

DIPLOMADOLGOZAT

King Claudia Mária

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet

**Környezetgazdálkodási agrármérnök mesterképzési
szak**

**Mikroműanyag felületeket kolonizáló bakteriális közösségek
vizsgálata a Zagyván**

Belső konzulens: Dr. Szabó István

egyetemi docens, tanszékvezető

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:**

Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet,

Környezettoxikológia Tanszék

Készítette:

King Claudia Mária

Szent István Campus, Gödöllő

2023

Tartalom

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzések	3
3. Szakirodalmi áttekintés	4
3.1. A baktériumok története	4
3.2. A baktériumok jellemzői	5
3.3. A biofilm	8
3.3.1. A biofilm a szennyvíztisztításban.....	10
3.4. A 16S rDNS-t vizsgálat.....	10
3.5. A mikroműanyag.....	11
4. Anyagok és módszerek	15
4.1. A „Plastic colonizer” módszer.....	15
4.2. A mintavételi helyszínek bemutatása	16
4.3. A kihelyezés és begyűjtés menete	17
4.4. A minták laboratóriumi feldolgozása	19
4.5. Baktérium tenyésztés.....	21
4.6. A DNS szekvenálással végzett törzsazonosítás	23
4.7. A baktériumtörzsek hosszútávú tárolása -80°C-on	24
5. Eredmények és értékelésük	26
5.1. A baktériumtörzsek izolálásának eredményei	26
5.2. A mikroműanyag analitika eredményei.....	37
6. Következtetések és javaslatok	39
7. Összefoglalás	40
8. Irodalomjegyzék	41
9. Köszönetnyilvánítás	47

1. Bevezetés

A világon az elmúlt 40 évben a műanyagtermelés drasztikusan növekedett, megnégyszereződött. Napjainkban a kitermelt olaj 6%-át használják fel műanyagipari termékekhez (Payne et al. 2019). A műanyagok népszerűsége a megmunkálhatóságból, a kedvező árból következtethető, melyet mind a csomagoló-, mind az építőiparban, de az egészségügyben és más, számos területen alkalmaznak és használnak. Kitűnő mechanikai és kémiai tulajdonságaik miatt, az élet minden területén egyre nagyobb mértékben használjuk. Azonban a műanyag felelőtlen felhasználásának árnyoldalát is ismerjük. Az emberi nemtörődömség, illetve a műanyag hulladékok nem megfelelő, illegális elhelyezéséről számos példát olvashatunk, sőt Magyarországon sok esetben saját szemünkkel is tapasztalhatjuk. Ma még nagyon keveset tudunk arról, hogy a műanyag hosszútávú környezetterhelése milyen következményekkel jár. 2014-ben összesen 311 millió tonnát gyártottak műanyagból. 2015-ben a műanyagipar és a műanyagok, a világ szén-dioxid kibocsátásának 3,8%-át tették ki, ami már önmagában sem alacsony érték, azonban kutatók szerint ez 2050-re elérheti akár a 15%-ot is (Tátraaljai & Pukánszky, 2020).

A műanyagok elterjedésével párhuzamosan jelent meg a mikroműanyagok környezeti előfordulása, amely napjainkban szintén komoly környezetvédelmi kérdéseket vet fel, hiszen a környezeti elemekben és a táplálékláncban is megtalálhatók ezek a szilárd, mesterséges részecskék. A kifejezés, helytelenül ugyan, de a műanyag méretére utal, ugyanis definíció szerint az 5 mm-nél kisebb műanyag szemcséket nevezük mikroműanyagoknak. Ezeket az apró műanyag darabokat legelőször 1970-es években figyelték meg, tengerekben. Kutatások alapján a szennyvíztisztítókból és felszíni vizekben, óceánokban, valamint azok partjain és a különböző élőlényekben is hol több, hol kevesebb mértékű mikroműanyag van jelen. A környezetbe legnagyobb mennyiségben az egyszer használatos csomagolási anyagok hulladékká válásával kerülnek ki és feltételezhető, hogy a mikroműanyagok elsődleges forrásai ezek a termékek.

Annak ellenére, hogy számos visszajelzés alapján a mikroplasztikok nagy problémát jelentenek a környezet és az ökoszisztéma elemeiben napjainkban, ez a tudományterület jelentős mértékben alulkutatózott. A mikroműanyagok környezeti előfordulásának elemzésével kapcsolatban napjainkban is folyamatos az adatgyűjtés.

Még ennél is kevésbé ismert, hogy a mikroműanyag felületek milyen kémiai és biológiai ágenseket tudnak adszorbeálni a felületükön és ezen keresztül transzportálni a környezetben. A mikroműanyagok felületén kialakuló életközösségek (plastiszféra) egyik pionír kolonizáló közösségei a baktériumok. Diplomadolgozatomban Magyarországon, a Zagyván kihelyezett mikroplasztikok felületét kolonizáló baktériumokat terveztem vizsgálni.

2. Célkitűzések

A dolgozatom során a következő célokat szerettem volna megvalósítani:

A Zagyván olyan korábban kidolgozott és publikált módszernek megfelelő ún. „plastic colonizerek” kihelyezése, amelyek segítségével a baktériumközösségek kontrollált módon izolálhatók.

A mintavevő „plastic colonizerek” visszagyűjtése egy hónap után, 2022 júniusában, majd a bennük lévő mikroműanyagok felszínéről baktériumok izolálása és azonosítása molekuláris biológiai 16S rDNS alapú módszerekkel, az egyetem Környezettoxikológia Tanszékén. Az azonosított baktériumokkal kapcsolatos irodalmi kutatás.

A mintavételezéssel egy időben vett mikroműanyag analitikai eredmények értékelése.

3. Szakirodalmi áttekintés

3.1. A baktériumok története

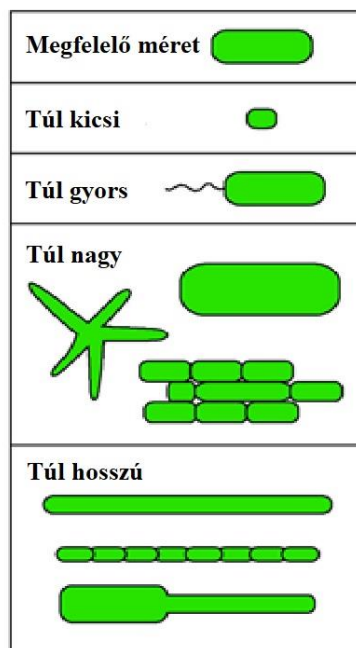
A baktériumok a Föld minden élőhelyén és életterén fellelhetők. Eredetük a „kék bolygó” életének korai periódusaira nyúlik vissza. A legkorábbi fosszíliák alapján a korai devonban (419.2 millió - 358.9 millió évvel ezelőtt) már biztosan léteztek, de a kutatások szerint ennél jóval régebb óta (kb. 1,8 milliárd éve) élnek a bolygón. Tekintettel arra, hogy ilyen régóta népesítik be a Föld felszínét, illetve gyors egyedfejlődésükre mára a legszélsőségesebb körülmények közt is képesek túlélni, akklimatizálódni. Egyes fajaik megtalálhatók felszín alatti és felszín feletti hőforrásokban, radioaktív anyagokban, illetve vízben és szárazföldön egyaránt. Az evolúció kizárólag ezen baktériumsejtek adaptálódásával jöhetett létre. A legtöbb baktériumtörzs jelenleg nem tenyésztethető ki laboratóriumi körülmények között, ami az emberiség számára problémát jelenthet, hiszen így a baktériumfajok megismerése korlátok közé szorul (Kadner, 2022).

Az emberiség történelme során - a többnyire ártalmatlan, ám esetenként megbetegedést okozó patogén mikrobák - évezredek keresztül, még az orvostudomány és az antibiotikumok megjelenése előtt jelentősen befolyásolták, nehezítették a mindennapi életet fertőző képességükkel. A fertőző betegségekért felelős mikrobák, mint a tuberkulózis (TBC), lepra és kolera hatalmas problémát jelentettek globális szinten is. Az első pálcika alakú baktériumokat egy holland zoológus, Anton van Leeuwenhoek pillantotta meg saját készítésű mikroszkópjával, 1674-ben. A holland királyhoz intézett levelében megírja felfedezését. A levélben megemlíti, hogy a természetes vízből vett mintából kémcsőbe tette az akkor még ismeretlen baktériumokat. A pálcika szerű képződményeket növényi részmaradványhoz hasonlítja, azonban megemlíti, hogy viselkedésük állatokéhoz hasonló (Leeuwenhoek, 1753).

A baktériumokat a mindennapi élet számos szegmensében alkalmazzuk: az élelmiszeriparban ma elsősorban tejtermékek beoltására, a gyógyszeriparban antibiotikumok előállítása céljából alkalmazunk mikrobákat. A környezetgazdálkodáson belül a szennyvíztisztításban vesszük hasznukat, a bányászatban pedig meddőhányók veszélyes termékeinek semlegesítésére (Hofstra et al. 1994, Daims et al. 2016, Cohen, 2006).

3.2. A baktériumok jellemzői

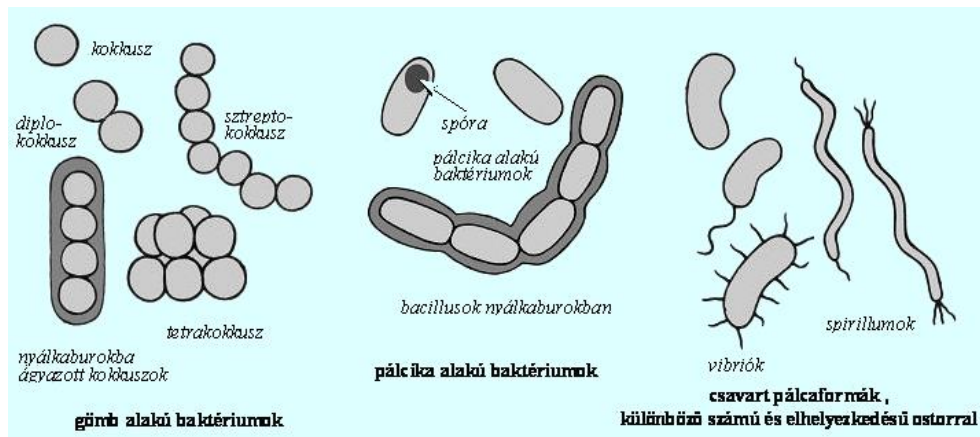
Szakemberek két teóriával álltak elő a baktériumok morfológiáját illetően. Az első teória szerint ezen mikroorganizmusok alakja - mely igen változatos, törzsenként eltérő lehet - meghatározza életmódjukat, táplálkozásukat, élőhelyüket. Ezek a jellegzetes bélyegek nem változnak, a törzsek vagy fajok egyedi azonosítójeleként szolgálnak. Egy másik teória szerint ezek az élőlények képesek testméretüket és formájukat változtatni, úgy hogy alkalmazkodni tudjanak a külső, környezeti behatásokhoz. A baktériumokat fogyasztó egyéb szervezetek ugyanis csak azokat az egyedeket tudják elfogyasztani, melyeknek alakja és mérete pont megfelelő számukra, az alakváltás tehát egyfajta védekezési lehetőség lehet a predációval szemben. Az 1. ábrán azt a bakteriológiai módszert láthatjuk, mely lehetővé teszi számukra, hogy megváltoztassák alakjukat, így nem esnek prédává.



1. ábra: A baktériumok alakváltozása (Forrás: Young, 2007)

Mindkét feltételezés konklúziója lényegében ugyanaz. A morfológiai alkalmazkodás és változás valamilyen fontos biológiai funkció, mely elengedhetetlen a bakteriális élet létezéséhez (Young, 2007).

A mikrobiológia tudomány alak szerint három fő típust különböztet meg: gömb (coccus), pálcika (bacillus), spirál (spirochaeta) (2. ábra).



2. ábra: Baktériumalakok (Forrás: Vogel-Angermann, 1992 & Hortobágyi, 1979)

Ezek az élőlények alakjuk mellett táplálkozásuk alapján is elkülöníthetők. Egyrészt a használt energiaforrás szerint és másrészt a plasztikus anyagok forrása alapján. Energiaforrás szerint lehetnek fototrófok (fényfelhasználók), kemotrófok (redukált vegyületeket használók) vagy litotrófok (szubsztrátot használók). A plasztikus anyagok szerint pedig autotrófok (szervetlen anyagokból építenek szerves vegyületeket) vagy heterotrófok (szerves anyagokat használnak fel életben maradásukhoz) (György, 2021).

