



---

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

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

PhD értekezés

Szerző: **Németh Imre**

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

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék  
Környezeti Mikrobiológia és Biotechnológia Kutatócsoport



2025

# Tartalomjegyzék

1. Rövidítések.....	4
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1. Nanorészecskék jellemzői .....	7
3.1.1. Nanorészecskék definíciója.....	7
3.1.2. Nanorészecskék csoportosítása és felhasználása .....	7
3.1.3. Nanorészecskék megjelenése és sorsa a környezetben .....	9
3.2. Nanoökotoxikológia .....	12
3.2.1. Nanoökotoxikológia vonatkozású szabályozások.....	14
3.3. Nanoanyagok környezetre gyakorolt hatásai.....	18
3.3.1. Nano cink-oxid és nano titán-dioxid hatása a környezetre .....	19
3.3.1.1. Egy fajt alkalmazó tesztrendszerekben leírt hatások.....	19
3.3.1.2. Mikrobiális közösségre gyakorolt hatások .....	20
3.3.1.3. Bakteriális kommunikáció és befolyásolása nanoanyagokkal .....	22
3.3.2. Nano grafén-oxid hatása a környezetre .....	25
3.4. Nano-bioremediáció .....	29
3.4.1. Policiklusos aromás szénhidrogének.....	32
3.4.1.1. Policiklusos aromás szénhidrogének jellemzése .....	32
3.4.1.2. Bioremediációs technikák policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok esetén .....	34
3.5. Nanorészecskék környezetre gyakorolt hatása és alkalmazhatóságuk bioremediációs eljárásokban - a szakirodalom összefoglaló értékelése .....	36
4. Célkitűzés.....	38
5. Anyagok és módszerek .....	40
5.1. Felhasznált nanorészecskék.....	40
5.1.1. Nano cink-oxid.....	40
5.1.2. Nano titán-dioxid .....	40
5.1.3. Nano grafén-oxidok .....	41
5.2. Nanoanyagok környezetre gyakorolt hatásának vizsgálata komplex megközelítéssel .	42
5.2.1. Nano grafén-oxid toxicitásának vizsgálata és potenciális környezeti kockázatának jellemzése .....	42
5.2.1.1. Egy fajt alkalmazó tesztrendszerek .....	42
5.2.1.2. Mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése.....	43

5.2.2. Nano cink-oxid és nano titán-dioxid hatásának vizsgálata .....	44
5.2.2.1. Mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése.....	44
5.2.2.2. Bakteriális kommunikációra gyakorolt hatás felmérése.....	44
5.3. Enzim alapú technológia fejlesztése és hatékonyságának felmérése policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok bioremediációjára .....	45
5.3.1. Metagenomikai úton tervezett enzimek talajremediációban történő vizsgálata.....	45
5.3.2. Cink-oxid bioremediációs eljárás hatékonyságára gyakorolt hatásának felmérése	46
5.4. Statisztikai analízis .....	47
6. Eredmények és értékelésük .....	48
6.1. Grafén-oxid, illetve cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék környezetre gyakorolt hatásának jellemzése környezettoxikológiai megközelítéssel .....	48
6.1.1. Grafén-oxid nanorészecskék környezetre gyakorolt hatásának és kockázatának jellemzése és értékelése egy fajt alkalmazó tesztrendszerekben.....	48
6.1.2. Grafén-oxid nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatása fiziológiai profilozás (CLPP) alapján .....	61
6.1.3. Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatása fiziológiai profilozás (CLPP) alapján.....	64
6.1.3.1. A titán-dioxid és cink-oxid nanorészecskék enzimaktivitásra gyakorolt hatása .....	64
6.1.3.2. Cink-oxid nanorészecskék hatása mikrobiális közösségre .....	64
6.1.3.3. Titán-dioxid nanorészecskék hatása mikrobiális közösségre .....	72
6.1.4. Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék hatása a bakteriális kommunikációra ...	82
6.1.4.1. A vizsgált nanorészecskék toxicitása a tesztorganizmusra .....	82
6.1.4.2. A vizsgált nanorészecskék kvórum-szabályozott folyamatokra gyakorolt hatása .....	85
6.2. Enzim-alapú technológiafejlesztés policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok bioremediációjára .....	91
6.2.1 Metagenomikai úton tervezett enzimek hatékonysága talajremediáció során .....	91
6.2.2. Cink-oxid nanorészecskék bioremediációs technológiára gyakorolt hatása.....	94
6.2.2.1. Mikrobiális aktivitás a kezelések után.....	94
6.2.2.2. Szennyezőanyag eltávolítási hatékonyság.....	96
6.2.2.3. A biológiai aktivitás és a szennyezőanyag-eltávolítás hatékonyságának átfogó értékelése .....	101
7. Összefoglalás.....	105
8. Új tudományos eredmények.....	107
9. Irodalomjegyzék.....	109
10. Közlemények.....	154

11. Mellékletek.....	157
11.1. Irodalmi összefoglaló mellékletei.....	157
11.2. A vizsgálatok során alkalmazott módszerek leírása.....	167
11.2.1. Különböző tesztorganizmusokra gyakorolt hatás felmérése .....	167
11.2.1.1. <i>Aliivibrio fischeri</i> biolumineszcencia és enzimaktivitás vizsgálat .....	167
11.2.1.2. <i>Escherichia coli</i> szaporodás, enzimaktivitás, ROS termelés vizsgálat.....	168
11.2.1.3. Genotoxicitás vizsgálata SOS ChromoTest™ tesztrendszerrel.....	169
11.2.1.4. <i>Tetrahymena pyriformis</i> szaporodás és enzimaktivitás vizsgálat .....	169
11.2.1.5. <i>Panagrellus redivivus</i> mortalitás vizsgálat .....	170
11.2.1.6. <i>Sinapis alba</i> és <i>Triticum aestivum</i> csírázás, gyökér- és szárhosszfejlődés vizsgálat .....	170
11.2.2. Bakteriális kommunikációra gyakorolt hatás felmérése .....	170
11.2.2.1. A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilmképzésének vizsgálata .....	171
11.2.2.2. A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pioverdin termelésének vizsgálata .....	171
11.2.3. Mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése .....	172
11.2.3.1. Vízi közösségre gyakorolt hatás felmérése.....	172
11.2.4. Policiklusos aromás szénhidrogénnel szennyezett talajok remediációja.....	175
11.2.4.1. Talajlakó mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése .....	176
11.2.4.2. Szennyezőanyag koncentrációjának mérése.....	177
11.3. Az értekezés tárgyához tartozó kiegészítő eredmények és információk.....	177
11.3.1. A grafén-oxid szuszpenziók fizikai-kémiai jellemzői .....	177
11.3.2. Grafén-oxidot alkalmazó kísérletek eredményei.....	179
12. Köszönetnyilvánítás .....	184
13. Nyilatkozatok .....	185

# 1. Rövidítések

AF – Értékelési tényező (Assessment Factor)

AHL – N-acil-homoszerin-lakton (N-Acyl-Homoserine Lactone)

ANOVA – Varianciaanalízis (Analysis of Variance)

AUC – Görbe alatti terület (Area Under the Curve)

AWCD – Átlagos színfejlődési érték (Average Well Colour Development)

CLPP – Közösségi szintű profilozás (Community Level Physiological Profiling)

CNT – Szén nanocső (Carbon Nano Tube)

D – Simpson-index

DOC – Oldott szerves szén (Dissolved Organic Carbon)

DV – Desztillált víz

E – Shannon-egyenletesség (Shannon Evenness)

EC – Hatásos koncentráció (Effective Concentration)

EC<sub>20</sub> – 20%-os gátlást okozó hatásos koncentráció

EC<sub>50</sub> – 50%-os gátlást okozó hatásos koncentráció

EPH – Extrahálható kőolaj-szénhidrogének (Extractable Petroleum Hydrocarbons)

EPS – Extracelluláris polimer mátrix (Extracellular Polymeric Substances)

G – Gini-index

H – Shannon-index

IARC – Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (International Agency for Research on Cancer)

ISO – Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization for Standardization)

LC<sub>50</sub> – Letális koncentráció (Lethal Concentration): Az egyedek 50%-ának pusztulását okozó koncentráció

MIC – Legkisebb, teljes gátló hatást okozó koncentráció (Minimum Inhibitory Concentration)

MOF – Fém-szervesanyag térháló (Metal-Organic Framework)

nGO – Nano grafén-oxid

NP – Nanorészecske (Nanoparticle)

nSiO<sub>2</sub> – Nano szilícium-dioxid

nTiO<sub>2</sub> – Nano titán-dioxid

nZnO – Nano cink-oxid

nZnO<sub>2</sub> – Nano cink-peroxid

nZVI – Nano zéró-vegyértékű vas (Nano Zero-Valent Iron)

OD – Optikai denzitás (Optical Density)

OECD – Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organization for Economic Co-operation and Development)

QS – Baktériumok közötti kommunikáció / kvórum érzékelés (Quorum Sensing)

QQ – Baktériumok közötti kommunikáció / kvórum érzékelés csillapítása (Quorum Quenching)

PEC – Előrejelzett környezeti koncentráció (Predicted Environmental Concentration)

PNEC – Előrejelezhetően hatás nélküli koncentráció (PNEC – Predicted No Effect Concentration)

PQS – *Pseudomonas* kinolon szignálmolekula (*Pseudomonas* Quinolone Signal)

RCR – Környezeti kockázatot jellemző arányszám (Risk Characterisation Ratio)

RQ – Kockázati tényező (Risk Quotient)

ROS – Reaktív oxigén származék (Reactive Oxygen Species)

RMANOVA – Ismételt mérések varianciaanalízis (Repeated Measures Analysis of Variance)

SAWCD – Szubsztrátcsoportonkénti átlagos színfejlődési érték (Substrate Average Well Colour Development)

SC – Legkisebb hatásos koncentráció (Smallest Concentration)

SR – Szubsztrátszám (Substrate Richness)

TPH – Összes alifás szénhidrogének (Total Paraffin Hydrocarbons)

U – McIntosh-index

US EPA – Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (United States Environmental Protection Agency)

VPH – Illékony kőolaj-szénhidrogének (Volatile Petroleum Hydrocarbons)

ZOI – Gátlási zóna (Zone of Inhibition)

## 2. Bevezetés

A nanotechnológia fejlődése az emberi társadalom számos területén hozott már 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, 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. Mivel rendkívül sok tényező befolyásolja hatásukat, és nincs a hatásvizsgálataikra alkalmazott egységes vizsgálati módszer, ezért különböző irányelveket határoztak meg a nanorészecskék környezeti kockázatfelmérése céljából.

Ehhez kapcsolódóan egyrészt célom volt a cink-oxid, titán-dioxid és grafén-oxid nanorészecskék környezeti kockázatfelmérést támogató hatásvizsgálata környezettotoxicológiai módszerekkel. A kutatás során nem csupán egy-egy fajra fókuszáló tesztrendszereket alkalmaztam, hanem mikrokozmosz vizsgálatokat is végeztem, melyek lehetővé tették, hogy komplexebb, ökológiai rendszerekben tanulmányozzam a nanorészecskék hatásait, különös tekintettel a talajlakó és vízi mikrobiális közösségekre, valamint ezek metabolikus aktivitására. Mindemellett feltérképeztem, hogy miként befolyásolják a nanorészecskék a mikroorganizmusok közötti kommunikációt és a mikrobiális ökoszisztémák működését.

A nanorészecskék egyre növekvő felhasználása miatt azok környezetbe jutása is fokozódik, emiatt kritikus fontosságú, hogy megértsük azokat a kölcsönhatásokat, amelyek az élővilág és a nanoméretű anyagok között zajlanak. Mindemellett a környezetbe jutásuk, valamint felhalmozódásuk mértékének növekedése jelentős kihívás elé állítja a környezetvédelmi szabályozást és a fenntartható fejlődést.

A hagyományos szennyezőanyagokkal szemben a nanorészecskék eltérően viselkedhetnek 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. A kutatás multidiszciplináris megközelítésének céljából a kémia, a biológia, az ökotoxikológia és a környezetmérnöki tudományok területén szerzett ismereteket alkalmaztam, hogy átfogó képet kapjak a nanorészecskék élővilágra és ökoszisztémákra gyakorolt hatásairól.

A nanoanyagok hatásvizsgálata mellett doktori munkámban kiemelt szerepet kapott a cink-oxid nanorészecskék hatékonyságának felmérése is egy környezetbarát kockázatcsökkentési biotechnológia fejlesztéséhez kapcsolódóan.

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.

Az értekezés arra törekszik, hogy előmozdítsa ezen kölcsönhatások tudományos megértését, és alapot teremtsen a további kutatásokhoz, melyek a nanotechnológiai alkalmazások és a környezet harmóniájának elősegítéséhez járulhatnak hozzá.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. Nanorészecskék jellemzői

Napjainkban a nanotechnológia egyre nagyobb figyelmet kap a rendkívül sokrétű felhasználási területeinek köszönhetően. A növekvő érdeklődés és igény miatt fokozott volumenben szükséges a nanoanyagok előállítása, melynek következtében fontos felmérni a környezetre és élőlényekre gyakorolt hatásukat.

##### 3.1.1. Nanorészecskék definíciója

A „nano” előtag a görög „νάνοσ” (ejtése: nánosz) szóból ered, mely magyar megfelelője a „törpe”. A nanorészecske kifejezés egyes szerzők számára olyan anyagokat jelent, melyek mérete a nano mérettartományban ( $10^{-9}$ m) van, míg általános értelmezés szerint azon anyagok tartoznak közéjük, melyek kiterjedése legalább egy dimenzióban 1–100 nm közötti (Sharma és mtsai., 2012; Martínez és mtsai., 2021).

##### 3.1.2. Nanorészecskék csoportosítása és felhasználása

A nanoanyagokat különböző szempontok szerint csoportosíthatjuk, például eredetük, összetételük, dimenziójuk, porozitásuk, kristályosságuk szerint (Barhoum és mtsai., 2022; Eker és mtsai., 2024).

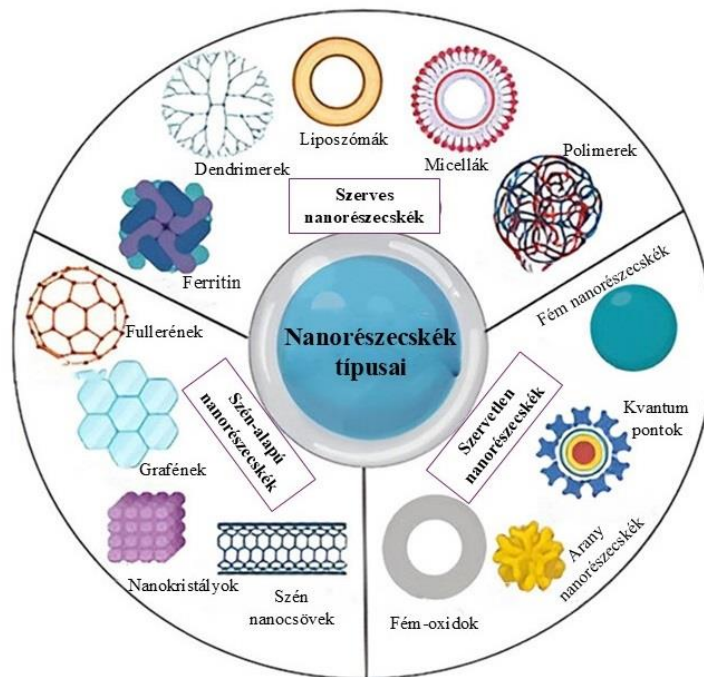
Eredetük szerint lehetnek természetes úton keletkező, illetve antropogén forrásból származó nanorészecskék. Utóbbi kategória további alcsoportokra bontható, véletlenül keletkező, illetve mesterségesen előállított nanorészecskékre. Utóbbi kategóriába azon nanorészecskék tartoznak, amelyeket előre meghatározott jellemzők (méret, összetétel) alapján, tervezetten állítanak elő, míg a véletlenül keletkező nanoanyagok természetes és spontán módon alakulnak ki (például a cigarettafüstből, kipufogógázból vagy tüzekből fakadóan). Ezt a kategóriát bizonyos esetekben nehéz megkülönböztetni a természetes úton keletkező nanorészecskéktől (Martínez és mtsai., 2020; Cao és mtsai., 2021; Tran és mtsai., 2024), amely kategóriába sorolhatók többek között az élőlények (például növények, mikrobák) által előállított nanorészecskék (Xia és mtsai., 2010; Raut és mtsai., 2024). Nanorészecskék jöhetnek létre a mikrobiális légzés, a metabolikus folyamatok, továbbá a mikrobák bomlása során (Mishra és Sundaram, 2023). Természetes nanorészecskék közé tartoznak továbbá a vulkáni tevékenység, szél- és talajerózió következtében létrejövő nanoanyagok (Tran és mtsai., 2024), tengeri sókból származó, levegőben szálló nano-kristályok (Nowack és Bucheli, 2007), valamint talajokban lévő szerves- és szervetlen nanorészecskék (mint talajkolloidok, agyagásványok, fém-oxidok, huminsavak) (Buffle, 2006; Theng és Yuan, 2008). A technológia fejlődésének köszönhetően mesterségesen is állítanak elő a természetesen keletkező nanoanyagok tulajdonságaihoz hasonló nanorészecskéket (Barhoum és mtsai., 2022). A nanorészecskék mesterséges úton történő előállításának módjai két kategóriába sorolhatók: „fentről-lefelé” (top-down) és „alulról-felfelé” („bottom-up”) technikák alapján. Előbbi esetén a kívánt méretű és alakú részecskéket nagyobb szemcseméretű, tömbfázisbeli anyagok marásával, vagy őrlésével hozzák létre, míg utóbbi esetén ellenkezőleg, kisebb alegységekből hoznak létre komplex szerkezeteket (Sharma és mtsai., 2012; Abid és mtsai., 2022).

Attól függően, hogy a nanorészecskék mennyi dimenzióban kisebbek 100 nm-nél, megkülönböztetünk 0D, 1D, 2D, 3D nanoanyagokat (Barhoum és mtsai., 2022).

A 0D nanorészecskék mindhárom dimenzióban kisebbek 100 nm-nél, így közéjük tartoznak a kvantum pöttyök, mágneses nanorészecskék, polimer nanorészecskék. Fotokémiai tulajdonságaik miatt gyakran alkalmazzák őket optikai eszközökben (Wang és mtsai., 2020b).

Az 1D nanorészecskék 1 dimenzióban nagyobbak 100 nm-nél, így a fém és fém-oxid nanorészecskék mellett a nanocsövek, nanoszálak a csoport képviselői. Gyakran alkalmazzák őket orvostechikai célokra, mint sebkezelésre, szövetfejlesztésre (Jeevanandam és mtsai., 2020). A 2D nanorészecskék két dimenzióban is 100 nm feletti, így többnyire vékony réteges felépítésűek, lemezes szerkezettel, mint például a grafén, grafén-oxid, szilikátok, antimonit (Jin és mtsai., 2018). A 3D nanorészecskék három dimenzióban is 100 nm feletti, és közéjük tartoznak a doboz-formájú grafén, strukturált nanohuzalok és nanocsövek. Ezeket az anyagokat elsősorban az energiaátalakításra, illetve tárolásra szolgáló üzemanyagcellák, akkumulátorok gyártásánál használják, továbbá napelemekben, robotikában, orvostechikai eszközökben és víztisztításban (Nnaji és mtsai., 2018; Zhao és Lei, 2020).

A nanorészecskék típusait és szerkezetét szemlélteti az 1. ábra.



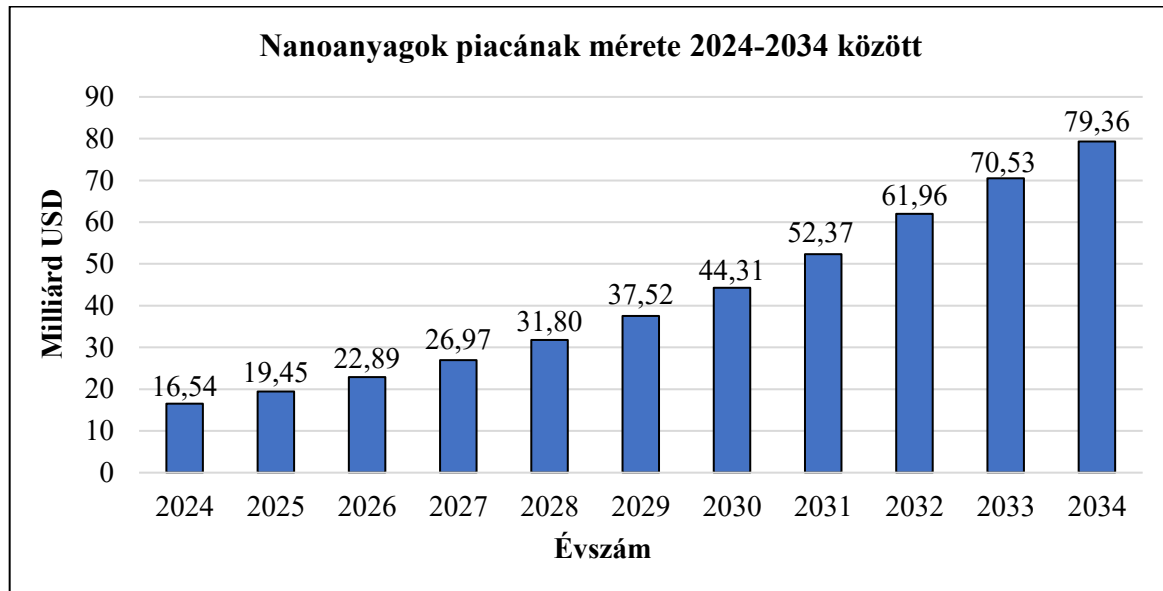
1. ábra: Nanorészecskék típusai (Dhall és mtsai., 2024 nyomán)

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, mivel így befolyásolható többek között az oldhatóság, diffúzió, stabilitás, felezési idő (Hughes és Asmatulu, 2021).

A nanorészecskék használata jelentős mértékben növekedett a tudomány, orvostechnika és gyógyszerészet, elektronika, távközlés és egyéb ipari területeken. Különösen a fém-oxid nanorészecskék alkalmazása nyert teret a mezőgazdaságban, háztartási cikkekben és az energiatermelésben (Hendricks és mtsai., 2023; Kerin és mtsai., 2023). Például a mangán-dioxid ( $MnO_2$ ) nanorészecskéket katalizátorként alkalmazzák (Al-Tamimi, 2021), míg a titán-dioxid ( $TiO_2$ ) és cink-oxid ( $ZnO$ ) nanorészecskék a leggyakrabban alkalmazott nanoanyagok kozmetikai termékekben, például fényvédő krémekben, testápolókban, szappanokban, szájvízben (Adawi és mtsai., 2018; Mishra és Sundaram, 2023; Phatak és mtsai., 2024), valamint az élelmiszeriparban csomagolóanyagként (Singh és mtsai., 2009; Contado, 2015; El-Kady és mtsai., 2023; Tran és mtsai., 2024). A  $TiO_2$  megtalálható étrend-kiegészítőkben, szósokban és öntetekben, növényi alapú tejszínhelyettesítőkben, édességekben és rágógumikban (Ropers és mtsai., 2017).

Mezőgazdaságban történő alkalmazásuk során a talajokba közvetlenül juttatják ki őket nano-műtrágyák, vetőmagkezelő szerek, nano-pesticidok és hidropóniás oldatok formájában (Rajput és mtsai., 2020; Kumar és mtsai., 2023b). Emellett szennyezett közegek (talajok, vizek) kezelésére is alkalmazzák őket, így például vas-nanorészecskéket talajvíz tisztítására (Hughes és Asmatulu, 2021).

Mindezek következtében a nanoanyagok kereskedelmi forgalma rendkívüli mértékben növekszik, és az előrejelzések szerint ez a továbbiakban még nagyobb mértékben emelkedni fog (2. ábra).



**2. ábra:** Nanoanyagok kereskedelmi forgalmának előrejelzése a 2024-2034 közötti időszakra vonatkozólag (Bidwai, 2025 nyomán)

Kérdéses azonban, hogy nanorészecskék alkalmazásának előnyei, meghaladják-e a hozzájuk köthető költségeket és az alkalmazással kapcsolatos környezeti hatásokat, ismeretlen veszélyeket.

### 3.1.3. Nanorészecskék megjelenése és sorsa a környezetben

A nanorészecskék ipari és háztartási felhasználásának jelentős növekedése (Singh, 2023) következtében azok elkerülhetetlenül megjelennek a környezetben, és az ökoszisztémákra kifejtett hatásuk révén figyelmet kell fordítani azok lehetséges kockázataira (Jan és mtsai., 2022; Murali és mtsai., 2022; Yang és mtsai., 2023).

A nanorészecskék élettartamuk bármely szakaszában bekerülhetnek a környezetbe (Mishra és Sundaram, 2023):

- természetes folyamatok (például vulkánkitörés, erdőtűz, talajerózió) révén,
- a nanorészecskék gyártása és a nanorészecskéket tartalmazó termékek előállításánál,
- a nanorészecskék használata közben, valamint
- a nanorészecskéket tartalmazó termékek hulladékkezelése során.

A nanorészecskék természetes úton a légtérbe elsősorban vulkáni tevékenységek, erdőtüzek, talajerózió, villámlások és porviharok során kerülhetnek (Smita és mtsai., 2012; Mishra és Sundaram, 2023).

Az ipari tevékenységek során a nanorészecskék szándékosan, a gyártás részeként vagy melléktermékként is keletkezhetnek. Számos termék, például bevonatok, festékek, pigmentek

és katalitikus adalékok tartalmaznak nanorészecskéket. Továbbá hegesztés során is juthatnak a levegőbe nanorészecskék (Gomes és mtsai., 2012). A különböző égési folyamatokból (például kipufogógáz, erőművek) is kerülhetnek nanorészecskék a levegőbe. Ermolin és munkatársai (2017) kimutatták, hogy palládium nanorészecskék keletkeznek a kipufogógázokban. A közúti közlekedés a levegőben lévő nanorészecskék elsődleges forrása, különösen a forgalmas területeken (Rönkkö és Timonen, 2019; Belkacem és mtsai., 2022).

A gyártási tevékenységek során a nanorészecskék a kibocsátott anyagok (például füst, szennyvíz) révén kerülhetnek a környezetbe. Megtalálhatók továbbá a hulladékégetések során visszamaradó hamuban, salakban, illetve gázokban (Holder és mtsai., 2013; Vejerano és mtsai., 2014). A nanorészecskék környezetbe történő kibocsátása történhet közvetlenül vagy közvetetten, például szennyvíztisztító telepek vagy hulladéklerakók révén (Reinhart és mtsai., 2010). A hulladéklerakókból elszivárgó víz szintén jelentős mennyiségű nanorészecskét juttat a vízi ökoszisztémába és a talajba (Malakar és Snow, 2020; Wang és mtsai., 2020a; Mishra és Sundaram, 2023). Emellett a kezeletlen, és a szennyvíztisztítókból kezelt szennyvízzel is nagy mennyiségű nanorészecske juthat a vízi rendszerekbe (Abdolapur Monikh és mtsai., 2021; Tran és mtsai., 2024), ahol akár mikrométeres nagyságrendű aggregátumokat képezhetnek, melyek leülepedhetnek és felhalmozódhatnak az üledékekben (Keller és mtsai., 2010).

Összességében elmondható, hogy az antropogén tevékenységek révén a nanorészecskék közvetlenül környezetbe történő kijuttatása mellett a szennyvizek és hulladéklerakók csurgalékvíze révén is bekerülhetnek az ökoszisztémába, így a vizekbe, talajba, levegőbe egyaránt.

Keller és munkatársai (2013) tanulmánya szerint a globálisan előállított nanorészecskék 63–91%-a hulladéklerakókban végzi, míg a többi a talajba (8–28%), a vizekbe (0,4–7%) és a levegőbe (0,1–1,5%) kerül. Az évente gyártott több mint 400 tonna ezüst (Ag) nanorészecske jelentős környezetterhelést okoz (Padhye és mtsai., 2023; Tran és mtsai., 2024), a réz (Cu) nanorészecskékhez hasonlóan. Utóbbi esetén egyes becslések szerint a környezetbe kibocsátott réz nanorészecskék több mint 95%-a végül vízi üledékekbe és talajokba kerül, ahol felhalmozódva akár 500 µg/kg koncentrációt is elérhet (Keller és mtsai., 2017). A szén alapú nanorészecskék 90%-a gyártási folyamat során kerül a környezetbe (Sun és mtsai., 2016).

Egy braziliai ipari övezet légterében a fém alapú nanorészecskék 14,2–467 nm mérettartományban voltak jelen (Souza és mtsai., 2021). Európában a felszíni vizek üledékében található szén-nanocsövek (Carbon Nano Tube – CNT) koncentrációját 6,7 µg/kg-nak, míg a titán-dioxid (TiO<sub>2</sub>) nanorészecskék koncentrációját 40 mg/kg-nak becsülték (Sun és mtsai., 2016). Továbbá a szennyvíziszapban lévő nano TiO<sub>2</sub> dózisát 170 mg/kg-nak prognosztizálták (Sun és mtsai., 2014). Mindemellett a hulladékégetésből visszamaradó salak nanorészecske koncentrációját mg/kg nagyságrendűnek jósolták (Sun és mtsai., 2016). A cink-oxid (ZnO) nanorészecskék előállításának mértéke világszinten 550–10000 tonna/év, így egyes becslések szerint annak koncentrációja a felszíni vizekben 0,001–0,058 µg/L, a talajban 0,24–0,661 µg/kg, és 0,22–1,42 µg/L a szennyvíztisztítókból elfolyó vizekben (Gottschalk és mtsai., 2009; Wu és mtsai., 2019a). Titán-dioxid esetén a szennyvíztisztítókból elfolyó vizekben 5–15 µg/L koncentrációt mértek (Kiser és mtsai., 2009). Ezzel szemben Sun és munkatársai (2016) arról számoltak be, hogy a nano TiO<sub>2</sub> koncentrációja a felszíni vizekben 2,17 µg/L, üledékekben 43,1 mg/kg, talajokban 2,94 µg/kg, szennyvíziszappal kezelt talajokban 61,1 mg/kg, a levegőben pedig 2,05 ng/m<sup>3</sup> átlagosan. Nano cink-oxid esetén az alábbi értékeket határozták meg modellezés alapján: felszíni vizekben 0,38 µg/L, üledékekben 6,97 mg/kg, talajokban 1,82 µg/kg, szennyvíziszappal kezelt talajokban 1,82 mg/kg, a levegőben pedig 0,94 ng/m<sup>3</sup>.

Miután a nanorészecskék a környezetbe kerültek, különféle átalakuláson mennek keresztül, ami befolyásolja sorsukat és transzportjukat az eltérő környezeti elemekben; felhalmozódhatnak

különböző közegekben, mint például vízben, üledékekben, talajban, szennyvíziszapban és levegőben (Zhao és mtsai., 2021a; Mishra és Sundaram, 2023; Zhang és mtsai., 2025).

A nanorészecskék tulajdonságainak, illetve viselkedésének megváltozását számos tényező befolyásolja. Elsődleges szerepe van a részecskék méretének, alakjának, felületi kémiai tulajdonságainak, aggregációra való képességének azok stabilitására, mobilitására és perzisztenciájára. Továbbá a nanorészecskék és az abiotikus környezeti elemek közötti kölcsönhatások is jelentősen módosítják a nanorészecskék környezetben való viselkedését és ökotoxikológiai hatásukat (Abbas és mtsai., 2020; Li és mtsai., 2025).

A nanorészecskék sorsára a környezeti tényezők, például a hőmérséklet, a pH, a redoxpotenciál, a sótartalom és más vegyi anyagok jelenléte is hatással van. A hőmérséklet-ingadozások befolyásolhatják a nanorészecskék stabilitását, oldhatóságát és fázisátalakulását, míg a nyomásváltozás hatással lehet azok diszperziójára és aggregációjára. Továbbá a közeg pH értéke is jelentősen megváltoztathatja a nanorészecskék viselkedését. A nanorészecskék oldódási és aggregációs folyamatokon mehetnek keresztül a pH-változások hatására, ami módosítja stabilitásukat és reakcióképességüket (Fernando és Zhou, 2019; Schneider és mtsai., 2021; Mishra és Sundaram, 2023). A környezeti redoxfeltételek hatással vannak a nanorészecskék felületi kémiai tulajdonságaira. Az idő múlásával a nanorészecskék öregedési folyamatokon mennek keresztül, amelyek kémiai átalakulásokat, aggregációt és bomlást foglalnak magukban. Ezenkívül a nanorészecskék területi eloszlása, bioakkumulációja és trófikus szintek közötti transzfere gyakran a környezeti közeg jellemzői által szabályozott. Ezek a folyamatok, a nanorészecskék transzportjával együtt meghatározzák a nanorészecskék viselkedését, illetve negatív hatásait (Peijnenburg és mtsai., 2015; Bundschuh és mtsai., 2018).

A nanorészecskék transzportja különböző környezeti elemekben is megvalósulhat (Souza és mtsai., 2021; Yusuf és mtsai., 2024).

A légkörben a nanorészecskék nagy távolságra juthatnak, majd eső vagy száraz ülepedés révén a talajba és a felszíni vizekbe kerülve eljuthatnak a tavakba, folyókba, tengerekbe (3. ábra) (Omara és mtsai., 2019; Hochella és mtsai., 2019; Malakar és Snow, 2020).

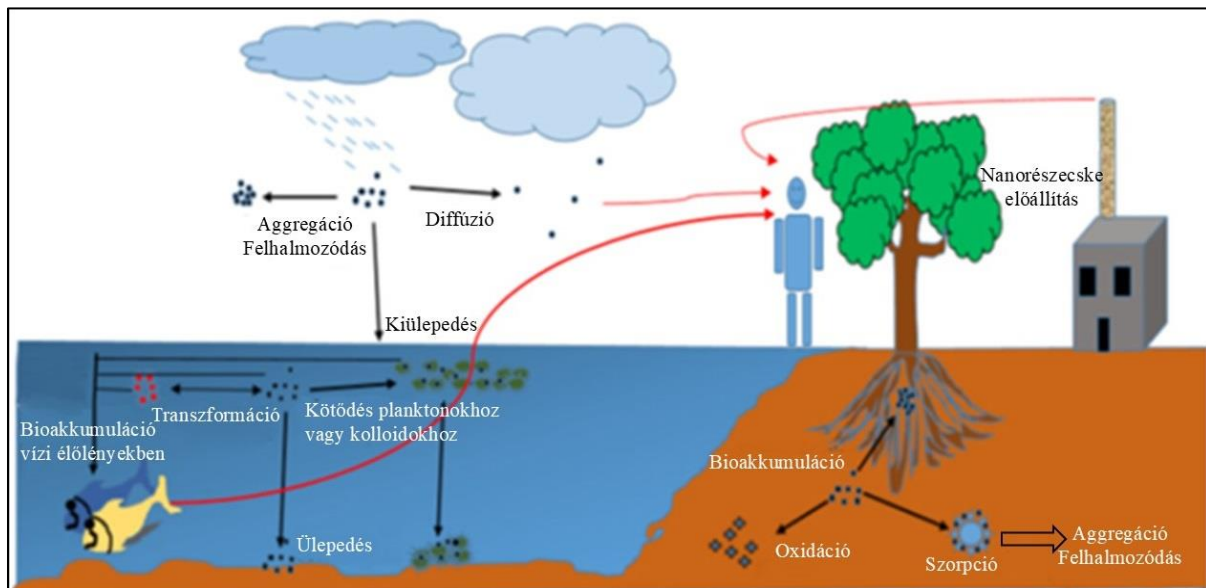
A légkörben a nanorészecskék bioaeroszolokhoz (biológiai forrásból származó levegőben lebegő részecskék) kapcsolódva is terjedhetnek légköri diszperzió, illetve ülepedés révén (Shammi és mtsai., 2021).

Vízi környezetben a nanorészecskék szuszpendált formában jelen lehetnek a vízben, leülepedhetnek az üledékbe, vagy szerves anyagokhoz kapcsolódhatnak. A talajban függőleges irányban szivárgással vagy oldalirányban felszíni lefolyással vándorolhatnak. Mivel a szárazföldi és vízi környezetben számos vegyi anyag megtalálható, a nanorészecskék vektorként funkcionálhatnak egyes szerves és szervetlen szennyezőanyagok tekintetében (Zhang és mtsai., 2007; Oliveira és mtsai., 2021).

A nanorészecskék különböző bio- vagy geotranszformációs folyamatokon mehetnek keresztül (Rajput és mtsai., 2020). Ezek a transzformációk döntő szerepet játszanak a nanorészecskék biológiai hozzáférhetőségének és toxicitásának alakulásában. Ennek következtében toxikus hatású oxidatív stresszt idézhetnek elő, ami például a növények általi felszívódás (Ali és mtsai., 2021; Wang és mtsai., 2023; Sembada és Lenggoro, 2024), vagy a talajban és vízi ökoszisztémában lévő élőlényekbe jutás révén potenciális veszélyt jelenthet az emberi egészségre is, mivel bioakkumuláció útján bekerülhetnek az élelmiszerláncba (Abdolapur Monikh és mtsai., 2021; Li és mtsai., 2022; Zeng és mtsai., 2024; Jumle és mtsai., 2025). A nanorészecskék emberi szervezetbe jutásának elsődleges útjai az élelmiszerek és italok fogyasztása mellett a légzőrendszeren és a bőrön keresztül történő felvétel (Yang és mtsai., 2021).

Így például helyileg alkalmazott krémekből a vízzel, levegővel és talajjal való érintkezés révén kerülhetnek a környezetbe (Polonini és Brayner, 2015; Yokota és Kyotani, 2018; Dzyhovskiy és mtsai., 2024). Ropers és munkatársai (2017) szerint az Egyesült Államokban a  $\text{TiO}_2$  fogyasztása napi 0,20–0,70  $\mu\text{g}/\text{testtömegkilogramm}$ , míg az Egyesült Királyságban és Németországban körülbelül 1,0  $\mu\text{g}/\text{testtömegkilogramm}$  naponta.

A nanorészecskék a szervezetbe lépve a vér- vagy a nyirokrendszer révén különböző szervekbe (például szív, gyomor, vese, máj, tüdő) juthatnak (Polonini és Brayner, 2015; Ji és mtsai., 2024). Az emberi testből a kiválasztórendszeren keresztül, valamint anyatejjel távoznak, azonban felhalmozódhatnak a szervezetben, elsősorban a májban és a lépben (Maharramov és mtsai., 2019; Kumar és mtsai., 2023a; Mishra és Sundaram, 2023). Ezek hatásának felmérésére toxikológiai vizsgálatok szükségesek, ugyanakkor az emberekre és más élőlényekre gyakorolt hatástanulmányokra eltérő módszereket javasoltak (Huang és mtsai., 2021).



3. ábra: A nanorészecskék sorsa és viselkedése a környezetben (Omara és mtsai., 2019 nyomán)

### 3.2. Nanoökotoxikológia

A környezetoxikológia a környezetbe került vegyi anyagok ökoszisztéma tagjaira gyakorolt hatását vizsgálja és ez alapján ad előrejelzést a teljes ökoszisztémára vonatkozólag. Mivel az ökoszisztéma minden alkotóelemére kiterjedő vizsgálat a jelenlegi tudásunk és a költségek miatt nem lehetséges, ezért választott fajok vagy tesztorganizmusok válaszreakciói alapján következtetünk az ökoszisztéma egészére (Gruiz és mtsai., 2001).

Az ökotoxikológia a szennyezőanyagok bioszféra alkotóelemeire gyakorolt hatásaival foglalkozik (Newman és Zhao, 2008).

Az ökotoxikológia kifejezést René Truhaut alkotta meg 1969-ben, aki a következőképpen határozta meg: a toxikológia azon ága, amely a természetes vagy mesterséges szennyezőanyagok ökoszisztémára – beleértve az emberre, állatokra, növényekre és mikroorganizmusokra – gyakorolt toxikus hatásainak tanulmányozásával foglalkozik (Truhaut, 1977). A környezet védelme érdekében nélkülözhetetlen a potenciális szennyezőanyagok ökototoxicitásának vizsgálata, így a nanoanyagok széleskörű alkalmazása miatt, azok ökotoxikológiai hatásainak vizsgálata is kiemelt jelentőségű (Boros és Ostafe, 2020).

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 komplex közösségekig. Ezek az információk nélkülözhetetlenek a nanoanyagok környezeti kockázatának felmérése céljából (Schirmer és Auffan, 2015).

Mindehhez több kihívás is társul: a biológiai kísérletek során alkalmazott nanorészecskék kiválasztása, valamint azok viselkedésének és fizikai-kémiai jellemzőinek vizsgálata a kísérletek előtt, alatt és után, figyelembe véve az expozíció során lehetséges közeget és releváns koncentrációt a biológiai hozzáférhetőség szempontjából. Szükséges vizsgálni a nanorészecskék felvételének lehetséges útjait az élőlények által különböző közegekben. A kísérletek során alkalmazott tesztorganizmusok és mért végpontok kiválasztása is kihívást jelent (Behra és Krug, 2008; Kahru és Dubourguier, 2010; Schirmer és Auffan, 2015). Mindemellett további nehézséget okoz, hogy még az ugyanabból az anyagból származó részecskék is teljesen eltérően viselkedhetnek kisebb módosítások (például felületi bevonat, eltérő méret) miatt. Ez az egyik fő különbség a klasszikus toxikológia és a nanotoxikológia között (Polonini és Brayner, 2015).

Noha egyre nagyobb szerepet kap a nanoanyagok potenciális környezeti kockázatának vizsgálata azok felhasználása és alkalmazása előtt, 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 kvantitatív kockázatértékelését. Bár a nanotoxikológiai kutatások az 1990-es években elkezdődtek, közel 10 év telt el a nanotoxikológiával foglalkozó tudományos közlemények számának exponenciális növekedéséig (Kahru és Dubourguier, 2010), mely azóta is folyamatosan növekszik.

A nanoanyagok ökotoxicitásának felmérésére vonatkozó növekvő igény miatt szükségessé vált a standard ökotoxikológiai teszt módszerek fejlesztése a nanoanyagok vizsgálatára. Habár az egyéb anyagok toxicitásának felmérésére szolgáló standard ökotoxikológiai teszt módszerek a nanoanyagokra is alkalmazhatók, bizonyos mértékű adaptációra és módosításra van szükség (Boros és Ostafe, 2020). Mindemellett a legkorszerűbb technológiákra is szükség van, így például a nagy áteresztőképességű szűrési módszerek segítségével gyorsan értékelhetővé válik számos nanoanyag hatása. Továbbá a különböző omikai technikák (genomika, transzkriptomika, proteomika és metabolomika) alkalmazása révén lehetőség nyílik a nanorészecskékre adott molekuláris válaszok átfogó feltérképezésére. Ezen kívül számítógépes modellezések révén előre jelezhető a nanorészecskék viselkedése komplex környezeti elemekben. Az említett technikák hozzájárulnak a különböző típusú nanorészecskék potenciális környezeti hatásainak predikciójához (Isibor és mtsai., 2024).

A vegyi anyagok szabályozási tesztelésére használt módszereket a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organization for Economic Co-operation and Development – OECD) tesztelési irányelvek programja keretében fejlesztik ki és teszik közzé. Az OECD és az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (United States Environmental Protection Agency US–EPA) által kidolgozott irányelvekben leírt standard tesztek közül több, nanoanyagokra is adaptálható módszer szerepel (Tschiche és mtsai., 2022), melyek közé tartoznak az algákon, békalencsén, bolharákokon, vízibolhákön, árvaszúnyogokon, szárazföldi növényeken, fonálférgeken és földigilisztákon alapuló módszerek. A nanoanyagok különböző élőlényekre gyakorolt hatásainak vizsgálata alapján a nanoanyagok hatásai megnyilvánulhatnak viselkedésbeli, morfológiai, sejtszintű, molekuláris vagy genetikai hatásokban (Boros és Ostafe, 2020).

A nanoanyagok toxicitására vonatkozó elérhető EC értékek (hatásos koncentráció, Effective Concentration – EC) alapján a legtöbb adat elsősorban vízi tesztrendszerek esetén áll rendelkezésre, és a vizsgálatok alapján a legérzékenyebb tesztorganizmusok közé tartoznak az algák, míg a legtoxikusabb nanoanyagok az ezüst nanoanyagok (Boros és Ostafe, 2020).

A nanorészecskék toxikológiai vizsgálatainak költségei közel 250 millió dollártól több, mint 1 milliárd dollárig terjednek. Az alapvetően biztonságosnak tekintett nanorészecskék esetén is szükségesek szűrővizsgálatok, míg az elővigyázatosság elve alapján végzett átfogó vizsgálatok hosszú távú *in vivo* tesztelést igényelnek (Choi és mtsai., 2009). Mivel folyamatosan új nanoanyagok jelennek meg, ezeknek a releváns tesztelése hosszú időt vesz igénybe kockázatuk jellemzéséhez. Erre megoldást jelenthetne Choi és munkatársai szerint (2009), ha kevésbé szigorú, de továbbra is kockázatkerülő megközelítéseket alkalmaznának.

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 kutatásokat, metodikai és technológiai fejlesztéseket egyaránt. Mivel a toxikológiai és egyéb vizsgálatok időigényesek, helyette javaslatok vannak az ún. elővigyázatossági megközelítés kialakítására és alkalmazására a nanotechnológiával és nanoanyagokkal kapcsolatban, így elkerülve a környezeti kockázatok kialakulását (Picecchi, 2018). Többszintű kockázatértékelési stratégiára lenne szükség, amely hasonló az EU REACH jogszabályához, a vegyi anyagok szabályozásával kapcsolatban (Choi és mtsai., 2009).

### 3.2.1. Nanoökotoxikológia vonatkozású szabályozások

A nanoanyagokhoz kapcsolódó tevékenységek és kutatások számos meglévő jogszabály hatálya alá tartoznak, azonban amikor egy konkrét nanorészecskére és annak különböző alkalmazási területeire vonatkozólag kell állást foglalni, gyakran nem egyértelmű, hogy az adott szabályozások valóban alkalmazhatók-e. A fő korlátozó tényezők közé tartozik, hogy hiányosak az ökotoxicitásra vonatkozó adatok, valamint a foglalkozási expozíciós határértékeket nem lehet meghatározni a meglévő módszerekkel (Hansen és Baun, 2012).

2006-ban az OECD munkacsoportot állított fel a gyártott nanoanyagok környezetre és humán egészségre gyakorolt hatásának vizsgálata és biztonságosságuk felmérése céljából (Demirbaş és Çevik, 2020). Munkájuk alapján (OECD, 2017) az OECD arra a következtetésre jutott, hogy a nanoanyagok azonosítása és jellemzése a hagyományos vegyi anyagokhoz képest további fizikai-kémiai tulajdonságok megadását igényli, mivel a nem nanoanyagok toxikológiai tulajdonságai nem feltétlenül egyenértékűek a nanoanyagokéval (Tschiche és mtsai., 2022).

Ennek következtében a meglévő tesztelési irányelvek (Test Guideline – TG) nanoanyagokra történő alkalmazásának adaptálásán, másrészt új tesztelési irányelvek vagy iránymutatási dokumentumok elkészítésén dolgoznak, amelyek kifejezetten a nanoanyagok jellemzésére vonatkoznak, így kidolgozva a nanoanyagok hatásági tesztelésére vonatkozó irányelveket, útmutatásokat (OECD, 2009; Rasmussen és mtsai., 2019; Tschiche és mtsai., 2022). Már több, nanoanyagokra vonatkozó irányelvet is elfogadtak: egy új tesztelési irányelvet a „Nanoanyagok diszperziós stabilitása szimulált környezeti közegekben” (TG318), valamint a „Szubakut légzési toxicitás: 28, illetve 90 napos vizsgálat” (TG412 és TG413) irányelvek adaptációját. Emellett több új irányelvet is fejlesztenek a fizikai-kémiai tulajdonságokra vonatkozóan, például a „Gyártott nanoanyagok részecskemérete és méreteloszlása” (TG125) és a „Gyártott nanoanyagok fajlagos felületének meghatározása” (TG124) irányelveket (OECD); melyek a nanorészecskék alapvető tulajdonságainak, így a méretnek és a felületnek a mérését segítik.

További új tesztelési irányelveket készítenek a nanorészecskék vízoldhatóságát, fém nanorészecskék oldódási sebességének meghatározását, valamint a nanoanyagok szennyvízből történő eltávolítását és vízi környezetben történő átalakulását illetően.

Mindemellett az OECD vizsgálta a nanorészecskék fizikai-kémiai jellemzőit és az elérhető teszt módszereket, amelyek alapján megbízható döntések hozhatók a nanorészecskék toxicitását illetően a fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján (Rasmussen és mtsai., 2018).

Az EU-ban az OECD tesztelési irányelveket beépítették a Vizsgálati Módszerek Szabályzatába (Európai Parlament, 2008). Ezenkívül a Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization for Standardization – ISO) olyan nanotechnológiához kapcsolódó szabványokat fejleszt, amelyek kiegészítik a hatósági tesztelési módszereket (Tschiche és mtsai., 2022).

Ennek céljából az ISO 2005-ben 33 résztvevő és 15 megfigyelő ország részvételével létrehozta a nanotechnológiával foglalkozó műszaki bizottságot (Technical Committee – TC), a TC229-et.

Az 1. táblázat az ISO/TC 229 műszaki bizottság WG3 (Working Group 3) munkacsoportja által összeállított ISO szabványokat sorolja fel, amelyek a nanotechnológiához kapcsolódóan a toxikológiai vizsgálati módszereket, munkahelyi biztonsági és egészségvédelmi intézkedéseket, valamint a fogyasztási cikkekkel kapcsolatos ajánlásokat tartalmazzák (Demirbaş és Çevik, 2020).

Az Európai Bizottság 2004-ben megjelent stratégiai céljai között is szerepelt a nanotechnológiához kapcsolódó irányelvek meghatározása, majd 2005-ben akciótervet alakítottak ki a nanotechnológiához, illetve azokkal összefüggésben lévő tudományokkal kapcsolatban (Eisenberger és mtsai., 2010; Kahru és Dubourguier, 2010). Mindezek eredményeként Európában a nanoanyagok jelenleg különböző uniós jogszabályok hatálya alá tartoznak, amelyek közül néhány különböző kifejezéseket használ, például nanoanyag, tervezett nanoanyag vagy nanoforma (Rauscher és mtsai., 2017). A jogszabályok közé tartozik a REACH (Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals) (Európai Parlament, 2006; Európai Bizottság, 2018), a CLP-rendelet (Classification, Labelling and Packaging Regulation) (Európai Vegyipari Bizottság, 2008), az Orvostechikai Eszközök Szabályozása (Európai Parlament, 2017), a Biocid Termékek Szabályozása (Európai Bizottság, 2012), az Új Élelmiszerek Szabályozása (Európai Parlament, 2015), valamint a Kozmetikai Termékek Szabályozása (Európai Bizottság, 2009). Ugyanakkor a REACH-ben, az ágazatspecifikus szabályozásokban, valamint a nemzeti nyilvántartásokban használt definíciók mind eltérőek, így ebben is harmonizációra lenne szükség (Tschiche és mtsai., 2022). Ha egy anyagot a jogszabályok valamelyike által nanoanyagként azonosítanak, az szabályozási rendelkezéseket von maga után. Ilyen rendelkezések például a specifikus követelmények, melyek az anyagok nano formaként történő azonosítására szolgálnak, vagy a nanoanyagokhoz kapcsolódó biztonsági szempontok. A REACH szerint regisztrációköteles, nano formában lévő anyagokra vonatkozó új információs követelmények 2020. január 1-jén léptek hatályba, melyet a REACH módosított mellékletei tartalmaznak (Európai Vegyipari Bizottság; Tschiche és mtsai., 2022).

A REACH a „nanoforma” kifejezést használja, és azt egy természetes vagy mesterséges anyag olyan formájaként definiálja, amely megfelel az Európai Bizottság (European Commission – EC) nanoanyagokra vonatkozó meghatározásának (Európai Bizottság, 2011). Ugyanakkor, a Bizottság 2022. június 10-én felülvizsgálta nanoanyagokra vonatkozó definícióját (Shao és Nymark, 2023). Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy az Európai Bizottság nanoanyagokra vonatkozó meghatározása jogilag kötelező érvényűvé vált a REACH hatálya alá tartozó anyagokra vonatkozóan, a rendeletnek megfelelő módosítások szerint.

Lehetőség van további nanoforma csoportok meghatározására, amelyekre vonatkozóan a veszély-, a kitettség- és a kockázatértékelés együttesen elvégezhető. Az ECETOC, egy európai ipari szövetség, létrehozott egy online felületet, amely támogatja az ilyen nano-csoportok létrehozását (Janer és mtsai., 2021).

**1. táblázat** – Nanotechnológiához kapcsolódó ISO szabványok (Demirbaş és Çevik, 2020 nyomán)

Szabvány sorszáma	Szabvány leírása
<b>Toxicitás: Teszt módszerek</b>	
ISO 29701:2010	Az endotoxin tesztelésére vonatkozó <i>in vitro</i> rendszerek – <i>Limulus</i> amebocyte lysate teszt.
ISO/TS 19337	Nano-objektumok jellemzőivel és mérési módszereivel kapcsolatos <i>in vitro</i> toxikológiai tesztek.
ISO/TS 19057	Nanoanyagok alkalmazása és sejtes <i>in vitro</i> tesztek módszertanai a nanoanyagok biodurabilitásának értékeléséhez.
ISO 10801:2010	Fém nanorészecskék belégzési toxikológiai tesztelésére.
ISO/TS 19007	Módosított MTS teszt alkalmazása a sejtek életképességének mérésére.
ISO 10808:2010	Nanorészecskék jellemzése és toxikológiai tesztelése belégzéses expozíció során.
ISO/TS 18827	Szintetizált cink-oxid nanoanyagok toxikológiai tulajdonságai fizikai-kémiai jellemzéssel.
ISO/TR 13014:2012	Útmutató nanoanyagok fizikai és kémiai jellemzésére.
ISO/TR 16196	Gyártott nanoanyagok adagolási módszerei és mintakészítési eljárásai.
ISO/TS 14101:2012	Arany nanorészecskék felületének jellemzése és toxikológiai tesztelése FT-IR módszerrel.
ISO/TS 16550:2014	Ezüst nanorészecskék vizsgálata.
ISO/TR 16197:2014	Gyártott nanoanyagok toxikológiai tesztelési módszereinek meghatározása.
<b>Munkahelyi biztonság és egészség</b>	
ISO/TR 12885:2012	Egészségügyi és biztonsági alkalmazások nanotechnológiával kapcsolatos munkahelyi környezetekben.
ISO/TS 18637	Nanoanyagok és azok aggregátumaira vonatkozó expozíciós határértékek kidolgozásáról szóló tanulmányok.
ISO/TR 13121:2013	Nanoanyagok kockázatkezelése.
ISO/TS 12901-2:2014	Nanoanyagokra alkalmazott kockázatkezelés.
ISO/TR 13329:2012	Biztonsági adatlapok (SDS) előkészítésére vonatkozó útmutató nanoanyagokhoz.
ISO/TS 12901-1:2012	Útmutató tervezett nanoanyagok kockázatkezeléséhez.
<b>Fogyasztási termékek</b>	
ISO/TS 13830:2013	Tanácsadás fogyasztói nanoanyagok önkéntes címkézéséről.

Az Európai Bizottság nanoanyagokra vonatkozó definíciójának (amely szerint az anyagban lévő részecskék minimum 50%-ának legalább egy dimenziójának mérete az 1 nm – 100 nm tartományba esik, továbbá azon fullerének, grafén-lemezek és egyrétegű szén-nanocsövek, amelyeknek legalább egy külső mérete kisebb, mint 1 nanométer) implementálása érdekében útmutatót készített (Sharma és mtsai., 2012; Tschiche és mtsai., 2022). Egy kapcsolódó jelentésben tisztázzák a definícióban használt kulcsfogalmakat és kifejezéseket, ez által megértést nyújt a terminológiáról (Rauscher és mtsai., 2019b).

Egy másik jelentésben a nanoanyagok azonosításához szükséges méréseket írja le, és megadja azokat szempontokat, amelyeket figyelembe kell venni a nanoanyagok definíció szerinti értékelése során (Rauscher és mtsai., 2019a). Emellett a “NanoDefine Methods Manual” című kézikönyvben általános információkat publikáltak a mérési módszerekről, folyamatokról és működési eljárásról (Mech és mtsai., 2020a). Ezek segítségével lehetőség nyílik arra, hogy megvizsgáljuk az anyagokat, hogy az Európai Bizottság általi definíció szerint nanoanyagoknak minősülnek-e (Mech és mtsai., 2020b). Ez szintén igaz a REACH szerint nyersanyagként vagy egy termék összetevőjeként feltüntetett anyagokra, de annak meghatározása, hogy egy piacon lévő készítmény vagy termék valóban tartalmaz-e nanoanyagokat, továbbra is egyedi analitikai vizsgálatot igényel (Tschiche és mtsai., 2022).

A nanoanyag meghatározásokhoz kapcsolódó különböző szabályozások áttekintése a 2. táblázatban látható.

**2. táblázat** – A nanoanyagokra vonatkozó Európai Uniói jogszabályok. A nanoanyag fogalom meghatározását tartalmazó jogszabályok kézzel, a definíció nélküliek pedig szürkével vannak jelölve (Tschiche és mtsai., 2022; Shao és Nymark, 2023 nyomán)

Szabályozás	Nanotechnológiához kapcsolódó definíció	Implementációt elősegítő szervezet
REACH (1907/2006/EK rendelet) és módosítása (2018/1881/EU rendelet)	Nanoforma	Európai Vegyipari Bizottság
Biocid termékekről szóló rendelet (528/2012/EU rendelet)	Nanoanyag	Európai Vegyipari Bizottság
Kozmetikai rendelet (1223/2009/EK rendelet)	Nanoanyag	Fogyasztói Biztonság Tudományos Bizottsága
Új élelmiszerekről szóló rendelet (2015/2283/EK rendelet)	Mesterségesen előállított nanoanyag	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
Élelmiszer-adalékanyagok rendelete (1333/2008/EK rendelet)	-	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
Élelmiszerrel érintkező műanyagok rendelete (10/2011/EK rendelet)	-	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
Élelmiszerrel érintkező aktív és intelligens anyagok rendelete (450/2009/EK rendelet)	-	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
A fogyasztók tájékoztatásáról szóló rendelet (1169/2011/EU rendelet)	Nanoanyag	-
Orvostechikai eszközökről szóló rendelet (2017/745/EK rendelet)	Nanoanyagok	Közös Kutatóközpont; Európai Gyógyszerügynökség; a tagállamok által kijelölt és bejelentett szervezetek

A Kozmetikai Termékek Szabályozása és az Új Élelmiszerek Szabályozása egyaránt előírja, hogy az ezekben a jogszabályokban szereplő nanoanyag meghatározást a technikai és tudományos fejlődéshez, illetve a nemzetközi szinten elfogadott meghatározásokhoz kell

igazítani. Az egyik lehetséges megoldás az lenne, ha ezek a szabályozások az Európai Bizottság által definiált nanoanyag meghatározást használnák, megfelelően kiegészítve az ágazatspecifikus rendelkezésekkel (Tschiche és mtsai., 2022). Mivel az Európai Bizottság 2022. június 10-én felülvizsgálta a nanoanyagokra vonatkozó ajánlott definícióját, ezért várható, hogy a különböző jogszabályi keretek ennek megfelelően frissítik a nanoanyagokra alkalmazott fogalommeghatározást (Nielsen és mtsai., 2023; Shao és Nymark, 2023).

A szabályozás szempontjából jelenleg probléma, hogy az EU-ban egyes, a nanoanyagokra vonatkozó 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.

Mivel a nanotechnológia fejlődésének köszönhetően folyamatosan új nanoanyagok jelennek meg, ezért szükség szerű a nanoökotoxicitás szabályozásának fejlesztése zöld technológiai tervezés, fenntartható gyártás és robusztus kockázatkezelés révén. Mindemellett a nanoanyagok szabályozására vonatkozó reaktív megközelítés helyett, tudományosan megalapozott, proaktív döntéshozatal szükséges a nanotechnológia általi környezeti kihívások és lehetőségek kezelésére (Fenntarthatósági Igazgatóság, 2025).

### 3.3. Nanoanyagok környezetre gyakorolt hatásai

A nanorészecskék a természetben két fő formában fordulnak elő. Lehetnek egy nagyobb méretű anyagban vagy annak felületén rögzítve (például kompozitban, mikronizált anyag felületének részeként stb.), illetve lehetnek szabad nanorészecskék, amelyek mobilisak a környezetben és az emberi testben is (Hansen és mtsai., 2008). Utóbbiak toxikológiai szempontból aggasztóbbak. A nanorészecskék által kiváltott hatások komplexitása részben abból fakad, hogy képesek kötődni és kölcsönhatásba lépni biológiai anyagokkal, miközben felületi tulajdonságaik az adott környezettől függően változnak (Polonini és Brayner, 2015).

A nanorészecskék az idő múlásával kémiai változásokon, aggregáción és bomlásokon mennek keresztül a környezetben, melyek meghatározzák azok sorsát, és végső soron toxicitásukat (Lowry és mtsai., 2012). Mivel a nanorészecskék tulajdonságai és a környezeti tényezők befolyásolják ezeket a folyamatokat, nehéz általánosítani a nanorészecskék toxicitását még enyhén eltérő környezeti feltételek mellett is (Lowry és mtsai., 2012; Riaz és mtsai., 2021; Mishra és Sundaram, 2023).

A kutatásom szempontjából kiemelt jelentőségű fém-oxid nanorészecskék, így a cink-oxid (ZnO) és titán-dioxid (TiO<sub>2</sub>) nanorészecskék különböző mechanizmuson keresztül fejtik ki toxikus hatásukat az élőlényekre. Mindkét nanorészecske típus esetén jellemző a reaktív oxigén származék (ROS – Reactive Oxygen Species) képzés, így elsősorban a szuperoxid anionok (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) és a hidroxil gyökök (•OH) termelése. Ezek a rendkívül reaktív származékok képesek károsítani a sejtmembránt, a fehérjéket és a DNS-t, ami az élőlények károsodásához, illetve pusztulásához vezet. Mindemellett ezen fém-oxid nanorészecskék fotokatalizátorként működnek UV-fénynek kitéve őket, mely erősíti a ROS képzést, így toxicitásukat (Hou és mtsai., 2019; Dey és mtsai., 2025; Takhar és Singh, 2025).

Ezen kívül a nZnO oldódása esetén Zn<sup>2+</sup> ionok szabadulnak fel, melyek a sejtfehérjékhez, nukleinsavakhoz és egyéb komponensekhez kapcsolódva gátolják a metabolikus aktivitást, mely szintén sejthalálhoz vezethet (Bordin és mtsai., 2024; Dey és mtsai., 2025).

Ezzel szemben a titán-dioxid nem oldható, emiatt a Ti<sup>4+</sup> ionok nem járulnak hozzá a TiO<sub>2</sub> toxicitásához (Hou és mtsai., 2019).

Ugyanakkor mindkét típusú nanorészecske nagy fajlagos felülete révén könnyen hozzátapad a sejtek membránjához, ahol elektrosztatikus hatások által a lipidek peroxidációját, illetve a membrán károsodását okozzák (Hou és mtsai., 2019; Dey és mtsai., 2025).

### 3.3.1. Nano cink-oxid és nano titán-dioxid hatása a környezetre

#### *3.3.1.1. Egy fajt alkalmazó tesztrendszerekben leírt hatások*

A nanorészecskék toxicitásának felmérésére vonatkozó kutatások száma rendkívüli mértékben növekszik, így a már régóta alkalmazott nZnO és nTiO<sub>2</sub> hatására vonatkozólag sok tanulmány született egy fajt alkalmazó tesztrendszerekben.

A nZnO antibakteriális hatását mind Gram-negatív, mind Gram-pozitív baktériumok esetén leírták, többek között olyan patogén mikrobák esetén is, mint a *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium TB*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Dey és mtsai., 2025).

A nZnO mikroorganizmusokra gyakorolt hatásairól szóló tanulmányokat szemlélteti az M1. táblázat.

A cink-oxid nanorészecskék növényekre gyakorolt hatásának felmérése során pozitív és negatív hatásokat egyaránt észleltek, melyet elsősorban fizikai-kémiai jellemzőik befolyásolnak (Strekalovskaya és mtsai., 2024). Csírázás-, illetve növekedésserkentő hatásuk mellett többen leírták, hogy növelik a klorofilltartalmat, emiatt gyakran alkalmazzák őket növények növekedési folyamatainak stimulálására. Ugyanakkor a csírázást, valamint a gyökér növekedését gátló, biomassza csökkentő hatásokról is beszámoltak már (M2. táblázat).

A nZnO talajlakó gerinctelenekre gyakorolt hatásának vizsgálatai alapján a földigiliszták (*Eisenia fetida*, *E. veneta*) sejtműködési zavarain keresztül azok növekedésére és szaporodására negatív hatást gyakorol a nZnO. Reprodukciós toxicitásról számolt be Samarasinghe és munkatársai (2023) 500 és 1000 mg/kg nZnO esetén, míg 400 mg/kg nZnO az *E. andrei* szaporodását gátolta (Alves és mtsai., 2019). A földigilisztákra számított EC<sub>50</sub> érték 160–360 mg/kg közötti (Lahive és mtsai., 2023), azonban egyes leírások szerint 300 mg/kg nZnO elősegítette fiatal *E. fetida* egyedek növekedését (Valerio-Rodríguez és mtsai., 2020; Strekalovskaya és mtsai., 2024).

A nZnO továbbá gátolja a fonálférgek, például a *Caenorhabditis elegans* életképességét és szaporodását (Wang és mtsai., 2009; Zöngür és Er Zeybekler, 2024). Továbbá a stresszválaszokkal és az anyagcserével kapcsolatos gének expressziójának mértéke is változik nZnO hatására (Strekalovskaya és mtsai., 2024).

Hasonló megállapításra jutottak Al-Azzazy és munkatársai (2024) néhány talajlakó ízeltlábú (például ugróvillások, atkák) esetén, ugyanis csökkent túlélési és szaporodási arányt észleltek nZnO-nak való kitettség esetén. 250 mg/kg koncentrációjú nZnO szennyvíziszappal kezelt talaj esetén a *Folsomia candida* (Collembola) mortalitása jelentős mértékben növekedett, azonban 45 nap kitettség után csökkent a toxicitás mértéke (Oleszczuk és mtsai., 2019). Emellett 4000 mg/kg nZnO esetén a reprodukciós ráta jelentősen csökkent (Alves és mtsai., 2019; Strekalovskaya és mtsai., 2024).

A nZnO LC<sub>50</sub> értéke (egyedek 50%-ának letalitását okozó koncentráció) kisebb 0,1 mg/L-nél ezért a korábban alkalmazott 67/548/EGK irányelv szerint „rendkívül mérgező” anyagként tartották számon a vízi élőlényekre nézve (Kahru és Dubourguier, 2010). Az Egyesült Nemzetek Szervezete által kidolgozott és jelenleg érvényes vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere (Globally Harmonized System; GHS) alapján

azonban már a nZnO az „Akut 1. kategóriába” tartozik (mivel LC<sub>50</sub> értéke kisebb mint 1 mg/L) (Egyesült Nemzetek Szervezete, 2023). Ugyanakkor a különböző trófikus szintekhez tartozó vízi élőlényeknél tapasztalható toxicitása jelentősen eltérhet (Adams és mtsai., 2006a; Heinlaan és mtsai., 2008; Wong és mtsai., 2010; Xiong és mtsai., 2011; Wu és mtsai., 2019a).

Bondarenko és munkatársai (2013) tanulmánya szerint a különböző rendszertani kategóriák esetén tapasztalt LC<sub>50</sub> értékek a következők: baktériumok esetén (különböző fajok alapján) 50–1000 mg/L, algák esetén (különböző fajok alapján) 0,052–4,56 mg/L, rákfélék (*Daphnia magna*) esetén 0,62–22 mg/L, továbbá halak (*Danio rerio*) esetén 1,79–4,92 mg/L közötti (Wu és mtsai., 2019a).

Hasonló eredményre jutottak Bordin és munkatársai (2024) is, akik tanulmánya alapján vízi ökoszisztémában a gerinctelenek a legérzékenyebb élőlények, melyet a baktériumok, algák és gerincesek követnek nZnO-ra vonatkozólag. Ezen trófikus szintek esetén a legérzékenyebb tesztorganizmusok között megemlítendő a *Daphnia magna* és *Paracentrotus lividus*; *Escherichia coli* és *Vibrio fischeri*; *Scenedesmus obliquus* és *Isochrysis galbana*; valamint *Danio rerio* és *Rutilus caspicus*. A toxicitási vizsgálatok során tapasztalt eltérések valószínűsíthetően a tesztelt egyedek érzékenységének eltéréseivel, valamint a különböző környezeti tényezőkkel (például a közeg összetétele, pH-értéke, expozíciós idő) állnak összefüggésben (Wu és mtsai., 2019a).

A nTiO<sub>2</sub> kevésbé toxikus a nZnO-hoz képest, melyet a 10–100 mg/L közötti LC<sub>50</sub> értéke alapján történő korábbi „káros”, illetve jelenlegi „Akut 3. kategória” besorolása is jelez (Kahru és Dubourguier, 2010). Ugyanakkor a nTiO<sub>2</sub>-t több területen alkalmazzák széles-spektrumú antimikrobiális hatása miatt, melyet jelentősen befolyásol a nanorészecske mérete, alakja, szintézisének módja (Serov és mtsai., 2024).

A nTiO<sub>2</sub> antimikrobiális hatásaival kapcsolatos kutatásokat foglalja össze az M3. táblázat.

A nTiO<sub>2</sub> növényekre, illetve algákra gyakorolt hatásának felmérése során a nZnO-hoz hasonlóan a csírázás-, fotoszintézis aktivitás gátlásáról, valamint a biomassza csökkenéséről számoltak be (M4. táblázat).

A nTiO<sub>2</sub> gerinctelen, valamint gerinces állatokra gyakorolt hatása szintén hasonló a nZnO-hoz, melyet az M5. táblázat szemléltet.

### 3.3.1.2. Mikrobiális közösségre gyakorolt hatások

A nanorészecskék toxicitása nagy mértékben függ a környezeti jellemzőktől (például kémiai összetétel, pH, ionerősség stb.), azonban a nanorészecskék is hatással vannak a környezeti paraméterekre, ez által közvetetten is kifejthetik hatásukat az élőlényekre.

A nanorészecskék disszociációját számos tényező (nanorészecske összetétele, mérete, morfológiája, töltése, felületkémia) befolyásolja, ennek hatására azonban mobilisabbak a környezetben (Peng és mtsai., 2017). A nZnO oldódása során Zn<sup>2+</sup> ionok szabadulnak fel, melynek hatására növekszik a talaj pH értéke (Tourinho és mtsai., 2012; García-Gómez és mtsai., 2018b). A nZnO továbbá növeli a talaj víztartalmát és víztartó kapacitását homoktalajok esetén. Emellett javítja a porozitást, ami kedvező a növények gyökerének fejlődése szempontjából (Bayat és mtsai., 2018; Strekalovskaya és mtsai., 2024).

Bár a nanorészecskék egy adott fajra gyakorolt hatásáról sok tanulmány született, a mikrobiális közösségre gyakorolt hatásokról kevesebb információ áll rendelkezésre, és – az egy fajt alkalmazó tesztekhez hasonlóan – pozitív és negatív hatásokról egyaránt beszámoltak.

Strekalovskaya és munkatársai (2024) tanulmánya alapján a nZnO talaj mikroflórára gyakorolt pozitív hatása kisebb koncentrációk (<250 mg/kg) esetén jellemző, míg ennél nagyobb dózis alkalmazásakor már toxikus hatások jelentkeznek.

A nZnO talaj mikrobiális közösségre, illetve annak aktivitására gyakorolt hatását mutatja be az M6. táblázat kiemelt kutatások alapján.

A nZnO-hoz hasonlóan, a mikrobiális közösségre, illetve annak aktivitására gyakorolt pozitív és negatív hatásokról egyaránt beszámoltak nTiO<sub>2</sub> esetén is. Ezekből a kutatásokból néhányat kiemelve a főbb paramétereikkel az M7. táblázat szemléltet.

Az élőlények nanorészecskékkel szembeni érzékenysége módosulhat más fajok jelenlétében (Levy és mtsai., 2009), ennek ellenére kevés információ áll rendelkezésre a nanorészecskék vízi ökoszisztémákra gyakorolt hatásáról, különös tekintettel az olyan kutatásokra, melyek a nanorészecskék különböző trófikus szintekről származó tesztorganizmusokra gyakorolt hatását vizsgálja adott rendszeren belül (Bernhardt és mtsai., 2010; Wu és mtsai., 2019a).

Annak ellenére, hogy a mikrobiális közösség kulcsfontosságú eleme az ökoszisztémának, a nanorészecskék vízi mikrobiális közösségek szerkezetére és diverzitására gyakorolt hatására vonatkozólag kevés információ áll rendelkezésre. Habár vannak a nanorészecskék folyók (Barnes és mtsai., 2010; Londono és mtsai., 2017), patakok (Battin és mtsai., 2009), tengeri torkolati üledékek (Echavarri-Bravo és mtsai., 2015), talajvizek (Zabetakis és mtsai., 2015) és három svéd tó (Farkas és mtsai., 2015) mikroflórájára gyakorolt hatására vonatkozó adatok, a nTiO<sub>2</sub> és nZnO komplex vízi mikrobiális közösségekre gyakorolt hatásának vizsgálata további kutatásokat és új metodikai megközelítéseket igényel.

Battin és munkatársai (2009) az elsők között bizonyították, hogy a felszíni vizekben előforduló nTiO<sub>2</sub> koncentráció a természetes UV-sugárzás szintje mellett jelentősen befolyásolja a természetes mikroflórát (planktonikus fázisban és biofilmben lévő sejteket egyaránt).

Farkas és munkatársai (2015) a nTiO<sub>2</sub> baktériumközösségekre gyakorolt hatását *in situ* vizsgálta három tóban. Eredményeik alapján a nTiO<sub>2</sub> hatására változott a bakteriális sejtsűrűség és mikrobiális aktivitás. Mindemellett a mikrobiális közösségre kifejtett hatás eltérő volt a víz kémiai paramétereitől függően.

Londono és munkatársai (2017) folyóvízmintákhoz 700 µg/L nTiO<sub>2</sub>-t és 70 µg/L nZnO-t adtak külön-külön, illetve kombinálva a nanorészecskék vízi mikrobiális közösségekre gyakorolt hatásának vizsgálata céljából. A nTiO<sub>2</sub> általi kezelés önmagában nem okozott szignifikáns hatást, azonban a nZnO, illetve a nZnO és nTiO<sub>2</sub> együttes alkalmazása jelentős hatást gyakorolt a mikrobiális közösség szerkezetére, a különböző nemzetségek eloszlására. A fajgazdagság eltolódása baktériumok esetén nagyobb mértékű volt az eukariótnál tapasztalathoz képest.

Ezzel szemben Chen és munkatársai (2022) tanulmánya alapján a nTiO<sub>2</sub> nagyobb gátló hatást fejtett ki eukarióta algákra, mint a cianobaktériumokra monokultúrák esetén. Hasonló eredményre jutottak mikrokozmosz rendszerbeli vizsgálatok során, ahol a nTiO<sub>2</sub> enyhén csökkentette a klorofill-a tartalmat, ugyanakkor jelentősen növelte a fikocianin mennyiségét. Továbbá a nTiO<sub>2</sub> destabilizálta az édesvízi mikrobiális közösség összetételét, különösen az eukarióta közösséget, azonban nem befolyásolta jelentősen a prokarióta közösség funkcionális diverzitását.

Az eddigi tanulmányok alapján a természetes vízi mikrobiális közösségek érzékenyebbek a nanorészecskékre, mint egy-egy baktérium törzs, ami jelzi ezen vizsgálatok fontosságát (Farkas és mtsai., 2015; Londono és mtsai., 2017). Farkas és munkatársai (2015) feltételezéseik alapján az egyes baktérium törzsekre gyakorolt hatások összege határozza meg a komplex baktériumközösség sejtsűrűségére és aktivitására gyakorolt hatást.

Mindemellett azonban azok a tényezők, amelyek a mikrobiális közösség egy részére toxikusak, negatívan befolyásolhatják az egész közösség működését, megváltoztatva a mikrobatorzsek közötti kölcsönhatásokat (Shade és mtsai., 2012).

Mindezek alapján látható, hogy a nanorészecskék mikrobiális közösségekre gyakorolt hatásának felmérése rendkívül fontos. Erre vonatkozólag különböző biokémiai és/vagy molekuláris technikákra van lehetőség, azonban a Biolog EcoPlate™ módszert csak néhány tanulmányban alkalmazták, annak ellenére, hogy egy aránylag kis költségű és gyors technika a mikrobiális közösség fiziológiai profilozására (Community-Level Physiological Profiling, CLPP) (Németh és mtsai., 2021).

Christian és Lind (2006) több szempontból vizsgálta a Biolog EcoPlate™ alkalmazási lehetőségeit édesvízi baktériumközösségek esetében, beleértve az inokulum denzitását, az inkubációs hőmérsékletet, a nem bakteriális eredetű színfejlődést és a szubsztrát szelektivitást. Xie és munkatársai (2021) a kínai Tianmuhu-tóból és annak feljebb lévő, duzzasztott folyószakaszából származó mikrobiális közösség összetételét, diverzitását és metabolikus aktivitását vizsgálta Biolog EcoPlate™ segítségével, az antropogén tevékenységek, így a szennyezőanyag kibocsátás és a duzzasztás biodiverzításra gyakorolt hatásainak felmérése céljából.

Habár az említett tanulmányok alkalmazták a Biolog EcoPlate™ módszert, több fontos paramétert nem közöltek (például reagensek, mintaelőkészítés menete, inkubációs idő, számítások pontos leírása), illetve általában csak néhány végpontot (többnyire az átlagos színfejlődési értéket (Average Well Colour Development, AWCD), görbe alatti területet (Area Under the Curve, AUC) és a hasznosított szubsztrátok számát (Substrate Richness, SR)) értékelték. Mindemellett nanorészecskék hatásának felmérésére jellemzően csak 100 mg/L feletti koncentrációk esetén alkalmazták és csak néhány esetben használták 1 mg/L körüli dózis esetén (Londono és mtsai., 2017; Németh és mtsai., 2021).

Mindezek figyelembevételével a Biolog EcoPlate™ alkalmas módszer lehet a nanorészecskék mikrobiális közösségekre gyakorolt hatásának felmérésére akár kis nanorészecske koncentrációk alkalmazása esetén is, különös tekintettel a belőle származtatható különböző végpontok révén.

A mikrobiális vizsgálatokon belül napjainkban egyre nagyobb szerepet kap a kvórum érzékelésre, azaz a mikrobiális kommunikációra gyakorolt hatás vizsgálata. A következő fejezetben ismertetem ennek a kutatási területnek a hátterét, kiemelve a nanorészecskék hatásvizsgálatához kapcsolódó néhány eredményt.

### *3.3.1.3. Bakteriális kommunikáció és befolyásolása nanoanyagokkal*

A baktériumok egysejtű élőlények, azonban közösségként képesek olyan komplex feladatok elvégzésére, amit önállóan nem tudnának véghez vinni. Ehhez szükséges a sejtek közötti kommunikáció, mely szignálmolekulák segítségével történik. A kvórum érzékelés (Quorum Sensing; QS), vagyis a sejt-sejt közötti kommunikáció egy jelátviteli folyamat, mely függ a sejtek sűrűségétől. 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. Receptorhoz való kötődésük azonban fokozza újabb szignálok létrehozását, emiatt autoinducer molekuláknak is nevezik őket (Waters és Bassler, 2005). 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 (Papenfort és Bassler, 2016).

Ennek következtében a módosuló környezeti feltételekhez alkalmazkodva a baktériumok összehangolt működésbe kezdenek, ami lehetővé teszi különböző fiziológiai folyamatok létrejöttét, mint a biolumineszcencia, patogenezis, bizonyos anyagok biodegradációja, motilitás, toxinok- és exopoliszacharidok termelése (Nealson és mtsai., 1970; Davies és mtsai., 1998), valamint virulenciafaktorok, mint például a pioverdin, piocianin, rhamnolipid, elasztázok, sziderofórok és exotoxinok előállítás, melyek közreműködnek a biofilmek kialakulásában (Zhang és Li 2016; Khan és mtsai., 2020b), így idesorolva a biofilmképzést is.

