



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2023. május 12.

**SZENNYVÍZ HATÁSA ALATT ÁLLÓ FELSZÍNI VÍZ
PLASZTISZFÉRIKUS MIKROBAKÖZÖSSÉGÉNEK
ELEMZÉSE**

**Analyzes of plastispheric microbial communities in surface water under
impact of treated wastewater**

Készítette: **Sütő Panna**
FWQVUC
Környezetmérnök Bsc
Nappali tagozat
Szent István Campus

Témavezető: Dr. Szabó István, egyetemi docens,
MATE-AKI (Szent István Campus)

Lehetséges OTDK szekció: Biológia Szekció

**Gödöllő
2023.**

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	4
2	Irodalmi áttekintés	5
2.1	A műanyag.....	5
2.1.1	Műanyag típusai	5
2.1.1.1	Polietilén-tereftalát (PET).....	5
2.1.1.2	Nagy sűrűségű polietilén (HDPE)	5
2.1.1.3	Polivinil-klorid (PVC)	6
2.1.1.4	Alacsony sűrűségű polietilén (LDPE)	6
2.1.1.5	Polipropilén (PP)	6
2.1.1.6	Polisztirol (PS).....	6
2.1.1.7	Egyéb műanyagok	6
2.1.1.8	Bioműanyagok.....	7
2.2	Műanyag, mint hulladék	8
2.3	Műanyag hatásai a környezetre	10
2.4	A mikroműanyag	12
2.4.1	Mikroműanyag csoportosítása, keletkezése	12
2.4.2	Mikroműanyagok forrásai és alkalmazásai	13
2.4.3	Mikroműanyagok hatása az élő szervezetekre	14
2.4.4	Mikroműanyag, mint biológiai vektor	16
3	Anyag és módszer	17
3.1	A mintavételi helyszín	17
3.2	Szentendrei szennyvíztisztító telep.....	17
3.3	Plastic colonizer módszer	18
3.4	Kísérlet kivitelezése.....	18
3.4.1	Baktérium izolátumok és mikrobiom meghatározás	19

3.4.1.1	Baktérium izolálás	19
3.4.1.2	Identifikálás	21
3.4.1.3	Törzstárolás	25
3.4.2	Közösségi mikrobiom elemzés 16S rDNS amplikon szekvenálással	25
3.4.2.1	A baktériálisközösség izolálása	25
3.4.2.2	Amplikon szekvenálás	26
4	Eredmények bemutatása, értékelése	27
4.1	Az izolált baktériumtörzsel 16S rDNS szekvenálásának eredménye	27
4.2	16S rDNS szekválás eredményeinek kiértékelése	28
4.3	Amplikon szekvenálás eredménye	30
4.4	Amplikon szekvenálás eredményeinek kiértékelése	33
5	Összefoglalás	35
6	Köszönetnyilvánítás	36
7	Mellékletek	37
8	Irodalomjegyzék	38

1 Bevezetés

Az elmúlt évtizedben igen jelentős, globális szintű problémává nőtte ki magát a műanyag szennyezés. Egyre több szakirodalom foglalkozik a témával és egyre több kutatás folyik a műanyag hulladék keletkezésének megelőzéséről, újrafeldolgozásáról és környezeti hatásairól. A dolgozatomban az utóbbival fogok részletesebben foglalkozni.

Napjainkban évente körülbelül 359 millió tonna műanyag keletkezik ([http1](#)). A kutatók becslése szerint, ha továbbra is ilyen ütemben halad a műanyagok gyártása, 2050-re az 1,8 milliárd tonnát is elérheti az évenkénti termelés (Bergman et al, 2015). Európában jelenleg a műanyag hulladékok kezelése az alábbi módszerekkel történik: 42,6 %-a kerül energetikai hasznosításra, 32,5%-a újrahasznosításra kerül, illetve 24,9%-a végzi hulladéklerakóban. Fontos megemlíteni, hogy ezen hulladékok egy része a hulladékkezelési módszereket elkerülve, közvetlenül, vagy közvetve a környezetbe, valamint az tengerekbe, óceánokba jutnak ([http1](#)). Becsült adatok szerint jelenleg 5,25 milliárd tonna műanyag hulladék van a Földön és ebből 150 millió tonna szennyezi a világ sós- és édesvízkészletét. Ezen adatok tudatában láthatjuk, hogy nem csak a további hulladékok keletkezésének a megelőzés a fontos, hanem a már kikerült szennyezőanyagok felszámolása, feldolgozása is nagyon lényeges (Bergmann et al, 2015, [http2](#)). Az esztétikai és a fizikai szennyezés mellett a műanyag rendelkezik egy olyan másodlagos tulajdonsággal, amely lehetővé teszi, hogy a felületükön adszorbeáljanak különböző kémiai szennyezőanyagokat, valamint hozzájuk kapcsolódva élőlény közösségeket hordozzanak (plasztiszféra), további indirekt környezeti kockázatokat okozva ezzel (Wiesner et al, 2018).

Három és fél éve foglalkozom a mikroműanyagok felületén kialakuló mikrobaközösségekkel, amely három elnyert UNKP ösztöndíj keretein belül valósulhatott meg. Jelen dolgozatom célja a szennyvíz hatása alatt álló felszíni víz plasztiszférikus közösségének bemutatása, illetve baktériumok fajsztintú identifikálása mikroműanyag felületről. A kutatás során továbbá célom volt a plasztiszférikus közösség és a környezeti közeg (pl- felszíni víz, szennyvíz) közösségének összehasonlítása.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A műanyag

A műanyag az egyik legismertebb mesterséges anyag a világon, amelyet számtalan területen használnak. A műanyag kifejezés is mutatja, hogy nem egyetlen konkrét meghatározott anyagról van szó, hanem eltérő tulajdonságú anyagok összefoglaló neve. Annak ellenére, hogy ezek az anyagok különböző jellemzőkkel rendelkeznek, szerkezetük igen hasonló. A műanyag definícióját többféleképpen is meghatározták. Az általánosan elfogadott fogalom szerint a műanyagok olyan makromolekulájú anyagok, amelyeket kizárólag mesterséges úton, a természetben előforduló makromolekulák kémiai átalakításával vagy kis móltömegű anyagok polimerizációjával hoznak létre. A műanyag polimerből épül fel, ami olyan hosszúláncú szerves kémiai vegyületek halmaza amelyben sok ezer monomer elsőrendű kémiai kötással kötődik egymáshoz. Kémiailag tehát a műanyag egy olyan összetett rendszer, amely egy vagy többféle polimerből és kémiai adalékanyagból tevődik össze (Stoll, 2018; Szabó, 2009; Erdei, 2017).

2.1.1 *Műanyag típusai*

A műanyagok különböző összetételűek, típusonként fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságaik eltérhetnek. Hulladékfeldolgozás és kezelés szempontjából 7 fő típus van (Pukánszky et al., 2011). A termékeken az újrahasznosítás jele, az önmagába forduló nyílás szimbólumban lévő szám ad arról tájékoztatást, hogyan kezelhető az adott műanyag. A főbb csoportokat az alábbiakban mutatom be.

2.1.1.1 Polietilén-tereftalát (PET)

Ez a típus a legszélesebb körben alkalmazott műanyag. Elsődleges felhasználási területe a csomagolóipar, azon belül pedig a palackok gyártása, illetve a kozmetikumok, élelmiszerek csomagolása is számottevő. Monomerje az etilén, olvadáspontja 110 és 130 °C között van. A PET egy részben kristályos polimer, nagy hőállósággal, ezért a hűtés gyorsaságával lehet szabályozni a formáját, keménységét. Jellemzője az átlátszóság. Szelektíven gyűjtve újrafeldolgozható, melyből leggyakrabban granulátumot készítenek.

2.1.1.2 Nagy sűrűségű polietilén (HDPE)

A HDPE (high-density polyethylene) sűrűsége legalább 0,941 g/cm³. Leggyakrabban a csomagolóiparban alkalmazzák, keményebb csomagolásokra, például átlátszó tejespalack, tisztítószerek flakon, szemeteszsák. Emellett vízvezetékek előállítására is használják. Monomerje az etilén, olvadáspontja 110 és 130 °C között van. A polietilének közül az egyik legegyszerűbb a kémiai felépítése. Merev, szilárd, nedválló anyag.

2.1.1.3 Polivinil-klorid (PVC)

A világ harmadik leggyakrabban alkalmazott polimere. Általában vízelvezetési alkalmazásokban, házipítési iparban csövekhez, pellet vagy gyanta formájában is piacra kerül. A vinil-klorid gyökös polimerizációjával állítják elő, olvadáspontja 80 °C körül van. Könnyű, könnyen kezelhető és formázható műanyag. Kémiaileg ellenálló, kemény, de hőre lágyuló anyag. Mivel bonyolult a szerkezete, ezért igen ritkán hasznosítják újra.

2.1.1.4 Alacsony sűrűségű polietilén (LDPE)

Az LDPE (low-density polyethylene) sűrűsége 0,915-0,925 g/cm³ között változik. Leggyakrabban fóliagyártásra használják, valamint készülnek belőle tasakok, bélések, szemetes zsákok, puhább műanyag palackok és mezőgazdasági fóliák. Monomerje az etilén, olvadáspontja 110 és 130 °C között van. Kis sűrűségű és kis szakítószilárdságú, viszont nagy hajlékonyságú műanyag. Szelektíven gyűjtve anyagában újrahasznosítható.

2.1.1.5 Polipropilén (PP)

A második leggyakrabban előállított és alkalmazott műanyag. Leggyakrabban szintén csomagolóanyagként alkalmazzák, emellett a textilipar, vegyipar is alkalmazza. Jelentős mértékben használják még különböző műanyag alkatrészeknél és az írószereknél. Monomerje a propilén, olvadáspontja 165 °C körül van. Hőre lágyuló, jól vákuumformázható, kemény műanyag. Szelektíven gyűjtve újrahasznosítható.

2.1.1.6 Polisztirol (PS)

Leggyakrabban építőiparban használják, például szigetelés, pl. hungarocell formájában. Ezen kívül hűtőtáskák, védőeszközök előállítására alkalmazzák. Monomere a sztirol, üvegesedési hőmérséklete 100 °C körül van. Hőszigetelő, saválló és vízálló is egyben. Kismértékben deformálható, kemény, merev műanyag. Jellemzően a lakossági szelektív hulladékudvarokban lehet elhelyezni. Az EPS-t egyre gyakrabban dolgozzák fel és használják például pórusképző anyagként, vagy cementtel keverve a könnyűbeton alkotóelemeként. Egyes rovarok lárvái is képesek elfogyasztani (Rinke et al, 2022).

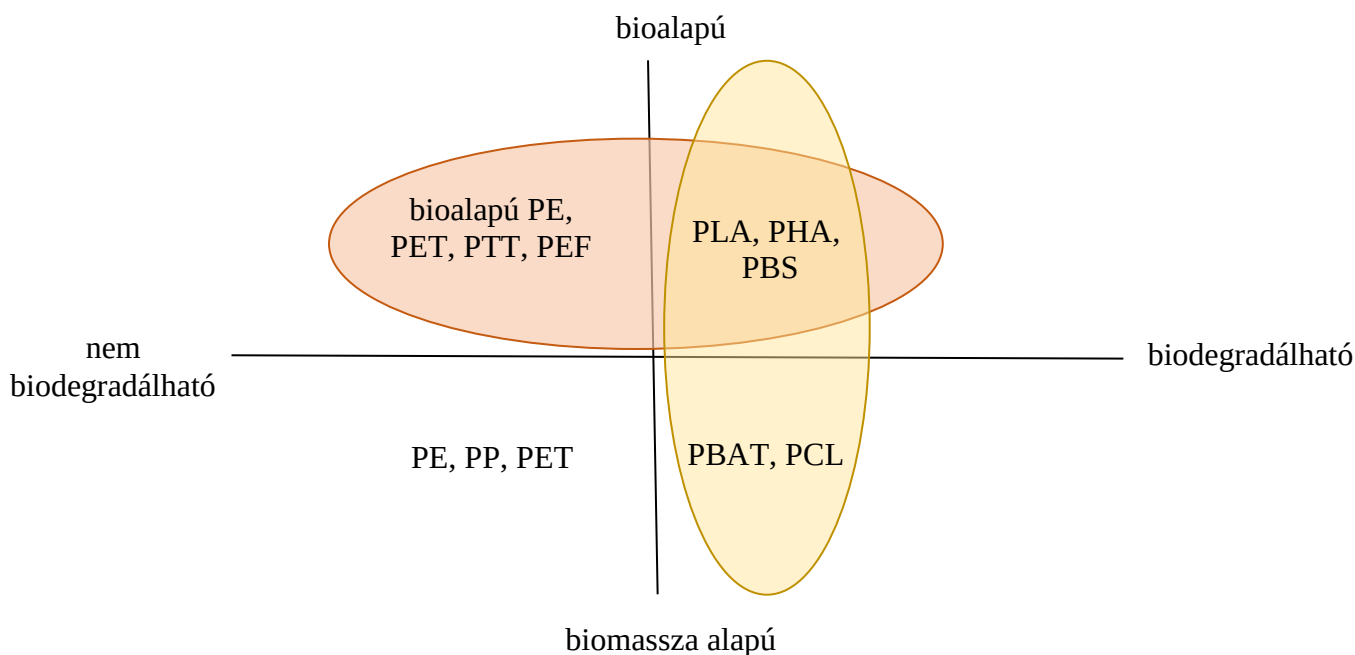
2.1.1.7 Egyéb műanyagok

Azokat a műanyagokat soroljuk ide, amelyek tulajdonságaik vagy biodegradálhatóságuk miatt a fent említett csoportokba egyértelműen be nem sorolhatók. Ebbe a csoportba tartjuk számon az úgynevezett kompozit műanyag hulladékot, melynek fő jellemzője, hogy a műanyagon kívül tartalmaz más anyagot is, például papírt vagy alumíniumot (pl. tetrapack doboz). Az egyéb

műanyagok között találhatók a környezetvédelmi szempontból legelőnyösebb, az elmúlt években kifejlesztett bioműanyagok, amelyek manapság már minden fogyasztó és termelő számára elérhető árucikk a piacon (Pukánszky et al., 2011; Palm et al, 2019).