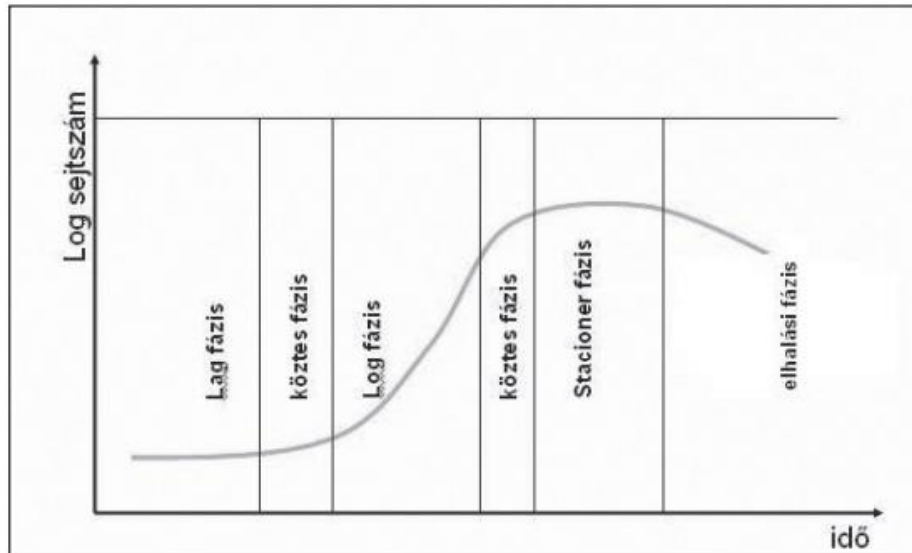
Növekedésnek nevezzük egy baktériumtelep egyedeinek, azaz az azonos mikroorganizmusok egyes elemeinek alkotóelemeinek megváltozását és térfogatgyarapodását. Ekkor a baktériumok környezetükből veszik fel a táplálékot, mely anyagokat a baktérium szervezet asszimilál. Mikor térfogatuk és környezetük aránya megváltozik, sejtosztódással kezdenek szaporodni. Ez a folyamat az egyedek számának szaporodását, növekedését jelenti. A baktériumok szaporodása vagy direkt sejtosztódással, vagy haránthasadással, néha bimbózással (*Rhodomicrobium* fajok, *Ancalomicrobium* fajok) történik. Egyes baktériumok esetén a fonalak feldarabolódásával (cianobaktériumoknál). A sejtosztódásnak 6 szakasza van: 1.) a sejt növekedése, 2.) RNS mennyiségének növekedése, 3.) fokozott fehérjeszintézis, 4.) a citoplazma és a maganyag kettéosztódása, 5.) befűződés, és végül 6.) a két leánysejt kialakulása. Baktériumtörzsenként a generációs idő elég eltérő lehet. Néhány fajnál ez néhány perc (*Escherichia coli*), még másoknál több nap (*Mycobacterium leprae*).

Baktériumok táptalajra való oltásakor, meghatározott adaptációs idő után osztódni kezdenek. A tenyésztés ideje általában 18-24 óra. Egy baktérium vagy baktériumtörzs az egymást gyorsan követő osztódások eredményeképpen szemmel látható baktériumtelepet kezd el alkotni. A tenyészhető telepek szilárd táptalajokon alakulnak ki, mely a 3. ábrán látható. A baktériumtelep egészét tenyészetnek nevezzük. Tenyészet kialakulhat folyékony tápoldatban is, de telepek ilyenkor nem képződnek, a sejtek egyedül, vagy aggregálva lebegnek a folyadékban.



3.ábra: Baktériumtelep szilárd táptalajon (Készítette: King Claudia, 2022.07.19)

Folyékony tápoldatban bizonyos időközönként a szaporodási dinamikát élő sejtszámmal határozzuk meg. Szaporodásuk laboratóriumi körülmények között logaritmikus változást mutat: Egy bizonyos mennyiségű táptalajban limitált rendelkezésre álló tápanyag van. Amíg a tápanyag rendelkezésre áll, addig exponenciális növekedés tapasztalható, amint a rendelkezésre álló táplálék elfogy és az anyagcsere termékek elkezdnek felhalmozódni, a baktériumok szaporodása hanyatlásnak indul. A baktériumok szaporodásának szakaszai a 4. ábrán láthatók, melyek a következők: lag (adaptációs szakasz), log (exponenciális szakasz), stacioner (stagnáló szakasz), deklinációs (pusztulási szakasz) (György, 2021).



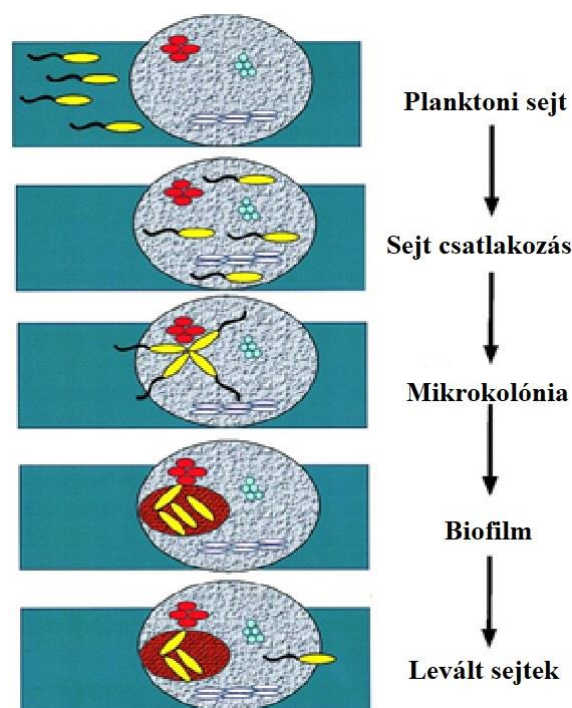
4. ábra: A baktériumok növekedési dinamikájának fázisai (Forrás: György, 2021)

3.3. A biofilm

A baktériumok evolúciós fejlődése igen gyors volt, minél inkább próbáltak ellenállni a környezeti hatásoknak, illetve adaptálódni azokhoz. Individualitás helyett egyszerűbb, majd később egyre bonyolultabban aggregált formát választottak a túléléshez, vagyis sok esetben az együttélést, a szimbiózist választották, ami így a szimbiózisban élő mikroorganizmusok számára jelentős evolúciós előnyt jelentett. Így még tovább nőtt ellenálló- és túlélőképességük (Sachs et al. 2011).

A természetes környezetben a különböző anyagok felszínével érintkező mikrobiális életforma többnyire a biofilm. Genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy az egy fajba tartozó baktériumok több lépésben alakítanak biofilmet (Watnick et al. 1999), sejtközi jelátvitellel kommunikálnak, így képezve nem csak együtt élő, de egymással együttműködő közösséget (Davies et al. 1998) is. A biofilm képződése olyan fejlődési folyamat, amely más bakteriális közösségek működéséhez hasonlít, mint például a Gram-pozitív baktériumok (vastag peptidoglikán-réteget tartalmazó sejtfallal rendelkező baktériumok) spórával történő szaporodása (Dunny, 1997). Természetes környezetben a biofilm szinte kivétel nélkül egy többfajú mikrobiális közösség, amely baktériumokat foglal magába, amelyek céltudatosan vándorolnak, nagy arányban osztják meg genetikai anyagukat, és különálló, sokszor egymástól is függő ökológiai niche-eket töltenek be a biofilmen belül (Watnick et al. 2000).

A biofilm kialakulásának kezdetekor néhány baktériumsejt letapad a hordozó felületre, melyen osztódik és extracelluláris poliszacharid mátrixot (EPS) kezd el termelni. Az EPS mechanikai védelmet nyújt, továbbá segít megtapadni a továbbiakban érkező baktériumoknak (Flemming, 2010). A természetes biofilm kevésbé hasonlít egy magasan fejlett organizmushoz, inkább egy összetett, erősen differenciált, multikulturális közösséghez hasonlít. Kialakulásának kezdeti szakaszában a baktérium először megközelíti az idegen anyag felületét, így mozgása lelassul, a mikroorganizmus ezután átmeneti kapcsolatot alakíthat ki a felülettel és/vagy más mikrobákkal, amelyek korábban az anyaghoz kapcsolódtak. Amikor a baktérium egy mikrokolónia tagjaként stabil társulást alkot, kiválasztja élőhelyét. Mikor több mikroba is egymáshoz csatlakozik, egy 3 dimenziós alakzat jön létre (5. ábra). Időnként a biofilmhez kapcsolódó baktériumok leválnak mátrixról, vagyis a biofilm nem egy mozdulatlan sejthalom (Watnick et al. 2000).



5. ábra: A biofilm kialakulása (Forrás: Watnick et al. 2000)

A biofilm kialakulásának vizsgálata a környezetben több, mint egy évszázada tekint vissza (Atkinson, 1975). Az ilyen típusú biofolyamatok kutatásának érdekeltisége az 1980-as években nőtt meg. Sok kutatót kezdte el érdekelni a biofilmek jelenléte, nem csak a víz- és szennyvízkezelésben, hanem a biotechnológia számos más területén is (Adler, 1987).

3.3.1. A biofilm a szennyvíztisztításban

Ökológiai szempontból azért fontos a biofilmekben található bakteriális közösségek jelenléte, mert szerepet játszanak egyes tápanyagkörforgási folyamatokban. Rengeteg anyagot képesek lebontani, ezért alkalmazzák őket többek között a szennyvíztisztításban is (Stewart, 2008). A természetes vizektől eltérően a szennyvizek nem rendelkeznek öntisztító tulajdonságokkal, mivel ezekben kisebb számban fordulnak elő bakteriális közösségek. Biológiai, kémiai és ökológiai eszközöket kell alkalmazni tisztításukkor. A baktériumok lebontó folyamataik révén folyamatosan idegen anyagoktól próbálják mentesíteni a környezetüket. A szennyvizek természetesen végbemenő biológiai tisztítási folyamatait oxigén koncentráció növelésével lehet elérni, illetve el kell távolítani a baktériumok munkáját gátló toxikus anyagokat és tényezőket (Mara, 2003).

A biofilmekben lejátszódó anyagcsere kapcsolatok egyik tipikus formája a szintrófia, melyben a baktériumok által lebontott szubsztrát más szervezeteknek nyújt tápanyagot. A szintrófián felül lezajlódhatnak nitrifikációs és denitrifikációs folyamatok is (Stewart, 2008).

3.4. A 16S rDNS-t vizsgálat

A biofilm működésének megértése szempontjából fontos ismernünk a hálózatos rendszert alkotó mikroszervezeteket, vagyis ahhoz, hogy megértsük a biofilm felépítését, funkcióját, működését, tudnunk kell hogy milyen baktériumok alkotják. A riboszómákban megy végbe a fehérjék szintézise, amit translációnak nevezünk. Ezen folyamatban az rRNS és a riboszomális fehérjék játszanak szerepet. A folyamat első lépésként az információ (transzkripció során) lefordítódik mRNS- sé, ami elszállítja a szintetizálandó fehérjék alapját a riboszómákhoz. A riboszómán a ribonukleotidok sorrendjét a translációs képlet olvassa le. Minden ilyen hármast adott aminosavnak felel meg. A riboszóma és a tRNS molekulák ezt módszert alkalmazva állítják elő a fehérjéket (Kurland, 1960). Korábban a baktériumtörzsek meghatározáshoz egyszerű táptalajon történő szaporítást alkalmazták, de ez nem tette lehetővé a bonyolultabb közösségek leírását, tekintettel arra, hogy a mikroszervezetek nagy része nem tenyésztendő. Napjainkban a meghatározás legegyszerűbb módja a 16S rDNS módszer. Azért ezt a módszert alkalmazzuk, mert a 16S egy szemikonzerv génszakasz, ami azt jelenti, hogy a DNS spirál 2 lánc a folyamat során szétválik, majd enzimek komplementer szálakat képeznek,

így a kapott molekulák csak félig állnak az eredeti DNS-ből (Berg et al. 2002). A bázispárok minden baktérium esetében az elején és a végén eltérést nem mutat, azonban a szakasz közepe minden esetben egy evolúciós bélyeg a baktériumot tekintve, ez a konzervált génszakasz (Tindall, 2010).

Ez a fajta mikrobiológiai vizsgálat egyre elterjedtebb módszer, a legmodernebb meghatározása a baktérium közösségek taxonómiai összetételének, a funkcionális diverzitásnak, vagy akár aktivitásuk mértékének (Claesson et al. 2010). Ez azért jó célszekvencia, mert akár faji szinten is azonosíthatunk számos prokariótát (Beer et al. 2013). a 16S alapú fajmeghatározás mára sokkal pontosabb és komplexebb eredményt ad, mint a korábbi mikrobiológiai módszerek. Ennél az eljárásnál az adott génszakasznak tudjuk meg a bázis sorrendjét, ami körülbelül 1500 bázispár hosszúságú, azonban egy baktériumfaj teljes meghatározásához ma a teljes genomjának vizsgálata, ismerete szükséges.