A Gram-negatív baktériumok szignálmolekulái az N-acil-homoszerin-lakton (AHL) típusú vegyületek (Whitehead és mtsai., 2001), míg Gram-pozitív baktériumok esetében oligopeptid makromolekulák segítségével történik a kommunikáció (Thoendel és Horswill, 2010). Továbbá mindkét típusban megfigyelték a nem faj specifikus autoinducer, furanozil-bór-dieszter (AI-2) molekulát is (Schauder és mtsai., 2001). Ezekon kívül leírtak már néhány egyéni, adott fajra jellemző szignálmolekulát (McKnight és mtsai., 2000), mint például a *Pseudomonas aeruginosa* PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal – *Pseudomonas* kinolon szignál) molekulája (Turan és mtsai., 2017), az *Aeromonas* AI-3 autoinducer molekulája (Talagrand-Reboul és mtsai., 2017), a *Legionella pneumophila* AHK (Alfa-Hidroxi-Keton) jelmolekulája (Tiaden és Hilbi, 2012), és a *Xanthomonas campestris* DSF (Diffúziós Szignál Faktor) molekulája (Deng és mtsai., 2014).

A legtöbb Gram-negatív baktérium kvórum érzékelése AHL típusú szignálmolekula segítségével megy végbe (Shaw és mtsai., 1997), mely molekula szintéziséért felelős génszakasz a LuxI-LuxR rendszeren belül található.

Az *Aliivibrio fischeri* LuxI-LuxR kvórum érzékelő rendszerét tanulmányozták elsőként a bakteriális kommunikációs rendszerek közül, melyet később számos további Gram-negatív baktériumnál azonosítottak. Ezen fajok mindegyike AHL-t, vagy AHL-homológot állít elő, ugyanakkor csak a saját jelmolekuláikat képesek felismerni, s arra válaszreakciót adni (Li és Tian, 2012). Ilyen kommunikációs rendszer például a növénypatogén *Agrobacterium tumefaciens* TraI-TraR rendszere, illetve a *Pseudomonas aeruginosa* LasI-LasR és RhlI-RhlR rendszerei, melyek virulenciafaktorok kifejeződését szabályozzák (Waters és Bassler, 2005). A LasI-LasR rendszer szignálmolekulája az N-3-oxo-dodekanoil-homoszerin lakton (C12-3-oxo-AHL), míg az RhlI-RhlR rendszeré az N-butanoil-homoszerin lakton (C4-AHL) (Netotea és mtsai., 2009).

A *Pseudomonas aeruginosa* négy AHL-alapú, hierarchikusan egymás alá-fölé rendelt QS rendszerrel rendelkezik, melyek kölcsönhatásba léphetnek egymással (Pérez-Pérez és mtsai., 2017). Ezek a rendszerek együtt szabályozzák a biofilmképződéssel, antibiotikum-rezisztenciával, motilitással és vasmegkötéssel kapcsolatos gének expresszióját (Wade és mtsai., 2005; Lee és Zhang, 2015; Khan és mtsai., 2020a).

A *Pseudomonas aeruginosa* kinolon szignálmolekulája befolyásolja a baktérium virulencia faktorainak (elasztáz, piocianin, rhamnolipidek), illetve a sziderofór pioverdin termelését, valamint a biofilmképződésre is hatással van. A kinolon mellett annak prekürzora is szignálként funkcionál (Shaw és mtsai., 1997).

A kvórum érzékelés befolyásolásával számos területen előnyökre tehetünk szert. Növelhetjük a pigmenttermelés intenzitását, melyet festékanyagként hasznosíthatunk az élelmiszer- és textiliparban, továbbá antibakteriális hatásuk miatt a gyógyászatban is (Narsing Rao és mtsai., 2017). Emellett a biofilmképzés befolyásolása révén jó oxigén- és tápanyagellátottságú biofilm-granulátumok hozhatók létre, melyekkel javítható a szennyvíztisztítás határfoka, csökkenthető annak költsége (Zhang és Li, 2016).

Mivel a biofilmek magukba foglalják a biotikus és abiotikus felületekre tapadt mikrobiális sejteket és az általuk termelt extracelluláris polimer mátrixot (EPS – Extracellular Polymeric Substances) egyaránt, így a természetes vizekben, élő szövetekben, valamint az ivóvízhálózatban és az orvosi eszközökben megjelenő sejtömeget is (Flemming és Wingender, 2010). A képződött biofilmek káros hatást gyakorolnak a különböző szilárd anyagok felületére (biokorrózió), ami nehézségeket okozhat többek között a szennyvíztisztításban, az élelmiszer- és fémiparban (Beech, 2004; de Celis és mtsai., 2022). Mivel a bakteriális biofilmképzés QS-szabályozott folyamat (Ding és mtsai., 2011; Zhou és mtsai., 2020), ezért a QS-gátló molekulák alkalmazása ígéretes megoldás lehet a patogén mikrobák általi biofilmképződéssel szemben (Zhou és mtsai., 2020).

A kvórum csillapítás (Quorum Quenching; QQ) során a bakteriális kommunikáció mértékét csökkentik a szignálmolekulák degradálásával vagy manipulálásával (Zamani és mtsai., 2013). Ez a mikrobák között természetes úton is végbemenő folyamat (Dong és mtsai., 2007), ami megakadályozza a nagy sejtsűrűséghez kapcsolt folyamataik beindítását. A kvórum csillapítást eltérő gátlóanyagok segítségével érik el, melyek különböző mechanizmuson keresztül tudják akadályozni a sejtek közötti kommunikációt (Hayat és mtsai., 2019; Zhou és mtsai., 2020). Az inhibitorok természetes vegyületek, vagy azok szintetikus származékai is lehetnek, így a nanorészecskék is alkalmazhatóak erre a célra.

Az elmúlt évtizedben a nanorészecskék a bakteriális kommunikációval kapcsolatos kutatások középpontjába kerültek kvórum csillapító hatásuk miatt (Naik és Kowshik, 2014; Al-Shabib és mtsai., 2016; Prateeksha és mtsai., 2017; Samanta és mtsai., 2017), s így – antibakteriális hatásuk révén egyaránt – lehetőség nyílik gátolni az antibiotikum-rezisztencia kialakulását (Dufour és mtsai., 2010; Slavin és mtsai., 2017). A fém-oxid nanorészecskék, mint kvórum-gátló anyagok a virulencia és a biofilmképzés csökkentése céljából az elmúlt években kerültek fókuszpontba (Qais és mtsai., 2018; Hayat és mtsai., 2019) egyéb, részletesebben tanulmányozott anyagok mellett (Shaaban és mtsai., 2019). Khan és munkatársai (2020b) szerint a fém nanorészecskék QS gátló hatásának felmérése még kezdeti stáuszban van; azonban további átfogó, molekuláris és genetikai szintű kutatások szükségesek annak megértésére, hogy ezek a „nanofegyverek” miképp gátolják a QS rendszereket (Salkar és Charya, 2023).

A QS inhibitor molekulák vizsgálata az egyik legintenzívebben kutatott területté vált a biofilmképzés megakadályozására irányuló törekvések céljából (Hayat és mtsai., 2019).

A *Pseudomonas aeruginosa* egy Gram-negatív, opportunista patogén baktérium, amely ideális tesztorganizmus biofilmképzés vizsgálatára (Rasamiravaka és mtsai., 2015). A *P. aeruginosa* fertőzőképessége révén képes akut és krónikus fertőzéseket okozni emberekben, állatokban, növényekben. Humán fertőzések esetén nagy kockázatnak vannak kitéve a légzőszervi és immunhiányos megbetegedésben szenvedők, illetve az égési és egyéb sérülésekkel rendelkezők (Lee és Yoon 2017; García-Reyes és mtsai., 2020). Mindemellert a *P. aeruginosa* minden környezeti elemében életképes, előfordulása különösen vizekben, szennyvíztisztítóknak jelentős (de Celis és mtsai., 2022). A *P. aeruginosa* biofilmképzésének gátlásáról számoltak be Gómez-Gómez és munkatársai (2019b) nehézfém nanorészecskék esetén. Leírásuk szerint a szelén és tellúr-alapú nanorészecskék a biofilm szerkezetének torzításával csökkentették a biofilmképzés mértékét. Továbbá García-Lara és munkatársai (2015) tanulmánya szerint a ZnO nanorészecskék 1 mmol koncentrációban jelentősen csökkentették a *P. aeruginosa* plicianin és elasztáz termelését, valamint gátolták a biofilmképzést.

Mindezek figyelembevételével látható, hogy a nanorészecskék jelentős potenciállal rendelkeznek a különböző kvórum vezérelt folyamatok befolyásolására, így a mikrobiális kommunikáció csillapítására, mely számos területen alkalmazható.

### 3.3.2. Nano grafén-oxid hatása a környezetre

Kutatásom egyik célkitűzése volt a nano grafén-oxid (nGO) környezeti kockázatfelmérése vízi ökoszisztémára számos egy fajt alkalmazó ökotoxikológiai teszt eredményeire alapozva, ezért ebben a fejezetben hangsúlyos szerepet kap a vonatkozó szakirodalom részletes áttekintése.

A nGO kivételes fizikai-kémiai tulajdonságai (nagy felület, magas mechanikai szilárdság, kiváló elektromos vezetőképesség, optikai tulajdonságok) miatt jelentős figyelmet kapott (Lu és mtsai., 2009; Wang és mtsai., 2011c; Wang és mtsai., 2011a; Ge és mtsai., 2011a). Ennek következtében számos területen alkalmazzák a nGO különböző típusait, így többek között az orvostudományban, elektronikai eszközökben, energiatárolás céljára, valamint a környezetvédelemben (Peng és mtsai., 2010; Sanchez és mtsai., 2012). Ugyanakkor több *in vitro* és *in vivo* tanulmány alapján a nGO-k és származékaik különböző káros hatásokat válthatnak ki az élőlényekben. Különböző tesztrendszerekben – beleértve a mikrobákat (baktériumokat, gombákat és algákat), rákokat, növényeket, földigilisztákat, halakat, egereket, valamint humán sejteket – vizsgálva ökotoxicitásukat, oxidatív stresszt, gyulladást, valamint cito- és genotoxikus hatásokat figyeltek meg (Bianco és mtsai., 2022; Yadav és mtsai., 2022; Németh és mtsai., 2023), azonban ezen tanulmányok eredményei és következtetései nagy bizonytalanságokat mutatnak (Ge és mtsai., 2011a; Hu és mtsai., 2015; Sepahi és Azizi, 2024). Mindemellett a grafén alapú nanorészecskék megzavarhatják a mikrobiális közösség növekedését, szerkezetét, aktivitását és sokféleségét (Németh és mtsai., 2023).

A nGO toxikus hatását különböző mechanizmusokon keresztül fejt ki, így például fizikai roncsolás, oxidatív stressz (ROS) révén, valamint kölcsönhatásba lépve a fehérjékkel, lipidekkel és nukleinsavakkal, ezáltal zavarva a sejtfunciókat és a jelátviteli folyamatokat (pl. növekedési faktor, tumor nekrozis faktor), ami gyulladáshoz, apoptózishoz, illetve nekrozishoz vezethet (Wang és mtsai., 2013; Ou és mtsai., 2016; Fahmi és mtsai., 2017; Dasmahapatra és mtsai., 2019; Malkova és mtsai., 2021; Zare és mtsai., 2021). Továbbá befolyásolja az aminosav metabolizmust (Li és mtsai., 2018b) és a vas ionok megkötése révén vashiányt idézhet elő (Yu és mtsai., 2017).

A nGO toxicitását befolyásolják annak fizikai-kémiai tulajdonságai, így a mérete, morfológiája, a felületi funkciós csoportjai és töltése (Ou és mtsai., 2016; Foller és mtsai., 2021; Ghulam és mtsai., 2022; Sepahi és Azizi, 2024). Méretük és alakjuk jelentősen befolyásolja a sejtek általi felvehetőségüket, a sejten/szervezeten belüli eloszlásukat és reakcióképességüket, továbbá kiválasztásukat (Wang és mtsai., 2013; Francia és mtsai., 2020; Rajakumari és mtsai., 2020; Li és mtsai., 2021a).

A kisebb nanorészecskék toxicitása nagyobb, mint a nagyobb méretűeké (Ghulam és mtsai., 2022). Gurunathan és munkatársai (2019) tanulmánya szerint, a 20 nm nagyságú nGO részecskék nagyobb mértékben gátolták a vizsgált Leydig és Sertoli-sejtek életképességét és szaporodását, továbbá intenzívebb reaktív oxigén származék (ROS) képződést okoztak a 100 nm-es nGO részecskékhez képest. Ugyanakkor mindkét méretű nGO csökkentette a mitokondriális membránpotenciált és DNS-károsítás mellett apoptózist okozott (Gurunathan és mtsai., 2019). Liao és munkatársai (2011) leírása alapján a kisebb méretű GO nanorészecskék hemolitikus aktivitása nagyobb volt a nagyobb méretű, aggregálódott grafénlemezekéhez képest.

A nanorészecske alakja is fontos tényező a sejtekbe történő bejutás, illetve toxicitás szempontjából. A lemezes szerkezetű GO könnyebben keresztül jut a sejtmembránon a többi formához (pl. pehely, szalag) képest, így citotoxikus hatása is nagyobb. Ezzel szemben a szalagszerű GO jelentősebb mértékű DNS károsodást okoz, így genotoxicitása is erősebb (Akhavan és mtsai., 2012; Wang és mtsai., 2013). Mindemellett megemlítendő, hogy a szabálytalan alakú GO-lemezek lassabban ürülnek ki a szervezetből, ami hosszabb expozícióhoz, ez által nagyobb toxicitáshoz vezethet.

Ezzel szemben a gömb alakhoz leginkább hasonlító nanorészecskék gyorsabban távoznak a szervezetből, így potenciális toxicitásuk is kisebb (Egbuna és mtsai., 2021; Sepahi és Azizi, 2024).

A GO felületkémiája is jelentősen befolyásolja azok toxicitását, ugyanis Pelin és munkatársai (2017) kísérletei során a kevésbé oxidált vegyület kisebb citotoxikus hatással rendelkezett, míg a legnagyobb oxidációs szinttel rendelkező formának nagyobb plazma- és mitokondriális membránkárosító hatása volt. Emellett a töltésüknek is nagy szerepe van, ugyanis befolyásolja azok sejtmembránokhoz való affinitását, ami eltérő felvételt és toxicitást eredményez (Sepahi és Azizi, 2024). A pozitív töltésű lemezeket többek között fagocitózis és klatrin-mediált endocitózis útján veszik fel a sejtek, míg a negatív töltésű lemezek fagocitózis és szulfát-receptor-mediált endocitózis révén jutnak át a membránon (Li és mtsai., 2021a).

Grafén-oxid és redukált grafén-oxid nanorészecskék esetén is kimutatták azok ROS termelés általi citotoxikus hatását Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok esetén egyaránt (Akhavan és Ghaderi, 2010; Efremova és mtsai., 2015). Akhavan és Ghaderi (2010) tanulmánya alapján a grafén-oxid nanofalak éles élei megsértették a baktériumok membrán szerkezetét, ami a sejtalkotók kiáramlásához vezetett. A hatásmechanizmus alapján a Gram-negatív *Escherichia coli* baktérium külső membránja révén ellenállóbb volt a grafén-oxiddal szemben a Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* baktériumhoz képest. Továbbá a redukált grafén-oxid nanorészecskék toxikusabbnak bizonyultak a nem redukált formához képest (Akhavan és Ghaderi, 2010). Hasonló megállapításra jutottak Mokkaapati és munkatársai (2018), akik szintén a redukált nGO formát találták toxikusabbnak a nem redukált formához képest, *Bacillus subtilis* és *Pseudomonas aeruginosa* fajokra nézve agar táptalajon. Vizsgálataik során azonban a Gram-negatív *P. aeruginosa* volt érzékenyebb a Gram-pozitív *B. subtilis*-hez képest, sőt, utóbbi szaporodását még serkentette is 0,01–0,08 mg/L koncentrációban a GO. Yin és munkatársai (2020) három zöldalga (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*), egy cianobaktérium (*Microcystis aeruginosa*), és egy kovamoszat (*Cyclotella sp.*) fajon vizsgálta a GO hatását. Eredményeik alapján 10 mg/L koncentrációban jelentősen csökkent mindegyik faj szaporodási rátája, melynek okaként a megnövekedett oxidatív stresszt és membrán permeabilitást tulajdonították. A legérzékenyebb fajnak a *S. obliquus* bizonyult, míg a leginkább toleráns a *C. reinhardtii* volt.

Srikanth és munkatársai (2018) a GO nanorészecskék kék naphal sejtekre gyakorolt koncentráció- és időfüggő citotoxikus hatását írta le. Vizsgálataik során a nagyobb nGO koncentráció és a hosszabb expozíciós idő nagyobb mértékű ROS termelést okozott.

A nGO akut és krónikus toxicitást váltott ki a *Ceriodaphnia dubia* édesvízi vízibolha esetében. A hosszan tartó expozíció csökkentette az utódok számát és a táplálkozási rátát, valamint növelte a ROS-termelést (Souza és mtsai., 2018). Hasonlóképpen *Daphnia magna* vízibolha esetén is fokozott ROS termelést idézett elő, noha szinte az összes ROS távozott 24 órán belül (Lv és mtsai., 2018). Zhang és munkatársai (2019) *Daphnia magna* tesztorganizmuson végzett vizsgálataik alapján a nGO LC<sub>50</sub> értéke 84,3 mg/L volt 48 óra elteltével, míg 21 nap elteltével 3,3 mg/L. Továbbá Guo és munkatársai (2013) megfigyelték, hogy a 0,25 mg/L koncentrációjú grafénnek kitett *D. magna* egyedekben tömegük 1%-ának megfelelő mennyiségű grafén halmozódott fel. Fekete-Kertész és munkatársai (2020) vizsgálataik alapján a halálozási arány 20%-kal, míg az immobilitási arány 10%-kal növekedett 50 mg/L nGO-nak kitett *D. magna* egyedek esetén 48 óra expozíciós idő elteltével. Továbbá egyéb szubletális végpontokat is vizsgáltak 3–50 mg/L koncentrációtartományban, és tapasztalataik alapján növekedett a táplálkozási aktivitás és a szívverés gyakorisága a *D. magna* egyedekben. Mindezek mellett a ROS termelés is koncentráció arányosan növekedett.

Zebradánió embrió fejlődésére kisebb koncentrációban (100–300 mg/L) nem volt jelentős hatással a GO, azonban nagyobb koncentráció (400–1000 mg/L) esetén jelentősen megnőtt az embriók halálozásának mértéke. Továbbá a GO fokozta a szívverést és az apoptózist, valamint és szív- és érrendszeri rendellenességeket okozott, továbbá csökkentette a hemoglobin termelést (Bangeppagari és mtsai., 2019).

Felnőtt zebrahalakra gyakorolt hatásuk felmérése során megállapították, hogy 1–50 mg/L koncentrációban alkalmazva a máj és a bélrendszerben lévő sejtek bomlását okozza. Továbbá fokozza a szuperoxid-dizmutáz és kataláz enzimek aktivitását (Souza és mtsai., 2019).

A zebrahalak és egerek bélmikrobiotájának megváltoztatásán túl a humán bélmikroflóra összetételét is módosítja a nGO. Egy *in vitro* végzett kísérlet során 25 mg/L nGO csökkentette a *Bacteroidota* törzs tagjainak számát, míg a *Firmicutes* és *Bacteroidota* arányt növelte. Emellett gátolta az aminosavak és szénhidrátok hasznosítását, továbbá csökkentette a Gamma-amino-vajsav és az 5-hidroxi-indol-3-ecetsav szintézisét. 250 mg/L nGO kezelést követően a *Bacteroidota* törzsbe tartozó *Bacteroides*, *Dysgonomonas* és *Parabacteroides* nemzetségek előfordulása volt gyakori. Ezen eredmények alapján a nGO jelentős hatást gyakorol a bél mikrobiális közösségének összetételére és anyagcseréjére (Couvillion és mtsai., 2023).

A GO ökotoxikológiai hatását vizsgáló tanulmányok többnyire egy fajra összpontosítottak, és viszonylag kevés tanulmány született a mikrobiális közösségre gyakorolt hatásuk felméréséről, pedig egyes beszámolók szerint megváltoztatják a közösség szerkezetét és aktivitását, például a szén- és nitrogén anyagcseréhez kapcsolódó metabolikus aktivitást (Braylé és mtsai., 2022).

50–300 mg/L koncentrációjú nGO gátolta a nitrifikációs folyamatokat eleveniszapban 5 óra kontaktidő elteltével (Ahmed és Rodrigues, 2013). Hasonló hatást figyeltek meg 48 óra expozíciós idő után folyók és tavak vizéből származó mikrobiális közösség esetén is. Fontos azonban megjegyezni, hogy nyáron nem észlelték a hatást, ami szintén bizonyítja, hogy a környezeti paraméterek jelentősen befolyásolják a GO toxicitását (Ko és mtsai., 2019).

A nitrifikáció gátlásáról számoltak be szennyvíztisztító telepek esetén 45 napig tartó 100 mg/L nGO kezelésnek való kitettség esetén, azonban 60 nap elteltével helyreállt a nitrifikációs aktivitás, mely a közösség szerkezetének változásával és alkalmazkodásával magyarázható (Lian és mtsai., 2020). Szintén a szennyvíztisztítóban lévő mikrobaközösség nitrit- és nitrát-reduktáz enzimaktivitásának csökkenéséről számoltak be Zhang és munkatársai (2024), melyet a fokozott oxidatív stressznek tulajdonítottak.

A metántermelés fokozódását figyelték meg anaerob körülmények között 3 mg/L koncentrációjú nGO esetén 13 és 18 nap kontaktidő után (Wang és mtsai., 2021b), míg 10 mg/L esetén 8 nap elteltével (Li és mtsai., 2021b). Továbbá 10, 20, és 30 mg/L redukált GO esetén 45 nap elteltével szintén nőtt a metántermelés, mely a *Methanoculleus* fajok számának növekedésével áll összefüggésben (Muratçobanoğlu és mtsai., 2021).

Ugyanakkor a metántermelés csökkenéséről számoltak be Dong és munkatársai (2019) 2,16 és 43,2 mg/L nGO esetén. Továbbá kimutatták, hogy a GO-nak jelentős affinitása van a szerves szubsztrátok felé, ami csökkenti azok biológiai hozzáférhetőségét.

Evariste és munkatársai (2021) a szerves anyagok lebontásához kapcsolódó mikrobiális aktivitás változást vizsgálták vízi mikrobiális közösség esetén, amely 0,1, 1 és 10 mg/L koncentrációjú nGO-nak volt kitéve. Eredményeik alapján a 10 mg/L koncentrációjú nGO esetén nőtt az aktivitás 48 óra elteltével, azonban 144 óra expozíciós idő elteltével már nem volt észlelhető az aktivitás változás.

Mikrobiális közösségek esetén az egyik leggyakrabban vizsgált végpont a növekedési ráta, amely kifejezhető a sejtek számának, a biomasszának vagy a DNS-mennyiségének változásával. A grafén alapú nanorészecskék általában negatívan befolyásolják a mikrobiális közösségek növekedését.

Ahmed és Rodrigues (2013) kimutatta, hogy 50 mg/L koncentrációjú nGO 5 óra elteltével gátolta az eleveniszapban lévő mikrobák szaporodását, továbbá 100–300 mg/L koncentráció esetén csökkent a mikrobaközösség életképessége. Továbbá 35 és 95 mg/L nGO esetén 7 nap elteltével csökkent az extrahálható DNS mennyisége (Kedves és mtsai., 2020). A talajban lévő biomassza csökkenéséről számoltak be (a DNS mennyisége alapján) Ge és munkatársai (2016) 1 g/kg dózisú grafén alkalmazása esetén 1 év elteltével. Továbbá szintén a talaj biomasszájának csökkenését írták le Chung és munkatársai (2015) 7 nap expozíciós idő elteltével 0,5 és 1 mg/kg nGO esetén, habár az helyreállt 13 és 59 nap elteltével.

Összességében a GO által a mikrobiális közösségekre gyakorolt negatív hatás elsődleges okának az oxidatív stresszt tulajdonítják (Ahmed és Rodrigues, 2013; Ko és mtsai., 2019; Li és mtsai., 2019).

Zhang és munkatársai (2024) vizsgálatai alapján a GO nanorészecskék hatására a szennyvíztisztókban lévő fonalas baktériumok jelentős mértékben elszaporodtak, ami által romlott az ülepedés hatékonysága.

A mikrobiális közösségek aktivitását, diverzitását és életképességét különböző mérőszámokkal jellemzik. Az alfa-diverzitás a közösségen belüli taxonok gazdagságát és/vagy egyenletességét jelenti, melyet eltérő indexekkel (például Shannon, Simpson) számszerűsítenek, és gyakran a 16S rRNS gének szekvenálása alapján származtatják (Braylé és mtsai., 2022).

A grafén-oxidok alfa-diverzitásra gyakorolt hatása vizsgálata során eltérő eredmények születtek. Rövid távú (30 napos) talajvizsgálatok esetén nem mutattak ki változást az alfa-diverzitásban (Kim és mtsai., 2018; Forstner és mtsai., 2019a; Forstner és mtsai., 2019b), míg diverzitás (különösen Shannon-index) növekedést tapasztaltak anaerob körülmények között 5, 10 és 15 mg/L nGO esetén (Li és mtsai., 2021b), továbbá eleveniszapban 25 mg/L nGO dózist alkalmazva (Yujie és mtsai., 2020), illetve talajokban 5 g/kg nGO esetén 90 nap (Du és mtsai., 2015), míg 300 mg/kg dózis esetén 360 nap elteltével (Wu és mtsai., 2021).

Ugyanakkor több esetben az alfa-diverzitás csökkenéséről számoltak be. Kadmiumot és 1–2 g/kg GO-t tartalmazó talaj mikrobiális aktivitásának vizsgálata során csupán a Shannon-index változott 60 nap kontaktidő elteltével (Xiong és mtsai., 2018). Szennyvíztisztító reaktorok esetén 100 mg/L nGO koncentráció által csökkent a Shannon-index 45 nap elteltével, mely 60 nap után helyreállt (Lian és mtsai., 2020). Továbbá több index (egyenletesség, Shannon-index) csökkenését figyelték meg 7 nap GO-nak való kitettség után üledékekben (Li és mtsai., 2020). Du és munkatársai (2020b) megfigyelései alapján, 50 mg/kg redukált GO 90 napig csökkentette a talaj mikroflóra Shannon-indexét, míg ugyanilyen koncentrációjú GO nem változtatta meg jelentős mértékben az alfa-diverzitást. Song és munkatársai (2018) tanulmánya szerint a 10 és 100 mg/kg grafénnek kitett mikrobaközösség alfa-diverzitása csökkent 7 és 15 nap elteltével, azonban hosszabb expozíciós idő esetén a diverzitás növekedését figyelték meg. A diverzitás helyreállítását azonban nem tapasztalták 1000 mg/kg koncentrációjú grafén esetén, ami a mikrobaközösség kisebb grafén-koncentrációhoz való alkalmazkodóképességére utal.

Az alfa-diverzitást jelző mérőszámok (Shannon- és Simpson-index) azonban helyreálltak 18 nap elteltével egy 3 mg/L nGO-nak kitett anaerob reaktor esetén (Wang és mtsai., 2021b). Ezek az eredmények összhangban vannak a mikrobiális növekedés és biomassza mennyiség esetén tapasztalt hatásokkal, amelyek alapján a konzorcium képes volt kisebb nGO koncentrációhoz alkalmazkodni (Jia és mtsai., 2019).

A béta-diverzitás a közösségek szerkezetei közötti különbségeket jelzi, melyet többnyire a kontroll és kezelésnek kitett mikrobiális közösségek strukturális eltéréseinek kimutatására használnak. Dózisfüggő hatást figyeltek meg 10, 100 és 1000 mg/kg grafénnek kitett talajközösség esetén, azonban 60 nap elteltével helyreállt a mikroflóra szerkezete (Ren és mtsai., 2015). Más tanulmányok jelentősebb eltéréseket írtak le grafén-oxid és redukált grafén-oxid esetén, a talaj- illetve üledéklakó mikroflóra helyreállása nélkül (Forstner és mtsai., 2019a; Du és mtsai., 2020b; Li és mtsai., 2020; Wu és mtsai., 2021), melyeknél jelentősen befolyásolta a hatást a szennyezőanyag típusa, koncentrációja és az expozíciós idő. Hasonló megfigyelést tapasztaltak Evariste és munkatársai (2021), akik kovamoszatokból és baktériumokból álló biofilmben észleltek szerkezeti eltéréseket 10 mg/L GO esetén, míg redukált GO alkalmazása nem okozott jelentős változást. Továbbá vízi ökoszisztéma esetén a bentikus és a planktonikus mikrobiális közösség szerkezetének változását írták le Evariste és munkatársai (2020) 0,05 és 0,1 mg/L GO és redukált GO esetén. Ezek a tanulmányok alátámasztják, hogy a grafén-alapú nanorészecskék csökkentik a kevésbé toleráns fajok számát, ami befolyásolhatja a mikrobiális közösségek közti kölcsönhatásokat is, például versenghetnek szénforrásokért, és megzavarhatja az elemek körforgását (Lian és mtsai., 2020; Braylé és mtsai., 2022).

A grafén-oxid nanorészecskék ökotoxicitására vonatkozó tanulmányok alapján elmondható, hogy elsősorban egy fajt alkalmazó laboratóriumi tesztek alapján vizsgálták hatásukat, míg annak ellenére, hogy a különböző környezeti elemekben előfordulnak, még hiányosak az ismeretek a potenciális környezeti kockázatuk jellemzésére. Az egyes tanulmányokban ellentmondásos eredményekről számoltak be, mely leginkább azzal magyarázható, hogy a nanorészecskék toxicitását jelentősen befolyásolják az adott nanorészecske jellemzői és a környezeti paraméterek. Ennek következtében szükségesek olyan vizsgálatok, melyek relevánsabb környezeti feltételek között vizsgálják a nanorészecskék hatását, például több fajt alkalmazó mikro- és mezokozmosz rendszerekben (Fekete-Kertész és mtsai., 2023; Németh és mtsai., 2023). Ez különösen fontos, mivel a grafén-oxidot, illetve egyéb nanorészecskéket esetenként közvetlenül juttatnak a környezetbe, például policiklusos aromás szénhidrogénekkal (PAH-ok) szennyezett talajok bioremediációja céljából (Wang és mtsai., 2025).

Doktori munkámban a környezeti kockázatfelméréshez kapcsolódó kutatások mellett vizsgáltam a nanoanyagok (a nano cink-oxid) hatását környezeti kockázat csökkentését célzó bioremediációs technológia fejlesztés kapcsán is. A következő fejezetekben ennek a tématerületnek a szakirodalmi háttérét ismertetem.

### 3.4. Nano-bioremediáció

A különböző környezeti elemek, így a talajok szennyezőanyag tartalmának csökkentésére eltérő módszereket alkalmazhatunk, melyek lehetnek fizikai, kémiai, termikus, illetve biológiai alapokon nyugvó technikák.

A talajmosás (oldószer extrakció) (Von Lau és mtsai., 2014), fitoremediáció, fotokatalitikus degradáció, elektrokinetikus remedáció (Gan és mtsai., 2009) és a kémiai oxidáció (Ranc és

mtsai., 2017) a leggyakrabban alkalmazott módszerek között vannak, de termikus remediációt is alkalmazhatunk például policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok) eltávolítására (Chou és mtsai., 2010; Ranc és mtsai., 2017).

További, környezetbarát megoldást kínáló módszerek lehetnek a biodegradáción alapuló bioremediációs technikák (Gan és mtsai., 2009), bár a nehezen bontható többgyűrűs vegyületek esetén sok esetben a biodegradáció intenzifikálása szükséges. A szennyezett területen végbemenő biodegradáció hatékonysága növelhető mikroorganizmusok és/vagy enzimek hozzáadásával például oltóanyag formájában (Muter, 2023), mely technikát bioaugmentációnak nevezünk (Gao és mtsai., 2022).

Az enzim-alapú bioremediáció egy hatékony eljárás lehet a rekalcitráns xenobiotikumok (antropogén eredetű szennyezőanyagok) szennyezett közegből, környezetbarát módon történő eltávolítására (Sharma és mtsai., 2018).

A közelmúltban új, nanoanyagokat alkalmazó technikák jelentek meg, melyek ígéretes lehetőséget teremtenek a különböző szennyezőanyagok általi környezeti kockázat csökkentésére (Eldos és mtsai., 2022), így a szennyezett területek tisztítására és a szennyezés kontrollálására (Kuppusamy és mtsai., 2016).

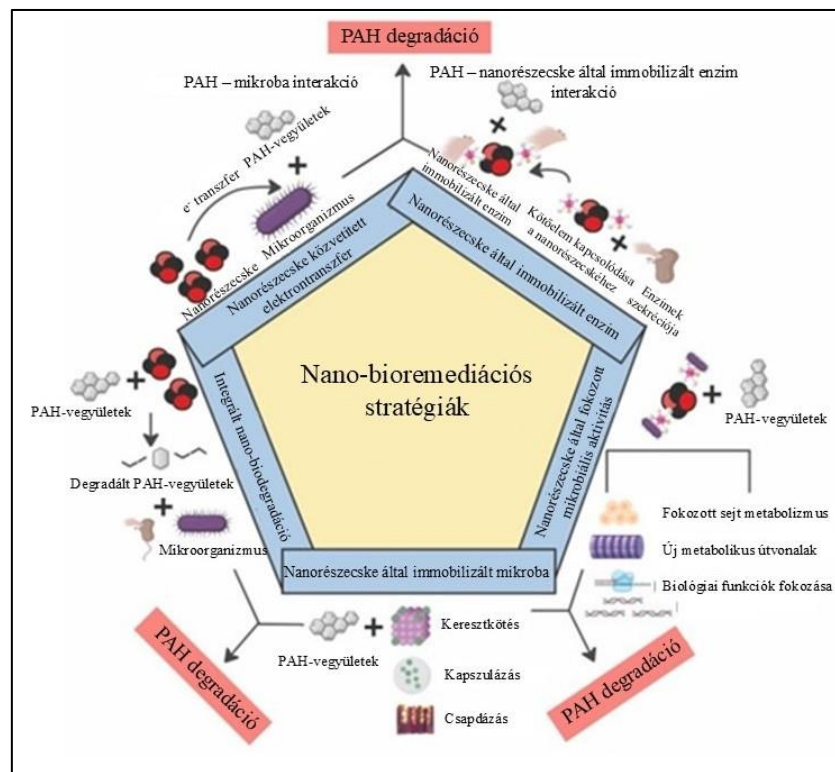
A nanorészecskék kis részecskeméretüknek és különböző felületi bevonatuknak köszönhetően szélesebb körben el tudnak terjedni a nagyobb részecskékhez képest. A talajszemcsék pórusain keresztül áramolva eljuthatnak olyan nehezen hozzáférhető helyekre is (pl. víztartó rétegek), amik a hagyományos eljárásokkal csak költségesen érhetőek el, így alkalmasak *in situ* kezelésekre (Tratnyek és Johnson, 2006; Yoon és mtsai., 2018). Ennek köszönhetően segítségül szolgálhatnak talajremediációs célokra, és az egyik legdinamikusabban fejlődő technikai megoldásnak tekinthető alkalmazásuk a szennyezőanyagok eltávolítására más módszerekkel, például a bioremediációval kombinálva (Huang és mtsai., 2016).

A nanoanyagok és/vagy nanotechnológia, valamint a bioremediációs eljárás együttes alkalmazását nano-bioremediációnak nevezzük (Chauhan és mtsai., 2023). Cecchin és munkatársai (2017) szerint a nano-bioremediáció során nanorészecskéket és mikrobákat vagy növényeket alkalmaznak a szennyezőanyag eltávolítására, míg mások az alkalmazott organizmus alapján különböztetik meg az eljárást, így beszélhetünk fito-, állati-, valamint mikrobiális nanoremediációról (El-Ramady és mtsai., 2017; Vázquez-Núñez és mtsai., 2020). Emellett Ramezani és munkatársai (2021) baktériumok által előállított nanorészecskék és/vagy egyéb nanoanyagok általi szennyezőanyag (pl. nehézfémek, szerves és szervetlen szennyezőanyagok) eltávolítást neveztek nano-bioremediációnak; hasonlóan Biswal-hoz (2023), aki szerint nano-bioremediáció esetén a szennyezőanyag eltávolítása céljából alkalmazott nanorészecskék előállítása biológiai úton történik növények, baktériumok, gombák, algák segítségével.

Bármely terminológiát is használjuk a bio-nanoremediációra, környezetbarát technológia révén nagy potenciállal rendelkezik a különböző közegekben előforduló szennyezőanyagok költséghatékony csökkentésére vonatkozólag, mely kevés toxikus melléktermékkel, káros következménnyel jár, szemben egyéb fizikai-kémiai technikákkal, melyek költséges és nehezen monitorozható eljárások (Ghosal és mtsai., 2016; Russo és mtsai., 2020; Chaudhary és mtsai., 2023; Rajput és mtsai., 2023).

Számos technika áll rendelkezésre a nano-bioremediációra, ideértve a nanorészecskék által fokozott mikrobiális aktivitáson alapuló biodegradáció sebességének növelését (Chauhan és mtsai., 2023; Gupta és mtsai., 2024), 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 komplex PAH-remediáció érdekében (4. ábra) (Gupta és mtsai., 2024).



4. ábra: Nano-bioremediációs technikák (Gupta és mtsai., 2024 nyomán)

Emellett a nanorészecskék az alábbi módokon is kifejthetik hatásukat szennyezőanyag eltávolítása céljából (Ansari és mtsai., 2023):

1. Nagy felületük és reaktivitásuk révén képesek a felszínükön adszorbeálni és immobilizálni a szennyezőanyagokat. Például 12 nm átmérőjű  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  részecskéket alkalmaztak arzén eltávolítására vízből (Yoon és mtsai., 2018).
2. A detoxifikációs szakasz beindítja és katalizálja a kiindulási mérgező vegyületek szétesését, amely kevésbé toxikus melléktermékek keletkezéséhez vezet. A leggyakoribb ilyen folyamatok közé tartoznak az oxidációs-redukciós reakciók, mint a fotokatalitikus  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék általi szerves anyag oxidáció vagy nano zéró-vegyértékű vas (nZVI; nano Zero-Valent Iron) redukció (Fajardo és mtsai., 2019; Abdelraheem és mtsai., 2020).
3. A nanorészecskék javítják a szennyezőanyagok biológiai hozzáférhetőségét és hozzájárulnak a szennyezőanyagok további, biológiai bontásához. Casals és munkatársai (2014) anaerob bontási folyamat során  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanorészecskéket alkalmaztak ion-forrásként, hogy a biogáz termelést fokozzák.

Mindemellett a nanorágyák és nanoásványok biostimuláció révén is hozzájárulhatnak a hatékony szennyezőanyageltávolításhoz, míg a zöld szintézissel előállított nanooxidálószerek alkalmasak például PAH vegyületek oxidációjára (Kuyukina és mtsai., 2021).

A nanoanyagok segítségével történő bioremediáció általi PAH eltávolítást vizsgálva, több nanorészecskét (beleértve  $\text{ZnO}$ -t,  $\text{TiO}_2$ -t) illetően leírták, hogy fémes-szervesanyagok térhálóként (metal-organic framework, MOF) javítják a PAH eltávolítás hatékonyságát

(Alvaro és mtsai., 2007; Russo és mtsai., 2020; Eldos és mtsai., 2022; New és mtsai., 2023). Habár a mikrobák és a nanorészecskék közötti kölcsönhatás összetett a PAH-ok adszorpciója során, elsősorban a PAH-ok molekulaszervezetével kapcsolatos (Gupta és mtsai., 2024).

Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a nanorészecskék talajremediációs céllal történő használata kedvezőtlen hatásokat is okozhat. Ge és munkatársai (2011b) leírták, hogy a ZnO és TiO<sub>2</sub> nanorészecskék veszélyeztették a talaj mikroflórát, mivel csökkentették a mikrobiális fajgazdagságot és a biomasszát. Ezért nélkülözhetetlen a nanoanyagok – technológiai hatékonyságának értékelése mellett – a lehetséges negatív környezeti hatásainak értékelése, így a talajlakó élőlényekre, a növényzetre és az emberi jólétre egyaránt. A kármentesítési technológiák tervezésénél figyelembe kell venni a nanoanyagok ökológiai és talajtani hatásait (New és mtsai., 2023).

Mivel doktori kutatásom egyik fő része egy enzimalapú bioremediációs technológia fejlesztéshez kapcsolódik policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajokra, a következő fejezetben ennek szakmai hátterét foglalom össze a szakirodalom alapján.

### 3.4.1. Policiklusos aromás szénhidrogének

#### *3.4.1.1. Policiklusos aromás szénhidrogének jellemzése*

A policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok) szerves vegyületek, amelyek környezeti körülmények között többnyire szintelen, fehér vagy sárgás kristályos, szilárd anyagok. Legalább két kondenzált aromás gyűrűből állnak, melyek egymáshoz képest lineárisan, szöveget bezárva vagy csoportosan helyezkednek el (Baskaran és Byun, 2024; Femi-Oloye és mtsai., 2024; Sombiri és mtsai., 2024; Venkatraman és mtsai., 2024). A levegőben közel 500 PAH vegyületet azonosítottak (Law és mtsai., 2022); a több, mint 100 ismert PAH alapvegyület és azok származékaik alapján (Zhang és mtsai., 2022) PAH-ok száma meghaladja a 10000-et (Nowakowski és mtsai., 2022).

Az aromás gyűrűk száma alapján megkülönböztetünk kis molekulatömegű (Low Molecular Weight; LMW) PAH-okat, melyek 2-3 gyűrűt tartalmaznak, míg a 4 vagy annál több gyűrűből álló vegyületeket nagy molekulatömegű (High Molecular Weight; HMW) PAH-oknak nevezzük (Edokpayi és mtsai., 2016). Szerkezetük döntően befolyásolja fizikai, kémiai, illetve biológiai tulajdonságaikat (Patel és mtsai., 2020). Az LMW PAH-ok elsősorban kőolajszennyezésből származnak, míg a HMW PAH-ok elsődleges forrása a szén, koks, biomassza tökéletlen égése és a kipufogógázok (Li és Duan, 2015; Reizer és mtsai., 2022).

A PAH-ok keletkezésüket tekintve lehetnek természetes, illetve antropogén eredetűek, azonban forrásuk szerint három csoportba soroljuk őket: Pirolízis során keletkeznek a *pirogén* PAH vegyületek. A *petrogén* vegyületek elsődleges forrása a nyersolaj kezelésével kapcsolatos tevékenységek (feldolgozás, tárolás, használat), míg a *biológiai* PAH vegyületek baktériumok és növények által szintetizált anyagok, de az erdőtüzek, vulkánkitörések is természetes forrásaik (Abdel-Shafy és Mansour, 2016). Döntő többségük pirolízissel és szerves anyagok tökéletlen égése során keletkezik (Mastral és Callén, 2000; Liu és mtsai., 2022; Topuz, 2022).

Jelentős mennyiségű PAH kerül a környezetbe az ipari tevékenységek által, így az alumínium- és kocszgyártásból, cement- és gumiabroncs gyártásból, bitumen- és aszfalt előállításból, petrokémiai folyamatokból, továbbá hő- és energiatermelésből, hulladékégetésből (Kwon és Castaldi, 2008; Sher és mtsai., 2023). Továbbá nagy mennyiségben tartalmaz PAH vegyületeket a korom, kátrány, cigarettafüst, kipufogógáz (Kamiya és mtsai., 2017; Adesina és mtsai., 2022; Dandajeh és mtsai., 2022; Shao és mtsai., 2023).

A PAH vegyületek toxicitása szerkezeti felépítésük mellett függ a környezeti paramétereiktől, például a foto-oxidációs folyamatoktól, ugyanis UV sugárzás hatására általában mérgezőbbek (McDonald és Chapman, 2002). Karcinogén, teratogén és mutagén hatásúak (Deary és mtsai., 2022; Reizer és mtsai., 2022; Ansari és mtsai., 2023). Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (United States Environmental Protection Agency; US EPA) 16 PAH vegyületet jelölt elsőbbségi szennyezőanyagként, míg a Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (International Agency for Research on Cancer; IARC) 15 PAH-t (köztük 6 US EPA által szabályozott) valószínűsíthetően rákkeltőnek minősített (Drwal és mtsai., 2019; Ansari és mtsai., 2023).

A humán kitettség elsősorban inhalációs úton jellemző, de a bőrön keresztüli felszívódás is egyre nagyobb szerepet kap (Feng és mtsai., 2025). Szervezetbe kerülve rákkeltő hatással rendelkeznek elsősorban a tüdőben, gyomorban, bőrben, továbbá meddőséget okozhatnak nők körében (Neal és mtsai., 2008). Mindemellett a metabolizmusok során, elsősorban a májenzimek által epoxid és dihidrodiol vegyületek képződnek belőlük, melyek a DNS-sel reakcióba lépő mutagén anyagok, melyek daganatos megbetegedéseket okozhatnak (Adujo, 2023).

A környezetbe kerülő PAH vegyületek sorsát elsősorban azok fizikai-kémiai tulajdonságai határozzák meg, különösen hidrofobicitásuk (Manzetti, 2013), mely jelentősen függ a szerkezetüktől. Az LMW-PAH vegyületek jobb vízoldhatóságuk és nagyobb illékonyáguk révén gyorsabban mobilizálódnak, degradálódnak, míg a HMW-PAH-ok nehezebben degradálható, perzisztens vegyületek (Kuppusamy és mtsai., 2017).

Alapvetően elmondható, hogy a molekulatömeg növekedésével nő a hidrofobicitás és az elektrokémiai stabilitás, így a HMW-PAH-ok hajlamosak akkumulációra, különösen az alacsonyabb rendű organizmusokban, melyek táplálékai magasabb trófikus szinten lévő élőlények számára, így a tápláléklánc magasabb szintjei felé haladva növekszik a felhalmozódott szennyezőanyag koncentrációja (biomagnifikáció) (Liu és mtsai., 2023).

Ugyanakkor egyéb tényezők, mint a fényintenzitás, hőmérséklet, elérhető elektronakceptorok minősége, adszorbensek típusa szintén befolyásolják a PAH-ok életidejét a közegben (Lima és mtsai., 2005).

A légkörben lévő, gázfázisú PAH-okkal reakcióba léphetnek az UV-sugárzás hatására keletkező hidroxil- és ózon származékok, melyek hatására a PAH koncentráció jelentősen csökkenhet. A légkörben lévő részecskékhez szorbeálódott PAH-ok akár több hétig is a levegőben maradhatnak, így távoli területekre juthatnak (Arey és Atkinson, 2003; Jiang és mtsai., 2023). Ülepedési folyamatok (száraz vagy nedves) során a földfelszínre vagy a felszíni vizekbe kerülnek, ahol hozzáférhetőségüket a szorpciós-deszorpciós folyamatok határozzák meg (Abdel-Shafy és Mansour, 2016).

Hidrofób vegyületek révén talajvízben oldott formában kis koncentrációban, elsősorban talajszemcsékhez adszorbeálva vannak jelen, azonban a vízben lévő huminsavakhoz, kolloidokhoz kötődve mobilisak, így messzire juthatnak (Conte és mtsai., 2001; Mackay és Gschwend, 2001).

Felszíni vizekben az ülepedő szemcsékhez adszorbeálva juthatnak az üledékekbe, ahol természetes degradáció révén csökken koncentrációjuk (Heitkamp és Cerniglia, 1987; Kanaly és Harayama, 2000; Knightes és Peters, 2003; Timoshenko és mtsai., 2021).

Mindemellett azonban a perzisztens PAH vegyületek biológiai úton történő lebontása, degradációja elsősorban aerob baktériumok és gombák által hatékony. A mikrobák számára

szén- és energiaforrásként szolgálnak ezek a vegyületek, így metabolikus aktivitásuk során hasznosítják, illetve átalakítják azokat.

#### 3.4.1.2. *Bioremediációs technikák policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok esetén*

A biodegradáción alapuló bioremediációs technológiákat több szempont szerint is csoportosíthatjuk, például annak helye szerint lehet *in situ* és *ex situ* (Kuppan és mtsai., 2024), továbbá az alkalmazott mikroorganizmusok alapján: a degradációt végző mikrobák rendszertani besorolása és tulajdonságai ismeretlenek, vagy rendszertani és fiziológiai tulajdonságaik ismeretében tudatosan alkalmazzuk őket. Előbbi esetén beszélhetünk természetes öntisztulásról, amikor nincs szükség külső beavatkozásra, az őshonos mikroflóra kellő degradációs kapacitással rendelkezik a szennyező eltávolítására (Bala és mtsai., 2022; Kuppan és mtsai., 2024). Ha a biodegradáció sebességének növelése érdekében tápanyagokat (nitrogén, foszfor, kálium) és oxigént juttatunk a szennyezett területre, akkor biostimulációról beszélünk. Ha az endemikus mikroflóra rendelkezik a szennyezőanyag bontásához szükséges enzimkészlettel, de a degradációs aktivitás kicsi, akkor az adott területről izolált és felszaporított mikrobák visszainjektálásával is elősegíthetjük a remediációt (Silva és mtsai., 2009).

Amennyiben rendszertanilag és fiziológiai tulajdonságaikban ismert mikrobákat szaporítunk fel és juttatunk a szennyezett területre, úgy bioaugmentációs technikát alkalmazunk. Ezt elsősorban olyan területeken alkalmazzuk, ahol az endemikus mikroflóra nem rendelkezik olyan enzimekkel, amelyek lehetővé tennék a szennyezőanyagok lebontását (Thompson és mtsai., 2005). Ezzel azonban sérülhet az őshonos mikrobaközösség működése, melynek helyrehozása nem vagy nagyon nehezen lehetséges. Mindemelletl kompetíció alakulhat ki a szénforrásokért az őshonos és az injektált mikroorganizmusok között, továbbá bakteriofágok és protozoonok is csökkenthetik a bejuttatott sejtek számát, ami a bioaugmentáció határfokát rontják (Oro és mtsai., 2024). Ezen kívül egyéb abiotikus tényezők (pl. hőmérséklet, nedvességtartalom, tápanyag mennyisége) is korlátozhatják a remediáció hatékonyságát (Mrozik és Piotrowska-Seget, 2010).

A bioaugmentáció hatékonyságának növelése céljából genetikailag módosított mikroorganizmusokat is alkalmaznak, melyek szennyezőanyagbontásért felelős enzimeik stabilitását növelik, illetve szubsztrát-specifitását szélesítik (Rayu és mtsai., 2012; Muter, 2023). Emellett olyan rekombináns baktériumfajok használata is jellemző, melyek felületaktív anyagok termelésére is képesek, s általuk a szennyezőanyagok biológiai hozzáférhetősége nő (Rafeeq és mtsai., 2023). A rekombináns baktériumok alkalmazása azonban közvélemény és hatósági szempontból aggályos, mivel féltik, hogy megváltoztatják az őshonos ökoszisztémát (Ezezika és Singer, 2010; Shams és mtsai., 2024). Ennek kiküszöbölésére különféle megoldások lehetségesek, így például a transzgénikus mikrobák szelekciós nyomás alá helyezése, melyet plazmidok használatával érnek el. Ennek következtében örökítőanyaguk replikációjához többlet-energia szükséges, ez által a növekedési rátájuk kisebb lesz az őshonos mikroflórával szemben, s így „kihígulnak” a mikroba populációból (Garbisu és mtsai., 2017; Marquiegui-Alvaro és mtsai., 2025). Egyéb lehetséges megoldás, hogy élő sejtek helyett a szennyezőanyag bontásért felelős enzimeket juttatják az érintett területre.

Tisztított enzimek segítségével tápanyagban szegény talajok kármentesítésére is van lehetőség (Sharma és mtsai., 2018). Mindemelletl enzimes kezelés révén elkerülhető olyan káros melléktermékek keletkezése, melyek mikrobiális degradáció esetén előfordulhatnak. Ugyanakkor a mikrobákhoz képest az enzimek szubsztrát-specifitása nagyobb, valamint kisebb méretük révén mobilisabbak (Gianfreda és Bollag, 2002); de nehézséget jelenthet, hogy

az enzimek stabilitása gyengébb, továbbá aktivitásuk csökkenhet vagy megszűnhet fizikai vagy kémiai változások hatására (Nigam és Shukla, 2015).

Ezen problémákra megoldást kínálnak az enzim immobilizációs technikák valamint a genetikai módosításuk (Gupta és Singh, 2017; Park és mtsai., 2017; Shaheen és mtsai., 2017).

Genetikai módosítást többnyire rekombináns DNS által hajtunk végre, melynek során az aminosavsorrendet módosíthatjuk kívánalmainknak megfelelően (Singh és mtsai., 2013). Ennek következtében változik az enzim térszerkezete, ami hatással van annak aktivitására és stressztűrő képességére például a pH-val, hőmérséklettel szemben (Rayu és mtsai., 2012).

Enzimek immobilizációja során különböző hordozókhoz kötik az enzimeket, hogy csökkentsék a mobilitásukat, s így növeljék a stabilitásukat (Ahmad és Sardar, 2015). Azonban az immobilizálás nem befolyásolhatja az enzimek konformációját és aktivitását (Shaheen és mtsai., 2017). Az immobilizált enzimek tágabb környezeti körülmények között (szélesebb pH és hőmérséklettartományban) is megőrzik aktivitásukat, sőt hőstabilitásuk is javítható. Továbbá néhány intracelluláris enzim sejtmentes közegben elveszti aktivitását, melyre szintén megoldást nyújthat az immobilizáció (Skoronski és mtsai., 2017).

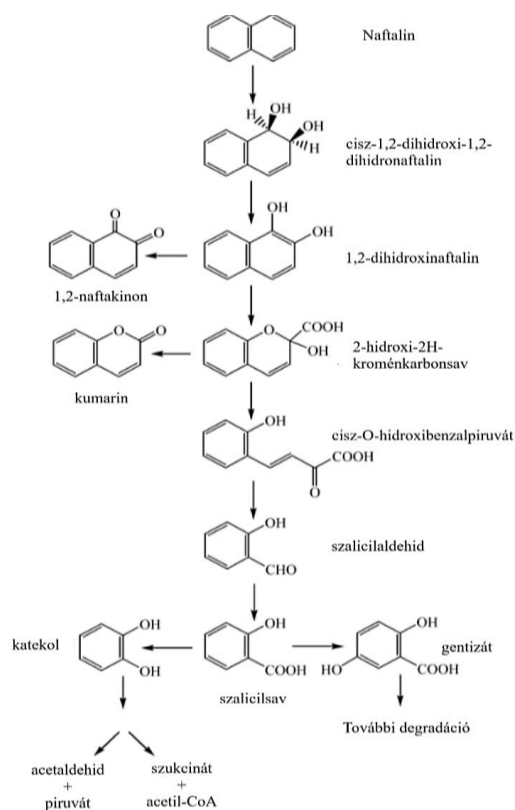
A PAH vegyületek biodegradációja eltérő mechanizmusok alapján történik az algák, baktériumok és gombák által. Az 5. ábra a naftalin lehetséges lebontási útvonalaira mutat egy példát.

Az algák és baktériumok elsősorban mono- és dioxigenáz, valamint hidroláz és hidroxiláz enzimek révén, míg a gombák elsősorban lignolitikus enzimekkel (lakkáz, lignin- és mangán peroxidáz), valamint a citokrom P450 enzimrendszer segítségével degradálják a szennyezőanyagokat (Mou és mtsai., 2023; Tesfaye és mtsai., 2025).

A PAH-ok kezdeti oxidációs lépése peroxidáz enzimek segítségével történik (Zhang és mtsai., 2015). Ezt követően a folyamat hasonló a monoaromás vegyületek degradációjához, ugyanis az egyes gyűrűk bomlása után katekol köztes termék keletkezik, végül az a benzolgyűrű hasítása után szervesetlen vegyületekre bomlik. Ezt a folyamatot katalizálják a mono- és dioxigenáz enzimek (Ghosal és mtsai., 2016).

A degradációs folyamat során gentizát (2,5-dihidroxibenzoészav) köztes termék is keletkezhet, melynek aromás gyűrűje a gentizát-1,2-dioxigenáz enzim révén felhasad, és maleil-piruvát keletkezik, ami több lépésben fumaráttá alakul (Adams és mtsai., 2006b; Romero-Silva és mtsai., 2013; Huang és mtsai., 2015).

Ezek alapján elmondható, hogy PAH-okkal szennyezett területek enzim alapú biodegradációjához peroxidáz és gentizát-1,2-dioxigenáz enzimek használata javasolt (Nagy és mtsai., 2024).



5. ábra: A naftalin bakteriális lebontása (Seo és mtsai., 2009 nyomán)

### 3.5. Nanorészecskék környezetre gyakorolt hatása és alkalmazhatóságuk bioremediációs eljárásokban - a szakirodalom összefoglaló értékelése

A nanoremediáció hatékonyságát számos tényező befolyásolja (például a nanorészecske fizikai-kémiai tulajdonságai és koncentrációja, az expozíciós idő, a kezdeti szennyezőanyag koncentráció) (Ansari és mtsai., 2023). A nanoanyagok remediációs célú felhasználására vonatkozólag a laboratóriumi szintű vizsgálatok során ígéretes eredményeket értek el több szennyezőanyaggal szemben (Araújo és mtsai., 2015; Galdames és mtsai., 2020), mely tükrözi a nanoremediáció által nyújtotta előnyöket, így a nanorészecskék nagy felületi arányának köszönhető reaktivitást, valamint a mobilitásuk általi szennyezőanyag eltávolítást mélyebb talajrétegekben (Ansari és mtsai., 2023).

Ugyanakkor a nanoanyagok eltérő hatásokat (pozitív és negatív egyaránt) gyakorolhatnak az élőlényekre, a környezetre, illetve az emberre, ez által nélkülözhetetlen a használatukra vonatkozó környezeti és humán komplex kockázatfelmérés (Alazaiza és mtsai., 2021; Ansari és mtsai., 2023). A nanoremediációs technológiák elfogadottságának és népszerűségének növelését elősegíti a használatuk kockázatára vonatkozó részletes dokumentáció, a terepi szintű remediációs technológiaparaméter vizsgálatok, a tudományos és politikai szféra közötti egyeztetések, valamint a további kutatás-fejlesztési kezdeményezések, mint például a laboratóriumi eredmények kiterjesztése és optimalizálása a valós körülményekre (Mukhopadhyay és mtsai., 2022; Ansari és mtsai., 2023).

A nanoremediáció széleskörű elterjedését azonban gátolja a nanorészecskék toxicitásának komplexitása, melyet számos tényező befolyásol és módosul a környezeti körülmények változása esetén (Karn és mtsai., 2009). Emellett – ahogy számos kutatás eredménye felhívja rá a figyelmet – a nanorészecskék környezeti sorsára és toxicitására vonatkozóan további kutatásokra van szükség (Patil és mtsai., 2016; Ganie és mtsai., 2021).

A nanoanyagok releváns és megbízható kockázatértékeléséhez kritikus fontosságú a környezetben megjelenő koncentrációjuk meghatározása, ehhez továbbfejlesztett érzékeny analitikai technikákra van szükség. Matematikai modelleket is alkalmazhatunk a nanoanyagok környezeti sorsának szimulálására, de a befolyásoló tényezőkre, folyamatokra vonatkozó ismereteink, valamint a felszíni heterogenitás, az öregedés és a modell paramétereinek jellemzéséhez a tudásunk még mindig hiányos, különösen szabadföldi körülmények között. Ugyanakkor továbbra is szükség van szabványosított megközelítésekre a nanorészecskék ökoszisztémákra és emberekre gyakorolt kockázatainak gyors és gazdaságos meghatározásához. Lehetséges, hogy a genomikai, transzkriptomikai, proteomikai valamint a bioinformatikai eszközök felhasználhatók erre a célra, de további kutatásokra van szükség az egyén és a populáció szintjén (Bradford és mtsai., 2021).

A nanorészecskék kockázatfelmérésére vonatkozó eddigi tanulmányok elsősorban a nanorészecskék előzetes kockázatszűrésére és/vagy kutatási célból készültek, nem pedig hivatalos döntéshozatali tevékenységek elősegítése céljából. Habár a hagyományos kockázatfelmérési módszerek sok információt nyújtanak a nanorészecskék toxicitására vonatkozólag, hosszú távú hatásukat nem biztos, hogy kellőképpen előre tudják jelezni a módszerek korlátai és a toxicitást befolyásoló tényezők komplexitása általi bizonytalanságok miatt (Hristozov és mtsai., 2012). Különös tekintettel a nanotechnológia, illetve nanoremediációs technikák gyors fejlődése révén létrehozott új nanorészecske-típusok esetén, melyek széleskörű szennyezőanyag eltávolításra lehetnek alkalmasak.

Emiatt elengedhetetlen a megfelelő és megalapozott kockázatértékelések elvégzése annak érdekében, hogy megelőzzük vagy mérsékeljük a potenciális környezeti, vagy ökológiai kockázatokat. Ehhez szükséges a nanoanyagok környezetben való viselkedésével és toxicitásával kapcsolatos további ismeretek szerzése olyan körülmények között, ahol nincs jelen egyéb szennyezőanyag; illetve olyan kutatások is nélkülözhetetlenek, melyek a nanorészecskék és más szennyezőanyagok együttes hatását vizsgálja. Megemlítendő, hogy mindezekhez a laboratóriumi vizsgálatokon túl *in situ* kutatások is szükségesek annak érdekében, hogy szabványos protokollok és értékhatárok legyenek meghatározhatóak a nanoanyagok szabadföldön történő alkalmazására.

A nanoremediáció széleskörű, biztonságos alkalmazása tehát további vizsgálatokat, illetve értékelést igényel, különösen a hatékonyság és a potenciális káros környezeti hatások szempontjából. Ugyanakkor a nanoremediáció – akár más remediációs technológiákkal való kombinálása – a fenntartható remediációs gyakorlat, illetve környezetvédelem jövőjét jelentheti (Alazaiza és mtsai., 2021).

## 4. Célkitűzés

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

Kutatásom első fázisában grafén-oxid, illetve cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék környezetre gyakorolt hatását környezettoxicológiai megközelítéssel vizsgálom és jellemzem, valamint értékelem potenciálisan káros, vagy kedvező hatásukat.

Doktori munkám második fázisa egy hatékony és környezetbarát kockázatcsökkentési biotechnológia fejlesztéséhez kapcsolódik, melynek során célom PAH-vegyületekkel szennyezett talajok enzim-alapú bioremediációs eljárásának kidolgozása és megvalósítása, ami igazolja a technológia és az alkalmazott enzimek hatékonyságát. Mindemellett felmérem, hogy nZnO hozzáadása elősegíti vagy gátolja a technológia hatékonyságát.

Céлом volt a cink-oxid, titán-dioxid és grafén-oxid nanorészecskék környezetre gyakorolt hatásának felmérése különböző tesztrendszerek, illetve eltérő trófikus szintekről származó tesztorganizmusok alkalmazásával. 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. Továbbá, mivel a nGO hatásfelméréséhez 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 céлом továbbá egy könnyen alkalmazható metodika 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<sup>TM</sup> tesztrendszert mérem fel, hogy alkalmas-e erre, mint relatíve olcsó és gyors technika. További céлом, hogy a Biolog EcoPlate<sup>TM</sup> mérések alapján nyert adatokból származtatható különböző vizsgálati végpontok érzékenységét felmérjem és az alapján javasoljak vizsgálati végponto(ka)t, 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 céлом 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 céлом volt a vizsgált nanorészecskék koncentráció- és időfüggő hatásának, valamint a citotoxikus hatásának vizsgálata is.

Előzetes feltételezéseink alapján, a nanorészecskék eltérő hatást gyakorolnak a különböző QS-szabályozott folyamatokra, valamint a nZnO hormézis hatást fejthet ki, míg a nTiO<sub>2</sub> nem. Továbbá várakozásaink szerint kicsi, szubletális koncentrációban is szignifikáns hatást mutathatnak a biofilmképzésre a nanorészecskék.

További kutatásaim során bioinformatikai úton tervezett új PAH-bontó enzimek (gentizát-dioxidáz és kataláz-peroxidáz) biodegradációs hatékonyságát vizsgálom, melynek során PAH-okkal szennyezett talaj mikrobiális aktivitásának és funkcionális diverzitásának meghatározására is felmérem a Biolog EcoPlate<sup>TM</sup> alkalmazhatóságát.

Mindezeket egy komplex rendszerben, nZnO és PAH-bontó enzimek együttes alkalmazásával vizsgálom nano-bioremediációs eljárás során.

Előzetes hipotézisünk szerint a nZnO jelenléte, a szennyezett közegben lévő koncentrációjától függően növelheti vagy gátolhatja egy enzim-alapú bioremediációs eljárás hatékonyságát, valamint a talaj mikrobiális közösségének aktivitását és funkcionális diverzitását. Ez közvetlenül és közvetve is befolyásolhatja a PAH-ok lebontásának hatékonyságát.

Mindezek tükrében célom volt értékelni a nZnO PAH-bontó enzimekre, ezáltal a bioremediáció hatékonyságára gyakorolt hatását, továbbá felmérni a nZnO talajban élő őshonos mikroflóra aktivitására és diverzitására kifejtett hatását; így hozzájárulva eredményeimmel egy környezetbarát kármentesítési eljárás kidolgozásához a jövőben.

## 5. Anyagok és módszerek

Doktori kutatásom középpontjában a nanorészecskék hatás- és hatékonyság felmérése állt különböző tesztrendszerben környezetotoxicitásuk és remediációs célú alkalmazhatóságuk szempontjából, melynek során figyelembe vettem a szakirodalomban található eddigi tanulmányok eredményét is. Ennek alapján határoztam meg, hogy adott nanorészecske hatását milyen tesztorganizmus válaszreakciói alapján, illetve milyen közegben térképezem fel.

A környezetre gyakorolt hatás felmérése során – különböző trófikus szintekről – egy fajú tesztrendszereket alkalmaztam az eddig kevésbé jellemzett nanorészecskék (elsősorban grafén-oxidok) toxicitásának vizsgálatára. Egyúttal az édesvízi mikrobiális közösségre gyakorolt hatást is felmértem az egyes nanorészecske típusok esetén, mely még kevésbé kutatott terület. Mindemellett a nanorészecskék egyéb, potenciális alkalmazási területét is vizsgálni kívántam a bakteriális kommunikáció befolyásolása, valamint talajremediációs technikára gyakorolt hatás felmérése révén.

A vizsgálatok során alkalmazott módszerek részletes metodikai leírása a „11.2. A vizsgálatok során alkalmazott módszerek leírása” fejezetben található.

### 5.1. Felhasznált nanorészecskék

A különböző típusú nanorészecskéket eltérő gyártóktól szereztük be, majd desztillált vízzel eltérő koncentrációjú diszperziókat készítettem belőlük, amelyeket felhasználás előtt 15 percig ultrahanggal kezeltem. A steril munkavégzést igénylő vizsgálatoknál előzetesen autoklávban csíramentesítettem a mintákat.

#### 5.1.1. Nano cink-oxid

A cink-oxid nanorészecskéket (CAS szám: 1314-13-2) a Sigma-Aldrich Inc.-től vásároltuk. A gyártó által megadott információk alapján a részecskék mérete kisebb volt 100 nm-nél, míg az átlagos részecskeméret 40 nm alatti (3. táblázat).

#### 3. táblázat – Nano cink-oxid szuszpenzió jellemző paraméterei

Jellemző	Érték
pH	7,5 ± 1,5
Sűrűség [g/cm <sup>3</sup> ]	1,7 ± 0,1
Részecskeméret (d50) [nm]	≤ 100
Átlagos részecskeméret (d90) [nm]	≤ 40
Koncentráció [m/m%] (vízben)	20

#### 5.1.2. Nano titán-dioxid

A titán-dioxid nanorészecskéket (CAS szám: 13463-67-7) az Evonik Resource Efficiency GmbH-től szereztük be, típusuk: AERODISP® VP Disp. W2730X. A gyártó által megadott információk alapján a TiO<sub>2</sub> részecskék (90% anatáz és 10% rutil) mérete 100 nm-nél kisebb, míg az átlagos részecskeméret 16 nm alatti (4. táblázat).

#### 4. táblázat – Nano titán-dioxid szuszpenzió jellemző paraméterei

Jellemző	Érték
pH	6,0 – 8,0
Sűrűség [g/cm <sup>3</sup> ]	1,28
Részecskeméret (d50) [nm]	≤ 100
TiO <sub>2</sub> tartalom [%]	29 – 31
Viszkozitás [mPas]	≤ 1000

### 5.1.3. Nano grafén-oxidok

A grafén-oxid nanorészecskéket a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karának Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszéken készítették. Két, eltérő típusú grafén-oxid szuszpenzió készült, melyek elnevezése (AF 96/97 és PM 995) a kiindulási grafitból ered.

Az AF 96/97 grafit (melynek széntartalma 96–98%, hamutartalma 2–4%, nominális részecskemérete min. 99,5%-ban  $\leq 40 \mu\text{m}$ ) a Graphit Kropfmühl GmbH-től, míg a PM 995 grafit (melynek széntartalma min. 99,5%, hamutartalma  $<0,5\%$ , nominális részecskemérete max. 10%-ban  $+ 0,063 \text{ mm}$ ) a Graphite Týn-től származik és nedves exfoliációval állítottak elő belőlük grafén-oxidot. Végül többször mosták őket, míg semleges pH értékű nem lett az 1,5  $\text{m}^3/\text{m}^3$ -ú vizes szuszpenzió, melyet barna üvegben tároltak.

Az egyes grafén-oxid típusok fizikai-kémiai jellemzőinek (5. táblázat) vizsgálata fagyasztva-szárított minták használatával történt. A két GO típus legtöbb jellemzője közel azonos értékű, azonban az AF 96/97 típusú részecskék vékonyabbak és a rétegek közötti tér is keskenyebb. A legnagyobb eltérés a fajlagos felületben mutatkozik a két típus között, ugyanis az AF 96/97 típusnak több mint kétszerese a PM 995-nél mért értékhez képest. További jellemzők a mellékletben található (részecskeméret eloszlás – M1. ábra, nitrogénadszorpciós izotermák – M2. ábra, por-röntgendiffrakciós (XRD) görbék és Raman-spektrumok – M3. ábra, felületkémiai jellemzők – M13. táblázat, röntgen fotoelektron spektroszkópia (XPS) – M14. táblázat).

5. táblázat – Nano grafén-oxid szuszpenziók jellemző paraméterei

Jellemző	AF 96/97	PM 995
Kiindulási szuszpenzió koncentrációja [ $\text{m}^3/\text{m}^3$ ]	1,53	1,56
Részecskeméret eloszlás <sup>a</sup>		
d10 [ $\mu\text{m}$ ]	5,9	10,2
d50 [ $\mu\text{m}$ ]	14,3	27,3
d90 [ $\mu\text{m}$ ]	35,2	58,3
Fajlagos felület <sup>b,c</sup> [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	84	40
Átlagos kristályméret <sup>b,d</sup> [nm]	8,24	6,74
Átlagos távolság a grafén rétegek között <sup>b,d</sup> [nm]	0,76	0,85
Átlagos rétegszám <sup>b,d</sup>	11	8
$I_D/I_G$ <sup>b,e</sup>	1,8	1,6
O/C arány értéke a GO származékoknak [atom %] <sup>b,f</sup>	0,48	0,50
Felületi funkciók csoportok koncentrációja pH 3 és 10 között [ $\text{mmol}/\text{g}$ ] <sup>g</sup>	2,30	2,34

<sup>a</sup> M1. ábra

<sup>b</sup> fagyasztva szárított mintákon mért érték

<sup>c</sup> kicsi hőmérsékleten ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mért nitrogén adszorpciós-deszorpciós izotermák alapján (Samaniego Andrade és mtsai., 2023), M2. ábra, M14. táblázat

<sup>d</sup> röntgen diffrakcióval mért érték (Farah és mtsai., 2023), M3.a ábra

<sup>e</sup> Raman spektroszkópia alapján (Bertóti és mtsai., 2022), M3.b ábra

<sup>f</sup> röntgen fotoelektron spektroszkópia (XPS) alapján (Bertóti és mtsai., 2022), M14. táblázat

<sup>g</sup> potenciometrikus titrálás alapján (Paudics és mtsai., 2021)

## 5.2. Nanoanyagok környezetre gyakorolt hatásának vizsgálata komplex megközelítéssel

A nanorészecskék élővilágra gyakorolt hatását több, eltérő típusú tesztrendszerben tanulmányoztam, melyek között voltak egy fajt és több fajt (mikrobiális közösséget) alkalmazó tesztrendszerek.

Kutatásom során egy-egy tesztrendszerben különböző végpontokat vizsgáltam eltérő metodika szerint, melyek eredményei alapján értékeltem a vizsgált nanorészecskék által kiváltott válaszreakciók (pl. fénykibocsátás, enzimaktivitás, szaporodás) mértékét az adott organizmuson, populáción.

A következő fejezetekben a különböző kísérleti rendszerek egymásra épülését és a kísérletek követésére alkalmazott metodikát ismertetem.

### 5.2.1. Nano grafén-oxid toxicitásának vizsgálata és potenciális környezeti kockázatának jellemzése

A grafén-oxid nanorészecskék ökotoxicitására vonatkozó elérhető tanulmányok, eredmények néha ellentmondóak és csak részterületeket fednek le a trófikus szintek tekintetében, így széleskörű hatásfelmérést végeztem, melynek során az egy fajt alkalmazó tesztrendszerek használata mellett a mikrobiális közösségre gyakorolt hatást is felmértem.

#### *5.2.1.1. Egy fajt alkalmazó tesztrendszerek*

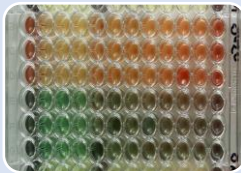
A vizsgált nanorészecskék hatásának vizsgálatát eltérő trófikus szintekről származó tesztorganizmusok segítségével végeztem környezeti kockázatfelmérést támogató komplex hatásfelmérés céljából. A tesztek elsősorban a környezettoxikológiai vizsgálatok során gyakran alkalmazott fajok használatával hajtottam végre. A toxicitás felmérésére alkalmazott tesztorganizmusokat és a vizsgált végpontokat a 6. ábra szemlélteti.

A nGO környezeti kockázatának felmérése során a 6. ábrán bemutatott módszerek eredményei alapján meghatároztam a 20%-os gátló hatást okozó hatásos koncentrációértékeket ( $EC_{20}$  – Effective Concentrations) az „5.4. Statisztikai analízis” fejezetben ismertetett módon. A legkisebb  $EC_{20}$  értéket figyelembe véve, konzervatív megközelítéssel megadható a nGO-k PNEC (Predicted No-Effect Concentration, előrejelzés szerint károsan még nem ható koncentráció) értéke, mely a kockázati tényező (Risk Quotient, RQ) meghatározásához szükséges. Az RQ értékét az előre jelezhető környezeti koncentráció (Predicted Environmental Concentration, PEC) és a PNEC hányadosaként kapjuk meg. Minél nagyobb az RQ értéke, annál nagyobb veszélyt jelent a környezetbe került vegyi anyag.



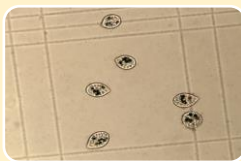
### ***Aliivibrio fischeri***

- Biolumineszcencia intenzitás
- Légzési láncban résztvevő enzimek aktivitásának mérése



### ***Escherichia coli***

- Szaporodás
- Légzési láncban résztvevő enzimek aktivitásának mérése
- Reaktív oxigén gyök termelés intenzitásának mérése
- Genotoxicitás vizsgálata *SOS ChromoTest™* segítségével



### ***Tetrahymena pyriformis***

- Szaporodás
- Légzési láncban résztvevő enzimek aktivitásának mérése



### ***Panagrellus redivivus***

- Mortalitás



### ***Sinapis alba* (Fehér mustár) és *Triticum aestivum* (Közönséges búza)**

- Csírázóképeség
- Gyökér- és szárhossznövekedés

**6. ábra:** A grafén-oxid nanorészecskék toxicitásának vizsgálata során alkalmazott tesztorganizmusok és a vizsgált végpontok

#### **5.2.1.2. Mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése**

A nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérését laboratóriumi mikrokozmosz rendszerek vizsgálatán keresztül végeztem, de valós környezetből (Balaton) származó édesvízzel.

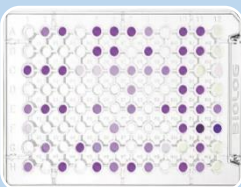
Ezekből a laboratóriumi kontrollált többfajú komplex rendszerekből (mikrokozmoszokból), meghatározott inkubációs idő elteltével mintát véve határoztam meg a mikrobiális aktivitást különböző vizsgálati módszerek segítségével. Ennek során mikrotitrátor lemezben mértem az enzimaktivitást, valamint Biolog EcoPlate™ használatával eltérő indexeket és végpontokat határoztam meg, melyek a mikrobiális aktivitás jellemzésére szolgálnak.

A nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérésére szolgáló módszerek és vizsgálati végpontok listája a 7. ábrán láthatók.



### Életképesség vizsgálata

- Légzési láncban résztvevő enzimek aktivitásának mérése



### Szénforrás hasznosításon alapuló mikrobiális aktivitás és funkcionális diverzitás vizsgálata Biolog EcoPlate™ segítségével

- Szubsztrátszám (SR)
- Átlagos színfejlődési érték (AWCD)
- Szubsztrátcsopontonkénti átlagos színfejlődési érték (SAWCD)
- Görbe alatti terület (AUC)
- Shannon-index (H)
- Shannon-egyenletesség (E)
- Simpson-index (D)
- McIntosh-index (U)
- Gini-index (G)

7. **ábra:** A nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérésére alkalmazott módszerek és végpontok

#### 5.2.2. Nano cink-oxid és nano titán-dioxid hatásának vizsgálata

A cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék hatását több eltérő tesztrendszerben vizsgáltam.

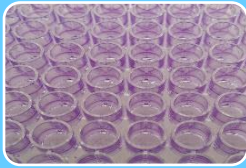
##### *5.2.2.1. Mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése*

A nano cink-oxid, illetve nano titán-dioxid édesvízi mikrobiális közösségre gyakorolt hatását a fentieknek megfelelően (7. ábra), Biolog EcoPlate™ alkalmazásával mértem fel, és az abból származtatott vizsgálati végpontokat határoztam meg. Ezek a szénforrás hasznosításon alapuló mikrobiális aktivitás és funkcionális diverzitás vizsgálatára szolgáló végpontok megegyeznek a Biolog EcoPlate™ rendszer 7. ábrán bemutatott végpontjaival.

##### *5.2.2.2. Bakteriális kommunikációra gyakorolt hatás felmérése*

A fém-oxid nanorészecskék mikrobákra gyakorolt hatását a bakteriális kommunikáció befolyásolása révén 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 (8. ábra) annak érdekében, hogy a toxikus hatást el tudjam különíteni a bakteriális kommunikációra gyakorolt hatástól.

### Bakteriális kommunikáció által befolyásolt paraméterek vizsgálata



- Pioverdin termelés intenzitásának mérése
- Biofilmképzés intenzitásának mérése

### Szaporodás és életképesség felmérése



- Szaporodás
- Légzési láncban résztvevő enzimek aktivitásának mérése
- Reaktív oxigén származék termelés intenzitásának mérése

**8. ábra:** *Pseudomonas aeruginosa* baktériumra gyakorolt hatás felmérése fém-oxid nanorészecskék esetén

## 5.3. Enzim alapú technológia fejlesztése és hatékonyságának felmérése policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok bioremediációjára

Policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok kármentesítési lehetőségeinek felmérésére vonatkozólag is végeztem kutatásaimat, ehhez kapcsolódóan egy innovatív bioremediációs technológia megalapozása és hatékonyságának felmérése volt a célom.

### 5.3.1. Metagenomikai úton tervezett enzimek talajremediációban történő vizsgálata

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 mikrokozmosz rendszerekben (M11. táblázat) vizsgáltam. Ennek során 1 mg tisztított enzimet, valamint 20 mmol kalcium-peroxidot ( $\text{CaO}_2$ ) adtam 200 g szennyezett talajhoz különböző kombinációkban.

Kutatómunkám egy konzorciális együttműködés keretében elnyert 2017-1.3.1-VKE-2017-00013 számú pályázat keretén belül végeztem, melyben a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszéke mellett az ELGOSCAR Környezettechnológiai Zrt., az Eötvös Loránd Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszéke és Bioinformatikai Csoportja, a Fermentia Mikrobiológiai Kft., és a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézete vett részt. A pályázat célja szénhidrogénekkal szennyezett talajok biológiai kezelése új oltóanyagok és innovatív technológiák segítségével, így a vizsgálataim során alkalmazott enzimeket is a konzorciális együttműködés révén alakították ki.