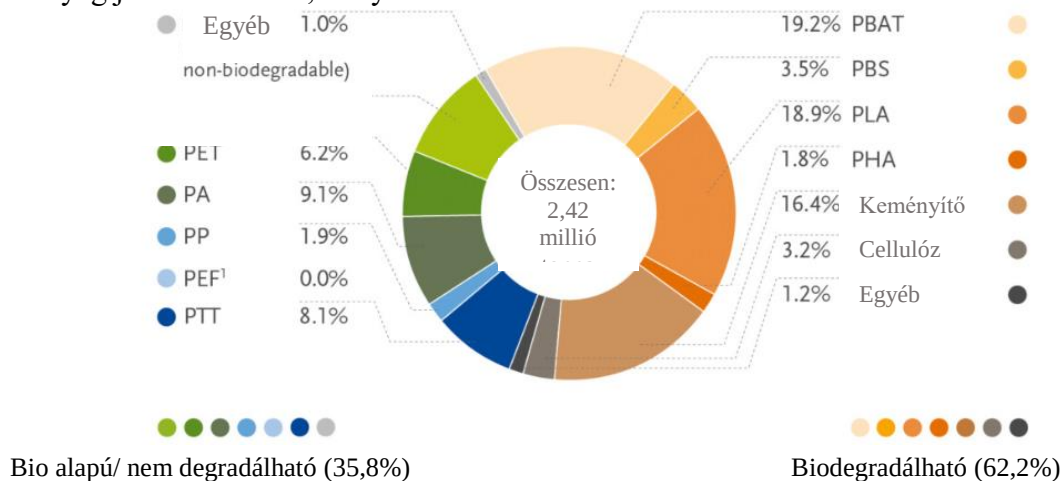
2.1.1.8 *Bioműanyagok*

A bioműanyagokat két csoportra oszthatjuk. Vannak a bioalapú műanyagok, illetve a biológiailag lebomló műanyagok, azonban vannak olyanok, amelyeket mindkét csoportba sorolhatjuk. A bioalapú jelző magába foglalja azokat az anyagokat vagy termékeket, amelyek részben vagy egészben biomasszából, azaz jellemzően növényekből származtathatóak. A leggyakrabban használt ezek közül a kukorica, cellulóz vagy cukornád alapú polimerek. A biológiailag bomtható műanyag viszont különböző mikroorganizmusok által kerül lebontásra, amelyek képesek átalakítani vízzé, szén-dioxiddá és komposzttá - amennyiben a lebontás ideális. Ennek a tulajdonságának köszönhetően ezek a műanyagok komposztálhatók a többi műanyaggal ellentétben. Az 1. ábrán jól látható, hogy megkülönböztetünk olyan műanyagokat, melyek bioalapúak, azonban nem biodegradálhatók, ilyen a bioalapú polietilén (bioPE), a szintén bioalapú polietilén-tereftalát (bioPET), a politrimetilén-tereftalát (PTT), illetve a polietilén-furanoát (PEF). Biomassza alapú, illetve biodegradálható például a polibutilén-adipát-ko-tereftalát (PBAT) és a polikaprolakton (PCL) is. A kutatás során alkalmazott politejsav (PLA) a bioalapú és biodegradálható is egyben, mint a polihidroxialkanát (PHA) és a polibutilén (PBS) is. (Az ábrán továbbá látható a polietilén (PE), a polietilén-tereftalát (PET), illetve a polipropilén (PP) is, amelyek a bioműanyag csoportok egyikébe sem sorolhatók.)



1. ábra Bioműanyagok csoportosítása anyagtulajdonságuk és biodegradálhatóságuk alapján (<http4>)

A 2. ábra bemutatja, hogy az egyes bioműanyagok termelése hogyan oszlik meg globálisan. Látható, hogy világszinten 2,42 millió tonna bioműanyagot termelünk, melynek 62,2%-a biodegradálható, illetve 35,8%-a bio alapú, viszont nem biodegradálható. Továbbá az is leolvasható, hogy az egyes típusok hogyan oszlanak meg. A legtöbbet termelt biodegradálható műanyag jelenleg a PLA, melyet a kutatás során is alkalmaztam.



2. ábra 2021-ben Globálisan termelt bioműanyagok felosztása, típus alapján (http4)

A PLA egy olyan kristályos szerkezetű polimer, amelyet erjesztéssel és polikondenzációval vagy dilaktid polimerizációval állítanak elő természetes anyagokból, főként magas keményítőtartalommal rendelkezőkből. Leggyakrabban egyszerhasználatos tárgyakat készítenek belőle, ezen felül pedig alkalmazzák hétköznapi használati tárgyak esetében, textíliák, illetve kompozit alapanyagként is használják (Garlotta et al. 2011). A PLA komposztálás során körülbelül 12 hét alatt lebomlik. Amennyiben nem komposztálják, égetése során több energiát termel, mint például a papír és az sem elhanyagolható, hogy nem keletkeznek égetésekor illékony gázok, illetve az égéstermék is igen kis mennyiségű. Ártalmatlanítás esetén pedig nem keletkezik metán, tehát minden hulladékkezelési módszer esetében egy jobb alternatívának bizonyul a hagyományosan alkalmazott hulladékoknál (http6).

2.2 Műanyag, mint hulladék

Minden évben 100 milliárd poliamid zacskó kerül értékesítésre Európában. Ez 6 g/zacskóval számolva évente 600.000 tonna műanyag. Ez elosztva a lakosokra azt jelenti, hogy Európában minden lakos 200 zacskót használ évente, ami 1,2 kg műanyag. Az emberek 89%-a egyszer használja ezeket a zacskókat. A számítások szerint csak ebből a tevékenységből 48.000 tonna műanyag kerül a környezetbe évente.

A műanyag csökkentésének elve a hulladékhierchiára épül. Az EU 2008/98/EK irányelv a hulladékokról és egyes irányelvek hatályon kívüli elhelyezéséről szóló jogszabályban határozzák meg a hulladékhiearchiát. A megfelelő felhasználási megoldás függ például a műanyag jellegétől, a helyi adottságoktól, gazdasági szempontoktól és egyéb tényezőktől is (http8).

A hulladékhiearchia alapján a hulladékok kezelésének prioritizált lépése a megelőzés. Ebből a szempontból megfelelő megoldásnak tűnik a természetes nyersanyagforrásra épülő vagy biológiailag előállítható polimerek alkalmazása. 1995-ben jelent meg az első nagy mennyiségű természetes nyersanyagokból készült 100%-ban lebomló műanyag a piacon. Ez megfelel a 2018/851 EU módosító irányelvnek, amely a körforgásos gazdaságról, illetve a kiterjesztett gyártói felelősségről szól, miszerint minden gyártó köteles minimális mennyiségű anyagot használni, ezzel is csökkentve a keletkező (műanyag) hulladék tömegét (http8).

A következő szint az újrafelhasználás. Ez legfőképp ipari méreteknél fontos, hogy ne egyszer használatos műanyagokat alkalmazzanak, hanem folyamatosan újra fel tudják használni az előállított műanyagokat. Települési hulladéknál kevésbé jellemző, bár egyre többen törekednek az egyszeri használatra tervezett műanyagok többször felhasználásra a háztartásokban is. Az utóbbi években elterjedt komposztálás is ide sorolható. A komposztálás mind ipari, mind háztartási szinten elérhető módszer. A műanyagok nagy része nem komposztálható, de ez alól kivételt képez a biológiailag bontható műanyag, mely emiatt is említésre méltó. A komposztba a legtöbb szerves háztartási hulladék belekerülhet, majd megfelelő nedvességtartalom, oxigénellátottság, hőmérséklet, illetve szén- és nitrogénarány mellett bizonyos idő elteltével végtermékként jelenik meg a komposzt. A komposzt egy fenntartható, megfelelő alternatíva lehet a trágyázásra. Mezőgazdaságban gyakran felhasználgják a komposztokat talaj minőségének, szerves anyag tartalmának növelésére. Amennyiben a műanyag termék nem bomlik le teljes mértékben, a mikroműanyag szennyezők jelen lehetnek, melyeknek mezőgazdasági célú felhasználása további következményeket vonhat maga után, ezért ebben az esetben ezt is monitorozni szükséges.

A hulladékhiearchia harmadik szintje az újrafeldolgozás, anyagában történő hasznosítás. Ez gyakorlatban akkor tud megvalósulni, amennyiben gazdaságilag és környezetvédelmi szempontból is kedvezőbb maga a hasznosítás, mint más hulladékkezelési eljárás alkalmazása. Ez egykomponensű hulladékok esetében alkalmazható, ezért a műanyag tervezésénél figyelembe kell venni, hogy például a termék tartálya és fedője ugyanazon típusú műanyagból legyen. Ez esetben a feldolgozás a többi technológiához képest egyszerűbb, a termék értéke

magas, viszont az eljárás is költséges. Fontos megjegyezni a kémiai újrahasznosítást, bár nagy része jelenleg még csak kísérleti stádiumban van. A tudományos kutatások azonban egyértelműen igazolják, hogy ez az újrahasznosítás jövője. Az eljárás alapja, hogy a polimerből kis móltömegű komponenseket gyártanak, amelyek később felhasználható a műanyagiparban és egyéb ipari területeken is. Jelenleg használt eljárás az átészterezés, ezt a módszert polikondenzációval előállított műanyagból alkalmazzák, mint a PET vagy poliuretán. A kapott polioloiból újra poliuretán (PUR) habokat állítanak elő.

Az Európai Közösség elismeri az égetést, mint hulladékhasznosítási módszert, abban az esetben, ha megfelelő hatásfokú és energetikai hasznosításra alkalmas. Egyes polimerek, mint például a polietilén és a polisztirol igen nagy hőtartalommal rendelkezik, így fűtőértékük is igen magas. Az égetés problémája, az égés során keletkező légszennyező és egészségkárosító gázok, például a különböző savak és a rákkeltő dioxinok. Ennek kiküszöbölésére különböző savtalanító és gáz- vagy porleválasztó berendezéseket üzemeltetnek a hulladékégetők. Az innen leválasztott anyagok általában veszélyes hulladékként kezelendők tovább. A műanyag hulladék égetése nem a legkorszerűbb módszer a hulladékkezelésre környezetvédelmi szempontból. 2019-ben körülbelül 850 millió tonna CO₂ üvegházhatású gáz keletkezett a műanyag égetés során, amely nagyban hozzájárul a klímaváltozáshoz és a felmelegedéshez.

Az utolsó lépcső a hulladék ártalmatlanítása. Ez jelenthet a lerakást, vagy olyan égetést, melynek energetikai hasznosítása nem elég hatékony. Magyarországon jelenlegleg 72 lerakó működik. Műanyag típusok közül leggyakrabban a PS vagy a PVC kerül ártalmatlanításra (Pukánszky et al., 2011).

2.3 Műanyag hatásai a környezetre

A kőolajból előállított műanyag gyártása légszennyezéssel járhat, amely a környéket, transzmisszió esetén pedig nagyobb területet is szennyezhet. A műanyag tehát már előállításakor is terhelést jelenthet a környezetre (http8).

A műanyagszennyezéssel járó fizikai és az esztétikai szennyezés szinte mindenki számára közismert. A műanyag a második leggyakrabban keletkező hulladéktípus, ezen belül is a PET a leggyakrabban alkalmazott műanyag, melynek bomlási ideje kb. 450 év. A tengeri hulladék 85%-át műanyag hulladék teszi ki, amelynek nagy része PET. A PET és egyéb víznél könnyebb műanyagok a víz felszínén lebegve képesek több km²-es hulladékszigeteket létrehozni. Az egyik legismertebb a Csendes-óceánon kialakult, hozzávetőlegesen 2500 km átmérőjű és 100 millió tonna tömegű „sziget”. Ezek a hulladékok az esztétikai szennyezésen túl is igen jelentős mértékű hatással rendelkeznek: a napfényt és az oxigént elzárják az élőlények elől, továbbá

számos káros kémiai és biológiai hatásuk is ismert. Legfőbb, ismert fizikai hatásuk az élőlények pusztulása, pusztítása, a biodiverzitás csökkentése. Amennyiben a vízi élőlények műanyagot fogyasztanak, a részecskék bejutnak a táplálékláncba és végül az emberi szervezetbe is, melynek szintén élettani hatásai lehetnek.