A prokarióták genomja igen változatos de mégis elég a 16S bázispárjainak ismerete, hogy teljes képet kapjunk a baktérium fajáról. Mivel ez rendkívül specifikusak ezek a szakaszok, így a baktériumok között családon belüli eltéréseket is könnyen ki lehet mutatni, ezért nagyon jól alkalmazható eljárás identifikációra. Az általánosan használatos értelmezés szerint a 16S szekvencia esetében 95%-os egyezés alapján azonos nemzetségről, 97-98%-os egyezés esetén pedig már valószínűleg azonos fajról beszélhetünk (Jonhson et al. 2019).

3.5. A mikroműanyag

A mikroműanyagok megismerése előtt fontos tudni, hogy mit nevezünk műanyagnak, milyen műanyagtípusok vannak és melyek azok, amiket a leggyakrabban alkalmazunk a gyártástechnológiában. A műanyag a mesterséges polimerek közé tartozik, azaz a természetben nem fordul elő, emberi tevékenység során létrejött anyag (Czvikovszky, 2000). A műanyagok leginkább fosszilis szerves anyagokból származnak, így szénalapú, hosszú láncú vegyületekből felépülő termékek. A világ műanyagtermelésének leggyakrabban előforduló műanyagfélésegei a (Cantor, 2011):

- PP- Polypropylen (Polipropilén)
- LDPE- Low density polyethylene (Kis sűrűségű polietilén)
- PET- Polyethylen terephthalate (Polietilén-tereftalát)

- PVC- Polyvinyl Chloride (Polivinil-klorid)
- PS- Polystyrene (Polisztrén)
- PLA- Polylactic acid (Politejsav)

Ezeket az anyagokat a műanyag termékeken szereplő ún. egységes műanyag azonosító kód alapján lehetett beazonosítani. A műanyag azonosító kódok a 6. ábrán láthatók.



6. ábra: Műanyag azonosító kódok és jelentésük (Forrás: Az Európai Közösségek Hivatalos Lapja)

A fent említett műanyagféléseket különböző polimerek építik fel, vagyis kémiai és ezen keresztül fizikai tulajdonságaik is különbözőek, ami meghatározhatja perzisztenciájukat is. A fent bemutatott műanyagfélések legfőbb tulajdonságai az alábbiak:

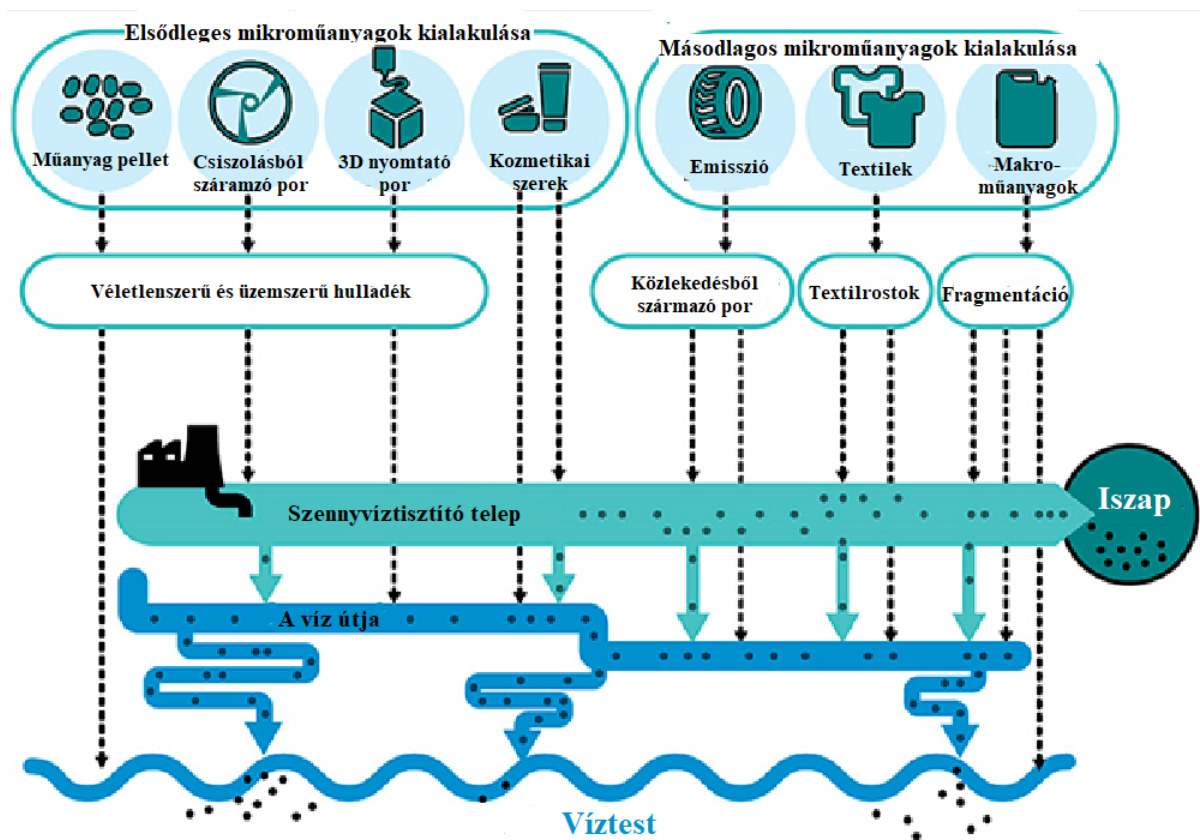
A polietilén egy kristályos, hőre lágyuló anyag. Az egyik leggyakrabban használt műanyag fajta, a poliolefinok csoportjába tartozik. Leginkább csomagolásként használják különböző fajtáit. Leggyakoribb gyártási formája az LDPE és a HDPE. Az LDPE, melyet mi is alkalmaztunk leginkább szatyrok és fóliák alapanyagá. Sűrűsége 0,91-0,94 g/cm³. Az LDPE és a HDPE egyaránt újrahasznosítható.

A polipropilén (PP) világszerte a második legnagyobb mennyiségben előállított műanyag, szintén a poliolefinok közé tartozik, sűrűsége 0,85-0,95 g/cm³. Hőre lágyuló anyag, részben kristályos. Főként a háztartásokban használjuk, például műanyag virágcserpekek, kerti bútoroknak, vödöröknek, de ebből készülnek a fecskendők is. Szintén újrahasznosítható műanyag.

A polisztirol (PS) szintén nagy mennyiségben előállított. Sűrűsége 1,04-1,09 g/cm³, tehát vízben sajnos elsüllyed. Hasonlóan az előzőkhöz, hőre lágyuló műanyag, amorf szerkezetű. Ebből az anyagból állítják elő az egyszer használatos evőeszközöket, tányérokat. CD és DVD tokok készülnek még polisztirolból, illetve az egyszer használatos borotvák.

Habosított formája az EPS (expandált polisztirol), mely hungarocellként ismeretes, amit szinte minden szállítás alkalmával használunk. Habosítatlan változata újrahasznosítható (http2).

A mikroműanyag vagy más néven mikroplasztik a bármilyen, pl. a fent bemutatott műanyagféleségekből származtatható, 5 mm-nél kisebb műanyagrészekké elnevezése. Ezek az anyagok polimerek és azok adalékanyagaiból tevődik össze. A mikroműanyagokat jellemzően két csoportba sorolhatjuk, az elsődleges és másodlagos mikroműanyagok csoportjába. Az elsődleges mikroműanyagok a már eleve kisméretűre tervezett és gyártott műanyagok, amelyek több termékben pl. kozmetikumokban fellelhetők. A másodlagos mikroműanyagok pedig a már említett nagyobb méretű műanyag hulladékok szétesésekor, mállásakor, bomlásakor keletkeznek (Bordós et al., 2016). Leginkább fizikai vagy kémiai hatások által aprózódhatnak, de előfordul biológiai aprózódás is. Az elsődleges és másodlagos mikroműanyagok veszélye a környezetre a 7. ábrán látható.



7. ábra: Az elsődleges és másodlagos műanyagok eredete, veszélyük a környezetbe juttatva (Forrás: http1.)

Az első mikroműanyag részecskékkel kapcsolatos kutatásokat az 1970-es években tették. Ma már tudjuk, hogy előfordulásuk egyre nagyobb mértékű a természetes környezetben,

mikroműanyagokat számos élő szervezetben kimutatták már, a meleg- és hidegvérűek szervezetében egyaránt közvetett vagy közvetlen módon. A műanyagok gyártása vegyi anyagok felhasználásával történik, így felszívódásuk az állatok szervezetében toxicitást okozhat. A tengerekben élő állatok a mikroműanyagokat életfolyamataik során lenyelik. Ezeket az állatokat ételként elfogyasztva az emberek is kitéttek a mikroplasztik szennyezésnek (Smith et al. 2018). A műanyag, vízi állatokra gyakorolt hatása mellett nem elhanyagolható kérdéskör a szárazföldi állatpopulációk kitétsége sem. Még a vízben élő szervezetekben a mikroplasztik és a műanyag toxikus anyagai könnyen akkumulálódnak, addig a talajlakó állatokban kevésbé. Egy tanulmány szerint a trágyagilisztában (*Eisena fetida*) nem mutatható ki műanyag felhalmozódás (Wang et al. 2019). Egy másik kutatás egerek tápcsatornájában vizsgálta a metabolikus toxicitásra gyakorolt lehetséges hatásait. Az egerek, mint emlősök jól modellezik a műanyagok emberi szervezetre gyakorolt negatív hatásait. Az kapott adatok arra utalnak, hogy a mikro- és nanoműanyagok felhalmozódása az emlősök és az emberi szövetekben valószínűleg negatív, de tisztázatlan hosszú távú következményekkel járhat (Yong et al. 2020). Különböző kísérletek várhatók a mikroműanyagok, szaporító rendszerben okozott problémáiról is, ugyanis vélhetően van ilyen negatív hatásuk. Ezeket a kísérleteket emlős szervezeten, egereken és patkányokon fogják elvégezni (D'Angelo et al. 2021).

Több emberi szövet érintettsége is bizonyított már. Az első kutatást, mely placentában való mikroműanyag jelenlétet mutatott Ragusa és munkatársai végezték el. Az eredmények szerint a legtöbb várandós nő szervezete műanyagok által érintett (Ragusa et al. 2021). Amato-Lourenco és munkatársai bár nem bizonyították a mikroműanyagok negatív hatásait, kimutattak az általuk vizsgált 20 tüdőből 13-ban valamiféle műanyagot. Ezek főként polipropilén és polietilén darabok voltak. Tehát belégzés útján is kerülhetnek az emberi testbe mikroműanyagok (Amato-Lourenco et al. 2021). Cirrózisos betegek májában, 11 esetből mindben találtak mikroműanyagokat. Azon páciensek májában, akik nem szenvedtek cirrózisban nem találtak műanyagszennyezést. Ez arra enged következtetni, hogy a cirrózisos megbetegedésekben közrejátszik a mikroműanyag bioakkumulációja az emberi szervezetben. Természetesen további vizsgálatok szükségesek (Horvatits et al. 2020).

A természetes vizekben jelentik az egyik legnagyobb problémát, ahol az üledékben és a vízben lebegve egyaránt megtalálhatók. Részben az emberi tevékenység és a használati tárgyaink felaprózódása miatt kerültek ki a környezetbe (Bordós et al. 2016).

4. Anyagok és módszerek

Diplomadolgozatom témájaként nem kizárólag természetes vizekben kialakuló mikroplasztik kolonizáló mikrobaközösségek vizsgálata volt a célom, hanem annak megállapítása, hogy a szennyvíztisztítókból származó tisztított szennyvíz milyen hatással vannak a bakteriális biofilm kialakulására.