A technológiai mikrokozmosz kísérletekben az ELGOSCAR Környezettechnológiai Zrt.-től származó, mesterségesen szennyezett kőzetlisztes homoktalajt (aleurit) használtunk, amely ismert koncentrációjú PAH szennyezést (12,5 mg/kg naftalin, 25,9 mg/kg fenantrén, 46,2 mg/kg antracén és 52,0 mg/kg pirén) tartalmazott (M10. táblázat). A PAH vegyületekkel való szennyezettség mértéke alapján a közepes szennyezettségű közegekhez tartozott (Wu és mtsai., 2019b; Patel és mtsai., 2020).

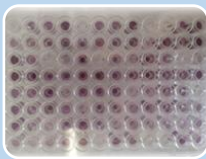
Az enzimalapú remediációs technológia fejlesztésében kiemelt jelentőségű, hogy a PAH-vegyületek koncentrációjának csökkenése az enzimek katalitikus aktivitásából származzon, ne a mikroflóra általi biodegradációból, így a mikrobiális aktivitás gátlása érdekében kalcium-peroxidot ( $\text{CaO}_2$ ) is alkalmaztam 20 mmol koncentrációban. Emellett azt is felmértem, hogy a  $\text{CaO}_2$  önmagában alkalmazva befolyásolja-e a szennyezőanyag eltávolítást, javítható-e általa a remediáció hatékonysága.

A remediáció hatékonyságára gyakorolt hatást a szennyezőanyagok koncentrációjának analitikai mérésén, továbbá a mikrobiális aktivitás meghatározásán keresztül végeztem (9. ábra). Utóbbihoz a korábban leírt Biolog EcoPlate™ eszközt használtam és az abból számított végpontok alapján jellemeztem az észlelt hatást.



#### **Szennyezőanyag koncentrációjának analitikai mérése**

- Gázkromatográfia tömegspektrométer detektorral (GC-MS)



#### **Szénforrás hasznosításon alapuló mikrobiális aktivitás és funkcionális diverzitás vizsgálata Biolog EcoPlate™ segítségével**

- Szubsztrátszám (SR)
- Átlagos színfejlődési érték (AWCD)
- Szubsztrátcsoportonkénti átlagos színfejlődési érték (SAWCD)
- Görbe alatti terület (AUC)
- Shannon-index (H)
- Shannon-egyenletesség (E)
- Simpson-index (D)
- McIntosh-index (U)
- Gini-index (G)

*9. ábra: Bioremediációs eljárás hatékonyságának felmérésére alkalmazott monitoring módszerek*

### 5.3.2. Cink-oxid bioremediációs eljárás hatékonyságára gyakorolt hatásának felmérése

Kutatásom kiterjedt a nanorészecskék potenciális alkalmazási területének felmérésére is egy környezetvédelmi biotechnológiában, így a nano cink-oxid PAH-okkal szennyezett talaj bioremediációs eljárásának hatékonyságára gyakorolt hatását is felmértem az előzőekben bemutatott kutatáshoz kapcsolódóan. Ennek során mikrokozmosz rendszert hoztam létre (M12. táblázat), amelyben PAH-szennyezett talaj mellé a metagenomikai módszerekkel előállított enzimek közül a korábbi kísérletek alapján legnagyobb szennyezőanyag eltávolítást, illetve mikrobiális aktivitást eredményező enzimek (Nagy és mtsai., 2024) vizsgálatával folytattam kísérleteimet.

A szennyezett talajhoz 200 és 1000 mg/kg koncentrációban adtam nano cink-oxidot, valamint 10 mmol kalcium-peroxidot és enzimeket (E39 és E105) különböző kombinációkban, hogy felmérjem milyen hatást gyakorol a remediáció hatékonyságára.

Monitoring módszereket illetően továbbra is a 9. ábra szerinti szennyezőanyagkoncentráció mérését, illetve mikrobiális aktivitás meghatározását alkalmaztam.

#### 5.4. 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.

Továbbá 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 (így az *A. fischeri* enzimaktivitását, az *E. coli* szaporodását és enzimaktivitását, a *S. alba* és *T. aestivum* gyökér- és szárhosszfejlődését). 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 (így az *A. fischeri* biolumineszcencia intenzitását, a *T. pyriformis* szaporodását és enzimaktivitását, a *P. redivivus* mortalitását, valamint az élővízben lévő mikrobiális közösség metabolikus aktivitását, továbbá a bakteriális kommunikáció vizsgálata során a biofilmképzést, pioverdin termelést). A próba feltételének teljesülését Mauchly-féle szfericitás vizsgálattal határoztam meg.

A szignifikáns eltéréseket eltérő betűk jelzik a diagramokon.

A koncentráció (dózis)-válasz összefüggés felméréséhez kapcsolódóan – a grafén-oxidok környezeti hatásvizsgálata és kockázatfelmérése esetén – *dose-response* analízist végeztem az Origin® 2018 (OriginLab, Northampton, MA, USA) szoftver segítségével, mely alapján meghatároztam az adott, vizsgált végpont 20%-os gátlását okozó hatásos koncentrációkat (EC<sub>20</sub> – Effective Concentrations).

## 6. Eredmények és értékelésük

Doktori kutatásom a környezeti kockázatmenedzsment két eltérő irányvonala a környezeti kockázatfelmérés, illetve környezeti kockázatcsökkentés köré épült, különböző nanoanyagokkal a fókuszban. Kutatómunkám első fázisában különböző nanoanyagok (grafén-oxid, illetve cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék) környezetre gyakorolt hatását mértem fel és jellemeztem környezettoxikológiai megközelítéssel. Doktori munkám második fázisa egy hatékony és környezetbarát kockázatcsökkentési biotechnológia fejlesztéséhez kapcsolódott metagenomikai úton fejlesztett enzimek alkalmazásával. Ennek részeként új enzimek hatékonyságát nZnO jelenlétében is vizsgáltam, annak felderítésére, hogy a nZnO képes-e tovább növelni a PAH-vegyületek eltávolítását.

A kutatásom során végzett vizsgálatok főbb eredményeit és azok értékelését, összevetve más tanulmányok eredményeivel az alábbiakban részletezem a különböző vizsgálati metodikáknak megfelelően.

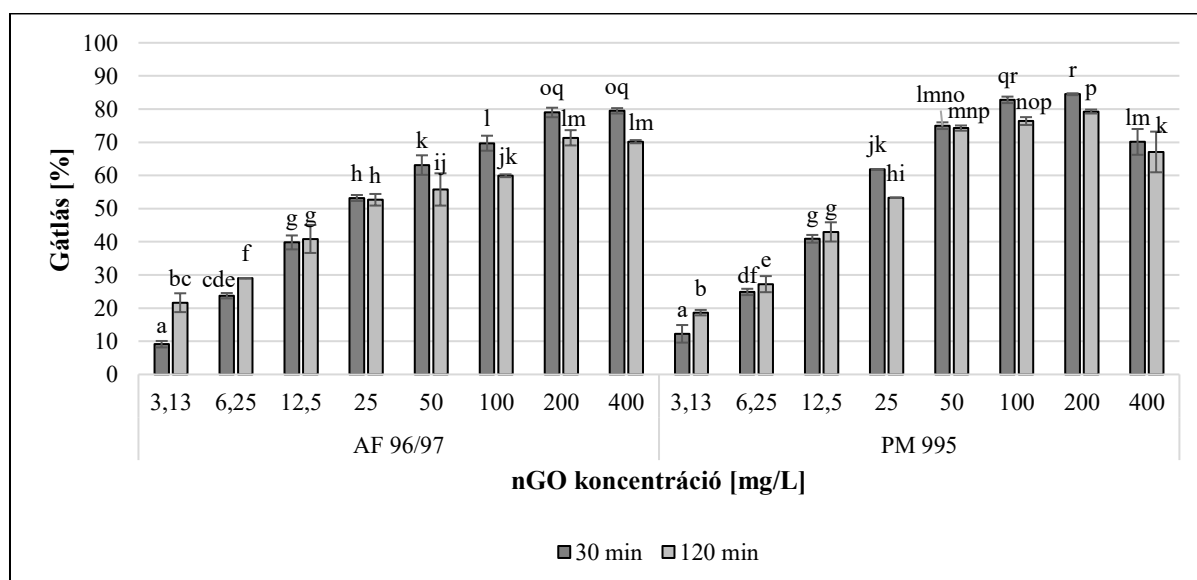
### 6.1. Grafén-oxid, illetve cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék környezetre gyakorolt hatásának jellemzése környezettoxikológiai megközelítéssel

#### 6.1.1. Grafén-oxid nanorészecskék környezetre gyakorolt hatásának és kockázatának jellemzése és értékelése egy fajt alkalmazó tesztrendszerben

Az AF 96/97 és PM 995 grafén-oxid nanorészecskék toxicitását egy fajt alkalmazó, valamint mikrobiális többfajú tesztrendszerben is felmértem, különböző végpontok alkalmazásával. Komplex kutatásom eredményeit, ezek értékelését, valamint az ezekre alapozott környezeti kockázat becslését mutatom be ebben a fejezetben.

#### *Aliivibrio fischeri* tesztorganizmusra gyakorolt hatás

A vizsgált GO nanorészecskék *Aliivibrio fischeri* baktérium biolumineszcenciájának intenzitására gyakorolt hatását a 10. ábra szemlélteti.



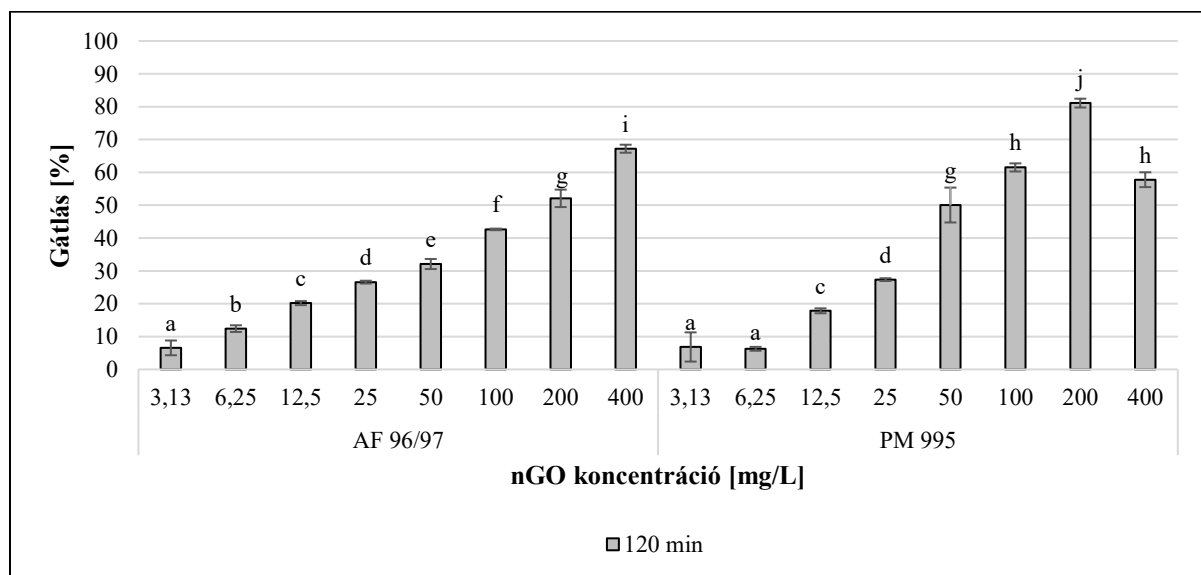
10. ábra: Grafén-oxid nanorészecskék hatása az *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia intenzitására. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Az eredmények alapján mindkét nGO koncentrációfüggő negatív hatást gyakorolt a fénykibocsátásra a vizsgált koncentrációtartományban; azonban 400 mg/L PM 995 esetén enyhe csökkenés volt megfigyelhető a gátlás mértékében. A 10. ábráról szintén leolvasható, hogy az inkubációs időnek jelentős volt a hatása. Kisebb koncentrációk esetén (3,13–6,25 mg/L) a gátlási arány nagyobb volt 120 perc expozíciós időnél, mint 30 percnél, ugyanakkor az eredmények statisztikai elemzése alapján, még a legkisebb alkalmazott koncentráció (3,13 mg/L) is mindkét nGO típus esetén a kontrollhoz képesti szignifikáns hatást okozott 30 perc kontaktidő után. 12,5–25 mg/L nGO koncentráció hatásának vizsgálata során az okozott eltérések nem bizonyultak szignifikánsnak (az AF 96/97 esetében különböző expozíciós időknél egyaránt), míg nagyobb nGO dózisok (>50 mg/L) alkalmazása esetén a gátlási arányok kisebbek voltak hosszabb expozíciós idő során, továbbá a legtöbb esetben szignifikánsnak bizonyult a 30 perces inhibíció mértékéhez képest. A legnagyobb mértékű inhibíciót 30 perc inkubációs idő után figyeltük meg (79,5% 400 mg/L AF 96/97 esetén, illetve 84,5% 200 mg/L PM 995 alkalmazásakor).

A 30 perc kontaktidő után meghatározott EC<sub>20</sub> értékek (6. táblázat) is azt mutatják, hogy a PM 995 típusú nGO enyhén toxikusabb volt, mint az AF 96/97, mivel a PM 995 EC<sub>20</sub> értéke 5,01 mg/L volt, míg az AF 96/97 esetén 5,86 mg/L-nak adódott. Azonban 120 perces expozíciós idő után a PM 995 EC<sub>20</sub> értéke nagyobb volt (4,40 mg/L), mint az AF 96/97-é (4,01 mg/L); így nem állítható egyértelműen, hogy a PM 995 nGO toxikusabb, mint az AF 96/97.

Emellett fontos kiemelni, hogy a kvórum érzékelés által szabályozott biolumineszcenciára gyakorolt hatás végső eredményeiben mind a citotoxikus hatás, mind a QS-befolyásoló hatás szerepet játszhat.

A sejtek életképességének felmérésére a baktériumsejtek metabolikus aktivitását vizsgáltuk rezaurin redukciós módszerrel 120 perc expozíciós idő után, melynek eredményeit a 11. ábra szemlélteti.



**11. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása az *Aliivibrio fischeri* enzimaktivitására. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Az eredmények alapján a nGO koncentrációfüggő negatív hatást gyakorolt az *A. fischeri* enzimaktivitására; már a 3,13 mg/L nGO koncentráció is szignifikáns gátlást okozott mindkét nGO esetében. Az nGO hatása hasonló mértékű volt a 25 mg/L-es koncentrációig mindkét típusnál, azonban nagyobb dózisoknál a PM 995 jelentősebb gátló hatást fejtett ki, kivéve

400 mg/L esetén. Ezt a statisztikai elemzés is megerősítette, amely szignifikáns különbségeket mutatott ki a kezelések között. A legnagyobb negatív hatás 81% volt, amelyet 200 mg/L nGO PM 995 esetében figyeltük meg, míg az AF 96/97 esetében ez 67% volt 400 mg/L koncentrációnál.

Másrésről, enzimaktivitás vizsgálat során minden esetben kisebb volt a gátlási arány a biolumineszcencia intenzitás mérésnél tapasztaltakhoz képest azonos nGO koncentráció esetén. Ez azt jelzi, hogy a biolumineszcencia intenzitás mérés érzékenyebb végpont, mint az enzimaktivitás mérés, melyben közre játszhat, hogy a nGO a bakteriális kommunikációra is hatást gyakorol. A biolumineszcencia intenzitás mérésének érzékenységét az EC<sub>20</sub> értékek (6. táblázat) szintén alátámasztják (AF 96/97 esetén 22,86 mg/L, míg PM 995 esetén 16,13 mg/L). Mindkét EC<sub>20</sub> érték nagyobb volt, mint a biolumineszcencia intenzitás alapján számított EC<sub>20</sub> értékek. Összeségében elmondható, hogy ezen eredmények alapján a nGO PM 995 toxikusabb az *A. fischeri* baktériumra, mint az AF 96/97.

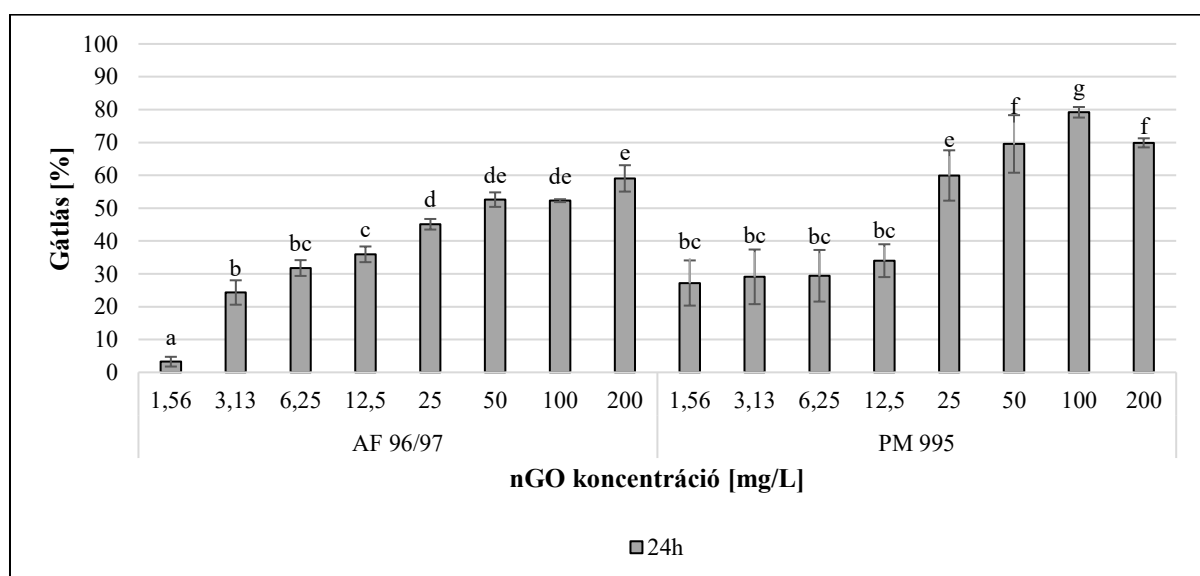
Lee és munkatársai (2022) a nGO vizsgálatok során nem tapasztaltak antimikrobiális hatást *Vibrio* fajokra vonatkozólag, valamint Domi és munkatársai (2020) sem észleltek gátló hatást a *Vibrio fischeri* biolumineszcencia intenzitásában 160 mg/L nGO koncentrációig, azonban 800 mg/L alkalmazása 100%-ban gátolta azt 10 perc expozíciós idő elteltével. Ugyanakkor a mi tesztrendszerünk érzékenységét jól szemléltetik a kisebb koncentrációk esetén tapasztalt gátló hatások, valamint, hogy a biolumineszcencia gátlása mellett az *A. fischeri* enzimaktivitása vizsgálata során is inhibíciót tapasztaltunk.

### ***Escherichia coli* tesztorganizmusra gyakorolt hatás**

A grafén-oxid nanorészecskék *Escherichia coli* szaporodására gyakorolt hatását OD mérés alapján vizsgáltuk DIALAB ELISA EL800 lemezleolvasó segítségével.

Ez a módszer nem biztosított megbízható eredményeket, mivel az abszorbancia mérés során a nGO színe (és denzitása) befolyásolta a mikrotiter lemez celláiban mért értékeket. Így csak a rezaurin redukción alapuló enzimaktivitás vizsgálat volt alkalmazható ennél a tesztorganizmusnál, mivel ez a mérési módszer a fluoreszcencia intenzitásának mérésén alapul.

A grafén-oxid nanorészecskék *Escherichia coli* enzimaktivitására gyakorolt hatását a 12. ábra szemlélteti.



**12. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása az *Escherichia coli* enzimaktivitására rezaurin redukciós teszttel. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A GO nanorészecskék koncentrációfüggő gátló hatást gyakoroltak az *E. coli* metabolikus aktivitására minden kezelés esetén. A kisebb koncentrációjú (1,56–12,5 mg/L) PM 995 kezelések nem okoztak szignifikáns különbségeket, mivel a hatások mértéke nagyon hasonló volt. Másrészt, nagyobb dózisok (25–200 mg/L) alkalmazásánál a PM 995 szignifikánsan nagyobb gátló hatást fejtett ki az enzimaktivásra az AF 96/97-hez képest. A legnagyobb gátlás a PM 995 nGO esetében 79% volt 100 mg/L koncentrációt alkalmazva, míg az AF 96/97 esetén ez csak 59% volt 200 mg/L koncentrációnál. A PM 995 nagyobb negatív hatását a statisztikai elemzés is megerősítette, miszerint az AF 96/97 típus 3,13 mg/L koncentrációnál eredményezett szignifikáns hatást, míg a PM 995 már 1,56 mg/L koncentrációnál is szignifikáns gátló hatású volt. Az EC<sub>20</sub> értékek (6. táblázat) szintén azt tükrözik, hogy a PM 995 toxikusabb, mivel annak EC<sub>20</sub> értéke 2,57 mg/L volt, míg az AF 96/97 esetében ez 3,97 mg/L-nek adódott.

A ROS képződés vizsgálata azt mutatta, hogy a növekvő nGO koncentráció nem eredményezett ROS növekedést, sőt koncentrációarányosan csökkent annak mértéke (M15. táblázat). Ez arra utal, hogy a tesztelt nGO szuszpenzió nem vált ki oxidatív stressz reakciót, hanem más hatásmechanizmuson keresztül fejt ki citotoxikus hatást.

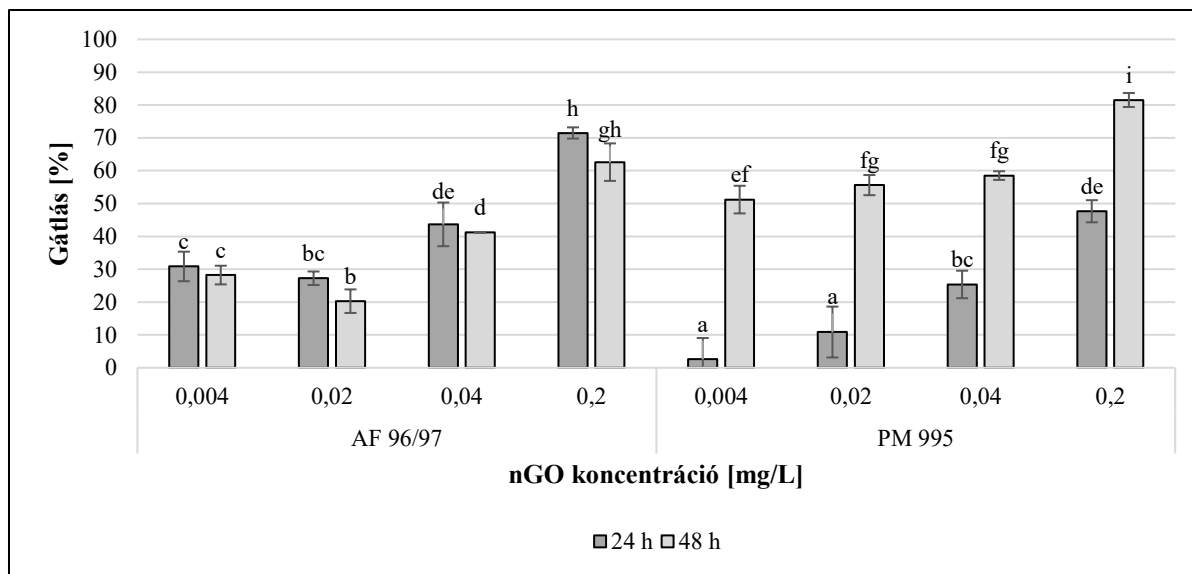
Liu és munkatársai (2011) tanulmányában a GO és a redukált GO erős antibakteriális aktivitásáról számoltak be *E. coli*-ra vonatkozólag, miszerint 40 µg/mL GO koncentráció 69,3%-os, míg azonos koncentrációjú redukált GO 45,9%-os életképességcsökkenést okozott. Qiang és munkatársai (2021) a nGO erőteljes citotoxikus hatását írták le *E. coli*-ra nézve, koncentráció-arányos módon gátolva a baktérium növekedését és szaporodását. Eredményeink szerint szintén koncentráció-arányos gátló hatásúak az enzimaktivásra a tesztelt nGO-k, bár az alkalmazott koncentrációtartomány szélesebb volt, míg a legnagyobb gátló hatás 79% volt 100 mg/L nGO PM 995 esetén.

### **Genotoxicitás vizsgálata EBPI SOS ChromoTest™ segítségével**

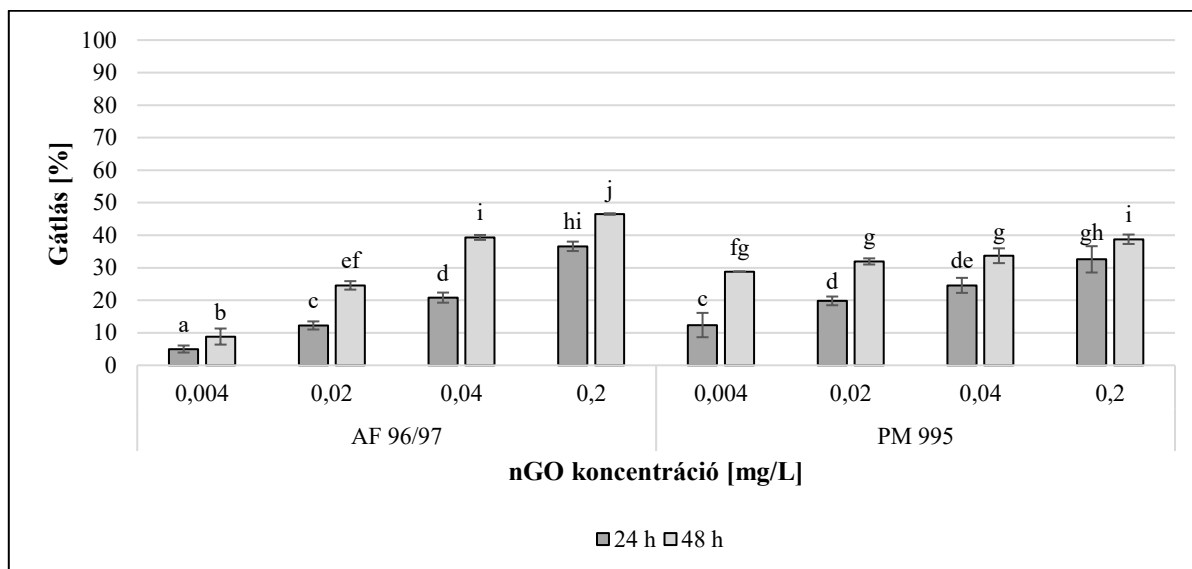
A tesztelt anyagok genotoxicitásának vizsgálata vizuálisan és fotometrikus műszeres méréssel kvantitatívan történt. A genotoxicitás értékelése során problémát jelentett a minták zavarossága és színe az 1×, 2×, és 4×-es mintahígításoknál (500–2000 mg/L koncentráció tartomány). 8×-os mintahígításnál ez a zavaró hatás már nem volt számottevő, azonban ezen koncentrációknál nem mértünk genotoxikus hatásokat. Az EBPI SOS ChromoTest™ eredményei alapján egyik tesztelt minta sem bizonyult genotoxikusnak 250 mg/L koncentrációnál, mivel az indukciós faktorok (IF) 1,5-nél kisebbek voltak.

### ***Tetrahymena pyriformis* tesztorganizmusra gyakorolt hatás**

A GO nanorészecskék protozoa *Tetrahymena pyriformis*-ra gyakorolt hatását különböző módszerekkel és végpontokkal vizsgáltuk. Az OD mérés, valamint az MTT redukción alapuló módszerek nem adtak megbízható eredményt, mivel a GO nanorészecskék színe ebben az esetben is befolyásolta a mért értékeket. Az MTT redukción alapuló enzimaktivitás mérés szintén elfogadhatatlan volt, azonban a fluoreszcencia intenzitásán alapuló rezaurin teszt megbízható módszernek bizonyult. Továbbá, a reprodukciós ráta meghatározására a sejtek mikroszkópos számlálása volt a legmegbízhatóbb módszer a GO nanorészecskék hatásának felmérésére. A nGO *T. pyriformis* szaporodására gyakorolt hatását a 13. ábra szemlélteti, míg az enzimaktivitás vizsgálat eredményeit a 14. ábra illusztrálja.



**13. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a *Tetrahymena pyriformis* szaporodására. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).



**14. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a *Tetrahymena pyriformis* enzimaktivitására. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Mindkét típusú GO nanorészecske koncentráció- és kontaktidő függő gátló hatást gyakorolt a *T. pyriformis* szaporodására. Az AF 96/97 esetén az inhibíció mértéke hasonló volt 24 és 48 óra inkubáció után, azonban enyhe csökkenés volt észlelhető 48 óra elteltével. A PM 995 gátló hatása sokkal nagyobb volt 48 óra elteltével, mint 24 óra expozíciós idő után, különösen kisebb koncentrációk vizsgálata során.

A statisztikai analízis megerősítette, hogy 24 óra kontaktidő után az AF 96/97 nGO típusnak már 0,004 mg/L koncentráció esetén is szignifikáns hatása volt, míg a PM 995 esetén csak 0,02 mg/L koncentrációnál volt szignifikáns hatás megfigyelhető. 48 óra elteltével mindkét nGO típus a kontrollhoz képest szignifikáns mértékben gátolta a szaporodást még a legkisebb tesztelt koncentráció, 0,004 mg/L esetén is.

Az enzimaktivitás vizsgálat eredményei hasonló tendenciát mutattak a szaporodásnál tapasztaltakhoz, habár ebben az esetben a gátlás mértéke mindig nagyobb volt 48 óra inkubációs

idő után, mint 24 óra elteltével. Az *A. fischeri* teszt eredményeihez hasonlóan a *T. pyriformis* enzimaktivitás mérése is kevésbé bizonyult érzékeny módszernek a szaporodás méréséhez képest, mivel minden kezelés kisebb hatást gyakorolt az enzimaktivitásra, mint a szaporodásra.

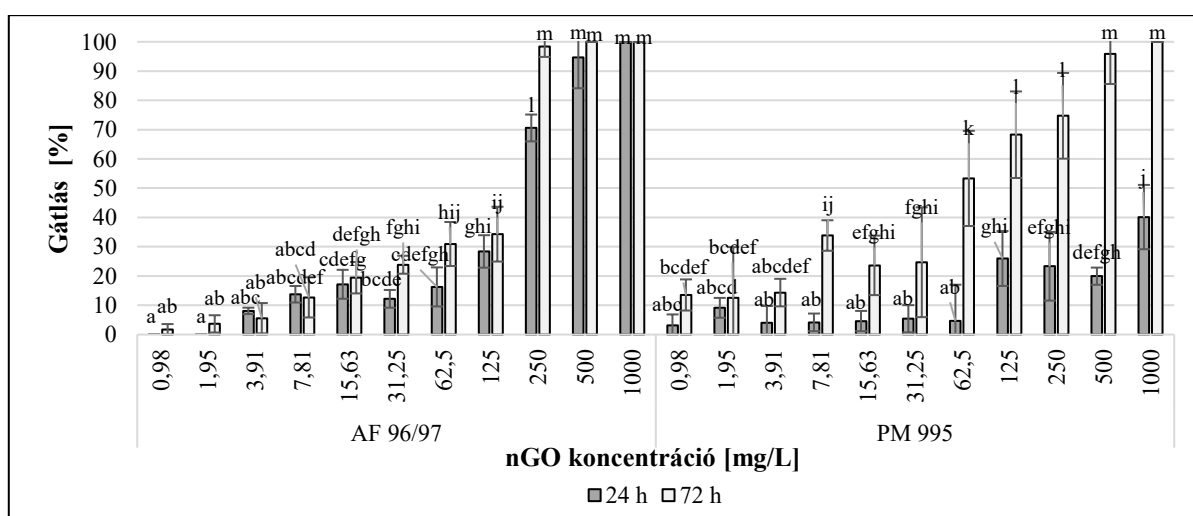
A PM 995 csak 0,02 mg/L nGO koncentrációnál volt szignifikáns hatással a szaporodás mértékére. Az enzimaktivitás vizsgálat során tapasztalt legnagyobb gátló hatás az AF 96/97 nGO esetében 46% volt 0,2 mg/L koncentrációnál 48 óra elteltével, míg PM 995 esetén azonos körülmények között 39% volt. A szaporodásgátlás koncentráció-válasz összefüggés alapján meghatározott EC<sub>20</sub> értékek kisebbek voltak, mint az enzimaktivitás méréseknél azonos kontaktidőnél, kivéve PM 995 esetén 24 óra elteltével (6. táblázat). A legkisebb EC<sub>20</sub> értékeket (0,004 mg/L) PM 995 esetén határoztuk meg 48 óra elteltével, mind a szaporodásra, mind az enzimaktivitás felmérésére irányuló kísérletek esetén.

Több kutató vizsgálta egy fajt alkalmazó rendszerekben különböző nanorészecskék hatását, köztük a protozoákra is. Guo és munkatársai (2022) arról számoltak be, hogy a szilika (SiO<sub>2</sub>) nanorészecskék befolyásolták a baktériumok bejutását a *Tetrahymena thermophila* tesztorganizmusba az ATP szintézis gátlásán és a fagocitózisban szerepet játszó gének moderálásán keresztül.

Liao és munkatársai (2019) a GO *T. thermophila* tesztorganizmus szaporodására, enzimaktivitására és oxidatív stressz mértékére gyakorolt hatásának tanulmányozása során megállapította, hogy 32 mg/L-nél nagyobb GO koncentráció a protozoa szaporodását jelentős mértékben gátolta. Az alkalmazott GO dózis növelése kezdetben fokozta, majd csökkentette a ROS és a szuperoxid-dizmutáz enzim szintjét, míg az acetilkolin-észteráz enzimaktivitást gátolta. Ezzel ellentétben tapasztalataink szerint már 0,004 mg/L nGO koncentráció szignifikáns mértékben gátolta a *Tetrahymena pyriformis* szaporodását és enzimaktivitását 24 óra elteltével. Ennek megfelelően a legkisebb EC<sub>20</sub> értékeket ezen tesztorganizmus esetén kalkuláltuk, ami alapján a *T. pyriformis* volt a legérzékenyebb a vizsgált tesztorganizmusok közül. Ezek alapján a *T. pyriformis* protozoa nagyon érzékeny faj, így alkalmazható tesztorganizmus lehet korai figyelmeztetésre és a konzervatív megközelítést alkalmazó *worst-case scenario* vizsgálatára.

### **Panagrellus redivivus** tesztorganizmusra gyakorolt hatás

A GO nanorészecskék hatását *Panagrellus redivivus* mortalitási teszt segítségével is vizsgáltuk, melynek eredményeit a 15. ábra szemlélteti.



**15. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a *Panagrellus redivivus* mortalitására. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Mindkét típusú GO nanorészecske koncentráció- és időfüggő hatást fejtett ki a tesztorganizmusra, bár voltak eltérések. 1000 mg/L nGO dózis alkalmazásakor 100% volt a mortalitás mindkét nGO típus esetén 72 óra elteltével, noha ez AF 96/97 vizsgálatokor már 24 óra után bekövetkezett. Az AF96/97 nGO típus főleg nagy koncentrációk (>250 mg/L) esetén fejtett ki jelentős negatív hatást elsősorban 24 óra expozíciós idő után, de 72 óra elteltével a gátlás mértéke 98% volt 250 mg/L koncentrációnál, míg PM 995 alkalmazásánál ugyanezen dózisonál 74% volt.

Ugyanakkor, kisebb koncentrációk (<125 mg/L) vizsgálatokor PM 995 esetén volt nagyobb a hatás mértéke. A legkisebb szignifikáns negatív hatásokat 24 óra elteltével AF 96/97 és PM 995 esetén 7,81 és 125 mg/L nGO koncentrációknál figyeltük meg, míg 48 óra expozíciós idő után 15,63 és 0,98 mg/L dózisonál tapasztaltuk. Ennek következtében az EC<sub>20</sub> értékek (6. táblázat) is azt jelezték, hogy 24 óra elteltével az AF 96/97 típusnak volt kisebb az EC<sub>20</sub> értéke (79,74 mg/L), azaz jelentősebb hatása; míg 72 órás kitétség után a PM 995-nek (11,33 mg/L).

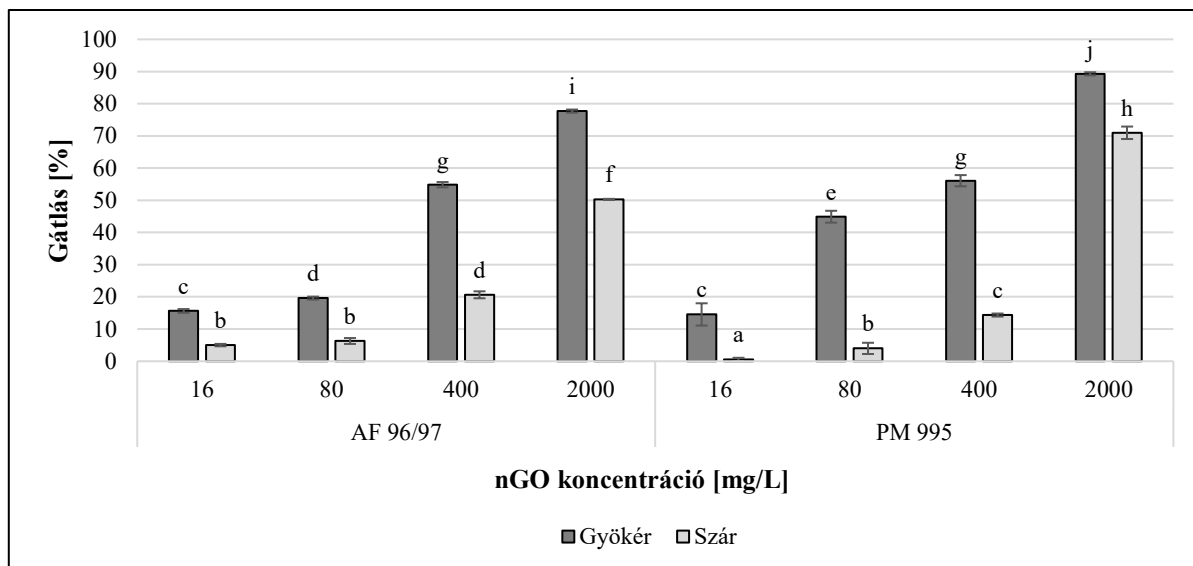
A *Panagrellus redivivus* mortalitás teszt mérsékelte, de koncentráció-függő érzékenységet mutatott a gátlási százalék, valamint EC<sub>20</sub> értékek alapján (11,3–217,6 mg/L koncentrációtartományban). Ez a fonálféreg, az állatok (fogyasztói) trófikus szintjét képviselte az ökotoxikológiai vizsgálatok során, azonban az irodalmi áttekintés alapján ritkán alkalmaznak fonálférgeket a nGO-k toxicitásának felmérése során.

Eredményeink alapján a két különböző típusú nGO-nak jelentősen eltérő hatása volt az idő múlásával, ami összefüggésben lehet a két nGO közegben való különböző viselkedésével. Az EC<sub>20</sub> értékek alapján a PM 995 típusú nGO hosszabb kontaktidő (48 óra) esetén nagyobb mortalitást okozott, míg az AF 96/97 típusú nGO 24 óra elteltével fejtett ki jelentősebb gátló hatást. Habár az irodalomban található leírás arról, hogy nZnO alkalmazása koncentráció-arányos módon növelte a *Panagrellus redivivus* halálozásának mértékét, jelenleg nem található egyéb közlemény arra vonatkozólag, hogy a nGO milyen hatást gyakorol a *P. redivivus* tesztorganizmusra, így vizsgálataink és eredményeink újszerűek és úttörőek.

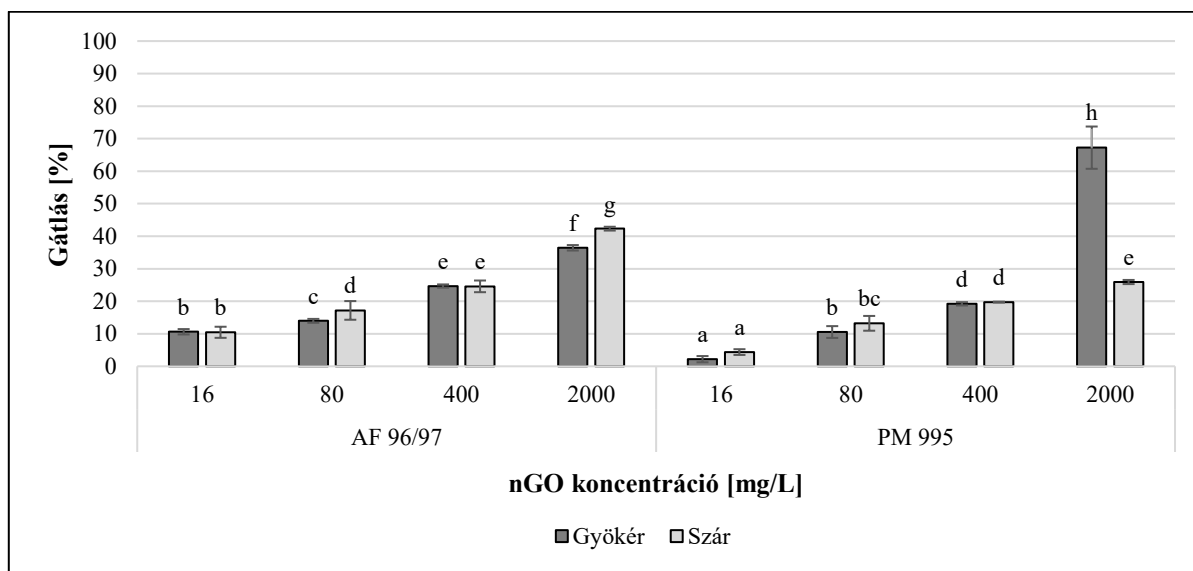
A nGO gerinctelen állatokra vonatkozó ökotoxikológiai felmérése az elérhető szakirodalom alapján eddig elsősorban rákféléken (pl. *Daphnia magna*) végzett vizsgálatokkal történt (Gambardella és Pinsino, 2022). Ezen tanulmányok elsősorban a szaporodás, illetve halálozás mértékét vizsgálták, míg a vedlési arány, enzimaktivitás, génexpresszió vizsgálatok kevésbé gyakran alkalmazott vizsgálati végpontok. Fekete-Kertész és munkatársai (2020) a hagyományosan alkalmazott végpontok mellett érzékenyebb, szubletális végpontokat is vizsgált (szívverés, táplálkozási aktivitás, ROS termelés), melyek alapján megállapította, hogy a nGO jelentős mértékben befolyásolta a *D. magna* viselkedését, fiziológiáját, oxidatív stressz reakciót okozva. Eredményeik alapján a legérzékenyebb végpont a ROS termelés volt (EC<sub>20</sub> = 4,78 mg/L), mely jelzi a nGO toxicitásának potenciális mechanizmusát, továbbá 50 mg/L nGO 20 ± 7% letalitást, valamint 10 ± 5% immobilizációt okozott. Ezen eredmények alapján a *Daphnia magna* érzékenyebb állati gerinctelen tesztorganizmusnak bizonyult a nGO-ra nézve a *Panagrellus redivivus* fonálféregnél.

### ***Sinapis alba* és *Triticum aestivum* tesztorganizmusokra gyakorolt hatás**

Az alkalmazott nGO részecskék *S. alba* és a *T. aestivum* növényekre gyakorolt hatását a 16. ábra és a 17. ábra szemléltetik. A GO nanorészecskék mindegyik tesztelt koncentrációban gátolták a gyökér- és szárhossznövekedést mindkét növényfaj esetén; ez a hatás mindkét növényi tesztorganizmus esetén koncentrációfüggő volt.



**16. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a *Sinapis alba* gyökér- és szárhossz növekedésére. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).



**17. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a *Triticum aestivum* gyökér- és szárhossz növekedésére. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A *S. alba* esetén a gátló hatás mértéke nagyobb volt a gyökérnövekedésre, mint a szárnövekedésre mindkét típusú nGO esetén. Mindkét nGO szignifikáns hatást gyakorolt 16 mg/L koncentrációban mindkét mért végponton, a legnagyobb negatív hatást 2000 mg/L PM 995 alkalmazása során figyeltük meg (89% gyökérhossznövekedés gátlás). A legnagyobb szárnövekedés gátlás 70% volt ugyanezen kezelés során.

Az nGO AF 96/97 esetén megfigyelt legnagyobb gátlási érték gyökérhossznövekedésnél 78%, míg a szárnövekedésnél 50% volt 2000 mg/L koncentrációt alkalmazva. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a gyökérhossz-mérés érzékenyebb végpont volt, mint a szárnövekedés-mérés.

Az EC<sub>20</sub> értékek megerősítették ezt az állítást, mivel a gyökérhosszmérés alapján az AF 96/97 esetén 76,71 mg/L, PM 995 esetén 40,73 mg/L volt, míg a szárhossz vizsgálata alapján az AF 96/97 esetén 380,13 mg/L, PM 995 esetén 554,01 mg/L volt az EC<sub>20</sub> érték (6. táblázat). A vizsgált GO nanorészecskék hatása a *T. aestivum* tesztorganizmusra szintén koncentrációfüggő volt (17. ábra), hasonlóan a *S. alba* esetén tapasztaltakkal, de a hatás nagysága mindkét mért végpontnál közel azonos volt, kivéve 2000 mg/L PM 995 esetén, amikor a megfigyelt gátló hatás 67% volt a gyökérhossznövekedésre, míg ugyanez a kezelés a szárhossznövekedést csak 26%-kal csökkentette. Ugyanakkor, az AF 96/97 esetén minden vizsgált nGO koncentrációnál nagyobb volt a gátlás mértéke a PM 995-nél tapasztaltakhoz képest, így a legnagyobb inhibíció a szárhossznövekedésre 42% volt (2000 mg/L AF 96/97). Ezek az eredmények összhangban voltak a statisztikai elemzéssel, amely kimutatta, hogy az AF 96/97 a kontrollhoz képest szignifikáns hatással volt mindkét mért végpontra 16 mg/L koncentrációban, míg a PM 995 szintén szignifikáns hatással volt a szárhossznövekedésre 16 mg/L koncentráció alkalmazásakor.

A *T. aestivum* szár- és gyökérhossz növekedésére vonatkozó EC<sub>20</sub> értékek (224,78 és 223,98 mg/L) (6. táblázat) is azt jelezték, hogy az AF 96/97 hasonló hatással volt mind a gyökér-, mind a szárhossznövekedésre. Másrészt a PM 995 nagyobb hatást gyakorolt a *T. aestivum* szárhossznövekedésére, mivel az EC<sub>20</sub> értéke 203,49 mg/L volt, míg gyökérhossz esetén 392,53 mg/L.

A növénytesztek mutatták a legkisebb érzékenységet a toxicitás vizsgálatok során. A két eltérő típusú nGO *S. alba* és *T. aestivum* növényekre gyakorolt hatása alapján elmondható, hogy a *S. alba* bizonyult érzékenyebb tesztnövénynek, míg a vizsgált végpontok alapján a gyökérhossz mérés. Mindkét tesztrendszer alkalmas a nGO hatásának felmérésére (elsősorban nagy koncentrációk esetén), azonban érzékenysége miatt elsősorban a gyökérhossz vizsgálat javasolt, mivel általa kisebb koncentrációk esetén is szignifikáns hatások mutathatók ki. Eredményeink alapján a *S. alba* gyökér-, és a *T. aestivum* szárhossznövekedés vizsgálata mérsékelt érzékeny végpontok a nGO hatásának felmérésére.

A tapasztalt hatások összhangban vannak Begum és munkatársai (2011) által leírtakkal. Eredményeik szerint a káposzta, paradicsom, saláta és spenót növények gyökér- és szárhossznövekedése erősen gátolt volt 500–2000 mg/L grafén koncentráció alkalmazása esetén. Wang és munkatársai (2019) szerint a grafén-családba tartozó nanoanyagok (GFN-ek) fizikai, fiziológiai és biokémiai hatások (mechanikai sérülés, ROS termelés és az antioxidáns enzimek aktivitásának módosítása) révén késleltetett csírázást és növény morfológiai elváltozásokat okoztak. Zhang és munkatársai (2016) a grafén hatását vizsgálták *T. aestivum* gyökér- és szárhossznövekedésére 250–1500 mg/L koncentrációtartományban, és eredményeinktől eltérően serkentő hatást tapasztaltak gyökérhossznövekedés esetén, noha a gyökérszörhossz esetén gátló hatást észleltek. Ren és munkatársai (2020) szintén a nGO serkentő hatását írták le búzacsíra gyökérhossznövekedésére 100 mg/L koncentráció esetén, ám nagyobb koncentrációt alkalmazva gátló hatást tapasztaltak. Liu és munkatársai (2015) a nGO 50 µg/mL és afeletti koncentrációban történő vizsgálata során a rizsszemek késleltetett csírázását, valamint a gyököcske és a rügyecske fejlődésének inhibícióját tapasztalták, mely hatás az alkalmazott koncentrációval arányos volt. Wang és munkatársai (2014), valamint Zhao és munkatársai (2015) leírták, hogy az *Arabidopsis thaliana* palánták gyökérzetében akkumulálódott a nGO, míg a levélsejtekben nem tapasztaltak ilyen két hét expozíciós idő után. Chen és munkatársai (2017) kutatásuk során szintén arra a megállapításra jutottak, hogy a nGO gátolja a búzaszemek csírázását, továbbá nagy koncentráció esetén felhalmozódik a gyökérrendszerben, oxidatív stresszt indukálva. Roupcová és munkatársai (2017) nGO-alapú anyagok hatását vizsgálták *S. alba* tesztnövényen. Azt tapasztalták, hogy a *S. alba* magok

csírázását az összes grafén-alapú filmréteg (nGO, nGO–fullerén (C<sub>60</sub>) -, nGO–fluor-grafit -, nGO–bioszén -, nGO–fullerén (C<sub>60</sub>)–polikaprolakton kompozit) gátolta, melyek közül a legkisebb mértékű inhibíciót a nGO esetén mérték.

Összegezve eredményeinket az irodalomban található adatokkal, elmondható, hogy a nGO-nak jótékony hatása lehet a növények növekedésére, azonban ellentmondásos megállapítások vannak erre vonatkozólag; például Wang és munkatársai (2019) a nGO növénymagok csírázására gyakorolt hatását a csökkent vízfelvétellel magyarázták, míg Yang és munkatársai (2022) a magok nagyobb víztartalmáról számoltak be, ugyanakkor mindkét tanulmány fokozott ROS termelést írt le. Az általunk tapasztalt eredmények alapján nem javasoljuk a nGO közvetlen kontaktba kerülését növénymagokkal.

### **A hatásos koncentrációk (EC) és az előrejelezhetően hatást nem jelentő koncentrációk (PNEC) meghatározása a vizsgált nano grafén-oxid szuszpenziók esetén**

Az ökotoxikológiai hatásfelmérést akut, egy fajt alkalmazó tesztek segítségével végeztem, melynek eredményei alapján a GO szuszpenzióknak való rövid idejű kitettség is toxikus lehet három trófikus szinten is, de eltérő mértékben.

A hatásos koncentrációk (EC) meghatározása céljából koncentráció-válasz görbét illesztettem a tesztek eredményei alapján számított gátlási százalékokra Origin® 2018 szoftver logisztikus illesztés funkcióján keresztül, mely alapján az adott mérési ponthoz kapcsolódó 20%-os gátlást okozó nGO koncentráció értékeket leolvastam. Ezen eredmények a 6. táblázatban szerepelnek a különböző tesztorganizmusoknál vizsgált végpontok esetén eltérő kontaktidő alkalmazása mellett. Ennek segítségével összehasonlítható a tesztorganizmusok érzékenysége a vizsgált anyagra vonatkozólag, továbbá az expozíciós idő hatása is. Minél kisebb az EC<sub>20</sub> értéke, annál toxikusabb az adott nGO. Ennek vizuális szemléltetése érdekében a 6. táblázatban színjelölést alkalmaztam: az enyhén toxikus hatásokat zöld szín (és árnyalatai), míg a jelentős mértékben toxikus hatásokat piros szín (és árnyalatai) jelölik.

Az előrejelzés szerint szignifikáns hatást nem mutató koncentrációkat (PNEC – Predicted No Effect Concentrations) a hatásos koncentrációk (EC<sub>20</sub>) alapján határoztam meg. Ezek a PNEC értékek adják az alapot a környezeti kockázat meghatározásához az EU által ajánlott metodikát alkalmazva (Európai Bizottság, 2003). Ezt a metodikát alkalmaztam a nano grafén-oxidok első környezeti kockázatfelmérésére.

A módszer során az úgynevezett értékelési tényező (AF – Assessment Factor) sémát (Európai Bizottság, 2003) használtam a PNEC értékének meghatározására vízi élőhely esetén AF 96/97 és PM 995 nGO típusra vonatkozóan egyaránt. A három trófikus szintről származó tesztorganizmusok segítségével végrehajtott akut toxicitási tesztek eredményei alapján az értékelési tényező (AF) értéke 1000. A legkisebb hatásos koncentráció (SC) értékeket, valamint biztonsági értékelési tényezőként (SC/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.

A potenciális környezeti kockázatot a kockázat jellemzési aránnyal (RCR – Risk Characterisation Ratio) számszerűsíthetjük, mely az előrejelzett környezeti koncentráció (PEC – Predicted Environmental Concentration) és az előrejelzett hatás nélküli koncentráció (PNEC) értékének hányadosa.

$$RCR = \frac{PEC}{PNEC}$$

Az előrejelzett környezeti koncentráció (PEC) értékének meghatározására irodalmi adatokat vettem alapul. A *worst-case scenario* megközelítést alkalmazva a legnagyobb lehetséges koncentrációértéket (1,82 ng/L) (Zhao és mtsai., 2021b) használtam a számítások során.

Ennek következtében az RCR 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) nem jelentenek környezeti kockázatot a konzervatív megközelítést alkalmazva sem.

**6. táblázat** – A vizsgált nGO szuszpenziók tesztorganizmusokra gyakorolt hatásának EC<sub>20</sub> értékei [mg/L]

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

## Összegzés a vizsgált nano grafén-oxid szuszpenziók környezeti hatásáról és potenciális kockázatáról

Kutatásom során két, eltérő típusú grafén-oxid (AF 96/97 és PM 995) toxicitását vizsgáltam és hasonlítottam össze vízi környezetből származó, eltérő trófikus szintről származó tesztorganizmusok (baktériumok, protozoa, növények és gerinctelen állat) válaszreakciói alapján, melyek segítségével átfogó felmérést végeztem a környezetre gyakorolt rövid- és középtávú hatásokról. Egyszerű, környezeti szempontból releváns, gyors és olcsó teszt módszereket használtam és javaslok a további GO és egyéb nanorészecskék hatásának felmérésére akár kis koncentrációk esetén is.

A komplex ökotoxikológiai felmérés során mindkét típusú nGO hatását az egyes vizsgált tesztorganizmusokra vonatkozó hatásos koncentrációk (EC) és a származtatott kezdeti PNEC értékek kiszámításával jellemeztem.

Továbbá a környezeti kockázat jellemzése céljából – a hagyományos kockázatértékelés során konzervatív (pesszimista) megközelítést alkalmazva – az előrejelzett környezeti koncentrációt (PEC) összehasonlítottam a várhatóan hatás nélküli koncentrációval (PNEC).

A toxicitás mértéke függött a nGO típusától és koncentrációjától, az expozíciós időtől, valamint a tesztrendszerrel. Az ökotoxikológiai vizsgálatok eredménye eltérő volt tesztorganizmusonként, illetve vizsgált végpontokként, továbbá befolyásolta az alkalmazott kontaktidő.

A vizsgált GO nanoszuszpenziók fizikai-kémiai tulajdonságaiban csak kis eltéréseket tapasztaltunk. A legnagyobb különbség, hogy az AF 96/97 kisebb részecskeméretű és nagyobb fajlagos felületű (BET: 84 m<sup>2</sup>/g) a PM 995-nél (BET: 40 m<sup>2</sup>/g). Emiatt több esetben (pl. bakteriális tesztrendszerekben) csupán kis mértékű eltérés volt tapasztalható a toxicitásban a két nGO típus esetén. Ugyanakkor néhány tesztorganizmus esetén (pl. *Tetrahymena pyriformis* és *Panagrellus redivivus*) jelentős eltérés mutatkozott a toxicitásban és a nanorészecskék viselkedésében.

Összességében elmondható, hogy a vizsgált grafén-oxidok fizikai-kémiai jellemzői és a kiváltott ökotoxicitás között nem mutatható ki egyértelmű szerkezet-aktivitás összefüggés, ami rávilágít arra, hogy a tesztrendszer jellemzői, valamint a nGO-k és a komplex mátrixkölsönhatások jelentősen befolyásolják az okozott hatásokat.

A komplex ökotoxikológiai felmérés eredményei felhívják a figyelmet arra, hogy különböző trófikus szintekről származó tesztorganizmusok alkalmazása javasolt a hatásvizsgálatra. Az EC<sub>20</sub> értékek 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.

Eredményeink alapján a toxicitás mértéke nőtt az expozíciós idő előrehaladtával, ami jelzi, hogy a nGO átalakulása, transzformációja fokozhatja a vizsgált tesztorganizmusokra gyakorolt káros hatásukat.

Annak ellenére, hogy a GO alapú nanoanyagok számos felhasználási területen nagyon ígéretesek, a környezeti kockázatértékelések (Bianco és mtsai., 2022) alapján még mindig jelentős hiányosságok vannak a lehetséges környezeti hatásaikkal kapcsolatban, mivel a környezeti elemek és tényezők nagyban befolyásolják sorsukat és toxicitásukat.

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a GO nanorészecskék vízi ökoszisztémára gyakorolt hatásának jellemzéséhez komplex ökotoxikológiai vizsgálatok szükségesek, mely különböző trófikus szintről származó tesztorganizmusokat, illetve expozíciós útvonalakat tartalmaz. Tapasztalataink alapján a GO nanorészecskék toxicitása függ a nGO típusától, koncentrációjától, expozíciós időtől és útvonaltól, továbbá a vizsgált tesztorganizmustól. Az alkalmazott ökotoxikológiai metodika egyszerű, olcsó és széleskörű válaszreakció felmérésére alkalmas a trófikus szintek tekintetében. Mindemellett gyorsnak tekinthető, mivel általában három napon belül eredményt szolgáltat a legtöbb módszer esetén. Vizsgálataink továbbá rámutattak arra, hogy a környezeti kockázatfelmérés során rendkívül fontos a tesztrendszerek alapos megválasztása, tervezése.

Kutatási eredményeink alátámasztják a *Tetrahymena pyriformis* alkalmazásának jelentőségét ökotoxikológiai kutatásokban és vizsgálati metodikákban.

A protozoonok a mikrobiális közösségek fő alkotóelemei, és jelentős szerepet játszanak a különböző biogeokémia (szén, nitrogén és foszfor) ciklusokban.

A táplálékhálózatokban mint fő fogyasztók jelennek meg. Baktériumokat és más kis szervezeteket fogyasztva fontos szerepet játszanak a táplálékhálózat dinamikájában is, mivel táplálékforrást biztosítanak számos szervezet számára, mint például a rákfélék, rovarlárvák, fonálféreg, gyűrűsféreg.

Ezeket a szervezeteket viszont más magasabb rendű szervezetek, például a halak is fogyasztják. Ezáltal a protozoonok fontos trófikus kapcsolat létrehozásáért felelősek, anyagot és energiát juttatva az alacsonyabb trófikus szintekről a magasabb szintekre (Mortimer és mtsai., 2016).

A *Tetrahymena* fajok jelenléte vagy hiánya az adott környezeti feltételek mellett specifikus szennyezések biológiai indikátorának is tekinthető (Maurya és Pandey, 2020).

A *Tetrahymena pyriformis* tesztorganizmust alkalmazó ökotoxikológiai vizsgálatok (szaporodás és enzimaktivitás mérés) megbízhatóan alkalmazhatóak a nGO környezeti hatásvizsgálására vonatkozólag akár korai figyelmeztető előrejelzésként, mivel a tesztrendszerhez kapcsolódó hatásos koncentráció ( $EC_{20}$ ) értékek közel állnak a környezetben megjelenő és mérhető GO koncentrációval.

Kutatásom további újdonsága, hogy a PNEC (előrejelezhetően káros hatást nem okozó koncentráció) értékre vonatkozó számítást végeztem nGO-ra, melynek alapjául szolgálnak a széleskörű ökotoxikológiai tesztrendszerekkel végzett vizsgálatok.

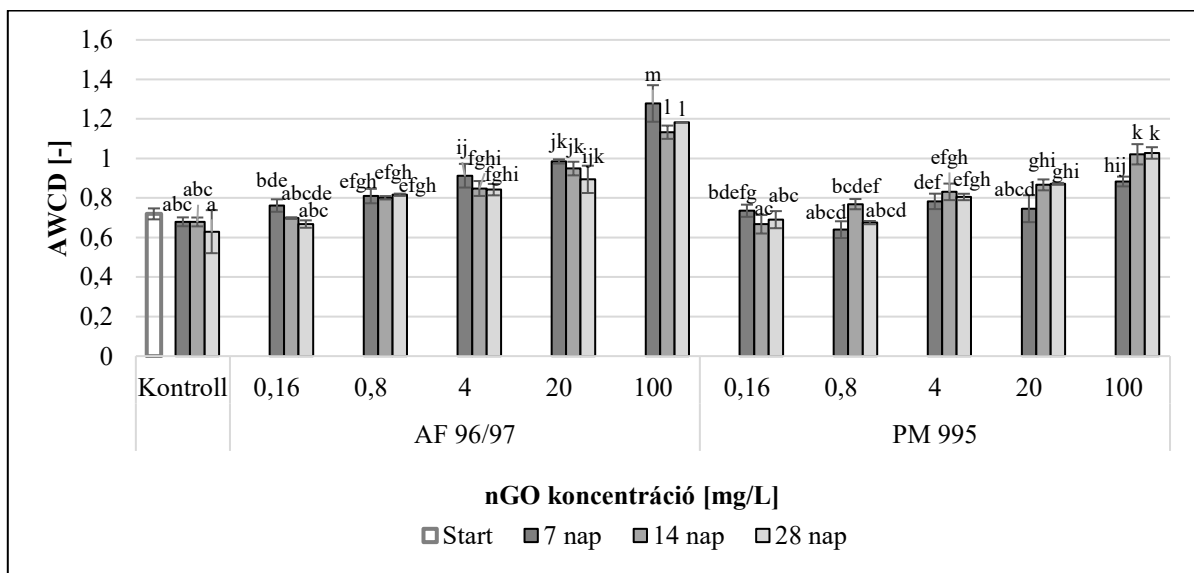
Eredményeim alapján, vizsgált grafén-oxid szuszpenziók a konzervatív megközelítésű környezeti kockázatértékelést, vagyis legrosszabb kimenetet (*worst-case scenario*) alkalmazva sem jelentek környezeti kockázatot.

Mindemellett fontos megemlíteni, hogy a szén-alapú nanorészecskék toxicitásának vizsgálatára vonatkozó tanulmányok növekvő számának ellenére a jelenlegi ismereteink hiányosak és rendkívül fontos, hogy különböző esettanulmányokkal vizsgáljuk ezen anyagok potenciálisan káros és veszélyes hatását. A részletesebb és pontosabb kockázatfelmérés céljából több tesztorganizmust alkalmazó tesztrendszerek, valamint hosszú távú – krónikus hatások felmérését célzó - vizsgálatok szükségesek a jövőben.

### 6.1.2. Grafén-oxid nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatása fiziológiai profilozás (CLPP) alapján

Az általam vizsgált grafén-oxid nanorészecskék édesvízi ökoszisztémára gyakorolt hatását természetes tóból, Balatonból származó vízminta segítségével mértem fel, amelyben jelenlévő mikroorganizmus közösségre gyakorolt hatást követtem nyomon, különös tekintettel a metabolikus aktivitás, valamint a mikrobiális diverzitás változásokra, különböző indexek alkalmazása segítségével. A következőkben vizsgálataim során tapasztalt hatásokat, változásokat mutatom be.

A mikrobiális közösség aktivitását jelző átlagos színfejlődési értékek (AWCD) (18. ábra) növekedtek a nGO koncentrációk fokozatos növelésével. Az AF 96/97 esetében az AWCD értékek minden kezelés során növekedtek a kontrollhoz képest, míg a PM 995 csekély negatív hatást gyakorolt 0,16 és 0,8 mg/L koncentrációk alkalmazása esetén 14 és 7 napos inkubáció után. A PM 995 kezelések hatása minden esetben kisebb volt a másik nGO típushoz képest; a legnagyobb AWCD érték 1,02 volt 100 mg/L koncentrációnál 14 és 28 nap után, míg AF 96/97 vizsgálata során ugyanezen koncentrációnál 7 napos inkubáció után 1,28 volt.



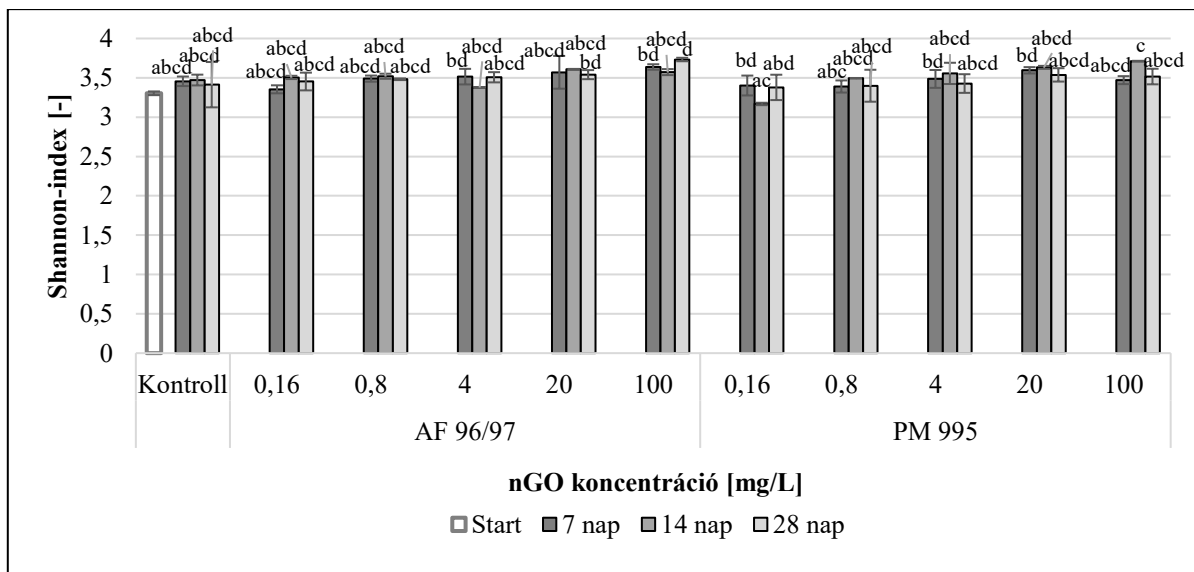
**18. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása az átlagos színfejlődési értékre (AWCD).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Az inkubációs idő hatása is megmutatkozott az AWCD értékek alakulásában, de az eredmények nem mutattak egyértelmű tendenciákat, mivel a kontroll és a nGO AF 96/97 kezelések kisebb AWCD értékeket eredményeztek, míg a nGO PM 995 kezelések AWCD értékei növekedtek (kivéve a 0,16 mg/L koncentrációnál) az inkubációs idő előrehaladtával. Másrészt, a kontrollhoz képest szignifikáns különbséget mutató legkisebb koncentráció minden mérési időpontnál ugyanaz volt mindkét nGO típus esetében (0,8 mg/L AF 96/97 esetén, míg 4 mg/L PM 995 esetében).

A mért AWCD értékek azt mutatják, hogy mindkét nGO típus jelentősen fokozta a mikrobiális aktivitást. A hasznosított szubsztrátok számát (SR) illetően eredményeink hasonló mintázatot mutattak (M4. ábra), mint az AWCD értékek esetén. Mindkét típusú nGO a kontrollhoz képest fokozta a hasznosított szubsztrátok számát.

Az AF 96/97 gyakorolt nagyobb hatást kisebb nGO koncentrációk alkalmazásakor, azonban a legnagyobb SR értéket (27) 100 mg/L PM 995-nél tapasztaltuk 28 napos expozíciós idő után. Az inkubációs idő előrehaladtával, az AWCD értékekkel ellentétben, a hasznosított szubsztrátok száma csökkent az AF 96/97 kezelések esetén, míg PM 995 alkalmazása során növekedett. Ugyanakkor az AWCD értékekkel összhangban, fokozott mikrobiális aktivitást jeleztek a tapasztalt SR értékek.

A mikrobiális diverzitást jelző Shannon-index értékei (19. ábra) szintén növekedtek mindkét nGO típus esetében az alkalmazott koncentrációk növekedésével; habár, a 0,16 mg/L PM 995 kezelés minden mintavételi időpontban enyhe csökkenést eredményezett a kontrollhoz képest.

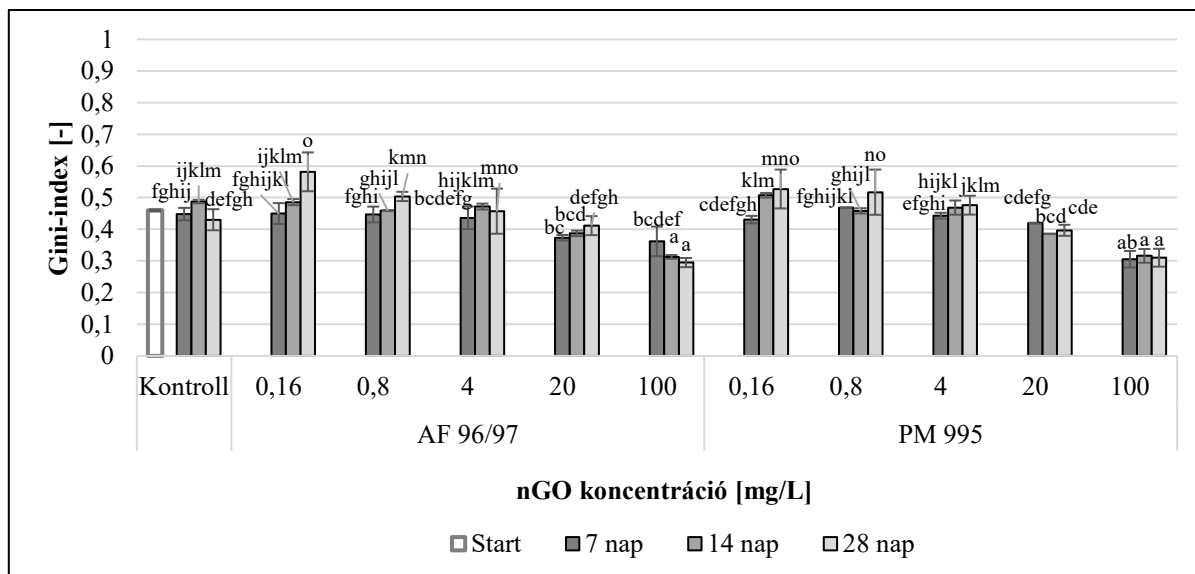


**19. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a Shannon-indexre (H).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Azonos nGO koncentrációt alkalmazva a PM 995 esetén a Shannon-index értékek kisebbek voltak az AF 96/97-nél tapasztaltakhoz képest, azonban nem volt közöttük szignifikáns különbség. Továbbá nem volt megfigyelhető szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest egyik kezelés esetén sem egyik mintavételi időpontban sem.

A McIntosh-index (U) értékek között jelentős különbségek voltak megfigyelhetők (M5. ábra). Ezen végpont értékei növekedtek az alkalmazott nGO koncentráció növelésével minden kezelés esetén. Mindkét nGO típusnak szignifikáns hatása volt a kontrollhoz képest 7 napos inkubáció után 0,16 mg/L koncentrációnál, azonban 28 nap inkubációs időt követően a 0,16 mg/L AF 96/97 kezelés továbbra is szignifikáns hatással volt, de a PM 995 csak 4 mg/L koncentrációnál mutatott szignifikáns hatást.

A funkcionális diverzitás értékeléséhez Gini-index (G) értékeket is meghatároztunk (20. ábra). A nGO koncentráció növelésével a Gini koefficiens értékei csökkentek mindkét nGO típus esetén. A 0,16–4 mg/L koncentrációtartományban szignifikánsan nagyobb értékek voltak, míg a 20–100 mg/L koncentrációk esetén (különösen az utóbbi esetben) az értékek kisebbek voltak a kontrollhoz képest 28 nap inkubáció után. A legnagyobb Gini-index értékek AF 96/97 típus esetén 0,58, PM 995 esetén 0,53 volt 0,16 mg/L koncentrációnál, míg a legkisebb Gini-index érték 100 mg/L dózist alkalmazva AF 96/97 esetén 0,29, valamint PM 995 esetén 0,31 volt.



**20. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a Gini-indexre (G).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Ezek az értékek azt is jelezték, hogy nagy koncentrációban (20–100 mg/L), a nGO-k fokozták a mikrobiális közösség funkcionális aktivitását, mivel a kicsi Gini-index értékek magas funkcionális diverzitást jeleznek. A szubsztrátcsoportonkénti átlagos színfejlődési értékek (SAWCD) szerint nem volt jelentős eltérés a vizsgált hat szubsztrátkategória felhasználási arányát tekintve a különböző nGO dózisú kezelések között (M6. ábra). Ugyanakkor megemlítenéd, hogy különösen nagyobb nGO koncentrációt (100 mg/L) alkalmazva, főleg PM 995 esetén a polimerek metabolizmusa csökkent, továbbá az expozíciós időnek is jelentős szerepe volt, ugyanis a hasznosítási arány csökkent az idő előrehaladtával. Másrészt az aminok hasznosítási aránya enyhén növekedett.

### Összegzés a vizsgált nano grafén-oxid szuszpenziók mikrobiális közösségre gyakorolt hatásáról

A grafén-alapú anyagok különböző környezeti elemekre gyakorolt hatását egyre több tanulmány vizsgálja, mely tükrözi a téma jelentőségét. Néhány kutatás már vizsgálta ezen típusú részecskék felszíni vizek (folyók, tavak) mikrobiális közösségeire gyakorolt negatív hatását kis léptékben inkubációs idővel együtt, azonban a víztestekre gyakorolt hatás még ismeretlen (Brayl és mtsai., 2022). Összességében elmondható, hogy az eddigi tanulmányok a grafén alapú nanorészecskék mikrobiális közösségekre gyakorolt negatív, káros hatását írták le, melynek oka elsősorban az általuk okozott oxidatív stressz.

Kutatásom során megállapítottam, 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. Kis 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 jelezett mindkét típusú nGO esetén.

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

### 6.1.3. Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatása fiziológiai profilozás (CLPP) alapján

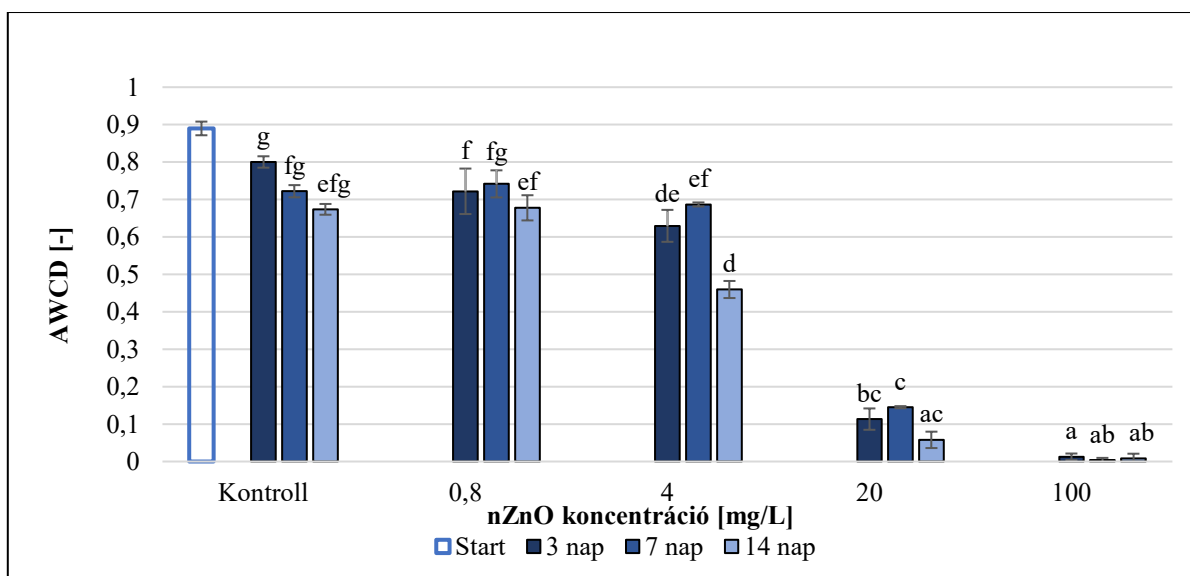
#### 6.1.3.1. A titán-dioxid és cink-oxid nanorészecskék enzimaktivitásra gyakorolt hatása

A tetrazólium redukción alapuló enzimaktivitásvizsgálat módszerre vonatkozólag alacsony érzékenységet tapasztaltunk eredményeink alapján. A TiO<sub>2</sub> nanorészecskék nem idéztek elő jelentős gátlást (<5%), míg a ZnO nanorészecskék koncentrációfüggő gátló hatást gyakoroltak az enzimaktivitásra. A ZnO 100 mg/L koncentrációban okozta a legnagyobb gátlást (60 ± 21%), míg kisebb nZnO dózisok, (20 mg/L, 4 mg/L és 0,8 mg/L) rendre 48 ± 20%, 23 ± 5% és 12 ± 1% gátlást eredményeztek a kontrollhoz képest.

#### 6.1.3.2. Cink-oxid nanorészecskék hatása mikrobiális közösségre

Az átlagos színfejlődési érték (AWCD – Average Well Colour Development) szignifikáns mértékben csökkent a kísérlet kezdetétől a végéig (21. ábra). A különböző koncentrációjú nano cink-oxid kezeléseknek szignifikáns hatása volt az AWCD-re, de az idő és a kezelés kölcsönhatásának nem volt jelentős hatása. A legnagyobb gátló hatást (98-99%) 100 mg/L nZnO okozta, míg 0,8 mg/L nZnO-nál volt a legkisebb (11-58%) megfigyelt hatás, noha 3 nap elteltével az is szignifikáns mértékű volt a kontrollhoz képest. Ugyanakkor a 4, 20 és 100 mg/L kezelések 14 nap elteltével szignifikáns hatást eredményeztek.

Korrelációanalízis alapján erős negatív lineáris kapcsolat ( $r = -0,99$ ) mutatható ki a ZnO nanorészecskék és az AWCD értékek között minden mérési időpontban (M16. táblázat).



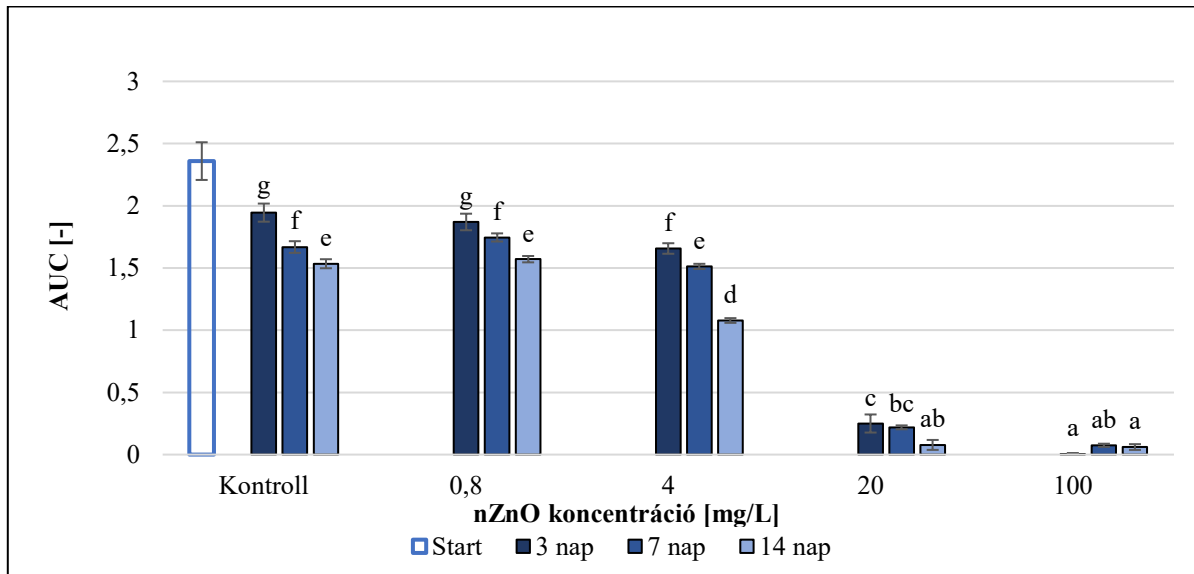
**21. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása az átlagos színfejlődési értékre (AWCD-re). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0,05$ ).