A műanyag a polimerek mellett tartalmaz más adalékanyagokat is, ami az előállítás során rájuk kerül, például a különböző színezőanyagok. Ezek az anyagok az emberi szervezetbe bekerülve (a műanyag elégetésekor, belélegezve) elváltozásokat okozhatnak. Az adalékok közé tartoznak a biszfenol-A-t tartalmazó vegyületek, a ftalátok, és a triclosan is. Ezekről az adalékokról számos tanulmány született már korábban, ahol kimutatták toxikus hatásaikat. A PET esetében a többszöri újrahasználatból apró, mikroméretű repedések keletkezhetnek, így pedig a káros adalékanyagok bejutnak az élelmiszerbe, például a dietil-hexil ftalát (DEHP), amiről a kutatók bebizonyították, hogy jelentős hatással van az emberi endokrin (hormonális) rendszerre (EDC), illetve összefüggésben áll a kóros túlsúllyal (obezitás) is. További jellemzője, hogy képes károsítani a májat, a veséket és a tüdőt is. Szintén műanyag adalékanyagok közé sorolhatók a különböző lágyítószerke, égésgátló anyagok, UV-stabilizátorok.

A 7-es (egyéb) típusú műanyagok közé sorolandó a polikarbonát alapanyagú műanyag is, melyhez gyakran adagolnak biszfenol-A-t, amit a köznyelv BPA-ként is ismer. Igen veszélyes adalékanyag, amely degeneratívan hat mind a női és férfi szaporodó szervekre, viselkedési zavart okozhat, befolyásolja az immunrendszer működését és emberben bizonyítottan rákkeltő hatásai is ismertek. Továbbá a BPA különösen ártalmas csecsemőkre nézve, hiszen a szervezetük nem képes kiszűrni ezt az anyagot. Ezen ismeretek tudatában született a döntés, miszerint 2011-től Európában a BPA hozzáadása cumisüveghez tiltott ([http10](http://10)).

Szintén problémás a műanyagok égetése: a polivinil-klorid elégetésekor foszgén, vinil-klorid illetve dioxinok szabadulnak fel, mely az emberi szervezetbe bekerülve rákkeltő, mutagén hatásúak is lehetnek. (Primpke et al., 2017). Ezért is került tiltásra a kerti hulladékok égetés Magyarországon. Sajnos azonban sok esetben tudni arról, hogy ezek a műanyag hulladékok itthon a háztartási vegyes tüzelésű kazánokba is bekerülnek, jelentős levegőszennyezést okozva településeinken.

A műanyagok további jelentős környezeti kockázatuk abban is rejlik, hogy képesek megkötni különböző szennyezőanyagokat is. Ilyenek például a hidrofób aromás szénhidrogének. Ezek közül kiemelendő a policiklikus aromás szénhidrogének csoportja, melybe több száz vegyület tartozik, valamint ezek közül több vegyület is bizonyítottan mutagén, karcinogén hatású (Cignotti et al, 2019).

2.4 A mikroműanyag

A fent bemutatott környezeti hatásokon túl ismeretes, hogy nehezen, de a műanyag képes különböző fizikai, kémiai és biológiai hatásra aprózódni, így mikroműanyagok jönnek létre, melyek további kockázatot jelenthetnek. A mikroműanyag kifejezés alatt olyan apró méretű műanyag részecskéket értünk, melyeknek maximális mérete 5 mm, a minimális pedig a mikrométeres tartományban van. Az Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság határozta meg ezt a definíciót, mely anyagában és formájában nem korlátozza, csak méretében, miszerint 0,1 μm és 5 mm átmérő között lehet.

2.4.1 *Mikroműanyag csoportosítása, keletkezése*

A műanyagokat méret és keletkezés szerint csoportosíthatjuk. Méret szerint 3 csoportot különböztetnek meg (1. táblázatban). 1-5 mm közötti műanyagokat hívjuk mikroműanyagnak. 1 μm -1 mm között mini-mikroműanyagokról, illetve 1 μm alatt nanoműanyagokról beszélünk.

Méret	Megnevezés
< 1 μm	nanoműanyag
1 μm -1 mm	mini-mikroműanyag
1-5 mm	mikroműanyag

1. táblázat: Mikroműanyag csoportosítása (Stöven et al, 2015)

A mikroműanyagon kívül beszélhetünk mezo- és makroműanyagról, melynek mérettartománya 5-25 mm között, makro esetén pedig 25 mm felett van (Stöven et al., 2015). Keletkezés szerint megkülönböztetünk elsődleges és másodlagos mikroműanyagokat. Elsődlegesnek nevezzük az olyan részecskéket, amik a környezetbe kikerülve már 5mm-nél kisebbek. Ide tartozik többek között az iparban a csiszolás és a tisztítás folyamatából eredő, illetve a kozmetikából kikerülő részecskék melyek már mikroméretűek. Továbbá az olyan műanyag granulátum, ami a csomagolások és a fóliák gyártása során keletkezik. Ezek a mikroműanyagok rendszerint a keletkezés helyén valamint a feldolgozásuk közben kerülhetnek a légtérbe és egyéb környezeti elemekbe.

A másodlagos mikroműanyagok alatt azokat a műanyagokat értjük, melyek környezetbe kerülésekor nem ilyen apró méretűek, hanem ez az állapot valamilyen fizikai, kémiai vagy biológiai bomlás útján következik be. Ha a műanyag a vízben (vízfelszín alatt) van, akkor nagyon lassan indul el ez a bomlási folyamat. Ezzel ellentétben a vízfelszínen ez a folyamat sokkal hamarabb következik be, a felszínen ugyanis az erős UV sugárzás és a magas hőmérsékelt ingadozás hatására legyengül a műanyag, majd apró részecskékké mállik. A részecske lesüllyed a víz aljára és a hideg víz, valamint a növekvő nyomás hatására tovább degradálódhat kisebb részecskékké. A víz mélyén a tulajdonságai megváltoznak és nagyobb

kémiai stabilitásra tesz szert, így a mikroműanyag élettartama jelentősen megnövekszik. Amennyiben szárazföldön indul meg ez a bomlási folyamat, abban az esetben az előbb leírtakhoz képest is gyorsabban következik be, melynek eredményeképp gyorsabban képződnek mikroméretű részecskék (Primpke et al., 2017).

2.4.2 Mikroműanyagok forrásai és alkalmazásai

Az elsődleges mikroműanyagoknak legjelentősebb forrása számos kutatás szerint a kozmetikai ipar, azon belül is főként a tusfürdőkben és a folyékony szappanokban jellemző használatuk. A napi fogyasztás alapján a felhasznált mennyiség 2,4 mg/fő-re jön ki. Ez körülbelül 1,25 kg/fő/évnek felel meg. Európában minden kozmetikai terméket figyelembe véve, évente 500 millió lakossal számolva 3125 tonna mikroműanyagot juttatunk ki a csatornarendszereken keresztül a háztartásokból. Magyarországra megfelelően még nincsenek adatok, ezért dolgozatomban a németországi helyzet kerül bemutatásra. Itt a következőképp alakul a mikroműanyag felhasználása (2. táblázat).

A mikroműanyag forrása	Becsült mennyiség Németországban (t)
kozmetika	500
mosó, tisztító, ápoló a háztartásokban	nincs pontos adat
mosó, tisztító az iparban	< 100
felület koptató	< 100
orvostudomány	nincs pontos adat
műszaki alkalmazás	100000

2. táblázat: Elsődleges mikroműanyag forrásai (Ahrens et al, 2015)

A másodlagos mikroműanyagok nagy része a hulladékok aprózódásából jön létre. Ezen kívül szintetikus szálak, ruhák, egyéb textilek, a termelés, a feldolgozás, illetve a gumibroncs kopás a lehetséges forrásai. Becslések szerint Európában évente a termelési hulladék 6-10%-a kerül a világ vizeibe, ez a mennyiség 3,4-5,7 millió tonna. A ruházatból és más textilből származó műanyagszálak egy ideje a hasonló kutatások középpontjában állnak, ennek ellenére még a mai napig számos hiányosság van az adatokat illetően. Eddigi adatok szerint Európában körülbelül 500-2500 tonna szintetikus mikroszál keletkezik évente. A 3. táblázat összefoglalja, hogy a másodlagos mikroműanyagok milyen tevékenységből adódóan keletkeznek, illetve milyen mennyiségben, Németországra nézve. (Ahrens et al., 2015).

Forrás	Mennyiség Németországban (t)
műanyag hulladék aprózódása	„megszámlálhatatlanul nagy mennyiség”
gumibroncs kopása	60000-110000
granulátum veszteség	21000-210000
műszál	80-400

3. táblázat: Másodlagos mikroműanyag forrásai (Ahrens et al, 2015)

2.4.3 Mikroműanyagok hatása az élő szervezetekre

Ahogy korábban bemutattam, a műanyagok méretükben és anyag összetételükben is igen változatosak lehetnek. Mivel különböző anyagból készülhetnek, ezért a képződő mikroműanyag is más-más tulajdonsággal rendelkezhet. A környezetben jelen lévő mikroműanyag jelentős kockázatot jelenthet a szárazföldi és a vízi élőlényekre is egyaránt (Bordós et al, 2016).

Napjainkban írtak le egy kizárólag műanyagok által okozott betegséget tengeri madarak esetében, mely a plasztikózis nevet kapta. A plasztikózis a madarakban lévő műanyag hulladékok lenyelését, a gyomor felsértését követő hegesedés. Ez az első olyan tanulmány, amelyben kifejezetten a műanyag okozza a fibrózist a madaraknál. A tanulmány szerint eltérő korú madarak esetében is kimutatták, tehát a fiatal madarak is ki vannak téve a plasztikózis nevezetű betegségnek. A mikroműanyag részecskék begyulladhatnak, a tartós gyulladás következtében pedig megkezdődik a hegesedés és a szövetek eltorzulhatnak. Ezáltal a madarak sebezhetőbbé válnak a különböző fertőzésekkel szemben, továbbá a táplálék felvétele és megemésztése nehezebbé válik, így megállhat a növekedés, akár halál is bekövetkezhet. A különböző természetes anyagok, mint például a habkő ilyet nem képes okozni a madarakban, a betegség kifejezetten a műanyag szervezetbe jutásakor következhet be (Horton et al, 2023).

A kisebb élőlények, például a planktonok az általuk elfogyasztott részecskéket képesek a táplálékláncon keresztül magasabb trofitási szintekre is eljuttatni. A halak, tengeri teknősök, madarak és vízi emlősök emésztőrendszeréből is izoláltak már mikroműanyagokat. Ennek a következménye, hogy csökken a bevitt táplálék mennyisége és ez pedig az élettartam csökkenéséhez vezet. A vizsgálatok kimutatták, hogy ezekben az állatokban a műanyagrészecskék felhalmozódása visszaöklendezést, gyomor és bélrendszeri betegségeket okozhat és ezen tényezők sok esetben halálhoz vezethetnek. A részecskék fizikai és élettani sérülést válthatnak ki, amely a nagyobb tengeri élőlényeknél is betegséghez, puszuláshoz vezethet. A szennyezett tengeri területeken vannak olyan élőlények, melyeknél a testük tömegének 80%-át teszik ki ezek a mikroműanyagok. Így az elfogyasztott műanyag részecske a táplálékláncon végig megy, végül pedig az emberi szervezetben is felhalmozódhat, amennyiben ezeket az élőlényeket elfogyasztjuk (Primpke et al., 2017).

A mikroműanyag, mint humán egészségügyi veszélyforrás 1950 körül kezdett megjelenni, amikor sok más anyagból készült terméket felváltott a műanyag. Legelőször az élelmiszerekben talált mikroműanyag részecskék keltették fel a környezetkutatók érdeklődését. Kimutattak ilyen anyagokat számos élelmiszerből, például a vízből, a sörből, a mézből és az étkezési tengeri

élőlényekből. Gyártástechnológiában mikroműanyagokkal a kozmetikai iparban találkozhatunk, például a fogkrémekben és a tusfürdőkben is megtalálhatók ezek a részecskék, melyet a nagyobb tisztítási hatások érdekében alkalmaznak. Az előbb említett kozmetikai termékek akár 10 % mikroműanyagot is tartalmazhatnak. A mikroműanyag jelenlétét az emberi szervezetben elsőként humán székletmintából mutatták ki, amely igen nagy felháborodást, a műanyagokkal szembeni ellenérzést keltett világszerte (Naegelen, 2019). Azóta több más humán mintában is bizonyították jelenlétüket.