4.1. A „Plastic colonizer” módszer

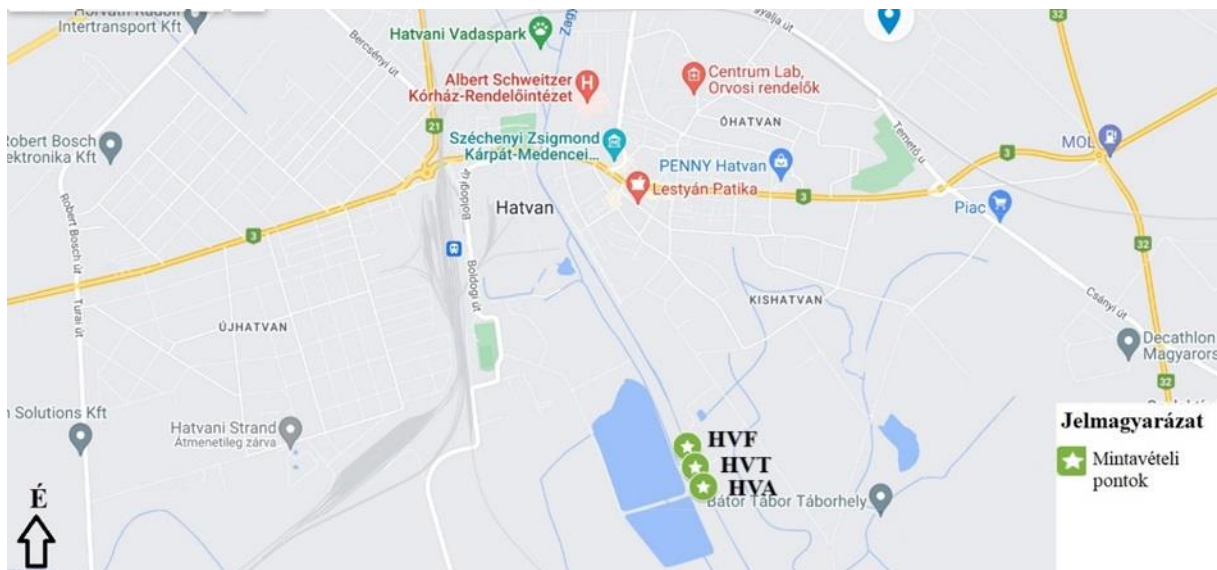
A műanyagfelületeket kolonizáló baktériumok izolálásához dolgozatomban az ún. „plastic colonizer” módszert alkalmaztam. A módszer használatát témavezetőm, Dr. Szabó István és munkatársainak 2021-es publikációja alapján hajtottam végre, azonban a kiindulási (publikált) módszert a felszíni folyóvíz változékonysága okán módosítottam, saját céljaimnak megfelelően. A módszer lényege egy kereskedelemben is kapható rozsdamentes acél teafilter, amelyet kb. 5 g mikroműanyaggal töltöttem fel (<5mm) található (8. ábra). A korábbi kísérletben az alábbi képen látható, az én vizsgálatommal megegyező eszközöket helyezték ki egy hazai tó vízfelszíne alá, ahonnan így műanyag kolonizáló biofilm alkotó baktériumokat gyűjtöttek.



8. ábra: A „plastic colonizer” nyitott és zárt állapotban (Forrás: Szabó et al. 2021)

4.2. A mintavételi helyszínek bemutatása

Az általam választott vizsgálati terület helyszíne Hatvan, mely Heves megyében található. Itt az Eurofins Analytical Services Hungary Kft.-vel (korábban Wessling Hungary Kft.) együttműködve a Zagyva folyó partján található szennyvíztisztító befolyási pontjainak vízminőségi paramétereit vizsgáltuk. A hatvani mintapontok a 9. ábrán láthatók.

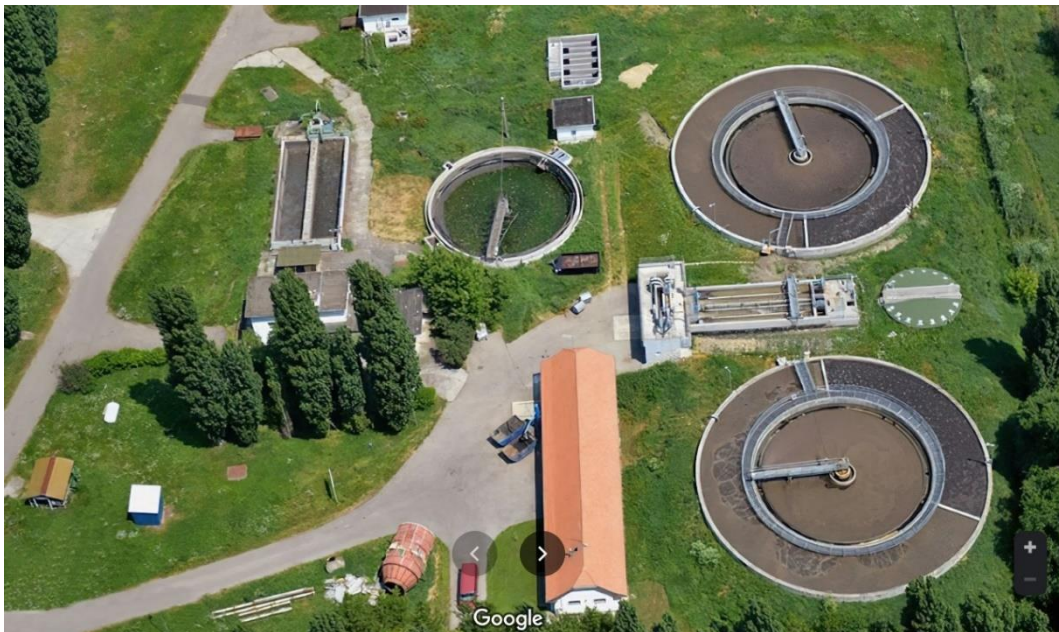


9. ábra: Hatvani mintapontok térképe

A plastic colonizereket, 2022. május 22-én helyeztük ki, a térképen feltüntetett helyszíneken.

4.3. A kihelyezés és begyűjtés menete

6 féle különböző mikroműanyag került (PP, LDPE, PET, PVC, PS, PLA) 6 különálló plastic colonizerbe, melyeket rozsdamentes dróttal kapcsoltuk össze. Ezeket egy átlagos méretű zsalukőre rögzítettük, hogy a folyó sodrása ne szállítsa el az eszközöket. A zsaluköveket szennyvíz kiömlési pontjához, illetve a folyásirány szerint felette és alatta 100-100 méterrel helyeztük ki a, a meder aljára. A hatvani szennyvíztisztító a 10. ábrán látható.



10.ábra: Hatvani szennyvíztisztító telep (Forrás: Google Maps)

A kihelyezési pontok elnevezése ennek megfelelően a következő: tisztított szennyvíz (HVT), tisztított szennyvíz alatt (HVA), tisztított szennyvíz felett (HVF). A későbbi vizsgálatok során ezeket a jeleket alkalmaztuk a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetében, a Környezettoxikológiai laboratóriumban, ahol feldolgoztam ezeket a mintákat, és ugyanígy az analitikai laboratórium mintáinak esetében.

A mintavételi eszközöket egy hónapig hagytuk kint a helyszínen, majd 2022. június 22-én begyűjtöttük őket. A helyszínre elkezdtük a zsalukövekről egyesével leakasztani az összefűzött mintavevőket. A begyűjtést ábrázolja a 11. ábra.



11. ábra: A „plastic colonizer”-ek begyűjtése (Forrás: King Claudia, 2022.06.22.)

Miután kiemeltük a vízből a „plastic colonizer”-eket, nagyméretű előzetesen sterilizált befőttesüvegbe helyeztük őket, mely azzal a vízzel volt megtöltve, melyet kiemeltünk ugyanarról a helyszínről, ahonnan a mintavevőket is. A folyamatot maszkban és nitriles gumikesztyűben végeztük, folyamatos fertőtlenítés mellett. A befőttes üvegbe áthelyezett a zsalukövekről leválasztott mintavevők a 12. ábrán láthatók.



12. ábra: A vízminta és teatojás a befőttesüvegben (Forrás: King Claudia, 2022.06.22)

Mind a három helyszínről begyűjtöttük a colonizereket, majd hűtőtáskában, egy órán belül a laboratóriumba szállítottuk őket, ahol további vizsgálatokat végeztünk rajtuk.

Ugyanezen a napon az analitikai laboratórium is mintákat vett a helyszínen. Szintén a miénkkel megegyező szennyvíz kivezetési pontjában, illetve az e feletti és az alatti pontokban vettek vízmintákat. A későbbiekben a laboratóriumban a mikroműanyagok mennyiségét vizsgálták a begyűjtött minták mindegyikében. Ezeket az adatokat az későbbiekben részletesen bemutatom.

4.4. A minták laboratóriumi feldolgozása

A begyűjtött plastic colonizereket, egy órán belül, steril körülmények között a laboratóriumba szállítottam, ahol később feldolgoztam őket. A laboratóriumban a mikroműanyagokat egyesével eltávolítottam a minavevőkből, amelyeket egyenként nyitottam ki. A felnyitott mintavevőkből és a műanyag részecskéket steril spatulával egy előre sterilizett rozsdamentes acél szűrőbe helyeztem át, majd sterilizett fiziológiai sóoldattal mostam le, hogy eltávolítsam az iszap szemcséket de megőrizzem a műanyaghoz kapcsolódó biofilm épségét. A letisztított műanyagdarabokat egy Erlenmeyer-lombikba tettem át, mely 90 ml steril desztillált víz, 30 g üvegyöngy, 13,5 µl Tween 80-at tartalmazott. Ez követően szobahőmérsékleten inkubáltam a lombikokat. Rázógépen 170 fordulat/perc sebességgel, 1 órán át rázattam a lombikokat, hogy kinyerjem a műanyag felületekre tapadt mikrobiális biofilmet. Minden lombikot egyedi azonosítóval láttam el, a 1. táblázat szerint.

MATE-AKI labor jele	Változók			
	Dátum és jele	Műanyag és jele		
HVF (Hatvani szennyvíztelep befolyó feletti Zagyva szakasz)	2022.06.22	-P	PP	-P
			LDPE	-L
			PVC	-VC
			PS	-S
			PLA	-LA
			PET	-ET
HVT (Hatvani szennyvíztelep befolyó ág)	2022.06.22		PP	-P
			LDPE	-L
			PVC	-VC
			PS	-S
			PLA	-LA
HVA (Hatvani szennyvíztelep befolyó alatti Zagyva szakasz)	2022.06.22		PET	-ET
			PP	-P
			LDPE	-L
			PVC	-VC
			PS	-S
			PLA	-LA
			PET	-ET

1. táblázat: Teatojásokban található műanyagok kódjai a mikroműanyagok anyagainak megfelelően.

Rázatas után 90 ml szuszpenziót kaptam. Ezután hígítási sort készítettem, minden mintából 10^2 - 10^5 hígítási fokig, 3 párhuzamosban. A munkafolyamatot steril eszközökkel végeztem el, a baktériumtelepeket kémcsövekben található, előre sterilizett R2A folyékony táptalajba oltottam. Az R2A táptalaj összetétele a következő:

- proteóz pepton, 0,05%
- kazaminosavak, 0,05%
- élesztő kivonat, 0,05%
- dextróz, 0,05%
- oldható keményítő, 0,05%
- dikálium-foszfát, 0,03%
- magnézium-szulfát, 0,005%
- nátrium-piruvát, 0,03%

4.5. Baktérium tenyésztés

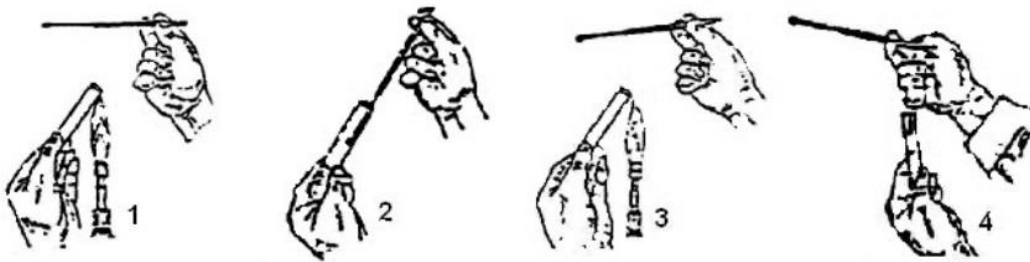
A petricsészéket feliratoztam, majd minden mintából 3 párhuzamost alkotva, 10^2 - 10^5 hígításig 1 ml folyékony táptalajban felszaporított baktérium szuszpenziót pipettáztam a petricsészében található szilárd (agarral kiegészített) R2A táptalajra. 24-48 óráig 28°C -os termosztátban inkubálódtak. A szélesztési munkafolyamat a 13.ábrán látható. Ezen idő alatt a baktériumok felszaporodtak. Erre a lépésre azért volt szükséges, mert a mintában sok mikroszervezet van, aminek az elkülönítésének egyik lehetséges módszere a lemezöntés hígítással.