**7. táblázat** – RMANOVA eredmények az idő függvényében a cink-oxid nanorészecskék édesvízi mikrobiális diverzitásra gyakorolt hatásának felmérésére. A félkövér számok a szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Forrás	Szabadságfok	Négyzetes középérték	F-érték	p érték	Forrás	Szabadságfok	Négyzetes középérték	F-érték	p érték
AWCD					SR				
<b>Kezelés</b>	4	0,55	3317,68	<b>0,000</b>	<b>Kezelés</b>	4	536,02	989,57	<b>0,000</b>
<b>Idő</b>	2	0,01	7,95	<b>0,041</b>	<b>Idő</b>	2	9,95	23,88	<b>0,000</b>
<b>Idő x Kezelés</b>	8	0,00	1,96	0,269	<b>Idő x Kezelés</b>	8	3,14	7,52	<b>0,000</b>
AUC					H				
<b>Kezelés</b>	4	3,16	3299,60	<b>0,001</b>	<b>Kezelés</b>	4	1,22	1487,4	<b>0,000</b>
<b>Idő</b>	2	0,15	117,61	<b>0,000</b>	<b>Idő</b>	2	0,18	25,2	<b>0,000</b>
<b>Idő x Kezelés</b>	8	0,03	19,46	<b>0,006</b>	<b>Idő x Kezelés</b>	8	0,10	13,5	<b>0,000</b>
E					U				
<b>Kezelés</b>	3	3,38	223,07	<b>0,000</b>	<b>Kezelés</b>	4	31,38	1230,25	<b>0,000</b>
<b>Idő</b>	2	0,04	0,69	0,526	<b>Idő</b>	2	0,70	0,70	<b>0,000</b>
<b>Idő x Kezelés</b>	6	0,05	0,78	0,606	<b>Idő x Kezelés</b>	8	0,23	0,23	<b>0,000</b>
D					G				
<b>Kezelés</b>	4	0,02	50,87	<b>0,000</b>	<b>Kezelés</b>	4	4,29	287,48	<b>0,000</b>
<b>Idő</b>	2	0,01	30,71	<b>0,000</b>	<b>Idő</b>	2	0,04	1,24	0,339
<b>Idő x Kezelés</b>	8	0,00	11,49	<b>0,000</b>	<b>Idő x Kezelés</b>	8	0,24	7,31	<b>0,005</b>

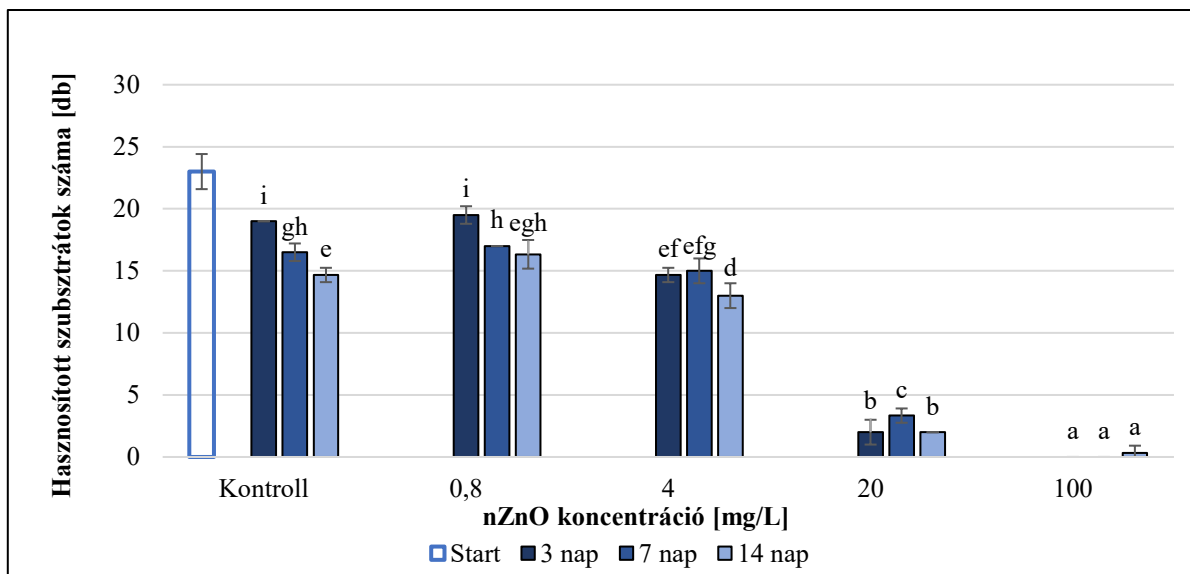
AWCD – Átlagos színfejlődési érték, AUC – Görbe alatti terület, SR – Szubsztrátszám, H – Shannon-diverzitás index, E – Shannon-egyenletesség index, D – Simpson-index, U – McIntosh-index, G – Gini-index

A görbe alatti terület (AUC – Area Under the Curve) az AWCD értékekhez hasonló tendenciát mutatott, ebben az esetben azonban a kezelés és expozíciós idő kölcsönhatásának szignifikáns hatása volt, akárcsak önmagában a kezelésnek, illetve az időnek (7. táblázat). Csökkenő értékeket észleltünk azonos koncentrációjú nano cink-oxidos kezeléseknél a különböző időpontok során, kivéve 100 mg/L nZnO esetén, ahol enyhe növekedés volt tapasztalható. Ugyanakkor a növekvő nZnO koncentráció hatására szignifikáns mértékben csökkent az AUC érték, 4 mg/L és afölötti koncentráció esetén minden mérési időpontban (22. ábra). A korrelációanalízis eredményeképpen elmondható, hogy az AUC értékek negatív korrelációt ( $r = -0,98-1,00$ ) mutattak az alkalmazott nZnO koncentrációval 3, 7 és 14 nap elteltével (M16. táblázat).



**22. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása a görbe alatti területre (AUC).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0,05$ ).

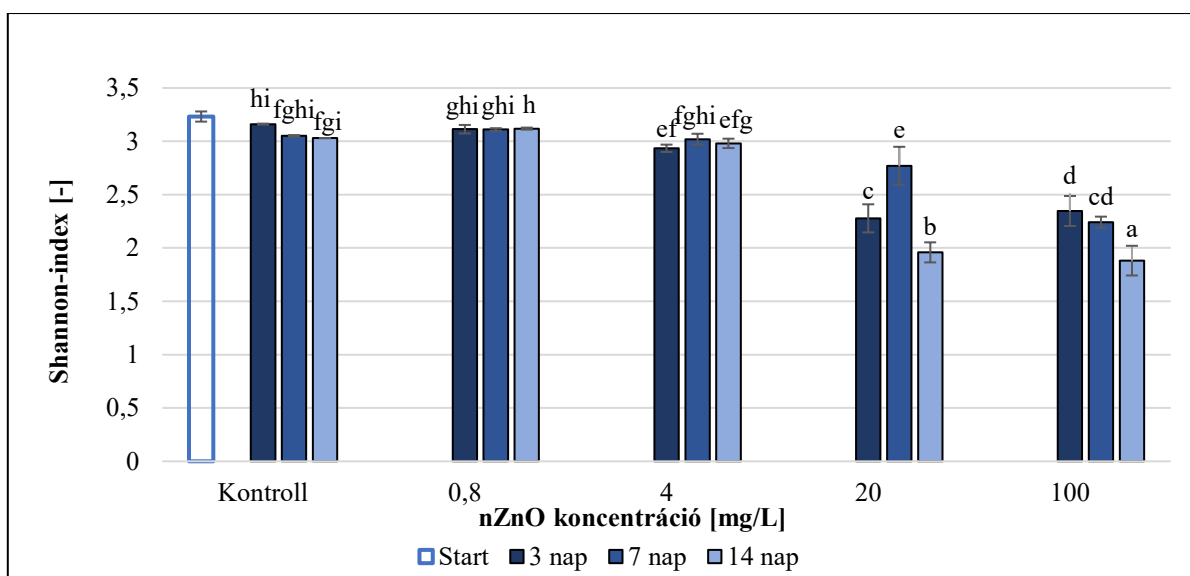
A szubsztrátszámra (SR – Substrate Richness) gyakorolt hatás hasonló volt az AUC-nál tapasztaltakhoz (23. ábra). Nagyobb nZnO koncentráció esetén jelentősen lecsökkent a hasznosított szubsztrátok száma, sőt 100 mg/L nano cink-oxid esetén nem volt tapasztalható szubsztráthasznosítás 3 és 7 nap elteltével, míg 14 nap után is csak egy szubsztrát (piroszőlősav metil-észter) esetén volt színváltozás detektálható, mely egyezett az AUC-nál tapasztalt eredményekkel. Statisztikai elemzés alapján mind a kezelésnek, mind az időnek, mind pedig ezek kölcsönhatásának szignifikáns hatása volt az SR-re vonatkozólag (7. táblázat), míg a korrelációanalízis erős negatív korrelációt ( $r = -0,97-0,99$ ) mutatott ki az alkalmazott nZnO dózis, illetve a hasznosított szubsztrátok száma között 3, 7 és 14 nap elteltével egyaránt (M16. táblázat).



**23. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása a hasznosított szubsztrátok számára (SR).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Eredményeink alapján a Shannon-index (H) értékeinek is hasonló lefutása volt a korábban említett végpontokhoz (AWD, AUC, SR), noha kevésbé volt érzékeny és kiugró értéket is tapasztaltunk 20 mg/L nZnO esetén.

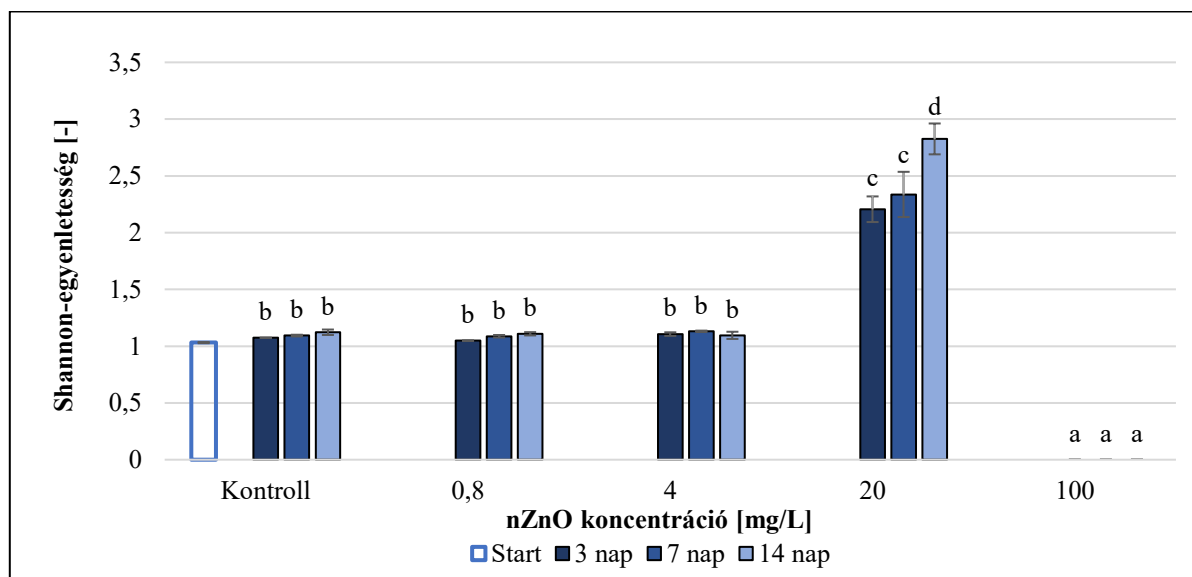
A 20 és 100 mg/L nZnO kezeléseknél tapasztalt Shannon-index értékei között nem volt olyan jelentős különbség, mint a korábbi végpontok esetén ezen koncentrációknál. Ugyanakkor, a 20 és 100 mg/L nZnO-nál mért értékek jóval kisebbek a kisebb nZnO koncentrációknál mért értékekhez képest (24. ábra). A statisztikai elemzés kimutatta az idő, kezelés és ezek kölcsönhatásának szignifikáns hatását (7. táblázat).



**24. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása a Shannon-indexre (H).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

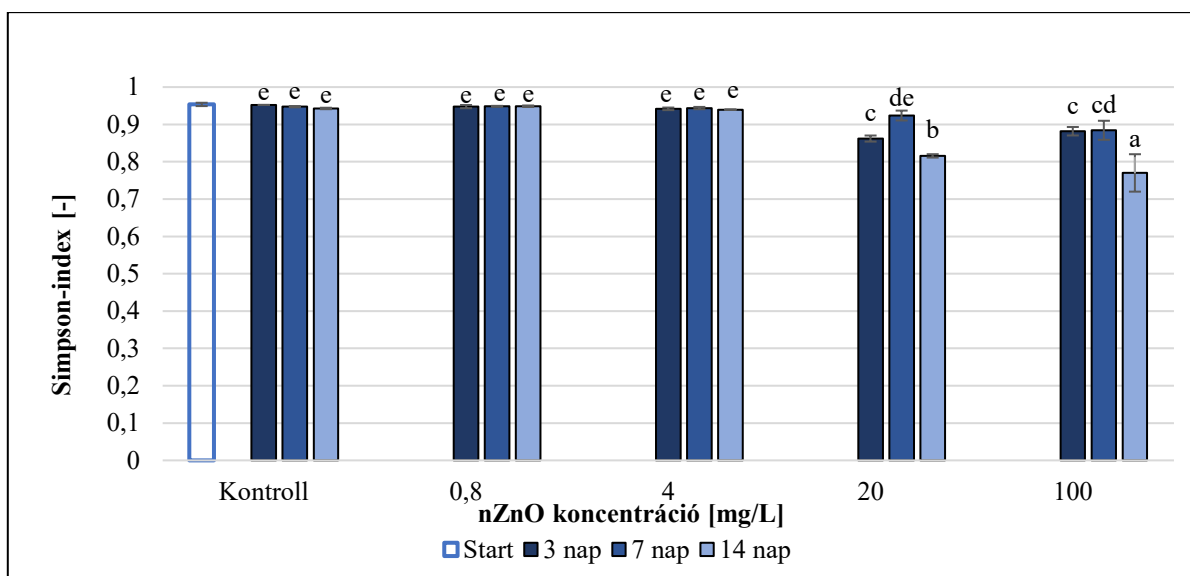
A korrelációanalízis szoros összefüggést ( $r = -0,99$ ) mutatott ki az nZnO koncentráció és a Shannon-index értékek között 3 és 14 nap elteltével (M16. táblázat).

A Shannon-egyenletesség (E – Evenness), mely a Shannon-indexből származtatott mutató, nem eredményezett szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest 0,8 és 4 mg/L nZnO esetén. Ugyanakkor 20 mg/L nZnO alkalmazása szignifikáns eltéréseket okozott (25. ábra), míg 100 mg/L nano cink-oxid esetén nem volt alkalmazható ezen mutatószám, ugyanis számításához a szubsztrátszámmal (SR) szükséges osztani a Shannon-indexet (H), azonban a szubsztrátszám értéke nulla volt. Statisztikai elemzés alapján ezen végpontra csak a nano cink-oxidos kezelés önmagában volt szignifikáns hatással (7. táblázat), míg a Pearson-korreláció analízis (M16. táblázat) jelentős mértékű korrelációt mutatott ki az alkalmazott nZnO koncentráció és a Shannon egyenletesség (E) értéke között, de csak 7 és 14 nap expozíciós idő esetén ( $r = -0,723$  és  $-0,614$ ).



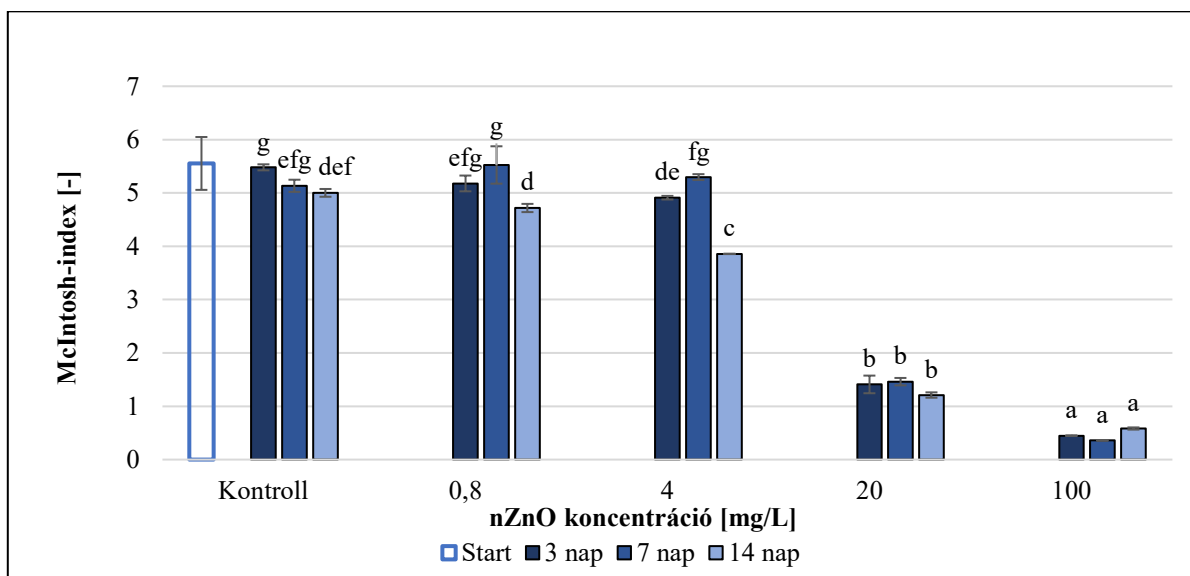
**25. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása a Shannon-egyenletességre (E).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0,05$ ).

A Simpson-index (D) esetén, a Shannon-egyenletességnél tapasztaltakhoz hasonlóan nem figyeltünk meg szignifikáns hatást 0,8, valamint 4 mg/L nZnO esetén, azonban 20 és 100 mg/L nZnO koncentrációt alkalmazva szignifikáns eltérés volt tapasztalható, míg a legnagyobb D értékcsökkenés (18%) 100 mg/L nZnO dózisonál volt megfigyelhető 14 nap elteltével (26. ábra). Habár csak a legnagyobb vizsgált koncentrációban észleltünk szignifikáns eltérést minden mérési időpontban, az RMANOVA analízis alapján az idő, a kezelés, illetve ezek kölcsönhatása is szignifikáns hatást gyakorolt a Simpson-indexre (7. táblázat). A korrelációanalízis kimutatta a nZnO és Simpson-index közötti lineáris negatív kapcsolatot (3 nap elteltével  $r = -0,641$ , 7 nap elteltével  $r = -0,887$ , 14 nap elteltével  $r = -0,849$ ) (M16. táblázat).



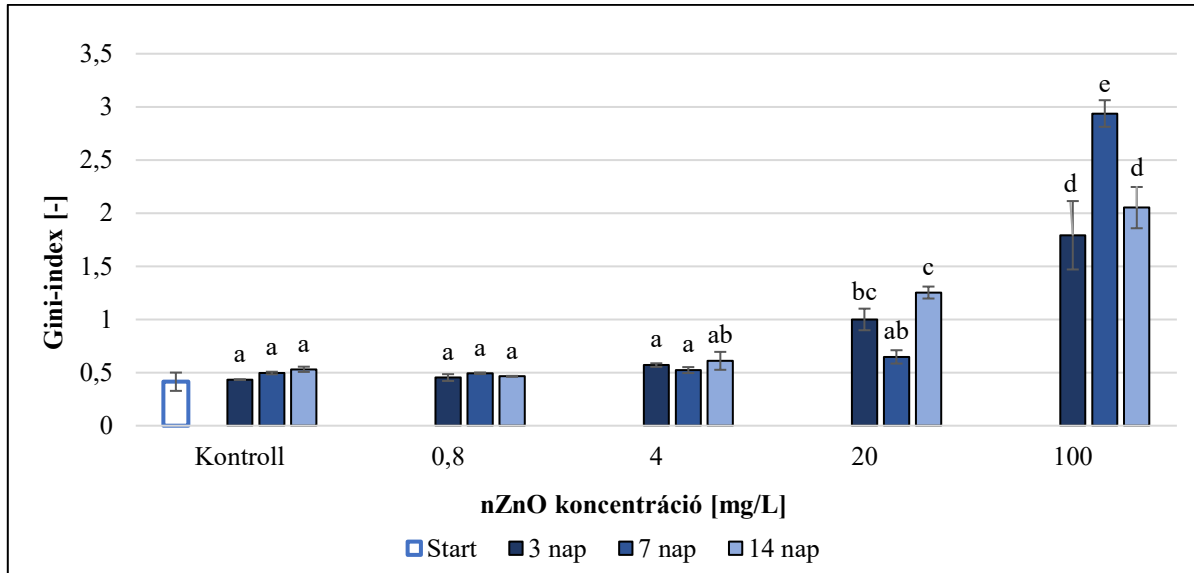
**26. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása a Simpson-indexre (D).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A McIntosh-index (U) bizonyult a legérzékenyebb diverzitás indexnek a nano cink-oxid mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérése során. Az U értéke csökkent az alkalmazott nano cink-oxid koncentráció növekedésével, illetve az expozíciós idő előrehaladtával (27. 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 (7. táblázat). A korrelációanalízis erős, lineáris, negatív kapcsolatot (3 nap elteltével  $r = -0,835$ , 7 nap elteltével  $r = -0,838$ , 14 nap elteltével  $r = -0,808$ ) mutatott ki a nano cink-oxid koncentráció és a McIntosh-index között, mely szignifikánsnak bizonyult (M16. táblázat).



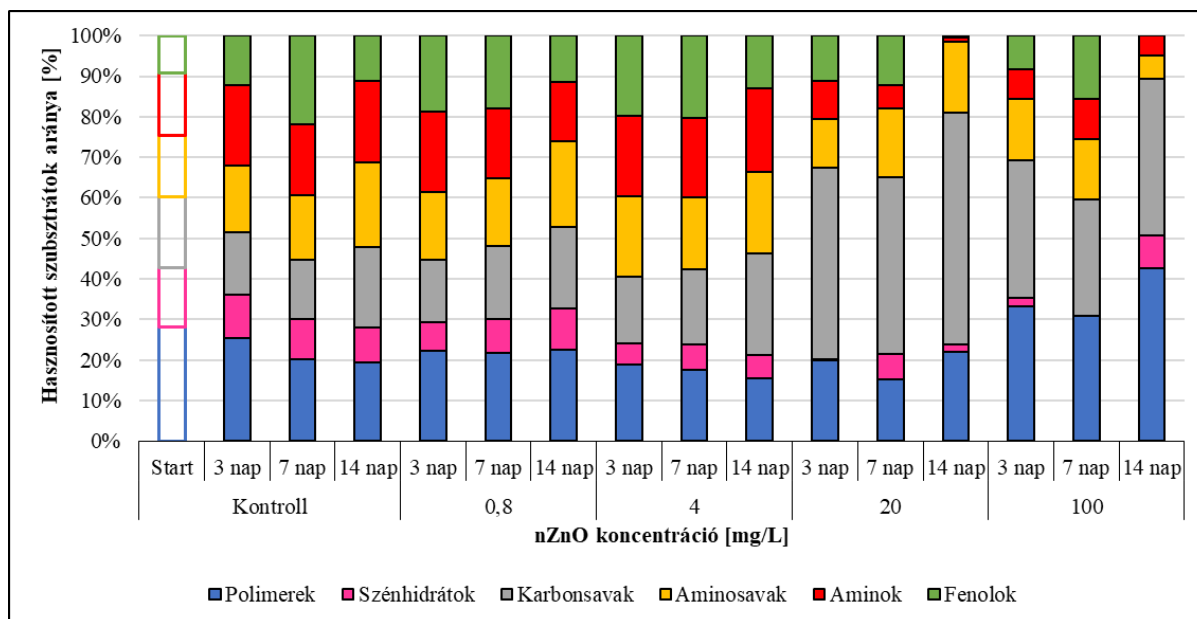
**27. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása a McIntosh-indexre (U).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A Gini-index (G) értéke növekedett, ahogy nőtt az alkalmazott nZnO koncentráció (28. ábra). Kicsi G értékek nagy funkcionális diverzitást jeleznek (Preston-Mafham és mtsai., 2002). Szignifikáns hatást csak nagy nZnO koncentráció (20 és 100 mg/L) vizsgálata során tapasztaltunk. A legnagyobb G érték növekedés (493%) 100 mg/L nZnO esetén 7 nap elteltével volt megfigyelhető. Statisztikai analízis alapján nem csak a kezelés, hanem a kezelés és idő kölcsönhatása is szignifikáns hatással volt a G értékre (7. táblázat). A korrelációanalízis erős, szignifikáns mértékű pozitív kapcsolatot ( $r = 0,824-0,903$ ) mutatott ki a nZnO koncentráció és a Gini-index között (M16. táblázat).



**28. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása a Gini-indexre (G).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0,05$ ).

A mikrobiális metabolikus aktivitást szintén jelentős mértékben befolyásolta a nZnO, melyet a szubsztrát csoportonkénti átlagos színfejlődési értékek (SAWCD) változása igazol. Az egyes szubsztrátcsoporthoz hasznosítási arányát szemlélteti a 29. ábra, melynek során 100%-nak a vizsgált 6 szubsztrát kategória teljes használatát tekintettük. A polimerek hasznosítási aránya csökkent az idő előrehaladtával és az alkalmazott nZnO koncentráció növekedésével, habár 100 mg/L esetén növekedést tapasztaltunk.



**29. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása a szubsztrátcsoportonkénti átlagos színfejlődési értékre (SAWCD).

Az aminok használata hasonló mintát mutatott, továbbá 20 mg/L nZnO koncentrációt alkalmazva az aminok metabolizmusának mértéke csökkent, csakúgy, mint a fenol típusú vegyületek hasznosítása. Ugyanakkor, a karbonsavak hasznosítási aránya növekedett az alkalmazott nZnO dózis növelésével, mely arra utal, hogy ezen vegyületek hasznosítására nem volt jelentős hatással a nano cink-oxid, vagy a megváltozott környezet hatására intenzívebb karbonsav metabolizmus volt tapasztalható.

Eredményeink alapján a szubsztrátcsoportok hasznosítási arányára nagyobb nZnO koncentráció (20 és 100 mg/L) jelenléte volt csak jelentős hatással.

Bár a szénhidrátok csoportjába tartozik a Biolog EcoPlate™-en található szubsztrátok legtöbbje, ennél a csoportnál tapasztaltuk a legkisebb hasznosítási arányt (0–14,5%), míg a polimerek és karbonsavak esetén a legnagyobb mértékűt (15–43% és 15–56%).

## Összegzés a vizsgált nano cink-oxid szuszpenzió mikrobiális közösségre gyakorolt hatásáról

A nanoanyagok vízi és szárazföldi teszrendszerre gyakorolt hatásait vizsgáló, különböző módszerekkel végzett tanulmányokkal összhangban (Londono és mtsai., 2017; Casas-Beltran és mtsai., 2020; Chavan és Nandanatham, 2020), a nZnO koncentráció- és időfüggő hatását tapasztaltuk az édesvízi mikrobiális közösségre nézve is. A Biolog EcoPlate™ módszerrel végzett kísérleteink során a mikrobiális aktivitást jelző AWCD, SR, AUC, SAWCD értékeket, valamint a közösség fajgazdagságát és funkcionális diverzitását jelző indexeket (H, E, D, U, G) határoztunk meg, melyek alapján jellemeztük a nanorészecskék mikroflórára gyakorolt hatását.

Du és munkatársai (2019) arról számoltak be, hogy a ZnO nanorészecskék szignifikáns mértékben és folyamatosan gátolták a levelek bomlását patakvízben 100 mg/L koncentráció esetén egy 50 napos kísérlet során; míg 10 mg/L dózis esetén a gátló hatás csak a 43. napon jelentkezett. Emellett megemlítendő, hogy a gombafajok diverzitása csökkent a kísérlet során. Egy másik kutatás szerint (Du és mtsai., 2020a) a gomba eredetű biomassza mennyisége

növekedett 5 nap expozíciós idő esetén, azonban 45 nap kontaktidő elteltével szignifikáns mértékben csökkent 300 mg/L nZnO koncentrációt alkalmazva.

Eredményeink utóbbi tanulmánnyal összhangban állnak, azonban az általunk alkalmazott Biolog EcoPlate™ már 3 nap expozíciós idő elteltével jelezte a negatív hatásokat 0,8 mg/L nZnO koncentráció esetén is a különböző végpontok vizsgálata alapján. Mind a ZnO nanorészecskék, mind az oldott  $Zn^{2+}$  ionok okozhatták a káros hatásokat.

Kusi és munkatársai (2020) az ezüst nanorészecskék (AgNP) édesvízi mikrobiális közösségre gyakorolt hatását vizsgálták 125 mg/L koncentrációig. Eredményeik összhangban állnak az általunk tapasztaltakkal, ugyanis beszámolójuk szerint a patakvízből származó mikroflóra metabolikus aktivitását gátolták az Ag nanorészecskék, mely csökkent AWCD és SR értékeket eredményezett. Továbbá a szubsztráthasznosítási mintázat is hasonlóképpen változott tanulmányukban, mely alapján az aminosavak, szénhidrátok és karbonsavak metabolizmusa fontos indikátor lehet, és az SAWCD értékek figyelembevétele előrejelzést adhat a nanorészecskék káros hatásáról.

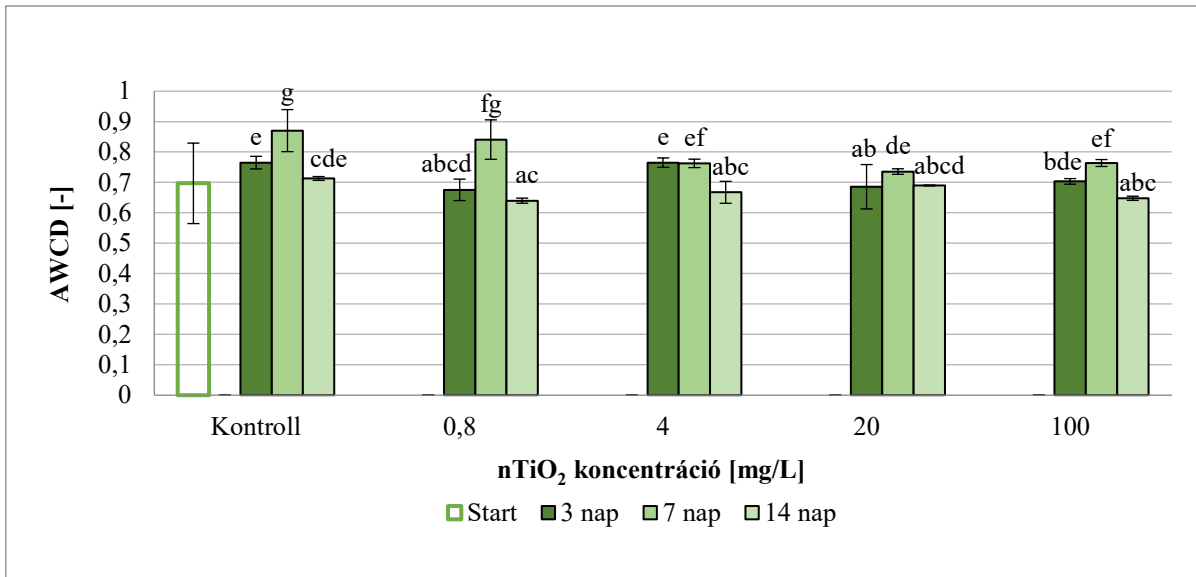
Az általunk tapasztalt SAWCD értékek alapján minden szubsztrátkategória metabolizmusára hatást gyakorolt a nZnO, elsősorban nagyobb (20–100 mg/L) koncentrációk esetén. A legnagyobb mértékben a karbonsavak hasznosításának mértékét befolyásolta, mivel kezdeti 15–17%-os SAWCD érték 20 és 100 mg/L nZnO dózis esetén 30–57%-ra emelkedett. Ez összhangban áll Melita és munkatársai (2019), valamint Zhen Teng és munkatársai (2020) által leírtakkal, akik szintén arról számoltak be, hogy a karbonsavak bizonyultak érzékeny szénforrásnak. Mivel ezek a szubsztrátok a felszíni vizekben a szerves anyagok lebomlásának termékei, ezért a karbonsavak a vízi környezet labilis szervesanyag-forrásai közé tartoznak.

A fokozott karbonsav metabolizmus oka lehet, hogy a 20 és 100 mg/L nZnO által okozott leromlott környezeti feltételek hatására a mikrobák a könnyen hozzáférhető szubsztrátok hasznosítását helyezik előtérbe.

#### *6.1.3.3. Titán-dioxid nanorészecskék hatása mikrobiális közösségre*

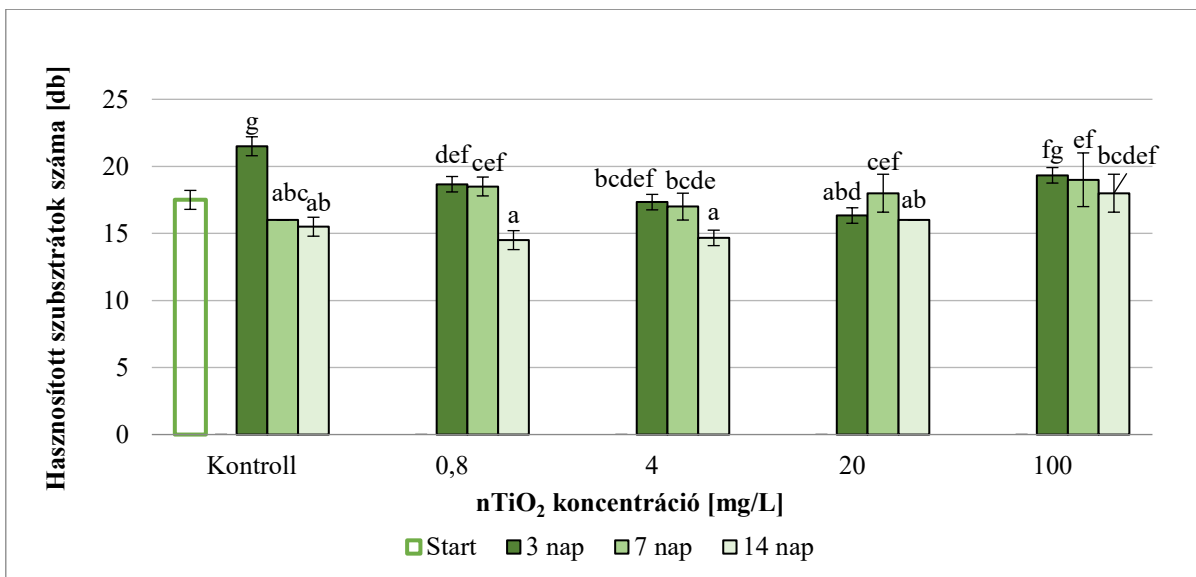
Az átlagos színfejlődési érték (AWCD) esetén enyhe csökkenés figyelhető meg a kísérlet elején és végén vizsgált minták alapján (30. ábra), mint ahogy a görbe alatti terület (AUC) esetén is (M7. ábra). A legnagyobb csökkenés (15%) 20 mg/L nTiO<sub>2</sub> esetén 7 nap elteltével volt megfigyelhető, míg 100 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentrációt alkalmazva 9%-os csökkenést tapasztaltunk 14 nap után. A statisztikai analízis alapján mind a nTiO<sub>2</sub>-s kezelés, mind a kontaktidő, mind pedig ezek kölcsönhatása szignifikáns hatással volt az AWCD értékekre (8. táblázat). A kontrollhoz képesti legnagyobb, szignifikáns eltérés 7 nap expozíciós idő után, nagyobb nTiO<sub>2</sub> koncentráció (4–100 mg/L) esetén volt megfigyelhető, ugyanakkor 14 nap elteltével nem tapasztaltunk szignifikáns hatást.

A korrelációanalízis nem eredményezett egyértelmű összefüggést a nTiO<sub>2</sub> koncentráció és az AWCD értékek között (M16. táblázat).



**30. ábra:** Titán-dioxid nanorészecskék hatása az átlagos színfejlődési értékre (AWCD-re). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ )

A hasznosított szubsztrátok száma (SR) különböző mintázatot eredményezett minden mérési időpontban (31. ábra). 20 mg/L-ig terjedő nTiO<sub>2</sub> koncentrációnál az SR értékek 3 nap után folyamatosan csökkentek, noha 100 mg/L koncentrációnál nem volt szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest. Kismértékű növekedés volt tapasztalható a koncentrációval arányos módon a 7 és 14 napos expozíció után. A kontrollhoz képesti legnagyobb különbség (~19%-os gátlás) a 20 mg/L-es nTiO<sub>2</sub> dózis esetén jelentkezett 3 nap után. Az RMANOVA (8. táblázat) kimutatta, hogy a nTiO<sub>2</sub>-s kezelés nem befolyásolta jelentősen az SR alakulását, azonban az expozíciós idő, valamint az idő és kezelés kölcsönhatása szignifikáns mértékben befolyásolta a hasznosított szubsztrátok számát. A korrelációanalízis erős pozitív összefüggést ( $r = 0,850$ ) mutatott a koncentráció és az SR között 2 hét kontaktidő elteltével (M16. táblázat).



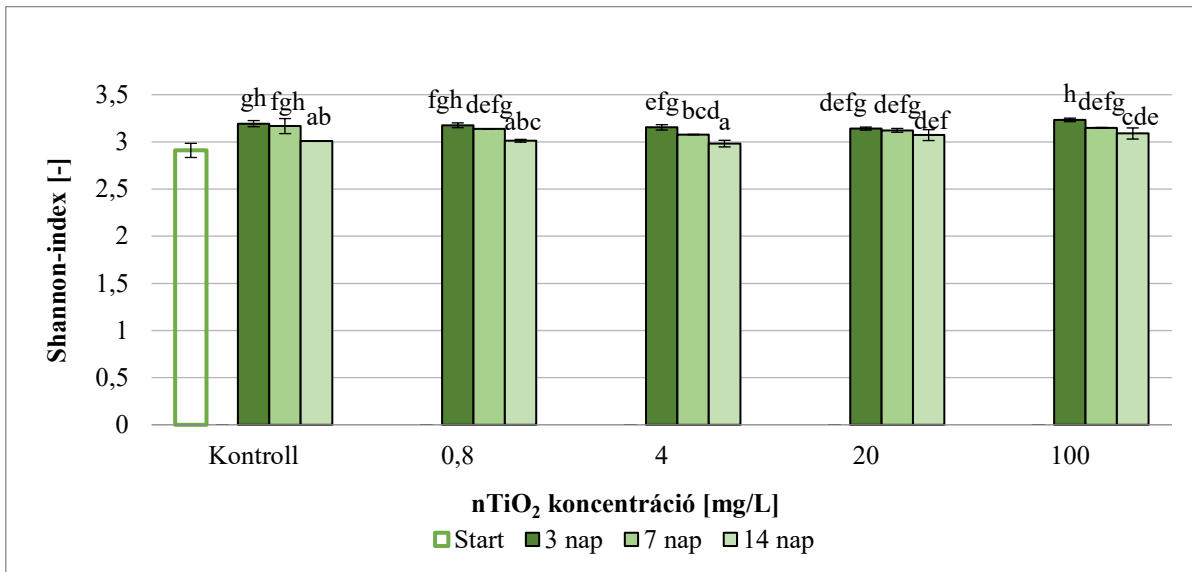
**31. ábra:** Titán-dioxid nanorészecskék hatása a hasznosított szubsztrátok számára (SR). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

**8. táblázat** – RMANOVA eredmények az idő függvényében a titán-dioxid nanorészecskék édesvízi mikrobiális diverzitásra gyakorolt hatásának felmérésére. A félkövér számok a szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Forrás	Szabadságfok	Négyzetes középérték	F-érték	p érték	Forrás	Szabadságfok	Négyzetes középérték	F-érték	p érték
AWCD					SR				
<b>Kezelés</b>	<b>4</b>	0,01	7,01	<b>0,028</b>	Kezelés	4	5,67	4,166	0,059
<b>Idő</b>	<b>2</b>	0,04	52,87	<b>0,000</b>	<b>Idő</b>	<b>2</b>	21,30	26,438	<b>0,000</b>
<b>Idő x Kezelés</b>	<b>8</b>	0,00	4,49	<b>0,015</b>	<b>Idő x Kezelés</b>	<b>8</b>	5,14	6,381	<b>0,002</b>
AUC					H				
<b>Kezelés</b>	<b>4</b>	0,25	35,38	<b>0,000</b>	<b>Kezelés</b>	<b>4</b>	0,01	6,4	<b>0,034</b>
<b>Idő</b>	<b>2</b>	0,24	53,20	<b>0,000</b>	<b>Idő</b>	<b>2</b>	0,05	40,9	<b>0,000</b>
<b>Idő x Kezelés</b>	<b>8</b>	0,04	9,60	<b>0,000</b>	<b>Idő x Kezelés</b>	<b>8</b>	0,00	2,1	0,132
E					U				
<b>Kezelés</b>	<b>4</b>	0,00	5,4	<b>0,046</b>	<b>Kezelés</b>	<b>4</b>	0,34	6,80	<b>0,030</b>
<b>Idő</b>	<b>2</b>	0,00	2,7	0,114	<b>Idő</b>	<b>2</b>	1,26	107,30	<b>0,000</b>
<b>Idő x Kezelés</b>	<b>8</b>	0,00	4,3	<b>0,018</b>	<b>Idő x Kezelés</b>	<b>8</b>	0,10	8,75	<b>0,001</b>
D					G				
Kezelés	4	0,00	2	0,239	<b>Kezelés</b>	<b>4</b>	0,01	7,426	<b>0,025</b>
<b>Idő</b>	<b>2</b>	0,00	46	<b>0,000</b>	<b>Idő</b>	<b>2</b>	0,03	122,266	<b>0,000</b>
<b>Idő x Kezelés</b>	<b>8</b>	0,00	2	0,103	<b>Idő x Kezelés</b>	<b>8</b>	0,00	4,887	<b>0,011</b>

AWCD – Átlagos színfejlődési érték, AUC – Görbe alatti terület, SR – Szubsztrátszám, H – Shannon-diverzitás index, E – Shannon-egyenletesség index, D – Simpson-index, U – McIntosh-index, G – Gini-index

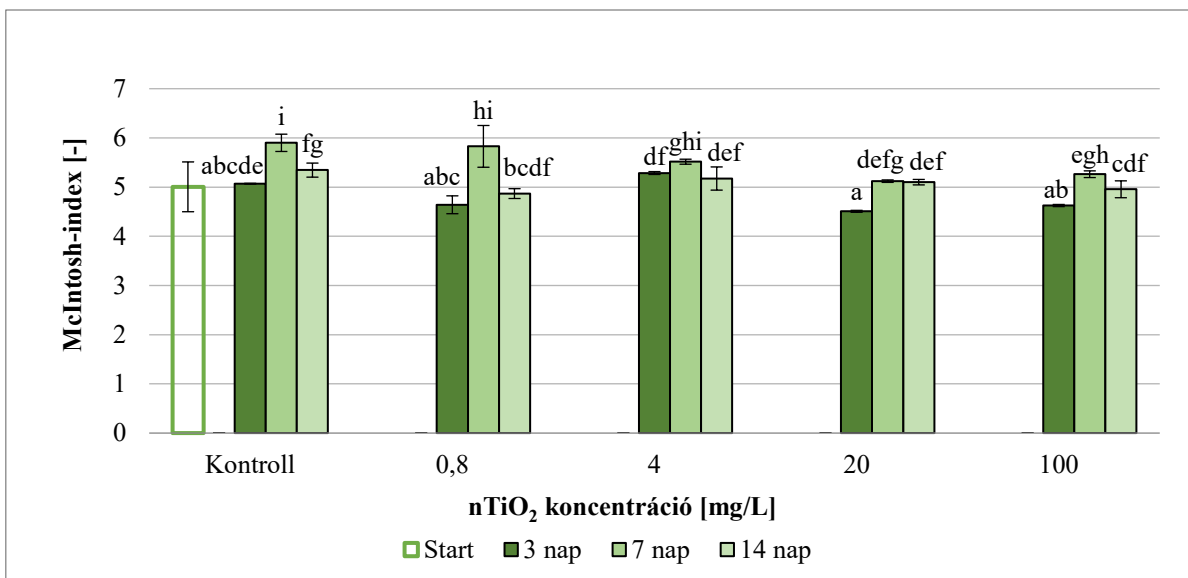
A Shannon-index (H), amelyet széles körben alkalmaznak a mikrobiális diverzitás jellemzésére, csak nagyon kis különbségeket mutatott mind az idő, mind a nTiO<sub>2</sub> kezelések függvényében (32. ábra). Kontrollhoz képesti szignifikáns eltérést 4 mg/L nTiO<sub>2</sub> esetén 7 nap után, valamint 20 és 100 mg/L nTiO<sub>2</sub> alkalmazásakor 14 nap után mértünk.



**32. ábra:** Titán-dioxid nanorészecskék hatása a Shannon-indexre (H).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A legnagyobb eltérés (kisebb mint 5%) a kontrollhoz képest 4 mg/L nTiO<sub>2</sub> esetén, 7 nap után következett be. Az RMANOVA eredményei alapján a nTiO<sub>2</sub>-s kezelés és az expozíciós idő szignifikáns hatást gyakoroltak a Shannon-indexre (8. táblázat). A Pearson-korrelációs együtthatók nem mutattak egyértelmű, jelentős összefüggést a változók között ebben az esetben (M15. táblázat), de a Shannon-egyenletesség (M8. ábra) esetén szignifikáns kapcsolat volt megfigyelhető 14 napos expozíció után (M16. táblázat).

A McIntosh-index (U) (33. ábra) nagyobb különbségeket mutatott mind a kontaktidő, mind a TiO<sub>2</sub> nanorészecske koncentráció függvényében a Simpson-indexhez képest (M9. ábra). Ezek az eltérések azonban nem mutattak egyértelmű tendenciát az alkalmazott nTiO<sub>2</sub> koncentráció függvényében.

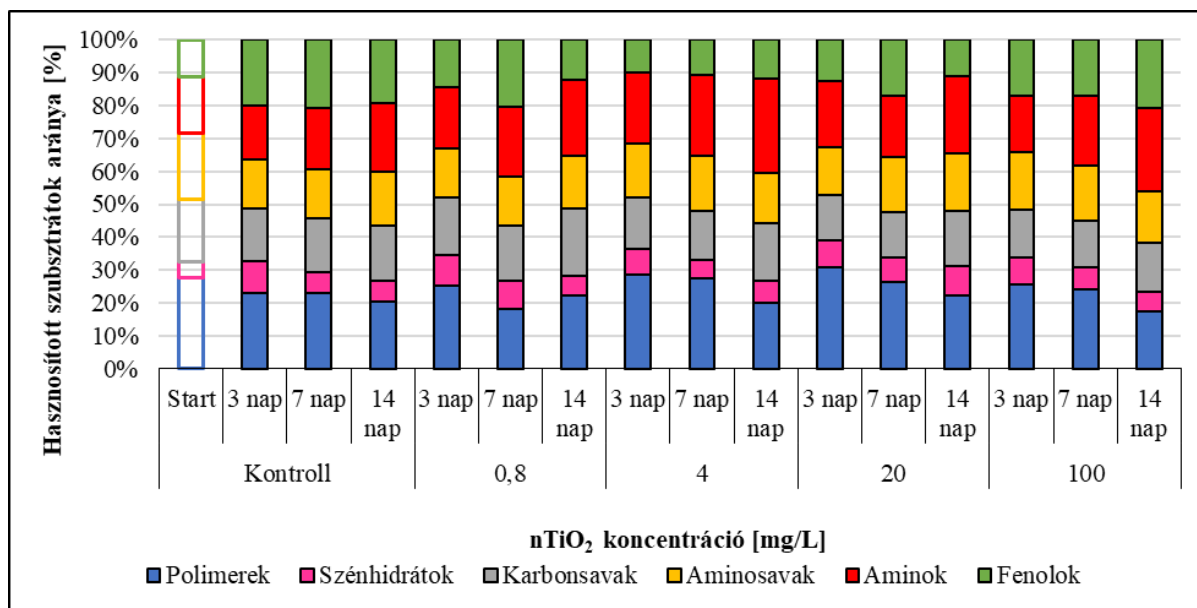


**33. ábra:** Titán-dioxid nanorészecskék hatása a McIntosh-indexre (U).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A kontrollhoz képest szignifikáns eltérések csak 20 és 100 mg/L nTiO<sub>2</sub> esetén, 7 nap után jelentkeztek, továbbá a McIntosh-index értékek ezen mintavételi időpontban voltak a legnagyobbak. A 7. napon mért adatok alapján a McIntosh-index értékei enyhe csökkenő tendenciát mutattak a nTiO<sub>2</sub> koncentráció növekedésével. 20 mg/L és 100 mg/L nTiO<sub>2</sub> dózis okozta a kontrollhoz képesti legnagyobb csökkenést, mely 13%-ot, illetve 11%-ot jelentett.

A korrelációanalízis eredménye alapján csak enyhe, nem szignifikáns mértékű kapcsolat volt a két változó (TiO<sub>2</sub> koncentráció és McIntosh-index) között (M16. táblázat), hasonlóan a Gini-index esetében tapasztaltaknál is (M10. ábra). A statisztikai elemzés alapján a McIntosh-index értékeit szignifikáns mértékben befolyásolta a nTiO<sub>2</sub> kezelés, a kontaktidő, valamint ezek kölcsönhatása (8. táblázat).

A szubsztrát csoportonkénti átlagos színfejlődési értékek (SAWCD) alapján az egyes szubsztrát kategóriák hasznosítási aránya nem változott jelentős mértékben a nTiO<sub>2</sub>-al kezelt mikrokozmosz rendszerekben a kísérlet során (34. ábra).



34. ábra: Titán-dioxid nanorészecskék hatása a szubsztrátcsopontonkénti átlagos színfejlődési értékre (SAWCD).

Ugyanakkor, a mikrobák a különböző mikrokozmoszokban mind a hat szubsztrát kategóriából származó szénforrást hasznosították, azonban a hasznosítási arányban eltérések adódtak az alkalmazott nTiO<sub>2</sub> koncentrációtól és kontaktidőtől függetlenül.

A szénhidrátok hasznosítási aránya (5–10%) volt a legkisebb, míg a polimereké (18–31%) és aminoké (16–29%) a legnagyobb.

### Összegzés a vizsgált nano titán-dioxid szuszpenzió mikrobiális közösségre gyakorolt hatásáról

A TiO<sub>2</sub> nanorészecskék kismértékű, de szignifikáns hatást gyakoroltak a mikrobiális közösségre. Az eredmények összhangban vannak a Miao és munkatársai (2018) által leírt nTiO<sub>2</sub> és nano cérium-dioxid (nCeO<sub>2</sub>) hatásokkal, melyet vízi környezetből származó üledéklakó mikroflórán vizsgáltak. Eredményeik szerint az oxigén fogyasztás mindkét típusú nanorészecske alkalmazása esetén csökkent, azonban nTiO<sub>2</sub> esetén kisebb volt az akut toxicitás mértéke a nCeO<sub>2</sub>-nál tapasztaltnál képest. Bár a kezelések növelték a mikrobiális diverzitást, az üledéklakó mikrobiális közösség metabolikus aktivitására negatív hatást fejtett ki mindkét típusú nanorészecske (Miao és mtsai., 2018).

Továbbá Londono és munkatársai (2017), valamint Chavan és Nadanathangam (2020) is arról számoltak be, hogy azonos körülmények között a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék kisebb hatást gyakoroltak a mikrobiális közösségre, mint a nZnO. Néhány tanulmány szerint a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék a felszíni vizekben, illetve vízi tesztkörnyezetben agglomerátumokat képezhetnek, így a TiO<sub>2</sub> által kiváltott hatások az egyedi, jól diszpergált nanorészecskék mellett jelenlévő agglomerátumok hatásából is eredeztethetőek (Battin és mtsai., 2009; Jiang és mtsai., 2009); emiatt a felszíni vizekben lévő mikroorganizmusok a nanorészecskék több méretének, illetve formájának vannak kitéve. A nTiO<sub>2</sub> által kiváltott toxicitás jellemzően ROS képzésen keresztül történik fotokatalitikus reakció révén, mely a lipidmembránok károsodását okozza (Battin és mtsai., 2009). Mivel kísérleteink során sötétben inkubáltuk a reaktorokat, ezért ez a mechanizmus nem játszhatott jelentős szerepet, ami magyarázatot adhat a mikrobiális közösségre gyakorolt csekélyebb mértékű befolyásra.

Ugyanakkor a vizsgálat körülményei alapján nem valószínűsíthető, hogy a  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék feloldódtak volna, így a mikrobiális közösségre gyakorolt kicsi, ám szignifikáns mértékű hatásukat egyéb úton fejthették ki, mint például nagyobb sejtmembrán permeabilitás esetén közvetlen penetrációval a sejtbe jutva vagy a membránhoz való adszorpció révén intracelluláris ROS-t generálva (Battin és mtsai., 2009). Továbbá a nanorészecskék szerves molekulákhoz való kötődési affinitása, a primer részecskék (<10 nm) sejtbe történő bejutása a sérült membránokon keresztül, valamint a környezeti mátrixhatások különböző mértékű toxicitást indukálhatnak (Jiang és mtsai., 2008; Battin és mtsai., 2009; Jiang és mtsai., 2009).

### **A nano cink-oxid és a nano titán-dioxid szuszpenzió mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának összehasonlító elemzése**

A jelenleg elérhető kutatási eredmények a fém-oxid nanorészecskék nyíltvízi mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérésére vonatkozólag rendkívül szűkösek. Vizsgálataink eredményei rámutatnak, hogy a magasabb trófikus szintről származó, egy fajt alkalmazó toxicitásvizsgálatok mellett szükséges a mikrobiális közösségre gyakorolt hatások kutatása is. Biolog EcoPlate™ alkalmazásával szignifikáns eltéréseket állapítottunk meg a két tesztelt fém-oxid nanorészecske (nZnO és nTiO<sub>2</sub>) vízi mikrobiális közösségre gyakorolt hatására vonatkozólag, mely során a tesztelt nanorészecske koncentráció és expozíciós idő azonos volt.

Kutatásunk alapján a  $\text{TiO}_2$  és ZnO nanorészecskék koncentrációjuktól és az expozíciós időtől függően káros hatást gyakorolhatnak a mikrobiális aktivitásra. A nZnO erősebb hatást fejtett ki a nTiO<sub>2</sub>-hoz képest minden vizsgált végpont esetén, vélhetően a nZnO oldódása révén felszabaduló  $\text{Zn}^{2+}$  ionok következtében, mellyel szemben a nTiO<sub>2</sub> oldódása nem jellemző. A vizsgálatok során alkalmazott Biolog EcoPlate™ eredményei megerősítették, hogy a fém-oxid nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatása jelentős mértékben függ a részecske típusától (Londono és mtsai., 2017; Chavan és Nadanathangam, 2020). 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. 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 (Sun és mtsai., 2016), 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 hatása korrelációban áll az alkalmazott koncentrációval és expozíciós idővel, így 100 mg/L dózis esetén a szubsztráthasznosítási aktivitás jelentősen csökkent 14 nap elteltével. Eredményeink összhangban vannak Londono és munkatársai (2017) által leírtakkal, akik megállapították, hogy a nZnO nagyobb befolyással van a vízi mikrobiális közösségre, mint a nTiO<sub>2</sub>. Megfigyeléseik szerint 700 µg/L nTiO<sub>2</sub> nem okozott szignifikáns hatást, míg 70 µg/L nZnO szignifikáns mértékben módosította a mikrobiális közösség szerkezetét, genetikai sokféleségét és eloszlását. Hasonlóképpen, Chavan és Nadanathangam (2020) tanulmánya szerint a talaj mikroflóra metabolikus aktivitását és diverzitását jelentősen befolyásolta 500 µg/g nZnO, míg azonos koncentrációjú nTiO<sub>2</sub> esetén ezt nem észlelték.

A Pearson-korreláció eredményei alapján, a nTiO<sub>2</sub> koncentráció és a vizsgált végpontok között enyhe korreláció volt megfigyelhető, mely a legtöbb esetben nem volt szignifikáns mértékű ( $p < 0.05$ ), de a korreláció értékei (r-érték) a legtöbb esetben növekedtek az inkubációs idő hosszabbodásával (M16. táblázat), ami szintén jelzi az expozíciós idő jelentőségét.

A TiO<sub>2</sub> nanorészecskéknel tapasztaltakkal ellentétben, nZnO esetén a Shannon-egyenletesség kivételével minden vizsgálati végpont esetén erős korreláció ( $|r| > 0,80$ ) volt megfigyelhető a nZnO koncentrációval, melyek közül a legtöbb szignifikáns volt (M16. táblázat), függetlenül az alkalmazott expozíciós időtől.

A nZnO okozta erősebb mikrobiális aktivitást gátló hatás egyik lehetséges oka az oldott cink ionok jelenléte. A cink ionok felvétele csökkentett enzimaktivitást okozhat, ugyanis Sirelkhatim és munkatársai (2015) tanulmánya szerint a ZnO nanorészecskék gátolták a légzési láncban résztvevő enzimeket. Eredményeink alátámasztják ezt, mivel a tetrazólium redukción alapuló vizsgálat során koncentráció-függő gátló hatást tapasztaltunk az enzimaktivitásban, melyre magyarázatot adnak a Sirelkhatim és munkatársai (2015) által leírtak.

### **Összegzés a vizsgált nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatásáról**

A nanorészecskék alkalmazása gyakori és széles körben elterjedt, így azok könnyen megjelenhetnek a vízi ökoszisztémában. Ennek ellenére az édesvízi mikrobiális diverzitásra gyakorolt hatásokról kevés információ áll rendelkezésre. Kutatásom során a Biolog EcoPlate™ technikát alkalmaztam, hogy felmérjem a fém-oxid és a grafén-oxid nanorészecskék hatását az édesvízi mikrobiális közösség metabolikus aktivitására és fiziológiai profiljára vonatkozólag. A laboratóriumi körülmények között végzett mikrokozmosz kísérletek során nZnO-t és nTiO<sub>2</sub>-t, és nGO-t alkalmaztam vizsgálataimhoz, melynek eredményei alapján a nTiO<sub>2</sub> csak kis mértékben befolyásolta a mikrobiális közösséget, a különböző nGO-knak nagyobb hatása volt, míg a nZnO erőteljes hatást gyakorolt a mikroflóra metabolikus aktivitásra és a funkcionális diverzitásra. A nanorészecskék jelenléte, illetve koncentrációja mellett fontos tényező az expozíciós idő, ugyanis a Biolog EcoPlate™ segítségével felmért végpontokra szignifikáns hatása volt ezen faktoroknak. Ugyanakkor az adatok alapján kijelenthető, hogy a hatás mértékében, illetve milyenségében meghatározó szerepe van a nanorészecske típusának. A szénhidrátok, karbonsavak és polimerek bizonyultak az elsődleges indikátor szubsztrátnak nagy nZnO koncentráció esetén.

Eredményeink igazolták, hogy a vizsgált indexek érzékenysége eltérő volt, továbbá egyidejű alkalmazásuk javasolt, mert kiegészítő információkat szolgáltathatnak. A McIntosh-index, mint diverzitásjelző mérőszám, jó érzékenységet mutatott a nanorészecskékkel kezelt vízminta mikrobiális közösségének diverzitásváltozására. A mikrobafajok és a szénforráshasznosításuk eloszlása is változott a kezelés hatására, melyet a Gini-index, illetve a Shannon-egyenletesség jól szemléltet. Mindezek alapján, a nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérésére, illetve (előre)jelzésére javasolt a Biolog EcoPlate™ használata, mint olcsó, egyszerű és gyors technika.

### **A Biolog EcoPlate™ alkalmazhatóságának jellemzése a nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának vizsgálatára vonatkozólag**

A Biolog EcoPlate™ egy olcsó és egyszerű eszköz mikrobiális közösségek és azok aktivitásának jellemzésére és összehasonlítására. Az optikai denzitás mérés alapján meghatározott különböző végpontokon keresztül nyújt információt a közeg mikroflórájáról. Mivel nTiO<sub>2</sub> esetén csupán néhány esetben volt tapasztalható szignifikáns eltérés a kezelésekek során, ezért elsősorban a nZnO-nál észlelt hatásokat figyelembe véve jellemzem a Biolog EcoPlate™ alkalmazhatóságát.

Eredményeink alapján az AWCD, AUC, SR értékek szignifikáns mértékben csökkentek jelentősebb nZnO koncentráció esetén. Ezek a végpontok a nZnO káros hatását igazolják, noha a végpontok nem teljesen függetlenek egymástól. Az SR és AWCD kapcsolatban állnak egymással: nagy AWCD érték esetén a legtöbb szénforrás hasznosításra kerül, míg közepes AWCD érték azt sugallja, hogy az összes szubsztrátot gyengén vagy néhány szénforrást jól, míg másokat nem hasznosít a mikroflóra (Harch és mtsai., 1997). Az AUC értékek is az optikai denzitás értékekből származtathatók, így hasonló mintázata van az AWCD-hez és SR-hez. Az RMANOVA statisztikai analízis alapján szignifikáns változás volt megfigyelhető a mikrobiális közösség metabolikus aktivitásában nZnO alkalmazásakor az említett indexek vizsgálata során, mely különösen SR és AUC esetén volt figyelemreméltó.

A különböző szubsztrátcsoportok hasznosítási aránya (SAWCD) ritkán alkalmazott végpont a Biolog EcoPlate™ használatával történő mikrobiális aktivitás jellemzése során, noha fontos kiegészítő információt tud nyújtani. A metabolikus aktivitás során elsődlegesen preferált és gyorsan hasznosított szubsztrátok hasznos információt nyújtanak a környezet állapotáról (Melita és mtsai., 2019). Érdekeséggéppen, a karbonsavak hasznosítási aránya növekedett az expozíciós idő növekedésével 20 és 100 mg/L nZnO alkalmazásakor, melyek közül a piroszőlősav-metil-észter esetén volt a legnagyobb mértékű szignifikáns eltérés tapasztalható 14 nap elteltével. A Tween40 és Tween80 hasznosítása aránya szintén jelentős volt 20 és 100 mg/L nZnO esetén, míg a szénhidrátoké jóval kisebb mértékű volt a kontrollhoz képest. Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a mikrobiális közösség szerkezete megváltozott a hozzáadott ZnO nanorészecskék hatására, ami miatt a meglévő mikrobiális közösség anyagcsere-preferenciája a karbonsavak és a polimerek felé irányult, Wu és munkatársainak (2020) kutatási eredményeihez hasonlóan. Ebben szerepe lehet mind az oldott  $Zn^{2+}$  ionoknak, mind a ZnO nanorészecskéknek.

Kutatásom során céлом volt különböző diverzitás indexek összehasonlítása, így a Shannon-index, Shannon-egyenletesség, Simpson-index, McIntosh-index és Gini-index elemzése. Az említettek közül a Shannon-index és a Shannon-egyenletesség a leggyakrabban alkalmazott végpontok a funkcionális diverzitás jellemzésére. A Shannon-index a hasznosított szénforrások eloszlásáról nyújt információt. Nagy Shannon-index érték egyidejűleg utal kiváló funkcionális metabolikus diverzitásra és a funkcionális típusok egyenletes eloszlására. Nagy Shannon-egyenletesség érték csak akkor érhető el, ha az összes szénforrás jól hasznosított, de ez visszafelé nem igaz. Ha a legtöbb szubsztrát hasznosításra kerül, akkor a Shannon-index értéke nagy lesz (Harch és mtsai., 1997). Eredményeink alapján a nZnO csökkentette a Shannon-index értékét, ami a nZnO mikrobiális aktivitásra és diverzitásra gyakorolt negatív hatását igazolja. A Shannon-egyenletesség értékei kisebbek voltak 20 mg/L nZnO koncentráció alatt, míg 100 mg/L nZnO esetén matematikai probléma merült fel, mivel az SR értéke 0 volt, és a Shannon-egyenletesség számítása során az SR természetes alapú logaritmusával történő osztás szükséges, emiatt jelentős csökkenés tapasztalható az eredményeknél. Ezek alapján nem ajánlom ezt a végpontot a mikrobiális közösség aktivitásának jellemzésére.

A Simpson-index – a Shannon-indexhez hasonlóan – a nZnO negatív hatását igazolta. A ritka fajokat nagyobb súlyban veszi figyelembe a közönséges fajoknál a Shannon-index, így a Shannon-indexet erősen befolyásolja a fajgazdagság. A Simpson-index a közönséges fajokat nagyobb súlyban veszi figyelembe, mint a ritka fajokat, így ez az index nagyobb súlyt fektet az egyenletességre (Adams és mtsai., 2017). Kutatásunk során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két index (Simpson- és Shannon-index) között.

Eredményeink alapján a McIntosh-index mutatja be legjobban átfogóan az AWCD, AUC és SR végpontokat, mivel ennek az indexnek a számítása is az optikai denzitás értékeken alapul. A McIntosh-index a dominancia mérőszáma, ám nem gyakran használt végpont.

Vizsgálataink során a McIntosh-index és a mikrobiális aktivitás között korreláció volt megfigyelhető, továbbá jelezte a kezelés és az expozíciós idő hatását is. DeJong (1975) szintén arról számolt be, hogy a McIntosh-, és a Simpson-indexek jobban illeszkedtek a diverzitáshoz, mint a Shannon-index, mivel ezen indexeket elsősorban az egyenletesség, mintsem a szubsztrátszám befolyásolja, a Shannon-indextől eltérően.

Mindemellett megemlítendő, hogy a Gini-index érzékenysége miatt jól tükrözte a nanorészecskék által kiváltott metabolikus aktivitás változásokat (M3. ábra). A Gini-index értékei növekedtek a nZnO koncentráció növelésével, ám az RMANOVA analízis nem mutatott olyan erős szignifikáns különbséget, mint a Shannon-, Simpson- és McIntosh-indexek esetén.

A Biolog EcoPlate™ néhány korlátozó tényezővel rendelkezik (Stefanowicz, 2006; Chavan és Nadanathangam, 2020). A mikroflóra közösség szintű profilozására (CLPP) könnyebb és olcsóbb módszer a Biolog EcoPlate™ használata, mint a DNS vagy RNS alapú profilozás; sőt néhány tanulmány szerint a molekuláris profilozás nem olyan érzékeny, mint a CLPP alapú megközelítés (El Fantroussi és mtsai., 1999; Sutcliffe és mtsai., 2019).

Ugyanakkor további vizsgálatok szükségesek a nanorészecskékre leginkább érzékeny baktérium nemzetségek meghatározása céljából, ugyanis a CLPP és a DNS-alapú módszerekkel eltérő mintázatok figyelhetőek meg (Ros és mtsai., 2008; Lladó és Baldrian, 2017). Az aerob és anaerob mikrobiális közösség változásait egyaránt szükséges vizsgálni, melyet a 95 szénforrást tartalmazó Biolog AN (anaerob) mikrotitrátor lemezzel végezhetünk el, így egyidejűleg több szubsztrát hasznosítását is monitoringozhatjuk.

#### 6.1.4. Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék hatása a bakteriális kommunikációra

A cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék toxicitására vonatkozólag számos kutatás eredménye rendelkezésre áll, azonban olyan szubletális végpontokra gyakorolt hatásokról, mint a bakteriális kommunikáció által vezérelt biofilmképzés, pigmenttermelés, korlátozottak az információk. Ez alapján célt volt felmérni, hogy a nZnO és nTiO<sub>2</sub> miképpen befolyásolja a *Pseudomonas aeruginosa* bakteriális kommunikáció által vezérelt folyamatait. Különböző végpontokat vizsgáltam annak feltérképezésére, hogy a nanorészecskék használata új módszert jelenthet-e a baktériumok viselkedésének befolyásolására és lehetőséget teremthet-e fertőzések megelőzésére.

##### *6.1.4.1. A vizsgált nanorészecskék toxicitása a tesztorganizmusra*

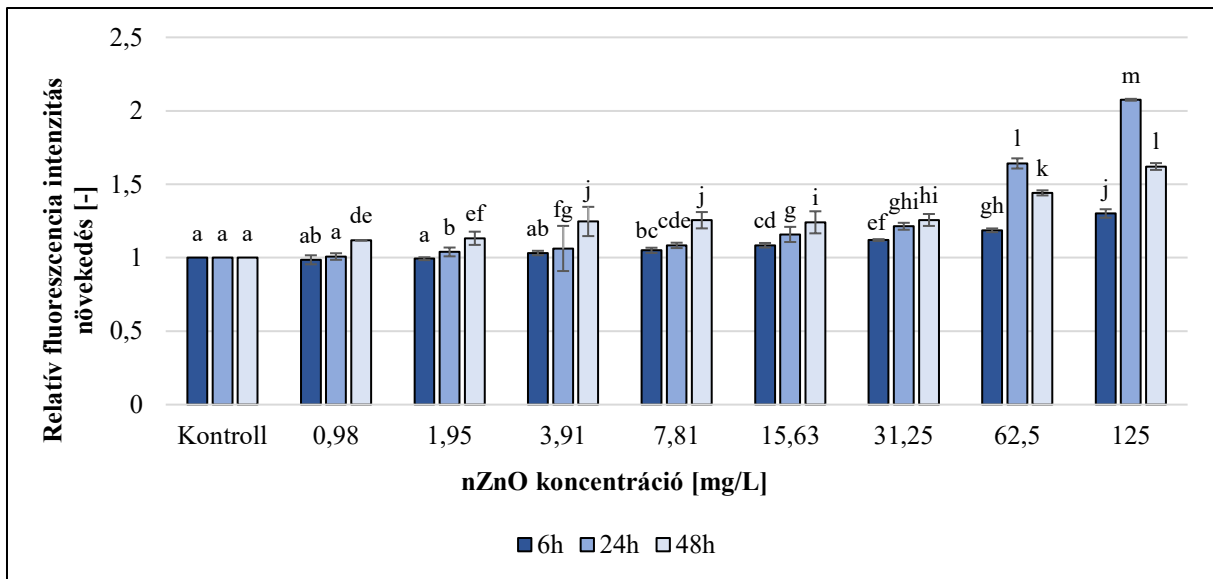
A nanorészecskék toxikus hatásának felmérésére különböző életképesség vizsgálatokat végeztünk, így mértük az optikai denzitást és a légzési láncban szerepet játszó enzimek aktivitását, továbbá felmértük a reaktív oxigén származék termelés intenzitását.

##### 6.1.4.1.1. Optikai denzitás és enzimaktivitás mérés eredményei

Az optikai denzitás mérése és az enzimaktivitás tesztek mérési eredményei alapján ebben a tesztrendszerben nem tudtunk releváns következtetéseket levonni, mert a nanoanyagok aggregációja és kiülepedése jelentősen befolyásolta az abszorbanciát és ezzel együtt az eredményeket. Így ilyen kísérleti rendszerben ezekkel a végpontokkal kapott eredményeket nem használtuk fel a hatásvizsgálat jellemzéséhez.

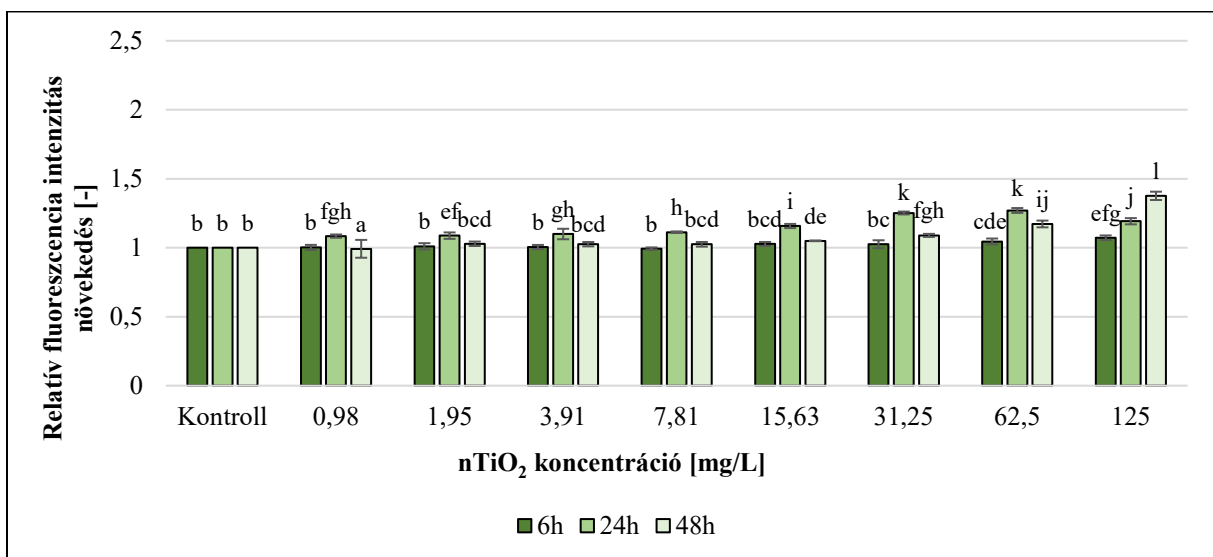
##### 6.1.4.1.2. Reaktív oxigén származék termelés intenzitásának változása

A ZnO nanorészecskék *P.aeruginosa* baktérium ROS termelésére gyakorolt hatását a 35. ábra szemlélteti. Eredményeink alapján a nZnO káros hatást fejtett ki a baktériumra, mely koncentráció- és időfüggő volt, vagyis a nagyobb dózis és a hosszabb expozíciós idő növelte a ROS termelést; habár 48 óra kontaktidő elteltével 62,5, illetve 125 mg/L nZnO koncentrációnál csökkenés volt megfigyelhető. Az inkubációs idő jelentőségét mutatja, hogy a legkisebb, szignifikáns ROS termelés növekedést okozó nZnO koncentráció 7,81, 1,95, illetve 0,98 mg/L volt 6, 24, illetve 48 óra elteltével. A legintenzívebb ROS termelést 125 mg/L nZnO koncentráció esetén, 24 óra elteltével tapasztaltuk, ami 108%-os ROS növekedést eredményezett.



35. ábra: Cink-oxid nanorészecskék hatása a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium ROS termelésére. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A TiO<sub>2</sub> nanorészecskék ROS termelésre gyakorolt hatását a 36. ábra illusztrálja. Noha a hatás koncentrációfüggő volt, a hatás mértéke kisebb volt, mint nZnO esetén. A legnagyobb ROS növekedés 38%-os volt, amit 48 óra elteltével, 125 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentrációnál észleltünk. Ugyanakkor kisebb nTiO<sub>2</sub> koncentráció alkalmazása esetén 24 óra kontaktidő után volt tapasztalható a legnagyobb ROS intenzitás. Továbbá 6 óra elteltével csak a 62,5 és 125 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentrációk esetén volt szignifikáns hatás (4,5%, illetve 7,2%-os ROS növekedés), míg 48 óra kontaktidő után 15,63 mg/L és ennél nagyobb nTiO<sub>2</sub> dózis esetén nőtt szignifikáns mértékben a ROS termelés. Ebben az esetben a keletkezett ROS mennyisége arányos volt az alkalmazott nTiO<sub>2</sub> koncentrációval, ugyanis a ROS képződés mértéke 5, 9, 17 és 38%-kal volt nagyobb a kontrollhoz képest.



36. ábra: Titán-dioxid nanorészecskék hatása a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium ROS termelésére. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Eredményeink alapján mindkét típusú nanorészecske az alkalmazott koncentráció növelésével arányosan fokozta a ROS képzést; habár 0,98 mg/L nTiO<sub>2</sub> esetén enyhe csökkenést tapasztaltunk 48 óra elteltével. Továbbá kis koncentráció alkalmazásakor egyik nanorészecske esetén sem észleltünk szignifikáns hatást 6 óra kontaktidő elteltével. Ugyanakkor szignifikáns ROS növekedést mértünk 7,81 mg/L nZnO és 62,5 mg/L nTiO<sub>2</sub> alkalmazása esetén. Eredményeink alapján a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék kisebb mértékben befolyásolták a *P. aeruginosa* ROS termelését a ZnO nanorészecskékhez képest. Ennek megfelelően a legnagyobb ROS növekedés nTiO<sub>2</sub> esetén 38% volt 125 mg/L koncentráció alkalmazása során 48 óra elteltével, míg nZnO esetén 108% volt 24 óra elteltével azonos dózisban.

Eredményeink azt sugallják, hogy az expozíciós idő is jelentősen befolyásolja a ROS termelést, mivel nZnO esetén az inkubációs idő növelésével a ROS mennyisége is nőtt (kivéve 62,5 és 125 mg/L esetén). Ezzel ellentétben nTiO<sub>2</sub> esetén a legnagyobb ROS növekedést 24 óra elteltével mértük az egyes kezeléseknél (kivéve 125 mg/L esetén).

Ebadi és munkatársai (2019) szintén megnövekedett ROS képzésről számoltak be *P. aeruginosa* baktérium vizsgálata során 500–2000 mg/L nZnO koncentrációt alkalmazva. Eredményeik alapján a fluoreszcencia intenzitás 250%-kal nagyobb volt a kontrollhoz képest 2000 mg/L nZnO dózis esetén.

Több tanulmány is vizsgálta a ZnO és TiO<sub>2</sub> nanorészecskék ROS termelésre gyakorolt hatását; melyek több esetben arra a következtetésre jutottak, hogy a nZnO nagyobb mértékű ROS képzést indukál a nTiO<sub>2</sub>-hoz képest azonos körülmények között (Wang és mtsai., 2011b; Khan és mtsai., 2015; Wang és mtsai., 2022). Ugyanakkor más tanulmányok arról számoltak be, hogy a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék okoztak nagyobb ROS növekedést a ZnO nanorészecskékhez képest (Karlsson és mtsai., 2008; Barnes és mtsai., 2013).

Wang és munkatársai (2022) megállapítása szerint, a Zn<sup>2+</sup> ionoknak való hosszabb idejű (24 óra) kitettség szignifikáns mértékben csökkentette a trikarbonsav ciklus transzkriptomjainak számát humán tüdő epiteliális karcinóma sejtekben. Továbbá a nZnO növelte a gyulladásban szerepet játszó gének expresszióját, a hősokk-fehérjék transzkripcióját, mitokondriális problémákat, és az apoptózist THP-1 makrofágokban. Ezzel szemben a nTiO<sub>2</sub> nem okozott oxidatív stresszt és nem fokozta a gyulladással válaszreakciót (Wang és mtsai., 2022).

Mindemellett a ZnO fotokatalitikus tulajdonságai UV megvilágításban még erőteljesebbek, ami fokozza a ROS termelés indukáló képességét. A TiO<sub>2</sub> szintén rendelkezik fotokatalitikus tulajdonságokkal, azonban a ROS termelésre gyakorolt hatása kisebb hasonló körülmények között. Martorano és munkatársai (2010) tanulmánya szerint az UV-B sugárzás a Zn<sup>2+</sup> felszabadulásához vezet a ZnO-ban, ami Zn<sup>2+</sup> ionok felhalmozódását eredményezi. Ez az egyensúlyhiány hozzájárul a citotoxikus hatáshoz és az oxidatív stresszhez.

Barnes és munkatársai (2013) vizsgálatai során a *P. aeruginosa* baktérium jelentős rezisztenciát mutatott az UV-aktivált ZnO és TiO<sub>2</sub> nanorészecskék általi inaktivációval szemben 10–1000 mg/L nanorészecske koncentráció esetén.