A kutatók szerint minden ember szervezetébe évente átlagosan 5 mg mikroműanyag kerül. A 10 µm-nél kisebb mikroműanyagok a belélegezve bekerülnek a szervezetbe, majd a légutakon át a hörgőbe érkezik. Ha olyan részecske kerül belégzésre amely nagyobb, mint 2,5 µm, az mélyen lerakódik a tüdőhólyagocskába. Ez a lerakódás erős összeköttetésben van a nyálkahártyával és befolyásolja a garatban működő öntisztító mechanizmust, amely por túlterheléshez vezet. A lerakódott mikroműanyagok képesek sejtes, oxidatív stresszt okozni, ezzel elősegítve az oxigén gyökök képzését. Emellett lehetővé teszi, hogy a beáramló intracelluláris Ca^{2+} makrofágok a membránsatornákon keresztül átírják a legfontosabb tartalmú géneket, például az α -tumornekrózist, majd előidézik a sejtek károsodását. A későbbi tanulmányokban kimutatták, hogy az alveoláris makrofágok is képesek bizonyos helyzetben hidrofób részecskékként viselkedni. Ilyen példa, amikor polisztirol van jelen a szervezetben, majd a mikroműanyag részecskék a tüdő hámjaiba behatolnak és az alveoláris makrofágokon át a nyirokkeringés legfontosabb részeibe tárolódnak, illetve a vér távoli nyirokcsomóiba is elszállítódik és felhalmozódik (Naegelen, 2019).

Az elmúlt évben több cikk is napvilágot látott, amely tárgyalja, hogy a csecsemők vérében, székletében illetve a méhlepényben is feldúsulhatnak a mikroműanyagok. A New York-i Egyetem vizsgálta, hogy a csecsemők széklete tízszer annyi PET-részecskét tartalmazott, mint a felnőtteké. Valószínűsíthető, hogy a különböző műanyag edények, cumisüvegek, cumik okozzák a feldúsulást. A publikációban írnak arról, miszerint négy egészséges méhlepényben, mind a magzati és anyai oldalán is kimutatták a mikroműanyagokat. A kutatók szerint a méhlepényben lévő részecskéket az anya lélegezte be vagy fogyasztotta el, méretük nagyjából 10 µm, így az könnyen a csecsemők véráramába is bekerülhetett. Ahhoz, hogy megismerjük ezek negatív élettani hatásait, kockázatukat, illetve lehetnek-e mérgező, egészséget károsító hatásúak, több vizsgálatot, kutatást is szükséges a jövőben elvégezni (Ragusa et al., 2020).

Manapság igen nagy figyelmet kap a mikroműanyag, többek között a korábban felsorolt kutatások állításai miatt. Ebből következik, hogy egyre több tanulmány készül a témában,

azonban a mikroműanyagok vizsgálatára jelenleg nincs egységesített módszer, így ezek összehasonlítása nehezen megvalósítható. Külön módszert alkalmaznak felszíni víz, talaj, illetve szennyvízminta esetén. A tanulmányok hatására egyre több határérték születik a mikroműanyagokra, különösen az élelmiszeriparban (Stöven et al, 2015).

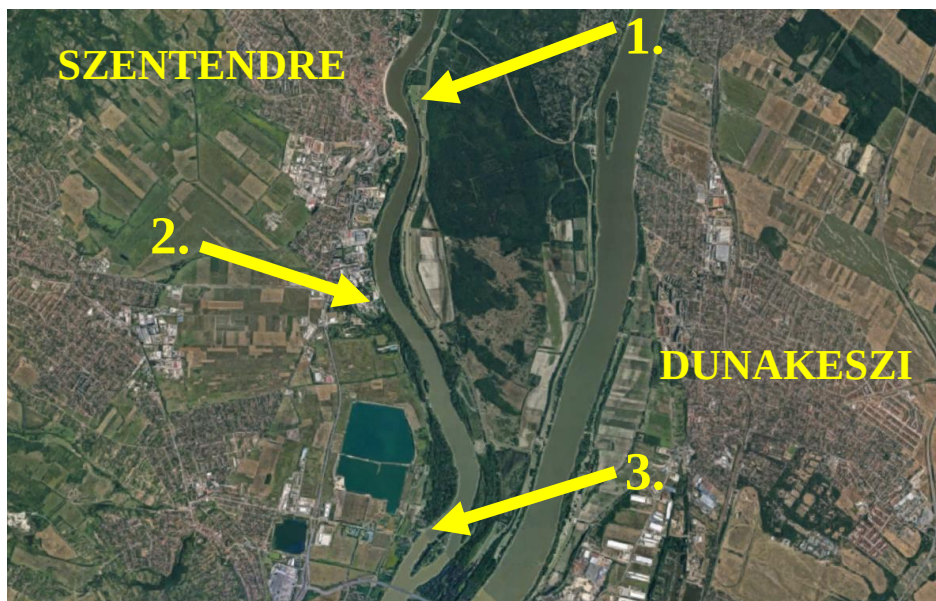
2.4.4 Mikroműanyag, mint biológiai vektor

Korábban már említettem, miszerint a műanyagok felületén egyfajta élettér alakulhat ki. Plasztiszférának nevezzük az olyan ökoszisztémákat, amelyet műanyagok alkotnak, továbbá az életteret, amely a műanyag felületén alakul ki. (Sahagun et al, 2013). A mikroműanyag részecskék nagy fajlagos felületüknek köszönhetően könnyen adszorbeálják az egyes anyagokat, sőt a részecskék képesek a különböző baktériumokat és vírusokat is szállítani. Ezt a műanyagok felületén kialakuló biofilm teszi lehetővé. A biofilm mikroorganizmusok összetapadását jelenti egy élő vagy élettelen felületen, amely egy többretegű nyálkás lerakódás formájában jelenik meg. Egy kocsonyás bevonat tartja össze őket, amely a fajok saját anyagcsere-termékeiből (az extracelluláris polimerekből) és vízből állnak. Ezáltal sokkal könnyebben kommunikálnak egymással a mikroorganizmusok, sokkal ellenállóbbak – perzisztensek - a különböző körülményekkel szemben, illetve nagyobb eséllyel alakulhat ki az antibiotikum rezisztencia is. Szerves, illetve szervesetlen anyagok is lerakódhatnak, a réteg pedig folyamatosan növekszik (Bíró et al, 2017). A kockázatuk abban rejlik, hogy a kialakult biofilm olyan baktériumokból is állhat, melyek negatív hatással vannak az élőszervezetre nézve. További aggodalomra ad okot, hogy a mikroműanyag részecskék hosszú ideig képesek lebegni, így megvan a lehetősége annak, hogy a biofilmet képző mikroorganizmusok nagyobb távot is megtegyenek (Primpke et al. 2017), ami további környezetegészségügyi problémákhoz járulhat hozzá. Dolgozatomban ez utóbbi indirekt hatás vizsgálatát tűztem ki célul.

3 Anyag és módszer

3.1 A mintavételi helyszín

A választott helyszín a Szentendrei sziget. Három mintavételi pontot választottam a szennyvíz hatása alatt álló felszíni víz vizsgálata céljából. A mintázás elve, hogy legyen egy mintavételi pont a szennyvíztisztító kifolyójában, a szennyvíztisztító kifolyója előtt, a Dunában, illetve szintén itt, a szennyvíztisztító kifolyója után. A mintavételezés, illetve az általunk alkalmazott a műanyag mintatartók (ún. plastic colonizer) kihelyezése az alábbi helyszíneken történt:



1. kép A Szentendrei sziget műholdas térképe, a mintavételezés helyszínei (Google Maps)

Az első helyszín a szennyvíztisztító telep kifolyója előtt van (térképen 1.) a Szentendrei sziget partján egy kompikötő úszó platformján. A második helyszín a szennyvíztisztító telep kifolyója, amely Szentendre település déli határánál helyezkedik el (térképen 2.) A harmadik helyszín a szennyvíztisztító telep kifolyója után, a Lupa-sziget közelében volt, szintén egy úszó platformon (térképen 3.)

3.2 Szentendrei szennyvíztisztító telep

A Szentendrei szennyvíztisztító telep jelenleg a DMRV Zrt. tulajdonát képezi. Hidraulikai kapacitása $950,4 \text{ m}^3/\text{nap}$, biológiai terhelése 10.119 LE. A szennyvíz-agglomerációhoz jelenleg a következő települések tartoznak: Szentendre, Leányfalu, Pomáz, Csobánka, Dunabogdány, Tahitótfalú, Pócsmegyer, Visegrád-Szentgyörgypuszt, Kisoroszi és Szigetmonostor. A szennyvíztisztító felépítésében az első szakasz egy fizikai, mechanikai tisztítófázis, mely a rácsok segítségével távolítja el a nagyobb, illetve szálal darabokat. A rácsokat homokfogó, olaj- és zsírfogó követi, majd egy előülepítő. Ezt követően egy automatikusan szabályozott

zsilipoltólózár biztosítja a következő szakasz egyenletes terhelést. A fizikai fázis követően következik a biológiai tisztítást, mely során egy aerob eleveniszapos medence kezdi az ammónia, illetve a szervesanyagok lebontását, illetve a denitrifikációt. Kiegészítőként foszforeltávolításhoz vegyszereket alkalmaznak, majd a biológiailag tisztított szennyvíz fázis-elválasztása kezdődik. A tisztítási folyamatokból kikerült fölösiszap gravitációs sűrítésre kerül, ezt követően pedig víztelenítésre, majd iszapkezelésre szállítják. A mintatartót a kezelt szennyvíz, tehát valamennyi tisztítási folyamaton átment szennyvíz élővízbe (Duna) való bevezetése előtt, a kifolyóba helyeztem (1. mellékelt kép) (http13).

3.3 Plastic colonizer módszer

A plastic colonizer egy, a konzulensem és a tanszék által tervezett felszíni vizek plasztiszférikus közösségeinek mintázására alkalmas műanyag mintatartó és vizsgáló módszer (Szabó et al. 2021). Összeállításához kereskedelembe kapható rozsdamentes acél anyagú és gömb alakú (Easy Filter 6,5x6 cm) teaszűrőket használat előtt, alufóliába csomagolva steriliztem autoklávban, 121 °C-on 15 percig. Sterilizés után mindegyik szűrőbe 3 g biológiailag bontható politejsav (PLA) szivószálat vágtam, 5 mm-nél kisebb darabokra (2. mellékelt kép). A felszíni vízbe helyszínenként két-két plastic colonizer, továbbá a szennyvíztisztító kifolyójába egy plastic colonizer került kihelyezésre. A mintatartót horgászszinórral, a vízfelszín alá (körülbelül 30 cm mélységbe) rögzítettem. Ahhoz, hogy biztosan a víz felszíne alatt maradjanak a mintavételi eszközök, azokat ólomsúlyokkal a fenékhez rögzítettem.

3.4 Kísérlet kivitelezése

A cél a három mintavételi helyszínen a közeg (tisztított szennyvíz, Duna) mikrobiológiai mintázása, illetve a mikroműanyag mintatartó begyűjtése volt. A kutatás 2022-ben vette kezdetét. A mintázás helyszíneit, annak időpontjait a 4. táblázat mutatja be.

	1. Felső pont (szvt. előtt)	2. Kifolyó (tisztított szennyvíz)	3. Alsó pont (szvt. után)
Kihelyezés	2022.11.04.	2022.12.22.	2022.11.11.
Begyűjtés 1. hónapot követően	2022.12.12.	2023.01.24.	nem sikerült
Begyűjtés 2. hónapot követően	2023.01.24	-	nem sikerült

4. táblázat: Mintatartók kihelyezése, illetve begyűjtése az egyes mintavételi pontokon

2022. november 4-én került kihelyezésre a szennyvíztisztító telep kifolyója előtti mintavételi pont (továbbiakban: felső pont). 2022. november 11.-én helyeztem ki a szennyvíztisztító telep kifolyója utáni mintatartót (továbbiakban: alsó pont). Az szennyvíztisztító telep kifolyójában a mintavevő kihelyezésére ekkor még nem kaptam engedélyt, így erre később került sor. A kifolyóba végül 2022. december 22.-én helyeztem ki a plastic colonizert. Terveim szerint a három mintatartó kihelyezése egy időpontban történt volna, azonban az előbb felsorolt körülmények miatt ez nem volt lehetséges. A plastic colonizerek a felső, illetve az alsó pont esetében kb. 2 hónapig voltak kint a helyszínen. Az első visszagyűjtés 2022. december 12.-én történt, 1 hónappal a kihelyezés után, ahol a felső pontot sikerült visszagyűjteni, azonban az alsó ponton a mintatartó ismeretlen okból eltűnt. Ezzel egyidőben ide újabb mintatartót helyeztem ki. A második visszagyűjtés (2023. január 24.) során a szennyvíztisztító telep kifolyóját gyűjtöttem be 1 hónappal a kihelyezés után, illetve a kifolyó előtti ponton lévő elsővel párhuzamosan kihelyezett mintavevőt is sikerült begyűjteni két hónappal a kihelyezés után, a kihelyezést követő 2. hónapban. Sajnos az alsó pontot ebben az esetben sem sikerült visszagyűjteni a mintatartó ismét eltűnt. Minden begyűjtésnél a közegből is vettem mintát (3. mellékelt kép).