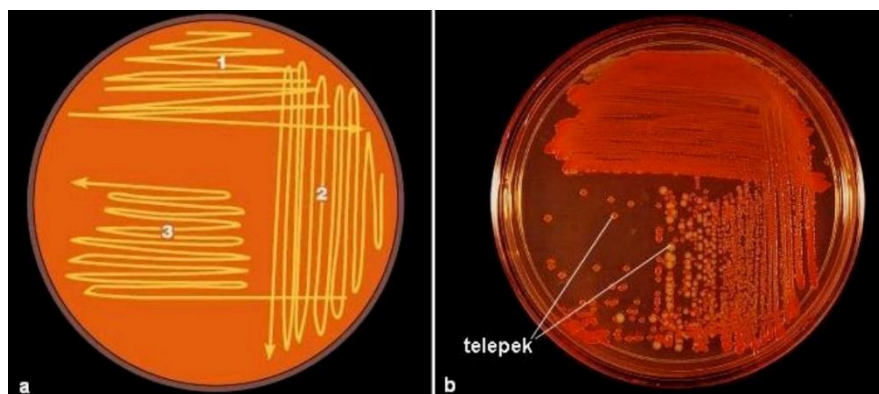
13.ábra: Petricsészék beoltása (Forrás: King Claudia, 2022.06.24)

Szilárd táptalajra azért van szükség egy baktérium tenyésztésnél, mert míg a baktériumok osztódnak, azon egységnyi idő alatt felhasználják az agarban lévő, rendelkezésükre álló tápanyagokat. Tulajdonságai közé tartozik, hogy az agaros táptalaj 98°C -on folyékony, 40 - 42°C -on már dermedt. Petricsészére (lemezre) lehet önteni folyékony állapotban, mely később megszilárdul, ezen felül kémcsőben ferde agart is lehet készíteni az izolált törzsek átoltásához, fenntartásához.

A táptalajon kinőtt baktériumtelepek változó mennyiségben és minőségben voltak jelen a lemezeken. Itt még mindig közösségi baktériumtenyészetéről van szó, vagyis a mintában jelenlévő baktérium törzsek közül több is megtalálható egy lemezen. Szükség volt a kinőtt telepekről elsődleges morfológiai leírásokat feljegyezni, hogy el lehessen különíteni az adott baktériumtelepeket. A folyamat mintavételi helyenként és műanyag típusonként körülbelül nyolc - nyolc baktériumtelep leválogatását jelentette a közösségi petricsészénkről. Ezután a kiválasztott telepekből tisztító szélesztéssel izolált törzstenyészeteket válogattam le. Tovább oltottam a kapott törzstenyészeteket következő R2A agaros petricsészékbe és ezt még egyszer megismételtem. A baktériumtelepek levételének folyamata és szélesztése a 14. és a 15. ábrán látható.



14. ábra: 1. A kémcső nyitása és leégetése, 2. Mintavétel kacsával, 3. A kémcső szájának leégetése és 4. lezárás
(Forrás: http3)



15. ábra: A leoltás irányát nyíl jelzi. 1. leoltás az eredeti baktériumtenyészetből. A további lépések között a kacsot leégetjük. 2. és 3. a kacs egyre kevesebb baktériumot vesz fel a szélesztésből. b: a leoltás megfelelően izolált telepeket eredményez (Forrás: http3)

R2A agarból minden baktériumtörzs részére feliratozott, sterilizált kémcsövekbe ferde agart öntöttem, melyet beoltottam az adott baktériummal. Ennek egy részét 4°C-os hűtőbe

tettem, másik részét pedig elküldtem további molekuláris törzsazonosítási vizsgálatokra a Biomi Kft. részére. A ferde agarra oltott baktériumtelepek a 16.ábrán láthatók.



16.ábra: Ferde agaron kinőtt baktériumtelepek

4.6. A DNS szekvenálással végzett törzsazonosítás

Baktériumok esetében a 16S rRNS gén szekvenálás alapján végeztem el ezeket a vizsgálatokat. Ez egy olyan biokémiai módszer, melyet a DNS-ben található dedikált nukleotidbázisok (adenin, guanin, timin, citozin) sorrendjének meghatározására alkalmaznak. A szekvencia határoz meg minden élő sejtet, mely örökletes információval rendelkezik. A vizsgált riboszomális RNS szakasz a baktériumfajokra jellemző információt tartalmaz.

A szekvenálás munkafázisait a Biomi Kft. végezte el, az általam izolált izolált baktérium törzs mindegyikén, ezt követően a nyers szekvencia adatokból én végeztem a faji szintű meghatározást nyilvános digitális adattbázisok segítségével.

4.7. A baktériumtörzsek hosszútávú tárolása -80°C-on

A tisztító szélesztések után összesen 65 db tiszta baktériumtörzset sikerült leválogatni a kifolyási pontból HVT, a kifolyási pont alatt (HVA) és a kifolyási pont felett (HVF) nyert mintákból a különböző műanyagféleségek felületéről.

A baktériumok növekedésüknél és szaporodásuknál fogva felemésztik a rendelkezésükre álló tápanyagot, ami a szilárd táptalajban található. Minél többet oltok át róluk és minél többet vannak szobahőmérsékleten, annál nagyobb a befertőződés kockázata. Ha használni szeretném az adott törzstenyészetet, tartósan kell tárolni azokat. Én ehhez a krio-fagyasztás módszerét választottam. A folyamat első lépéséhez a telepeket steril szélesztőkacs segítségével leválasztottam a táptalajról, majd R2A tápoldatba (5 ml) helyeztem, ezt összeráztam, hogy egy homogén szuszpenziót kapjak. Az Erlenmeyer-lombikokban található R2A tápoldatok (50 ml) a 16. ábrán láthatók.



17.ábra: Folyékony R2A táptalaj, lombikokban (Forrás: King Claudia, 2022.07.21)

Ezután az összevortexelt elegyből 5 ml-t pipettával kivettem és egy 15 ml-es Falcon-csőbe helyeztem. A csöveket a horizontális rázógépre erősítve, vízszintesen felhelyeztem, majd 48 óráig ráztam.

48 óra elteltével előkészítettem a kriocsöveket, feliratoztam őket, majd mindegyikbe egyesével belepipettáztam 700 μ l, 30%-os glicerolt, majd mindegyik mintából az azonos kódú

kriocsőbe pipettáztam szintén 700 μ l-t. Nagyon óvatos kézzel történő összerázás után egy órát hagytam állni szobahőmérsékleten, majd az izolátum minták -80°C -os mélyhűtőbe kerültek.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. A baktériumtörzsek izolálásának eredményei

Mint azt fent említettem a mikrobatörzsek feltárása során 65 baktériumfajt sikerült identifikálni. Az szekvenciákat a MEGA11 program segítségével alakítottam át azonosítható (fasta) formátumba, és a szekvenciák nem jól átíródott elejét és végét levágtam. Így körülbelül 600-700 tiszta bázispárt kaptam, ami az identifikációra elegendő volt. Az így kialakított 16S szekvenciákat a www.ezbiocloud.net adatbázis segítségével azonosítottam be faj szinten. A végeredményül kapott 65 baktériumtörzs mintakódjai a 2. táblázatban láthatók.

Minta száma	A minta megnevezése	Mintavétel helyszíne	Minta száma	A minta megnevezése	Mintavétel helyszíne	Minta száma	A minta megnevezése	Mintavétel helyszíne
1	HVAPS1	Tisztított szennyvíz-kivezetés alatt	23	HVTPET1	Tisztított szennyvíz-kivezetés pontjában	46	HVFPET1	Tisztított szennyvíz-kivezetés felett
2	HVAPS3		24	HVTPET2		47	HVFPET2	
3	HVAPS6		25	HVTPET5		48	HVFPET3	
4	HVAPS8		26	HVTPET6		49	HVFPL2	
5	HVAPP1		27	HVTPS1		50	HVFPL3	
6	HVAPP3		28	HVTPS2		51	HVFPL4	
7	HVAPP5		29	HVTPS3		52	HVFPL5	
8	HVAPP7		30	HVTPS4		53	HVFPP1	
9	HVAPVC1		31	HVTPVC1		54	HVFPP2	
10	HVAPVC3		32	HVTPVC2		55	HVFPP4	
11	HVAPVC4		33	HVTPVC3		56	HVFPP8	
12	HVAPVC8		34	HVTPP4		57	HVFPVC5	
13	HVAPL1		35	HVTPP6		58	HVFPVC6	
14	HVAPL2		36	HVTPP7		59	HFVPVC8	
15	HVAPL3		37	HVTPP11		60	HVFPVC9	
16	HVAPET1		38	HVTPL4		61	HVFPS2	
17	HVAPET2		39	HVTPL5		62	HVFPS3	
18	HVAPET3		40	HVTPL8		63	HVFPS4	
19	HVAPLA2		41	HVTPL9		64	HVFPLA1	
20	HVAPLA5		42	HVTPLA1		65	HVFPLA3	

21	HVAPLA6		43	HVTPLA3	
22	HVAPLA7		44	HVTPLA4	
45	HVTPLA6				

2. táblázat: Az izolált baktériumtörzsek mintakódjai

16S szekvencia esetében 95%-os egyezés esetében azonos nemzetségről, 98,6%-os egyezés esetében már azonos fajról beszélhetünk (Johnson, 2019). Az izolálás során az alábbi tényezőket néztem:

- 1.) az adatbázis szerint százalékosan mekkora a hasonlóság az általam azonosított baktériumfajok és az Ezbiocloud adatbázisában található baktériumfajok között a 16S riboszómális RNS szekvencia alapján,
- 2.) az adatbázis szerint melyik az általam azonosított baktériumhoz legközelebb álló taxon, illetve mikor és milyen környezetben izolálták,
- 3.) ezen felül irodalmi adatbázisokban kerestem utána, hogy műanyagfelületen korábban izolálták-e, illetve, hogy
- 4.) bizonyítottan fertőzést vagy megbetegedést okoz-e növényi vagy állati, akár emberi szervezetben, vagy
- 5.) valamilyen szerves anyag lebontó tulajdonsággal rendelkeznek-e?

Az eredményül kapott, identifikált és izolált baktériumfajok között vegyesen fordultak elő az imént elsorolt tulajdonsággal rendelkező mikroorganizmusok. 5 esetben a szekvenálás sajnos sikertelen volt. 12 esetben az adatbázissal való összeegyeztetés alapján olyan baktériumokat kaptam, melyek csak kóddal voltak ellátva, faji szintű azonosítás még nem született róluk.

A 65 minta szekvenciájának tulajdonságai a 3., 4., illetve 5. táblázatban láthatók. 65 baktériumból 49 esetben 98,6 %-os hasonlóság feletti a 16S rRNS gén azonossága ismert taxonnal, vagyis nagy valószínűséggel ugyanazon vagy ahhoz nagyon közeli fajt tenyésztettem ki. Azok a baktériumok, amik 98,6 %-nál kisebb egyezést mutatnak, zölddel vannak jelölve a táblázatban. Ezek lehetséges, hogy eddig le nem írt baktériumfajok képviselői, (főként a 98% egyezés alatti törzsek). 10 mintakód esetében találtunk patogén vagy fertőzést okozó baktériumokat, melyek lehetnek egyaránt emberi és állati vagy növényi egészségre veszélyesek, ezeket pirossal jelöltem. 2 esetben potenciálisan veszélyt jelentő fajokról van szó, ezek az adott oszlopban sárgával vannak jelölve, a pirostól eltérően, ugyanis ezek potenciálisan

jelentenek veszélyt. 14 esetben olyan baktériumokat identifikáltam, melyek bizonyítottan rendelkeznek valamilyen lebontó hatással, ezeket pirossal jelöltem a táblázatban, az erre vonatkozó oszlopban. 6 esetben pedig valószínűsíthető, hogy lebontó tulajdonságokkal rendelkeznek, ezeket sárgával jelöltem a lebontó tulajdonsággal rendelkező oszlopban. Taxonómiailag legközelebb álló rokonuk ad erre következtetést.