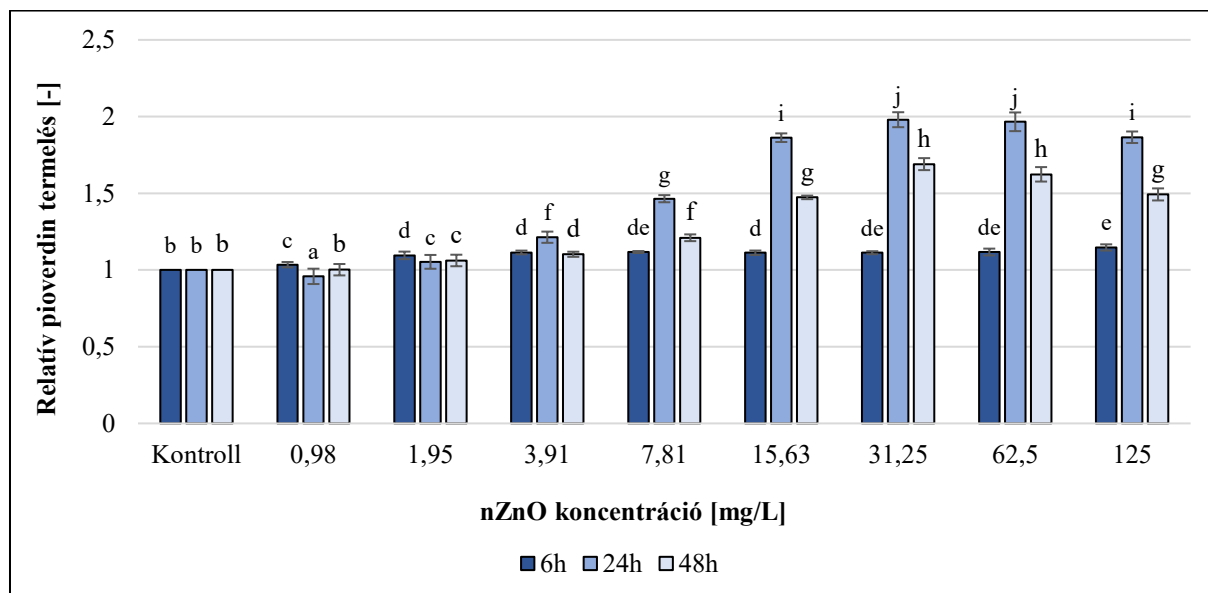
Eredményeink alapján összességében elmondható, hogy mindkét típusú nanorészecske növelte a reaktív oxigén származékok (ROS) termelését, és a hatás mértékét befolyásolta az alkalmazott koncentráció és expozíciós idő. Ugyan a nTiO<sub>2</sub> kisebb hatást gyakorolt erre a végpontra a nZnO-nál, a hatás koncentráció- és időfüggő volt. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy a ZnO erőteljesebben fokozza a reaktív oxigén származékok képzését.

#### 6.1.4.2. A vizsgált nanorészecskék kvórum-szabályozott folyamatokra gyakorolt hatása

A nanorészecskék bakteriális kommunikációra gyakorolt hatását kettő metodikai eljárás szerint mértem fel, így a *P. aeruginosa* pioverdin termelésének, valamint biofilm képzésének intenzitását vizsgáltam, melyek kvórum-vezérelt, szignál molekulák által szabályozott folyamatok.

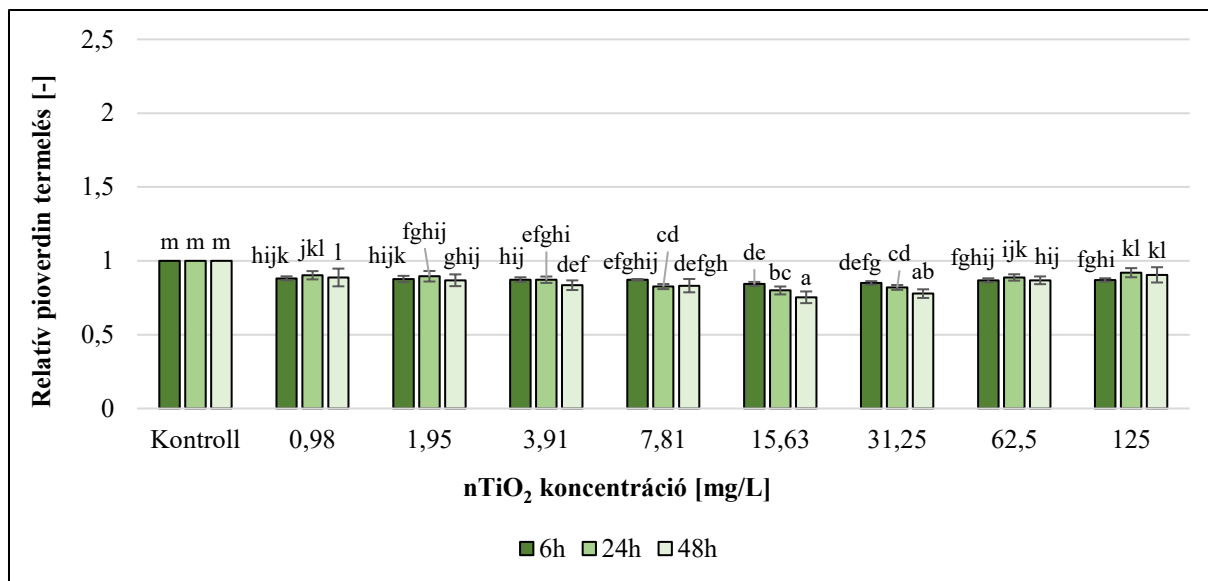
##### 6.1.4.2.1. Pioverdin termelés intenzitásának változása

A *P. aeruginosa* pioverdin termelése egy QS-szabályozott folyamat. Cink-oxid nanorészecskék jelenlétében történő pioverdin termelés intenzitását szemlélteti a 37. ábra. Az eredmények alapján a nZnO-nak koncentráció-függő pozitív hatása van a pioverdin termelésre, habár 62,5, illetve 125 mg/L nZnO dózis esetén enyhe csökkenés volt tapasztalható. A legnagyobb pioverdin termelés intenzitást 24 óra kontaktidő után észleltük (kivéve 1,95 mg/L nZnO koncentráció esetén), míg a legnagyobb intenzitás növekedést (98%) 31,25 mg/L nZnO dózissnál mértük. Minden kezelés szignifikáns eltérést okozott a kontrollhoz képest, kivéve 0,98 mg/L nZnO koncentráció 48 óra elteltével, amely mindössze 0,19%-os növekedést okozott. Továbbá megemlítendő, hogy az összes kezelés pozitívan hatott erre a végpontra, egyedül 0,98 mg/L nZnO koncentrációt alkalmazva tapasztaltunk gátló hatást 24 óra elteltével.



**37. ábra:** Cink-oxid nanorészecskék hatása a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium pioverdin termelésére. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A titán-dioxid nanorészecskék pioverdin termelésre gyakorolt hatása eltérőnek bizonyult a nano cink-oxidhoz képest, ugyanis minden kezelés – kismértékben, de – gátolta a sziderofór képzést (38. ábra). Az összes alkalmazott nTiO<sub>2</sub> dózis szignifikáns mértékben fejtett ki negatív hatást erre a kvórum-szabályozott folyamatra, noha a hatás mértéke hasonló volt az összes kezelésnél. A legkisebb pioverdin termelést 15,63 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentráció alkalmazása esetén mértük 48 óra inkubációs idő elteltével, mely 25%-os gátló hatást okozott.



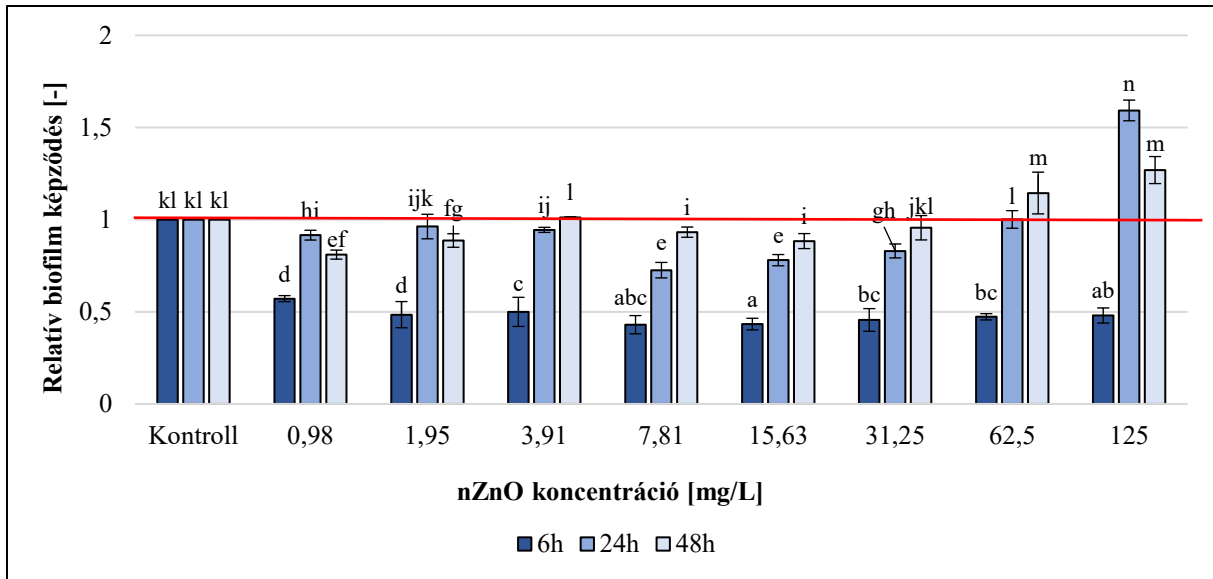
38. ábra: Titán-dioxid nanorészecskék hatása a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium pioverdin termelésére. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Eredményeink alapján a pioverdin termelés intenzitását jelentős mértékben befolyásolták a nanorészecskék. Megfigyeléseink szerint a nanorészecske típusának jelentős szerepe van a kifejtett hatásban, ugyanis a nZnO serkentő, míg a nTiO<sub>2</sub> gátló hatást mutatott erre a végpontra. A ZnO nanorészecskék által kifejtett hatás koncentráció- és időfüggő volt. Minden kezelés növelte a pioverdin mennyiségét, míg a legnagyobb pioverdin termelés intenzitást 24 óra elteltével tapasztaltuk. Ezzel ellentétben a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék enyhe gátló hatást fejtettek ki a pioverdin termelésére minden kezelés esetén. Eredményeink szerint ezt a nanorészecskét alkalmazva kisebb szerepe van az alkalmazott dózisnak és kontaktidőnek, ugyanis az inhibíció mértéke hasonló volt minden kezelés esetén.

Kutatásunk bizonyítja, hogy a vizsgált nanorészecskék szignifikáns mértékben befolyásolják a pioverdin termelés mértékét, és a kifejtett hatás, valamint annak mértéke jelentős mértékben függ a nanorészecske típusától és koncentrációjától, továbbá az expozíciós idő tartamától.

#### 6.1.4.2.2. Biofilmképzés intenzitásának változása

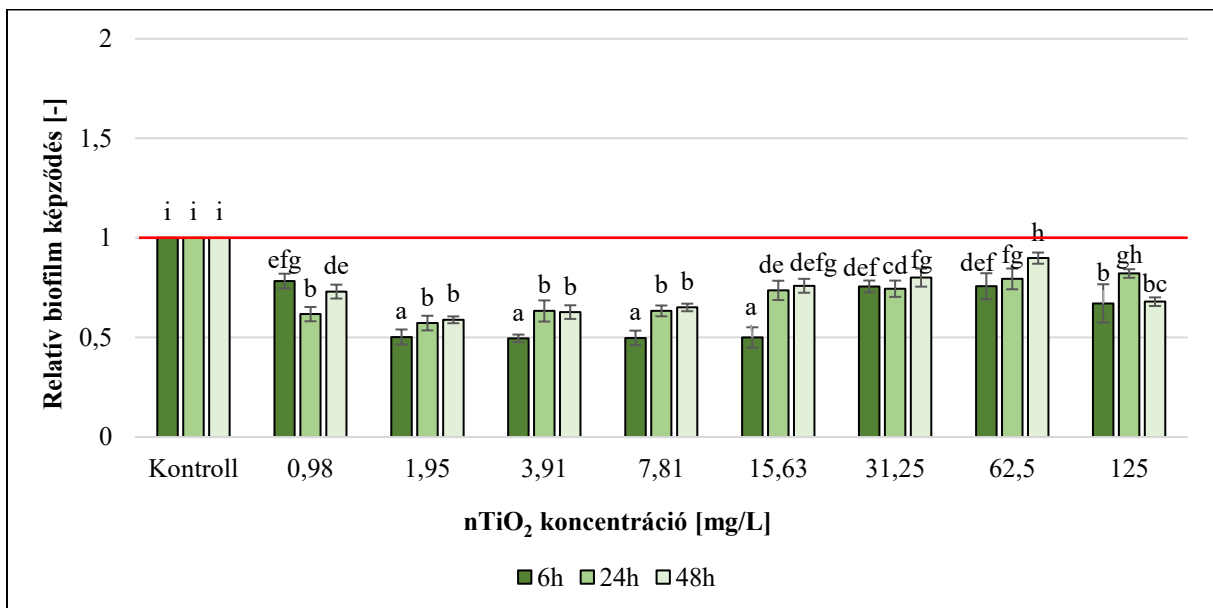
A cink-oxid nanorészecskék *P. aeruginosa* baktérium biofilm képzésére gyakorolt hatását a 39. ábra szemlélteti. Ennek alapján elmondható, hogy az alkalmazott kontaktidőnek és a koncentrációnak is szignifikáns szerepe volt a megnyilvánuló hatásban. Jelentős biofilmképzés csökkenést tapasztaltunk 6 óra inkubációs idő után, míg 24 és 48 óra elteltével a gátló hatás mértéke csökkent, sőt 62,5, valamint 125 mg/L nZnO koncentráció esetén serkentő hatást mértünk. A legnagyobb gátló hatást (57%) 7,81 mg/L nZnO koncentráció alkalmazásakor mértük 6 óra kontaktidő elteltével. Ezzel szemben a legnagyobb biofilmképzés növekedést (60%) 125 mg/L nZnO koncentráció esetén 24 óra inkubációs idő után tapasztaltuk. Ezen eredmények azt mutatják, hogy mind a nanorészecskék koncentrációja, mind pedig az expozíciós idő hossza jelentősen befolyásolja a *P. aeruginosa* biofilm képzésre gyakorolt hatását.



39. ábra: Cink-oxid nanorészecskék hatása a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium biofilm képzésére. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A titán-dioxid nanorészecskék biofilmképzésre gyakorolt hatását a 40. ábra illusztrálja. Ezen eredmények hasonlóak a pioverdin termelésre gyakorolt hatásnál tapasztaltakkal, ugyanis minden kezelés esetén szignifikáns gátló hatást figyeltünk meg. Noha enyhén csökkent az inhibíció mértéke a nTiO<sub>2</sub> koncentráció növelésével, a kontaktidő növelése is csökkentette a hatás mértékét.

A legnagyobb gátló hatást (50%) 6 óra expozíciós idő elteltével tapasztaltuk 3,91 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentráció alkalmazása esetén. Ezen koncentráció esetén a gátló hatás mértéke 37, illetve 35%-ra csökkent 24 és 48 óra elteltével. Továbbá az inhibíció mértékének legnagyobb csökkenését 15,63 mg/L nTiO<sub>2</sub> dózisú kezelésnél észleltük 24 és 48 óra elteltével, mely 24, illetve 26%-os hatás-csökkenés volt a 6 óránál tapasztalathoz képest.



40. ábra: Titán-dioxid nanorészecskék hatása a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium biofilm képzésére. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Eredményeink azt sugallják, hogy a nanorészecskék biofilmképzés intenzitására gyakorolt hatását elsősorban a nanorészecske típusa befolyásolja, mivel a különböző típusú fém-oxid nanorészecskék esetén eltérő hatást figyeltünk meg erre a végpontra vonatkozólag.

A nZnO minden kezelés esetén gátolta a biofilmképzést 6 óra inkubációs idő elteltével, és a legnagyobb gátló hatást (57%) 7,81 mg/L koncentráció esetén mértük. 24 óra kontaktidő esetén a legtöbb kezelés továbbra is gátolta a biofilmképzést, kivéve a 125 mg/L nZnO dózisú kezelést, ahol 60%-os serkentő hatást észleltünk. Mindemellett 48 óra expozíciós idő elteltével mind a gátló, mind a serkentő hatások mértéke csökkent. Sőt, 62,5 mg/L nZnO koncentráció esetén 14%-os serkentő hatást észleltünk 48 óra elteltével, míg korábban gátlót.

A különböző időpontokban történt mérések során a legnagyobb gátló hatást 7,81 és 15,63 mg/L nZnO koncentráció esetén tapasztaltuk. Ezzel ellenkezőleg serkentő hatást észleltünk 62,5, illetve 125 mg/L nZnO dózisú kezelésnél 48 óra elteltével.

A nTiO<sub>2</sub> hatása ellentétes, de konzekvens volt a *P. aeruginosa* biofilmképzésére a nZnO-hoz képest. Az összes kezelés esetén gátolta ezt a végpontot minden mérési időpontban, habár a hatás erőssége csökkent az inkubációs idő előrehaladtával. A legjelentősebb mértékű biofilmképzés csökkenést kis nTiO<sub>2</sub> koncentrációk (1,95–7,81 mg/L) esetén tapasztaltuk, míg a legnagyobb inhibíciót (50%) 6 óra után, 3,91 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentrációnál mértük.

Vizsgálatunk eredményeit összevetve más kutatások eredményeivel, azok megerősítették tapasztalatainkat, illetve új megvilágításba helyezték észrevételeinket.

Li és munkatársai (2018) kis koncentrációban (100 µg/L) vizsgálták a nTiO<sub>2</sub> és nZnO hatását a *P. aeruginosa* PAO1 baktérium kvórum (QS) rendszerére. Megállapították, hogy a vizsgált nanorészecskék hatással voltak a QS rendszerekre. Ugyanakkor megfigyelték, hogy a fém-oxid nanorészecskék (nZnO, nTiO<sub>2</sub>) nem befolyásolták szignifikáns mértékben a *P. aeruginosa* PAO1 QS-szabályozott folyamatait. Ezt a kicsi zéta-potenciáljaiknak tulajdonították, ami miatt aggregálódásra hajlamosabbak egyéb fém (Ag és Fe) nanorészecskékhez képest. Eredményeik alapján a nanorészecskék kémiai összetétele, alakja és zéta-potenciálja jelentős szerepet játszik a nanorészecskék QS rendszerekre gyakorolt hatásában.

de Celis és munkatársai (2022) tanulmányukban egy szennyvíztisztító telepről izolált *P. aeruginosa* törzs ezüst (Ag) és cink-oxid nanorészecskékre adott válaszreakcióit vizsgálták. Eredményeik alapján a baktérium fenotípusos és transzkriptomban jelentkező reakciói elsősorban a vas-homeosztázissal és a biofilmképzéssel vannak összefüggésben, mivel ezekben idézett elő változásokat a nZnO. Továbbá a ZnO nanorészecskék nagyobb dózisú alkalmazása jelentősen csökkentette a sejtek életképességét és megnövekedett ROS termelést okozott, ami további, erőteljesebb változásokat eredményezett a transzkriptomban és a biofilm szerkezetében.

Ali és munkatársai (2020) arról számoltak be, hogy a bioszintetikus úton előállított ZnO nanorészecskék gátolták a *P. aeruginosa* baktérium QS által szabályozott virulenciafaktorainak (piocianin és elasztáz) termelését 100 mg/L koncentráció esetén. Továbbá a hatás dózis-függő volt 100–300 mg/L nZnO koncentrációtartományban. Habár kísérleteinkhez képest Ali és munkatársai (2020) nagyobb dózisban alkalmazták a ZnO nanorészecskéket, eredményeik ellentétesek az általunk tapasztaltakkal, ugyanis vizsgálataink alapján a nZnO koncentrációarányosan növelte a pioverdin termelést.

Lee és munkatársai (2014) 8–400 mg/L koncentrációtartományban vizsgálták a ZnO nanorészecskék hatását *P. aeruginosa* baktériumra vonatkozólag. Eredményeik alapján a nZnO dózis-függően gátolta a biofilmképzést, a piocianin termelést, a *Pseudomonas quinolone signal* (PQS) jelmolekula és a piohelin szintézist, továbbá a hemolitikus aktivitást, anélkül, hogy befolyásolta volna a planktonikus fázisban lévő sejtek növekedését, mindemellett növelte a pioverdin termelést.

Habár vizsgálataik során nagyobb nZnO koncentrációt alkalmaztak, az általunk tapasztaltaknak megfelelően megnövekedett pioverdin termelésről számoltak be nZnO alkalmazása esetén. Ugyanakkor vizsgálataink során kisebb nZnO koncentrációnál (0,98–7,81 mg/L) csökkent intenzitású biofilmképzést tapasztaltunk. Az alkalmazott nZnO dózis növelésével a gátló hatás mértéke csökkent, sőt, nagy nZnO koncentráció esetén (62,5–125 mg/L) serkentő hatást észleltünk.

Shome és munkatársai (2023) összehasonlító vizsgálatokat végeztek ZnO nanorészecskék és kurkumin-ZnO nanokompozitok *P. aeruginosa* baktérium biofilmképzésre gyakorolt hatását illetően. Eredményeik alapján a nZnO jelentősen csökkentette a biofilmképzést 300, 500 és 700 mg/L koncentrációban, azonban szignifikáns hatást csak 300 és 500 mg/L koncentráció esetén értek el. Továbbá a 96 órás kontaktidő elteltével 42%-os biofilmképzés csökkenést mértek 300 mg/L nZnO esetén, míg azonos koncentrációjú kurkumin-nZnO kezelés által 49%-os gátló hatást tapasztaltak.

Eredményeink alapján a nZnO biofilmképzésre gyakorolt gátló hatása kisebb koncentráció esetén volt jelentősebb 6 óra kontaktidő esetén (57%-os 7,81 mg/L nZnO dózissal), azonban az inkubációs idő előrehaladtával a hatás mértéke csökkent, sőt 24 óra elteltével 60%-os serkentő hatást mértünk 125 mg/L nZnO koncentrációnál.

Al-Momani és munkatársai (2023) tanulmányt végeztek a ZnO nanorészecskék hat klinikai és egy standard (ATCC 27853) *P. aeruginosa* törzsre gyakorolt hatásáról. Megállapították, hogy a ZnO nanorészecskék szignifikáns mértékben gátolták az összes törzs növekedését és biofilmképzését 3000 mg/L koncentráció alatt, ami a biofilm metabolikus aktivitásának és biomasszájának csökkenéséhez vezetett. Eredményeik azt mutatták, hogy a nZnO szignifikáns hatást gyakorolt négy törzs biofilmképzésére 400 és 1000 mg/L közötti, míg a másik két törzs esetében 500 és 1000 mg/L közötti koncentrációtartományban.

Mivel kutatásunk során ugyanazt a *P. aeruginosa* törzset használtuk, összehasonlítottuk eredményeinket az általuk leírtakkal. Kísérleteink alapján a vizsgált baktériumtörzs érzékenyebb volt az alkalmazott nanorészecskékre, ugyanis már jóval kisebb koncentráció (0,96 mg/L) esetén is szignifikáns hatást figyeltünk meg, mind nZnO, mind nTiO<sub>2</sub> esetében.

Ahmed és munkatársai (2021) a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék quorum quenching-re (QQ) gyakorolt hatását vizsgálták 4 mg/L alatti koncentrációtartományban. Eredmények szerint a nTiO<sub>2</sub> szignifikáns mértékben, 96%-kal csökkentette az alkalmazott *P. aeruginosa* törzsek biofilmképzését, és mérsékelte a QS által szabályozott gének expresszióját. Ezek az eredmények alátámasztják a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék használatában rejlő potenciált a biofilmképzés gátlására. Habár az általuk vizsgált nTiO<sub>2</sub> dózis a mi kutatásunkban alkalmazott koncentrációtartományon belül volt, mi nem tapasztaltunk ilyen jelentős gátlási arányt. Ugyanakkor a legnagyobb biofilm csökkenést 3,91 mg/L-nél mértük. Noha 0,98 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentrációnál kisebb volt a biofilmképzés inhibíciójának mértéke, eredményeink arra utalnak, hogy a nagyobb nTiO<sub>2</sub> dózis alkalmazása kisebb biofilm-gátlási arányt eredményezhet a *P. aeruginosa*-val szemben, ahogyan azt Ahmed és munkatársai (2021) is kimutatták.

Rajkumari és munkatársai (2019) az *Aloe barbadensis*-ből szintetizált nTiO<sub>2</sub> hatását vizsgálták a *P. aeruginosa* PAO1 törzsön. Eredményeik szerint 31,25 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentráció 30,69%-kal gátolta a biofilmképzést. Továbbá arról is beszámoltak, hogy a már kialakult biofilm 47,04%-ban megbomlott ugyanilyen koncentrációjú TiO<sub>2</sub> nanorészecskék hatására. Vizsgálataink során a 31,25 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentráció alkalmazása 25%-os gátló hatást eredményezett, míg a legnagyobb gátlási arányt (50%) 3,91 mg/L nTiO<sub>2</sub> koncentrációnál figyeltük meg 6 óra inkubációs idő elteltével.

Anupama és munkatársai (2018) a *P. aeruginosa* PAO1 biofilmképzésének molekuláris mechanizmusának kutatása során vizsgálták, hogy az anatóz TiO<sub>2</sub> molekulák miként zavarják ezt a folyamatot. *In silico* vizsgálták a sejtek és fém-oxidok közötti molekuláris kölcsönhatásokat.

A  $n\text{TiO}_2$  jelentős biofilmképzést gátló hatását a sejtmembránban lévő szulfhidril ( $-\text{SH}$ ) csoportok és a  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék közötti reakciónak tulajdonították, amelynek következtében  $\text{S}-\text{TiO}_2$  kötés jött létre. Ez a kötés valószínűleg nehezíti az elektrontranszportláncot és azoknak a kulcsfontosságú enzimeknek a működését, melyek szükségesek a biofilmek kialakulásához (Abdulazeem és mtsai., 2019).

Az említett tanulmányok igazolják a  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék jelentős potenciállal rendelkeznek a biofilmképződés csökkentésére, s ennek a hatásnak a mértékét mértük fel kutatásunk során.

Tanulmányunk kimutatta, hogy a  $\text{ZnO}$  és  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék hatékonyan képesek befolyásolni a *Pseudomonas aeruginosa* biofilmképzését. A továbbiakban a folyamat háttérét és más fém nanorészecskék biofilmképzésre gyakorolt hatását is vizsgálni szükséges, mivel azok hatásának mértéke eltérő lehet.

Összefoglalva, a nanorészecskékben jelentős potenciál rejlik a biofilmképződés mértékének befolyásolásában.

Kutatásunk rámutatott, hogy a nanorészecskék – a sejtekre gyakorolt toxikus hatáson túl – jelentősen befolyásolják a kvórum szabályozott folyamatokat is. Fontos megállapítás, hogy eredményeink alapján, adott nanorészecske típus eltérő módon befolyásolhatja a különböző, bakteriális kommunikáció által vezérelt folyamatokat, így a biofilmképzést és a siderofór termelést.

Mindemellett a  $n\text{ZnO}$  biofilmképzésre gyakorolt hatása függ az alkalmazott koncentrációtól és expozíciós időtől, melyektől függően serkentő és gátló hatása egyaránt megfigyelhető. Ezzel szemben a  $n\text{TiO}_2$  minden kísérleti beállítás mellett egyértelműen gátolta a biofilmképzést és pioverdin termelést egyaránt.

Továbbá fontos és szükséges a fiziológiai hatások, például az enzimaktivitás mérés technikájának továbbfejlesztése; valamint figyelem és körültekintés szükséges más tanulmányok eredményeinek értelmezésekor.

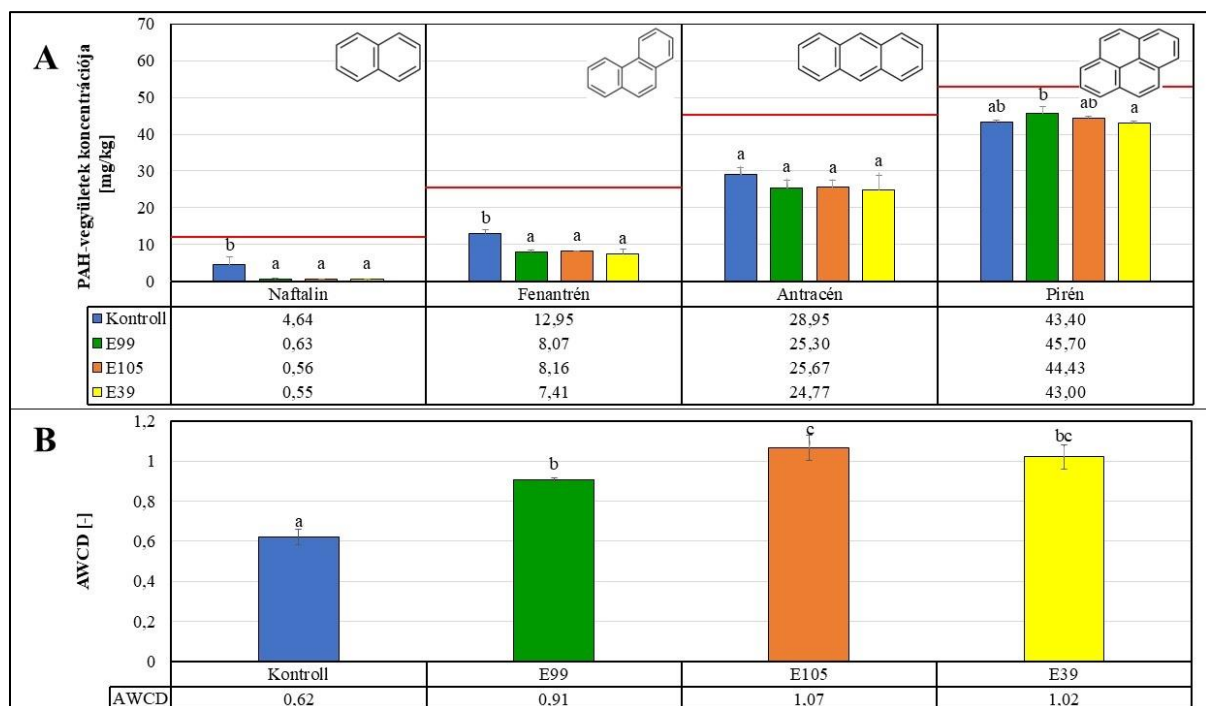
## 6.2. Enzim-alapú technológiafejlesztés policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok bioremediációjára

Kutatásaim során PAH-okkal szennyezett talajok új enzim-alapú bioremediációs eljárásának fejlesztésén is dolgoztam, melynek eredményeit az alábbiakban mutatom be.

### 6.2.1 Metagenomikai úton tervezett enzimek hatékonysága talajremediáció során

Metagenomikai módszerekkel tervezett új enzimek működését mikrokozmosz kísérletek során mértük fel. Ennek során olyan talajmintákat használtunk, amelyek ismert mennyiségű PAH szennyezőanyagot (12,5 mg/kg naftalin, 25,9 mg/kg fenantrén, 46,2 mg/kg antracén és 52,0 mg/kg pirén) tartalmaztak, és 7 nap inkubációt követően a szennyezőanyagok koncentrációja alapján értékeltük az enzimek hatékonyságát.

Az enzimek hozzáadása nélkül is jelentős PAH eltávolítást észleltünk, ami a talajban lévő természetes mikroflóra PAH-bontó képességére és aktivitására utal (41.A. ábra).



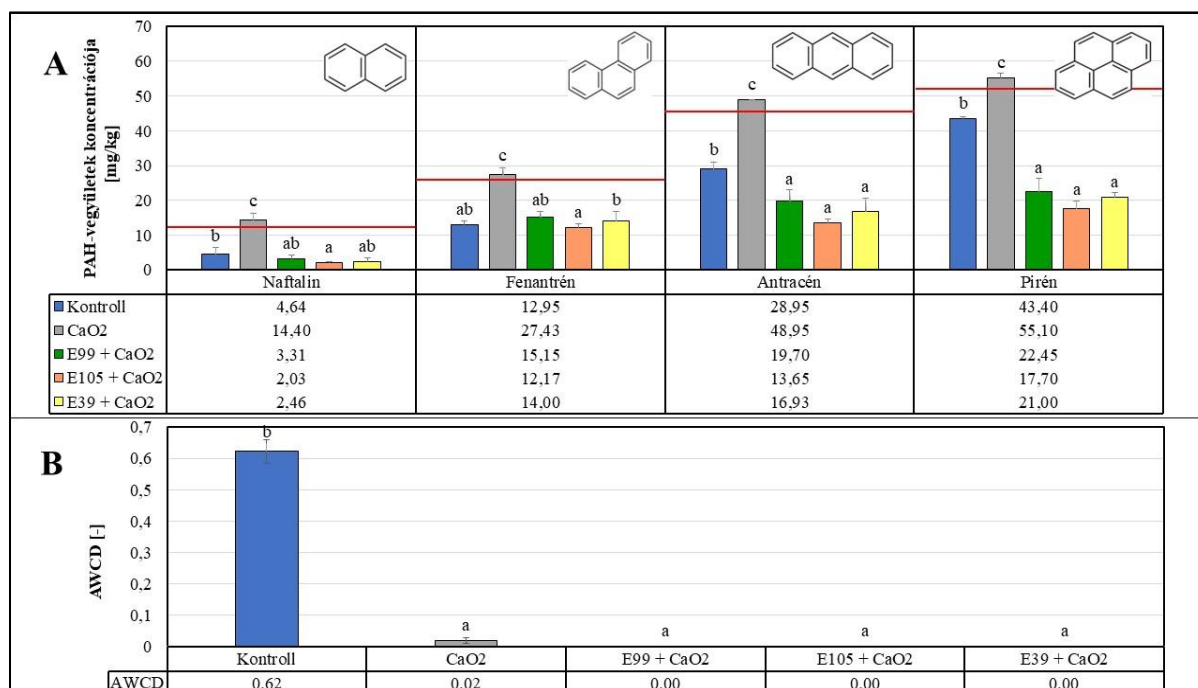
**41. ábra:** PAH-vegyületek koncentrációja (A rész) és mikrobiológiai aktivitás (B rész) az új enzimekkel kezelt talajokban. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ). A piros vonal a kezdeti értéket szemlélteti.

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.

A talaj természetes mikrobiális aktivitására vonatkozó feltételezést tovább erősítette a Biolog EcoPlate™ teszt eredménye (41.B. ábra), melynek során az AWCD értékek alapján jellemeztük a mikrobiális metabolikus aktivitást. Az enzimek hozzáadása utáni 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 (41.A. ábra). Mivel vizsgálataink szerint az enzimek hozzáadása növelte a természetes mikrobiális aktivitást, ezért nem jelenthető ki egyértelműen, hogy az új enzimek pozitív hatása a specifikus katalitikus aktivitásuknak köszönhető, vagy annak, hogy szén- és nitrogénforrásként képesek stimulálni a természetes mikrobiális aktivitást.

További kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy az enzimek hozzáadása egy szervesen oxidáló molekulával kombinálva növeli-e a PAH-degradációra gyakorolt kedvező hatást (42.A. ábra és 42.B. ábra). Ennek érdekében kalcium-peroxidot ( $\text{CaO}_2$ ) alkalmaztunk, mivel ez a vegyület stabilitás és költségek tekintetében kedvezőbb más oxidálószerkezhöz képest.



**42. ábra:** PAH-vegyületek koncentrációja (A rész) és mikrobiológiai aktivitás (B rész) a  $\text{CaO}_2$ -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.

Egyes tanulmányok szerint (Khodaveisi és mtsai., 2011; Małachowska-Jutysz és Niesler, 2015) a  $\text{CaO}_2$  rendkívül hatékony kőolajszármazékok és PAH szennyezőanyagok talajból történő eltávolítására, mikrokozmosz-kísérleteink azonban ezt nem erősítették meg. A  $\text{CaO}_2$  hozzáadása által a PAH vegyületek koncentrációja nem csökkent a kiindulási koncentrációhoz képest (42.A. ábra) melynek oka valószínűsíthetően az, hogy a  $\text{CaO}_2$  elpusztította a talaj természetes mikroflóráját, mivel a – kontroll talajnál is tapasztalt – metabolikus aktivitás a  $\text{CaO}_2$  hozzáadására teljesen megszűnt (42.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 (42.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 erősen arra utal, hogy az alkalmazott enzimek hatékonyan képesek degradálni a PAH szennyezőanyagokat mikrobiális aktivitás hiányában is.

Ezzel összhangban Wang és munkatársai (2014a) hasonló eredményről számoltak be, amely szerint peroxidos kezelés által sterilizált környezetben is hatékonyabb volt a pirén eltávolítása, mivel megszűnt az őshonos mikrobákkal való versengés.

Eredményeink alapján a kezeletlen talajban lévő mikroflóra megfelelően alkalmazkodott a környezethez és az őshonos mikrobák által végzett biodegradációnak tulajdonítható a PAH szennyezőanyagok koncentrációjának csökkenése. Ugyanakkor eredményeink szerint a szennyezőanyag eltávolítási hatékonyság csökkent az aromás gyűrűk számának növekedésével. 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 a naftalin esetén az enzimes 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  $\text{CaO}_2$  együttes alkalmazásával 41–53%-ra csökkent.

Ezzel ellentétben antracén esetén a  $\text{CaO}_2$  pozitív hatással volt, mivel az enzimekkel elért 44–46%-os eltávolítási hatékonyság a kombinált kezelés során 57–70%-ra növekedett. A  $\text{CaO}_2$  legkedvezőbb hatását a pirén eltávolításánál tapasztaltuk, ahol a degradáció hatékonysága 56–65% volt az enzimek és a  $\text{CaO}_2$  együttes alkalmazásával, míg az enzimek önmagukban csupán 12–17%-os eltávolítást értek el ennél a szennyezőanyagnál.

Mivel a degradáció mértéke általában negatív korrelációt mutatott a szennyezőanyagok aromás gyűrűinek számával, így az eltávolítási hatékonyság naftalin esetén volt a legnagyobb, míg pirén esetén a legkisebb  $\text{CaO}_2$  alkalmazása nélkül. Ez a tapasztalat összhangban van azzal, hogy a bonyolultabb, kondenzált aromás gyűrűs szerkezetek ellenállóbbak a degradációval szemben.

A  $\text{CaO}_2$  és az enzimek kombinált alkalmazása a legkedvezőbb hatást a rendkívül stabil, négy összekapcsolt aromás gyűrűt tartalmazó pirén esetén mutatta. Ezen enzimes kezelések közül az E105 (gentizát 1,2-dioxigenáz) enzim bizonyult a leghatékonyabbnak a  $\text{CaO}_2$  jelenlétében.

Néhány tanulmány kimutatta, hogy a hidrogén-peroxiddal végzett kémiai oxidáció ígéretes előkezelési módszer lehet hidrofób szennyezőanyagok eltávolítására bioremediáció előtt (Lin és mtsai., 2004; Kakosová és mtsai., 2017; Liao és mtsai., 2019a), azonban ezeket a módszereket még nem alkalmazták enzimatikus bioremediáció során. Liao és munkatársai (2019a) kimutatták, hogy a kémiai oxidáció hatékony előkezelési lehetőség, mely bioremediációval kombinálható a PAH-ok talajból történő eltávolítására. Leírásuk alapján a kálium-permanganát alkalmazása növelte a lebontási hatékonyságot más oxidálószerkezh képest (aktivált perszulfát, Fenton-reakció és módosított Fenton-reakció); ugyanakkor a permanganát csökkentette a mikrobiális diverzitást és késleltette a mikrobaközösség helyreállítását, míg a Fenton-kezelés során alkalmazott hidrogén-peroxid csak csekély hatással volt az őshonos mikrobák diverzítására.

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 tapasztalthoz képest. A  $\text{CaO}_2$  és az enzimek együttes alkalmazása kisebb mértékű eltávolítást eredményezett naftalin és fenantrén esetén a csak enzimes kezelésekh képest, miközben nagyobb hatékonyságot értünk el az együttes alkalmazásukkal az antracén és a pirén eltávolításában. A  $\text{CaO}_2$  önmagában nem bizonyult hatékonynak a szennyezőanyagok eltávolításában. Míg jelentős káros hatást gyakorolt a talajban található természetes mikrobiális aktivitásra, az

enzimatis lebonrás – 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 eszköz PAH-vegyületekkel szennyezett és remediált talajok mikrobiális közösségének aktivitásának jellemzésére, sőt szükséges kiegészítő módszer a szennyezőanyagok koncentrációjára vonatkozó analitikai eredmények, így a bioremediáció hatékonyságának tágabb értelmezéséhez.

Ezen, új enzimekkel végzett bioremediáció hatékony lehetőség lehet tápanyagban szegény, alacsony biológiai aktivitású szennyezett talajok esetén PAH-vegyületek eltávolítására.

### 6.2.2. Cink-oxid nanorészecskék bioremediációs technológiára gyakorolt hatása

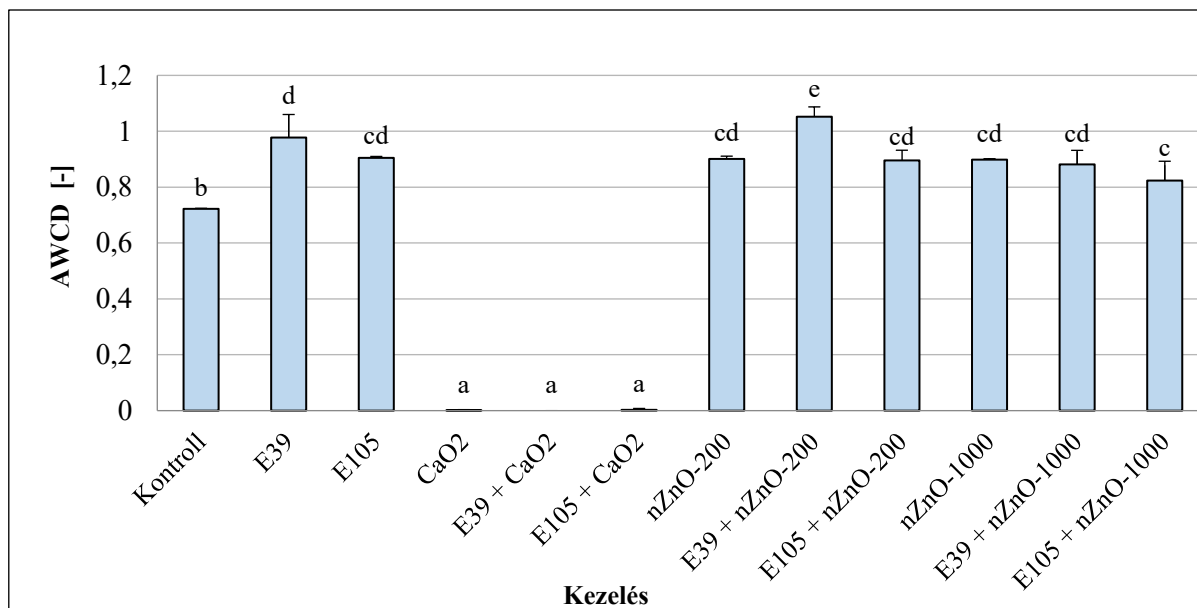
A nanorészecskék segítségével történő bioremediációs eljárások kidolgozása egyre nagyobb szerepet kap, így céltom volt, a korábban ismertetett PAH-bontásra alkalmas enzimek és nano cink-oxid segítségével történő nano-bioremediációs eljárás alapjainak felmérése. Ennek érdekében az E105 (gentizát 1,2-dioxigenáz) és E39 (kataláz-peroxidáz) enzimekkel folytattam vizsgálataimat, mert ezen enzimek esetén tapasztaltuk a legnagyobb mikrobiális aktivitást, illetve szennyezőanyag eltávolítást. Az enzimek és a nZnO együttes alkalmazásának célja a PAH-vegyületek fokozott degradációja, illetve a remediáció hatékonyságának növelése.

A mikrobiális aktivitás vizsgálatainak és a szennyezőanyagok koncentrációját meghatározó analitikai mérések eredményei az alábbiakban kerülnek bemutatásra.

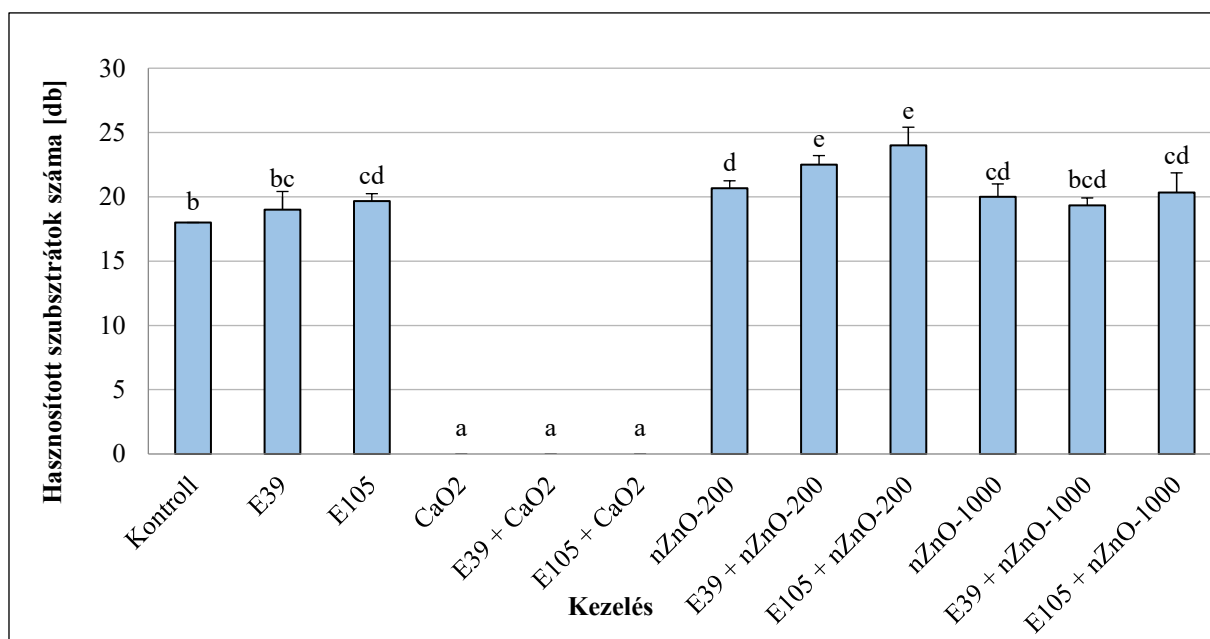
#### *6.2.2.1. Mikrobiális aktivitás a kezelések után*

A mikrobiális közösség aktivitásának és funkcionális diverzitásának vizsgálata Biolog EcoPlate™ alkalmazásával történt.

Az átlagos színfejlődési értékek alapján (43. ábra) az alkalmazott enzimek hatására szignifikáns mértékben növekedett, míg a hozzáadott CaO<sub>2</sub> hatására jelentősen csökkent (0-hoz közelire) a mikrobiális aktivitás. Az E39 enzim nagyobb mértékben növelte az aktivitást, mint az E105 enzim. Mindemellett, a nZnO kedvező hatást gyakorolt a mikroflórára, mivel minden nZnO-t alkalmazó kezelés esetén nagyobb AWCD értéket mértünk a kontrollhoz képest. Noha mind a 200 mg/kg és az 1000 mg/kg nZnO koncentráció alkalmazása növelte az aktivitást, a 200 mg/kg nZnO dózisu kezelés által nagyobb aktivitás növekedést tapasztaltunk. A legnagyobb AWCD értéket (1,05) az E39+200 mg/kg nZnO kezelés esetén mértük, mely szignifikáns mértékben nagyobb volt az E39 és a 200 mg/kg nZnO külön-külön történő alkalmazásakor mértékhez képest.



**43. ábra:** Különböző kezelések hatása az átlagos színfejlődési értékre (AWCD-re). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).



**44. ábra:** Különböző kezelések hatása a hasznosított szubsztrátok számára (SR). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

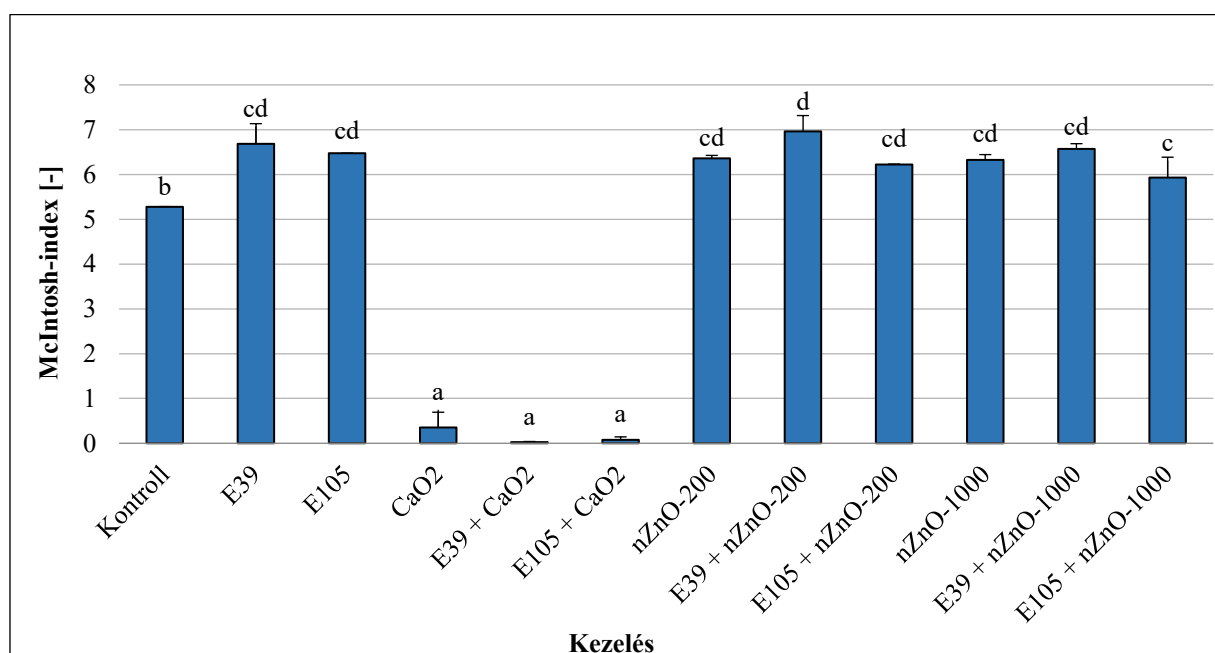
A 44. ábra alapján a hasznosított szubsztrátok száma (SR) az AWCD-hez hasonló tendenciát mutatott, ám ebben az esetben az E105 kezelés eredményezett nagyobb SR értéket az E39 enzimes kezeléshez képest.

A CaO<sub>2</sub> kezelés hatására a hasznosított szubsztrátok száma 0 volt, míg a nZnO hozzáadása növelte a szubsztrátszámot. Ennek megfelelően, a legnagyobb SR értéket (24) az E105 és a 200 mg/kg nZnO kombinált alkalmazása esetén mértük; noha ez nem volt szignifikánsan nagyobb az E39+200 mg/kg nZnO kezeléshez képest, ahol az SR értéke 22,5 volt.

Ugyanakkor mindkét említett kezeléskor tapasztalt SR érték szignifikánsan nagyobb volt a csak enzimet, illetve csak nZnO-t alkalmazó kezeléseknél mérthez képest.

A McIntosh-index értékei (U) is meghatározásra kerültek, mivel a korábbi kutatások alapján ez a végpont bizonyult a legérzékenyebbnek a nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérése során (Németh és mtsai., 2021).

A McIntosh-index értékei (45. ábra) az AWCD-hez hasonló mintázatot mutattak, így mindkét enzimes kezelés szignifikáns mértékben növelte, míg a CaO<sub>2</sub> kezelés szignifikánsan csökkentette a McIntosh-index értékeket. Mindemellett a nZnO hozzáadásával is növekedett a mikrobiális aktivitást jelző mérőszám. A legnagyobb McIntosh-index értéket (6,96) az E39+200 mg/kg nZnO kezeléskor mértük, habár ez nem volt szignifikáns mértékben nagyobb az önállóan alkalmazott E39 enzim, illetve 200 mg/kg nZnO kezeléseknél képest.



**45. ábra:** Különböző kezelések hatása a McIntosh-indexre (U).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

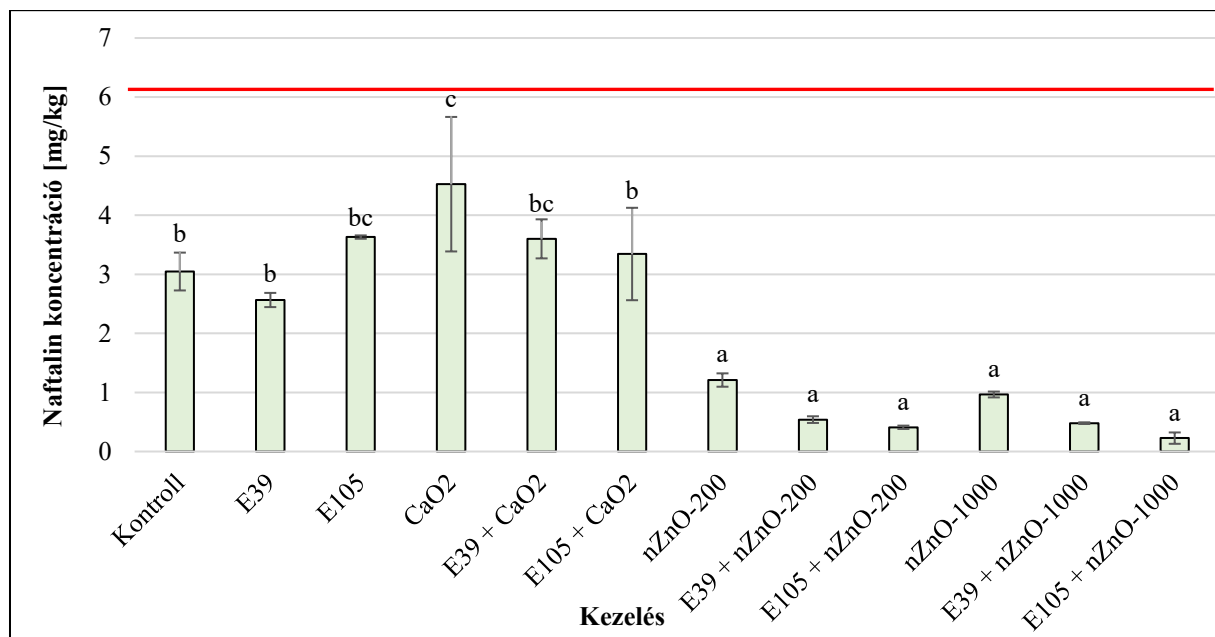
#### 6.2.2.2. Szennyezőanyag eltávolítási hatékonyság

A szennyezőanyagok koncentrációjának mérése GC-MS módszerrel történt, mely alapján a következőkben néhány PAH vegyület koncentrációjának változását mutatom be a kezelésekre hatással.

A naftalin degradációjának mértéke nem tért el szignifikáns mértékben a kontrolltól az enzimes kezelésekre hatására (46. ábra). Ugyanakkor a visszamaradt naftalin koncentráció E39 enzim alkalmazása esetén kisebb, míg E105 enzim alkalmazása esetén enyhén nagyobb volt a kontrollhoz képest, azonban ezen kezelésekre közti különbség sem volt szignifikáns mértékű. Továbbá a CaO<sub>2</sub> kezelés esetén történt a legkisebb naftalin eltávolítás, mivel itt mértük a legnagyobb visszamaradt naftalin koncentrációt (4,53 mg/kg).

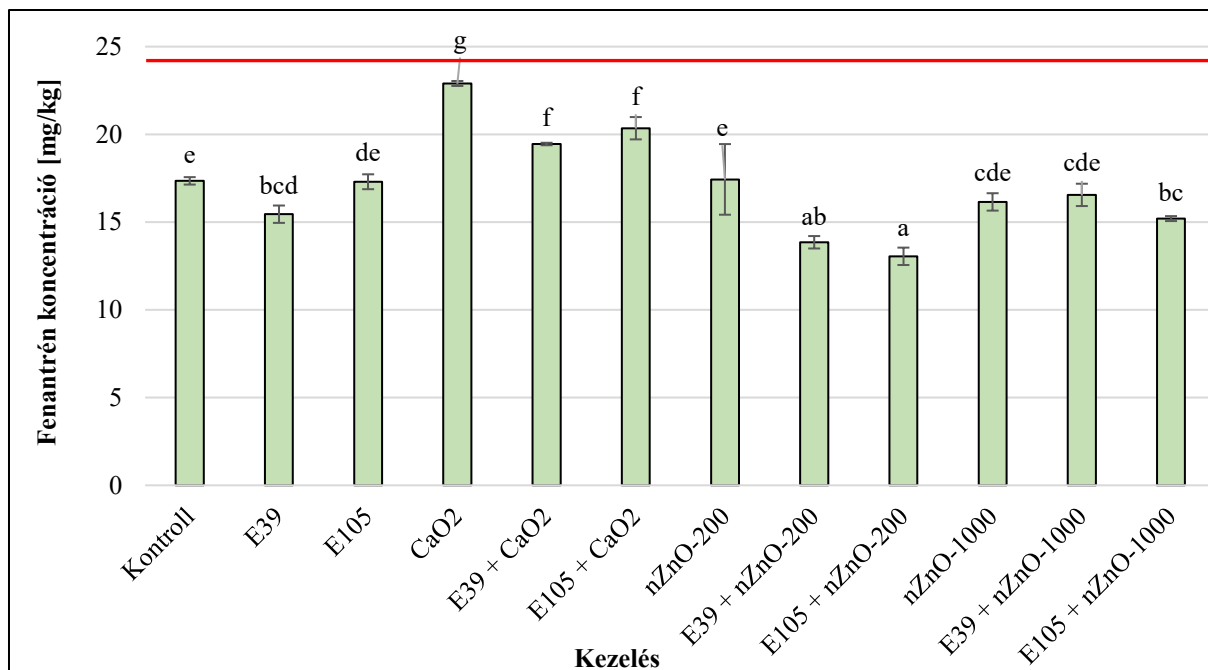
Mindemellett a nZnO használata eredményezte a legnagyobb naftalin eltávolítást, ennek megfelelően a legkisebb naftalin koncentrációt (0,23 mg/kg) –vagyis a legnagyobb eltávolítást– az E105 enzim és 1000 mg/kg nZnO együttes alkalmazása esetén mértük.

Érdeemes megemlíteni, hogy az E105 enzim és a nZnO kombinált használata kisebb naftalin koncentrációt eredményezett az E39 és nZnO együttes alkalmazásához képest mind 200, mind 1000 mg/kg nZnO koncentráció alkalmazása esetén. Ezzel ellentétben a csupán enzimes kezelések vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az E105 enzim hatására nagyobb volt a visszamaradt naftalin koncentrációja az E39 kezeléshez képest.



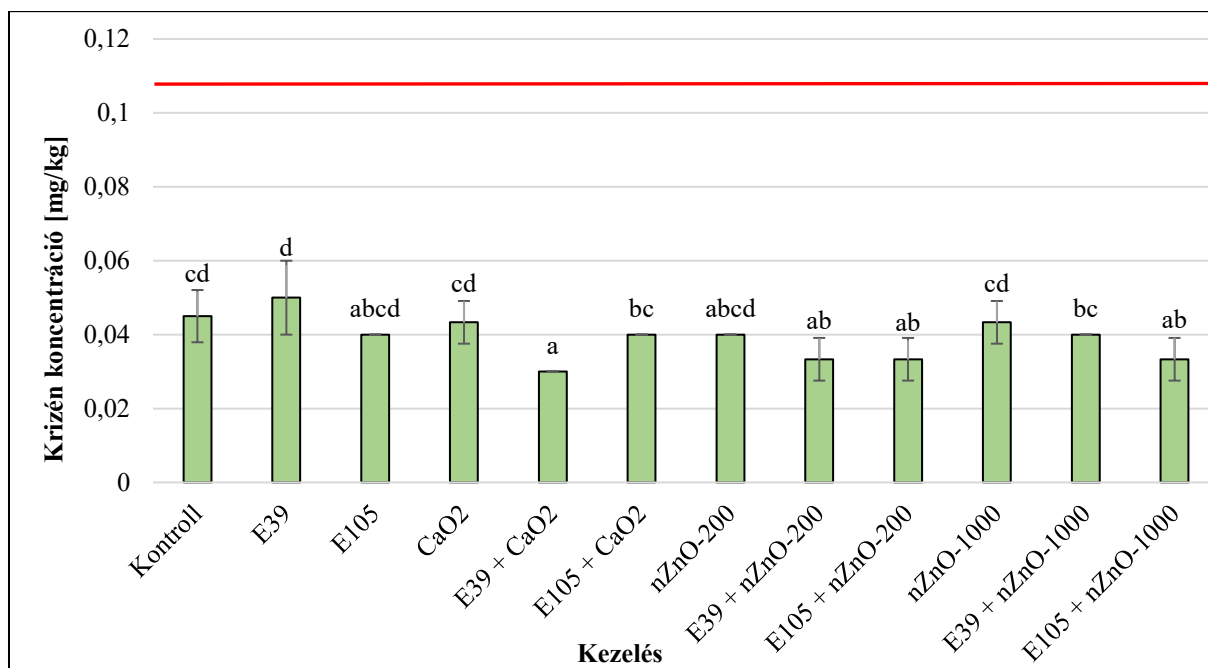
**46. ábra:** A naftalin koncentrációja a kezelések után. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ). A piros vonal a kezdeti értéket szemlélteti.

A kezelések után visszamaradt fenantrén koncentrációját szemlélteti a 47. ábra. A naftalinnál tapasztaltakhoz hasonlóan, az E105 enzim kezelés enyhén csökkentette a szennyezőanyag eltávolítás mértékét, míg az E39 enzim hatására jelentősen kisebb volt a fenantrén koncentrációja a kontrollhoz képest. A legnagyobb maradék fenantrén koncentrációt (22,9 mg/kg) CaO<sub>2</sub> kezelés esetén mértük. Habár az E105 enzim 1000 mg/kg nZnO-val kombinált alkalmazása szignifikáns mértékű fenantrén csökkenést okozott, a legkisebb fenantrén koncentrációt (13,05 mg/kg) 200 mg/kg nZnO és E105 enzim együttes használatával értük el. Ugyanakkor a nZnO önmagában nem okozott szignifikáns változást a fenantrén eltávolítását illetően, sem 200, sem 1000 mg/kg dózisban alkalmazva. Továbbá az E39+200 mg/kg nZnO kezelés nem eredményezett szignifikánsan nagyobb fenantrén koncentrációt az E105+200 mg/kg nZnO kezelésnél, míg önmagában az E105 kezelés után a fenantrén koncentrációja nagyobb volt az E39 enzimes kezelésnél mérthez képest.



47. ábra: A fenantrén koncentrációja a kezelések után. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ). A piros vonal a kezdeti értéket szemlélteti.

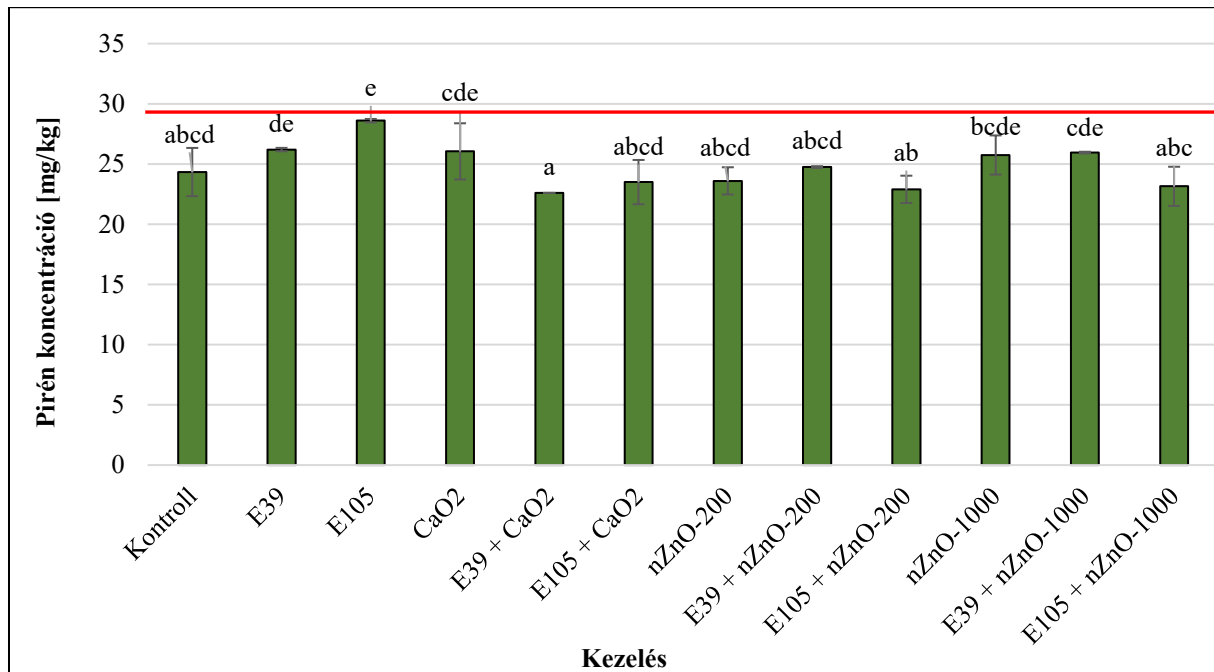
Az analitikai mérések alapján a krizén koncentrációjában szignifikáns eltérések mutatkoztak a különböző kezelések esetén (48. ábra). Az E39 enzim és a CaO<sub>2</sub> együttes alkalmazása, mely a legkisebb krizén koncentrációt (0,03 mg/kg) eredményezte, valamint az E39+200 mg/kg nZnO kezelés és az E105 enzim 200, illetve 1000 mg/kg nZnO-dal együtt használva szignifikánsan kisebb krizén koncentrációt eredményezett a kontrollhoz képest.



48. ábra: A krizén koncentrációja a kezelések után. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ). A piros vonal a kezdeti értéket szemlélteti.

A különböző kezelések után visszamaradt pirén koncentrációt szemlélteti a 49. ábra.

Ennek alapján látható, hogy az enzimes kezelések önmagukban nem vezettek ezen szennyezőanyag degradációjának serkentéséhez. Ugyanakkor a nZnO együttes alkalmazása az enzimekkel a pirén koncentrációjának nagyobb mértékű csökkenéséhez vezetett a csupán enzimes kezelésekhez képest, de a kontrollhoz képest nem szignifikáns mértékben. Az E39 enzim és a CaO<sub>2</sub> kombinált alkalmazása eredményezte a legkisebb pirén koncentrációt (22,6 mg/kg).

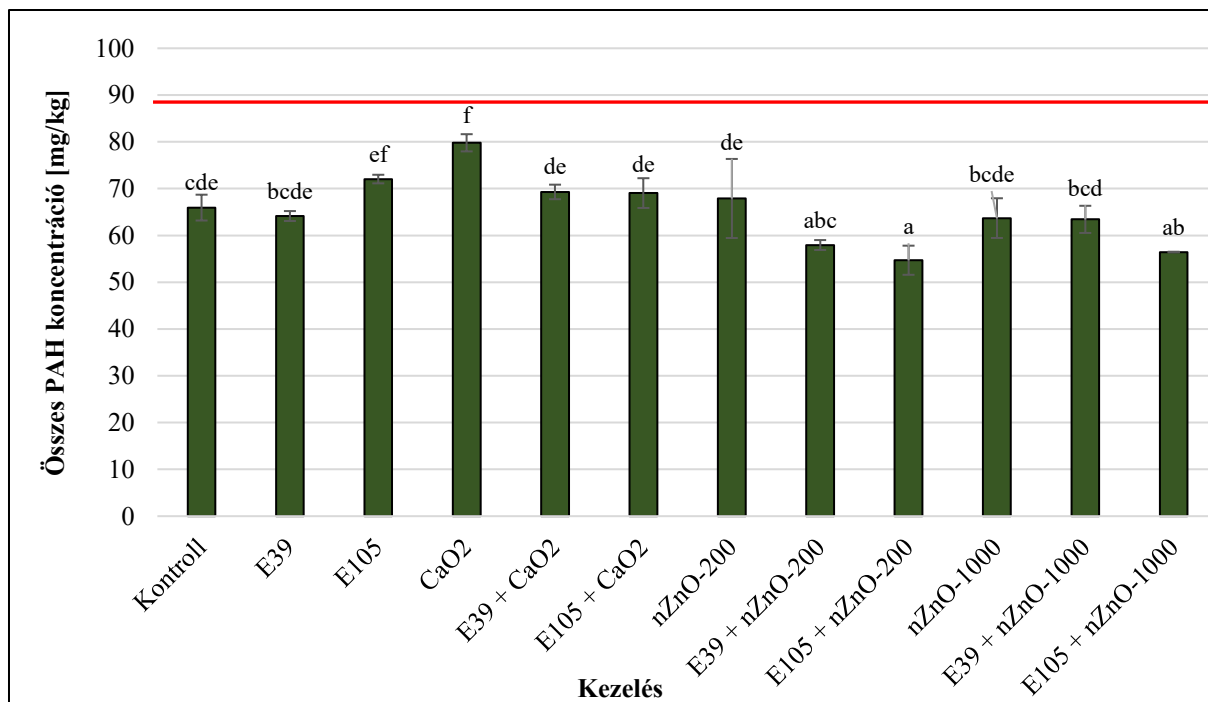


49. ábra: A pirén koncentrációja a kezelések után. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ). A piros vonal a kezdeti értéket szemlélteti.

Az összes PAH koncentráció változását az 50. ábra illusztrálja. A kutatás eredményei alapján a CaO<sub>2</sub> gátolta a PAH-vegyületek eltávolítását, amit a kontrollhoz képest megemelkedett visszamaradó szennyezőanyag-koncentráció igazol azon kezelések esetén, melyeknél a CaO<sub>2</sub>-t alkalmaztuk. Ennek megfelelően a legnagyobb PAH koncentrációt (79,8 mg/kg) – tehát a legkisebb eltávolítást – a CaO<sub>2</sub> önmagában történt alkalmazása után mértük.

Habár az E39 enzimes kezelés (további adalék nélkül) kismértékben fokozta a PAH eltávolítást, az E105 enzimes kezelés nem eredményezett hatékonyság növekedést, és egyik kezelés sem okozott szignifikáns eltérést.

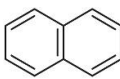
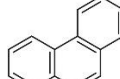
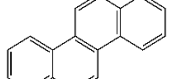
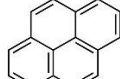
A nZnO 1000 mg/kg koncentrációban történő alkalmazása serkentette a PAH szennyezőanyagok eltávolítását, azonban a hatás csak az E105 enzimmel történő együttes alkalmazás esetén volt szignifikáns mértékű. Továbbá 200 mg/kg nZnO kezelés önmagában a kontrollhoz képesti nagyobb PAH koncentrációt eredményezett, azonban enzimekkel kombinált alkalmazása esetén kisebb szennyezőanyag koncentrációt mértünk. Ugyanakkor, az 1000 mg/kg nZnO kezelésekhez hasonlóan, csak az E105 enzimmel együttes alkalmazása okozott szignifikáns eltérést. Mindemellett a legnagyobb szennyezőanyag csökkenés általi legkisebb PAH koncentrációt (54,7 mg/kg) is ennél a kezelésnél (E105+200 mg/kg nZnO) mértük.



50. ábra: Az összes PAH koncentrációja a kezelések után. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ). A piros vonal a kezdeti értéket szemlélteti.

A különböző szennyezőanyagok kiindulási koncentrációjához képesti eltávolítási hatékonyságot számítottunk, ezen eredményeket a 9. táblázat szemlélteti.

9. 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)				Összes PAH
	Naftalin	Fenantrén	Krizén	Pirén	
					
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

A 9. táblázatban bemutatott legkisebb és legnagyobb szennyezőanyag eltávolítási hatékonyság értékek összhangban állnak a korábbiakban bemutatott szennyezőanyag koncentrációk eredményeivel.

Eredményeink alapján a  $\text{CaO}_2$  - a kontrollal összehasonlítva – jelentős mértékben gátolta a szennyezőanyagok degradációját, ami jelzi a mikrobiális aktivitásra gyakorolt gátló hatását.

Bár néhány esetben a vizsgált enzimek önmagukban történő alkalmazása szintén kis eltávolítási hatékonyságot eredményezett a kontrollhoz képest (E39 enzim a krizén és E105 enzim a pirén esetén), ugyanakkor a  $\text{CaO}_2$  és az enzimek kombinált alkalmazása serkentette a degradációt ezen szennyezőanyagoknál.

A  $\text{nZnO}$  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 pirénél E39 enzimmel kombinált kezelés esetén. Mindemellett a  $\text{nZnO}$  és az E105 enzim együttes alkalmazása minden kezelés esetén növelte az eltávolítás hatékonyságát. Továbbá 1000 mg/kg  $\text{nZnO}$  alkalmazása fokozta az E105 enzim eltávolítási hatékonyságát az E39 enzimhez képest minden szennyezőanyag esetén. Hasonlóképpen, 200 mg/kg  $\text{nZnO}$  E105 enzimmel történő kombinált alkalmazása nagyobb eltávolítási hatékonyságot eredményezett (kivéve krizén esetén) az E39 enzimmel együttes használatához képest.

Ugyan a  $\text{nZnO}$  és az enzimek kombinált alkalmazása a PAH szennyezők hatékony lebontását eredményezi, és az E105 enzim 1000 mg/kg  $\text{nZnO}$ -dal történő együttes alkalmazása nagyobb naftalin eltávolítási hatékonyságot eredményezett, mint 200 mg/kg  $\text{nZnO}$ -dal való kombinált használata során, eredményeink alapján a legnagyobb eltávolítási hatékonyságot az E105 enzim és 200 mg/kg  $\text{nZnO}$  szimultán alkalmazásával érhetjük el.

#### *6.2.2.3. A biológiai aktivitás és a szennyezőanyag-eltávolítás hatékonyságának átfogó értékelése*

A bioremediációs technológia tervezése és fejlesztése egy összetett folyamat, amelyhez számos biotikus és abiotikus tényező figyelembevétele szükséges. Ezen tényezők különböző adalékanyagok, például peroxidok, nanorészecskék és bio-felületaktív anyagok hozzáadásával történő módosítása jelentős hatással van a szennyezőanyag lebontás hatékonyságára (Nagy és mtsai., 2024).

A kalcium-peroxidot gyakran alkalmazzák bioremediációs technikáknál, mivel oxigént biztosít a mikrobák számára, így stimulálva őket. Az oxigénfelszabadulás végterméke az  $\bullet\text{OH}$ , amely roncsolja a szennyezőanyagok aromás szerkezetét (Mosmeri és mtsai., 2019; Jandoo és mtsai., 2022). A  $\text{CaO}_2$  rosszul oldódik, ezért hosszabb ideig és több oxigént képes felszabadítani más adalékanyagokhoz képest, mint például a magnézium-peroxid vagy a hidrogén-peroxid. Ezenkívül a  $\text{CaO}_2$  használata a talaj pH értékének emelkedését eredményezheti (Jandoo és mtsai., 2022). A környezeti tényezők és a talaj jellemzőinek optimalizálása fokozhatja a biodegradáció hatékonyságát (Wang és mtsai., 2021a; Tang és mtsai., 2022; Nagy és mtsai., 2024).

Tapasztalataink alapján azonban 10 mmol  $\text{CaO}_2$  a mikrobiális aktivitást nagymértékben csökkentette, ami a szennyezőanyagok lebomlásának gátlását eredményezte. Az inkubációs idő letelte után a legnagyobb visszamaradt naftalin-, fenantrén- és teljes PAH-koncentrációt a  $\text{CaO}_2$  kezelés esetén figyeltük meg. Ezek az eredmények összhangban vannak Nagy és munkatársai (2024) megállapításaival, akik leírták, hogy 20 mmol  $\text{CaO}_2$  talajhoz való hozzáadása teljesen megszüntette a mikrobiális aktivitást, az eredeti mikroflóra elpusztítása miatt.

Az enzimek bioremediációs folyamatokban történő alkalmazása több előnnyel jár a mikrobiális sejtek használatához képest, mivel nagyobb specificitással és mobilitással rendelkeznek, és a

szennyezőanyagok nagy koncentrációja esetén is aktívak, továbbá nincs szükség alkalmazásuk esetén tápanyag-kiegészítésre.

Mindemellett biológiailag lebomlanak, ami gátolja akkumulálódásukat és így nem válnak perzisztens szennyezőanyagokká (Gianfreda és Rao, 2004; Rao és mtsai., 2010; Kensa, 2011; Eibes és mtsai., 2015; Saravanan és mtsai., 2021). Ugyanakkor alkalmazásuk szempontjából hátrányt jelent, hogy a szabad enzimek életideje korlátozott, és nagymértékben függ a környezeti tényezőktől. A talajban élő mikroorganizmusoknak tápanyagforrást is jelenthetnek. Továbbá általában nem képesek a szennyezőanyagok teljes lebontására, bár általában az első átalakítási lépés korlátozza a szennyezőanyagok további degradációját (Vásquez-Murrieta és mtsai., 2016; Nagy és mtsai., 2024). Ezeket a hátráltató tényezőket azonban kiküszöbölhetjük az enzimek immobilizálásával és/vagy génmódosítással, ami a rekombináns enzimek nagyobb stabilitásához és aktivitásához vezet, így lehetővé válik a szennyezett területek környezetbarát, költséghatékony remediációs technikával történő kezelése (Sharma és mtsai., 2018; Bhandari és mtsai., 2021; Saravanan és mtsai., 2021).

Vizsgálataink megerősítették, hogy a Nagy és munkatársai (2024) által is alkalmazott enzimek (E39 és E105) fokozzák a talaj mikrobiota metabolikus aktivitását. Habár ők 65, illetve 73%-os AWCD növekedést írtak le, míg mi ezen kísérlet során csak 36, illetve 25%-os növekedést figyeltünk meg az E39 és E105 enzimek használata által. Sőt, eredményeink alapján az E39 enzim gyakorolt nagyobb hatást az AWCD értékekre az E105-höz képest. Mindemellett ezen kutatás során több végpontot vizsgáltunk, megállapítottuk, hogy az E39 nagyobb hatással volt a McIntosh-indexre is, míg az E105 a hasznosított szubsztrátok számát (SR) befolyásolta nagyobb mértékben.

Eredményeink szerint a nZnO mindkét alkalmazott dózis esetében pozitív hatást gyakorolt a mikrobiális aktivitásra, és a hatás mértéke közel azonos volt. Ugyanakkor, a nZnO hatása kisebb volt, mint az enzimeké. Eredményeink összhangban vannak más tanulmányokkal, amelyek a nano fém-oxidok mikrobiális aktivitásra gyakorolt hatását vizsgálták és elemezték, azonban ellentmondásos megállapításokat is tettek már.

Liu és munkatársai (2021) megfigyelték, hogy a CuO és a ZnO nanorészecskék serkentették a talaj mikrobiális közösségét. Ezt a baktérium- és gombafajok számának növekedése és a különböző indexek értékeinek emelkedése tükrözte. Ugyanakkor a kedvező hatás mérséklődött 250 mg/kg-nál nagyobb nanorészecske koncentráció esetén. Wu és munkatársai (2020) nem tapasztaltak nagyobb toxicitást 80 mg/L és 120 mg/L nZnO koncentráció esetén, mint 40 mg/L dózisonál, amikor egy ár-apályos vizes élőhely mikrobiális közösségének aktivitását vizsgálták Biolog EcoPlate™ segítségével. García-Gómez és munkatársai (2018) szintén Biolog EcoPlate™-et használtak két, nZnO-nak kitett mezőgazdasági talaj mikrobiális közösségi szintű fiziológiai profilozására (CLPP). Eredményeik szerint 1000 mg/kg nZnO fokozta a bakteriális növekedést savas talajban anélkül, hogy megváltoztatta volna azok metabolikus profilját, míg meszes talajban a baktériumközösség funkcionális gazdagsága jelentősen csökkent. Emellett kisebb nZnO koncentrációk (0–100 mg/kg) alkalmazása esetén stimuláló hatást figyeltek meg mindkét talajtípusban. Ezzel szemben Dinesh és munkatársai (2023) azt tapasztalták, hogy a nZnO csökkentette a talaj mikroflóra enzimaktivitását és légzését, valamint a mikrobiális biomasszát, aminek következtében az alfa-diverzitás csökkent, ahogy az alkalmazott nZnO koncentrációja nőtt 1000 mg/kg-ig. Ezek az eredmények összhangban vannak Shen és munkatársai (2015) által leírtakkal, miszerint a dehidrogenáz és a fluoreszcens diacetát-hidroláz aktivitás inhibíciója dózisfüggő volt már 1; 5 és 10 mg/kg nZnO koncentráció esetén is. Továbbá Ge és munkatársai (2011b) kimutatták, hogy mind a nTiO<sub>2</sub>, mind a nZnO csökkentette a talaj mikrobiális biomasszáját és diverzitását, valamint módosította a talaj bakteriális közösségének összetételét már 0,5 mg/kg koncentrációnál. Mindemellett a nZnO

hatása jelentősebb volt, mint a  $\text{TiO}_2$  nanorészecskéké. Strekalovskaya és munkatársai (2024) szintén a nZnO serkentő hatásáról számolt be a talaj mikrobiota aktivitására vonatkozólag kicsi, legfeljebb 250 mg/kg nZnO dózis esetén, azonban e fölötti nZnO koncentráció esetén toxikus hatások jelentkeztek.