3.4.1 Baktérium izolátumok és mikrobiom meghatározás

A plastic colonizerek laborba érkezése után az első lépés a műanyagdarabok steril vizes lemosása volt, a szemcsék és a nem biofilm eredetű élő szervezetek eltávolítása miatt. A lemosott mikroműanyagokat egy Erlenmeyer-lombikba tettem, majd steril, bidesztillált vizet töltöttem rá (100 ml) és szintén steril rázógyöngyöket tettem hozzá, ez segítette a műanyagdarabok felületén megkötött baktérium közösség leválasztását. Annak érdekében, hogy a mikroműanyagok felületéről a bidesztillált vízbe kerüljenek az adszorbeált baktériumok, körülbelül fél órán át volt szükséges rázatni a mikroműanyagot tartalmazó lombikokat 120 RPM-en, szobahőmérsékleten. Ezt a műveletet a baktériumok izolálása követte.

3.4.1.1 Baktérium izolálás

A steril körülmények megőrzése érdekében ezeket a lépéseket lamináris box alatt végeztem. A ráztatás végén keletkezett, valamint a vízminta vételezésből származó vizsgálandó oldatot határhígításos módszerrel hígítottam. Erre azért van szükség, mert a vízben és a mikroplasztik felületén nagy számú baktérium képes megtelepedni és a hígításokkal csökkentjük az 1 cm³-ben lévő baktériumok számát, a megszámlálhatóság és az elkülöníthetőség (izolálás) érdekében. A módszer alapja, hogy az Erlenmeyer-lombikban lévő folyadék 10⁰-on, azaz a

kiindulási hígítású alapoldat. Ebből kiindulva minden újabb hígításnál tizedannyi lett az alapoldat mennyisége: A kémcsövek 9 cm^3 bidesztillált vizet tartalmaznak, így, ha belekerül az 1 cm^3 minta az előző hígításból, akkor pontosan tizedannyi alapoldatot tartalmaz, mint az előző hígítás. A hígítási sort tehát a lombikkal kezdtem, a pipetta segítségével, ekkor pontosan 10 cm^3 folyadékot szívtam fel, mert a 10^{-1} hígítást 100 cm^3 -re, egy újabb Erlenmeyer-lombikba végeztem. A sort 1 cm^3 továbbpipettázásával folytattam a kémcsövekbe, egészen 10^{-7} hígításig. A hígítás sterilizett hegyű automata pipettával történt. Ezt követően lemezt öntöttem minden egyes hígításból 10^{-1} -től 10^{-7} -ig: Lemezöntésnél 1 cm^3 tettem a steril, feliratozott petri-csészébe, majd kézmelegen hozzáöntöttem a kiválasztott táptalajból.

Kísérletemben kétféle táptalajt alkalmaztam: LB, illetve az R2A. Az R2A táptalaj készítéséhez analitikai mérlegen mértem ki $0,5\text{ g}$ proteóz peptont, $0,5\text{ g}$ élesztő kivonatot, $0,5\text{ g}$ casamino savat, $0,5\text{ g}$ glükózt, $0,5\text{ g}$ oldható keményítőt, $0,3\text{ g}$ Na-piruvátot, $0,3\text{ g}$ dikálium-foszfátot, $0,05\text{ g}$ magnézium-szulfátot és végül 15 g agart. Az LB táptalaj esetében a következőket mértem ki: 10 g pepton, 5 g élesztőkivonat, 10 g nátrium-klorid. Mindkét esetben mértem mérőhengerrel 1000 cm^3 desztillált vizet, majd ezeket az anyagokat egy nagy lombikba téve üvegbot segítségével összekevertem és mikrohullámú sütőben a szilárd anyagok teljes feloldódásáig melegítettem. A kész táptalajt kisebb lombikokban tároltam és steriliztem. A sterilizálás automata autoklávban, $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ $1,2$ atmoszféra nyomáson, 20 percen át történik. Használat előtt, az elkészült agaros táptalajt újra kell melegíteni. Ha az agaros táptalaj megfelelő hőmérsékletű (kézmeleg) kezdődhet a lemezöntés a petri-csészébe. Éppen annyit kell hozzáönteni a már kimért hígításokhoz, hogy a petri-csésze alját ellepje, majd a homogenizálás érdekében kissé elkeverni. A petri-csésze tetejét rárakva hagytam megszilárdulni, amint ez bekövetkezett, fejjel lefelé az inkubációs szekrénybe tettem. Azért szükséges fejjel lefelé fordítani, mert így a csészében keletkező pára nem csapódik ki az üveg tetejére.

Az inkubálás $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 48 óráig történt. 48 óra elteltével megjelentek a táptalajon a baktérium telepek (4. mellékelt kép), amelyeket leszámoltam. Az első hígításnál (10^{-1}) a negyedelést alkalmaztam, azaz a csészét négy felé osztottam és egy negyed megszámlálása után az arányosságot feltételezve megszoroztam négygel. A 10^{-1} hígításnál jellemzően túlzottan egymásra nőttek a telepek, ezért leggyakrabban a 10^{-2} és a 10^{-3} hígításból oltottam tovább a kiválasztott (izolált) baktérium telepeket, legtöbb esetben 10^{-5} -nél tovább nem is nőtt ki baktérium a táptalajokon. Az identifikálni kívánt telepet úgy választottam ki, hogy a többitől morfológiaiilag – színben vagy alakban – eltérő, jól elkülöníthető legyen.

Amennyiben kiválasztottam a meghatározni kívánt baktériumokat, a nagyobb tisztaság érdekében szélesztettem őket a baktérium telepnek megfelelő tátalajt tartalmazó Petri-csészékbe (azt a táptalajt alkalmaztam, amelyen kinőttek korábban a telepek). A szélesztés oltókaccsal történt, a klasszikus biológiai módszerek szabályai szerint, sterilen. Az átoltást követően újabb, 28 °C-os inkubálásra került sor. 24 óra elteltével a baktérium telepek jellemzően ismét kinőttek (5. mellékelt kép. Amennyiben a telepeket tisztának ('egyfajúnak') láttam, akkor kezdődött a molekuláris identifikálás.

3.4.1.2 Identifikálás

Az identifikálás első lépése a DNS kinyerése, melyet a Zymo Quick DNA Miniprep Plus Kit alkalmazásával végeztem el. 0,5 ml-es centrifugacsőbe (ependorf tube) 200 µl DNA Elution Buffert pipettáztam, majd a néhány napos baktériumtörzset oltókacs segítségével beletettem, majd vortex-el homogenizáltam. Amennyiben a folyadék már teljesen homogén volt, hozzáadtam a 200 µl Red buffert és a -20 °C-on tárolt Proteinase K-t. A Proteinase K egy széles körben alkalmazott nukleinsavkészítmény fehérjék emésztésére, amely eléri a kívánt hatást, anélkül, hogy az izolálni kívánt DNS integritását veszélyeztetné. Újabb 10-15 másodperces vortex után 10 percig 55 °C -on inkubáltam. Az inkubálást követően hozzáadtam az eddig keletkezett oldattal megegyező mennyiségű (420 µl) Genomic Binding Buffer-t. Újabb homogenizálás után az oldatot átpipettáztam az úgynevezett Zymo-Spin oszlopba, amelynek lényege, hogy ezen a szűrőn a DNS megfelelő kezelés mellett képes megtapadni, de az egyéb, identifikáláshoz szükségtelen anyagokat kimossa, így egy gyűjtőcsőbe összegyűlik. Ha megtörtént a pipetázás 12000-es RPM-en 1 percig centrifugáltam, majd a gyűjtőcsövet eldobva egy új gyűjtőcső alkalmazásával rámértem pipettával 400 µl DNA Pre-Wash Buffert, majd ismét ugyanazon a fordulatszámon 1 percig lecentrifugáltam. A gyűjtőcsövet ebben az esetben kiürítettem, majd 700 µl DNA Wash Buffert pipetázunk rá a szűrőre és szintén 12000-es RPM-en újabb 1 percig centrifugáltam. Újabb DNA Wash Buffert pipetáztam, jelen esetben 200 µl-ert, majd szintén centrifugálás következett. A következő lépés a gyűjtőcső eldobása után a szűrőn kinyert, fennmaradt DNS leoldása, melyhez egy centrifugacsövet tettem a szűrő alá és rámértem közvetlenül a szűrőre, a szűrő megsértése nélkül 50 µl DNA Elution Buffert. Ahhoz, hogy a leoldás bekövetkezzon 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytam, majd maximum sebességen, 13500-as RPM-en 1 percig centrifugáltam. Ekkor a DNS a centrifugacsőbe került. Amennyiben minden lépés sikeres volt, megfelelő DNS-t kaptam, amelynek a jelenlétét gélelektroforézissel ellenőriztem.

A gélelektroforézist az identifikálás során többször is alkalmaztam, hogy ellenőrizzük a DNS jelenlétét és minőségét. Először is szükségem volt gélre a futtatáshoz, melyet az alábbi módon készítettem el: 70 ml SB bufferbe analitikai mérlegen mért 0,7 g agarózt mértem, ezt mikróztam 1+0,5 percig, majd amikor már nem forrt hozzáadtam pipettával 3,5 µl Eco Safe oldatot, amely majd megfesti a DNS-t. A gél egy tankba öntöttem, ami a fésűk behelyezésével 30 perc elteltével megszilárdul, a fésűt kivéve pedig megkaptam a zsebeket. Ezután kezdődhetett a zsebek feltöltése. Az ellenőrizni kívánt oldatból 4 µl-t pipettáztam, majd 1 µl DNA loading dye-al megfestettem, hogy látható legyen az izolált DNS. Az első zsebbe 3 µl GeneRulert pipettáztam, ez az úgynevezett létra, amely minden esetben pozitív eredményt mutat, ehhez lehet hasonlítani a saját DNS-ünk hosszúságát. Végül egyenárammal megfuttattam a betöltött gél, 100 volton körülbelül 40 percig. Az idő elteltével az UV fény alá betéve látható, hogy sikerült-e a töltéssel rendelkező DNS kinyerése, illetve a szín erőssége alapján megállapítható, hogy ez milyen minőségű (6. mellékelt kép).

Amennyiben sikeres volt a DNS kinyerése, következett a 16S rDNS PCR összeállítása. Ehhez szükség van PCR mastermix-re. Először 32,95 µl MQ vizet mértem ki, majd bele pipettáztam az alábbi anyagokat: 5 µl Taq buffer, 0,5 µl 8f forward primer, 0,5 µl 1492r reverse primer, 10 µl dNTP, 0,25 µl Taq polimerase és végül 0,8 µl DNS templát, így a végén 50 µl termékem lett. Nem egyesével mértem ki a PCR csövekbe az anyagokat, hanem kiszámoltam, mennyire van szükség, az alapján, hogy mennyi baktériumot kívánunk identifikálni. Ezt centrifugacsőbe mértem ki, majd vortex és lepörgetés után pedig pipettával adagoltam a PCR csövekbe, ezt követően pedig egyesével hozzáadtam a 8 µl DNS templátot. A Taq polimerase egy hőstabil DNS-polimeráz, amely képes ellenállni a hőciklushoz szükséges magas hőmérsékletnek is, a primerek (8f és 1492r) alkalmazásával pedig az amplifikáció szükséges szakasza határozható meg. Esetünkben a kb. 1500 bázispár hosszú 16S szakaszra van szükség, ezért alkalmazzuk ezeket a primereket. Ezt a folyamatot egy másfél órás PCR program követte, melynek lényege hogy először 94-95°C-ra hevíti a DNS-t, hogy hidrogénkötések felbomoljanak, így a kettős szálak szétválnak. Ezt nevezik denaturálásnak. A DNS szálak szétválása után a hőmérséklet csökken, így a primerek hozzá tudnak csatlakozni a DNS szálakhoz, azaz megtörténik a kapcsolódás. Az utolsó lépés a meghosszabbítás, melynek lényege, hogy a DNS-polimeráz végigmegy a DNS-szálon, ahol lemásolja a bázispárokat, létrehozva ezzel a hiányzó szálakat. Ez a folyamat esetünkben 32-szer ismétlődik, így a végére több milliószoros kópiaszámban készül el az identifikáció szempontjából lényeges 1500 bázispár hosszúságú riboszomális DNS szakasz. A hőmérséklet az 5. táblázatban lévő módon változik:

Hőmérséklet	Időtartam	} 32 x
95 °C	3 min	
94 °C	30 sec	
52 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

5. táblázat: A PCR módszerhez alkalmazott hőprofil

Amennyiben befejeződött a program, újabb gélelektroforézissel ellenőriztem a DNS minőségét, majd következett a PCR tisztítás, amelyet a NucleoSpin Extract II. DNS Clean-up Kit-el végeztem. A kit segítségével a terméket megtisztítom a különböző enzimektől, így tiszta PCR terméket kapok. A korábbihoz hasonló, szűrővel ellátott centrifugacsövet alkalmaztam. A PCR termékből 25 µl-t kimértem, és hozzáadtam dupla mennyiségű NT(I) buffert, majd centrifugáltam 30 másodpercig, 11000-es RPM-en. Ezt követően a gyűjtőcsövet kiöntöttem, majd hozzáadtam pipettával 650 µl NT3 buffert és szintén lecentrifugáltam 11000-es RPM-en fél percig. Kiöntöttem a benne lévő anyagot, majd újabb 1 percig centrifugáltam. Egy tiszta centrifugacsövet tettem a szűrős cső alá, és figyelve arra hogy a szűrőre rá, de a megsértése nélkül, pipettáztam 30 µl NE buffert. 5 percig szobahőmérsékleten pihentettem, majd 1 percig, 11000-es RPM-en centrifugáltam. Ekkor a DNS a szűrőről leoldódva a centrifugacsőben volt megfigyelhető. Ismét gélelektroforézissel ellenőriztem a munkálatokat, a DNS minőségét és a lánc hosszúságát.