<i>Szennyvíztisztító kiömlési pontja alatt vett minták</i>							
<i>Minta kódja</i>	<i>Hasonlóság (%)</i>	<i>Legközelebbi taxon</i>	<i>Izolálás helye és ideje</i>	<i>Fertőzést okoz vagy patogén</i>	<i>Lebontó tulajdonsággal rendelkezik</i>		<i>Forrás</i>
<i>HVAP ET1</i>	99,47	<i>Bosea eneae</i>	2003	<i>Kórházi vízhálózat</i>	Igen	Nem	<i>La Scola et al. 2003</i>
<i>HVAP ET2</i>	<i>Sikertelen szekvenálás</i>						
<i>HVAP ET3</i>	100	<i>Roseomonas lacus</i>	2006	<i>Tavi üledék</i>	Nem	Nem	<i>Jiang et al. 2006</i>
<i>HVAP L1</i>	98,15	<i>Dechloromonas agitata</i>	2001	<i>Laboratóriumi körülmények közt</i>	Nem	Igen	<i>Achenbach et al. 2001</i>
<i>HVAP L2</i>	100	<i>Mycolicibacterium brumae</i>	1993	<i>Emberi köpet</i>	Nem	Nem	<i>Luquin et al. 1993</i>
<i>HVAP L3</i>	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1909	<i>Emberi bőr</i>	Igen	Nem	<i>F.P. Gorham, 1909</i>
<i>HVAP L5</i>	98,85	<i>Simplicispira lacusdiani</i>	2019	<i>Édesvíz</i>	Nem	Nem	<i>Shi et al. 2019</i>
<i>HVAP S3</i>	98,11	<i>Ottowia beijingensis</i>	2014	<i>Szennyvíziszap</i>	Nem	Nem	<i>Junwei et al. 2014</i>
<i>HVAP S8</i>	99,83	<i>Methyloversatilis discipulorum</i>	2015	<i>Tó</i>	Nem	Igen	<i>Smalley et al. 2015</i>
<i>HVAP VC1</i>	100	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	1978	<i>Szennyvíz</i>	Nem	Igen	<i>Auling et al. 1978</i>
<i>HVAP VC3</i>	98,3	<i>Simplicispira lacusdiani</i>	2019	<i>Édesvíz</i>	Nem	Nem	<i>Shi et al. 2019</i>
<i>HVAP VC4</i>	99,19	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	1982	<i>Talaj</i>	Nem	Nem	<i>Lalucat et al. 1982</i>

HVAP VC8	100	<i>Hydrogenoph aga pseudoflava</i>	1978	Szennyvíz	Nem	Igen	Auling et al. 1978
HVAP LA2	99,49	<i>Bosea eneae</i>	2003	Kórházi vízhálózat	Igen	Nem	La Scola et al. 2003
HVAP LA6	99,67	<i>Pseudomonas campi</i>	2021	Gyep talajából	Nem	Igen	Timsy et al. 2021
HVAP LA7	98,12	<i>Simplicispira lacusdiani</i>	2019	Édesvíz	Nem	Nem	Shi et al. 2019
HVAP P1	100	<i>Bosea lupini</i>	2012	Hüvelyes növénykultúra	Nem	Nem	De Meyer et al. 2012
HVAP P7	98,19	<i>Ottowia beijingensis</i>	2014	Szennyvíziszap	Nem	Nem	Junwei et al. 2014
HVAP P3	98,23	<i>Diapahoroba cter nitroreducens</i>	2002	Eleveniszap	Nem	Igen	Shams et al. 2002
HVAP P5	100	<i>Peribacillus butanolivoran s</i>	2008	Talaj	Nem	Igen	Kuisine et al. 2008
HVAP S1	Sikertelen szekvenálás						
HVAP S6	98,31	<i>Dechloromon as agitata</i>	2001	Laboratóriumi körülmények közt	Nem	Igen	Achenb ach et al. 2001

Szennyvíztisztító kiömlési pontjában vett minták							
Minta kódja	Hasonlóság (%)	Legközelebbi taxon	Izolálás helye és ideje		Fertőzést okoz vagy patogén	Lebontó tulajdonsággal rendelkezik	Forrás
HVTP ET5	<i>Sikertelen szekvenálás</i>						
HVTP ET6	99,81	<i>Micrococcus luteus</i>	1978	<i>Középkori falfestmény, levegő</i>	Nem	Nem	<i>Wieser et al. 2002</i>
HVTP L9	99,8	<i>Micrococcus luteus</i>			Nem	Nem	
HVTP LA1	99,8	<i>Micrococcus luteus</i>			Nem	Nem	
HVTP LA3	<i>Sikertelen szekvenálás</i>						
HVTP P4	98,29	<i>Simplicispira lacusdiani</i>	2019	<i>Édesvíz</i>	Nem	Nem	<i>Shi et al. 2019</i>
HVTP P6	100	<i>Gordonia phosphorivorans</i>	2013	<i>Szennyvíz bioreaktor</i>	Nem	<i>Lehetséges, rokonát tekintve</i>	<i>Kämpfer et al. 2013</i>
HVTP P11	98,1	<i>Massilia aurea</i>	2006	<i>Ivóvíz</i>	<i>Lehetséges, rokonát tekintve</i>	Nem	<i>Gallego et al. 2006</i>
HVTP S1	100	<i>Brucella pituitosa</i>	2020	<i>Ipari környezet</i>	Igen	Nem	<i>Mostafa et al. 2022</i>
HVTP S2	97,96	<i>Ottowia beijingensis</i>	2014	<i>Szennyvíziszap</i>	Nem	Nem	<i>Junwei et al. 2014</i>
HVTP S3	95,43	<i>Tessaracoccus flavescens</i>	2008	<i>Tengeri üledék</i>	Nem	Nem	<i>Lee&Lee, 2008</i>
HVTP S4	99,58	<i>Micrococcus luteus</i>	1978	<i>Középkori falfestmény, levegő</i>	Igen	Nem	<i>Wieser et al. 2002</i>

HVTP VC1	98,67	<i>Simplicispira lacusdiani</i>	2019	Édesvíz	Nem	Nem	Shi et al. 2019
HVTP VC2	100	<i>Gordonia phosphorivorans</i>	2013	Szennyvíz bioreaktor	Nem	Lehetséges, rokonát tekintve	Kämpfer et al. 2013
HVTP ET1	99,66	<i>Dechloromonas agitata</i>	2001	Laboratóriumi körülmények közt	Nem	Igen	Achenbach et al. 2001
HVTP ET2	99,69	<i>Gordonia phosphorivorans</i>	2013	Szennyvíz bioreaktor	Nem	Lehetséges, rokonát tekintve	Kämpfer et al. 2013
HVTP L4	99,54	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	1970	Hidrogénnel dúsított víz	Nem	Nem	Willems et al. 1990
HVTP L5	99,34	<i>Paracoccus xiamenensis</i>	2020	Tenger	Nem	Nem	Lyu et al. 2020
HVTP L8	99,54	<i>Paracoccus yeei</i>	2004	Emberi vér	Igen	Nem	Funke et al. 2004
HVTP LA4	98,75	<i>Janibacter alkaliphilus</i>	2012	Korall	Nem	Nem	Li et al. 2012
HVTP LA6	98,12	<i>Ottowia beijingensis</i>	2014	Szennyvíziszap	Nem	Nem	Huys et al. 2010
HVTP P7	98,13	<i>Aquabacterium commune</i>	1999	Ivóvíz	Nem	Nem	Kalmbach et al. 1999
HVTP VC3	98,15	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	2003	Szennyvíz	Nem	Igen	Mechichi et al. 2003

Szennyvíztisztító kiömlési pontja felett vett minták

Minta kódja	Hasonlóság (%)	Legközelebbi taxon	Izolálás helye és ideje		Fertőzést okoz vagy patogén	Lebontó tulajdonsággal rendelkezik	Forrás
HVF PS3	98,52	<i>Flavobacterium gyeonganense</i>	2014	Édesvíz	Nem	Nem	Kim et al. 2014
HVF PVC6	100	<i>Paracoccus yeei</i>	2004	Emberi vér	Igen	Nem	Funke et al. 2004
HVF PVC8	97,7	<i>Deefgea chitinilytica</i>	2009	Vizes élőhely	Nem	Nem	Chen et al. 2010
HVF PVC9	99,22	<i>Acidovorax soli</i>	2010	Szemétkerakó talaja	Nem	Lehetséges, rokonát tekintve	Choi et al. 2010
HVF PLA1	96,76	<i>Emticicia fontis</i>	2016	Édesizű tó	Nem	Nem	Nam et al. 2016
HVF PLA3	99,6	<i>Hydrogenophaga aromaticivora</i>	2021	Paraxilolt lebontó dúsító kultúra	Nem	Igen	Banerjee et al. 2021
HVF PPI	99,16	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	2005	Olajjal szennyezett talaj	Nem	Igen	Schippers et al. 2005
HVF PP2	Sikertelen szekvenálás						

HVF PP3	98,87	<i>Pseudomonas peli</i>	2006	Nitrifikáló oltóanyag	Valószínűleg (klórtűrés)	Nem	Vanpar ys et al. 2006
HVF PP8	Sikertelen szekvenálás						
HVF PET1	98,68	<i>Streptomyces ardus</i>	2003	Talaj	Nem	Nem	Kazuno ri et al. 2003
HVF PET2	100	<i>Hafnia paralvei</i>	2010	Emberi test	Igen	Nem	Huys et al. 2010
HVF PET3	Sikertelen szekvenálás						
HVF PL2	99,46	<i>Hydrogenoph aga pseudoflava</i>	1978	Szennyvíz	Nem	Igen	Auling et al. 1978
HVF PL3	100	<i>Bacillus zhangzhouens is</i>	2016	Garnélafa rm vize	Nem	Igen	Liu et al. 2016
HVF PL4	99,83	<i>Rhizobium aggregatum</i>	2011	Hexaklór- ciklohexá n lerakóhel y	Nem	Nem	Kaur et al. 2011
HVF PL5	99,27	<i>Acidovorax soli</i>	2010	Szemétlér akó talaja	Nem	Lehetséges, rokonát tekintve	Choi et al. 2010
HVF PS2	99,46	<i>Hydrogenoph aga taeniospiralis</i>	1982	Talaj	Nem	Nem	Lalucat et al. 1982
HVF PS4	99,38	<i>Hydrogenoph aga taeniospiralis</i>			Nem	Nem	

<i>HVF PVC5</i>	<i>100</i>	<i>Acidovorax delafieldii</i>	<i>1990</i>	<i>Városi vízhálózat ,talaj,kórh áz</i>	<i>Nem</i>	<i>Lehetséges, rokonát tekintve</i>	<i>Willem s et al. 1990</i>
----------------------------	------------	-----------------------------------	-------------	---	------------	---	-------------------------------------

3.,4.,5.táblázat: A szekvenálás eredményei és a vizsgált paraméterek táblázatos kiértékelése

A fent izolált fajok közül a bizonyítottan patogén mikrobák: *Bosea eneeae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Brucella pituitosa*, *Micrococcus luteus*, *Paracoccus yeei*, *Hafnia paralvei*.

A *Bosea eneeae* esetében 2013-ban elvégeztek tüdőgyulladásos betegek körében egy antitest vizsgálatot. A 95 beteg mindegyike lélegeztetőgépes kezelésre volt szorulva. Szervezetükbe kimutatták a *Bosea eneeae* ellen termelt antitesteket, így ez a baktériumfaj bizonyítottan megbetegedéseket okozhat (Bousbia et al. 2013).

A *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcusok* leggyakrabban előforduló tagja az emberi hámfelületeken. A legfontosabb tulajdonsága, hogy kiváló biofilmek, agglomerációk kialakításában, amelyek gátolják a fő gazdaszervezet védekező mechanizmusait. Főképp kórházi eszközökön képes megtelepedni, az emberi bőrön kiütéses, gennyes elváltozásokat okozhat (Otto, 2013).

A *Brucella pituitosa* jellemzően állati kórokozó, de embert is megfertőzhet, évente körülbelül 500 000 új humán megfertőződést írnak le. Főként a terhességek megszakításáért felelős ez a baktérium de valószínűsíthetően más betegségek kialakulásában is szerepet játszik (Mostafa et al. 2022)

A *Micrococcus luteus* bizonyítottan patogén baktérium. 2014-ben és 2016-ban Lengyelországban *Micrococcus luteus* által okozott megbetegedést diagnosztizáltak szivárványos pisztrángokban és sebes pisztrángokban. Ezen események mindegyikében kóros mortalitást (körülbelül 50%) és a külső szövetek és belső szervek kóros elváltozásai mutatták ki (Pekala et al. 2018)

A *Paracoccus yeei*-t tiszta tenyészetben izolálták egy aerob vértenyészetből és egy 67 éves férfi váladékából. A beteg szívelégtelenség miatti tüdőgyulladás gyanúja miatt került a kórház sürgősségi osztályára, ahol különböző kezeléseket után váladékmintát vettek tőle, melyből kitenyésztés útján *Paracoccus yeei*-t izoláltak, mely a betegség kialakulásáért volt felelős (Funke et al. 2004).

A *Hafnia paralvei* világszerte elterjedt mikroba. Különbőféle emlősöket, madarakat, hüllőket, kételtűeket, halakat képes megfertőzni. A *Hafnia* felelős a jércék, patkányok és lovak fertőző betegségeiért, és humán klinikai mintákból nyerték ki, még akkor is, ha nem direkt humán kórokozók (Huys et al. 2009).

A fent izolált fajok közül a bizonyítottan lebontó tulajdonsággal rendelkező mikrobák: *Dechloromonas agitata*, *Methyloversatilis discipulorum*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Pseudomonas campi*, *Diapahorobacter nitroreducens*, *Peribacillus butanolivorans*, *Alicycliphilus denitrificans*, *Hydrogenophaga aromaticivorans*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Bacillus zhangzhouensis*.