Az enzim-alapú bioremediációs technikákat széles körben alkalmazzák, és a nanoanyagok, illetve nanorészecskék használata a szennyezőanyagok eltávolítására az utóbbi időben nagyobb szerepet kapott. Azonban a nZnO és enzimek együttes alkalmazása a PAH-ok degradációjára új megközelítés, amit a témához kapcsolódó szűkös szakirodalom is jól mutat. Tanulmányunk felhívja a figyelmet a nZnO és a PAH-bontó enzimek együttes alkalmazásának újdonságára és potenciális lehetőségére. Ennek megfelelően az enzimek és 200 mg/kg nZnO együttes használata eredményezte a legnagyobb mikrobiális aktivitást. Az E39 + nZnO-200 kezelés növelte a legnagyobb mértékben az AWCD és a McIntosh-index értékeket, míg az E105 + nZnO-200 kezelés vezetett a legnagyobb SR értékhez.

Másrészt, az enzimek és 200 mg/kg nZnO szimultán alkalmazásához képest az enzimek és 1000 mg/kg nZnO kombinált alkalmazása kevésbé volt hatékony. Egyes esetekben még a mikrobiális aktivitás is kisebb volt a csak enzimeket alkalmazó kezelések eredményeihez képest. Összességében megállapítottuk, hogy az enzimek és 200 mg/kg nZnO kombinált alkalmazása jelentősen fokozta a mikrobiális aktivitást, és az E39 enzim kedvezőbb hatást fejtett ki.

Önmagában a nZnO hozzáadása nem okozott jelentős változást a szennyezőanyagok eltávolításának hatékonyságában, kivéve naftalin esetén, ahol koncentrációfüggő növekedését figyeltünk meg a bontási hatékonyságban, ennek megfelelően a legnagyobb eltávolítási arányt az E105 és 1000 mg/kg nZnO együttes alkalmazása esetén figyeltük meg. Ugyanakkor a nZnO és az enzimek kombinált alkalmazása növelte a szennyezőanyagok eltávolítási arányát, azonban nem észleltünk koncentrációfüggő hatást a degradáció hatékonyságára vonatkozólag, sőt több esetben 200 mg/kg nZnO alkalmazása nagyobb szennyezőanyag-eltávolítást eredményezett. Továbbá a legtöbb esetben a legnagyobb bontási arányt az E105 + nZnO-200 kezelés esetén figyeltük meg, annak ellenére, hogy az E105 önálló alkalmazása kevésbé volt előnyös, mint az E39; sőt, bizonyos esetekben a kontrollhoz képest gátolta is a degradációt.

A gentizát 1,2-dioxigenáz enzimek (GDO-k) a bicupin családba tartoznak (Fetzner, 2012). A legtöbb cupin aktív helyén fémként vas szerepel, továbbá jellemző a cink-, réz-, kobalt-, mangán- vagy nikkellionok kofaktorként történő alkalmazása (Dunwell és mtsai., 2004). Huang és munkatársai (2015) leírták, hogy 0,25 mM  $\text{Zn}^{2+}$  nem befolyásolta egy halofil *Marteella* törzsből származó GDO aktivitását, míg Feng és munkatársai (1999) arról számoltak be, hogy 5 mM  $\text{Zn}^{2+}$  gátolta a *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 és a *Pseudomonas putida* NCIB 9869 törzsek által termelt GDO-kat. Ezen vizsgálatok alapján a  $\text{Zn}^{2+}$  hatása a GDO-ra nemcsak a  $\text{Zn}^{2+}$  koncentrációjától, hanem a mikrobiális forrástól és az enzim szerkezetétől is függhet.

Eredményeink alapján 200 mg/kg nZnO hozzáadásának pozitív hatása van az E105 enzimre (9. táblázat), mivel ezek együttes alkalmazása vezetett a legnagyobb fenantrén (47%) és összes PAH (39%) eltávolítási arányhoz. Továbbá ez a kezelés a leghatékonyabbak közé tartozott más szennyezőanyagok esetében is, bár a legmagasabb eltávolítási hatékonyságok és a hozzájuk tartozó kezelések a következők voltak: naftalin: 96%, az E105 + nZnO-1000 kezeléssel, krizén: 72%, az E39 +  $\text{CaO}_2$  kezeléssel, pirén: 22%, az E39 +  $\text{CaO}_2$  kezeléssel.

Bár más nanoanyagok és enzimek kombinált alkalmazásával kapcsolatban végeztek kutatásokat (Chauhan és mtsai., 2022; Chai és mtsai., 2023; Xue és mtsai., 2023), jelenlegi ismereteink

szerint nincs más tanulmány, ami a nZnO és az PAH-bontására alkalmas enzimek együttes használata által tapasztalt eredményeket írta volna le.

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.

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.

Összefoglalva, a mikrobiális aktivitás és az analitikai mérések eredményei arra utalnak, hogy az E39 és E105 enzimek, valamint 200 mg/kg nZnO együttes alkalmazása kedvező lehet a PAH-szennyezett területek bioremediációja során.

Az őshonos mikroflóra metabolikus aktivitását leginkább az E39 + nZnO-200 kezelés fokozta, míg a legnagyobb PAH lebontást az E105 + nZnO-200 kezelés eredményezte.

Ugyanakkor 1000 mg/kg nZnO alkalmazása is kedvezőbb lehet az őshonos mikroflóra által okozott természetes öntisztuláshoz (kontrollhoz) képest, azonban gyengébb lebontási arányt eredményezne, mint az enzimek és 200 mg/kg nZnO együttes használata.

Annak ellenére, hogy az enzimek a leghatékonyabb bioremediációs eszközök közé tartoznak és képesek a szerves szennyezőanyagok lebontásának elősegítésére, kutatásom eredményei is rávilágítanak az enzimek talajbioremediációban történő alkalmazásának néhány korlátjára. Bár az enzimek alkalmazása szignifikáns hatással volt a szennyezett talaj mikrobiális aktivitására, nem tudtuk egyértelműen bizonyítani, hogy az enzimek önmagukban történő alkalmazása jelentős mértékű PAH lebontást eredményezne. Ugyanakkor a peroxiddal kombinált enzimes kezelések jó hatékonyságot mutattak a kontrollhoz képest a nehezen bontható krizén és pirén esetén. Valamint az enzimek és a nZnO együttes használata hatékonyabb PAH eltávolításhoz vezetett, ami tanulmányunk egy új és fontos megállapítása.

A nZnO önálló alkalmazása a talajban hatékonynak bizonyult a könnyebben degradálható naftalin eltávolításában, feltehetőleg a megnövekedett mikrobiális aktivitás miatt. Az 1000 mg/kg koncentrációjú nZnO kezelés esetén sem figyeltünk meg negatív hatást a talaj mikroflóra metabolikus aktivitásában, azonban az enzimek bontási hatékonysága alacsonyabb volt ennél a nZnO koncentrációnál a 200 mg/kg nZnO dózishoz képest, amely jelentősen növelte a lebontási hatékonyságot.

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. Mindemellett azonban további vizsgálatok szükségesek annak érdekében, hogy átfogó képet kapjunk a nZnO környezetre, illetve több trófikus szinten lévő élőlényekre gyakorolt hatásairól, valamint a PAH szennyezőanyagok degradációját elősegítő, szűkebb nZnO koncentrációtartomány meghatározásához.

## 7. Összefoglalás

A nanorészecskék felhasználása számos területen egyre nagyobb volumenű, ezért a környezetre, illetve élővilágra gyakorolt hatásuk és potenciális környezeti kockázatok felmérése nélkülözhetetlen, ugyanakkor rendkívül komplex feladat.

Bár bizonyos nanorészecskék egy-egy tesztorganizmusra gyakorolt hatásáról már több publikáció rendelkezésre áll, ezek sok esetben eltérő eredményeket mutatnak, emellett az újonnan tervezett és előállított nanorészecskék hatásának felmérése is kihívást jelent. Kevés olyan tanulmány született, mely a nanorészecskék komplex élővilágra, mikrobiális közösségre gyakorolt hatását írja le. A jövőbeni kutatásoknak részletesebben foglalkozniuk kell a nanorészecskék hatásfelmérésével szárazföldi környezetben, tisztázniuk kell a fém- és fém-oxid alapú, valamint a különböző szén- illetve grafén alapú nanoanyagok ökotoxicitását. Emellett a jövőbeni kutatási célok között szerepel a nanoanyagok környezettoxicológiai vizsgálatának multidiszciplináris megközelítése, figyelembe véve azok változó viselkedését.

Mindezekhez kapcsolódva célom volt a cink-oxid (ZnO) és titán-dioxid (TiO<sub>2</sub>), továbbá grafén-oxid (GO) nanorészecskék környezetre gyakorolt hatásának felmérése különböző trófikus szintekről származó organizmusokkal eltérő végpontokat alkalmazva.

Kutatásaim során felmértem a nGO vízi ökoszisztémára gyakorolt hatását, melynek során több trófikus szintről származó tesztorganizmus (baktérium, protozoa, fonálféreg, növény) eltérő válaszreakciói alapján vizsgáltam két különböző típusú GO nanorészecske toxicitását. Eredményeim alapján a vizsgált tesztrendszerek közül a *Tetrahymena pyriformis* protozoa szaporodásgátlása bizonyult a legérzékenyebb tesztrendszernek, melynél már 0,004 mg/L koncentráció esetén is szignifikáns gátló hatást kaptunk. Az EC<sub>20</sub> értékek alapján a növénytesztek bizonyultak a legkevésbé érzékenyek. Biolog EcoPlate™ alkalmazásával kivitelezett vízi mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése során koncentrációfüggő mikrobiális aktivitás növekedést tapasztaltunk a vizsgált 0,8–100 mg/L koncentrációtartományban. Arra a megállapításra jutottunk a *worst-case* scenáriót alkalmazó kockázatértékelés alapján, hogy a vizsgált GO nanorészecskék nem jelentenek környezeti kockázatot.

A nano fém-oxidok hatásfelméréshez kapcsolódó kutatásomban a nano cink-oxid és a nano titán-dioxid vizsgálatával foglalkoztam. Jelenlegi ismereteink hiányosak ezen anyagok mikrobiális közösségre gyakorolt hatásáról, így célom volt felmérni, hogy miként befolyásolják édesvízből származó mikroflóra metabolikus aktivitását és funkcionális diverzitását.

Eredményeim alapján a nZnO jelentősebb gátló hatást gyakorol a mikroflórára 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. 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 a többi végpont együttes vizsgálata sokszor kiegészítő információt hordoz magában. Mindezek alapján elmondható, hogy a Biolog EcoPlate™ technika jól alkalmazható a nanorészecskék vízi mikrobaközösségekre gyakorolt hatásának felmérésére.

A nZnO és nTiO<sub>2</sub> élővilágra gyakorolt hatását egyéb területen is vizsgáltam, a bakteriális kommunikációra gyakorolt hatását mértem fel *Pseudomonas aeruginosa* baktérium különböző válaszreakciói alapján. A baktériumra gyakorolt toxikus hatás elkülönítése céljából a reaktív oxigén származék termelés mértékét is vizsgáltam. Fluoreszcencia intenzitás mérésén keresztül

vizsgáltam a virulencia faktorként is számontartott pioverdin termelés mértékét, melynek során koncentráció- és időfüggő hatást állapítottunk meg. Ugyanakkor a nanorészecske típusa jelentősen befolyásolta az okozott hatást, mivel nZnO esetén serkentő, míg nTiO<sub>2</sub> esetén gátló hatást tapasztaltunk. A koncentráció- és időfüggő hatás még jelentősebb befolyással bírt a biofilmképzés intenzitására, melyet kristályibolyás festési eljárással vizsgáltunk. Habár nTiO<sub>2</sub> esetén minden esetben gátló hatást tapasztaltunk, kisebb nTiO<sub>2</sub> koncentráció esetén nagyobb volt az inhibíció mértéke, mint nagyobb koncentráció esetén. Ezzel szemben nZnO alkalmazása során rövidebb kontaktidőnél (6 óra) minden vizsgált koncentráció esetén gátló hatást tapasztaltunk, mely hosszabb expozíciós időnél (48 óra) kisebb mértékű volt, sőt nagyobb dózis esetén serkentő hatást tapasztaltunk. Mindezek tükrében elmondható, hogy a vizsgált nanorészecskék jelentős potenciállal rendelkeznek a bakteriális kommunikáció által vezérelt folyamatok befolyásolására, melynek előnye számos területen kiaknázható, de az alkalmazási paraméterek meghatározása további kutatást igényel.

Kutatásom másik részében a nZnO alkalmazási lehetőségét térképeztem fel egy nano-bioremediációs technológia fejlesztése során. Ennek keretében policiklusos aromás szénhidrogénekkel (PAH) szennyezett talajok bioremediációjára, PAH-bontó enzimekkel együtt alkalmazva mértem fel a hatását mikrokozmosz rendszerekben. Megelőző kutatásunkban az enzimek PAH degradációjára való alkalmasságát és hatékonyságát is vizsgáltam. Kalcium-peroxidot adtam a mikrokozmosz rendszerekhez, melynek hatására a talajban lévő természetes mikroflóra aktivitása megszűnt, így lehetőségem nyílt csak az enzimek működését felmérni. Igazolást nyert, hogy az enzimek hatékonyan bontották a különböző PAH-vegyületeket önmagukban és CaO<sub>2</sub>-dal együtt alkalmazva őket egyaránt. A CaO<sub>2</sub> alkalmazása egy jó módszer lehet különböző enzimek aktivitásának kimutatására releváns környezeti körülmények között.

A mikrokozmoszokhoz 200 és 1000 mg/kg koncentrációban nZnO-t adtam és vizsgáltam a hatását. A nZnO mindkét vizsgált koncentrációban növelte a mikrobiális aktivitást és szennyezőanyag eltávolítást, enzimekkel együtt adagolva nagyobb mértékű PAH degradációt eredményezett, különösen a nagyobb molekulatömegű, nehezen degradálható vegyületek (fenantrén, pirén) esetén. A pozitív hatás mértéke azonban nem volt koncentrációval arányos, sőt, esetenként gátló hatást is eredményezett 1000 mg/kg nZnO a 200 mg/kg dózisonál tapasztalt szennyezőanyag eltávolításhoz képest. Mindezek tükrében a nZnO 200 mg/kg koncentrációban történő 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. Új tudományos eredmények

1. Grafén-oxid nanoanyagok esetén elsőként végeztem környezeti kockázatfelmérést édesvízi ökoszisztémára. A nano grafén-oxidok (nGO) környezeti kockázatfelmérése során kimutattam, hogy a *Tetrahymena pyriformis* tesztorganizmus szaporodásgátlásának vizsgálata kiemelkedően érzékeny módszer, és akár korai figyelmeztető rendszerként is alkalmazható grafén-oxid típusú szennyezőanyagok hatásfelmérésében.
  - 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.

*Kapcsolódó publikáció: 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, 2858. <https://doi.org/10.3390/nano13212858>*

2. A nano grafén-oxidok (nGO) komplex környezettoxikológiai kockázatfelmérése 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.

*Kapcsolódó publikáció: 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, 2858. <https://doi.org/10.3390/nano13212858>*

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 vizsgálataihoz nanoanyagok hatásfelmérése során. A McIntosh-index, mint érzékeny és reprezentatív diverzitásmutató meghatározása javasolt a Biolog EcoPlate™ általánosan alkalmazott végpontjainak kiegészítéseként.

*Kapcsolódó publikáció: 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, 1777. <https://doi.org/10.3390/nano11071777>*

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 CaO<sub>2</sub> 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 CaO<sub>2</sub> 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.

*Kapcsolódó publikáció: 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>*

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.

*Kapcsolódó publikáció: 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>*

## 9. Irodalomjegyzék

- Abbas Q, Yousaf B, Amina, Ali MU, Munir MAM, El-Naggar A, Rinklebe J, Naushad M (2020) Transformation pathways and fate of engineered nanoparticles (ENPs) in distinct interactive environmental compartments: A review. *Environ Int* 138:105646. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105646>
- Abdel-Shafy HI, Mansour MSM (2016) A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Pet* 25:107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Abdelraheem WHM, Nadagouda MN, Dionysiou DD (2020) Solar light-assisted remediation of domestic wastewater by NB-TiO<sub>2</sub> nanoparticles for potable reuse. *Appl Catal B Environ* 269:118807. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.118807>
- Abdolapur Monikh F, Chupani L, Arenas-Lago D, Guo Z, Zhang P, Darbha GK, Valsami-Jones E, Lynch I, Vijver MG, van Bodegom PM, Peijnenburg WJGM (2021) Particle number-based trophic transfer of gold nanomaterials in an aquatic food chain. *Nat Commun* 12:899. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21164-w>
- Abdulazeem L, AL-Amiedi BHH, Alrubaei HA, AL-Mawlah YH (2019) Titanium dioxide nanoparticles as antibacterial agents against some pathogenic bacteria. *Drug Invent Today* 12:963–967. [https://sustainability.uobabylon.edu.iq/uploaded/Sustain\\_2021\\_10758941.pdf](https://sustainability.uobabylon.edu.iq/uploaded/Sustain_2021_10758941.pdf)
- Abid N, Muhammad A, Shujait S, Chaudhary K, Ikram M, Imran M, Haider J, Khan M, Khan Q, Maqbool M (2022) Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches , influencing factors , advantages , and disadvantages : A review. *Adv Colloid Interface Sci* 300:102597. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102597>
- Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ (2006a) Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. *Water Res* 40:3527–3532. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.004>
- Adams MA, Singh VK, Keller BO, Jia Z (2006b) Structural and biochemical characterization of gentisate 1, 2-dioxygenase from *Escherichia coli* O157 : H7. *Mol Microbiol* 61:1469–1484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05334.x>
- Adams TC, Brye KR, Savin MC, Lee JA, Gbur EE (2017) Microbial carbon substrate utilization differences among high- and average-yield soybean areas. *Agric* 7:1–15. <https://doi.org/10.3390/agriculture7060048>
- Adawi HI, Newbold MA, Reed JM, Vance ME, Feitshans IL, Bickford LR, Lewinski NA (2018) NanoImpact Nano-enabled personal care products: Current developments in consumer safety. *NanoImpact* 11:170–179. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.08.002>
- Adesina OA, Olowolafe TI, Igbafe A (2022) Levels of polycyclic aromatic hydrocarbon from mainstream smoke of tobacco products and its risks assessment. *J Hazard Mater Adv* 5:100053. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100053>
- Afrayem S, Chaurasia A (2017) Effect of zinc oxide nanoparticles on seed germination and seed vigour in chilli (*Capsicum annum* L.). *J Pharmacogn Phytochem* 6:1564–1566. <https://www.phytojournal.com/archives/2017.v6.i5.1874/effect-of-zinc-oxide-nanoparticles-on-seed-germination-and-seed-vigour-in-chilli-capsicum-annuum-l>

- Afzal S, Singh NK (2022) Effect of zinc and iron oxide nanoparticles on plant physiology, seed quality and microbial community structure in a rice-soil-microbial ecosystem. *Environ Pollut* 314:120224. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120224>
- Ahmad M, Razi S (2015) Enzyme Immobilization: An overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochem Anal Biochem* 04. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000178>
- Ahmad R, Mohsin M, Ahmad T, Sardar M (2015) Alpha amylase assisted synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Structural characterization and application as antibacterial agents. *J Hazard Mater* 283:171–177. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.073>
- Ahmed F, Rodrigues DF (2013) Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: A case study. *J Hazard Mater* 256–257:33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.064>
- Ahmed FY, Aly UF, Abd El-Baky RM, Waly NGFM (2021) Effect of titanium dioxide nanoparticles on the expression of efflux pump and quorum-sensing genes in *mdr Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antibiotics* 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060625>
- Akhavan O, Ghaderi E (2010) Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano* 4:5731–5736. <https://doi.org/10.1021/nn101390x>
- Akhavan O, Ghaderi E, Akhavan A (2012) Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials* 33:8017–8025. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.040>
- Al-Azzazy MM, Ghani SBA, Alhewairini SS (2024) Acaricidal activity of zinc oxide nanoparticles against mites associated with date palm trees. *Pakistan J Agric Sci* 61:1. 351–357. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/24.144>
- Al-Momani H, Al Balawi D, Hamed S, Albiss BA, Almasri M, AlGhawrie H, Ibrahim L, Al Balawi H, Al Haj Mahmoud S, Pearson J, Ward C (2023) The impact of biosynthesized ZnO nanoparticles from *Olea europaea* (Common Olive) on *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation. *Sci Rep* 13:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32366-1>
- Al-Shabib NA, Husain FM, Ahmed F, Khan RA, Ahmad I, Alsharaeh E, Khan MS, Hussain A, Rehman MT, Yusuf M, Hassan I, Khan JM, Ashraf GM, Alsalmeh AM, Al-Ajmi MF, Tarasov V V., Aliev G (2016) Biogenic synthesis of zinc oxide nanostructures from *Nigella sativa* seed: Prospective role as food packaging material inhibiting broad-spectrum quorum sensing and biofilm. *Sci Rep* 6:1–15. <https://doi.org/10.1038/srep36761>
- Al-Tamimi SA (2021) Biogenic green synthesis of metal oxide nanoparticles using oat biomass for ultrasensitive modified polymeric sensors. *Green Chem Lett Rev* 14:166–179. <https://doi.org/10.1080/17518253.2021.1895326>
- Alazaiza MYD, Albahnasawi A, Ali GAM, Bashir MJK, Coptly NK, Amr SSA, Abushammala MFM, Al Maskari T (2021) Recent advances of nanoremediation technologies for soil and groundwater remediation: A review. *Water* 13:16. 2186. <https://doi.org/10.3390/w13162186>
- Alhammad BA, Ahmad A, Seleiman MF, Tola E (2023) Seed priming with nanoparticles and 24-Epibrassinolide improved seed germination and enzymatic performance of *Zea mays*

- L. in salt-stressed soil. *Plants* 12:4. 690. <https://doi.org/10.3390/plants12040690>
- Ali S, Mehmood A, Khan N (2021) Uptake, translocation, and consequences of nanomaterials on plant growth and stress adaptation. *J Nanomater* 2021:6677616. <https://doi.org/10.1155/2021/6677616>
- Ali SG, Ansari MA, Alzohairy MA, Alomary MN, Jalal M, Alyahya S, Asiri SMM, Khan HM (2020) Effect of biosynthesized zno nanoparticles on multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* 9:1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050260>
- Alvaro M, Carbonell E, Ferrer B, Llabrés I Xamena FX, Garcia H (2007) Semiconductor behavior of a metal-organic framework (MOF). *Chem - A Eur J* 13:5106–5112. <https://doi.org/10.1002/chem.200601003>
- Alves ML, Filho LCI de O, Nogueira P, Ogliari AJ, Fiori MA, Baretta D, Baretta CRDM (2019) Influence of ZnO nanoparticles and non-nano ZnO on survival and reproduction of earthworm and springtail in tropical natural soil. *Rev Bras Cienc do Solo* 43:1–16. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20180133>
- Ansari F, Momina, Ahmad A, Rafatullah M (2023) Review on bioremediation technologies of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil: Mechanisms and future perspective. *Int Biodeterior Biodegrad* 179:105582. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2023.105582>
- Anupama R, Sajitha Lulu S, Mukherjee A, Babu S (2018) Cross-regulatory network in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm genes and TiO<sub>2</sub> anatase induced molecular perturbations in key proteins unraveled by a systems biology approach. *Gene* 647:289–296. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.042>
- Araújo R, Castro ACM, Fiúza A (2015) The use of nanoparticles in soil and water remediation processes. *Mater Today Proc* 2:315–320. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.04.055>
- Arey J, Atkinson R (2003) Photochemical reactions of PAHs in the atmosphere. In: Douben PET (eds) PAHs An Ecotoxicological Perspect 47–63. <https://doi.org/10.1002/0470867132.ch4>
- Aruoja V, Dubourguier H-C, Kasemets K, Kahru A (2009) Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ* 407:1461–1468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>
- Ates M, Demir V, Adiguzel R, Arslan Z (2013) Bioaccumulation, subacute toxicity, and tissue distribution of engineered titanium dioxide nanoparticles in goldfish (*Carassius auratus*). *J Nanomater* 1. 1687-4110. <https://doi.org/10.1155/2013/460518>
- Awasthi A, Bansal S, Jangir LK, Awasthi G, Awasthi KK, Awasthi K (2017) Effect of ZnO nanoparticles on germination of *Triticum aestivum* seeds. *Macromol Symp* 376:1700043. <https://doi.org/10.1002/masy.201700043>
- Awulu Emmanuel A (2023) Mutagenicity of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Cell Biol Genet* 7:1–8. <https://doi.org/10.5897/jcbg2023.0053>
- Azim SAA, Darwish HA, Rizk MZ, Ali SA, Kadry MO (2015) Amelioration of titanium dioxide nanoparticles-induced liver injury in mice: Possible role of some antioxidants. *Exp Toxicol Pathol* 67:305–314. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2015.02.001>

- Bala R, Kalia A, Dhaliwal SS (2019) Evaluation of efficacy of ZnO nanoparticles as remedial zinc nanofertilizer for rice. *J Soil Sci Plant Nutr* 19:379–389. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00040-z>
- Bala S, Garg D, Thirumalesh BV, Sharma M, Sridhar K, Inbaraj BS, Tripathi M (2022) Recent strategies for bioremediation of emerging pollutants: A review for a green and sustainable environment. *Toxics* 10. <https://doi.org/10.3390/toxics10080484>
- Bangeppagari M, Park SH, Kundapur RR, Lee SJ (2019) Graphene oxide induces cardiovascular defects in developing zebrafish (*Danio rerio*) embryo model: *In-vivo* toxicity assessment. *Sci Total Environ* 673:810–820. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.082>
- Barhoum A, Jeevanandam J, Hussien EA, Mekkawy SA, Mostafa M, Omran MM, Abdalla MS, Bechelany M (2022) Review on natural, incidental, bioinspired, and engineered nanomaterials: history, definitions, classifications, synthesis, properties, market, toxicities, risks, and regulations. *Nanomaterials* 12:2. 177. <https://doi.org/10.3390/nano12020177>
- Barnes RJ, Molina R, Xu J, Dobson PJ, Thompson IP (2013) Comparison of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles for photocatalytic degradation of methylene blue and the correlated inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Nanoparticle Res* 15. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1432-9>
- Barnes RJ, van der Gast CJ, Riba O, Lehtovirta LE, Prosser JI, Dobson PJ, Thompson IP (2010) The impact of zero-valent iron nanoparticles on a river water bacterial community. *J Hazard Mater* 184:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.006>
- Baskaran D, Byun H-S (2024) Current trend of polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation: Mechanism, artificial mixed microbial strategy, machine learning, ground application, cost and policy implications. *Chem Eng J* 498:155334. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.155334>
- Battin TJ, Kammer F V.D., Weilhartner A, Ottofuelling S, Hofmann T (2009) Nanostructured TiO<sub>2</sub>: Transport behavior and effects on aquatic microbial communities under environmental conditions. *Environ Sci Technol* 43:8098–8104. <https://doi.org/10.1021/es9017046>
- Bayat H, Kolahchi Z, Valaey S, Rastgou M, Mahdavi S (2018) Novel impacts of nanoparticles on soil properties: tensile strength of aggregates and compression characteristics of soil. *Arch Agron Soil Sci* 64:776–789. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1393527>
- Beech IB (2004) Corrosion of technical materials in the presence of biofilms - Current understanding and state-of-the art methods of study. *Int Biodeterior Biodegrad* 53:177–183. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00092-1)
- Begum P, Ikhtiari R, Fugetsu B (2011) Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. *Carbon N Y* 49:3907–3919. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.05.029>
- Behra R, Krug H (2008) Nanoparticles at large. *Nat Nanotechnol* 3:253–254. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.113>
- Belkacem I, Helali A, Khardi S, Chrouda A, Slimi K (2022) Road traffic nanoparticle characteristics: Sustainable environment and mobility. *Geosci Front* 13:101196. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2021.101196>

- Berkl Z, Fekete-Kertész I, Buda K, Vaszita E, Fenyvesi É, Szente L, Molnár M (2022) Effect of cyclodextrins on the biofilm formation capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Molecules* 27:11. 3603. <https://doi.org/10.3390/molecules27113603>
- Bernhardt ES, Colman BP, Hochella MFJ, Cardinale BJ, Nisbet RM, Richardson CJ, Yin L (2010) An ecological perspective on nanomaterial impacts in the environment. *J Environ Qual* 39:1954–1965. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0479>
- Bertóti I, Farah S, Bulátkó A, Farkas A, Madarász J, Mohai M, Sáfrán G, László K (2022) Nitrogen implantation into graphene oxide and reduced graphene oxides using radio frequency plasma treatment in microscale. *Carbon N Y* 199:415–423. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.08.024>
- Bhandari S, Poudel DK, Marahatha R, Dawadi S, Khadayat K, Phuyal S, Shrestha S, Gaire S, Basnet K, Khadka U, Parajuli N (2021) Microbial enzymes used in bioremediation. *J Chem* 8849512. 17. <https://doi.org/10.1155/2021/8849512>
- Bhattacharjya S, Adhikari T, Sahu A, Patra AK (2021) Ecotoxicological effect of TiO<sub>2</sub> nano particles on different soil enzymes and microbial community. *Ecotoxicology* 30:719–732. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02398-2>
- Bianco A, Del Rio A, Varchi G, Parenti MD, Palermo V (2022) Assessment of the potential impact of graphene, graphene oxide and other 2D materials on health, and the environment – June 2022. European Chemicals Agency. [https://innovamol.com/wp-content/uploads/2023/11/echa\\_2021\\_286\\_graphene\\_study.pdf](https://innovamol.com/wp-content/uploads/2023/11/echa_2021_286_graphene_study.pdf)
- Bidwai S (2025) Nanomaterials market size, share, and trends 2025 to 2034. In: Preced. Res. <https://www.precedenceresearch.com/nanomaterials-market>
- Birhanli A, Emre FB, Sayilkan F, Güngördü A (2014) Effect of nanosized TiO<sub>2</sub> particles on the development of *Xenopus laevis* embryos. *Turkish J Biol* 38:283–288. <https://doi.org/10.3906/biy-1307-37>
- Biswal T (2023) Nanobioremediation and its application for sustainable environment. In: Newman L, Ansari AA, Gill SS, Naeem M, Gill R (eds). *Phytoremediation: management of environmental contaminants*. Springer International Publishing, Cham, pp 463–485. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-17988-4\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-031-17988-4_22)
- Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A (2013) Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: a critical review. *Arch Toxicol* 87:1181–1200. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>
- Boonyanitipong P, Kositsup B, Kumar P, Baruah S, Dutta J (2011) Effects of zinc oxide nanoparticles on roots of rice *Oryza sativa* L. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinform.* 1:4. 282–285. <https://doi.org/10.7763/IJBBB.2011.V1.53>
- Boran H, Boyle D, Altinok I, Patsiou D, Henry TB (2016) Aqueous Hg<sup>2+</sup> associates with TiO<sub>2</sub> nanoparticles according to particle size, changes particle agglomeration, and becomes less bioavailable to zebrafish. *Aquat Toxicol* 174:242–246. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.017>

- Bordin ER, Ramsdorf WA, Lotti Domingos LM, de Souza Miranda LP, Mattoso Filho NP, Cestari MM (2024) Ecotoxicological effects of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on aquatic organisms: Current research and emerging trends. *J Environ Manage* 349:119396. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119396>
- Boros BV, Ostafe V (2020) Evaluation of ecotoxicology assessment methods of nanomaterials and their effects. *Nanomaterials* 10:4. 610. <https://doi.org/10.3390/nano10040610>
- Bradford SA, Shen C, Kim H, Letcher RJ, Rinklebe J, Ok YS, Ma L (2021) Environmental applications and risks of nanomaterials: An introduction to CREST publications during 2018–2021. *Crit Rev Environ Sci Technol* 52:3753–3762. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.2020425>
- Braylé P, Pinelli E, Gauthier L, Mouchet F, Barret M (2022) Graphene-based nanomaterials and microbial communities: a review of their interactions, from ecotoxicology to bioprocess engineering perspectives. *Environ Sci Nano* 3725–3741. <https://doi.org/10.1039/d2en00547f>
- Buffle J (2006) The key role of environmental colloids/nanoparticles for the sustainability of life. *Environ Chem* 3:155–158 [https://doi.org/10.1071/ENv3n3\\_ES](https://doi.org/10.1071/ENv3n3_ES)
- Bundschuh M, Filser J, Lüderwald S, McKee MS, Metreveli G, Schaumann GE, Schulz R, Wagner S (2018) Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environ Sci Eur* 30:6. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>
- Burke DJ, Zhu S, Publico-Lansigan MP, Hewins CR, Samia ACS (2014) Titanium oxide nanoparticle effects on composition of soil microbial communities and plant performance. *Biol Fertil Soils* 50:1169–1173. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0938-3>
- Burman U, Saini M, Kumar P- (2013) Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicol Environ Chem* 95:605–612. <https://doi.org/10.1080/02772248.2013.803796>
- Cañas JE, Qi B, Li S, Maul JD, Cox SB, Das S, Green MJ (2011) Acute and reproductive toxicity of nano-sized metal oxides (ZnO and TiO<sub>2</sub>) to earthworms (*Eisenia fetida*). *J Environ Monit* 13:3351–3357. <https://doi.org/10.1039/C1EM10497G>
- Cao S, Rathi P, Wu X, Ghim D, Jun Y-S, Singamaneni S (2021) Cellulose nanomaterials in interfacial evaporators for desalination: A “natural” choice. *Adv Mater* 33:2000922. <https://doi.org/10.1002/adma.202000922>
- Carmona ER, Escobar B, Vales G, Marcos R (2015) Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the comet assay in *Drosophila*. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 778:12–21. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.12.004>
- Casals E, Barrena R, García A, González E, Delgado L, Busquets-Fité M, Font X, Arbiol J, Glatzel P, Kvashnina K, Sánchez A, Puentes V (2014) Programmed iron oxide nanoparticles disintegration in anaerobic digesters boosts biogas production. *Small* 10:2801–2808. <https://doi.org/10.1002/sml.201303703>
- Casas-Beltran DA, Hernández-Pedraza M, Alvarado-Flores J (2020) Estimation of the discharge of sunscreens in aquatic environments of the Mexican Caribbean. *Environ* 7:1–11. <https://doi.org/10.3390/environments7020015>

- Cecchin I, Reddy KR, Thomé A, Tessaro EF, Schnaid F (2017) Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils. *Int Biodeterior Biodegrad* 119:419–428. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.027>
- Chai C, Ji Y, Wang N, Ge W, Wu J, Wang YQ, Li Y (2023) Immobilized lignin peroxidase on chitosan-modified halloysite nanotubes for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Int J Environ Sci Technol* 20:10877–10886. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04800-4>
- Chai H, Yao J, Sun J, Zhang C, Liu W, Zhu M, Ceccanti B (2015) The effect of metal oxide nanoparticles on functional bacteria and metabolic profiles in agricultural soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 94:490–495. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1485-9>
- Chanda S, Donga S, Pande J (2020) A review of antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and photocatalytic properties. In: Galvan C (ed) *Zinc Oxide: Production, Properties and Applications*. Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, USA, pp 1–45
- Chaudhary P, Ahamad L, Chaudhary A, Kumar G, Chen WJ, Chen S (2023) Nanoparticle-mediated bioremediation as a powerful weapon in the removal of environmental pollutants. *J Environ Chem Eng* 11:109591. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109591>
- Chauhan HA, Rafatullah M, Ali KA, Umar MF, Khan MA, Jeon BH (2022) Photocatalytic activity of graphene oxide/zinc oxide nanocomposite derived from rice husk for the degradation of phenanthrene under ultraviolet-visible light. *J Water Process Eng* 47:102714. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102714>
- Chauhan P, Imam A, Kanaujia PK, Suman SK (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>
- Chavan S, Nadanathangam V (2020) Shifts in metabolic patterns of soil bacterial communities on exposure to metal engineered nanomaterials. *Ecotoxicol Environ Saf* 189:110012. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110012>
- Chavan S, Nadanathangam V (2019) Effects of nanoparticles on plant growth-promoting bacteria in Indian agricultural soil. *Agronomy* 9:3. 140. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030140>
- Chen B, Pan Y, Chen Y, Zhang Z, Yang Z, Zheng M, Lu T, Jiang L, Qian H (2022) TiO<sub>2</sub> nanoparticles exert an adverse effect on aquatic microbial communities. *Sci Total Environ* 831:154942. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154942>
- Chen C, Unrine JM, Hu Y, Guo L, Tsyusko O V, Fan Z, Liu S, Wei G (2021) Responses of soil bacteria and fungal communities to pristine and sulfidized zinc oxide nanoparticles relative to Zn ions. *J Hazard Mater* 405:124258. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124258>
- Chen C, Zhao Y, Wang D, Ren Y, Liu H, Tian Y, Geng Y, Tang Y, Chen X (2023) Effects of nanoscale zinc oxide treatment on growth, rhizosphere microbiota, and metabolism of *Aconitum carmichaelii*. *PeerJ* 11:e16177. <https://doi.org/10.7717/peerj.16177>
- Chen J, Dong X, Xin Y, Zhao M (2011) Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquat Toxicol* 101:493–499. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.12.004>

- Chen J, Dou R, Yang Z, You T, Gao X, Wang L (2018) Phytotoxicity and bioaccumulation of zinc oxide nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol Biochem* 130:604–612. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.019>
- Chen L, Wang C, Li H, Qu X, Yang ST, Chang XL (2017) Bioaccumulation and toxicity of <sup>13</sup>C-skeleton labeled graphene oxide in wheat. *Environ Sci Technol* 51:10146–10153. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00822>
- Chen L, Zhou L, Liu Y, Deng S, Wu H, Wang G (2012) Toxicological effects of nanometer titanium dioxide (nano-TiO<sub>2</sub>) on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicol Environ Saf* 84:155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.019>
- Chitra K, Annadurai G (2013) Antimicrobial activity of wet chemically engineered spherical shaped ZnO nanoparticles on food borne pathogen. *Int. Food Res. J.* 20:59–64. ISSN 22317546
- 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>
- Chou J-D, Wey M-Y, Chang S-H (2010) Study on Pb and PAHs emission levels of heavy metals- and PAHs-contaminated soil during thermal treatment process. *J Environ Eng* 136:112–118. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)ee.1943-7870.0000133](https://doi.org/10.1061/(asce)ee.1943-7870.0000133)
- Christian BW, Lind OT (2006) Key issues concerning Biolog use for aerobic and anaerobic freshwater bacterial community-level physiological profiling. *Int Rev Hydrobiol* 91:257–268. <https://doi.org/10.1002/iroh.200510838>
- Chung H, Kim MJ, Ko K, Kim JH, Kwon H, Hong I, Park N, Lee S-W, Kim W (2015) Effects of graphene oxides on soil enzyme activity and microbial biomass. *Sci Total Environ* 514:307–313. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.077>
- Collins D, Luxton T, Kumar N, Shah S, Walker VK, Shah V (2012) Assessing the impact of copper and zinc oxide nanoparticles on soil: A field study. *PLoS One* 7:8. 42663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042663>
- Contado C (2015) Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem. *Front Chem* 6:3. 48. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00048>
- Conte P, Zena A, Pilidis G, Piccolo A (2001) Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environ Pollut* 112:27–31. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00101-9)
- Couvillion SP, Danczak RE, Cao X, Yang Q, Keerthisinghe TP, McClure RS, Bitounis D, Burnet MC, Fansler SJ, Richardson RE, Fang M, Qian W-J, Demokritou P, Thrall BD (2023) Graphene oxide exposure alters gut microbial community composition and metabolism in an *in vitro* human model. *NanoImpact* 30:100463. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2023.100463>
- Cox A, Venkatachalam P, Sahi S, Sharma N (2016) Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiol Biochem* 107:147–163. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.022>
- Dandajeh HA, Talibi M, Ladommatos N, Hellier P (2022) Polycyclic aromatic hydrocarbon and soot emissions in a diesel engine and from a tube reactor. *J King Saud Univ - Eng Sci* 34:435–444. <https://doi.org/10.1016/j.jksues.2020.12.007>

- Dasari TP, Pathakoti K, Hwang H-M (2013) Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO, CuO, CO<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and TiO<sub>2</sub>) to *E. coli* bacteria. *J Environ Sci* 25:882–888. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60152-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60152-1)
- Dasmahapatra AK, Dasari TPS, Tchounwou PB (2019) Graphene-based nanomaterials toxicity in fish. *Rev Environ Contam Toxicol* 247:1–58. [https://doi.org/10.1007/398\\_2018\\_15](https://doi.org/10.1007/398_2018_15)
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295–298. <https://10.1126/science.280.5361.295>
- de Celis M, Belda I, Marquina D, Santos A (2022) Phenotypic and transcriptional study of the antimicrobial activity of silver and zinc oxide nanoparticles on a wastewater biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Sci Total Environ* 826:153915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153915>
- Deary ME, Ekumankama CC, Cummings SP (2022) Structural selectivity of PAH removal processes in soil, and the effect of metal co-contaminants. *Environ.* 9:1–12. <https://doi.org/10.3390/environments9020023>
- DeJong TMA (1975) A comparison of three diversity indices based on their components of richness and evenness. *Oikos* 26:222–227. <https://doi.org/10.2307/3543712>
- Demirbaş, Arife K, Çevik S (2020) Regulatory policies for safety of nanomaterials. *Open J Nano* 5:1–16. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/983736>
- Deng Y, Lim A, Lee J, Chen S, An S, Dong YH, Zhang LH (2014) Diffusible signal factor (DSF) quorum sensing signal and structurally related molecules enhance the antimicrobial efficacy of antibiotics against some bacterial pathogens. *BMC Microbiol* 14:1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-51>
- Dey S, Mohanty D lochan, Divya N, Bakshi V, Mohanty A, Rath D, Das S, Mondal A, Roy S, Sabui R (2025) A critical review on zinc oxide nanoparticles: Synthesis, properties and biomedical applications. *Intell Pharm* 3:53–70. <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2024.08.004>
- Dhall S, Nigam A, Harshavardhan M, Mukherjee A, Srivastava P (2024) A comprehensive overview of methods involved in nanomaterial production and waste disposal from research labs and industries and existing regulatory guidelines for handling engineered nanomaterials. *Environ Chem Ecotox* 6. 269–282. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2024.06.002>
- Dinesh R, Sreena CP, Sheeja TE, Kumar IPV, Praveena R, Charles S, Srinivasan V, Jayarajan K, Sajith V, Subila KP, Haritha P (2023) Soil polluted with nano ZnO reveals unstable bacterial communities and decoupling of taxonomic and functional diversities. *Sci Total Environ* 889:164285. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164285>
- Ding X, Yin B, Qian L, Zeng Z, Yang Z, Li H, Lu Y, Zhou S (2011) Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Med Microbiol* 60:1827–1834. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.024166-0>
- Domi B, Rumbo C, García-Tojal J, Sima LE, Negroiu G, Tamayo-Ramos JA (2020) Interaction analysis of commercial graphene oxide nanoparticles with unicellular systems and biomolecules. *Int J Mol Sci* 21:5–8. <https://doi.org/10.3390/ijms21010205>

- Dong B, Xia Z, Sun J, Dai X, Chen X, Ni B-J (2019) The inhibitory impacts of nano-graphene oxide on methane production from waste activated sludge in anaerobic digestion. *Sci Total Environ* 646:1376–1384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.424>
- Dong YH, Wang LH, Zhang LH (2007) Quorum-quenching microbial infections: Mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 362:1201–1211. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2045>
- Drwal E, Rak A, Gregoraszczyk EL (2019) Review: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—Action on placental function and health risks in future life of newborns. *Toxicology* 411:133–142. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.10.003>
- Du J, Hu X, Zhou Q (2015) Graphene oxide regulates the bacterial community and exhibits property changes in soil. *RSC Adv* 5:27009–27017. <https://doi.org/10.1039/C5RA01045D>
- Du J, Zhang Y, Guo R, Meng F, Gao Y, Ma C, Zhang H (2019) Harmful effect of nanoparticles on the functions of freshwater ecosystems: Insight into nanoZnO-polluted stream. *Chemosphere* 214:830–838. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.171>
- Du J, Zhang Y, Yin Y, Zhang J, Ma H, Li K, Wan N (2020a) Do environmental concentrations of zinc oxide nanoparticle pose ecotoxicological risk to aquatic fungi associated with leaf litter decomposition? *Water Res* 178. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115840>
- Du J, Zhou Q, Wu J, Li G, Li G, Wu Y (2020b) Soil bacterial communities respond differently to graphene oxide and reduced graphene oxide after 90 days of exposure. *Soil Ecol Lett* 2:176–179. <https://doi.org/10.1007/s42832-020-0043-5>
- Du W, Sun Y, Ji R, Zhu J, Wu J, Guo H (2011) TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. *J Environ Monit* 13:822–828. <https://doi.org/10.1039/C0EM00611D>
- Dufour D, Leung V, Lévesque CM (2010) Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Top* 22:2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
- Dunwell JM, Purvis A, Khuri S (2004) Cupins: The most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 65:7–17. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.08.016>
- Dzyhovskyi V, Romani A, Pula W, Bondi A, Ferrara F, Melloni E, Gonelli A, Pozza E, Voltan R, Sguizzato M, Secchiero P, Esposito E (2024) Characterization methods for nanoparticle-skin interactions: An overview. *Life* 14. <https://doi.org/10.3390/life14050599>
- Ebadi M, Zolfaghari MR, Aghaei SS, Zargar M, Shafiei M, Zahiri HS, Noghabi KA (2019) A bio-inspired strategy for the synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using the cell extract of cyanobacterium: *Nostoc* sp. EA03: From biological function to toxicity evaluation. *RSC Adv* 9:23508–23525. <https://doi.org/10.1039/c9ra03962g>
- Echavarri-Bravo V, Paterson L, Aspray TJ, Porter JS, Winson MK, Thornton B, Hartl MGJ (2015) Shifts in the metabolic function of a benthic estuarine microbial community following a single pulse exposure to silver nanoparticles. *Environ Pollut* 201:91–99. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.02.033>
- Edokpayi JN, Odiyo JO, Popoola OE, Msagati TAM (2016) Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rivers, sediments and wastewater effluents in Vhembe District, South Africa. *Int J Environ Res Public Health* 13. <https://doi.org/10.3390/ijerph13040387>

- Efremova L V., Vasilchenko AS, Rakov EG, Deryabin DG (2015) Toxicity of graphene shells, graphene oxide, and graphene oxide paper evaluated with *Escherichia coli* biotests. *Biomed Res Int* 869361. 10. <https://doi.org/10.1155/2015/869361>
- Egbuna C, Parmar VK, Jeevanandam J, Ezzat SM, Patrick-Iwuanyanwu KC, Adetunji CO, Khan J, Onyeike EN, Uche CZ, Akram M, Ibrahim MS, El Mahdy NM, Awuchi CG, Saravanan K, Tijjani H, Odoh UE, Messaoudi M, Ifemeje JC, Olisah MC, Ezeofor NJ, Chikwendu CJ, Ibeabuchi CG (2021) Toxicity of nanoparticles in biomedical application: Nanotoxicology. *J Toxicol* 2021:9954443. <https://doi.org/10.1155/2021/9954443>
- Egyesült Nemzetek Szervezete (2023) Globally Harmonized System for the Classification and Labeling of Chemicals (GHS) (2023) ST/SG/AC.10/30/Rev.9/Corr.1 - GHS Rev.9 - Corr.1 <https://unece.org/transport/documents/2023/05/standards/ghs-rev9-corr1>
- Eibes G, Arca-Ramos A, Feijoo G, Lema JM, Moreira MT (2015) Enzymatic technologies for remediation of hydrophobic organic pollutants in soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:8815–8829. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6872-y>
- Eisenberger I, Nentwich M, Fiedeler U, Gzásó A, Simkó M (2010) Nano regulation in the European Union. *Nano dossiers* 17:1–6. <http://epub.oeaw.ac.at/ita/nanotrust-dossiers/dossier017en.pdf>
- Eker F, Duman H, Akdaşçı E, Bolat E, Sarıtaş S, Karav S, Witkowska AM (2024) A comprehensive review of nanoparticles: From classification to application and toxicity. *Molecules* 29:15. 3482. <https://doi.org/10.3390/molecules29153482>
- El-Kady MM, Ansari I, Arora C, Rai N, Soni S, Verma DK, Singh P, Mahmoud AED (2023) Nanomaterials: A comprehensive review of applications, toxicity, impact, and fate to environment. *J Mol Liq* 370:121046. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.121046>
- El-Ramady H, Alshaal T, Abowaly M, Abdalla N, Taha HS, Al-Saeedi AH, Shalaby T, Amer M, Fári M, Domokos-Szabolcsy É, Sztrik A, Prokisch J, Selmar D, Pilon Smits EAH, Pilon M (2017) Nanoremediation for sustainable crop production BT - Nanoscience in food and agriculture 5. In: Ranjan S, Dasgupta N, Lichtfouse E (eds). Springer International Publishing, Cham, pp 335–363
- El Fantroussi S, Verschuere L, Verstraete W, Top EM (1999) Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl Environ Microbiol* 65:982–988. <https://doi.org/10.1128/aem.65.3.982-988.1999>
- Eldos HI, Zouari N, Saeed S, Al-Ghouti MA (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>
- Environmental Bio-Detection Products Inc. (EBPI) SOS-ChromoTest™ kit, for rapid detection of genotoxicity or DNA damage. <https://www.biotoxicity.com/index.php/ebpi-toxicity-tests/sos-genotoxicity-tests/sos-chromotest-kit>
- Erdem A, Metzler D, Cha DK, Huang CP (2015) The short-term toxic effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward bacteria through viability, cellular respiration, and lipid peroxidation. *Environ Sci Pollut Res* 22:17917–17924. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5018-1>
- Ermolin MS, Fedotov PS, Ivaneev AI, Karandashev VK, Fedyunina NN, Eskinina V V (2017) Isolation and quantitative analysis of road dust nanoparticles. *J Anal Chem* 72:520–532.

<https://doi.org/10.1134/S1061934817050057>

- Escobar PA, Kemper RA, Tarca J, Nicolette J, Kenyon M, Glowienke S, Sawant SG, Christensen J, Johnson TE, McKnight C, Ward G, Galloway SM, Custer L, Gocke E, O'Donovan MR, Braun K, Snyder RD, Mahadevan B (2013) Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 752:99–118. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.12.002>
- 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. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/9aebb292-39c5-4b9c-b4cb-97fb02d9bea2/language-en>
- Európai Bizottság (2009) Regulation No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009, on Cosmetic Products. *Off J Eur Union* 59–209. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj/eng>
- Európai Bizottság (2011) Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Off J Eur Union* 38–40. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011H0696&from=CS>
- Európai Bizottság (2012) Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. *Off J Eur Union* 1–123. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj/eng>
- Európai Bizottság (2018) Commission Regulation (EU) 2018/1881 of 3 December 2018 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annexes I, III, VI, V. *Off J Eur Union* 308:1–20. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2018/1881/oj/eng>
- Európai Parlament (2006) Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) (OJ L 396). *Off J Eur Union* 396:1–849. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1907/oj/eng>
- Európai Parlament (2008) Council Regulation (EC), 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). *Off J Eur Union* 1–739. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/440/oj/eng>
- Európai Parlament (2015) Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliam. *Off J Eur Union* 58:1–22. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2015/2283/oj/eng>
- Európai Parlament (2017) Regulation, 2017/745 of the European parliament and of the council of 5 April 2017 on medical devices, amending Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 and repealing Council Directives 90/385/EEC and 93/42/EEC. *Off J Eur Union* 1–175. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/745/oj/eng>

- Európai Vegyianyag-ügynökség (2008) Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC). Off J Eur Union 1–1355. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1272/oj/eng>
- Európai Vegyianyag-ügynökség Nanomaterials. (European Chemical Agency, ECHA) <https://echa.europa.eu/regulations/nanomaterials>
- Evariste L, Braylé P, Mouchet F, Silvestre J, Gauthier L, Flahaut E, Pinelli E, Barret M (2021) Graphene-based nanomaterials modulate internal biofilm interactions and microbial diversity. *Front Microbiol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623853>
- Evariste L, Mottier A, Lagier L, Cadarsi S, Barret M, Sarrieu C, Soula B, Mouchet F, Flahaut E, Pinelli E, Gauthier L (2020) Assessment of graphene oxide ecotoxicity at several trophic levels using aquatic microcosms. *Carbon N Y* 156:261–271. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.09.051>
- Ezezika OC, Singer PA (2010) Genetically engineered oil-eating microbes for bioremediation: Prospects and regulatory challenges. *Technol Soc* 32:331–335. <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2010.10.010>
- Fahmi T, Branch LD, Nima ZA, Jang DS, Savenka A V, Biris AS, Basnakian AG (2017) Mechanism of graphene-induced cytotoxicity: Role of endonucleases. *J Appl Toxicol* 37:1325–1332. <https://doi.org/10.1002/jat.3462>
- Fajardo C, Costa G, Nande M, Martín C, Martín M, Sánchez-Fortún S (2019) Heavy metals immobilization capability of two iron-based nanoparticles (nZVI and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): Soil and freshwater bioassays to assess ecotoxicological impact. *Sci Total Environ* 656:421–432. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.323>
- Farah S, Gyarmati B, Madarász J, Villar-Rodil S, Tascón JMD, László K (2023) Heterogeneity of graphite oxide particles obtained with wet oxidative exfoliation. *J Mol Liq* 386:122451. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122451>
- Farkas J, Peter H, Ciesielski TM, Thomas K V., Sommaruga R, Salvenmoser W, Weyhenmeyer GA, Tranvik LJ, Jenssen BM (2015) Impact of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on freshwater bacteria from three Swedish lakes. *Sci Total Environ* 535:85–93. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.043>
- Federici G, Shaw BJ, Handy RD (2007) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol* 84:415–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- Fekete-Kertész I, László K, Molnár M (2023) Towards understanding the factors behind the limited integration of multispecies ecotoxicity assessment in environmental risk characterisation of graphene-family materials - A bibliometric review. *C* 9:4. 90. <https://doi.org/10.3390/c9040090>
- Fekete-Kertész I, László K, Terebesi C, Gyarmati BS, Farah S, Márton R, Molnár M (2020) Ecotoxicity assessment of graphene oxide by *Daphnia magna* through a multimarker approach from the molecular to the physiological level including behavioral changes. *Nanomaterials* 10:1–16. <https://doi.org/10.3390/nano10102048>

- Fekete-Kertész I, Píszmán D, Molnár M (2017) Particle size and concentration dependent ecotoxicity of nano- and microscale TiO<sub>2</sub> — Comparative study by different aquatic test organisms of different trophic levels. *Water Air Soil Pollut* 228. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3394-5>
- Femi-Oloye OP, Sutton RT, Gordon HD, Ain Das A, Morenikeji GO, Odoriso MK, Francestsco OD, Myers RL, Oloye FF (2024) An assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons using estimation programs. *Toxics* 12. <https://doi.org/10.3390/toxics12080592>
- Feng Y, Khoo HE, Poh CL (1999) Purification and characterization of gentisate 1,2-dioxygenases from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 and *Pseudomonas putida* NCIB 9869. *Appl Environ Microbiol* 65:946–950. <https://doi.org/10.1128/aem.65.3.946-950.1999>
- Feng Y, Li Z, Li W (2025) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): Environmental persistence and human health risks. *Nat Prod Commun* 20. <https://doi.org/10.1177/1934578X241311451>
- Fenntarthatósági Igazgatóság (2025) Nanomaterials for Sustainability. <https://energy.sustainability-directory.com/term/nanomaterials-for-sustainability/>
- Fernando I, Zhou Y (2019) Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere* 216:297–305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.122>
- Fetzner S (2012) Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. *Appl Environ Microbiol* 78:2505–2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.07651-11>
- Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Foller T, Daiyan R, Jin X, Leverett J, Kim H, Webster R, Yap JE, Wen X, Rawal A, De Silva KKH, Yoshimura M, Bustamante H, Chang SLY, Kumar P, You Y, Lee G, Amal R, Joshi R (2021) Enhanced graphitic domains of unreduced graphene oxide and the interplay of hydration behaviour and catalytic activity. *Mater Today* 50:44–54. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2021.08.003>
- Forstner C, Orton TG, Skarshewski A, Wang P, Kopittke PM, Dennis PG (2019a) Effects of graphene oxide and graphite on soil bacterial and fungal diversity. *Sci Total Environ* 671:140–148. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.360>
- Forstner C, Orton TG, Wang P, Kopittke PM, Dennis PG (2019b) Effects of carbon nanotubes and derivatives of graphene oxide on soil bacterial diversity. *Sci Total Environ* 682:356–363. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.162>
- Francia V, Montizaan D, Salvati A (2020) Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine. *Beilstein J Nanotechnol* 11:338–353. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.25>
- Galdames A, Ruiz-Rubio L, Orueta M, Sánchez-Arzalluz M, Vilas-Vilela JL (2020) Zero-valent iron nanoparticles for soil and groundwater remediation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17:16. 5817. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165817>
- Gambardella C, Pinsino A (2022) Nanomaterial ecotoxicology in the terrestrial and aquatic environment: A systematic review. *Toxics* 10. <https://doi.org/10.3390/toxics10070393>

- Gan HY, Schöning I, Schall P, Ammer C, Schrumpf M (2020) Soil organic matter mineralization as driven by nutrient stoichiometry in soils under differently managed forest stands. *Front For Glob Chang* 3:1–15. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2020.00099>
- Gan S, Lau E V., Ng HK (2009) Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Hazard Mater* 172:532–549. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.118>
- Ganie AS, Bano S, Khan N, Sultana S, Rehman Z, Rahman MM, Sabir S, Coulon F, Khan MZ (2021) Nanoremediation technologies for sustainable remediation of contaminated environments: Recent advances and challenges. *Chemosphere* 275:130065. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130065>
- 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>
- Gao G, Ze Y, Zhao X, Sang X, Zheng L, Ze X, Gui S, Sheng L, Sun Q, Hong J, Yu X, Wang L, Hong F, Zhang X (2013) Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *J Hazard Mater* 258–259:133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.04.046>
- Garbisu C, Garaiurrebaso O, Epelde L, Grohmann E, Alkorta I (2017) Plasmid-mediated bioaugmentation for the bioremediation of contaminated soils. *Front Microbiol* 8:1966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01966>
- García-Gómez C, Fernández MD, García S, Obrador AF, Letón M, Babín M (2018a) Soil pH effects on the toxicity of zinc oxide nanoparticles to soil microbial community. *Environ Sci Pollut Res* 25:28140–28152. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2833-1>
- García-Gómez C, Obrador A, González D, Babín M, Fernández MD (2018b) Comparative study of the phytotoxicity of ZnO nanoparticles and Zn accumulation in nine crops grown in a calcareous soil and an acidic soil. *Sci Total Environ* 644:770–780. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.356>
- García-Lara B, Saucedo-Mora MA, Roldán-Sánchez JA, Pérez-Eretza B, Ramasamy M, Lee J, Coria-Jimenez R, Tapia M, Varela-Guerrero V, García-Contreras R (2015) Inhibition of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles. *Lett Appl Microbiol* 61:299–305. <https://doi.org/10.1111/lam.12456>
- García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yanez M (2020) The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J Med Microbiol* 69:25–34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001116>
- Ge C, Du J, Zhao L, Wang L, Liu Y, Li D, Yang Y, Zhou R, Zhao Y, Chai Z, Chen C (2011a) Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16968–16973. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105270108>
- Ge Y, Schimel JP, Holden PA (2011b) 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>
- Ge Y, P. SJ, A. HP (2012) Identification of soil bacteria susceptible to TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles. *Appl Environ Microbiol* 78:6749–6758.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00941-12>

- Ge Y, Priester JH, Mortimer M, Chang CH, Ji Z, Schimel JP, Holden PA (2016) Long-term effects of multiwalled carbon nanotubes and graphene on microbial communities in dry soil. *Environ Sci Technol* 50:3965–3974. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05620>
- Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, Ahn Y (2016) Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
- Ghulam AN, Dos Santos OAL, Hazeem L, Backx BP, Bououdina M, Bellucci S (2022) Graphene oxide (GO) materials - applications and toxicity on living organisms and environment. *J Funct Biomater* 13. <https://doi.org/10.3390/jfb13020077>
- Gianfreda L, Bollag JM (2002) Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: R. G. Burns RPD (ed) *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker, Inc., pp 495–538
- Gianfreda L, Rao MA (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb Technol* 35:339–354. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.05.006>
- Gomes JFP, Albuquerque PCS, Miranda RMM, Vieira MTF (2012) Determination of airborne nanoparticles from welding operations. *J Toxicol Environ Heal Part A* 75:747–755. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.688489>
- Gómez-Gómez B, Arregui L, Serrano S, Santos A, Pérez-Corona T, Madrid Y (2019) Selenium and tellurium-based nanoparticles as interfering factors in quorum sensing-regulated processes: violacein production and bacterial biofilm formation. *Metallomics* 11 6:1104–1114. <https://doi.org/10.1039/C9MT00044E>
- Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW, Nowack B (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ Sci Technol* 43:9216–9222. <https://doi.org/10.1021/es9015533>
- Gruiz K, Horváth B, Molnár M (2001) *Környezettoxikológia, Vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára*. Műegyetemi Kiadó, Budapest
- Guo WB, Wu C, Yang L, Pan K, Miao AJ (2022) Nanoparticle pre- or co-exposure affects bacterial ingestion by the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *J Hazard Mater* 429:128268. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128268>
- Guo X, Dong S, Petersen EJ, Gao S, Huang Q, Mao L (2013) Biological uptake and depuration of radio-labeled graphene by *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 47:12524–12531. <https://doi.org/10.1021/es403230u>
- Guo Z, Han J, Xu Y, Lu Y, Shi C, Ge L, Cao T, Li J (2019) The mineralization characteristics of organic carbon and particle composition analysis in reconstructed soil with different proportions of soft rock and sand. *PeerJ* 7:e7707. <https://doi.org/10.7717/peerj.7707>
- Gupta N, Koley A, Banerjee S, Ghosh A, Hoque RR, 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>
- Gupta S, Singh D (2017) Role of genetically modified microorganisms in heavy metal bioremediation BT - *Advances in environmental biotechnology*. In: Kumar R, Sharma

- AK, Ahluwalia SS (eds). Springer Singapore, Singapore, pp 197–214 [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4041-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4041-2_12)
- Gurunathan S, Kang M-H, Jeyaraj M, Kim J-H (2019) Differential cytotoxicity of different sizes of graphene oxide nanoparticles in Leydig (TM3) and Sertoli (TM4) cells. *Nanomaterials* 9:2, 139. <https://doi.org/10.3390/nano9020139>
- Hansen SF, Baun A (2012) European regulation affecting nanomaterials - review of limitations and future recommendations. *Dose Response* 10:364–383. <https://doi.org/10.2203/dose-response.10-029.Hansen>
- Hansen SF, Michelson ES, Kamper A, Borling P, Stuer-Lauridsen F, Baun A (2008) Categorization framework to aid exposure assessment of nanomaterials in consumer products. *Ecotoxicology* 17:438–447. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0210-4>
- Hao L, Wang Z, Xing B (2009) Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci* 21:1459–1466. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62440-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62440-7)
- Harch BD, Correll RL, Meech W, Kirkby CA, Pankhurst CE (1997) Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilisation data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. *J Microbiol Methods* 30:91–101. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00048-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00048-1)
- Hayat S, Muzammil S, Shabana, Aslam B, Siddique MH, Saqalein M, Nisar MA (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>
- Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier H-C, Kahru A (2008) Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71:1308–1316. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.047>
- Heitkamp MA, Cerniglia CE (1987) Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. *Environ Toxicol Chem* 6:535–546. <https://doi.org/10.1002/etc.5620060706>
- Hendricks N, Olatunji O, Ofori I, Gumbi BP (2023) Occurrence, fate, and impact of engineered metal/carbonaceous nanomaterials in the environment, detection, and quantitation methods. *Int J Environ Sci Technol* 20:12937–12954. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04977-8>
- Hochella MF, Mogk DW, Ranville J, Allen IC, Luther GW, Marr LC, McGrail BP, Murayama M, Qafoku NP, Rosso KM, Sahai N, Schroeder PA, Vikesland P, Westerhoff P, Yang Y (2019) Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. *Science* 80. 363:eaau8299. <https://doi.org/10.1126/science.aau8299>
- Holder AL, Vejerano EP, Zhou X, Marr LC (2013) Nanomaterial disposal by incineration. *Environ Sci Process Impacts* 15:1652–1664. <https://doi.org/10.1039/C3EM00224A>
- Hong F, Sheng L, Ze Y, Hong J, Zhou Y, Wang L, Liu D, Yu X, Xu B, Zhao X, Ze X (2015) Suppression of neurite outgrowth of primary cultured hippocampal neurons is involved in impairment of glutamate metabolism and NMDA receptor function caused by nanoparticulate TiO<sub>2</sub>. *Biomaterials* 53:76–85. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.067>

- Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S, Wang X (2019) Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J Environ Sci* 75:40–53. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.010>
- Hristozov DR, Gottardo S, Critto A, Marcomini A (2012) Risk assessment of engineered nanomaterials: a review of available data and approaches from a regulatory perspective. *Nanotoxicology* 6:880–898. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.626534>
- Hu X, Ouyang S, Mu L, An J, Zhou Q (2015) Effects of graphene oxide and oxidized carbon nanotubes on the cellular division, microstructure, uptake, oxidative stress, and metabolic profiles. *Environ Sci Technol* 49:10825–10833. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02102>
- Huang HJ, Lee YH, Hsu YH, Liao C Te, Lin YF, Chiu HW (2021) Current strategies in assessment of nanotoxicity: Alternatives to *in vivo* animal testing. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22084216>
- Huang L, Hu H, Tang H, Liu Y, Xu P, Shi J, Lin K, Luo Q, Cui C (2015) Identification and characterization of a novel gentisate 1,2-dioxygenase gene from a halophilic *Martellella* strain. *Sci Rep* 5:1–9. <https://doi.org/10.1038/srep14307>
- Huang Y, Fulton AN, Keller AA (2016) Simultaneous removal of PAHs and metal contaminants from water using magnetic nanoparticle adsorbents. *Sci Total Environ* 571:1029–1036. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.093>
- 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://10.1007/978-3-030-63241-0\\_1](https://10.1007/978-3-030-63241-0_1)
- Isibor PO, Kayode-Edwards II, Taiwo OS (2024) Emerging technology and future directions in environmental nanotoxicology - Environmental Nanotoxicology: Combatting the Minute Contaminants. In: Isibor PO, Devi G, Enuneku AA (eds). Springer Nature Switzerland, Cham, pp 325–346. [https://10.1007/978-3-031-54154-4\\_16](https://10.1007/978-3-031-54154-4_16)
- ISO (2010) ISO 21338:2010 Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test). International Organization for Standardization, Geneva. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:21338:ed-1:v1:en>
- ISO (2007) ISO 11348-3:2007 Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). International Organization for Standardization, Geneva. <https://www.iso.org/standard/40518.html>
- Itroutwar PD, Kasivelu G, Raguraman V, Malaichamy K, Sevathapandian SK (2020) Effects of biogenic zinc oxide nanoparticles on seed germination and seedling vigor of maize (*Zea mays*). *Biocatal Agric Biotechnol* 29:101778. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101778>
- Iziy E, Majd A, Vaezi-Kakhki MR, Nejadstattari T, Noureini SK (2019) Effects of zinc oxide nanoparticles on enzymatic and nonenzymatic antioxidant content, germination, and biochemical and ultrastructural cell characteristics of *Portulaca oleracea* L. *Acta Soc Bot Pol* 88:1–14. <https://doi.org/10.5586/ASBP.3639>
- Jalal R, Goharshadi EK, Abareshi M, Moosavi M, Yousefi A, Nancarrow P (2010) ZnO nanofluids: Green synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Mater Chem Phys*

121:198–201. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.01.020>

- Jan N, Majeed N, Ahmad M, Ahmad Lone W, John R (2022) Nano-pollution: Why it should worry us. *Chemosphere* 302:134746. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134746>
- Jandoo J, Borecka A, Turek-Szytow J, Gnida A (2022) Biological properties of soil stimulated by calcium peroxide. *Contemporary Problems of Power Engineering and Environmental Protection*. [https://www.researchgate.net/profile/Jaspreet-Jandoo/publication/358348312\\_Biological\\_properties\\_of\\_soil\\_stimulated\\_by\\_calcium\\_peroxide/links/61fcf2ca4393577abe0d8e44/Biological-properties-of-soil-stimulated-by-calcium-peroxide.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jaspreet-Jandoo/publication/358348312_Biological_properties_of_soil_stimulated_by_calcium_peroxide/links/61fcf2ca4393577abe0d8e44/Biological-properties-of-soil-stimulated-by-calcium-peroxide.pdf)
- Janer G, Landsiedel R, Wohlleben W (2021) Rationale and decision rules behind the ECETOC NanoApp to support registration of sets of similar nanoforms within REACH. *Nanotoxicology* 15:145–166. <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1842933>
- Jayaseelan C, Rahuman AA, Roopan SM, Kirthi AV, Venkatesan J, Kim S-K, Iyappan M, Siva C (2013) Biological approach to synthesize TiO<sub>2</sub> nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 107:82–89. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.12.083>
- Jeevanandam J, Sundaramurthy A, Sharma V, Murugan C, Pal K, Abdel Kodous MH, Danquah MK (2020) Chapter 4 - Sustainability of One-Dimensional Nanostructures: Fabrication and Industrial Applications. In: Szekely G, Livingston A (eds). *Sustainable Nanoscale Engineering*. Elsevier, pp 83–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814681-1.00004-7>
- Ji Y, Wang Y, Wang X, Lv C, Zhou Q, Jiang G, Yan B, Chen L (2024) Beyond the promise: Exploring the complex interactions of nanoparticles within biological systems. *J Hazard Mater* 468:133800. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133800>
- Jia P-P, Sun T, Junaid M, Xiong Y-H, Wang Y-Q, Liu L, Pu S-Y, Pei D-S (2019) Chronic exposure to graphene oxide (GO) induced inflammation and differentially disturbed the intestinal microbiota in zebrafish. *Environ Sci Nano* 6:2452–2469. <https://doi.org/10.1039/C9EN00364A>
- Jiang G, Song X, Xie J, Shi T, Yang Q (2023) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in ambient air of Guangzhou city: Exposure levels, health effects and cytotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 262:115308. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115308>
- Jiang H, Lv L, Ahmed T, Jin S, Shahid M, Noman M, Osman H-EH, Wang Y, Sun G, Li X, Li B (2022) Effect of the nanoparticle exposures on the tomato bacterial wilt disease control by modulating the rhizosphere bacterial community. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23010414>
- Jiang J, Oberdörster G, Biswas P (2009a) Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanoparticle Res* 11:77–89. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4>
- Jiang J, Oberdörster G, Elder A, Gelein R, Mercer P, Biswas P (2008) Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? *Nanotoxicology* 2:33–42. <https://doi.org/10.1080/17435390701882478>
- Jiang W, Mashayekhi H, Xing B (2009b) Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ Pollut* 157:1619–1625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.025>

- Jin H, Guo C, Liu X, Liu J, Vasileff A, Jiao Y, Zheng Y, Qiao S-Z (2018) Emerging two-dimensional nanomaterials for electrocatalysis. *Chem Rev* 118:6337–6408. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00689>
- Jovanović B, Anastasova L, Rowe EW, Zhang Y, Clapp AR, Palić D (2011) Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Ecotoxicol Environ Saf* 74:675–683. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.017>
- Jumle K, Lakhawat SS, Ajmera H, Thakuria B, Sharma V, Jain V, Kumar V, Singh S, Kumar A, Malik N, Kothari SL, Kumar S, Sharma PK (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>
- Kahru A, Dubourguier H (2010) From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* 269:105–119. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.016>
- Kakosová E, Hrabák P, Černík M, Novotný V, Czinnerová M, Trögl J, Popelka J, Kuráň P, Zoubková L, Vrtoch Ľ (2017) Effect of various chemical oxidation agents on soil microbial communities. *Chem Eng J* 314:257–265. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.065>
- Kamiya Y, Kameda T, Ohura T, Tohno S (2017) Determination of particle-associated PAH derivatives (C1PAHs, NPAHs, OPAHs) in ambient air and automobile exhaust by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization. *Polycycl Aromat Compd* 37:128–140. <https://doi.org/10.1080/10406638.2016.1202290>
- Kanály RA, Harayama S (2000) Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol* 182:2059–2067. <https://doi.org/10.1128/JB.182.8.2059-2067.2000>
- Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L (2008) Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol* 21:1726–1732. <https://doi.org/10.1021/tx800064j>
- Karn B, Kuiken T, Otto M (2009) Nanotechnology and *in situ* remediation: A review of the benefits and potential risks. *Environ Health Perspect* 117:1823–1831. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900793>
- Kasemets K, Ivask A, Dubourguier H-C, Kahru A (2009) Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol Vitro* 23:1116–1122. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.015>
- Kaur H, Kalia A, Sandhu JS, Dheri GS, Kaur G, Pathania S (2022) Interaction of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with soil: Effect on microbiological and chemical traits. *Chemosphere* 301:134629. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134629>
- Kedves A, Sánta L, Balázs M, Kesserű P, Kiss I, Rónavári A, Kónya Z (2020) Chronic responses of aerobic granules to the presence of graphene oxide in sequencing batch reactors. *J Hazard Mater* 389:121905. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121905>
- Keller AA, Adeleye AS, Conway JR, Garner KL, Zhao L, Cherr GN, Hong J, Gardea-Torresdey JL, Godwin HA, Hanna S, Ji Z, Kaweeteerawat C, Lin S, Lenihan HS, Miller RJ, Nel AE,

- Peralta-Videa JR, Walker SL, Taylor AA, Torres-Duarte C, Zink JI, Zuverza-Mena N (2017) Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials. *NanoImpact* 7:28–40. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.05.003>
- Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S (2013) Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanoparticle Res* 15:1692. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
- Keller AA, Wang H, Zhou D, Lenihan HS, Cherr G, Cardinale BJ, Miller R, Ji Z (2010) Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ Sci Technol* 44:1962–1967. <https://doi.org/10.1021/es902987d>
- Kensa VM (2011) Bioremediation - An overview. *Jr. of Industrial Pollution Control* 27:2. 161–168. <https://www.icontrolpollution.com/articles/bioremediation-an-overview-161-168.pdf>
- Kerin H, Nagaraj K, Kamalesu S (2023) Review on aquatic toxicity of metal oxide nanoparticles. *Mater Today Proc.* <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.02.183>
- Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Kim YM (2020a) Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:33–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10201-w>
- Khan M, Naqvi AH, Ahmad M (2015) Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol Reports* 2:765–774. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.02.004>
- Khan MF, Husain FM, Zia Q, Ahmad E, Jamal A, Alaidarous M, Banawas S, Alam MM, Alshehri BA, Jameel M, Alam P, Ahamed MI, Ansari AH, Ahmad I (2020b) Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of zinc oxide nanopikes. *ACS Omega* 5:32203–32215. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03634>
- Khodaveisi J, Banejad H, Afkhami A, Olyaie E, Lashgari S, Dashti R (2011) Synthesis of calcium peroxide nanoparticles as an innovative reagent for *in situ* chemical oxidation. *J Hazard Mater* 192:1437–1440. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.060>
- Kim M-J, Ko D, Ko K, Kim D, Lee J-Y, Woo SM, Kim W, Chung H (2018) Effects of silver-graphene oxide nanocomposites on soil microbial communities. *J Hazard Mater* 346:93–102. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.032>
- Kiser MA, Westerhoff P, Benn T, Wang Y, Pérez-Rivera J, Hristovski K (2009) Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol* 43:6757–6763. <https://doi.org/10.1021/es901102n>
- Knightes CD, Peters CA (2003) Aqueous phase biodegradation kinetics of 10 PAH compounds. *Environ Eng Sci* 20:207–218. <https://doi.org/10.1089/109287503321671410>
- Ko K, Kim M-J, Lee J-Y, Kim W, Chung H (2019) Effects of graphene oxides and silver-graphene oxides on aquatic microbial activity. *Sci Total Environ* 651:1087–1095. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.124>
- Kumar M, Kulkarni P, Liu S, Chemuturi N, Shah DK (2023a) Nanoparticle biodistribution coefficients: A quantitative approach for understanding the tissue distribution of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 194:114708. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114708>
- Kumar N, Samota SR, Venkatesh K, Tripathi SC (2023b) Global trends in use of nano-

- fertilizers for crop production: Advantages and constraints – A review. *Soil Tillage Res* 228:105645. <https://doi.org/10.1016/j.still.2023.105645>
- Kuppan N, Padman M, Mahadeva M, Srinivasan S, Devarajan R (2024) A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: Eco friendly solutions for waste and pollution management. *Waste Manag Bull* 2:154–171. <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2024.07.005>
- Kuppusamy S, Palanisami T, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R (2016) *In-Situ* remediation approaches for the management of contaminated sites: A comprehensive overview - Reviews of environmental contamination and toxicology Volume 236. In: de Voogt P (ed). Springer International Publishing, Cham, pp 1–115. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2_1)
- Kuppusamy S, Thavamani P, Venkateswarlu K, Lee YB, Naidu R, Megharaj M (2017) Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere* 168:944–968. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.115>
- Kusi J, Scheuerman PR, Maier KJ (2020) Emerging environmental contaminants (silver nanoparticles) altered the catabolic capability and metabolic fingerprinting of microbial communities. *Aquat Toxicol* 228. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105633>
- Kuyukina MS, Ivshina IB, Krivoruchko A V., Peshkur TA, Cunningham CJ (2021) Improvement of jet fuel contaminated water treatment in a fluidized-bed bioreactor by introducing nickel nanoparticles. *Int Biodeterior Biodegrad* 164:105308. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105308>
- Kwon E, Castaldi MJ (2008) Investigation of mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) initiated from the thermal degradation of styrene butadiene rubber (SBR) in N<sub>2</sub> atmosphere. *Environ Sci Technol* 42:2175–2180. <https://doi.org/10.1021/es7026532>
- Lahive E, Matzke M, Svendsen C, Spurgeon DJ, Pournan H, Zhang H, Lawlor A, Glória Pereira M, Lofts S (2023) Soil properties influence the toxicity and availability of Zn from ZnO nanoparticles to earthworms. *Environ Pollut* 319:120907. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120907>
- Law SK, Fung YH, Chan HY, Han J, Lo CM, Wong HW (2022) A mini-review for an adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by physical gel. *Biointerface Res Appl Chem* 12:8195–8204. <https://doi.org/10.33263/BRIAC126.81958204>
- Lee DJ, Jo AR, Jang MC, Nam J, Choi HJ, Choi GW, Sung HY, Bae H, Ku YG, Chi YT (2018) Analysis of two quorum sensing-deficient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* 119:162–169. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.014>
- Lee J, Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6:26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lee JH, Kim YG, Cho MH, Lee J (2014) ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol Res* 169:888–896. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.005>
- Lee JH, Yoo H, Ahn YJ, Kim HJ, Kwon SR (2022) Evaluation of the antimicrobial effect of graphene oxide fiber on fish bacteria for application in aquaculture systems. *Materials* 15:1–9. <https://doi.org/10.3390/ma15030966>