Amennyiben megfelelő volt az újabb gélelektroforézissel ellenőrzött DNS, akkor a következő lépés a szekvenáló PCR összeállítása volt, mely ugyancsak egy mastermix készítésével kezdődik. Egy 0,5 ml-es centrifugacsőbe először kimértem azokat az anyagokat, amelyek minden esetben ugyanazok és szorzással kiszámoltam az összes meghatározni kívánt baktériumfajra szükséges mennyiséget. Egy egységre a következőképp alakulnak a mennyiségek: 3,5 µl MQ víz, 1 µl BigDye 1,5 µl BigDye buffer, 0,5 µl forward elsődleges (esetünkben 8f) azért hogy a baktérium fajspecifikus DNS szakaszát (16S) amplifikálni tudjam PCR-rel, majd vortex és lepörgetés után utoljára hozzáadtam egyesével a 3,5 µl tisztított DNS templátot. A korábban már alkalmazott hőmérsékletszabályozó PCR készülékkel dolgoztam, körülbelül 2 órás programban, melynek hőprofilját az 6. táblázat mutatja be.

Hőmérséklet	Időtartam
96 °C	1 min
96 °C	10 sec
51 °C	5 sec
60 °C	4 min
4 °C	∞

} 28 x

6. táblázat: Hőprofil (tisztított PCR)

A szekvenálás előtti utolsó lépés az alkoholos kicsapás, amelyre azért van szükség, hogy tiszta PCR terméket kapjunk. Először egy acetát mixet állítottam össze a következő anyagokból úgy, hogy minden szekvenálni kívánt baktérium mennyiségére számoltam. Egy templát esetén az alábbi mennyiségre volt szükségem: 14,5 µl MQ víz, 62,5 µl 95%-os etanol oldat és 2 µl 3 mólos nátrium acetát. A keveréket vortexeltem, hogy megfelelő elegyet kapjak, majd lepörgettem annak érdekében, hogy a PCR cső aljára kerüljön az acetát mix. Ezt követően egyesével pipettáztam a szekvenáló PCR termékhez. 5 percig szobahőmérsékleten pihentettem, majd nagy teljesítményű, állítható hőmérsékletű centrifugával dolgoztam és először 3220 g 30 percig 4 °C-on centrifugáltam. A PCR csöveket kiürítettem és újra rámértem pipettával 180 µl 70%-os etanol oldatot. Szintén 3220 g és 4 °C beállításával, ezúttal 20 percig centrifugáltam, majd minden nedvességet kiürítettem belőle. Ahhoz, hogy minden nedvesség távozzon, inkubáltam 50 °C-on körülbelül 10 percig, illetve amennyiben szükséges tovább is. Végző lépésként pedig 20 µl Hi-Di formamide-ot pipettáztam minden PCR csőbe a termékhez.

A szekvenálást az Eurofins BIOMI Kft. végezte. A módszer elméleti háttere, hogy a szekvenálási reakció tartalmaz fluoreszcens festékkel jelölt nukleotidokat. A reakció során különböző hosszúságú láncok keletkeznek, amelyeknek - a fluoreszcens festéknek köszönhetően - a végén lévő bázispárjai jelölve lesznek. A DNS lánc végére beépülő nukleotid az öt jellemző hullámhosszon fog fluoreszkálni, amely bázispáronként eltérő, ebből következik, hogy ismertté válik számunkra, hogy az adott lánc milyen bázispárra végződik. Az eltérő hosszúságú egyszálú DNS-láncot leolvassa a szekvenáló készülék, az alapján, hogy milyen fluoreszcens jelet adnak. Minden jel egy bázissal hosszabb szálról érkezik, így a leolvasott nukleotid sorrend megegyezik a DNS szekvenciájával is (Sanger módszer). A szekvenciákat a feldolgozáshoz a MEGA-7 számítógépes szoftverbe illesztve „fasta” formátumban kaptuk meg a 16S rDNS szakasz bázisainak sorrendjét, amely az adott baktériumfajra specifikus. A kisserkesztett, jó minőségű 16S rDNS szakaszt az interneten elérhető EzBioCloud oldalra feltöltve megkaphatjuk az izolátumhoz tartozó legközelebbi baktériumfajt. Amennyiben az egyezés 98% feletti, akkor az izolált baktériumot az adatbázisban szereplő fajjal azonosnak tekintjük.

3.4.1.3 Törzstárolás

A fent leírt molekuláris módszerekkel együtt minden izolált törzs esetében a 24/48 órás baktériumtörzsekből hosszú távú tárolása érdekében választottam le, -80 °C-os tárolásra. Ez azért fontos, hogy esetleges hibánál, illetve valamilyen szempontból érdekes baktériumfaj esetén újra el tudjam végezni az identifikálás folyamatát, illetve később is fel tudjam használni őket, pl. teljes genom meghatározáshoz. A módszerhez 30%-os glicerol oldat szükséges, melyet 35 ml 85%-os glicerolból és 65 ml desztillált vízből készítettem el. 1 ml-es kriogéncsőbe 700 µl 30%-os elkészített glicerol oldatot pipettáztam, majd oltókacs segítségével a petri-csészében lévő baktérium telepet beletettem. Vortex-el homogenizáltam, majd a -80 °C-os hűtőbe raktam, így ha szükséges több hónapig is megőrzi a benne lévő DNS-t.

3.4.2 Közösségi mikrobiom elemzés 16S rDNS amplikon szekvenálással

A minták laborba érkezését követően a koncentráltabb minta érdekében szűrésre volt szükség. A mikroműanyag minta esetében szükség volt a műanyag minta áthelyezésére egy steril, bidesztillált vízzel töltött (100 ml) Erlenmeyer lombikba, illetve szintén steril rázógyöngyöket tettem hozzá. A lombikot pedig 30 percen keresztül rázattam, hogy a műanyagdarabok felületén lévő baktérium telepek leválasztódjanak. A szűrés egy Millipore szűrőn keresztül történt (7. mellékelt kép) 0,22 mikrométeres MCE membránon keresztül. Lényege, hogy egy kisebb szivattyú segítségével átszivattyúzza a vizet, így a szűrőpapíron fennmarad a meghatározni kívánt mikroorganizmus közösség.

3.4.2.1 A baktériálisközösség izolálása

A laboratóriumi munka elősejttel foglalkozó részét ismét steril környezetben végeztem, ez pedig lamináris boksztal alatt valósult meg. Mivel ebben az esetben szilárd darabokkal dolgoztam (szűrőpapír), ezért a DNS izolálásához a DNeasy Power SoilP Pro Kit-et használtam. Első lépésben a szűrőpapírt apró darabokra vágtam, majd a powerbead pro centrifugacsőbe helyeztem és rámértem 800 µl Solution CD1 oldatot. A centrifugacsőben apró, steril részecskék vannak, így összekeverés, vortex után a szűrőpapíron lévő meghatározni kívánt DNS a centrifuga csőbe kerül. Ekkor 10 percen keresztül, maximum sebességen vortexeltem. Ezt követően centrifugáltam a mintát tartalmazó centrifugacsöveket maximum rpm-en egy percen keresztül. A felülúszót egy steril centrifugacsőbe pipettáztam át, amely 500-600 µl mennyiségű volt ekkor. Hozzáadtam 200 µl Solution CD2-t, majd rövid vortex után újra centrifugáltam maximum sebességen, egy percig. Hozzáadtam 650 µl Solution CD3-t, majd a kapott elegyből

650 µl-t MB centrifugacsőbe pipettáztam és centrifugáltam újabb egy percre. Hozzáadtam 500 µl Solution EA-t, majd újabb 1 percre centrifugáltam maximum sebességen, majd a gyűjtőcsövet kiürítettem. Ismét pipettáztam Solution C5-öt, majd újabb centrifugálás után a gyűjtőcsövet kiürítettem. Ezt a lépést megismételtem két perces centrifugálással is annak érdekében, hogy kizárólag a DNS maradjon fent a szűrőn. 50 µl Solution C6-ot pipettáztam hozzá a DNS leoldása érdekében egy új, steril centrifugacsőbe helyeztem az MB centrifugacsövet, majd utoljára egy percre keresztül centrifugáltam és megkaptam a leoldott DNS templátot. A DNS jelenlétét a korábban leírt módszerrel, gélelektroforézissel ellenőriztem. Amennyiben megfelelő eredményt kaptam, következhetett az amplikon szekvenálás.

3.4.2.2 Amplikon szekvenálás

Az amplikon szekvenálás az új-generációs szekvenálási módszerrel történt. Az új-generációs szekvenálás lényege, hogy az előzetesen előkészített DNS-szakasz szeparált klonális amplifikációt követően paralell szekvenáljuk, így a hatalmas mennyiségű adathoz jutunk, melyeket analizálva a DNS nukleotidsav-sorrendjéről kaphatunk információt, viszonylag rövid idő alatt. Az új-generációs szekvenálás során az elérhető DNS szakaszok közül a fajsztűű identifikálás során szintén szekvenált 16S rDNS szakasz alapján határoztuk meg a közösség alkotó mikroszervezeteket.

Az első lépés a DNS-fragmentáció, mely során több bázispár hosszúságúra tördelik a DNS-szakaszt, melyet mechanikai erővel, illetve enzimatis emésztéssel segítik elő. Ezt követően a fragmentumokból génkönyvtárat hozunk létre, mely során eltérő nukleinsavsorrenddel rendelkező fragmentumokra PCR-rel univerzális adaptereket kapcsolunk, így a reakcióban primerként funkcionálnak. A DNS fragmentumokat sokszorosítani kell, hogy a fluoreszcenciajelek a DNS mennyiségének növekedésével láthatóvá váljanak. A sokszorosítás minden esetben szeparáltan kell történjen, mely a DNS- templátok immobilizálásával megy végbe. Az amplifikációt követően megfelelő mennyiségű templátklaszter jön létre, melynek DNS-végein lehetővé válik az univerzális szekvenáló primer kapcsolódása, a szekvenálási reakció elindulása. Ezt követően a szekvenálás célja a DNS szakasz nukleotidsorrendjének leolvasása, mely a fényemisszió segítségével detektálható (Babay et al, 2015).

A szekvenálást az Eurofins BIOMI Kft. végezte. A szekvenálás eredményeit megkapva feldolgoztam őket a krona program segítségével.

4 Eredmények bemutatása, értékelése

4.1 Az izolált baktériumtörzsel 16S rDNS szekvenálásának eredménye

A 7. táblázatban a 16S RDNS szekvenálás eredményeit mutatom be PRV jelölést kaptak a felső pontról származó felszíni vízből (Dunából) vett minták, illetve PRP jelölést pedig ugyaninnen, a felszíni vízbe plastic colonizerben kihelyezett mikroműanyag minták kapták az. AZ SZSZV jelölés a szennyvíztisztító telep kifolyójának vízmintáját jelöli, illetve a SZEP jelölést pedig a szennyvíztisztító telep kifolyójába a mikroplasztik mintavevőben kihelyezett mikroműanyag kapta. A kötőjel utáni első szám a visszagyűjtések számát jelöli, illetve az utolsó szám pedig az izolátumok sorszámát adja meg. Ezen felül a táblázatban azokat az adatbázisban szereplő baktérium fajok neveit tüntettem fel, amely a legnagyobb egyezőséget mutatta az általam feltöltött szekvenciák és az adatbázisban szereplő szekvenciák között. Továbbá a táblázatban szerepel, hogy melyik típusú táptalajon sikerült kitenyészteni az adott fajt.

Minta jele	Baktérium faj neve	Egyezés (%)	Minta	Táptalaj
PRP-12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99.63	Műanyag	R2A
PRP-13	<i>MRY13-0052 Pseudomonas sp.</i>	100.00	Műanyag	R2A
PRP-14	<i>Acidovorax defluvii</i>	100.00	Műanyag	R2A
PRP-22	<i>Bacillus sonorensis</i>	100.00	Műanyag	LB
PRP-23	<i>Flavobacterium pectinovorum</i>	100.00	Műanyag	R2A
PRV-21	<i>Bacillus tequilensis</i>	100.00	Víz	R2A
SZEP-21	<i>Bacillus atrophaeus</i>	100.00	Műanyag	LB
SZEP-22	<i>Pseudomonas synxantha</i>	100.00	Műanyag	LB
SZEP-23	<i>Raoultella terrigena</i>	100.00	Műanyag	R2A
SZSZV-21	<i>Comamonas terrigena</i>	100.00	Víz	LB
SZSZV-22	<i>Aeromonas media</i>	100.00	Víz	R2A

7. táblázat: 16S rDNS szekvenálás eredménye

4.2 16S rDNS szekvenciák eredményeinek kiértékelése

Az eredményeim kiértékelése során szakirodalmi kutatást végeztem az azonosított fajok esetében. A célom ezzel az esetleges humán (fakultatív) patogének felkutatása, illetve egy rövid, informatív összefoglaló készítése, mely során ismertetem, hogy milyen baktériumfajokat sikerült azonosítani a mikroműanyagok felületéről, illetve a hordozó közegből. A leírásom minden esetben arra a fajra vonatkozik, amelyként az izolált törzset azonosítottam. A leírásban szereplő tulajdonságok nem biztos, hogy a törzsre is jellemzőek, de valószínűek.