A *Dechloromonas agitata* bizonyítottan a per-klorát lebontó törzsek képviselője (Zhang et al. 2021). A *Methyloversatilis discipulorum* faj képes lebontani az aromás vegyületeket (Luquin et al. 1993). A *Hydrogenophaga pseudoflava* polihidroxi-alkánsav lebontó tulajdonságait Yoon és Choi jegyezték le (Yoon & Choi, 1999). A *Pseudomonas campi*-t általában talajokból izolálják, bizonyítottan nitrátredukáló baktérium (Timsy et al. 2021). A *Diapahorobacter nitroreducens* nevű baktériumfaj szintén nitrátredukáló szervezet, mely esetében műanyagdegradációs kísérleteket végeznek (Khan, 2015). A *Peribacillus butanolivorans* neve is n- butanol lebontási képességére utal (Kuisiene, 2008). A *Alicycliphilus denitrificans* egy ciklohexanol lebontó, nitrát redukáló proteobaktérium (Mechichi et al. 2003). A *Hydrogenophaga aromaticivorans* baktériumfaj para-xilol lebontó tulajdonságairól ismeretes (Banerjee et al. 2021). A *Microbacterium hydrocarbonoxydans* a nyersolajat lebontó Gram-pozitív baktériumok baktériumtörzsek közé tartozik (Schippers et al. 2005). A *Bacillus zhangzhouensis* motorolaj lebontó képességét Liu és munkatársai jegyezték le (Liu et al. 2016).

5.2. A mikroműanyag analitika eredményei

Ahogy a fentebb említettem a mikroműanyag analitikát az analitikai laboratóriumban végezték el. Ez a saját mintafeldolgozással egy időben zajlott. Fontosnak tartottam az analitikai eredményeket és a saját eredményeimet összevetni, ugyanis így tisztább képet kaphatunk a szennyvíztelep környezeti hatásairól. Ezekben az analitikai mérésekben számszerinti adatok láthatók a mikroplasztik mennyiségéről, melyeket a mintavételi pontokon vett környezeti mintákban voltak jelen. Részben azokat a műanyagokat vizsgálták, melyeket a „plastic colonizer”-ekben elhelyeztünk. Az eredmények kiértékelése és összevetése azért fontos, hogy relevanciát keressünk a műanyagok és az azon megtelepedő, például fakultatív patogén baktériumok között. Potenciálisan környezeti vagy környezetegészségügyi veszélyt jelenthet ha a mikroműanyag szemcséken megtelepedő patogén mikrobák kikerülnek a tisztított szennyvízzel együtt a természetes vizekbe. Ha a kockázatos baktériumfajokat vagy

baktériumtörzseket a mikroműanyagok magukkal szállítják nagyobb problémát okozhatnak a környezetre vagy az emberi egészségre nézve. Mivel minden baktériumot izolálni nem tudunk, kérdés lehet még az is, hogy ezeken kívül milyen biofilmet vagy nem biofilmet alkotó baktériumtörzsek lehetnek még veszélyesek a természetet és a humán egészséget tekintve.

Hatvan				
	Mintajel	HV-AL	HV-TSZV	HV-F
Azonosított mikroműanyagok (részecske/m ³)	PE	48,9	176,8	0,9
	PP	109,8	199,8	1,9
	Poliészter	21,6	24,8	0
	PA	3,6	3,8	0
	Akril	0,4	7,6	0
	PVC	0,9	3,8	0,9
	PVAC	2,7	1,9	0
	PU	6,9	8,6	0
	PS	13,8	33,4	0,4
	ABS	0	5,7	0
	Cellulóz-acetát	0,4	14,3	0
	Alkid	17,5	46,8	0,4
	Összesen		227	527,7

6. táblázat: A mikroműanyag analitika táblázatos eredményei

Az eredményeket tekintve láthatjuk, hogy a PE és PP mintajelű műanyagok voltak legnagyobb mennyiségben kimutathatók a vízmintákban. A szennyvíz kifolyásának pontjában kaptuk a legmagasabb értéket, közel 200 részecske/m³-t PP-ből, ami a mérések közt a legmagasabb érték. Látható, hogy a szennyvízkivezetés egyértelműen megnöveli a mikroműanyag koncentrációt a felszíni vízben: A második legmagasabb koncentrációt a HV-A, azaz a szennyvíz kivezetési pontja alatt vett minták mutatják, amik szintén a PP esetében a legkiemelkedőbbek. A HV-F (kiömlési pont feletti) mintakóddal ellátott értékek elenyészők az alatta vett minták adataihoz képest. A HV-T, azaz a tisztított szennyvíz kiömlési pontjában a legmagasabb a vízben található mikroműanyagok köbméterre vetített értéke, ez a PP műanyag esetén a legjelentősebb.

A baktérium izolálás során egy potenciálisan patogén mikrobát mutattam ki PP műanyagban, ezt a baktériumot a HVFPP3 mintakód jelöli, vagyis a törzset a szennyvíz beérkezés feletti mintavételi pontba kirakott plastic colonizer PP műanyagjáról izoláltam. Illetve 3 lebontó tulajdonsággal rendelkező és 1 potenciálisan lebontó tulajdonsággal rendelkező baktériumot izoláltam a PP mikroműanyagok felületéről. Ezek HVAPP3, HVAPP5,

HVFPP1, HVTPP6 mintakóddal ellátott baktériumok. Ez utóbbit a tisztított szennyvízben kihelyezett PP műanyag felületéről.

6. Következtetések és javaslatok

Az eddigi kutatómunkám által elvégzett vizsgálatok során felszíni vízbe helyezett mikroműanyagok felületéről baktériumtörzseket izoláltam. A legtöbb általam identifikált és izolált törzs vízben, talajban vagy emberi szervezetben már korábban leírt baktériumfajok képviselői. Ezek között lehetnek patogén, fertőzést okozó vagy lebontó szervezetek. A vizsgált baktériumok esetében további különféle ellenőrzések és egyéb vizsgálatok szükségesek, hogy a baktériumtörzsek környezetre gyakorolt hatásait 100%-os pontossággal be lehessen azonosítani.

A szekvenálás eredményeként 98,6% alatti egyezést mutató baktériumfajok esetében lehetséges, hogy az általam talált és identifikált baktériumok között új faj képviselőit is találtam, ezek mintajelei: HVAPL1, HVAPS3, HVAPVC3, HVAPLA7, HVAPP7, HVAPP3, HVAPS6, HVTPP4, HVTPP11, HVTPS2, HVTPS3, HVTPP7, HVTPVC3, HVFPS3, HVFPVC8, HVFPLA. Azonosításukhoz teljes 16S rRNS gén, illetve genom-szintű azonosítás is szükséges. Kutatásaim során egyértelművé vált, hogy a mikroműanyagokat kolonizáló baktériumok feltérképezése még további vizsgálatokat igényel, mely sok lehetőséget rejt magában. Több helyszínen és több időpontban kellene mintát venni az átfogóbb képet alkotó eredmények érdekében. Javasolnám, hogy a mindennapokban gondoljuk újra a műanyagfelhasználási szokásainkat, ugyanis dolgozatom eredményei alapján is látható, hogy milyen környezet- és humán egészségügyi problémákat okozhat a mikroműanyagok jelenléte a környezetben.

7. Összefoglalás

Vizsgálataim során egy hazai folyóvíz, a Zagyva hatvani szakaszán plastic colonizereket helyeztem ki a folyóvízbe egy hónapig. A mintavétel célja a kiválasztott műanyagok felületén megtelepedő mikroszervezetek baktériumtenyésztéssel és DNS azonosítással történő meghatározása, különös tekintettel a hatvani szennyvízkifolyó hatásának vizsgálatára. A kihelyezett műanyagok felületéről számos baktériumot határoztam meg és vizsgáltam eredetüket. A legtöbb általam azonosított baktériumfaj vízben, talajban vagy emberi szervezetben korábban kimutatott baktériumfajok képviselői. Egyesek közülük patogén vagy műanyaglebontó képességgel rendelkeznek. Az eddigi kutatómunkám során átfogó képet kaptam arról, hogy a mintavételezéskor bizonyos mikrobák milyen mértékben fordultak elő a és a kihelyezett műanyagok felületén. Könnyebben áttekinthetővé vált, hogy a szennyvíz milyen hatást gyakorol a Zagyvára, illetve milyen volt a mikrobiális állapot az előtt, hogy a szennyvízzel érintkezett volna és az után, hogy a szennyvíz beáramolt a befogadóba. A terepi és laboratóriumi munkák során betekintést nyerhettem, hogy hogyan zajlik egy ilyen mintavételezés és az azt követő laboratóriumi munkálatok, illetve az ezeket megelőző előkészületek.

Az alkalmazott módszerek azt a célt szolgálták, hogy dolgozatom megírásával lehetőség nyíljon egy olyan vizsgálati módszerre, mely a természetes vizekben élő műanyag felületeket kolonizáló baktériumokat kutatja.

8. Irodalomjegyzék

Az Európai Közösségek Hivatalos Lapja L 50/28, Az 1997. január 28-ai Bizottsági 97/129/EC számú határozata a csomagolóanyagok azonosítási rendszerének meghatározásáról.

Achenbach L. A., Michaelidou U., Bruce R. A., Fryman J., Coates J. D. (2001): *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 527–533.

Albertson D., Natsios G.A., Gleckman R. (1978): Septic Shock With *Micrococcus luteus*. *Arch Intern Med*. p. 487–488.

Amato-Lourenço L.F., Carvalho-Oliveira R., Júnior G.R., Santos Galvão L., Ando R.A., Mauad T. (2021): Presence of airborne microplastics in human lung tissue, *Journal of Hazardous Materials*, p. 416,

Berg J.M., Tymoczko J.L. Stryer L., Clarke N.D. (2002): Imperfect DNA replication results in mutations, *DNA Replication, Recombination, and Repair in Biochemistry*, p. 3051

Beye M., Fahsi N., Raoult D., Fournier P. E. (2017): Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* species. *New microbes and new infections*, p. 24–29.

Bordós G., Jens R. (2016): Mikroműanyagok a környezetben és a táplálékláncban, 36 *Élelmiszervizsgálati közlemények*, LXII. évf. 2. szám, p. 1021-1046.

Bousbia R., Papazian L., Jean-Marie P.S., Auffray C. F. J-P., Raoult M.D., La Scola B. (2013): Serologic Prevalence of Amoeba-Associated Microorganisms in Intensive Care Unit Pneumonia Patients, *Plos*, p. 8.

Cantor K.M., Watts P. (2011): *Plastics Materials, Applied Plastics Engineering Handbook* p. 3-6.

Chen W. M., Chung Y. N., Chiu T. F., Cheng C. Y., Arun A. B., & Sheu S. Y. (2010): *Deefgea chitinilytica* sp. nov., isolated from a wetland, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 1450–1453.

Choi J. H., Kim M. S., Roh S. W., Bae J. W. (2010). *Acidovorax soli* sp. nov., isolated from landfill soil, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 2715–2718.

Cohen R.R.H (2006): Use of microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams, *Journal of Cleaner Production*, p. 1146-1157

Czvikovszky T., Nagy P., Gaál J. (2000): *A polimertechnika alapjai. Műegyetemi Kiadó, Budapest.*

Daims H., Taylor M. W., Wagner M. (2006): Wastewater treatment: a model system for microbial ecology, *Trends in Biotechnology*, p. 483-489

D'Angelo S, Meccariello R. (2021): Microplastics, A Threat for Male Fertility. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18, p. 2392.

De Meyer S. E., Willems, A. (2012): Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp. nov., *Bosea lathyri* sp. nov. and *Bosea robiniae* sp. nov., isolated from legumes, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 2505–2510.

Gallego V., Sánchez-Porro C., García M. T., Ventosa A. (2006): *Massilia aurea* sp. nov., isolated from drinking water, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 2449–2453.

Auling G., Reh M. C. Lee M., Schlegel H. G (1978): *Pseudomonas pseudoflava*, a New Species of HydrogenOxidizing Bacteria: Its Differentiation from *Pseudomonas flaua* and Other Yellow-Pigmented, Gram Negative,Hydrogen-Oxidizing Species, *Interntional journal systematic*, p. 82-95.

Gorham F. P. (1909): *The Systematic Relationships of the Coccaceae with a Discussion of the Principles of Bacterial Classification*. *American journal of public hygiene*, p. 199–204.

György É. (2021): *Általános mikrobiológia, a baktériumok morfológiája*. Scientia kiadó, Kolozsvár, p. 30-35.