- Lee K, Yoon SS (2017) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *J Microbiol Biotechnol* 27:1053–1064. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
- Leitgib L, Kálmán J, Gruiz K (2007) Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere* 66:428–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.024>
- Levy JL, Stauber JL, Wakelin SA, Jolley DF (2009) The effect of bacteria on the sensitivity of microalgae to copper in laboratory bioassays. *Chemosphere* 74:1266–1274. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.049>
- Li F, Liang Z, Zheng X, Zhao W, Wu M, Wang Z (2015) Toxicity of nano-TiO<sub>2</sub> on algae and the site of reactive oxygen species production. *Aquat Toxicol* 158:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.014>
- Li H, Chi Z, Yan B (2019) Long-term impacts of graphene oxide and Ag nanoparticles on anammox process: Performance, microbial community and toxic mechanism. *J Environ Sci* 79:239–247. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.07.012>
- Li J, Wang X, Mei K-C, Chang CH, Jiang J, Liu X, Liu Q, Guiney LM, Hersam MC, Liao Y-P, Meng H, Xia T (2021a) Lateral size of graphene oxide determines differential cellular uptake and cell death pathways in Kupffer cells, LSECs, and hepatocytes. *Nano Today* 37. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101061>
- Li M, Zhang Y, Feng S, Zhang X, Xi Y, Xiang X (2022) Bioaccumulation and biomagnification effects of nano-TiO<sub>2</sub> in the aquatic food chain. *Ecotoxicology* 31:1023–1034. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02572-0>
- Li N, Wang L, Yan H, Wang M, Shen D, Yin J, Shentu J (2018a) Effects of low-level engineered nanoparticles on the quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environ Sci Pollut Res* 25:7049–7058. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0947-5>
- Li S, Ao C, Wu M, Zhang P, Pan B, Xing B (2025) Geochemical behavior of engineered nanoparticles under biotic and abiotic processes. *Soil Environ Heal* 3:100145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seh.2025.100145>
- Li X, Mu L, Hu X (2018b) Integrating proteomics, metabolomics and typical analysis to investigate the uptake and oxidative stress of graphene oxide and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Nano* 5:115–129. <https://doi.org/10.1039/C7EN00803A>
- Li Y, Duan X (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of China Sea. *Environ Sci Pollut Res* 22:15432–15442. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5333-6>
- Li Y, Lu Y, Zhang W, Wu H, Zhang C, Wang L, Niu L, Zhang H (2020) Enhanced biological nitrogen removal from sediment by graphene derivative-mediated community assembly. *Bioresour Technol* 306:123187. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123187>
- Li Y, Wang Q, Liu L, Tabassum S, Sun J, Hong Y (2021b) Enhanced phenols removal and methane production with the assistance of graphene under anaerobic co-digestion conditions. *Sci Total Environ* 759:143523. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143523>
- Li YH, Tian X (2012) Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors* 12:2519–2538. <https://doi.org/10.3390/s120302519>

- Lian S, Qu Y, Li S, Zhang Z, Zhang H, Dai C, Deng Y (2020) Interaction of graphene-family nanomaterials with microbial communities in sequential batch reactors revealed by high-throughput sequencing. *Environ Res* 184:109392. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109392>
- Liao K-H, Lin Y-S, Macosko CW, Haynes CL (2011) Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces* 3:2607–2615. <https://doi.org/10.1021/am200428v>
- Liao X, Wu Z, Li Y, Cao H, Su C (2019a) Effect of various chemical oxidation reagents on soil indigenous microbial diversity in remediation of soil contaminated by PAHs. *Chemosphere* 226:483–491. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.126>
- Liao YC, Chang YQ, Xu CK, Cui Y Bin, Li M (2019b) Toxicity effects of graphene oxide to *Tetrahymena thermophila*. *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environ Sci* 39:1299–1305
- Lima ALC, Farrington JW, Reddy CM (2005) Combustion-derived polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment - A review. *Environ Forensics* 6:109–131. <https://doi.org/10.1080/15275920590952739>
- Lin D, Xing B (2008) Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ Sci Technol* 42:5580–5585. <https://doi.org/10.1021/es800422x>
- Lin Q, Chen Y, Wang Z, Wang Y (2004) Study on the possibility of hydrogen peroxide pretreatment and plant system to remediate soil pollution. *Chemosphere* 57:1439–1447. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.070>
- Lin X, Li J, Ma S, Liu G, Yang K, Tong M, Lin D (2014) Toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to *Escherichia coli*: effects of particle size, crystal phase and water chemistry. *PLoS One* 9:e110247
- Liu B, Gao L, Ding L, Lv L, Yu Y (2023) Trophodynamics and bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine food web from Laizhou Bay, China. *Mar Pollut Bull* 194:115307. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115307>
- Liu C, Shi H, Wang C, Fei Y, Han Z (2022) Thermal remediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons: Pollutant removal process and influence on soil functionality. *Toxics* 10. <https://doi.org/10.3390/toxics10080474>
- Liu S, Wei H, Li Z, Li S, Yan H, He Y, Tian Z (2015) Effects of graphene on germination and seedling morphology in rice. *J Nanosci Nanotechnol* 15:2695–2701. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9254>
- Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R, Kong J, Chen Y (2011) Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress. *ACS Nano* 5:6971–6980. <https://doi.org/10.1021/nn202451x>
- Liu Y, Li Y, Pan B, Zhang X, Zhang H, Steinberg CEW, Qiu H, Vijver MG, Peijnenburg WJGM (2021) Application of low dosage of copper oxide and zinc oxide nanoparticles boosts bacterial and fungal communities in soil. *Sci Total Environ* 757:143807. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143807>
- Lladó S, Baldrian P (2017) Community-level physiological profiling analyses show potential to identify the copiotrophic bacteria present in soil environments. *PLoS One* 12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171638>

- Londono N, Donovan AR, Shi H, Geisler M, Liang Y (2017) Impact of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on an aquatic microbial community: effect at environmentally relevant concentrations. *Nanotoxicology* 11:1140–1156. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1401141>
- Lowry G V, Gregory KB, Apte SC, Lead JR (2012) Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ Sci Technol* 46:6893–6899. <https://doi.org/10.1021/es300839e>
- Lu C-H, Yang H-H, Zhu C-L, Chen X, Chen G-N (2009) A graphene platform for sensing biomolecules. *Angew Chem Int Ed Engl* 48:4785–4787. <https://doi.org/10.1002/anie.200901479>
- Lv X, Yang Y, Tao Y, Jiang Y, Chen B, Zhu X, Cai Z, Li B (2018) A mechanism study on toxicity of graphene oxide to *Daphnia magna*: Direct link between bioaccumulation and oxidative stress. *Environ Pollut* 234:953–959. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.034>
- Mackay AA, Gschwend PM (2001) Enhanced concentrations of PAHs in groundwater at a coal tar site. *Environ Sci Technol* 35:1320–1328. <https://doi.org/10.1021/es0014786>
- Mahajan P, Dhoke SK, Khanna AS (2011) Effect of nano-ZnO particle suspension on growth of mung (*Vigna radiata*) and gram (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *J Nanotechnol* 2011:696535. <https://doi.org/10.1155/2011/696535>
- Maharramov AM, Hasanova UA, Suleymanova IA, Osmanova GE, Hajiyeva NE (2019) The engineered nanoparticles in food chain: potential toxicity and effects. *SN Appl Sci* 1:1362. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1412-5>
- Małachowska-Jutysz A, Niesler M (2015) The effect of calcium peroxide on the phenol oxidase and acid phosphatase activity and removal of fluoranthene from soil. *Water Air Soil Pollut* 226. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2632-y>
- Malakar A, Snow DD (2020) Nanoparticles as sources of inorganic water pollutants. In: Devi P, Singh P, Kansal SK (eds). *Inorganic pollutants in water*. Elsevier, pp 337–370. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818965-8.00017-2>
- Malkova A, Svadlakova T, Singh A, Kolackova M, Vankova R, Borsky P, Holmannova D, Karas A, Borska L, Fiala Z (2021) *In vitro* assessment of the genotoxic potential of pristine graphene platelets. *Nanomaterials* 11:9. 2210. <https://doi.org/10.3390/nano11092210>
- Manzetti S (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: Environmental fate and transformation. *Polycycl Aromat Compd* 33:311–330. <https://doi.org/10.1080/10406638.2013.781042>
- Marquiegui-Alvaro A, Kottara A, Chacón M, Cliffe L, Brockhurst M, Dixon N (2025) Genetic bioaugmentation-mediated bioremediation of terephthalate in soil microcosms using an engineered environmental plasmid. *Microb Biotechnol* 18:e70071. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70071>
- Martínez G, Merinero M, Pérez-Aranda M, Pérez-Soriano EM, Ortiz T, Begines B, Alcudia A (2021) Environmental impact of nanoparticles' application as an emerging technology: A review. *Mater* 14. <https://doi.org/10.3390/ma14010166>
- Martorano LM, Stork CJ, Li Y V. (2010) UV irradiation-induced zinc dissociation from

- commercial zinc oxide sunscreen and its action in human epidermal keratinocytes. *J Cosmet Dermatol* 9:276–286. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2010.00521.x>
- Mastral AM, Callén MS (2000) A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH): Emissions from energy generation. *Environ Sci Technol* 34:3051–3057. <https://doi.org/10.1021/es001028d>
- Maurya R, Pandey AK (2020). Importance of protozoa *Tetrahymena* in toxicological studies: A review. *Sci Total Environ* 741. 140058. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140058>
- Mazhar Z, Akhtar J, Alhodaib A, Naz T, Zafar MI, Iqbal MM, Fatima H, Naz I (2023) Efficacy of ZnO nanoparticles in Zn fortification and partitioning of wheat and rice grains under salt stress. *Sci Rep* 13:2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26039-8>
- McDonald BG, Chapman PM (2002) PAH phototoxicity - An ecologically irrelevant phenomenon? *Mar Pollut Bull* 44:1321–1326. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00358-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00358-2)
- McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC (2000) The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182:2702–2708. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2702-2708.2000>
- Mech A, Rauscher H, Rasmussen K, Babick F, Hodoroaba V-D, Ghanem A, Wohlleben W, Marvin H, Brüngel R, Friedrich CM (2020a) The NanoDefine methods manual. Eur Comm Jt Res Centre, Publ Off Eur Union Luxembg. <https://doi.org/10.2760/79490>
- Mech A, Wohlleben W, Ghanem A, Hodoroaba V, Weigel S, Babick F, Brüngel R, Friedrich CM, Rasmussen K, Rauscher H (2020b) Nano or not nano? A structured approach for identifying nanomaterials according to the European Commission's Definition. *Small* 16:2002228. <https://doi.org/10.1002/sml.202002228>
- Melita M, Amalfitano S, Preziosi E, Ghergo S, Frollini E, Parrone D, Zoppini A (2019) Physiological profiling and functional diversity of groundwater microbial communities in a municipal solid waste landfill area. *Water* 11. <https://doi.org/10.3390/w11122624>
- Metzler DM, Li M, Erdem A, Huang CP (2011) Responses of algae to photocatalytic nano-TiO<sub>2</sub> particles with an emphasis on the effect of particle size. *Chem Eng J* 170:538–546. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.02.002>
- Miao L, Wang P, Wang C, Hou J, Yao Y, Liu J, Lv B, Yang Y, You G, Xu Y, Liu Z, Liu S (2018) Effect of TiO<sub>2</sub> and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on the metabolic activity of surficial sediment microbial communities based on oxygen microelectrodes and high-throughput sequencing. *Water Res* 129:287–296. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.014>
- 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>
- Mokkapatı VRSS, Pandit S, Kim J, Martensson A, Lovmar M, Westerlund F, Mijakovic I (2018) Bacterial response to graphene oxide and reduced graphene oxide integrated in agar plates. *R Soc Open Sci* 5. <https://doi.org/10.1098/rsos.181083>
- Moll J, Klingenfuss F, Widmer F, Gogos A, Bucheli TD, Hartmann M, van der Heijden MGA (2017) Effects of titanium dioxide nanoparticles on soil microbial communities and wheat biomass. *Soil Biol Biochem* 111:85–93. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.019>

- Mortimer M, Petersen E, Buchholz BA, Orias E, Holden PA (2016) Bioaccumulation of multiwall carbon nanotubes in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding or trophic transfer. *Environ Sci Technol*. 50:16. 8876-85. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01916>.
- Mosmeri H, Gholami F, Shavandi M, Dastgheib SMM, Alaie E (2019) Bioremediation of benzene-contaminated groundwater by calcium peroxide (CaO<sub>2</sub>) nanoparticles: Continuous-flow and biodiversity studies. *J Hazard Mater* 371:183–190. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.071>
- Mou B, Gong G, Wu S (2023) Biodegradation mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbons: Combination of instrumental analysis and theoretical calculation. *Chemosphere* 341:140017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140017>
- Mrozik A, Piotrowska-Seget Z (2010) Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol Res* 165:363–375. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.001>
- Mukhopadhyay R, Sarkar B, Khan E, Alessi DS, Biswas JK, Manjaiah KM, Eguchi M, Wu KCW, Yamauchi Y, Ok YS (2022) Nanomaterials for sustainable remediation of chemical contaminants in water and soil. *Crit Rev Environ Sci Technol* 52:2611–2660. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1886891>
- Murali M, Gowtham HG, Singh SB, Shilpa N, Aiyaz M, Alomary MN, Alshamrani M, Salawi A, Almoshari Y, Ansari MA, Amruthesh KN (2022) Fate, bioaccumulation and toxicity of engineered nanomaterials in plants: Current challenges and future prospects. *Sci Total Environ* 811:152249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152249>
- Muratçobanoğlu H, Gökçek ÖB, Mert RA, Zan R, Demirel S (2021) The impact of reduced graphene oxide (rGO) supplementation on cattle manure anaerobic digestion: Focusing on process performance and microbial syntrophy. *Biochem Eng J* 173:108080. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108080>
- Muter O (2023) Current trends in bioaugmentation tools for bioremediation: A critical review of advances and knowledge gaps. *Microorganisms* 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030710>
- Nagy KK, Takács K, Németh I, Varga B, Grolmusz V, Molnár M, Vértessy BG (2024) Novel enzymes for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons identified by metagenomics and functional analysis in short-term soil microcosm experiments. *Sci Rep* 14:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61566-6>
- Naik K, Kowshik M (2014) Anti-quorum sensing activity of AgCl-TiO<sub>2</sub> nanoparticles with potential use as active food packaging material. *J Appl Microbiol* 117:972–983. <https://doi.org/10.1111/jam.12589>
- Narsing Rao MP, Xiao M, Li WJ (2017) Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. *Front Microbiol* 8:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01113>
- Nazir MA, Hasan M, Mustafa G, Tariq T, Ahmed MM, Golzari Dehno R, Ghorbanpour M (2024) Zinc oxide nano-fertilizer differentially effect on morphological and physiological identity of redox-enzymes and biochemical attributes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci Rep* 14:13091. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63987-9>
- Neal MS, Zhu J, Foster WG (2008) Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the

- serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers. *Reprod Toxicol* 25:100–106. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.10.012>
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104:313–322. <https://doi.org/10.1128/jb.104.1.313-322.1970>
- 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. <https://doi.org/10.3390/nano11071777>
- 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. <https://doi.org/10.3390/nano13212858>
- Netotea S, Bertani I, Steindler L, Kerényi Á, Venturi V, Pongor S (2009) A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: Modeling bacterial swarming as the movement of an “activation zone.” *Biol Direct* 4. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-6>
- New WX, Ogbezode JE, Gani P (2023) Nanoparticles in soil remediation: Challenges and opportunities. *Ind Domest Waste Manag* 3:127–140. <https://doi.org/10.53623/idwm.v3i2.357>
- Newman MC, Zhao Y (2008) Ecotoxicology nomenclature: LC, LD, LOC, LOEC, MAC. In: Jørgensen SE, Fath BDBT-E of E (eds). Academic Press, Oxford, pp 1187–1193. [https://www.vims.edu/people/newman\\_mc/pubs/NewmanZhao2008Encyclo.pdf](https://www.vims.edu/people/newman_mc/pubs/NewmanZhao2008Encyclo.pdf)
- Nielsen MB, Skjolding L, Baun A, Hansen SF (2023) NanoImpact European nanomaterial legislation in the past 20 years – Closing the final gaps. *NanoImpact* 32:100487. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2023.100487>
- Nigam VK, Shukla P (2015) Enzyme based biosensors for detection of environmental pollutants - A review. *J Microbiol Biotechnol* 25:1773–1781. <https://doi.org/10.4014/jmb.1504.04010>
- Nnaji CO, Jeevanandam J, Chan YS, Danquah MK, Pan S, Barhoum A (2018) Engineered nanomaterials for wastewater treatment: current and future trends. In: Barhoum A, Hamdy Makhoulouf ASBT-F of N (eds) *Micro and Nano Technologies*. Chapter 6. Elsevier, pp 129–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51255-8.00006-9>
- Nowack B, Bucheli TD (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut* 150:5–22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>
- Nowakowski M, Rykowska I, Wolski R, Andrzejewski P (2022) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives (O-PAHs, N-PAHs, OH-PAHs): determination in suspended particulate matter (SPM) – A review. *Environ Process* 9. <https://doi.org/10.1007/s40710-021-00555-7>
- O’Toole GA (2010) Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp* 3–5. <https://doi.org/10.3791/2437>
- OECD (2006) Test No. 208: Terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling growth test. In: OECD Guidelines for the testing of chemicals. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd.org/en/publications/test-no-208-terrestrial-plant-test-seedling->

emergence-and-seedling-growth-test\_9789264070066-en.html

- OECD (2009) Preliminary review of OECD test guidelines for their applicability to manufactured nanomaterials. OECD Publishing, Paris. [https://www.oecd.org/en/publications/preliminary-review-of-oecd-test-guidelines-for-their-applicability-to-manufactured-nanomaterials\\_b1b0e314-en.html](https://www.oecd.org/en/publications/preliminary-review-of-oecd-test-guidelines-for-their-applicability-to-manufactured-nanomaterials_b1b0e314-en.html)
- OECD (2017) Recommendation of the council on the safety testing and assessment of manufactured nanomaterials. 1–8. <https://legalinstruments.oecd.org/public/doc/298/298.en.pdf>
- OECD OECD Guidelines for the testing of chemicals. [https://www.oecd.org/en/publications/serials/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-1\\_g1gha292.html](https://www.oecd.org/en/publications/serials/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-1_g1gha292.html)
- Oleszczuk P, Czech B, Kończak M, Bogusz A, Siatecka A, Godlewska P, Wiesner M (2019) Impact of ZnO and ZnS nanoparticles in sewage sludge-amended soil on bacteria, plant and invertebrates. *Chemosphere* 237:124359. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124359>
- Oliveira MLS, Dotto GL, Pinto D, Neckel A, Silva LFO (2021) Nanoparticles as vectors of other contaminants in estuarine suspended sediments: Natural and real conditions. *Mar Pollut Bull* 168:112429. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112429>
- Omara AE-D, Elsakhawy T, Alshaal T, El-Ramady H, Kovács Z, Fári M (2019) Nanoparticles: A novel approach for sustainable agro-productivity. *Environ Biodivers Soil Secur* 3:29–62. <https://doi.org/10.21608/jenvbs.2019.7478.1050>
- Oro CED, Puton BMS, Venquiaruto LD, Dallago M, Tres M V (2024) Effective microbial strategies to remediate contaminated agricultural soils and conserve functions. *Agronomy* 14:11. 2637. <https://doi.org/10.3390/agronomy14112637>
- Ou L, Song B, Liang H, Liu J, Feng X, Deng B, Sun T, Shao L (2016) Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Part Fibre Toxicol* 13:57. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0168-y>
- Padhye LP, Jasemizad T, Bolan S, Tsyusko O V, Unrine JM, Biswal BK, Balasubramanian R, Zhang Y, Zhang T, Zhao J, Li Y, Rinklebe J, Wang H, Siddique KHM, Bolan N (2023) Silver contamination and its toxicity and risk management in terrestrial and aquatic ecosystems. *Sci Total Environ* 871:161926. [/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161926](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161926)
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F (2002) Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2720–2722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>
- Pandey AC, S. Sanjay S, S. Yadav R (2010) Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum*. *J Exp Nanosci* 5:488–497. <https://doi.org/10.1080/17458081003649648>
- Pandya P, Kumar S, Patil G, Mankad M, Shah Z (2024) Impact of ZnO nanopriming on physiological and biochemical traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *CABI Agric Biosci*. <https://doi.org/10.1186/s43170-024-00228-z>
- Papenfort K, Bassler BL (2016) Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative

- bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14:576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Park JM, Trevor Sewell B, Benedik MJ (2017) Cyanide bioremediation: the potential of engineered nitrilases. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:3029–3042. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8204-x>
- Patel AB, Shaikh S, Jain KR, Desai C, Madamwar D (2020) Polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, toxicity, and remediation approaches. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813>
- Paterson G, Ataria JM, Hoque ME, Burns DC, Metcalfe CD (2011) The toxicity of titanium dioxide nanopowder to early life stages of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 82:1002–1009. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.068>
- Patil SS, Shedbalkar UU, Truskewycz A, Chopade BA, Ball AS (2016) Nanoparticles for environmental clean-up: A review of potential risks and emerging solutions. *Environ Technol Innov* 5:10–21. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.11.001>
- Paudics A, Farah S, Bertóti I, Farkas A, László K, Mohai M, Sáfrán G, Szilágyi A, Kubinyi M (2021) Fluorescence probing of binding sites on graphene oxide nanosheets with Oxazine 1 dye. *Appl Surf Sci* 541. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.148451>
- Peijnenburg WJGM, Baalousha M, Chen J, Chaudry Q, Von der kammer F, Kuhlbusch TAJ, Lead J, Nickel C, Quik JTK, Renker M, Wang Z, Koelmans AA (2015) A Review of the properties and processes determining the fate of engineered nanomaterials in the aquatic environment. *Crit Rev Environ Sci Technol* 45:2084–2134. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1010430>
- Pelin M, Fusco L, León V, Martín C, Criado A, Sosa S, Vázquez E, Tubaro A, Prato M (2017) Differential cytotoxic effects of graphene and graphene oxide on skin keratinocytes. *Sci Rep* 7:40572. <https://doi.org/10.1038/srep40572>
- Peng C, Hu W, Zhou Y, Fan C, Huang Q (2010) Intracellular imaging with a graphene-based fluorescent probe. *Small* 6:1686–1692. <https://doi.org/10.1002/smll.201000560>
- Peng Y-H, Tsai Y-C, Hsiung C-E, Lin Y-H, Shih Y (2017) Influence of water chemistry on the environmental behaviors of commercial ZnO nanoparticles in various water and wastewater samples. *J Hazard Mater* 322:348–356. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.003>
- Pérez-Pérez M, Jorge P, Pérez Rodríguez G, Pereira MO, Lourenço A (2017) Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: new insights through network mining. *Biofouling* 33:128–142. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1272104>
- Phatak KA, Kumar P, Nath BB (2024) Nano-Structures & Nano-Objects ZnO nanoparticles : A key ingredient of sunscreen shows absence of adverse effects on *Drosophila* melanization pathway. *Nano-Structures & Nano-Objects* 38:101145. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2024.101145>
- Picocchi D (2018) Tiny things with a huge impact: The international regulation of nanomaterials. *Mich. J. Env't. & Admin. L.* 447. 7. <https://repository.law.umich.edu/mjeal/vol7/iss2/7>
- Polonini HC, Brayner R (2015) Nanoecotoxicology: The state of the art. In: Rai M, Ribeiro C, Mattoso L, Duran N (eds). *Nanotechnologies in food and agriculture*. Springer International Publishing, Cham, pp 301–319. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14024->

- Prasad TNVK V, Sudhakar P, Sreenivasulu Y, Latha P, Munaswamy V, Reddy KR, Sreepasad TS, Sajanalal PR, Pradeep T (2012) Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J Plant Nutr* 35:905–927. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663443>
- Prateeksha, Singh BR, Shoeb M, Sharma S, Naqvi AH, Gupta VK, Singh BN (2017) Scaffold of selenium nanovectors and honey phytochemicals for inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and biofilm formation. *Front Cell Infect Microbiol* 7:1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00093>
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. *FEMS Microbiol Ecol* 42:1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00990.x>
- Priyanka KP, Sukirtha TH, Balakrishna KM, Varghese T (2016) Microbicidal activity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles synthesised by sol–gel method. *IET Nanobiotechnology* 10:81–86. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0038>
- Qais F, Khan M, Ahmad I (2018) Nanoparticles as quorum sensing inhibitor: Prospects and limitations. In: Biotechnological applications of quorum sensing inhibitors. pp 227–244. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4_11)
- Qiang S, Li Z, Zhang L, Luo D, Geng R, Zeng X, Liang J, Li P, Fan Q (2021) Cytotoxic effect of graphene oxide nanoribbons on *Escherichia coli*. *Nanomaterials* 11:1–12. <https://doi.org/10.3390/nano11051339>
- Rafeeq H, Afsheen N, Rafique S, Arshad A, Intisar M, Hussain A, Bilal M, Iqbal HMN (2023) Genetically engineered microorganisms for environmental remediation. *Chemosphere* 310:136751. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136751>
- Rai-Kalal P, Jajoo A (2021) Priming with zinc oxide nanoparticles improve germination and photosynthetic performance in wheat. *Plant Physiol Biochem* 160:341–351. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.032>
- Rajakumar G, Rahuman AA, Roopan SM, Khanna VG, Elango G, Kamaraj C, Zahir AA, Velayutham K (2012) Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 91:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.01.011>
- Rajakumari R, Tharayil A, Thomas S, Kalarikkal N (2020) Toxicity of graphene based nanomaterials — A general overview of origin, exposure and mechanisms. In: Hussain CMBT-CAC (ed) Analytical applications of graphene for comprehensive analytical chemistry, Chapter 12. Elsevier, 91 281–325. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2020.09.004>
- Rajapakse K, Drobne D, Valant J, Vodovnik M, Levart A, Marinsek-Logar R (2012) Acclimation of *Tetrahymena thermophila* to bulk and nano-TiO<sub>2</sub> particles by changes in membrane fatty acids saturation. *J Hazard Mater* 221–222:199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.029>
- Rajkumari J, Magdalane CM, Siddhardha B, Madhavan J, Ramalingam G, Al-Dhabi NA, Arasu MV, Ghilan AKM, Duraipandiayan V, Kaviyarasu K (2019) Synthesis of titanium oxide nanoparticles using *Aloe barbadensis* mill and evaluation of its antibiofilm potential against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Photochem Photobiol B Biol* 201:111667.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111667>

- 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.aoad.2020.08.001>
- Rajput VD, Kumari S, Minkina T, Sushkova S, Mandzhieva S (2023) Nano-enhanced Microbial remediation of PAHs contaminated soil. *Air, Soil Water Res* 16. <https://doi.org/10.1177/11786221231170099>
- Raliya R, Tarafdar JC (2013) ZnO Nanoparticle Biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Agric Res* 2:48–57. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0049-z>
- Ramezani M, Rad FA, Ghahari S, Ghahari S, Ramezani M (2021) Nano-bioremediation application for environment contamination by microorganism - Microbial rejuvenation of polluted environment: Volume 2. In: Panpatte DG, Jhala YK (eds). Springer Singapore, Singapore, 349–378. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7455-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7455-9_14)
- Ranc B, Faure P, Croze V, Lorgeoux C, Simonnot MO (2017) Comparison of the effectiveness of soil heating prior or during *in situ* chemical oxidation (ISCO) of aged PAH-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res* 24:11265–11278. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8731-0>
- Rao MA, Scelza R, Scotti R, Gianfreda L (2010) Role of Enzymes in the remediation of polluted environments. *J soil Sci plant Nutr* 10:3. 333–353. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100008>
- Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M (2015) The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int* 759348. 17. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- Rasmussen K, Rauscher H, Kearns P, González M, Riego Sintes J (2019) Developing OECD test guidelines for regulatory testing of nanomaterials to ensure mutual acceptance of test data. *Regul Toxicol Pharmacol* 104:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.02.008>
- Rasmussen K, Rauscher H, Mech A, Riego Sintes J, Gilliland D, González M, Kearns P, Moss K, Visser M, Groenewold M, Bleeker EAJ (2018) Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials - Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD testing programme. *Regul Toxicol Pharmacol* 92:8–28. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.019>
- Rauscher H, Mech A, Gibson N, Gilliland D, Held A, Kestens V, Koeber R, Linsinger TPJ, Stefaniak EA (2019a) Identification of nanomaterials through measurements. *Publ Off Eur Union*. <https://doi.org/10.2760/053982>
- Rauscher H, Rasmussen K, Sokull-Klüttgen B (2017) Regulatory aspects of nanomaterials in the EU. *Chemie Ing Tech* 89:224–231. <https://doi.org/10.1002/cite.201600076>
- Rauscher H, Roebben G, Mech A, Gibson N, Kestens V, Linsinger TPJ, Sintes JR (2019b) An overview of concepts and terms used in the European Commission's definition of nanomaterial. *Publ Off Eur Union* 1–44. <https://doi.org/10.2760/459136>
- Raut SS, Singh R, Lekhak UM (2024) Next sustainability naturally occurring nanoparticles (

- NONPs ): A review. *Next Sustain* 3:100037. <https://doi.org/10.1016/j.nxsust.2024.100037>
- Rayu S, Karpouzas DG, Singh BK (2012) Emerging technologies in bioremediation: Constraints and opportunities. *Biodegradation* 23:917–926. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9576-3>
- Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A (2007) Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl Phys Lett* 90:213902. <https://doi.org/10.1063/1.2742324>
- Reinhart DR, Berge ND, Santra S, Bolyard SC (2010) Emerging contaminants: Nanomaterial fate in landfills. *Waste Manag* 30:2020–2021. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.08.004>
- Reizer E, Viskolcz B, Fiser B (2022) Formation and growth mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbons: A mini-review. *Chemosphere* 291:132793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132793>
- Ren W, Chang H, Li L, Teng Y (2020) Effect of graphene oxide on growth of wheat seedlings: Insights from oxidative stress and physiological flux. *Bull Environ Contam Toxicol* 105:139–145. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02888-9>
- Ren W, Ren G, Teng Y, Li Z, Li L (2015) Time-dependent effect of graphene on the structure, abundance, and function of the soil bacterial community. *J Hazard Mater* 297:286–294. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.017>
- Riaz U, Iqbal S, Shahzad L, Samreen T, Abbasi WM (2021) Chapter 8 - Health and safety hazards of nanomaterials. In: Tahir MB, Sagir M, Asiri Characterization, Hazards and Safety AMBT-NS (eds) Micro and Nano Technologies. Elsevier, 223–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823823-3.00012-4>
- Roh J-Y, Park Y-K, Park K, Choi J (2010) Ecotoxicological investigation of CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. *Environ Toxicol Pharmacol* 29:167–172. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.12.003>
- Romero-Silva M, Agulló V, Méndez V, Seeger M (2013) Genomic and functional analyses of the gentisate and protocatechuate ring-cleavage pathways and related 3-Hydroxybenzoate and 4-Hydroxybenzoate peripheral pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLoS One* 8:2. e56038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056038>
- Rönkkö Topi, Timonen Hilka (2019) Overview of sources and characteristics of nanoparticles in urban traffic-influenced areas. *J Alzheimer's Dis* 72:15–28. <https://doi.org/10.3233/JAD-190170>
- 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>
- Ros M, Goberna M, Pascual JA, Klammer S, Insam H (2008) 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *J Microbiol Methods* 72:221–226. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.003>
- Roupcová P, Kubátová H, Klouda K, Lepík P (2017) Phytotoxicological tests - Applications of foils based on graphene (graphene oxide). *Trans VŠB – Tech Univ Ostrava, Saf Eng Ser* 11:6–14. <https://doi.org/10.1515/tvsbses-2016-0011>

- Russo V, Hmoudah M, Broccoli F, Iesce MR, Jung OS, Di Serio M (2020) Applications of metal organic frameworks in wastewater treatment: A review on adsorption and photodegradation. *Front Chem Eng* 2:1–13. <https://doi.org/10.3389/fceng.2020.581487>
- Sabat D, Patnaik A, Ekka B, Dash P, Mishra M (2016) Investigation of titania nanoparticles on behaviour and mechanosensory organ of *Drosophila melanogaster*. *Physiol Behav* 167:76–85. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.08.032>
- Sadiq IM, Dalai S, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2011) Ecotoxicity study of titania (TiO<sub>2</sub>) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* *Ecotoxicol Environ Saf* 74:1180–1187. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.006>
- Salam A, Khan AR, Liu L, Yang S, Azhar W, Ulhassan Z, Zeeshan M, Wu J, Fan X, Gan Y (2022) Seed priming with zinc oxide nanoparticles downplayed ultrastructural damage and improved photosynthetic apparatus in maize under cobalt stress. *J Hazard Mater* 423:127021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127021>
- Saleem S, Malik A, Khan ST (2023) ZnO nanoparticles in combination with Zn biofertilizer improve wheat plant growth and grain Zn content without significantly changing the rhizospheric microbiome. *Environ Exp Bot* 213:105446. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105446>
- 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>
- Samaniego Andrade SK, Lakshmi SS, Bakos I, Klébert S, Kun R, Mohai M, Nagy B, László K (2023) The influence of reduced graphene oxide on the texture and chemistry of N,S-doped porous carbon. Implications for electrocatalytic and energy storage applications. *Nanomaterials* 13:16. 2364. <https://doi.org/10.3390/nano13162364>
- Samanta S, Singh BR, Adholeya A (2017) Intracellular synthesis of gold nanoparticles using an ectomycorrhizal strain EM-1083 of *Laccaria fraterna* and its nanoanti-quorum sensing potential against *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Microbiol* 57:448–460. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0662-4>
- Samarasinghe SVAC, Krishnan K, Aitken RJ, Naidu R, Megharaj M (2023) Chronic effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles to earthworm *Eisenia fetida*. *Environ Chem Ecotoxicol* 5:129–134. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2023.04.001>
- Sanchez VC, Jachak A, Hurt RH, Kane AB (2012) Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials: An Interdisciplinary Review. *Chem Res Toxicol* 25:15–34. <https://doi.org/10.1021/tx200339h>
- Saravanan A, Kumar PS, Vo D-VN, Jeevanantham S, Karishma S, Yaashikaa PR (2021) A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes. *J Hazard Mater* 419:126451. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126451>
- Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: Biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 41:463–476. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02532.x>
- Schirmer K, Auffan M (2015) Nanotoxicology in the environment. *Environ Sci Nano* 2:561–

563. <https://doi.org/10.1039/C5EN90023A>

- Schneider T, Mittag A, Westermann M, Gleis M (2021) Impact of pH changes on metal oxide nanoparticle behaviour during artificial digestion. *Food Funct* 12:1452–1457. <https://doi.org/10.1039/D0FO02842H>
- Sembada AA, Lenggono IW (2024) Transport of nanoparticles into plants and their detection methods. *Nanomaterials* 14. <https://doi.org/10.3390/nano14020131>
- Seo J, Keum Y, Li QX (2009) Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res Public Health*. 6:1. 278–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>
- Sepahi MM, Azizi M (2024) Graphene oxide nanotoxicity: A comprehensive analysis. In: Wambu EW (ed). *Chemistry of Graphene - Synthesis, reactivity, applications and toxicities*. IntechOpen, Rijeka. <https://doi.org/10.5772/intechopen.114205>
- Serov DA, Gritsaeva A V, Yanbaev FM, Simakina A V, Gudkov S V (2024) Review of antimicrobial properties of Titanium dioxide nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 25:19. 10519. <https://doi.org/10.3390/ijms251910519>
- Shaaban M, Elgaml A, Habib ESE (2019) Biotechnological applications of quorum sensing inhibition as novel therapeutic strategies for multidrug resistant pathogens. *Microb Pathog* 127:138–143. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.043>
- Shade A, Peter H, Allison SD, Baho DL, Berga M, Bürgmann H, Huber DH, Langenheder S, Lennon JT, Martiny JBH, Matulich KL, Schmidt TM, Handelsman J (2012) Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol* 3:1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>
- Shah V, Jones J, Dickman J, Greenman S (2014) Response of soil bacterial community to metal nanoparticles in biosolids. *J Hazard Mater* 274:399–403. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.003>
- Shaheen R, Asgher M, Hussain F, Bhatti HN (2017) Immobilized lignin peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05 with improved dye decolorization and cytotoxicity reduction properties. *Int J Biol Macromol* 103:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.040>
- Shammi M, Rahman MM, Tareq SM (2021) Distribution of bioaerosols in association with particulate matter: A review on emerging public health threat in Asian megacities. *Front Environ Sci* 9. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.698215>
- Shams A, Fischer A, Bodnar A, Kliegman M (2024) Perspectives on genetically engineered microorganisms and their regulation in the United States. *ACS Synth Biol* 13:1412–1423. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.4c00048>
- Shao C, Wang Q, Zhang W, Bennett A, Li Y, Guo J, Im HG, Roberts WL, Violi A, Sarathy SM (2023) Elucidating the polycyclic aromatic hydrocarbons involved in soot inception. *Commun Chem* 6:1–8. <https://doi.org/10.1038/s42004-023-01017-x>
- Shao G, Nymark P (2023) Review of regulation relevant to nanomaterials in the EU and Sweden. *Swedish Natl Platf Nanosafety* 1. <https://ki.se/media/258693/download>
- Sharma B, Dangi AK, Shukla P (2018) Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *J Environ Manage* 210:10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.075>

- Sharma V, Kumar A, Dhawan A (2012) Nanomaterials: exposure, effects and toxicity assessment. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci* 82:3–11. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0072-7>
- Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE, Rinehart KL, Farrand SK (1997) Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci* 94:6036–6041. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6036>
- Shen Z, Chen Z, Hou Z, Li T, Lu X (2015) Ecotoxicological effect of zinc oxide nanoparticles on soil microorganisms. *Front Environ Sci Eng* 9:912–918. <https://doi.org/10.1007/s11783-015-0789-7>
- Sher S, Waseem M, Leta MK (2023) Review of techniques for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from produced water. *Environments* 10:40. <https://doi.org/10.3390/environments10030040>
- Shi Y, Xiao Y, Li Z, Zhang X, Liu T, Li Y, Pan Y, Yan W (2021) Microorganism structure variation in urban soil microenvironment upon ZnO nanoparticles contamination. *Chemosphere* 273:128565. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128565>
- Shome S, Talukdar A Das, Nath R, Tewari S (2023) Curcumin-ZnO nanocomposite mediated inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and its mechanism of action. *J Drug Deliv Sci Technol* 81:104301. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104301>
- Silva ÍS, Santos E da C dos, Menezes CR de, Faria AF de, Franciscan E, Grossman M, Durrant LR (2009) Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresour Technol* 100:4669–4675. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.079>
- Simonin M, Martins JMF, Le Roux X, Uzu G, Calas A, Richaume A (2017) Toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on soil nitrification at environmentally relevant concentrations: Lack of classical dose–response relationships. *Nanotoxicology* 11:247–255. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1290845>
- Simonin M, Martins JMF, Uzu G, Vince E, Richaume A (2016) Combined Study of Titanium dioxide nanoparticle transport and toxicity on microbial nitrifying communities under single and repeated exposures in soil columns. *Environ Sci Technol* 50:10693–10699. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02415>
- Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TGG, Wright CJ, Doak SH (2009) NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30:3891–3914. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>
- Singh RK, Tiwari MK, Singh R, Lee JK (2013) From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *Int J Mol Sci* 14:1232–1277. <https://doi.org/10.3390/ijms14011232>
- Singh S (2023) Chapter 9 - Adverse effects of nanoparticles on human health and the environment. In: ul Islam A, Hussain CH, Shukla SK,(eds). Antiviral and antimicrobial coatings based on functionalized nanomaterials, Elsevier, pp 305–330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91783-4.00016-4>
- Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, Hasan H, Mohamad D (2015) Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity

- mechanism. *Nano-Micro Lett* 7:219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
- Skoronski E, Souza DH, Ely C, Broilo F, Fernandes M, Fúrigo A, Ghislandi MG (2017) Immobilization of laccase from *Aspergillus oryzae* on graphene nanosheets. *Int J Biol Macromol* 99:121–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.076>
- Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H (2017) Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology* 15:1–20. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>
- Smita S, Gupta SK, Bartonova A, Dusinska M, Gutleb AC, Rahman Q (2012) Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environ Heal* 11:S13. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-S1-S13>
- Solanki P, Laura JS (2018) Effect of ZnO nanoparticles on seed germination and seedling growth in wheat (*Triticum aestivum*). *J Pharmacogn Phytochem* 7:2048–2052. <https://www.phytojournal.com/archives/2018.v7.i5.5863/effect-of-zno-nanoparticles-on-seed-germination-and-seedling-growth-in-wheat-ltemgttriticum-aestivumltemgt>
- Sombiri S, Balhara N, Attri D, Kharb I, Giri A (2024) An overview on occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in food chain with special emphasis on human health ailments. *Discov Environ* 2:87. <https://doi.org/10.1007/s44274-024-00121-6>
- Song J, Duan C, Sang Y, Wu S, Ru J, Cui X (2018) Effects of graphene on bacterial community diversity and soil environments of haplic cambisols in Northeast China. *Forests* 9:11, 677. <https://doi.org/10.3390/f9110677>
- Souza I da C, Morozesk M, Mansano AS, Mendes VAS, Azevedo VC, Matsumoto ST, Elliott M, Monferrán M V, Wunderlin DA, Fernandes MN (2021) Atmospheric particulate matter from an industrial area as a source of metal nanoparticle contamination in aquatic ecosystems. *Sci Total Environ* 753:141976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141976>
- Souza JP, Mansano AS, Venturini FP, Santos F, Zucolotto V (2019) Antioxidant metabolism of zebrafish after sub-lethal exposure to graphene oxide and recovery. *Fish Physiol Biochem* 45:1289–1297. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00678-7>
- Souza JP, Venturini FP, Santos F, Zucolotto V (2018) Chronic toxicity in *Ceriodaphnia dubia* induced by graphene oxide. *Chemosphere* 190:218–224. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.018>
- Srikanth K, Sundar LS, Pereira E, Duarte AC (2018) Graphene oxide induces cytotoxicity and oxidative stress in bluegill sunfish cells. *J Appl Toxicol* 38:504–513. <https://doi.org/10.1002/jat.3557>
- Stefanowicz A (2006) The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. *Polish J Environ Stud* 15:669–676. <https://www.pjoes.com/pdf-87919-21778?filename=The%20Biolog%20Plates.pdf>
- Strekalovskaya EI, Perfileva AI, Krutovsky K V. (2024) Zinc oxide nanoparticles in the “Soil–Bacterial community–plant” system: Impact on the stability of soil ecosystems. *Agronomy* 14. <https://doi.org/10.3390/agronomy14071588>
- Subbaiah LV, Prasad TNVKV, Krishna TG, Sudhakar P, Reddy BR, Pradeep T (2016) Novel effects of nanoparticulate delivery of zinc on growth, oroductivity, and zinc biofortification in Maize (*Zea mays* L.). *J Agric Food Chem* 64:3778–3788.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00838>

- Sun TY, Gottschalk F, Hungerbühler K, Nowack B (2014) Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ Pollut* 185:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>
- Sun TY, Bornhöft NA, 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>
- Sutcliffe B, Hose GC, Harford AJ, Midgley DJ, Greenfield P, Paulsen IT, Chariton AA (2019) Microbial communities are sensitive indicators for freshwater sediment copper contamination. *Environ Pollut* 247:1028–1038. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.104>
- Szymańska R, Kołodziej K, Ślesak I, Zimak-Piekarczyk P, Orzechowska A, Gabruk M, Żądło A, Habina I, Knap W, Burda K, Kruk J (2016) Titanium dioxide nanoparticles (100–1000 mg/l) can affect vitamin E response in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Pollut* 213:957–965. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.026>
- Takhar V, Singh S (2025) Nanomaterials ROS: a comprehensive review for environmental applications. *Environ Sci Nano* 12:2516–2550. <https://doi.org/10.1039/D5EN00049A>
- Talagrand-Reboul E, Jumas-Bilak E, Lamy B (2017) The social life of *Aeromonas* through biofilm and quorum sensing systems. *Front Microbiol* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00037>
- Tang L, Zhang X, Li Z, Gudda FO, Waigi MG, Wang J, Liu H, Gao Y (2022) Enhanced PAHs-contaminated site soils remediation by mixed persulfate and calcium peroxide. *J Environ Manage* 306:114363. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114363>
- Tesfaye EL, Bogale FM, Aragaw TA (2025) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: The role of ligninolytic enzymes and advances of biosensors for *in-situ* monitoring. *Emerg Contam* 11:100424. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2024.100424>
- Theng BKG, Yuan G (2008) Nanoparticles in the soil environment. *Elements* 4:6. 395–399. <https://doi.org/10.2113/gselements.4.6.395>
- Thoendel M, Horswill AR (2010) Chapter 4 - Biosynthesis of peptide signals in Gram-positive bacteria. *Adv Appl Microbiol.* 71. 91–112. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)71004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)71004-2)
- Thompson IP, Gast CJ Van Der, Ciric L, Singer AC (2005) Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol* 7:909–915. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x>
- Tiaden A, Hilbi H (2012)  $\alpha$ -hydroxyketone synthesis and sensing by *Legionella* and *Vibrio*. *Sensors* 12:2899–2919. <https://doi.org/10.3390/s120302899>
- Timoshenko A, Kolesnikov S, Rajput VD, Minkina T (2021) Chapter 14 - Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil microbial community and their functionality. In: Abd-Elsalam KA (ed) Nanobiotechnology for plant protection. Zinc-based nanostructures for environmental and agricultural applications Elsevier, pp 267–284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822836-4.00029-X>
- Topuz F (2022) Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from water through

- degradable polycaprolactone electrospun membrane. *Turkish J Chem* 46:2080–2089. <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3504>
- Tourinho PS, van Gestel CAM, Lofts S, Svendsen C, Soares AMVM, Loureiro S (2012) Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ Toxicol Chem* 31:1679–1692. <https://doi.org/10.1002/etc.1880>
- Tran T, Nguyen M, Lin C, Hoang T (2024) Review on fate, transport, toxicity and health risk of nanoparticles in natural ecosystems: Emerging challenges in the modern age and solutions toward a sustainable environment. *Sci Total Environ* 912:169331. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169331>
- Tratnyek PG, Johnson RL (2006) Nanotechnologies for environmental cleanup. *Nano Today* 1:44–48. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(06\)70048-2](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(06)70048-2)
- Truhaut R (1977) Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1:2. 151–173. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(77\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(77)90033-1)
- Tschiche HR, Bierkandt FS, 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 GEM, 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>
- Turan NB, Chormey DS, Büyükpınar Ç, Engin GO, Bakirdere S (2017) Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. *TrAC - Trends Anal Chem* 91:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.007>
- Tymoszuk A, Wojnarowicz J (2020) Zinc oxide and Zinc oxide nanoparticles impact on *in vitro* germination and seedling growth in *Allium cepa* L. *Materials* 13:12. 132784; <https://doi.org/10.3390/ma13122784>
- Valerio-Rodríguez MF, Trejo-Téllez LI, Aguilar-González MÁ, Medina-Pérez G, Zúñiga-Enríquez JC, Ortégón-Pérez A, Fernández-Luqueño F (2020) Effects of ZnO, TiO<sub>2</sub> or Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles on the Body Mass, Reproduction, and Survival of *Eisenia fetida*. *Polish J Environ Stud* 29:2383–2394. <https://doi.org/10.15244/pjoes/100668>
- Van Acker H, Gielis J, Acke M, Cools F, Cos P, Coenye T (2016) The role of reactive oxygen species in antibiotic-induced cell death in *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *PLoS One* 11:e0159837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159837>
- Vásquez-Murrieta MS, Hernández-Hernández OJ, Cruz-Maya JA, Cancino-Díaz JC, Jan-Roblero J (2016) Approaches for removal of PAHs in soils: Bioaugmentation, biostimulation and bioattenuation. In: Larramendy ML, Soloneski S (eds) Soil Contamination. IntechOpen, Rijeka. <https://doi.org/10.5772/64682>
- Vázquez-Núñez E, Molina-Guerrero CE, Peña-Castro JM, Fernández-Luqueño F, de la Rosa-Álvarez MG (2020) Use of nanotechnology for the bioremediation of contaminants: A review. *Processes* 8:1–17. <https://doi.org/10.3390/pr8070826>
- Vejerano EP, Leon EC, Holder AL, Marr LC (2014) Characterization of particle emissions and fate of nanomaterials during incineration. *Environ Sci Nano* 1:133–143. <https://doi.org/10.1039/c3en00080j>
- Venkatraman G, Giribabu N, Mohan PS, Muttiah B, Govindarajan VK, Alagiri M, Abdul

- Rahman PS, Karsani SA (2024) Environmental impact and human health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and remedial strategies: A detailed review. *Chemosphere* 351:141227. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141227>
- Verma Y, Singh SK, Jatav HS, Rajput VD, Minkina T (2022) Interaction of zinc oxide nanoparticles with soil: Insights into the chemical and biological properties. *Environ Geochem Health* 44:221–234. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00929-8>
- Vijay M, Selvarajan V, Ananthapadmanabhan P V, Sreekumar KP, Stengl V, Bondioli F (2010) Bactericidal effects of reactive thermal plasma synthesized titanium dioxide photocatalysts. *J Phys Conf Ser* 208:12143. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/208/1/012143>
- Von Lau E, Gan S, Ng HK, Poh PE (2014) Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. *Environ Pollut* 184:640–649. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.010>
- Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, Pesci EC (2005) Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187:4372–4380. <https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4372-4380.2005>
- Wang A, Pu K, Dong B, Liu Y, Zhang L, Zhang Z, Duan W, Zhu Y (2013) Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene oxide towards human lung fibroblast cells. *J Appl Toxicol* 33:1156–1164. <https://doi.org/10.1002/jat.2877>
- Wang C, Sun H, Liu H, Wang B (2014a) Biodegradation of pyrene by *Phanerochaete chrysosporium* and enzyme activities in soils: Effect of SOM, sterilization and aging. *J Environ Sci* 26:1135–1144. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60507-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60507-0)
- Wang H, Wick RL, Xing B (2009) Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Pollut* 157:1171–1177. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.004>
- Wang H, Zhang Q, Chu X, Chen T, Ge J, Yu R (2011a) Graphene oxide-peptide conjugate as an intracellular protease sensor for caspase-3 activation imaging in live cells. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:7065–7069. <https://doi.org/10.1002/anie.201101351>
- Wang J, Nabi MM, Mohanty SK, Afrooz ARMN, Cantando E, Aich N, Baalousha M (2020a) Detection and quantification of engineered particles in urban runoff. *Chemosphere* 248:126070. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126070>
- Wang J, Zhang X, Zhou X, Waigi MG, Gudda FO, Zhang C, Ling W (2021a) Promoted oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by dual persulfate/calcium peroxide system. *Sci Total Environ* 758:143680. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143680>
- Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z (2007) Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett* 168:176–185. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.12.001>
- Wang P, Zheng Y, Lin P, Li J, Dong H, Yu H, Qi L, Ren L (2021b) Effects of graphite, graphene, and graphene oxide on the anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste: Attention to methane production and the fate of antibiotic resistance genes.

- Bioresour Technol 339:125585. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125585>
- Wang Q, Li C, Wang Y, Que X (2019) Phytotoxicity of graphene family nanomaterials and its mechanisms: A review. *Front Chem* 7:1–7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00292>
- Wang Q, Zhao S, Zhao Y, Rui Q, Wang D (2014b) Toxicity and translocation of graphene oxide in *Arabidopsis* plants under stress conditions. *RSC Adv* 4:60891–60901. <https://doi.org/10.1039/c4ra10621k>
- Wang S, Alenius H, El-Nezami H, Karisola P (2022) A new look at the effects of engineered ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Evidence from transcriptomics studies. *Nanomaterials* 12. <https://doi.org/10.3390/nano12081247>
- Wang X, Xie H, Wang P, Yin H (2023) Nanoparticles in plants: Uptake, transport and physiological activity in leaf and root. *Materials* 16. <https://doi.org/10.3390/ma16083097>
- Wang X, Yang X, Chen S, Li Q, Wang W, Hou C, Gao X, Wang L, Wang S (2016a) Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01243>
- Wang Y, Aker WG, Hwang H, Yedjou CG, Yu H, Tchounwou PB (2011b) A study of the mechanism of *in vitro* cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. *Sci Total Environ* 409:4753–4762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.039>
- Wang Y, Li Z, Wang J, Li J, Lin Y (2011c) Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* 29:205–212. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.01.008>
- Wang Y, Liu R, Dai Y, Chen J, Xiao Y, Bi X, Zou P, Li S (2025) Fire phoenix mediated bioremediation of high-PAHs contaminated soil enhanced by graphene oxide application. *Environ Technol Innov* 37:103933. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103933>
- Wang Y, Zhu X, Lao Y, Lv X, Tao Y, Huang B, Wang J, Zhou J, Cai Z (2016b) TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricorutum*. *Sci Total Environ* 565:818–826. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.164>
- Wang Z, Hu T, Liang R, Wei M (2020b) Application of zero-dimensional nanomaterials in biosensing. 8:1–19. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00320>
- Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Wei X, Cao P, Wang G, Liu Y, Song J, Han J (2021) CuO, ZnO, and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles modified the underground biomass and rhizosphere microbial community of *Salvia miltiorrhiza* (Bge.) after 165-day exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 217:112232. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112232>
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25:365–404. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x>
- Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, Radke K, Salinas E, Zok S, Landsiedel R (2009) Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO<sub>2</sub> and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76:1356–1365.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.025>

- Wolińska AM, Stępniewska Z (2012) Dehydrogenase activity in the soil environment. In: Canuto RA (ed). Dehydrogenases. IntechOpen, Rijeka. <https://doi.org/10.5772/48294>
- Wong SWY, Leung PTY, Djurisić AB, Leung KMY (2010) Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Anal Bioanal Chem* 396:609–618. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3249-z>
- Wu F, Harper BJ, Harper SL (2019a) Comparative dissolution, uptake, and toxicity of zinc oxide particles in individual aquatic species and mixed populations. *Environ Toxicol Chem* 38:591–602. <https://doi.org/10.1002/etc.4349>
- Wu H, Sun B, Li J. (2019b) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in sediments/soils of the rapidly urbanized lower reaches of the river Chaohu, China. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 16(13), 2302. <https://doi.org/10.3390/ijerph16132302>
- Wu Y, Rong X, Zhang C, Zhang R, He T, Yu Y, Zhao Z, Yang J, Han R (2020) Response of the intertidal microbial community structure and metabolic profiles to Zinc oxide nanoparticle exposure. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17:7. 2253. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072253>
- Wu F, Jiao S, Hu J, Wu X, Wang B, Shen G, Yang Y, Tao S, Wang X (2021) Stronger impacts of long-term relative to short-term exposure to carbon nanomaterials on soil bacterial communities. *J Hazard Mater* 410:124550. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124550>
- Wu Y, Rong X, Zhang C, Zhang R, He T, Yu Y, Zhao Z, Yang J, Han R (2020) Response of the intertidal microbial community structure and metabolic profiles to zinc oxide nanoparticle exposure. *Int J Environ Res Public Health* 17:1–15. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072253>
- Xia L, Lenaghan SC, Zhang M, Zhang Z, Li Q (2010) Naturally occurring nanoparticles from English ivy: an alternative to metal-based nanoparticles for UV protection. *J Nanobiotechnol* 8:12. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-12>
- Xie G, Tang X, Shao K, Zhu G, Gao G (2021) Ecotoxicology and environmental safety bacterial diversity, community composition and metabolic function in Lake Tianmuhu and its dammed river: Effects of domestic wastewater and damming. *Ecotoxicol Environ Saf* 213:112069. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112069>
- Xie Y, Yiping H, L. IP, Tony J, Xianming S (2011) Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 77:2325–2331. <https://doi.org/10.1128/AEM.02149-10>
- Xiong D, Fang T, Yu L, Sima X, Zhu W (2011) Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci Total Environ* 409:1444–1452. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.015>
- Xiong T, Yuan X, Wang H, Leng L, Li H, Wu Z, Jiang L, Xu R, Zeng G (2018) Implication of graphene oxide in Cd-contaminated soil: A case study of bacterial communities. *J Environ Manage* 205:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.067>
- Xu J, Luo X, Wang Y, Feng Y (2018) Evaluation of zinc oxide nanoparticles on lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth and soil bacterial community. *Environ Sci Pollut Res* 25:6026–6035. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0953-7>

- Xue C, Li L, Guo C, Gao Y, Yang C, Deng X, Li X, Tai P, Sun L (2023) Understanding the role of graphene oxide in affecting PAHs biodegradation by microorganisms: An integrated analysis using 16SrRNA, metatranscriptomic, and metabolomic approaches. *J Hazard Mater* 457:131811. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131811>
- Yadav S, Singh Raman AP, Meena H, Goswami AG, Bhawna, Kumar V, Jain P, Kumar G, Sagar M, Rana DK, Bahadur I, Singh P (2022) An update on graphene oxide: Applications and toxicity. *ACS Omega* 7:35387–35445. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03171>
- Yang W, Wang L, Mettenbrink EM, DeAngelis PL, Wilhelm S (2021) Nanoparticle Toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 61:269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338>
- Yang Y, Zhang N, You Q, Chen X, Zhang Y, Zhu L (2023) Novel insights into the multistep chlorination of silver nanoparticles in aquatic environments. *Water Res* 240:120111. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120111>
- Yang Y, Zhang R, Zhang X, Chen Z, Wang H, Li PCH (2022) Effects of graphene oxide on plant growth: A review. *Plants* 11:1–12. <https://doi.org/10.3390/plants11212826>
- Yin J, Fan W, Du J, Feng W, Dong Z, Liu Y, Zhou T (2020) The toxicity of graphene oxide affected by algal physiological characteristics: A comparative study in cyanobacterial, green algae, diatom. *Environ Pollut* 260:113847. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113847>
- Yokota J, Kyotani S (2018) Influence of nanoparticle size on the skin penetration, skin retention and anti-inflammatory activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Chinese Med Assoc* 81:511–519. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2018.01.008>
- Yoon H, Pangging M, Jang MH, Hwang YS, Chang YS (2018) Impact of surface modification on the toxicity of zerovalent iron nanoparticles in aquatic and terrestrial organisms. *Ecotoxicol Environ Saf* 163:436–443. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.099>
- Yu Q, Zhang B, Li J, Du T, Yi X, Li M, Chen W, Alvarez PJJ (2017) Graphene oxide significantly inhibits cell growth at sublethal concentrations by causing extracellular iron deficiency. *Nanotoxicology* 11:1102–1114. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1398357>
- Yujie S, Jian L, Jiafeng Y, Shicai X, Wenning Y, Zhenghua L, Muhammad S (2020) Effect of graphene oxide on the ammonia removal and bacterial community in a simulated wastewater treatment process. *J Environ Eng* 146:4020097. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001781](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001781)
- Yusuf EO, Amber I, Officer S, Oluyemi GF (2024) Transport of nanoparticles in porous media and associated environmental impact: A review. *J Eng Res* 12:275–284. <https://doi.org/10.1016/j.jer.2024.01.006>
- Zabetakis KM, De Guzmán GTN, Torrents A, Yarwood S (2015) Toxicity of zero-valent iron nanoparticles to a trichloroethylene-degrading groundwater microbial community. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* 50:794–805. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1019796>
- Zamani M, Behboudi K, Ahmadzadeh M (2013) Quorum quenching by *Bacillus cereus* U92: A double-edged sword in biological control of plant diseases. *Biocontrol Sci Technol* 23:555–573. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.787046>

- Zare EN, Zheng X, Makvandi P, Gheybi H, Sartorius R, Yiu CKY, Adeli M, Wu A, Zarrabi A, Varma RS, Tay FR (2021) Nonspherical metal-based nanoarchitectures: Synthesis and impact of size, shape, and composition on their biological activity. *Small* 17:e2007073. <https://doi.org/10.1002/sml.202007073>
- Zeng H, Lv Z, Sun X, Tong Y, Wu W, Dong S, Mao L (2024) Predicting bioaccumulation of nanomaterials: Modeling approaches with challenges. *Environ Heal* 2:189–201. <https://doi.org/10.1021/envhealth.3c00138>
- Zhai Y, Hunting ER, Liu G, Baas E, Peijnenburg WJGM, Vijver MG (2019) Compositional alterations in soil bacterial communities exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles are not reflected in functional impacts. *Environ Res* 178:108713. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108713>
- Zhang M, Fu G, Shi W, Feng X, Lens PNL, Zhang B (2024) Microbial response to the chronic toxicity effect of graphene and graphene oxide nanomaterials within aerobic granular sludge systems. *J Hazard Mater* 477:135350. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135350>
- Zhang P, Zhang R, Fang X, Song T, Cai X, Liu H, Du S (2016) Toxic effects of graphene on the growth and nutritional levels of wheat (*Triticum aestivum* L.): short- and long-term exposure studies. *J Hazard Mater* 317:543–551. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.019>
- Zhang R, Zheng X, Fan W, Wang X, Zhao T, Zhao X, Peijnenburg WJGM, Vijver MG, Wang Y (2025) Fate models of nanoparticles in the environment: a critical review and prospects. *Environ Sci Nano*. 7:12. 3394-3412. <https://doi.org/10.1039/D5EN00342C>
- Zhang S, Ning Y, Zhang X, Zhao Y, Yang X, Wu K, Yang S, La G, Sun X, Li X (2015) Contrasting characteristics of anthracene and pyrene degradation by wood rot fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. *Int Biodeterior Biodegrad* 105:228–232. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.09.012>
- Zhang W, Li C (2016) Exploiting quorum sensing interfering strategies in Gram-negative bacteria for the enhancement of environmental applications. *Front Microbiol* 6:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01535>
- Zhang X, Sun H, Zhang Z, Niu Q, Chen Y, Crittenden JC (2007) Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere* 67:160–166. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.003>
- Zhang Y, Meng T, Shi L, Guo X, Si X, Yang R, Quan X (2019) The effects of humic acid on the toxicity of graphene oxide to *Scenedesmus obliquus* and *Daphnia magna*. *Sci Total Environ* 649:163–171. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.280>
- Zhang Z, Chen J, Zhao Y, Wang L, Teng Y, Cai M, Zhao Y, Nikolaev A, Li Y (2022) Determination of 123 polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in atmospheric samples. *Chemosphere* 296:134025. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134025>
- Zhao H, Lei Y (2020) 3D Nanostructures for the next generation of high-performance nanodevices for electrochemical energy conversion and storage. *Adv Energy Mater* 10:2001460. <https://doi.org/10.1002/aenm.202001460>

- Zhao J, Wang X, Hoang SA, Bolan NS, Kirkham MB, Liu J, Xia X, Li Y (2021a) Silver nanoparticles in aquatic sediments: Occurrence, chemical transformations, toxicity, and analytical methods. *J Hazard Mater* 418:126368. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126368>
- Zhao J, Lin M, Wang Z, Cao X, Xing B (2021b) Engineered nanomaterials in the environment: Are they safe? *Crit Rev Environ Sci Technol* 51:1443–1478. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1764279>
- Zhao S, Wang Q, Zhao Y, Rui Q, Wang D (2015) Toxicity and translocation of graphene oxide in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Toxicol Pharmacol* 39:145–156. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.014>
- Zhen Teng, Fan W, Wang H, Cao X, Xu X (2020) Monitoring soil microorganisms with community-level physiological profiles using Biolog EcoPlates™ in Chaohu Lakeside Wetland, East China. *Eurasian Soil Sci* 53:1142–1153. <https://doi.org/10.1134/S1064229320080141>
- Zheng L, Hong F, Lu S, Liu C (2005) Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biol Trace Elem Res* 104:83–91. <https://doi.org/10.1385/BTER:104:1:083>
- 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>
- Zhu X, Zhou J, Cai Z (2011) The toxicity and oxidative stress of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Mar Pollut Bull* 63:334–338. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.006>
- Zöngür A, Er Zeybekler S (2024) Evaluation of the effects of zinc oxide (ZnO NPs) nanoparticles synthesized by green synthesis on *Caenorhabditis elegans*. *Biol Futur* 75:411–423. <https://doi.org/10.1007/s42977-024-00217-3>

## 10. Közlemények

A doktori munka keretében született publikációk (IF, kvartilis, szerzői hányad)

### Lektorált folyóiratcikkek

- **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, 1777. <https://doi.org/10.3390/nano11071777> IF: 5,719; Q1.  
Szerzői hányad: 75%
- **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, 2858. <https://doi.org/10.3390/nano13212858> IF: 4,4; Q1.  
Szerzői hányad: 70%
- 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.  
Szerzői hányad: 60%
- **Németh, I.**, Vaszita, E., Molnár, M. (2025) Influence of nZnO on enzyme-mediated PAH-removal from contaminated soil. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, IF: 1,8; Q3. <https://doi.org/10.3311/PPch.41649>  
Szerzői hányad: 90%
- **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)  
Szerzői hányad: 90%
- 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)  
Szerzői hányad: 100%

### Nem lektorált, ismeretterjesztő folyóiratban megjelent közlemények

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

### Lektorált konferenciakiadványok

- **Németh, I.**, Szikszai, S., Molnár, M. (2022) Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék hatása *Pseudomonas aeruginosa* baktérium életjelenségeire. *XXIII. Nemzetközi*

Konferencia részvételek szóbeli és/vagy poszter előadással

- Szóbeli előadások:

- **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 Magyarországiért Egyesület, Budapest. 2022.04.28.
- **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.
- **Németh, I.**, (2022) Nanorészecskék hatásának felmérése a környezetre és bioremediációs eljárások hatékonyságára. 5. ABÉT Tanszéki Doktoráns Konferencia, Budapest. 2022.01.31.
- **Németh, I.**, Molnár, M. (2022) Nanorészecskék ökotoxikológiai vizsgálata eltérő tesztrendszerekkel. XXV. Tavasz Szél Konferencia, Pécs. 2022.05.06.

- Poszter prezentációk:

- **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 Magyarországiért Egyesület, Budapest. 2022.04.28.
- **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.

Doktori kutatásaimhoz szorosan nem kapcsolódó publikációk:

Lektorált folyóiratcikkek:

- 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.  
Szerzői hányad: 10%
- 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.  
Szerzői hányad: 55%

#### Lektorált konferenciakiadvány:

- 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:
- 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:
- 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.
- 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.

## 11. Mellékletek

### 11.1. Irodalmi összefoglaló mellékletei

A nanorészecskék élővilágra gyakorolt hatására vonatkozó irodalmi adatok az alábbiakban kerülnek bemutatásra.

**M1. táblázat** – A nZnO mikroorganizmusokra gyakorolt hatása (Sirelkhatim és mtsai., 2015 nyomán)

nZnO mérete [nm]	nZnO koncentráció [mg/L]	Mikrobafaj	Hatás	Hivatkozás
~13 (átlag)	0–813 mg/L	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i> növekedésének teljes gátlása 3,4 mM felett <i>S. aureus</i> növekedésének teljes gátlása 1 mM felett	Reddy és mtsai., (2007)
37–47	125, 250, 500 mg/L	<i>Escherichia coli</i>	Koncentrációfüggő szaporodás gátlás, 500 mg/L esetén 120 perc elteltével 21%-os túlélési arány	Jalal és mtsai., (2010)
~30 (átlag)	100, 300, 500 mg/L	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i>	MIC: <i>C. jejuni</i> esetén 25–50 mg/L <i>E. coli</i> és <i>S. enterica</i> esetén 400 mg/L	Xie és mtsai., (2011)
100–146	200, 500, 1000 mg/L	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> <i>Aspergillus niger</i>	Koncentráció-arányos gátló hatás	Chitra és Annadurai (2013)

**M2. táblázat** – A nZnO növényekre gyakorolt hatása (Strekalovskaya és mtsai., 2024 nyomán)

nZnO mérete [nm]	nZnO koncentráció [mg/L]	Növényfaj	Hatás	Hivatkozás
			<b>Pozitív hatások</b>	
~37 (átlag)	100	<i>Zea mays</i>	Serkenti a csírázást és növekedést	Itroutwar és mtsai., (2020)
ismeretlen	750	<i>Capsicum annuum</i>	Serkenti a csírázást és növekedést	Afrayeem és Chaurasia (2017)
20–30	10	<i>Triticum aestivum</i>	Fokozza a magok csírázását és vízfelvételét, növeli az $\alpha$ -amiláz aktivitást és a klorofill tartalmat	Rai-Kalal és Jajoo (2021)
9–13	10, 25, 50, 100	<i>Triticum aestivum</i>	Serkenti a csírázást és a palánták morfológiai adottságainak fejlődését	Awasthi és mtsai., (2017)
40–50	250–500	<i>Triticum aestivum</i>	Serkenti a gyökér- és szárnövekedést, növeli a klorofilltartalmat	Solanki és Laura (2018)

**M2. táblázat** – A nZnO növényekre gyakorolt hatása (Strekalovskaya és mtsai., 2024 nyomán) (folytatás)

nZnO mérete [nm]	nZnO koncentráció [mg/L]	Növényfaj	Hatás	Hivatkozás
~25 (átlag)	1000	<i>Arachis hypogea</i>	Serkenti a magok csírázását, elősegíti a korai hajtások és virágzás megjelenését, növeli a levelek klorofill tartalmát	Prasad és mtsai., (2012)
~25 (átlag)	50–1500	<i>Zea mays</i>	Serkenti a csírázást és növekedést	Subbaiah és mtsai., (2016)
~20 (átlag)	500	<i>Zea mays</i>	Serkenti a csírázást és növekedést, növeli a szentömeget, káliumtartalmát és az $\alpha$ -amiláz aktivitását, fokozza a fotoszintézist	Salam és mtsai., (2022)
~100 (átlag)	100	<i>Zea mays</i>		Alhammad és mtsai., (2023)
~35 (átlag)	25	<i>Oryza sativa</i>	Serkenti a növekedést, növeli a pigment-, cink- és vastartalmat	Afzal és Singh (2022)
20–30	2000	<i>Cicer arietinum</i>	Serkenti a csírázást és a gyökérnövekedést, fokozza a növekedést serkentő hormonok szintézisét a hajtásokban	Pandey és mtsai., (2010)
$\leq 50$	10, 100	<i>Portulaca oleracea</i>	Serkenti a csírázást és növekedést, fokozza a klorofill és a karotinoid tartalmat	Iziy és mtsai., (2019)
20–60	50–1600	<i>Allium cepa</i>	Stimulálja a csírázást	Tymoszuk és Wojnarowicz (2020)
~50 (átlag)	500, 1000, 5000	<i>Oryza sativa</i>	Növeli a gyökér- és szárhosszt, klorofill- és cink tartalmat	Bala és mtsai., (2019)
~20 (átlag)	20	<i>Vigna radiata</i> <i>Cicer arietinum</i>	Serkenti a növények fejlődését és gyökérképzését	Mahajan és mtsai., (2011)
1,2–6,8	10	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	Fokozza a növényi biomasszát, a gyökér- és hajtáshosszt, gyökérfelületet, növeli a klorofill- és a fehérjetartalmat	Raliya és Tarafdar (2013)
~51 (átlag)	7	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Oryza sativa</i>	Serkenti a növekedést, fokozza a növények és a termések klorofill- és cinktartalmát, fokozza a növények abiotikus stresszel (sótartalommal) szembeni ellenállóképességét	Mazhar és mtsai., (2023)
~71 (átlag)	0,1–5	<i>Triticum aestivum</i>	Serkenti a csírázást és a morfológiai jellemzők fejlődését	Pandya és mtsai., (2024)

**M2. táblázat** – A nZnO növényekre gyakorolt hatása (Strekalovskaya és mtsai., 2024 nyomán) (folytatás)

nZnO mérete [nm]	nZnO koncentráció [mg/L]	Növényfaj	Hatás	Hivatkozás
ismeretlen	25, 50, 100, 200	<i>Triticum aestivum</i>	Serkenti a morfológiai jellemzők fejlődését, növeli a floém és xilém vastagságát és a klorofilltartalmat	Nazir és mtsai., (2024)
~20 (átlag)	100–700	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Növeli a talaj feletti- és alatti biomasszát, a gyökérméretét és a gyökerek cinktartalmát	Wei és mtsai., (2021)
<50	25, 50, 100	<i>Oryza sativa</i>	Fokozza a gyökerek felszívóképességét és cinktartalmát.	Chen és mtsai., (2018)
16–31	500	<i>Solanum lycopersicum</i>	Növeli a növényhosszúságot, a termésméretet és az antioxidáns enzimek aktivitását, így csökkentve a ROS tartalmat	Jiang és mtsai., (2022)
			<b>Negatív hatások</b>	
ismeretlen	250, 500	<i>Capsicum annuum</i>	Gátolja a magok csírázását és a növények növekedését	Afrayeem és Chaurasia (2017)
3–5	1000-2000	<i>Triticum aestivum</i>	Gátolja a magok csírázását és a növények növekedését	Chanda és mtsai., (2020)
ismeretlen	100-500	<i>Oryza sativa</i>	Gátolja a gyökerek morfológiai jellemzőinek fejlődését	Boonyanitipong és mtsai., (2011)
≤50	500	<i>Portulaca oleracea</i>	Roncsolja a sejtmembránt, csökkenti a kloroplasztiszok számát és azok deformitását okozza	Iziy és mtsai., (2019)
ismeretlen	10	<i>Cicer arietinum</i> L var. HC-1	Gátolja a gyökérnövekedést	Burman és mtsai., (2013)
~19 (átlag)	1, 5, 10	<i>Lolium perenne</i>	Csökkenti a biomasszát, gátolja a gyökérszövet fejlődését	Lin és Xing (2008)
~20 (átlag)	2000	<i>Vigna radiata</i> , <i>Cicer arietinum</i>	Lassítja a gyökér- és szárhossz növekedését	Mahajan és mtsai., (2011)
~50 (átlag)	200–300	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gátolja a gyökér- és szárhossznövekedést, csökkenti a klorofilltartalmat és a fotoszintézis intenzitását, a sejtek közötti CO <sub>2</sub> tartalmat és a párologtatás sebességét	Wang és mtsai., (2016a)
<50	500	<i>Oryza sativa</i>	Gátolja a növények szár- gyökérnövekedését, csökkenti a biomasszát és a klorofilltartalmat	Chen és mtsai., (2018)

**M3. táblázat** – A nTiO<sub>2</sub> mikroorganizmusokra gyakorolt hatása (Hou és mtsai., 2019 nyomán)

nTiO <sub>2</sub> mérete [nm]	Mikrobafaj	Hatás	Hivatkozás
~16,2 (átlag) ~45,8 (átlag)	<i>Escherichia coli</i> K12	24 h: LC <sub>50</sub> : 68 mg/L 24 h: LC <sub>50</sub> : 336 mg/L	Erdem és mtsai., (2015)
~16,2 (átlag) ~45,8 (átlag)	<i>Bacillus subtilis</i>	24 h: LC <sub>50</sub> : 96 mg/L 24 h: LC <sub>50</sub> : 401 mg/L	Erdem és mtsai., (2015)
25-70	<i>Vibrio fischeri</i>	30 min: EC <sub>50</sub> : >20000 mg/L 72 h: MIC: > 20000 mg/L	Heinlaan és mtsai., (2008)
62-74	<i>Escherichia coli</i>	24 h: MIC: 40 mg/L	Rajakumar és mtsai., (2012)
62-74	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24 h: MIC: 80 mg/L	Rajakumar és mtsai., (2012)
62-74	<i>Staphylococcus aureus</i>	24 h: MIC: 40 mg/L	Rajakumar és mtsai., (2012)
62-74	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24 h: MIC: 70 mg/L	Rajakumar és mtsai., (2012)
62-74	<i>Bacillus subtilis</i>	24 h: MIC: 45 mg/L	Rajakumar és mtsai., (2012)
10-50	<i>Escherichia coli</i>	1,5 h alatt teljes gátlás	Vijay és mtsai., (2010)
25-70	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24 h: EC <sub>50</sub> : > 20000 mg/L	Kasemets és mtsai., (2009)
~66 (átlag)	<i>Escherichia coli</i> DH5α	20 h alatt 44%-os gátlás 1000 mg/L koncentrációnál	Adams és mtsai., (2006a)
~66 (átlag)	<i>Bacillus subtilis</i> CB310	20 h alatt 75%-os gátlás 1000 mg/L koncentrációnál	Adams és mtsai., (2006a)
~50 (átlag)	<i>Bacillus subtilis</i>	24 h alatt 0%-os gátlás 20 mg/L koncentrációnál	Jiang és mtsai., (2009b)
~50 (átlag)	<i>Escherichia coli</i>	24 h alatt 0%-os gátlás 20 mg/L koncentrációnál	Jiang és mtsai., (2009b)
~50 (átlag)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24 h alatt 0%-os gátlás 20 mg/L koncentrációnál	Jiang és mtsai., (2009b)
~40,5 (átlag)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	24 h: MIC: 25 mg/L	Jayaseelan és mtsai., (2013)
~40,5 (átlag)	<i>Escherichia coli</i>	24 h: MIC: 20 mg/L	Jayaseelan és mtsai., (2013)
~40,5 (átlag)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24 h: MIC: 30 mg/L	Jayaseelan és mtsai., (2013)
~40,5 (átlag)	<i>Streptococcus pyogenes</i>	24 h: MIC: 10 mg/L	Jayaseelan és mtsai., (2013)
~40,5 (átlag)	<i>Staphylococcus aureus</i>	24 h: MIC: 10 mg/L	Jayaseelan és mtsai., (2013)
~40,5 (átlag)	<i>Enterococcus faecalis</i>	24 h: MIC: 15 mg/L	Jayaseelan és mtsai., (2013)
~50 (átlag)	<i>Escherichia coli</i>	18 h: MIC: 62,5 mg/L	Ahmad és mtsai., (2015)
~50 (átlag)	<i>Staphylococcus aureus</i>	18 h: MIC: 62,5 mg/L	Ahmad és mtsai., (2015)

**M3. táblázat** – A nTiO<sub>2</sub> mikroorganizmusokra gyakorolt hatása (Hou és mtsai., 2019 nyomán) (folytatás)

nTiO <sub>2</sub> mérete [nm]	Mikrobafaj	Hatás	Hivatkozás
~33 (átlag)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24 h ZOI: 1,8 cm 200 mg/L koncentrációnál 24 h ZOI: 2,1 cm 250 mg/L koncentrációnál	Priyanka és mtsai., (2016)
~33 (átlag)	<i>Staphylococcus aureus</i>	24 h ZOI: 1,6 cm 200 mg/L koncentrációnál 24 h ZOI: 2,1 cm 250 mg/L koncentrációnál	Priyanka és mtsai., (2016)
~33 (átlag)	<i>Bacillus subtilis</i>	24 h ZOI: 1,4 cm 200 mg/L koncentrációnál 24 h ZOI: 1,6 cm 250 mg/L koncentrációnál	Priyanka és mtsai., (2016)
~33 (átlag)	<i>Proteus vulgaris</i>	24 h ZOI: 1,6 cm 200 mg/L koncentrációnál 24 h ZOI: 1,7 cm 250 mg/L koncentrációnál	Priyanka és mtsai., (2016)
~33 (átlag)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24 h ZOI: 2,2 cm 200 mg/L koncentrációnál 24 h ZOI: 2,4 cm 250 mg/L koncentrációnál	Priyanka és mtsai., (2016)
~33 (átlag)	<i>Escherichia coli</i>	24 h ZOI: 1,3 cm 200 mg/L koncentrációnál 24 h ZOI: 1,6 cm 250 mg/L koncentrációnál	Priyanka és mtsai., (2016)
~33 (átlag)	<i>Candida albicans</i>	24 h ZOI: 2,0 cm 200 mg/L koncentrációnál 24 h ZOI: 2,1 cm 250 mg/L koncentrációnál	Priyanka és mtsai., (2016)
~42,3 (átlag)	<i>Escherichia coli</i>	30 min: LC <sub>50</sub> : 1,68 mg/L fényben 30 min: LC <sub>50</sub> : 583 mg/L sötétben	Dasari és mtsai., (2013)
~10 (átlag) ~25 (átlag) ~50 (átlag)	<i>Escherichia coli</i>	3 h: LC <sub>50</sub> : 17 mg/L 3 h: LC <sub>50</sub> : 59,2 mg/L 3 h: LC <sub>50</sub> : 304 mg/L	Lin és mtsai., (2014)

**M4. táblázat** – A nTiO<sub>2</sub> algákra és növényekre gyakorolt hatása (Hou és mtsai., 2019 nyomán)

nTiO <sub>2</sub> mérete [nm]	Faj	Hatás	Hivatkozás
25–70	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	24 h: EC <sub>50</sub> : 5,83 mg/L	Aruoja és mtsai., (2009)
5–10	<i>Skeletonema costatum</i>	72 h: EC <sub>50</sub> : 7,37 mg/L	Li és mtsai., (2015)
5–10	<i>Karenia brevis</i>	72 h: EC <sub>50</sub> : 10,69 mg/L	Li és mtsai., (2015)
ismeretlen	<i>Spinacia oleracea</i>	48 h alatt 38%-os csírázás gátlás 8% koncentrációnál	Zheng és mtsai., (2005)
~21 (átlag)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Fotoszintetikus aktivitás jelentősen csökkent 1 mg/L koncentráció felett	Chen és mtsai., (2012)
<21	<i>Nicotiana tabacum</i>	Másodlagos gyökerek megjelenése 2,5% koncentrációig	Cox és mtsai., (2016)
>20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Biomassza csökkenés: 5 hét: 65%-kal csökkent 0,5 mg/mL koncentrációnál 5 hét: 55%-kal csökkent 1 mg/mL koncentrációnál	Szymańska és mtsai., (2016)
~5,3 (átlag)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	96 h: EC <sub>50</sub> : 113 mg/L	Metzler és mtsai., (2011)
<25	<i>Scenedesmus sp.</i>	72 h: EC <sub>50</sub> : 71,2 mg/L	Sadiq és mtsai., (2011)
<25	<i>Chlorella sp.</i>	72 h: EC <sub>50</sub> : 16,12 mg/L	Sadiq és mtsai., (2011)
~15 (átlag)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	72 h: EC <sub>50</sub> : 167,79 mg/L	Wang és mtsai., (2016)