Klebsiella pneumoniae:

A normál bélflóra tagja, azonban opportunistá patogén. Abban az esetben okozhat megbetegedést, ha a bélflórából elvándorol egy másik helyre, ahol patogenitást mutat. Ha bejut a tüdőbe, tüdőgyulladást okozhat, de feljegyezték már húgyúti fertőzés okozójaként is. Hasonló tüneteket produkál, mint a *Streptococcus pneumoniae*, ide tartozik a láz, nehézlégzés, mellkasi fájdalom. Legyengült immunrendszer esetében okozhat súlyos problémákat is. A betegség antibiotikummal kezelhető, azonban rendelkezik természetes, illetve szerzett antibiotikum rezisztenciával is. Gyakran mutat rezisztenciát ampicillinre, penicillinre, gentamicinre (Paczosa et al., 2016).

MRY13-0052 Pseudomonas sp.:

A *Pseudomonas* nemzetség tagjaként tartják számon. A szekvenciát sikerült beazonosítani az EZBioCloud adatbázisa alapján, ahol 100%-os egyezőséget mutatott egy olyan fajjal, amelyet még nem írtak le hivatalosan és nincs elnevezve.

Acidovorax defluvii:

Leggyakrabban vízi ökoszisztémákból, talajból, illetve növényekről izolálják. Az utóbbi években több figyelmet kapott, hiszen feltűnt növényi patogénként, illetve ritkán állatban és emberben is okozhat fertőzést. Patogenitása főként a mezőgazdaságban termelt növények betegségeiben nyilvánul meg. A baktériumot feljegyezték már lebontó képessége miatt is, hiszen a különböző aromás vegyületeket képes volt lebontani, ezen tulajdonsága miatt pedig használják biológiai lebontásoknál, illetve olajszennyezések kezelésénél is (Kim et al., 2018).

Bacillus sonorensis:

Szintén talajból, vízből és növényekről izolálták, továbbá vannak feljegyzések élelmiszerből való izolálásra is. A fajt egyre gyakrabban alkalmazzák a biotechnológiában, illetve az orvostudományban is. Termelnek olyan enzimeket, amelyek résztvesznek a fermentáció

folyamatában, ilyen például a poliszacharidokat hidrolizáló celulláz enzim, melynek termelése igen hatékony ebben az esetben. Ezen felül feljegyezték a nehézfémek fémionjai eltávolítására alkalmazott fajként is, azonban ez a terület még nincs teljesen feltérképezve (Mohapatra et al., 2005).

Flavobacterium pectinovorum:

Talajban, vízben és állati, növényi szövetekben is megtalálható. A baktérium fontos szerepet játszik a pektin lebontásában. Az általa termelt pektináz enzim hasznos az élelmiszeriparban és a mezőgazdaságban is egyaránt. Elősegíti a növények fejlődését, illetve a talaj minőségének javításában is részt vesz. Az elmúlt években több kutatás is napvilágot látott, amely a faj genomjának, illetve enzimeinek elemzésére irányul. Ezen hatásain kívül viszont kórokozói lehetnek a növényeknek, például a citrusfélékben (Kim et al., 2012, Liu et al., 2019).

Bacillus tequilensis:

Elnevezése a tequilából jön, hiszen elsőként egy tequila üzem környékén izolálták Mexikóban. Számos enzimet termel, például lipázokat, proteázokat és amilázokat is. A termelt enzimek fontos szerepet játszanak az élelmiszeriparban, hiszen tartósításra is alkalmasak. A lipáz enzim például a tejtermékek ízét és textúráját is javítja. Az amilázokat széles körben alkalmazzák a sör- és kenyérgyártásban. Ennek a fajnak antibiotikum-termelő képessége is ismert, képes teicolanint termelni, amely hatásos egyes gram-pozitív baktériumok ellen (Flores-Gallegos et al., 2015, Sanchez-Pena et al., 2021).

Bacillus atrophaeus:

Leggyakrabban vízből és talajból izolálják. Igen gyakran alkalmazzák a *Bacillus anthracis* helyettesítőjeként a laboratóriumi kutatásokban, ugyanis a patogenitáson kívül számos tulajdonságuk hasonló. Ezen kívül használják takarmánygyártásban, hiszen hőstabil enzimeket termel, illetve proteolitikus aktivitása is lehet. A faj igen ellenálló a szélsőséges környezeti hatásokkal szemben, mint például a hőmérséklet és a szárazság, ezért biotechnológiai folyamatokban is hasznos lehet alkalmazni (Zhang et al., 2017).

Pseudomonas synxantha:

Floureszcens rizoszféra baktérium. Ezt a taxonómiai nevet közzétették, azonban a Nemzetközi Baktériumnomenklatúra szabályai szerint még nincs hivatalosan leírva. *Mycobacterium* gátló hatása ismert. A *Mycobacterium tuberculosis* okozza a tuberkolózis fertőzést, mely egy globális, súlyos megbetegedés az emberre nézve (Mukherjee et al., 2014). A fajnak ismert

különböző szervesanyag lebontó hatása. Képes lebontani különböző szerves vegyületeket, például vizsgálták dinitrotoloult, illetve didecil-dimetil-ammónium-klorid biológiai lebontása esetében (Nishihara et al, 2001, Monti et al, 2005). Ezen felül készült már kutatás azzal kapcsolatban, hogy az egyik legismertebb szennyezőanyagokat, a BTEX (benzol, toluol, etilbenzol, xilol) vegyületeket más baktériumfajjal (*Pseudomonas putida*) együtt, konzorciumban tenyésztve képes biológiai úton lebontani (Shim et al, 2005).

Raoultella terrigena:

Természetes környezetben van jelen, leggyakrabban talajból, vízből izolálják. Fakultatív humán patogénként tartják számon, hiszen legyengült immunrendszer esetében sebfertőzést okozhat, azonban igen ritkán fordul elő főként magas mortalitású probléma esetén (Feizabadi et al., 2010). Ezen felül biotechnológiai alkalmazása is ismert, hiszen képes acetáttal, laktáttal metabolizmusra és a glükózt is felhasználja, mint szénforrás (Nagata et al., 2013).

Comamonas terrigena:

Szintén talajból, vízből írják le a leggyakrabban, továbbá szennyvizekből is izolálták már. Nozokomiális baktérium, képes fertőzéseket okozni kórházakban, egészségügyi intézményekben, tehát fakultatív humán patogénként is tartják számon. Húgyúti fertőzést, meningitist, endokarditist is okozhat. Továbbá rezisztenciát mutat több antibiotikumra is, például a cefalosporinokra, kinolokra (Khan et al., 2013).

Aeromonas media:

Leggyakrabban édesvízi környezetből izolálják. Képes több olyan enzimet is termelni, amely a szerves anyagok lebontásában igen hatékony. Azonban ezt a fajt egy opportunista kórokozóként tartják számon, hiszen legyengült immunrendszer esetében képes különböző betegségeket okozni, mint a sebfertőzés, tüdőgyulladás, gasztrointesztinális megbetegedés. Rezisztenciát mutathat egyes antibiotikumokra, mint a penicillin és az amoxicillin (Tsai et al, 2019).

4.3 Amplikon szekvenálás eredménye

Az amplikon szekvenálás eredményeit az alábbi táblázatok mutatják be. A közösség domináns törzsei, rendjei és nemzetségei láthatók százalékos megoszlásban. A táblázatban azok szerepelnek, amik legalább 1%-os abundanciával kolonizálják a mikroműanyagot, illetve a közeget, amelybe a colonizereket kihelyeztem. Minden szinten a legmagasabb abundanciával rendelkező törzset/ rendet/ nemzetséget kiemeltem.

1. visszagyűjtés: felszíni víz (Duna) eredetű közösség (szvt. előtt):

A 8. táblázat a Duna vizének közösségét mutatja be az első visszagyűjtés mintájából a felső mintavételi pontból (PRV-1). A táblázatból leolvasható, hogy törzs szinten a *Proteobacteria* dominál, míg rend szintjén a *Pseudomonadales* dominál, nemzetség szintjén pedig az *Acinetobacter*.

Törzs		Rend		Nemzetség	
<i>Actinobacteriota</i>	1%	<i>Frankiales</i>	1%	NA	1%
<i>Armatimonadota</i>	2%	<i>Armatimonadales</i>	2%	<i>Armatimonas</i>	2%
<i>Bacteroidota</i>	1%	<i>Flavobacteriales</i>	1%	<i>Flavobacterium</i>	1%
<i>Cyanobacteria</i>	5%	<i>Chloroplast</i>	5%	NA	5%
<i>Proteobacteria</i>	7%	<i>Burkholderiales</i>	1%	<i>Rhizobacter</i>	1%
		<i>Enterobacterales</i>	2%	<i>Rheinheimera</i>	2%
		<i>Pseudomonadales</i>	4%	<i>Acinetobacter</i>	4%
<i>Verrucomicrobiota</i>	1%	<i>Verrucomicrobiales</i>	1%	NA	1%

8. táblázat: felszíni víz eredetű közösség összetétele

1. visszagyűjtés: felszíni vízben lévő műanyagot kolonizáló közösség (szvt. előtt):

A 9. táblázatban az első mintavételezés alkalmával begyűjtött Dunában lévő mikroműanyagot kolonizáló közösség (PRP-1) látható. Ebben az esetben is a *Proteobacteria* törzs szinten a legdominánsabb, azonban itt a *Burkholderiales* rend fordul elő. Nemzetség szintén a *Nitrospira* van jelen a legtöbb százalékban, amely a vízi közösség esetében nem volt kimutatható.

Törzs		Rend		Nemzetség	
<i>Bacteroidota</i>	3%	<i>Cytophagales</i>	1%	NA	1%
		<i>Flavobacteriales</i>	2%	<i>Flavobacterium</i>	2%
<i>Nitrospirota</i>	5%	<i>Nitrospirales</i>	6%	<i>Nitrospira</i>	6%
<i>Proteobacteria</i>	14%	<i>Burkholderiales</i>	9%	<i>Dechloromonas</i>	5%
				<i>Thauera</i>	1%
				NA	3%
		<i>Pseudomonadales</i>	1%	<i>Acinetobacter</i>	1%
		<i>Xanthomonadales</i>	4%	<i>Dokdonella</i>	4%

9. táblázat: felszíni vízben lévő plasztiszférikus közösség összetétele (1. begyűjtés)

2. visszagyűjtés: felszíni vízben lévő műanyagot kolonizáló közösség (szvt. előtt):

A 10. táblázat a második mintavételezés alkalmával begyűjtött Dunában lévő plasztiszférikus közösséget mutatja be. Törzs szinten a *Cyanobacteria* a domináns, míg nemzetség szintjén a *Phreatobacter*, ami a *Rhizobiales* rendbe tartozik.

Törzs		Rend		Nemzetség	
<i>Cyanobacteria</i>	5%	<i>Chloroplast</i>	5%	NA	4%
				NA	1%
<i>Proteobacteria</i>	5%	<i>Rhizobiales</i>	4%	<i>Phreatobacter</i>	4%
		<i>Burkholderiales</i>	1%	<i>Hydrogenophaga</i>	1%

10. táblázat: felszíni vízben lévő plasztiszférikus közösség összetétele (2. begyűjtés)

Tisztított szennyvízminta eredetű közösség (szvt. kifolyója):

A 11. táblázat a kezelt szennyvíz közösségét (SZSZV) mutatja be. Az eddigiektől eltérően ebben az esetben az *Arcobacter* nemzetség a domináns, amely a *Campylobacterales* rendbe és a *Campylobacterota* törzsbe tartozik, melyek szintjeiken szintén a gyakoriak.

Törzs		Rend		Nemzetség	
Acinetobacter	8%	Microtrichales	7%	Candidatus Microthrix	7%
		NA	1%	NA	1%
Campylobacterota	10%	Campylobacterales	10%	Arcobacter	10%
Firmicutes	5%	Lactobacillales	4%	Trichococcus	4%
		Peptostreptococcales-Tissierellales	1%	Romboutsia	1%
Patescibacteria	1%	NA	1%	NA	1%
Proteobacteria	6%	Burkholderiales	4%	NA	4%
		Enterobacterales	1%	Aeromonas	1%
		Pseudomonadales	1%	[Agitococcus] lubricus group	1%

11. táblázat: kezelt szennyvíz eredetű közösség összetétele

Kezelt szennyvízben lévő műanyagot kolonizáló közösség (szvt. kifolyója):

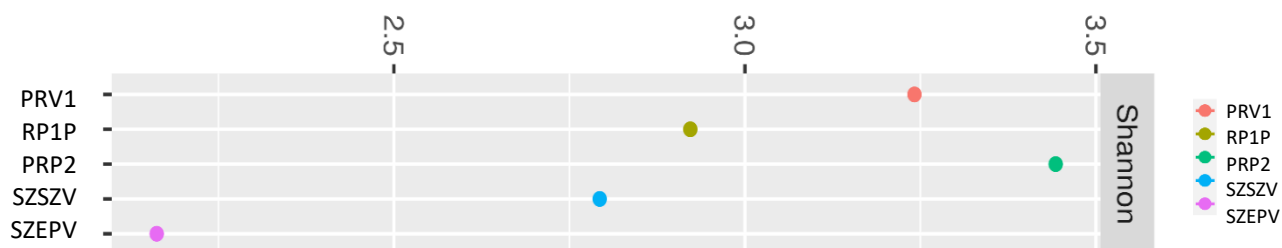
A 12. táblázat a kezelt szennyvízbe kihelyezett mikroműanyag felületét kolonizáló közösséget (SZEP) mutatja be. Törzs és rend szinten a Dunában lévő első begyűjtés plasztiszférikus közösségéhez hasonlóan a *Proteobacteria* és a *Burkholderiales* dominál, azonban eltérő százalékban. Nemzetség szintjén a *Thiothrix* dominál, amely az előző begyűjtések egyikénél sem volt jelen kimutatható százalékban.