Funke G., Frodl R., Sommer H. (2004): First Comprehensively Documented Case of *Paracoccus yeei* Infection in a Human, *ASM JournalsJournal of Clinical Microbiology*, p. 42

Hofstra, H., van der Vossen, J.M.B.M., van der Plas, J. (1994): *Microbes in food processing technology*, *Microbiology Reviews*, p. 175–183

Hortobágyi T. (1979): *Növényrendszertan* (Tankönyvkiadó, Budapest)

Horvatits T., Tamminga M., Liu B., Sebode M., Carambia A., Fischer L., Püschel K., Huber S., Fischer E.K. (2020): Microplastics detected in cirrhotic liver tissue, *eBioMedicine*, p. 82

Huber B., Scholz H. C., Kämpfer P., Falsen E., Langer S., Busse H. J. (2010): *Ochrobactrum pituitosum* sp. nov., isolated from an industrial environment, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 321–326.

Huys G., Cnockaert M., Abbott S. L., Janda J. M., Vandamme P. (2010): *Hafnia paralvei* sp. nov., formerly known as *Hafnia alvei* hybridization group 2. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 1725–1728.

Szabó I., Al-Omari J., Szerdahelyi G. S., Farkas M., Al-Omari Y., Szabó P. M., Sebők R., Griffits J., Kriszt B., Szoboszlay S. (2021). In Situ Investigation of Plastic-Associated Bacterial Communities in a Freshwater Lake of Hungary, *Water Air Soil Pollut* 232: 493

Lalucat J., Pares R., Schlegel H.G. (1982): *Pseudomonas taeniospivalis* sp. nov., an R-Body-Containing Hydrogen Bacterium, *International Journal of Systematic Bacteriology*, p. 332-338

Al-Omari J., Szabó I., Szerdahelyi G.S. , Radó J., KaszabE , Griffiths J., Tácsics A., Szoboszlay S., (2020): *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,Volume 71, Issue 1

Jiang C. Y., Dai X., Wan, B. J., Zhou Y. G., Liu S. J. (2006). *Roseomonas lacus* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 25–28.

Johnson J. S., Spakowicz D. J., Hong B.-Y., Petersen L. M., Demkowicz P., Chen L., Leopold S. R., Hanson B. M., Agresta H. O., Gerstein M., Sodergren E., Weinstock G. M. (2019): Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, p. 5029.

Junwei C., Qiliang L., Yang L., Guizhen L., Zongze S. (2014): *Ottowia beijingensis* sp. nov., isolated from coking wastewater activated sludge, and emended description of the genus *Ottowia*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, p. 963–96.

Kadner R. J., Rogers Kara (2022): *Bacteria*. *Encyclopedia Britannica*. Amerikai Egyesült Államok

Kalmbach S., Manz W., Wecke J., & Szewzyk U. (1999): *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *International journal of systematic bacteriology*, p. 769–777.

Kämpfer P., Martin K., & Dott W. (2013): *Gordonia phosphorivorans* sp. nov., isolated from a wastewater bioreactor with phosphorus removal. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 230–235.

Gneiding K., Frodl R., Funke G. (2008): Identities of *Microbacterium* spp. Encountered in Human Clinical Specimens, *ASM Journals Journal of Clinical Microbiology*, p. 11

Kaur J., Verma M., Lal R. (2011): *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus* Hirsch and Muller 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 1218–1225.

Hatano K., Nishii T., Kasai H. (2003): Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly *Streptoverticillium*) species by using phenotypes, DNA–DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Katoh and Arai 1957) corrig., sp.nov., nom. rev., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, p. 1519–1529.

Kevin D. Young (2007): Bacterial morphology: Why have different shapes?, *Curr Opin Microbiol.* p. 596–600.

Khan S.T. (2015): Nitrate removal performance of *Diaphorobacter nitroreducens* using biodegradable plastics as the source of reducing power, *AIP Conference Proceedings*, p. 71

Kim H., Kang H., Joun Y., Joh K. (2014): *Flavobacterium gyeonganense* sp. nov., isolated from freshwater, and emended descriptions of *Flavobacterium chungangense*, *Flavobacterium aquidurensis*, *Flavobacterium tructae* and *Flavobacterium granuli*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 4173–4178.

Kurland, C.G. (1960): Molecular characterization of ribonucleic acid from *Escherichia coli* ribosomes. *Journal of Molecular Biology* p. 83-91.

La Scola, B., Mallet M. N., Grimont P., Raoult D. (2003): *Bosea enae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 15–20.

Lazarova, V. (1995): Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*, p. 2227–2245.

Lee D. W., & Lee S. D. (2008): *Tessaracoccus flavescens* sp. nov., isolated from marine sediment, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p.785–789.

Leeuwenhoek A. van (1753): IV. Part of a letter from Mr Antony van Leeuwenhoek, F. R. S. concerning green weeds growing in water, and some animalcula found about them, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, p. 1304 – 1311.

Li J., Long L. J., Yang L. L., Xu Y., Wang F. Z., Li Q. X., Zhang S., & Li, W. J. (2012): *Janibacter alkaliphilus* sp. nov., isolated from coral *Anthogorgia* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, p. 157–162.

Lina Lyu, Bin Zhi, Qiliang Lai, Zongze Shao, Zhiqiang Yu (2020): *Paracoccus xiamenensis* sp. nov., isolated from seawater on the Xiamen, *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, p. 4285–4290

Liu, Y., Lai Q., Du J., Shao Z. (2016): *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 1193–1199.

M. Luquin, V. Ausina, V. Vincent-Levy-Frebault, M. A. Lveele, F. Belda, M. Garcia-Barcel., G. Prats, M. Daffe (1993): *Mycobacterium brumae* sp. nov., a Rapidly Growing, Nonphotochromogenic *Mycobacterium*, *International Journal Of Systematic Bacteriology*, p. 405-413

Y. Abdel-Glil M., Thomas P., Brandt C., Melzer F., Subbaiyan A, Chaudhuri P., Harmsen D., Jolley K. A., Janowicz A., Garofolo G., Neubauer H., Pletz M. W., Diekema D.J. (2022): Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Improved Characterization and Epidemiological Surveillance of Pathogenic *Brucella*, *Journal of Clinical Microbiology*, p. 8

Nam G. G., Joung Y., Song J., Lim Y., & Cho J. C. (2016): *Emticiciafontis* sp. nov., isolated from a freshwater pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 5161–5166.

Kuisiene N., Raugas J., Sproer C, Kroppenstedt R. M., Chitavichius D. (2008): *Bacillus butanolivorans* sp. nov., a species with industrial application for the remediation of n-butanol, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, p. 505–509.

Otto M. (2013): *Staphylococcus epidermidis* Pathogenesis, *Methods in Molecular Biology* book series MIMB, p. 1106

Watnick P., Kolter R. (2000): Biofilm, City of Microbes, American Society for Microbiology Journal of Bacteriology, p. 2675-2679

Payne J., McKewon P., D.Jones M. (2019): A circular economy approach to plastic waste, Polymer Degradation and Stability, Materials today, p. 170-181.

Pękala A., Paździor E., Antychowicz J., Bernad A., Głowacka H., Więcek B., Niemczuk W. (2018): *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), Aquaculture, p. 285-289.

Reasoner DJ., Geldreich EE. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl Environment Microbiology, p. 1-7.

Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali O., Papa F., Ciro M., Rongioletti A., Baiocco F., Draghi S., D'Amore E., Rinaldo D., Matta M., Giorgini E. (2021): First evidence of microplastics in human placenta, Environment International, p. 146.

Sachs J. L., Skophammer R. G., Regus J. U. (2011): Evolutionary transitions in bacterial symbiosis, Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 10800 – 10807.

Schippers A., Bosecker K., Spröer C., Schumann, P. (2005): *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. International journal of systematic and evolutionary microbiology, p.655–660.

Khan S.T. , Hiraishi A. (2002): *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge, The Journal of General and Applied Microbiology, p. 299-308

Shi, Y. L., Sun, Y., Jiang, Z. M., Ruan, Z. Y., Su, J., Yu, L. Y., & Zhang, Y. Q. (2019): *Simplicispira lacusdiani* sp. nov., a novel betaproteobacterium isolated from a freshwater reservoir. International journal of systematic and evolutionary microbiology, p. 129–133.

Banerjee S., Tánicsics A., Tóth E., Révész F., Bóka K., Kriszt B. (2021): *Hydrogenophaga aromaticivorans* sp. nov., isolated from a para-xylene-degrading enrichment culture, capable of degrading benzene, meta- and para-xylene , International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, p. 3

Smalley N. E., Taipale S., De Marco P., Doronina N. V., Kyrpides N., Shapiro N., Woyke T., Kalyuzhnaya M. G. (2015): Functional and genomic diversity of methylotrophic Rhodocyclaceae: description of *Methyloversatilis discipulorum* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, p. 2227–2233.

Smith M., Love D.C., Rochman C.M. (2018): Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. Current Environmental Health Rpt 5, p. 375–386.

Mechichi T., Stackebrandt E., Fuchs G. (2003): *Alicyclophilus denitrificans* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing β -proteobacterium, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, p. 147–152

Tátraaljai D., Pukánszky B. (2020): A műanyagipar és a műanyag-felhasználás környezeti hatásainak csökkentése, Magyar kémikusok lapja, Klíma különszám, p. 1-52.

Tobias T.S., Andreas U., Kublik S., Foesel B. U., Kolb S., Horn M. A., Behrendt U. (2021): *Pseudomonas campi* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from grassland soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, p. 71

Tindall B.J., Rossello'-Mo'ra R., Busse H. J., Ludwig W., Kämpfer P. (2010): Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, p. 249-266.

Vanparys B., Heylen K., Lebbe L., De Vos P. (2006): *Pseudomonas peli* sp. nov. and *Pseudomonas borbori* sp. nov., isolated from a nitrifying inoculum. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 1875–1881.

Vogel G., Angermann H. (1992): *Biológia* Springer Verlag, Budapest, Berlin

Wang J., Coffin S., Sun C., Schlenk D., Gan J. (2019): Negligible effects of microplastics on animal fitness and HOC bioaccumulation in earthworm *Eisenia fetida* in soil, *Environmental Pollution*, p. 776-784.

Wieser M., Denner E. B., Kämpfer P., Schumann P., Tindall B., Steiner U., Vybiral D., Lubitz W., Maszenan A. M., Patel B. K., Seviour R. J., Radax C. Busse H. J. (2002): Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, p. 629–637.

Willem A., Falsen E., Pot B., Jantzen E., Hoste B., Vandamme P., Gillis M., Kersters K., De Ley J. (1990): *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, *E. Falsen* (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, p. 384–398.

Ziran Y, Hosokawa H., Sadakane T., Kuroda M., Inoue D., Nishikawa H., Ike M.. (2020): Isolation and Characterization of Facultative-Anaerobic Antimonate-Reducing Bacteria *Microorganisms* 8, p. 1435

Yong C., Qian Y., Suresh V., Bor L. T. (2020): Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, p. 1509

Yoon S.C., Choi M.H. (1999): Local Sequence Dependence of Polyhydroxyalkanoic Acid Degradation in *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Carbohydrates, Lipids and other Natural Products*, p. 37800-37808.

http1: <https://www.holofon.hu/muananyagok.html> (2022. október)

http 2: https://sotepedia.hu/media/fok/targyak/2_bakteriumok_tenyesztese (2022. október)

http 3: https://sotepedia.hu/media/fok/targyak/2_bakteriumok_tenyesztese_copy.pdf (2022. október)

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti a konzulensemét, Dr. Szabó Istvánt, aki aktívan közreműködött a dolgozatom elkészítésében, különösen a terepi és laboratóriumi vizsgálatokban.

Szeretném megköszönni oktatóimnak, akik hozzájárulnak fejlődésemhez.

Köszönettel tartozom a szüleimnek és a családomnak az odaadó segítségükért, amire nem csak dolgozatom elkészítésében, hanem tanulmányaim során végig számíthatok.

Köszönet illeti a Biomi Kft. munkatársait, akik munkájukkal segítették dolgozatom elkészülését.

Köszönet illeti Új Nemzeti Kiválósági Programot szervezőit, akik anyagi és szellemi javakkal segítik munkámat.

Kutatásaimat támogatta az Innovációs és Technológiai Minisztérium, Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott, a Piacvezérelt Kutatás-fejlesztési és Innovációs Projektek támogatása pályázati program 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2021-00239 számú projektje.


NYILATKOZAT

King Claudia Mária (név) (hallgató Neptun azonosítója: **KS5FJ6**) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: Vácszentlászló, 2023. november 12.



belső konzulens
Dr. BÉRES ISTVÁN

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: **King Claudia Mária**
A Hallgató Neptun kódja: **KS5FJ6**
A dolgozat címe: **Mikroműanyag felületeket kolonizáló bakteriális közösségek vizsgálata a Zagyván**
A megjelenés éve: **2023**
A konzulens intézetének neve: **Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet**
A konzulens tanszékének a neve: **Környezettoxikológia Tanszék**

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Gödöllő, év 2023 hó November nap 8.



Hallgató aláírása