**M5. táblázat** – A nTiO<sub>2</sub> gerinctelen, illetve gerinces állatokra gyakorolt hatása (Hou és mtsai., 2019 nyomán)

nTiO <sub>2</sub> mérete [nm]	Faj	Hatás	Hivatkozás
~21 (átlag)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	14 nap alatt a Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATP-áz aktivitás jelentősen csökkent, a glutation aktivitás 65%-kal növekedett 1 mg/L koncentrációnál	Federici és mtsai., (2007)
20–30	<i>Daphnia magna</i>	48 h: EC <sub>50</sub> : > 100 mg/L 21 napos NOEC érték mortalitásra: 30 mg/L utódképzésre: 3 mg/L	Wiench és mtsai., (2009)
25–70	<i>Daphnia magna</i>	48 h: LC <sub>50</sub> : 20000 mg/L	Heinlaan és mtsai., (2008)
24 ± 10	<i>Danio rerio</i>	24 h: 1 mg/L nTiO <sub>2</sub> csökkenti a Hg <sup>2+</sup> ionok felvételét	Boran és mtsai., (2016)
~30 (átlag)	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	48 h: NOEC: >20000 mg/L	Heinlaan és mtsai., (2008)
~7 (átlag)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	24 h: 21%-kal csökkent a növekedés, 30%-kal csökkent a termékenység 1 mg/L koncentrációnál	Roh és mtsai., (2010)
~20 (átlag)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	24 h: nem változott jelentősen a növekedés, 10%-kal csökkent a termékenység 1 mg/L koncentrációnál	Roh és mtsai., (2010)
~50 (átlag)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	24 h: LC <sub>50</sub> : 79,9 mg/L	Wang és mtsai., (2009)

**M5. táblázat** – A nTiO<sub>2</sub> gerinctelen, illetve gerinces állatokra gyakorolt hatása (Hou és mtsai., 2019 nyomán) (folytatás)

nTiO <sub>2</sub> mérete [nm]	Faj	Hatás	Hivatkozás
~25 (átlag) ~80 (átlag)	<i>Mus musculus</i>	Jelentősen növekedett az alanin/aszpartát aminosztransferáz arány	Wang és mtsai., (2007)
~50 (átlag)	<i>Cyprinus carpio</i>	8 nap: a szuperoxid diszmutáz, kataláz, peroxidáz aktivitás növekedett, a lipid peroxidáció csökkent 100 és 200 mg/L koncentrációnál	Hao és mtsai., (2009)
<10	<i>Danio rerio</i>	6 hónap: a mortalitás 17%-kal növekedett 7 mg/L koncentrációnál	Chen és mtsai., (2011)
~15 (átlag)	<i>Tetrahymena thermophila</i>	24 h: a telített zsírsavak mennyisége nőtt, a telítetlen zsírsavak mennyisége változatlan	Rajapakse és mtsai., (2012)
~32 (átlag)	<i>Eisenia fetida</i>	4 hét: gátló hatás a szaporodásra	Cañas és mtsai., (2011)
<10	<i>Haliothis diversicolor supertexta</i>	96 h: szuperoxid diszmutáz aktivitás nőtt 1 mg/L koncentrációnál; lipid peroxidáció koncentráció arányosan nőtt 1–10 mg/L koncentrációnál	Zhu és mtsai., (2011)
10–30	<i>Carassius auratus</i>	5 nap: testtömeg 1,8%-kal nőtt 10 mg/L koncentrációnál, míg 19,7%-kal csökkent 100 mg/L koncentrációnál	Ates és mtsai., (2013)
~4,78 (átlag)	<i>Xenopus laevis</i> embrió	96 h: nincs jelentős hatása a mortalitásra 5–320 mg/L koncentrációnál	Birhanli és mtsai., (2014)
~21 (átlag)	<i>Oryzias latipes</i>	11 nap: nagyobb mértékben keltek ki a lárvák 14 mg/L koncentráció esetén, azonban az ezt követő 15 nap elteltével nagyobb volt a halálozási arányuk is	Paterson és mtsai., (2011)
<25	<i>Pimephales promelas</i>	48 h: légzőszervi problémák 0,1 mg/L koncentrációnál	Jovanović és mtsai., (2011)
~21 (átlag)	<i>Mus musculus</i>	2 hét: növekedett a májenzimek aktivitása és a malondialdehid koncentráció, csökkent a glutation koncentráció, és gyulladásozó folyamatok jelentkeztek a tumor nekrozis faktor- $\alpha$ és interleukin-6 szintjének növelése által 150 mg/ttkg/nap kezelésnél	Azim és mtsai., (2015)
30 $\pm$ 5	<i>Drosophila melanogaster</i>	A kikelés mértéke koncentráció arányosan csökken, továbbá késleltetett fejlődés figyelhető meg 200 és 250 mg/L koncentrációnál	Sabat és mtsai., (2016)
~86 (átlag)	<i>Drosophila melanogaster</i>	24 h: középbél és DNS károsodása 0,8 mg/L koncentrációnál	Carmona és mtsai., (2015)
5–6	<i>Rattus rattus hippocampus neuronsejtek</i>	4 nap: sejtek életképességének 12,8%-os, hosszának 6,9%-os csökkenése, glutation 7,75%-os növekedése, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATP-áz aktivitás 12,96%-os csökkenése 5 mg/L koncentrációnál, továbbá koncentrációval arányos hatások 30 mg/L-ig	Hong és mtsai., (2015)

**M5. táblázat** – A nTiO<sub>2</sub> gerinctelen, illetve gerinces állatokra gyakorolt hatása (Hou és mtsai., 2019 nyomán) (folytatás)

nTiO <sub>2</sub> mérete [nm]	Faj	Hatás	Hivatkozás
5–6	<i>Mus musculus</i>	90 nap: csökkent testtömeg, spermium mennyiség és mozgékonyág 2,5 mg/ttkg kezelésnél	Gao és mtsai., (2013)

**M6. táblázat** – A nZnO talajmikroflórára gyakorolt hatása (Strekalovskaya és mtsai., 2024 nyomán)

nZnO mérete [nm]	nZnO koncentráció [mg/kg]	Talaj pH	Serkenti	Gátolja	Hivatkozás
20–30	500	6,0	-	Biomassza, diverzitás	Ge és mtsai., (2011b)
~15 (átlag)	1000	7,5	-	<i>Azotobacter</i> , foszfor- és kálium-oldó baktériumok, ureáz-, kataláz enzimaktivitás, fluoreszcein-diacetát hidrolízis	Chai és mtsai., (2015)
ismeretlen	500	6,9	<i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Bacillales</i> , <i>Burkholderiales</i> , <i>Lactobacillales</i> , <i>Pseudomonadales</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Dialister</i>	<i>Proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Actinomycetales</i> , <i>Desulfivibrionales</i> , <i>Alteromonadales</i> , <i>Oceanospirillales</i> , <i>Halomonas</i>	Chavan és Nandanangam (2019)
20–50	550	7,5	<i>Rhizobiales</i>	<i>Sphingomonadales</i>	Collins és mtsai., (2012)
20–30	50–500	6,0	<i>Sphingomonadaceae</i> , <i>Streptomyetaceae</i> , <i>Streptomyces</i>	<i>Rhizobiales</i> , <i>Bradyrhizobiaceae</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Methylobacteriaceae</i>	Ge és mtsai., (2012)
~25 (átlag)	100, 500	7,9–8,2	<i>Proteobacteria</i> , <i>Nitrospirae</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Zygomycota</i> , <i>Basidiomycota</i>	<i>Bacteroidetes</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Firmicutes</i>	Chen és mtsai., (2021)
~65,8 (átlag)	0,5 1,25 2,5	8,58	–	Mikrobiális biomassza	Verma és mtsai., (2022)
~50 (átlag)	200, 500, 1000	7,56	<i>Proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Piscinibacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Burkholderiales</i> , <i>Altererythrobacter</i> , <i>Massilia</i>	<i>Bacteroidetes</i> , <i>Terrimonas</i> , <i>Flavitalea</i> , <i>Ohtaekwangia</i> , <i>Pseudomonas</i> , fenol-oxidáz aktivitás	Shi és mtsai., (2021)

**M6. táblázat** – A nZnO talajmikroflórára gyakorolt hatása (Strekalovskaya és mtsai., 2024 nyomán) (folytatás)

nZnO mérete [nm]	nZnO koncentráció [mg/kg]	Talaj pH	Serkenti	Gátolja	Hivatkozás
~50 (átlag)	<250	7,24	<i>Proteobacteria, Ascomycota, Sphingomonadales</i>	<i>Solirubrobacterales, Catenulisporales, Armatimonadetes</i>	Liu és mtsai., (2021b)
~50 (átlag)	30	6,4	<i>Bacteroidetes, Actinobacteria, Streptomycetaceae, Rhizobiaceae, Oxalobacteraceae, Chitinophagaceae, Solibacteraceae</i>	<i>Gemmatimonadaceae, Sphingomonadaceae, Haliangiaceae</i>	Chen és mtsai., (2023)
~35 (átlag)	25	7,4	Diverzitás	–	Afzal és Singh (2022)
~20 (átlag)	5 kg/ha	7,7–7,8	<i>Bacillus, Acinetobacter, Pedobacter, Massilia, Lysobacter, Pseudomonas</i>	–	Saleem és mtsai., (2023)
~20 (átlag)	100–700	7,12	<i>Proteobacteria, Methylobacillus, Humicola, Aminobacter, Arenimonas, Thiobacillus, Metarhizium</i>	–	Wei és mtsai., (2021)
~90 (átlag)	0,1, 10, 100	7,2	<i>Cyanobacteria, Nostoc, Scenedesmus, Xanthomonas, Galbibacter, Burkholderia</i>	–	Xu és mtsai., (2018)
16–31	500	ismeretlen	<i>Chloroflexi, Sphingomonadaceae, Rhizobiaceae, Rhodanobacteraceae, Xanthomonadaceae, Nitrosomonadaceae, Methylophilaceae, Microscillaceae, Gemmatimonadaceae</i>	<i>Proteobacteria, Patescibacteria, Actinobacteria</i>	Jiang és mtsai., (2022)
~30 (átlag)	250–1000	5,59	<i>Proteobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadota, Bacteroidota, Myxococcota, Cyanobacteria, Tausonia, Chaetomium, Mrakia</i>	<i>Firmicutes, Acidobacteriota, Nitrospirota, Verrucomicrobiota, Neocosmospora, Gibberella, Fusarium</i>	Wolińska és Stepniewska (2012)

M7. táblázat – A nTiO<sub>2</sub> talajmikroflórára gyakorolt hatása

nTiO <sub>2</sub> mérete [nm]	nTiO <sub>2</sub> koncentráció [mg/kg]	Talaj pH	Serkenti	Gátolja	Hivatkozás
15–20	500 1000 2000	6,0	–	Biomassza csökkenést és diverzitás változást okozott	Ge és mtsai., (2011b)
15–20	500 1000 2000	6,0	Szerves szennyezőanyagok degradációját ( <i>Sphingomonadaceae</i> ) és fehérjék bontását ( <i>Streptomycetaceae</i> , <i>Streptomyces</i> ) végző fajok	Nitrogén-fixálók ( <i>Rhizobiales</i> , <i>Bradyrhizobiaceae</i> , <i>Bradyrhizobium</i> ) és metán-oxidálók ( <i>Methylobacteriaceae</i> )	Ge és mtsai., (2012)
5–10, ~55 (átlag)	0,0625	4,3–4,9	–	Módosította a fajgazdagságot és összetételt	Shah és mtsai., (2014)
<100	100	7,36	Növekedett az ureáz enzimaktivitás	Csökkent a proteáz-, kataláz- és peroxidáz enzimaktivitás	Du és mtsai., (2011)
~10 (átlag)	1000	7,46	–	Csökkent a funkcionális diverzitás és ureáz aktivitás	Chai és mtsai., (2015)
~28,7 (átlag)	372	7,7	–	Ammónia oxidáló baktériumok és nitrifikációs enzimek gátlása	Simonin és mtsai., (2016)
~28,7 (átlag)	0,05–500	7,7	Nitrit-oxidáló <i>Nitrospira</i> fajokra nem volt jelentős hatás	Ammónia oxidáló baktériumok és a nitrit-oxidáló <i>Nitrobacter</i> fajok csökkenése	Simonin és mtsai., (2017)
40–60	200	–	Nincs jelentős hatása a rhizoszférában lévő baktériumközösségre	Az arbuskuláris mikorrhizában lévő közösséget gátolta	Burke és mtsai., (2014)
<50	5 10 20 40 80 100	7,5	Dehidrogenáz, alkalikus foszfatáz, ureáz enzimaktivitás- és biomasszanövekedés 20 mg/kg koncentrációig	Dehidrogenáz, alkalikus foszfatáz, ureáz enzimaktivitás- és biomasszacsökkenés 20 mg/kg koncentráció felett Mikrobiális légzés koncentráció arányosan nőtt, ami szubletális stresszt jelez.	Bhattacharjya és mtsai., (2021)
~11 (átlag)	1 2,5 5 10 20	6,4	Fokozott mikrobiális növekedés, elsősorban gombák és aktinobaktériumok esetén 10 mg/kg koncentrációig	Gátolt mikrobiális növekedés 20 mg/kg koncentrációban. Ammónia-oxidálókra jelentősebb hatás a nitrogén-fixálókhoz képest.	Kaur és mtsai., (2022)

**M7. táblázat** – A nTiO<sub>2</sub> talajmikroflórára gyakorolt hatása (folytatás)

nTiO <sub>2</sub> mérete [nm]	nTiO <sub>2</sub> koncentráció [mg/kg]	Talaj pH	Serkenti	Gátolja	Hivatkozás
~29 (átlag) ~92 (átlag)	1 100 1000	7,7	–	A mikrobiális közösség összetétele elsősorban baktériumok esetén változott, gombák esetén nem volt jelentős hatás	Moll és mtsai., (2017)
~25 (átlag)	1, 500, 2000	6,2	–	1 nap elteltével 1 mg/kg koncentrációban a mikrobaközösség gátlása figyelhető meg, mely 60 nap után nem észlelhető. Ellenben nagy dózisban 60 nap elteltével taxonómiai változást okozott, de a funkcionális diverzitásra nem gyakorolt jelentős hatást.	Zhai és mtsai., (2019)

## 11.2. A vizsgálatok során alkalmazott módszerek leírása

### 11.2.1. Különböző tesztorganizmusokra gyakorolt hatás felmérése

#### 11.2.1.1. *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia és enzimaktivitás vizsgálat

Az *Aliivibrio fischeri* Gram-negatív, biolumineszcens baktérium gyakran alkalmazott tesztorganizmus környezettoxikológiai vizsgálatok során, ugyanis az általa kibocsátott fény intenzitása csökken, ha számára káros, toxikus környezetbe kerül. A módszer kivitelezése során az ISO 21338:2010 (ISO, 2010) és az ISO 11348-3:2007 (ISO, 2007) szabványokat vettem alapul.

Kísérleteim során *Aliivibrio fischeri* NRRL B-111 77 törzset használtam, melyet a tesztek kezdete előtt 18 órával 40 mL folyékony fototáp közegbe (30 g NaCl, 6,1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 2,75 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,204 g MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g pepton, 0,5 g élesztő kivonat, 3 mL glicerin, 1 L desztillált víz, pH=7,2) (Fekete-Kertész és mtsai., 2017) oltottam át, és 24 °C-on, 160 rpm fordulatszámon rázatva inkubáltam, így készítve overnight (O/N) baktériumtenyészetet.

A tesztet mikrotitrátor lemezben végeztem el, melynek során 50 µL nanoszuszpenziót mértem a lemez celláiba majd 200 µL O/N baktériumtenyészetet adtam hozzá. Minden kezelést 6 párhuzamosban ismételtam. Negatív kontrollként desztillált vizet (DV), míg a baktériumkultúra érzékenységének ellenőrzése céljából pozitív kontrollként réz-szulfát (CuSO<sub>4</sub>) oldatot használtam.

#### 11.2.1.1.1. Aliivibrio fischeri biolumineszcencia intenzitás vizsgálata

A lemezek elkészítését követően 24 °C-on, sötétben inkubáltam azokat, majd 30 és 120 perc elteltével Fluostar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) lemezleolvasóval mértem a lumineszcencia intenzitás mértékét.

A nanorészecskék által okozott, kontrollhoz képesti hatás mértékének jellemzésére gátlási százalékot (G [%]) számoltam a következő egyenlet alapján:

$$G [\%] = \frac{K - M}{K} \times 100$$

ahol K a kontroll cellák értéke, M a nanorészecske mintát tartalmazó cellák értéke.

#### 11.2.1.1.2. Aliivibrio fischeri enzimaktivitás vizsgálata

A nanorészecskék toxikus hatásának vizsgálata céljából egy Palomino és munkatársai (2002) által leírt metabolikus aktivitás tesztet módosítva hajtottam végre. Ez az eljárás a sejtek életképességét vizsgálja a mitokondriális légzési láncon keresztül, ugyanis a gyengén fluoreszcens, kék színű rezaurin (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid, Alamar blue) festék redukálódik a mikrobiális légzés során, és így az erősen fluoreszcens, rózsaszín színű rezorufin keletkezik. A fluoreszcencia intenzitás mérésével az élő sejtek számáról kaphatunk információt, köszönhetően annak, hogy a reakció az élő sejtek mitokondriális légzési láncában megy végbe. A teszt kivitelezéséhez 30 µL 0,5 mM koncentrációjú steril rezaurin oldatot adtam a cellákhoz, majd 15 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltam a lemezt. Ezt követően Fluostar Optima (BMG Labtech) lemezleolvasóval mértem a fluoreszcencia intenzitást excitáció: 544 nm, emisszió: 590 nm hullámhossz beállítások mellett; majd az értékek alapján gátlási százalékot számoltam a fent ismertetett egyenlet szerint.

#### 11.2.1.2. Escherichia coli szaporodás, enzimaktivitás, ROS termelés vizsgálat

A nanorészecskék Gram-negatív baktériumokra gyakorolt hatását *Escherichia coli* ATCC 11775 Vitroids<sup>TM</sup> törzs szaporodásán, enzimaktivitásán, valamint ROS termelésének vizsgálatán keresztül is felmértem. A törzs laboratóriumban történő fenntartására LabM Luria-Bertani (LB) agart alkalmaztam. A kísérletek kezdete előtt 18 órával egy oltókacsnyi sejt kultúrát 30 mL folyékony LB tápközegben szuszpendáltam, majd 30 °C-on, 160 rpm fordulatszámra rázatva inkubáltam, így készítve O/N tenyészetet. Az O/N kultúra optikai denzitását SANYO SP 55 UV/VIS spektrofotométerrel mértem 600 nm hullámhosszon, majd LB tápközeggel hígítottam, hogy 0,1 OD<sub>600</sub> kezdeti értéke legyen a tesztekhez felhasznált kiindulási sejtenyészetnek. Ezt követően közvetlenül a teszt előtt még 100-szorosára hígítottam a baktériumkultúrát LB tápközeggel.

Kísérleteim kivitelezéséhez mikrotitrátor lemezt használtam, hasonlóan az *A. fischeri* baktériumnál leírt módszer szerint. Ennek megfelelően 50 µL nanoszuszpenzió mintát pipettáztam a lemez celláiba, majd 200 µL baktériumsuszpenziót adtam hozzá. Kontrollként desztillált vizet alkalmaztam, míg pozitív kontrollként antibiotikum oldatot (10 µg/mL tetraciklin és sztreptomycin) használtam, hogy meggyőződjek a baktériumtenyészet érzékenységről. A lemezeket 30 °C-on inkubáltam 24 órán keresztül.

#### 11.2.1.2.1. Escherichia coli szaporodás vizsgálata

A nanorészecskék citotoxikus hatásának felmérése céljából DIALAB ELISA EL800 (Dialab GmbH, Wiener Neudorf, Austria) lemezleolvasóval 630 nm hullámhosszon mértem az optikai denzitást közvetlenül a lemezek elkészítését követően majd az inkubációs idő (24 óra) letelte után, egyéb vizsgálatok (enzimaktivitás mérés, ROS termelés) előtt.

#### 11.2.1.2.2. *Escherichia coli* enzimaktivitás vizsgálata

Az enzimaktivitás mérést az *A. fischeri* tesztrendszerrel ismertetett módon végeztem.

#### 11.2.1.2.3. *Escherichia coli* reaktív oxigén származék (ROS) termelés vizsgálata

A reaktív oxigén származék (ROS) képződés mértékét Van Acker és munkatársai (2016) által alkalmazott módszer módosításával vizsgáltam annak érdekében, hogy a nanorészecskék citotoxikus hatását felderítsem. Ezen vizsgálati metodika azon alapszik, hogy a 2',7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein diacetát (H<sub>2</sub>DCFDA) egy nem fluoreszcens vegyület, melyet, ha az intracellulárisan képződött ROS molekulák oxidálnak, akkor egy erősen fluoreszcens vegyület, 2',7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein (DCF) keletkezik belőle. Ennek érdekében 30 µL 10 µM koncentrációjú H<sub>2</sub>DCFDA oldatot mértem a mikrotitrátor lemez celláiba, majd 30 °C-on, sötétben inkubáltam 30 percig. Ezt követően Fluostar Optima (BMG Labtech) lemezleolvasóval mértem a cellák fluoreszcencia intenzitását 485 nm hullámhosszúságú excitációs, 520 nm hullámhosszúságú emissziós beállítással. A képződött ROS mértékét a kontroll és a nanoszuszpenziókat tartalmazó cellák fluoreszcencia intenzitásának arányából határoztam meg.

#### 11.2.1.3. Genotoxicitás vizsgálata SOS ChromoTest<sup>TM</sup> tesztrendszerrel

A potenciális toxikus vegyületek genotoxikus hatással rendelkezhetnek, vagy károsíthatják a DNS-t. Ennek detektálására alkalmazott gyors eljárás az SOS ChromoTest, melyet én is alkalmaztam a nanorészecskék hatásának vizsgálata során. Ez a teszt módszer egy génmódosított *Escherichia coli* törzset alkalmaz a genetikai károsodásra adott elsődleges válaszreakciók felmérésére (Escobar és mtsai., 2013).

Az Environmental Bio-Detection Products cégtől származó teszt kit (5031 SOS-ChromoTest<sup>TM</sup> Kit) használata során a gyártó által leírt módszert (Environmental Bio-Detection Products Inc. (EBPI)) alkalmaztam. Kísérletem során a gyártóktól származó eredeti, valamint autoklávozott nanorészecske szuszpenziókat is vizsgáltam, melyekből 10 µL-t mértem a mikrotitrátor lemez celláiba és 100 µL *E. coli* szuszpenziót adtam hozzájuk. Negatív kontrollként 10%-os dimetil-szulfoxidot (DMSO) alkalmaztam. Ezt követően 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam a lemezt, majd 100 µL kromogén reagenst adtam hozzá és 30 percig inkubáltam 37 °C-on. A tapasztalt színváltozást szabad szemmel is vizsgáltam, továbbá DIALAB ELISA EL800 lemezleolvasó segítségével mértem 630 nm hullámhosszon az abszorbancia értékeket, melyek alapján gátlási százalékot határoztam meg.

#### 11.2.1.4. *Tetrahymena pyriformis* szaporodás és enzimaktivitás vizsgálat

A *Tetrahymena pyriformis* vízben élő protozoa, mely nevét körte alakjáról kapta. Gyors reprodukciós képessége miatt gyakran alkalmazott tesztorganizmus ökotoxikológiai vizsgálatok során. A tesztek kivitelezése során Leitgib és munkatársai (2007) cikkét vettem alapul.

Kísérletem során 100 mL térfogatú, steril Schott üvegekbe 34,8 mL tápközeget (10 g tripton, 1 g élesztőkivonat, 1 L desztillált víz) mértem, melyhez 200 µL antibiotikum-mixet (2% sztreptomycin, 0,2% penicillin, 1% nisztatin) és 4 mL nanoszuszpenziót (kontroll esetén desztillált vizet) adtam, ezt követően 1 mL *T. pyriformis* szuszpenziót (10<sup>5</sup> sejt/mL koncentrációban) pipettáztam hozzá. Minden kezelés során 3 párhuzamos reaktort alakítottam ki, melyeket 22 °C-on, 160 rpm fordulatszámon rázatva inkubáltam 48 órán keresztül és 24 óránként 2 mL mintát vettem belőlük steril kémcsövekbe.

#### 11.2.1.4.1. *Tetrahymena pyriformis* szaporodás vizsgálata

A gyűjtött mintákból 2 µL-t pipettáztam Bürker-kamrára (4 alkalommal egy mintából) annak érdekében, hogy megszámoljam a sejtek számát NIKON Eclipse E400 mikroszkóp segítségével. Szükség esetén 10 µL formaldehid hozzáadásával pusztítottam el az élő sejteket a könnyebb sejszámlálás céljából. A mért és feljegyzett adatokból gátlási százalékokat határoztam meg.

#### 11.2.1.4.2. *Tetrahymena pyriformis* enzimaktivitás vizsgálata

A gyűjtött mintákból 200 µL-t pipettáztam (3 párhuzamosban) egy steril mikrotitrátor lemez celláiba, majd DIALAB ELISA EL800 (Dialab GmbH, Wiener Neudorf, Austria) lemezleolvasóval mértem az optikai denzitást 630 nm hullámhosszon. Ezt követően rezazurin oldat segítségével történő enzimaktivitás mérést végeztem az *A. fischeri* tesztorganizmusnál ismertetett módon. Továbbá, a metabolikus aktivitás vizsgálata céljából MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) oldattal is végeztem kísérleteket. Ennek menete többnyire egyezik a rezazurin módszernél leírtakkal, itt azonban 30 µL 1 mg/mL koncentrációjú MTT oldatot adtam a mikrotitrátor lemez celláiba (rezazurin helyett) és 15 perc inkubációt követően 490 nm hullámhosszon mértem a cellák abszorbanancia értékét DIALAB ELISA EL800 lemezleolvasóval, majd gátlási százalékokat számoltam.

#### 11.2.1.5. *Panagrellus redivivus* mortalitás vizsgálat

A *Panagrellus redivivus* fonálféreg halálozási arányának vizsgálata elterjedt módszer az ökotoxikológiai vizsgálatok során.

Kísérleteimet mikrotitrátor lemezben végeztem, melynek során 200 µL hígított nanoszuszpenziót mértem a cellákba, kontrollként desztillált vizet, míg pozitív kontrollként cink-szulfátot alkalmaztam. Ezt követően 10 db *P. redivivus* fonálférget tettem a mikrotitrátor lemez celláiba pipetta segítségével (2 µL fenntartó közeggel). A lemezt 22 °C-on, alufóliába csomagolva sötétben inkubáltam 72 órán keresztül, míg 24 és 72 óra elteltével NIKON SMZ800 sztereomikroszkóp segítségével megszámoltam az élő, immobilis, illetve halott egyedek számát, mely értékek alapján gátlási százalékokat számoltam.

#### 11.2.1.6. *Sinapis alba* és *Triticum aestivum* csírázás, gyökér- és szárhosszfejlődés vizsgálat

A nanorészecskék növényekre gyakorolt hatását fehér mustár (*Sinapis alba*) és közönséges búza (*Triticum aestivum*) csírázóképeségének, valamint gyökér- és szárhosszfejlődésének vizsgálatán keresztül mértem fel az OECD 208 (2006) szabványt alapul véve. A teszt során 3,5 mL nanoszuszpenziót mértem Petri-csészébe helyezett szűrőpapírra (ügyelve arra, hogy ne legyen buborék a papír alatt), majd 20 db mustármagot vagy 16 db búzaszemet helyeztem rá közel azonos távolságra egymástól. Minden kezelésnél 3 párhuzamost alkalmaztam, kontrollként desztillált vizet használtam. Ezt követően a Petri-csészékre fedőt helyeztem majd alufóliába csomagolva 22 °C-on inkubáltam őket 72 órán keresztül. Az expozíciós idő letele után vonalzó segítségével milliméteres pontossággal mértem meg a fejlődött gyökerek és száruk hosszát, mely adatokból gátlási százalék értékeket határoztam meg.

#### 11.2.2. Bakteriális kommunikációra gyakorolt hatás felmérése

A nanorészecskék mikrobiális kommunikációra gyakorolt hatását – a korábban említett *A. fischeri* biolumineszcencia intenzitásának mérése mellett – a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium különböző, kvórum vezérelt folyamatainak keresztül is vizsgáltam, így a biofilmképzés és ploverdin termelés mértékét is meghatároztam.

Kísérleteimhez *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 (ATCC 27853; WDCM 00025; NCTC 12934) törzset használtam, melynek laboratóriumi fenntartása és a tesztekhez készített O/N kultúra készítése az *E. coli* tesztnél ismertetett módszerek megfelelő módon történt.

A teszt kivitelezését mikrotitrátor lemezben végeztem, melynek során 50 µL nanoszuszpenziót mértem a lemez celláiba, majd 150 µL baktériumtenyészetet adtam hozzá. Kontrollként desztillált vizet alkalmaztam, továbbá minden kezelést hat párhuzamos mérésben végeztem. Az elkészített lemezeket alufóliába csomagolva, sötétben inkubáltam 30 °C-on 6, 24, illetve 48 órán keresztül.

A korábban részletezett módon vizsgáltam a nanorészecskék sejtszaporodásra, enzimaktivitásra, és ROS képződésre gyakorolt hatását. Ugyanakkor a bakteriális kommunikáció által szabályozott biofilmképzés és pioverdin termelés befolyásolását is nyomon követtem.

#### 11.2.2.1. *A Pseudomonas aeruginosa biofilmképzésének vizsgálata*

Az inkubációs idő letelte után 150 µL felülúszót átpipettáztam – ügyelve arra, hogy a pipetta hegye csak a felső folyadékfázist érje – egy másik lemezbe, majd optikai denzitást és enzimaktivitást mértem annak érdekében, hogy a biofilmet nem képező sejtek mennyiségéről további információt szerezzek.

A biofilmképződés intenzitásának meghatározására O’Toole és munkatársai (2010), valamint Berkl és munkatársai (2022) által leírt, módosított eljárást alkalmaztam. Így a cellákban maradt felülúszót kiöntöttem, majd egy csapvizet tartalmazó kádban gyengéden mostam kétszer a lemezt, ügyelve arra, hogy ne sértsem a képződött biofilmet. Mosást követően papírtörlet szűrőttem a lemezt, majd 250 µL 0,1%-os kristályibolya oldatot mértem a cellákba és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltam a lemezt, hogy megfessem a biofilmet alkotó sejteket. Ezután kiöntöttem a festéket a lemezből, majd ismét csapvízben mostam kétszer a lemezt. Ezt követően 250 µL 30%-os ecetsavat pipettáztam a cellákba és 15 percig állni hagytam szobahőmérsékleten, hogy oldatba vigyem a (biofilmet képező) sejtek által megkötött festéket. Az inkubációs idő letelte után a cellák tartalmát pipettával homogenizáltam, és a kristályibolyát tartalmazó ecetsavas oldatból 250 µL-t átpipettáztam egy új, tiszta lemezbe. Ezt követően Fluostar Optima (BMG Labtech) lemezleolvasóval mértem a cellák abszorbancia értékét 544 nm hullámhosszon. A mért adatok alapján a kontrollhoz képesti relatív biofilmképződés intenzitást határoztam meg.

#### 11.2.2.2. *A Pseudomonas aeruginosa pioverdin termelésének vizsgálata*

A pioverdin egy *P. aeruginosa* által termelt fluoreszcens sziderofór, így a fluoreszcencia intenzitás mérésén keresztül információt kaphatunk a pioverdin mennyiségéről, így a nanorészecskék ezen kvórum-vezérelt folyamatra gyakorolt hatásáról.

A teszt elvégzése során LB tápközeg helyett King-B tápközeg (20 g proteáz-pepton, 1,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 g MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 15 g glicerin, 1 L desztillált víz, pH=7,2) alkalmaztam, mivel ez a médium elősegíti a pioverdin termelést (Lee és mtsai., 2018). Ennek megfelelően a lemezek összeállítását megelőzően, a baktériumtenyészet 100-szoros hígításához is King-B tápközeg használtam.

A cellák fluoreszcencia intenzitásának mérését az összeállított lemezek inkubációját megelőzően és azt követően Fluostar Optima (BMG Labtech) lemezleolvasóval mértem a következő beállítással: excitáció 485 nm és emisszió 520 nm hullámhosszon. A relatív fluoreszcencia intenzitás növekedést a kontrollhoz képest számítottam.

### 11.2.3. Mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése

A mikrobiális közösségre gyakorolt hatások vizsgálatához mikrokozmosz rendszereket alkalmaztam, és minden kezeléshez 3 párhuzamos reaktor állítottam össze. A kísérletek során kontrollként desztillált vizet használtam a nanorészecskéket tartalmazó szuszpenzió helyett.

#### 11.2.3.1. Vízi közösségre gyakorolt hatás felmérése

A vízben élő mikroflóra metabolikus aktivitásának változásának felmérése élő vízből származó vízminta használatával történt. Vizsgálataimhoz a Balaton sekély, partmenti vizéből vettem Révfülöpnön (46°49'36.5" É 17°37'50.5" K) steril üvegbe mintát, melyeket felhasználásig (24 órán belül) hűtve tároltam.

#### Balaton víz fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzése

A pH és a vezetőképesség (EC) nem változott jelentős mértékben a vizsgálat során. Titán-dioxid esetén a pH  $8,69 \pm 0,03$ , az EC  $632,0 \pm 9,5 \mu\text{S}$ , míg cink-oxid esetén a pH  $8,97 \pm 0,12$  az EC  $693,8 \pm 32,9 \mu\text{S}$  volt 14 nap elteltével.

A grafén-oxid hatásának felmérésére gyűjtött vízminta analitikai vizsgálatának eredményei az M8. táblázatban láthatóak.

**M8. táblázat** – A kísérlethez használt édesvíz jellemzői

Vízminták a Balatonból	pH (1)	EC (2)	NO <sub>3</sub> (NO <sub>2</sub> )-N (3)	K <sup>+</sup> (4)	Na <sup>+</sup> (4)	Ca <sup>2+</sup> (4)	Mg <sup>2+</sup> (4)	Cl <sup>-</sup> (5)	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (6)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (6)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (7)
	-	μS/cm	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/l	mg/L	mg/L
Mintavétel ideje: július	8,3 ±0,2	707 ±16	0,22 ±0,10	6,7 ±0,2	36,4 ±0,4	33,9 ±0,1	58,8 ±0,1	38,4 ±2,6	27,9 ±13,2	233,4 ±26,8	134,2 ±0,2
Mintavétel ideje: október	8,8 ±0	664 ±20	0,14 ±0	7,2 ±0,6	37,4 ±1,3	27,6 ±2,7	60,3 ±2,1	40,3 ±0,0	46,5 ±4,4	211,3 ±40,1	141,5 ±4,6

(1) HS 21470-2:981 módszer szerinti mérés alapján.

(2) HS EN 27888:1988 módszer szerinti mérés alapján.

(3) ISO 7890-3:1988 módszer szerinti mérés alapján.

(4) ICP-OES, HS EN 11885:2005 módszer szerinti mérés alapján.

(5) EPA 9253:1994 módszer szerinti mérés alapján.

(6) HS EN ISO 9963-1:1998 módszer szerinti mérés alapján.

(7) HS 448-13:1983 módszer szerinti mérés alapján.

A mikrokozmoszok összeállítása során (nZnO és nTiO<sub>2</sub> esetén) 100 mL térfogatú Schott-üvegekbe mértem 45 mL Balaton vizet, majd 10 mL nanoszuszpenziót pipettáztam hozzá úgy, hogy a nanorészecskék végső koncentrációja 0,8; 4; 20; 100 mg/L legyen. Ezt követően 120 rpm-n rázatva, szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltam őket, majd 3, 7 és 14 nap elteltével mintát vettem belőlük, mellyel végeztem további vizsgálataimat.

Grafén-oxid esetén 250 mL térfogatú Schott-üvegbe mértem 190 mL vízmintát, majd szintén 10 mL nanoszuszpenziót adtam hozzá úgy, hogy a GO végső koncentrációja 0,16; 0,8; 4; 20; 100 mg/L legyen. Az inkubáció hasonló körülmények között történt, míg mintavételre 7, 14 és 28 nap elteltével került sor.

A mikroflóra közösségi szintű fiziológiai profilozása (CLPP – Community-Level Physiological Profiling) céljából 125  $\mu\text{L}$  mintát pipettáztam Biolog EcoPlate™ celláiba. A Biolog EcoPlate™ egy 31 szénforrást és tetrazólium indikátort tartalmazó mikroplate, mely indikátor színváltozása jelzi, ha az adott szubsztrát metabolikus hasznosításra kerül.

A lemez összeállítását követően azonnal, majd 24 óránként mértük az optikai denzitást (OD) 490 nm hullámhosszon DIALAB ELISA EL800 mikrotitrátor lemez leolvasó segítségével. A lemezek inkubációja 25 °C-on, alufóliába csomagolva, sötétben történt nZnO és nTiO<sub>2</sub> esetén 120, míg GO esetén 168 órán keresztül.

A mért adatok alapján különböző vizsgálati végpontokat, diverzitás indexeket határoztunk meg, melyeket az M9. táblázat szemléltet.

Az átlagos színfejlődési érték (AWCD) a mikrobaközösség teljes metabolikus aktivitását méri, és az összes szubsztrát hasznosításának átlagos intenzitásán alapul. Ez jól összegzi a közösség általános aktivitását, de nem ad információt a diverzitásról.

A hasznosított szubsztrátok száma (SR) azt mutatja meg, hogy hány szubsztrátot hasznosított a közösség az EcoPlate-en. Ez az érték a funkcionális diverzitásra utal, de nem veszi figyelembe a szubsztrátok hasznosításának intenzitását.

A görbe alatti terület (AUC) a színfejlődési érték görbéje alatti területet integrálja, amely a metabolikus aktivitás időbeli mértékét jellemzi. Emiatt szorosan korrelál az átlagos színfejlődési értékkel, ezért külön számítása redundáns lehet. Mivel az átlagos színfejlődési érték könnyebben számítható, ezért inkább annak használata javasolt.

A Shannon-index (H) a közösség funkcionális diverzitásának mérésére szolgál, figyelembe véve mind a szubsztrátok számát, mind a szubsztrátok hasznosításának egyenletességét.

A Shannon-egyenletesség (E) azt méri, hogy a szubsztrátok hasznosítása mennyire egyenletes (függetlenül a hasznosított szubsztrátok számától).

A Simpson-index (D) a dominanciát méri: vagyis, hogy a mikrobiális aktivitás néhány szubsztrátra koncentrálódik-e, vagy egyenletesen oszlik el. Gyakran korrelál a Shannon-indexszel, de inkább a domináns szubsztrátok aktivitását emeli ki.

A McIntosh-index (U) a közösség funkcionális diverzitását és egyenletességét méri, de érzékenyebb a változásokra, mint a Shannon- vagy Simpson-index, mert figyelembe veszi a mikrobiális aktivitás relatív erősségét.

A Gini-index (G) az egyenlőtlenségeket méri a szubsztrátok hasznosításában, hasonlóan az egyenletességi mutatókhoz. Általában a Shannon-egyenletességgel korrelál, ezért önmagában ritkán használják.

A szubsztrátcsoportonként átlagos színfejlődési érték (SAWCD) az átlagos színfejlődési értékhez hasonló, de szubsztrátcsoportonként mutatja az aktivitást. Ez hasznos lehet specifikus szubsztrátcsoportok (például szénhidrátok, aminosavak) metabolizmusának vizsgálatára.

**M9. táblázat** – A *Biolog EcoPlate™* adatai alapján meghatározott végpontok

Végpont neve	Számítás módja	Magyarázat
Szubsztrátszám (SR)	$SR = \sum_{i=1}^N OD_i \geq 0,5$	N: szubsztrátok száma (jelen esetben N=31) OD <sub>i</sub> : korrigált OD érték, minden szubsztrátot tartalmazó cellának 120h, illetve 168h elteltével
Átlagos színfejlődési érték (AWCD)	$AWCD = \frac{\sum_{i=1}^N OD_i}{N}$	N: szubsztrátok száma (jelen esetben N=31) OD <sub>i</sub> : korrigált OD érték, minden szubsztrátot tartalmazó cellának
Szubsztrátcsoportonkénti átlagos színfejlődési érték (SAWCD)	$SAWCD = \frac{\sum_{i=1}^N OD_i}{N}$	N: szubsztrátok száma a szubsztrátcsoporton belül OD <sub>i</sub> : korrigált OD értéke a szubsztrátoknak a szubsztrátcsoporton belül
Görbe alatti terület (AUC)	$AUC = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^n \frac{OD_{i_n} + OD_{i_{n+1}}}{2 \cdot (t_{i_{n+1}} - t_{i_n})}$	N: szubsztrátok száma (jelen esetben N=31) n: mérések száma OD <sub>i</sub> : korrigált OD érték, minden szubsztrátot tartalmazó cellának, két egymást követő, különböző mérési időpontban
Shannon-index (H)	$H = - \sum_{i=1}^N P_i \cdot \ln P_i$ $P_i = \frac{OD_i}{\sum_{i=1}^N OD_i}$	N: szubsztrátok száma (jelen esetben N=31) P <sub>i</sub> : relatív színfejlődési értéke egy adott cellának az összes cella színfejlődéséhez képest
Shannon-egyenletesség (E)	$E = \frac{H}{\ln(SR)}$	H: Shannon-index SR: szubsztrátszám
Simpson-index (D)	$D = - \ln \sum_{i=1}^N (P_i)^2$	N: szubsztrátok száma (jelen esetben N=31) P <sub>i</sub> : relatív színfejlődési értéke egy adott cellának az összes cella színfejlődéséhez képest
McIntosh-index (U)	$U = \sqrt{\sum_{i=1}^N (OD_i)^2}$	N: szubsztrátok száma (jelen esetben N=31) P <sub>i</sub> : relatív színfejlődési értéke egy adott cellának az összes cella színfejlődéséhez képest
Gini-index (G)	$G = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N  OD_i - OD_j }{2N^2 \cdot (AWCD)}$	N: szubsztrátok száma (jelen esetben N=31) OD <sub>i</sub> : korrigált OD érték, minden szubsztrátot tartalmazó cellának AWCD: átlagos színfejlődési érték

#### 11.2.4. Policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok remediációja

A metagenomikai módszerekkel tervezett PAH-bontó enzimek működésének és hatékonyságának vizsgálatára mikrokozmosz rendszereket alakítottunk ki.

Ennek során az ELGOSCAR Környezettechnológiai Zrt.-től származó, mesterségesen szennyezett aleuritos homoktalajt használtuk, amely ismert mennyiségű PAH szennyezőanyagot (12,5 mg/kg naftalin, 25,9 mg/kg fenantrén, 46,2 mg/kg antracén és 52,0 mg/kg pirén) tartalmazott.

A bioremediációs mikrokozmosz kísérletekhez a közeget az ELGOSCAR Környezettechnológiai Zrt. biztosította számunkra. A technológiai mikrokozmoszokban kőzetlisztes homokot (aleurit) alkalmaztunk. A közeg szennyezés előtti főbb mérési paramétereit az M10. táblázat mutatja. A kőzetlisztes homok lúgos kémhatású volt, alacsony összes nitrogén tartalommal rendelkezett. A közeg oldott szerves szén (Dissolved Organic Carbon; DOC) tartalma – ami a talajban élő és elpusztult mikroorganizmusok maradványairól, illetve azok bomlástermékeinek mértékéről is ad információt – 21 mg/L volt, ami közepesnek mondható. A közeg nem tartalmazott szennyezőanyagot, minden mért komponens kimutathatósági határérték alatt volt.

**M10. táblázat** – A kőzetlisztes homok főbb vizsgálati eredményei

Paraméter	Mért érték
Kémhatás	8,97
Nitrition (oldott) mg/kg sz.a.	<1,00
Nitrátion (oldott) mg/kg sz.a.	<10,00
Kjeldahl-nitrogén mg/L 1:10 vizes kivonatból	1,4
Összes nitrogén mg/L 1:10 vizes kivonatból	1,4
DOC mg C/L 1:10 vizes kivonatból	21
Naftalinok mg/kg sz.a.	<0,01
PAH-ok naftalinok nélkül mg/kg sz.a.	<0,01
Összes PAH mg/kg sz.a.	<0,01
VPH C5-C12 mg/kg sz.a.	<5,0
EPH C12-C40 mg/kg sz.a.	<5,0
TPH C5-C40 mg/kg sz.a.	<10,0
Egyéb alkilbenzolok összesen sz.a. mg/kg sz.a.	<0,01

A mikrokozmoszok összeállítása során 500 mL térfogatú Schott üvegekbe mértem 200 g szennyezett közeget, majd kezeléstől függően további adalékanyagokat adtam hozzájuk (M11. táblázat). Minden kezelést három párhuzamosban végeztem el.

**M11. táblázat** – Az új típusú enzimek működőképességének és PAH-degradáló hatékonyságának felméréséhez készített mikrokozmoszok összeállítása

Kezelés	Összetevők
Kontroll	200 g talaj + 5 mL enzim-mentes puffer
CaO <sub>2</sub>	200 g talaj + 5 mL enzim-mentes puffer + 1,44 g CaO <sub>2</sub>
E99	200 g talaj + 5 mL E99 enzimet tartalmazó puffer
E105	200 g talaj + 5 mL E105 enzimet tartalmazó puffer
E39	200 g talaj + 5 mL E39 enzimet tartalmazó puffer
E99 + CaO <sub>2</sub>	200 g talaj + 5 mL E99 enzimet tartalmazó puffer + 1,44 g CaO <sub>2</sub>
E105 + CaO <sub>2</sub>	200 g talaj + 5 mL E105 enzimet tartalmazó puffer + 1,44 g CaO <sub>2</sub>
E39 + CaO <sub>2</sub>	200 g talaj + 5 mL E39 enzimet tartalmazó puffer + 1,44 g CaO <sub>2</sub>

Az 'E99', valamint 'E105' jelű gentizát 1,2-dioxigenáz, és az 'E39' jelű kataláz-peroxidáz enzimekből 1 mg-t adtam a talajokhoz 5 mL pufferben (140 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl; pH=7,5) (Nagy és mtsai., 2024).

Mivel a CaO<sub>2</sub> több tanulmány szerint elősegíti PAH degradációt, így kísérleteimet kiegészítettem 20 mmol CaO<sub>2</sub> jelenlétének vizsgálatával, mely eléréséhez 1,44 g-ot adtam a mikrokozmoszokhoz a Sigma-Aldrich Merck cégtől beszerzett CaO<sub>2</sub>-ből (CAS 78403-22-2) (cikkszám: 466271).

Egyéb tápanyagforrást (pl. nitrogén vagy foszfor) nem adtunk hozzá a mikrokozmoszokhoz.

A mikrokozmosz rendszerek összeállítását követően szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltam őket, majd a 7 napos inkubációs idő elteltével mintát vettem belőlük, és vizsgáltam a szennyezőanyag tartalmát, illetve mikrobiális aktivitást.

A nano cink-oxid PAH biodegradáció hatékonyságára gyakorolt hatását a korábbi kísérletek alapján legígéretesebb, vagyis legnagyobb mikrobiális aktivitást, illetve szennyezőanyag eltávolítást eredményező 'E39' és 'E105' enzimek (Nagy és mtsai., 2024) használatával mértem fel. Ennek során a korábbiakhoz hasonlóan kialakított mikrokozmosz rendszereket hoztam létre, amikhez 588 µL nZnO szuszpenziót adtam, hogy 200, illetve 1000 mg/kg végső nZnO koncentrációt érjek el. Kontrollként desztillált vizet (DV), valamint enzim-mentes puffert alkalmaztam, továbbá az összehasonlíthatóság, illetve a nZnO szennyezőanyag degradációra gyakorolt hatásának felmérése érdekében 10 mmol koncentrációban alkalmaztam CaO<sub>2</sub>-t (M12. táblázat).

Ezen kísérletek során a szennyezett közeg kiindulási PAH koncentrációja a gázkromatográfiás mérések alapján az alábbi volt: 6,31 mg/kg naftalin, 24,6 mg/kg fenantrén, 21,9 mg/kg antracén, 29,2 mg/kg pirén, 0,11 mg/kg krizén, továbbá az összes PAH koncentrációja 89,9 mg/kg.

**M12. táblázat** – A PAH-degradáció hatékonyságának felméréséhez készített mikrokozmoszok összeállítása

Kezelés	Összetevők
Kontroll	200 g talaj + 5 mL enzim-mentes puffer + 588 µL DV
E39	200 g talaj + 5 mL E39 enzimet tartalmazó puffer + 588 µL DV
E105	200 g talaj + 5 mL E105 enzimet tartalmazó puffer + 588 µL DV
CaO <sub>2</sub>	200 g talaj + 5 mL enzim-mentes puffer + 588 µL DV + 0,72 g CaO <sub>2</sub>
E39 + CaO <sub>2</sub>	200 g talaj + 5 mL E39 enzimet tartalmazó puffer + 588 µL DV + 0,72 g CaO <sub>2</sub>
E105 + CaO <sub>2</sub>	200 g talaj + 5 mL E105 enzimet tartalmazó puffer + 588 µL DV + 0,72 g CaO <sub>2</sub>
nZnO-200	200 g talaj + 5 mL enzim-mentes puffer + 588 µL nZnO szuszpenzió
E39 + nZnO-200	200 g talaj + 5 mL E39 enzimet tartalmazó puffer + 588 µL nZnO szuszpenzió
E105 + nZnO-200	200 g talaj + 5 mL E105 enzimet tartalmazó puffer + 588 µL nZnO szuszpenzió
nZnO-1000	200 g talaj + 5 mL enzim-mentes puffer + 588 µL nZnO szuszpenzió
E39 + nZnO-1000	200 g talaj + 5 mL E39 enzimet tartalmazó puffer + 588 µL nZnO szuszpenzió
E105 + nZnO-1000	200 g talaj + 5 mL E105 enzimet tartalmazó puffer + 588 µL nZnO szuszpenzió

#### 11.2.4.1. Talajlakó mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése

A mikrobiális közösség metabolikus aktivitás-változásának céljából Biolog EcoPlate<sup>TM</sup>-et alkalmaztam. Ehhez 5 g talajmintát mértem 100 mL térfogatú steril üvegbe, majd 45 mL steril, 0,85%-os NaCl oldatot adtam hozzá. Ezt követően 30 percig 180 rpm fordulatszámra ráztattam a szuszpenziót, majd 10 percig ülepedni hagytam, majd 1 mL felülúszót pipettáztam 9 mL steril, 0,85%-os NaCl oldathoz, melyből rendszeres homogenizálás közben 125 µL mintát pipettáztam

a Biolog EcoPlate™ celláiba. A továbbiakban az inkubáció, mérés, illetve indexek számolásának menete megegyezett a korábban ismertetett eljárással.

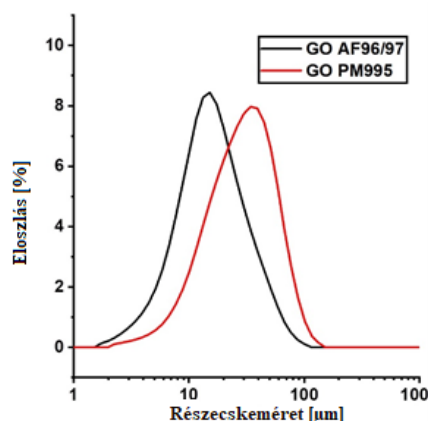
#### 11.2.4.2. Szennyezőanyag koncentrációjának mérése

Az inkubációs idő letelte után a közegben visszamaradt PAH vegyületek koncentrációját Agilent 6890 5973N típusú gázkromatográf (GC-MS) határoztuk meg a 21470-84:2002 szabvány módszer szerint.

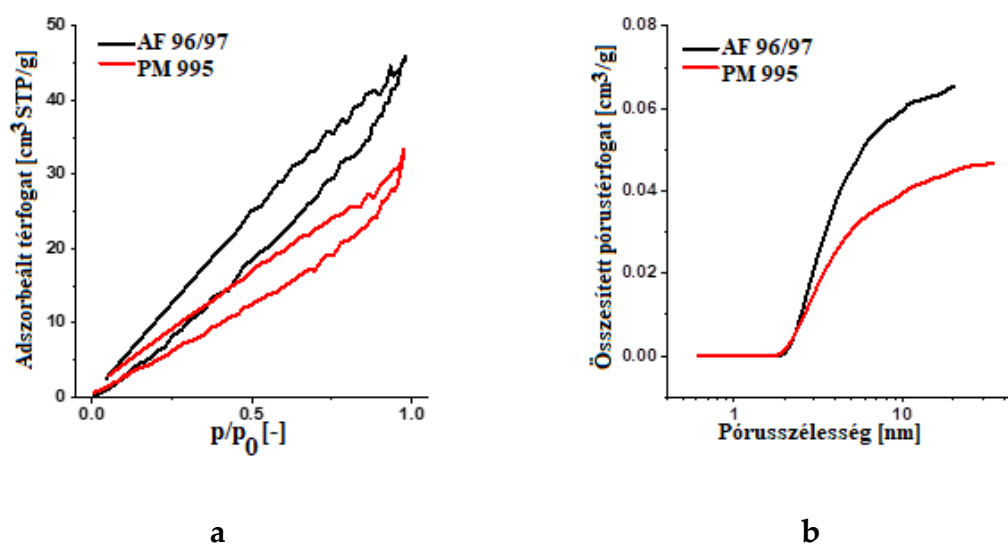
### 11.3. Az értekezés tárgyához tartozó kiegészítő eredmények és információk

A kísérletek során nyert adatokból származtatott további eredmények, melyek fontos és hasznos kiegészítő információt nyújtanak a korábban bemutatott adatok értelmezéséhez, illetve interpretációjához, az alábbi fejezetben kerülnek taglalásra.

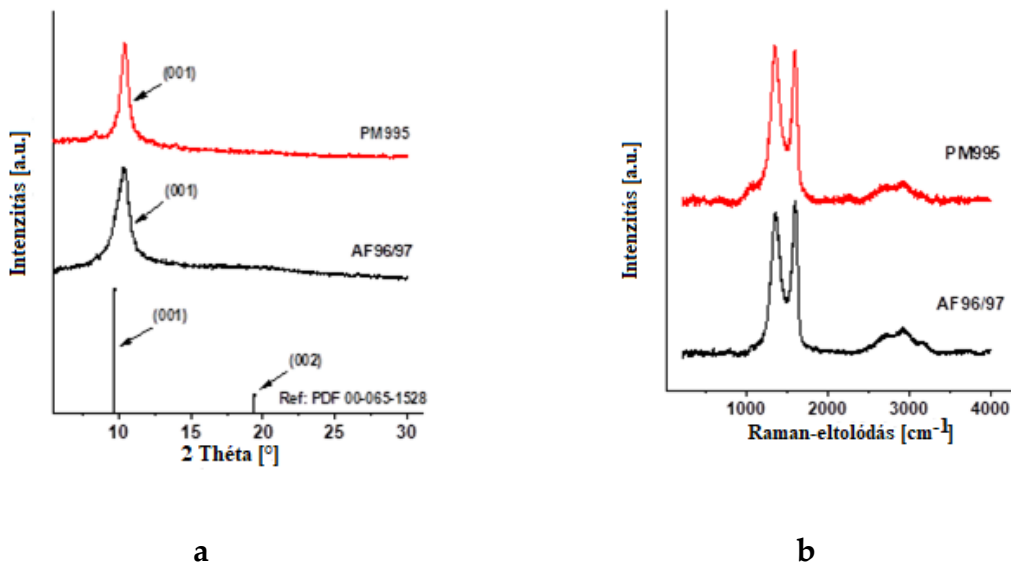
#### 11.3.1. A grafén-oxid szuszpenziók fizikai-kémiai jellemzői



**M1. ábra:** A két grafén-oxid minta szemcseméret-eloszlása, melynek mérése hígított vizes szuszpenziókból történt lézer-szórásos alapuló szemcseméret-eloszlás analízissel (HORIBA LA 950 A2, Horiba, Franciaország).



**M2. ábra:** A grafén-oxid minták alacsony hőmérsékletű (-196 °C) nitrogénadszorpciós izotermái (a), valamint a hozzájuk tartozó pórusméret-eloszlás (QSDFT, rés geometria) (b) (Nova 2000e, Quantachrome, Boynton Beach, FL, USA).



**M3. ábra:** A fagyasztva szárított grafén-oxid minták por-röntgendiffrakciós (XRD) görbéi (a) és Raman-spektrumai (b)

**M13. táblázat** – A grafén-oxid minták jellemzői a nitrogén adszorpciós izotermák alapján

Típus	Fajlagos felület [m <sup>2</sup> /g]	Teljes pórustérfogat [cm <sup>3</sup> /g]
AF 96/97	84	0,071
PM 995	40	0,051

**M14. táblázat** – A grafén-oxid minták felületi kémiai összetétele röntgen-fotoelektron-spektroszkópia (XPS) valamint a C1 és O1 régiók bomlása (%)

Minta	C	O	S	C1	C2	C3	C4	C5	O1	O2	O3
	atom %										
AF 96/97	66,5	32	1,5	23	5,6	30,2	5,3	2,3	11,1	17,8	3,1
PM 995	65,6	33,1	1,3	19,8	5,5	33,2	5,1	2	10,2	19,2	3,7

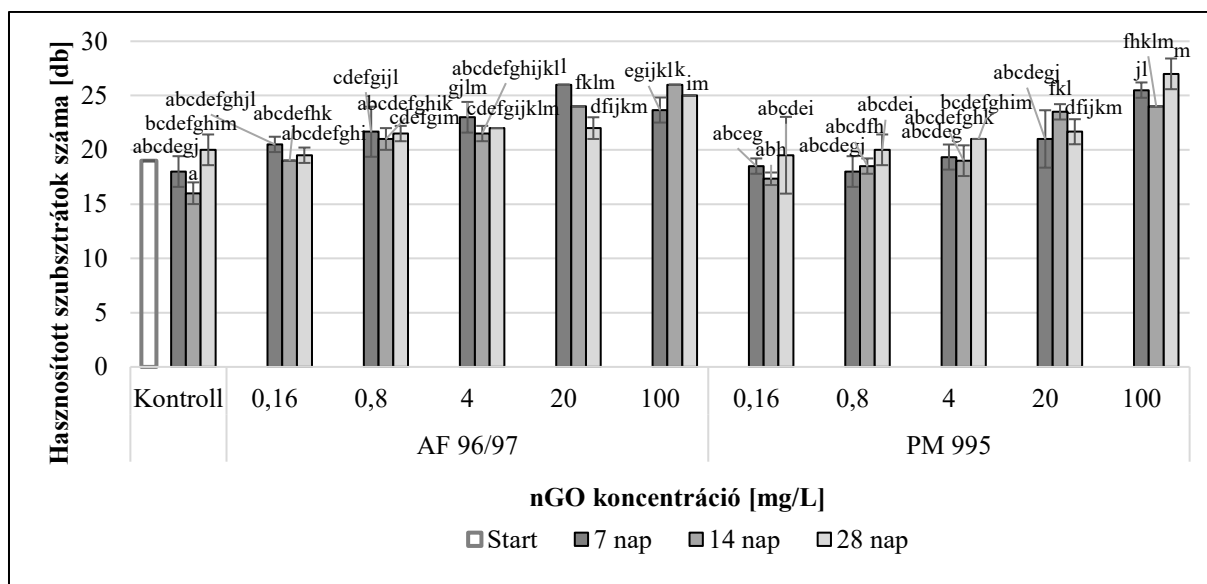
#### Kémiai állapotok hozzárendelése

Komponens	Kötési energia (eV)	Kémiai állapot
C1	284,3 ± 0,1	sp <sup>2</sup> C=C aromás
C2	285,1 ± 0,2	sp <sup>3</sup> C-C amorf, alifás
C3	286,4 ± 0,2	C–O–C éter, epoxi, C–OH hidroxil
C4	287,7 ± 0,2	C a C=O karbonil csoportban
C5	288,7 ± 0,2	C az O=C–O csoportban
O1	531,5 ± 0,2	O a karbonil csoportban
O2	532,6 ± 0,2	O éterben és epoxiban, OH alkoholban, C=O észterben
O3	533,5 ± 0,2	C-O-C észterben, OH karboxil csoportban

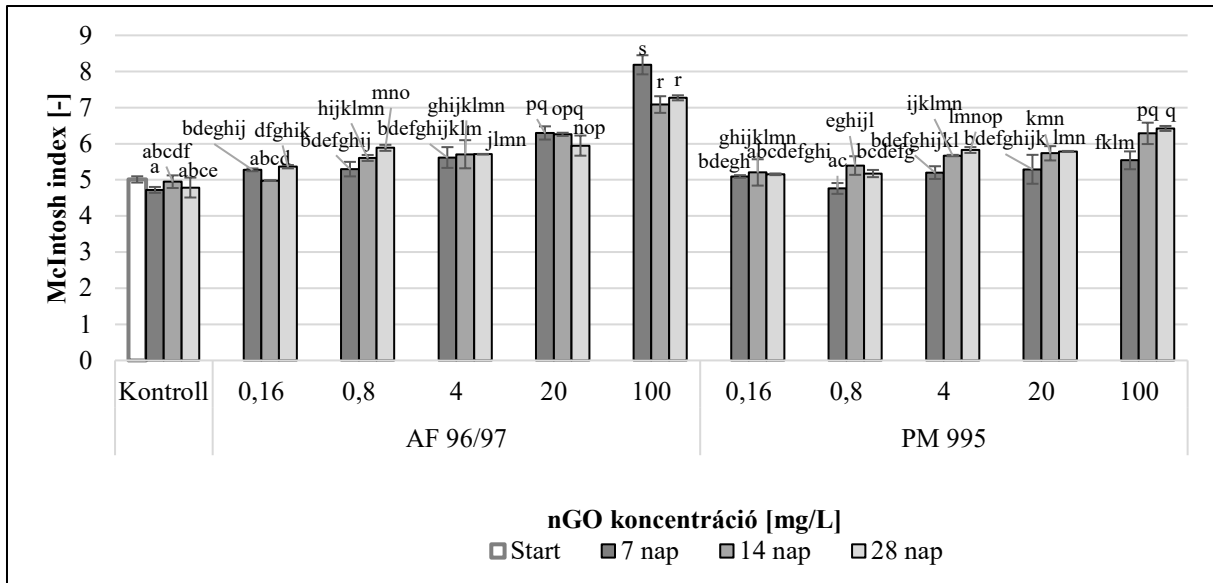
### 11.3.2. Grafén-oxidot alkalmazó kísérletek eredményei

**M15. táblázat** – A nano grafén-oxid hatása az *Escherichia coli* ROS termelésére

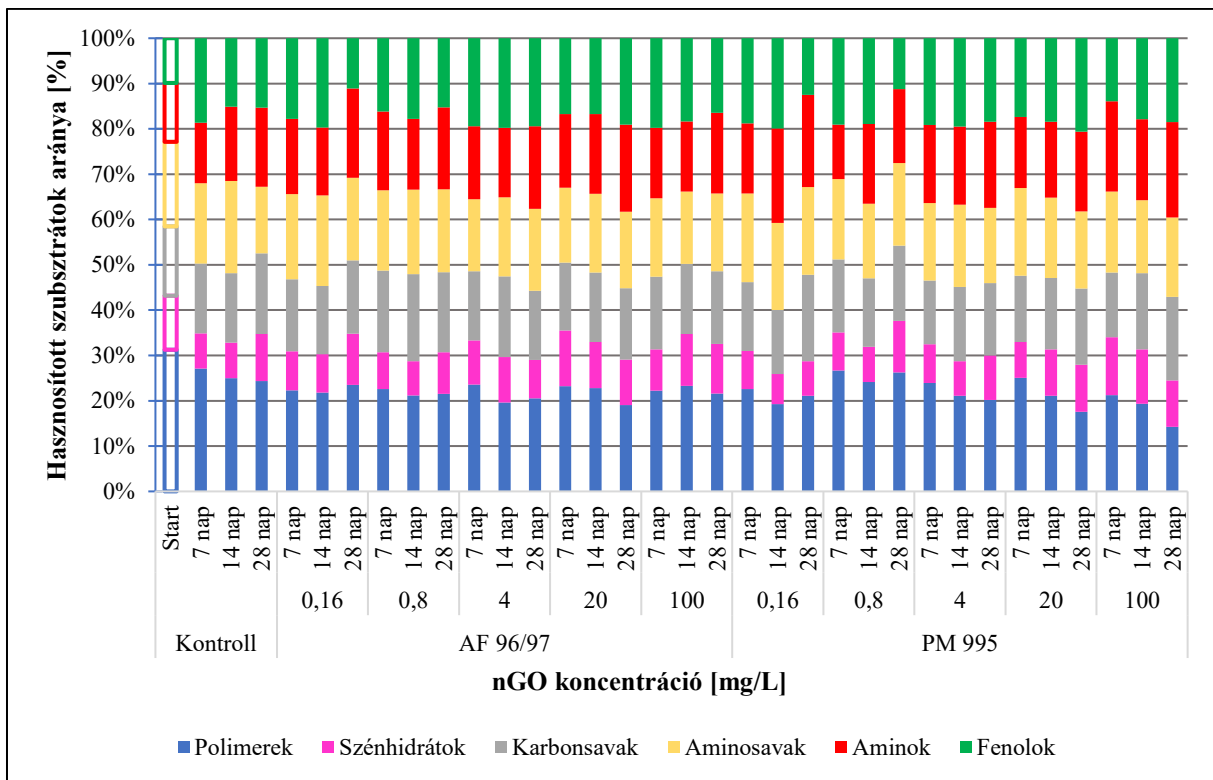
Végpont	ROS gátlás [%]							
Koncentráció [mg/L]	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	100	200
AF 96/97	8,48 (± 1,28)	12,66 (± 0,96)	17,77 (± 0,74)	22,77 (± 0,61)	30,53 (± 0,29)	38,7 (± 0,83)	47,75 (± 1,22)	62,88 (± 2,37)
PM 995	7,44 (± 0,91)	8,24 (± 0,38)	11,88 (± 0,77)	17,8 (± 0,83)	27,19 (± 1,05)	38,75 (± 1,11)	52,79 (± 1,66)	69,67 (± 1,08)



**M4. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a hasznosított szubsztrátok számára (SR).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).



**M5. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a McIntosh-indexre (U). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).



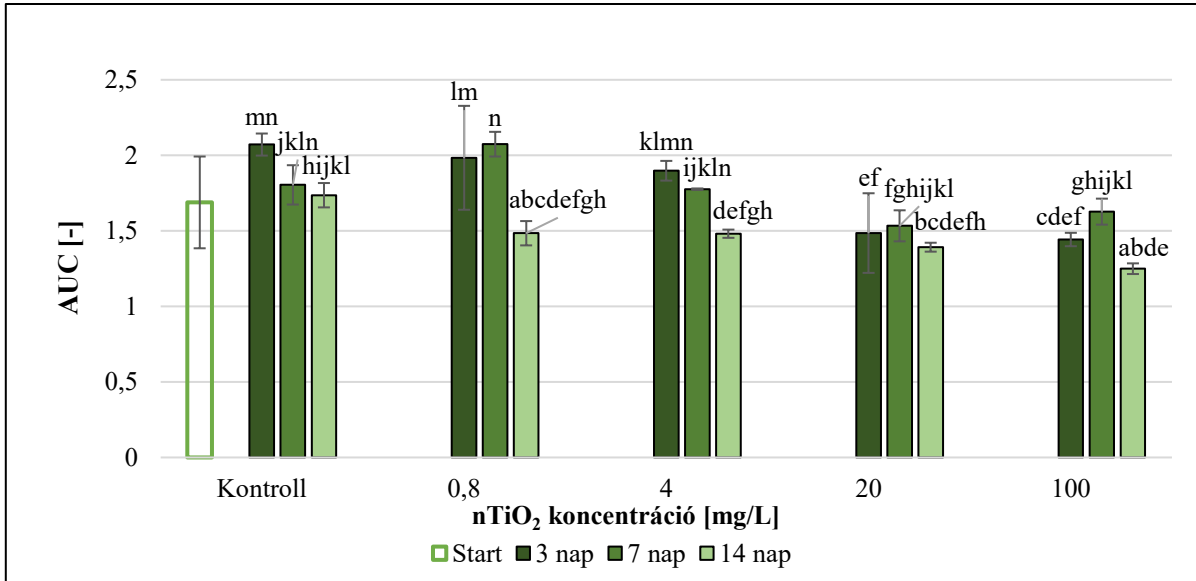
**M6. ábra:** Grafén-oxid nanorészecskék hatása a szubsztrátcsopontonkénti átlagos színfejlődési értékre (SAWCD).

**M16. táblázat** – Pearson-korreláció ( $r$ ) analízis eredménye a nano cink-oxid (nZnO) és nano titán-dioxid (nTiO<sub>2</sub>) koncentráció, valamint a diverzitás indexek közötti kapcsolat felmérésére. A félkövér számok jelzik a szignifikáns korrelációt  $p < 0.05$  szignifikancia szinten

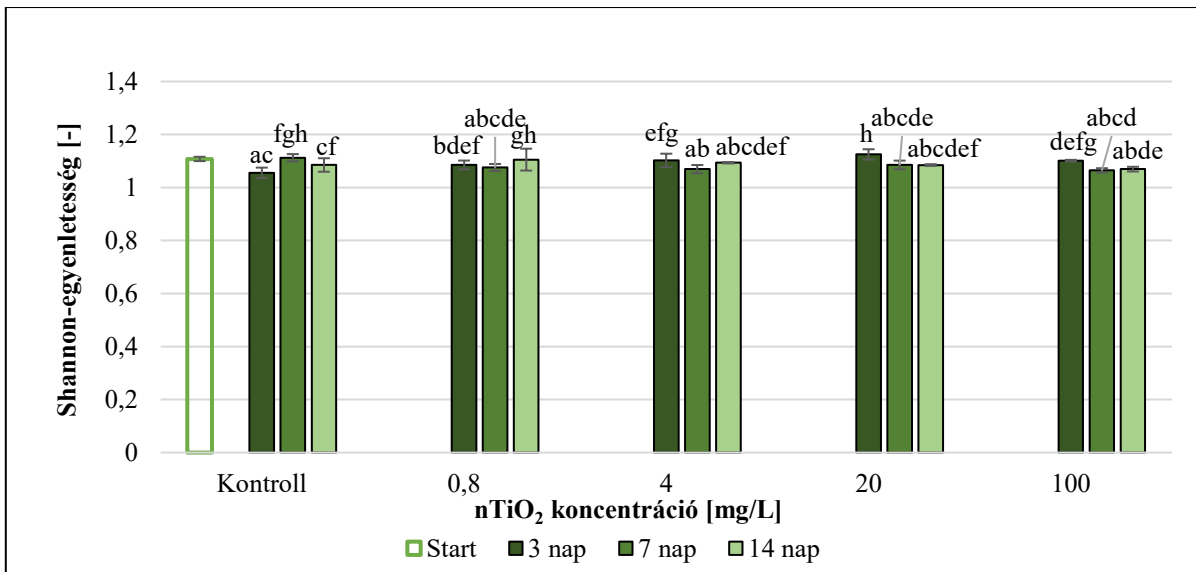
Végpont	r											
	AWCD			AUC			SR			H		
	3 nap	7 nap	14 nap	3 nap	7 nap	14 nap	3 nap	7 nap	14 nap	3 nap	7 nap	14 nap
nZnO koncentráció	<b>-0,997</b>	<b>-0,999</b>	<b>-0,989</b>	<b>-0,999</b>	<b>-1,000</b>	<b>-0,985</b>	<b>-0,993</b>	<b>-0,999</b>	<b>-0,972</b>	<b>-0,997</b>	-0,971	<b>-0,990</b>
nTiO <sub>2</sub> koncentráció	-0,193	-0,380	-0,364	-0,614	-0,479	<b>-0,748</b>	-0,011	0,451	<b>0,850</b>	0,803	0,188	0,582

Végpont	r											
	E			D			U			G		
	3 nap	7 nap	14 nap	3 nap	7 nap	14 nap	3 nap	7 nap	14 nap	3 nap	7 nap	14 nap
nZnO koncentráció	-0,600	<b>-0,723</b>	<b>-0,614</b>	<b>-0,641</b>	<b>-0,887</b>	<b>-0,849</b>	<b>-0,835</b>	<b>-0,838</b>	<b>-0,808</b>	<b>0,894</b>	<b>0,824</b>	<b>0,903</b>
nTiO <sub>2</sub> koncentráció	0,226	-0,379	<b>-0,647</b>	0,538	0,434	0,377	-0,425	-0,529	-0,474	-0,809	-0,676	-0,665

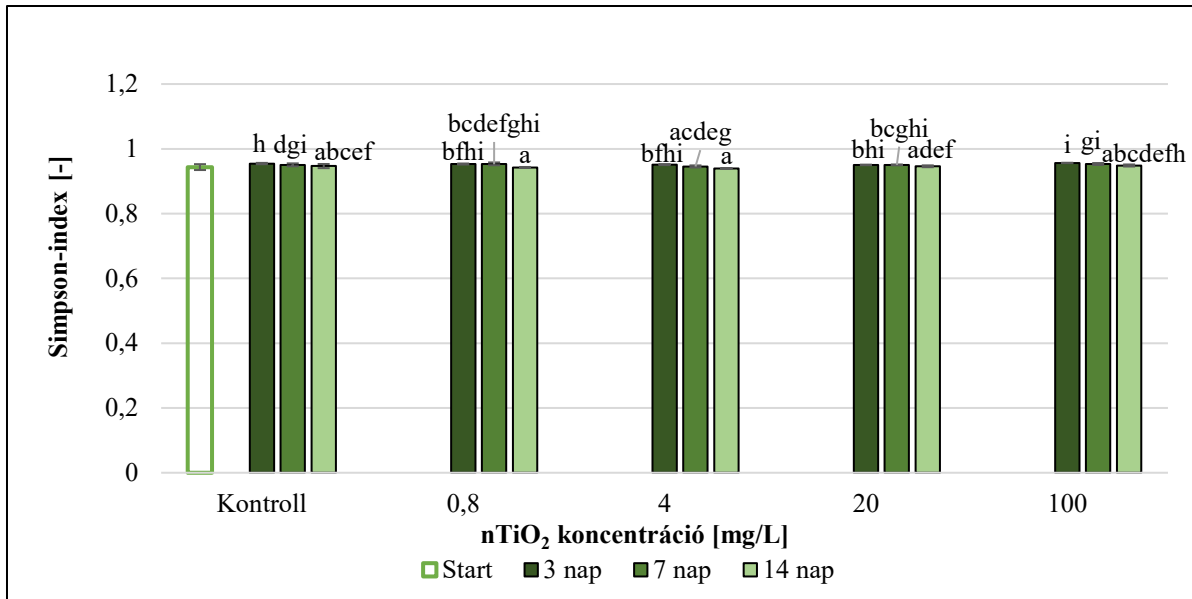
AWCD – Átlagos színfejlődési érték, AUC – Görbe alatti terület, SR - Szubsztrátszám, H – Shannon-diverzitás index, E – Shannon-egyenletesség index, D – Simpson-index, U – McIntosh-index, G – Gini-index



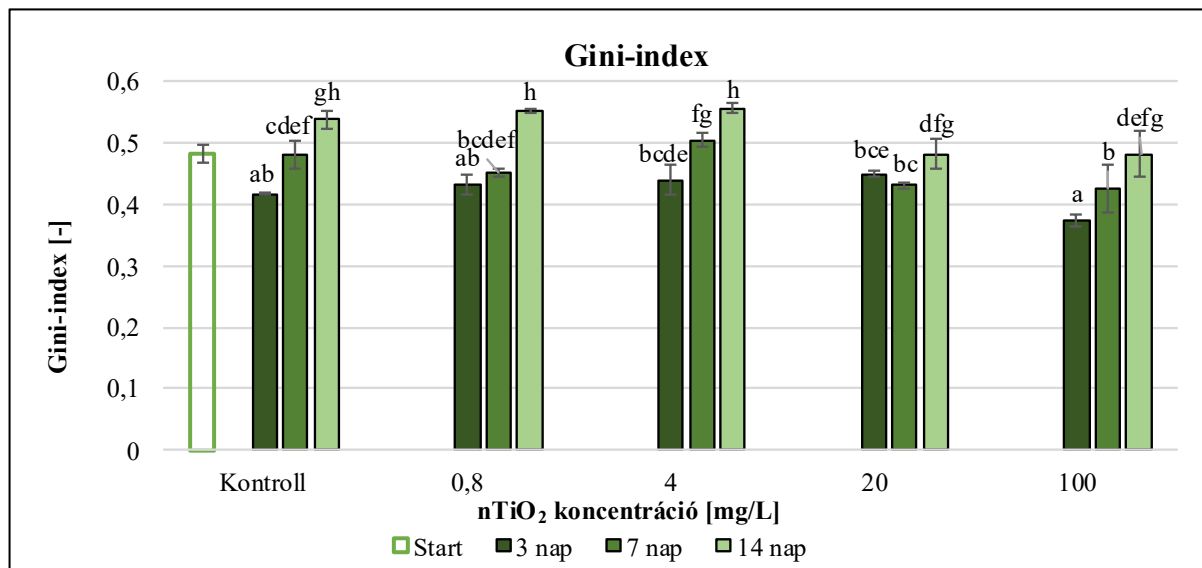
**M7. ábra:** Titán-dioxid nanorészecskék hatása a görbe alatti területre (AUC). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).



**M8. ábra:** Titán-dioxid nanorészecskék hatása a Shannon-egyenletességre (E). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).



**M9. ábra:** Titán-dioxid nanorészecskék hatása a Simpson-indexre (D).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).



**M10. ábra:** Titán-dioxid nanorészecskék hatása a Gini-indexre (G).  
A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

## 12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet és hálámat témavezetőmnek, **Dr. Molnár Mónika** egyetemi docensnek, aki szakmai irányításával, emberi támogatásával és önzetlen segítségével meghatározó módon járult hozzá kutatásom és disszertációm elkészítéséhez. Szemlélete és elhivatottsága nemcsak tudományos munkámat alakította, hanem kutatói attitűdömet is formálta.

Hálás köszönettel tartozom továbbá a **Környezeti Mikrobiológia és Biotechnológia Kutatócsoport** valamennyi munkatársának a mindennapi támogatásért, együttműködésért és a szakmai légkörért. Az együtt töltött évek, a közös munka és az elért eredmények nemcsak tudományos fejlődésemet segítették elő, hanem emberileg is maradandó élményt nyújtottak számomra. Kiemelten fontosnak tartom a közös kutatási eredményeket és publikációkat, amelyek a csapatmunka erejét tükrözik.

Ehhez kapcsolódóan szeretnék köszönetet mondani azoknak a szakdolgozatot és diplomamunkát készítő **hallgatóknak** is, akiknek munkáját konzulensként kísérhettem végig. Közreműködésük jelentős szerepet játszott kutatásom eredményeinek formálásában.

Továbbá szeretném kifejezni hálámat **családomnak**, akik tanulmányaim minden szakaszában támogattak és mellettem álltak. Megértésük, türelmük és biztatásuk nélkül e dolgozat nem jöhetett volna létre.

Végezetül köszönöm a következő projektek és ösztöndíjak támogatását:

- a Kulturális és Innovációs Minisztérium, valamint a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal „Versenyképességi és kiválósági együttműködések (VKE\_17)” programjának **NKFIH 4283-1/2017 VKE\_17 pályázat**,
- a Kulturális és Innovációs Minisztérium, valamint a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal **K128410 és K143571 kutatási témapályázatai**,
- a Kulturális és Innovációs Minisztérium, valamint a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal TKP2021 pályázati programjának **BME-EGA-02 pályázat**,
- a HORIZON-MSCA-2022-SE-01-0 **CLEANWATER (#101131382) pályázat**,
- a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Varga József Alapítványának **Pungor Ernő Doktorvárományosi Ösztöndíja**.

## 13. Nyilatkozatok

### NYILATKOZAT

Alulírott Németh Imre kijelentem, hogy ezt a doktori értekezést magam készítettem és abban csak a megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, amelyet szó szerint, vagy azonos tartalomban, de átfogalmazva más forrásból átvettem, egyértelműen, a forrás megadásával megjelöltem.

Budapest, 2025.07.25.

.....Németh Imre.....  
Németh Imre