Törzs		Rend		Nemzetség	
Actinobacteriota	11%	Microtrichales	5%	Candidatus Microthrix	5%
		NA	6%	NA	6%
Firmicutes	17%	Clostridiales	3%	Clostridium sensu stricto 1	3%
		Lactobacillales	3%	Trichococcus	3%
		Peptostreptococcales-Tissierellales	11%	Intestinibacter	1%
Proteobacteria	35%	Burkholderiales	21%	NA	7%
				NA	3%
				NA	2%
				Sphaerotilus	9%
		Pseudomonadales	2%	Acinetobacter	2%
		Thiotrichales	11%	Thiothrix	11%

12. táblázat: kezelt szennyvízben lévő mikroműanyag felületét kolonizáló közösség

4.4 Amplikon szekvenálás eredményeinek kiértékelése

Az eredményeket értékelését többféleképpen végeztem a különböző közösségek összehasonlítása céljából. A PRV1 minta, vagyis az első begyűjtés alkalmával vizsgált víz közeg, a PR1P pedig a felszíni vízben lévő mikroműanyag mintát jelöli a felső ponton. A PRP2 a második begyűjtés alkalmával vett minta jelölése, amely a mikroműanyag felületét kolonizáló közösséget jelenti a felső ponton. Végül az SZSZV mintakód a kezelt szennyvízközeg, illetve a SZEP pedig a kezelt szennyvízbe kihelyezett plasztiszférikus közösség mintáját jelöli. A 3. ábra az öt közösség diverzizását mutatja meg a Shannon-féle diverzitás szerint. A Shannon-index egy olyan mérték, amely megmutatja az egyes biológiai rendszerek diverzitását a fajok száma és azok relatív gyakoriságát figyelembe véve. A Shannon-féle diverzitás értéke a leggyakoribb fajokra való koncentráció esetén alacsonyabb, míg a fajok egyenlő aránya esetén magasabb, ezért a Shannon-index különösen érzékeny a ritka fajok jelenlétére vagy hiányára.

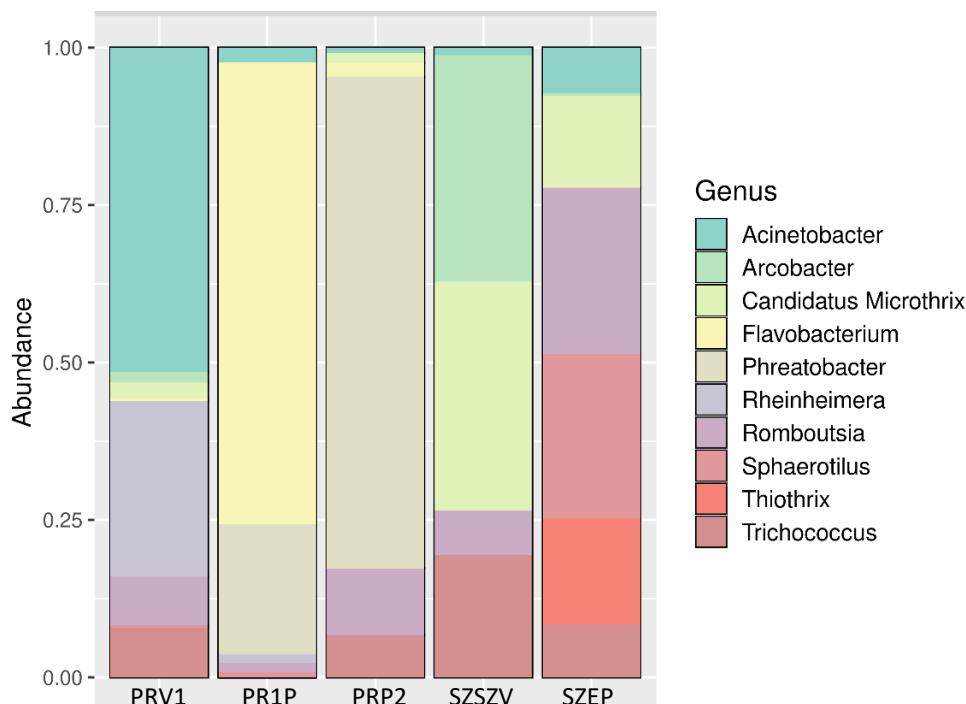


3. ábra: a Shannon-féle diverzitás az egyes mintákra nézve

Az ábrán jól látszik, hogy a legdiverzebb közösség a két hónapon át felszíni vízben lévő mikroplasztik felületén kialakult mikrobiom (PRP-2). Ezt követi a Duna természetes közösségének diverzitása (PRV). Ugyanitt az első hónapot követő begyűjtés plasztiszférikus közössége (PRP-1) kevésbé diverz, mint amelyik két hónapon keresztül volt a felszíni vízbe kihelyezve. Valószínűsíthető, hogy egy hónapos kihelyezése alatt nem alakult ki rajta a teljes kolonizáció. Legkevésbé diverz közösségnek pedig a kezelt szennyvízbe kihelyezett mikroműanyag felületén lévő közösség mondható (SZEPP).

A következő, 4. ábra az egyes nemzetségek abundanciáját mutatja be a közösségekre nézve. Látható, hogy az *Acinetobacter* nemzetség mindegyik minta esetében jelen van, azonban egyértelműen a felszíni vízminta (PRV) esetében a legdominánsabb. A nemzetség fajait főként talajból izolálták, azonban van olyan faj is, amelyet szennyvízből mutattak ki, így a kezelt vízben a jelenléte igazolható. Az *Arcobacter* faj csak a víz, illetve kezelt szennyvíz mintában van jelen kimutatható mennyiségben, számára a plasztiszféra nem bizonyult megfelelő élettérnek. A *Candidatus Microthrix* egy igen gyakori mikroorganizmus az eleveniszapos

szennyvíztisztító rendszerekben, ezt jól igazolja, hogy sokkal nagyobb abundanciával van jelen a kezelt szennyvízben (SZSZV), illetve a kezelt szennyvízbe kihelyezett mikroplasztik felületén (SZEP), mint a Dunába kihelyezett minták esetén. A *Flavobacterium* nemzetség a felszíni víz eredetű plasztiszférikus közösségben dominál. A nemzetség fajait főként édesvízi baktériumokként tartják számon. A *Phreatobacter* nemzetség a felszíni víz plasztiszférikus közösségein kimutathatók, azonban az ábrán látható, hogy a 2. hónapban visszaszorítja a *Flavobacterium* nemzetséget és abundánsabb lesz a *Phreatobacter*. A *Sphaerotilus* nemzetség csak a kezelt szennyvízbe kihelyezett mikroműanyag felületén volt jelen. Ezt a nemzetséget úgynevezett szennyvízgombaként is leírják, hiszen kolóniákat képeznek a szennyvizekben. Tagjai szálasak, pálcika alakúak és kialakítanak egy olyan burkot, amely védelmet nyújt számukra az áramló vízben. A *Thriotrix* szintén csak a kezelt szennyvíz plasztiszférikus közösségén volt jelen kimutatható százalékban. A nemzetség tagjai szulfidforrást tartalmazó vizekben fordulnak elő, illetve számos eleveniszapból, szennyvízből mutatták ki. Rúd alakúak, szintén burkolt filamentumokat képeznek, szabad végükön pedig gonidiumokat képeznek. Az hogy ez utóbbi két nemzetség tagjai valóban biofilm alkoók, vagy csak szálas szerkezetük miatt akadtak fel a mikroműanyag felületeken további vizsgálatot igényel.



4. ábra: A nemzetségek abundanciája az egyes mintákra nézve

5 Összefoglalás

A kutatásból levonható következtetés, hogy a plastic colonizer módszer *in vivo* alkalmazható. A módszer bizonyítottan alkalmas felszíni víz, továbbá nagyobb áramlási sebességgel rendelkező szennyvíz kifolyó mintázására, mikroműanyagok hosszabb idejű kihelyezésére, illetve begyűjtésére.

A feldolgozott publikációk alapján a mikroműanyagok felületén kialakul a biofilm, melyet jelen kutatásom is alátámaszt. Sikeresen izoláltam több különböző fajt is mikroműanyag felületéről, tehát a kutatás során elsajátított módszer alkalmas baktériumok fajsztintú identifikálására. Voltak köztük olyanok is, amelyek patogenitást is mutatnak az emberre nézve. Ez indirekt környezeti kockázatot is jelenhet, hiszen kis méretüknek köszönhetően transzportálódhatnak, megkötődhetnek különböző felületeken, így a plasztiszférán lévő mikroorganizmus is szállítható.

További levonható következtetés, hogy más közösség kolonizálja a mikroműanyag felületét és más a környezeti víz közegét. Sikertelenül olyan nemzetséget is kimutatni (*Phreatobacter*), amely csak a mikroműanyag felületén lévő közösségben volt jelen, ezáltal bizonyítva azt, hogy a nemzetség számára ez valóban egy jól „belelható” életteret jelent. Ezen felül a kezelt szennyvíz és a kezelt szennyvíz plasztiszférikus közössége is különböző. Több olyan nemzetség is volt (*Sphaerotilus*, *Thiotrix*), amely csak a kezelt szennyvíz plasztiszférikus közösségén volt jelen kimutatható százalékban.

A *Sphaerotilus* nemzetség esetében mivel egy szálas baktériumról van szó, érdemes lenne megvizsgálni, hogy valóban biofilmet képez a baktérium, vagy csak mechanikailag ráakadt a mikroműanyag mintára és ezért sikerült azonosítani. Továbbá javasolnám a *MRY13-0052 Pseudomonas sp.* esetében a fajleírást, amennyiben egy másik kutatócsoport még nem kezdte meg.

Kutatásommal a mikroműanyag okozta szennyezések, illetve direkt és indirekt kockázatai felméréséhez kívántam hozzájárulni.

6 Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Szabó Istvánnak, aki vállalta, hogy munkámat ellenőrzi, emellett támogatott, türelmes volt és segítséget nyújtott, amely hozzájárult tanulmányaimhoz és a gyakorlati munka elsajátításához.

A szakdolgozatom nem jöhetett volna létre az általam 2019-ben elnyert UNKP Felsőoktatási Tehetséggel Fel! Felsőoktatást Megkezdő Kutatói Ösztöndíj, UNKP-19-5-SZIE-1, valamint a 2020-ban elnyert UNKP Felsőoktatási Alapképzés Hallgatói Kutatói Ösztöndíj, UNKP-20-1-I-SZIE-2 kódszámú pályázatok nélkül, az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatása által. A szakdolgozatom elkészítéséhez szintén hozzájárult a 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2021-00239 számú projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott, a Piacvezérelt Kutatás-fejlesztési és Innovációs Projektek támogatása pályázati program, valamint Tématerületi Kiválósági Program 2021 Nemzetvédelem, nemzetbiztonság alprogram (NVA) TKP2021-NVA-22 számú támogatott pályázata. Továbbá köszönettel tartozom a 2022-ben elnyert UNKP-22-MATE kódszámú UNKP Felsőoktatási Alapképzés Hallgatói Kutatói Ösztöndíjának.



7 Mellékletek



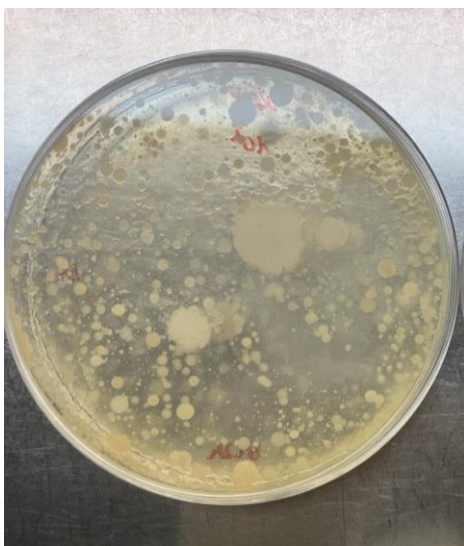
1. kép: A szennyvíztisztító telep kifolyójába
helyezett mintatartó



2. kép: Plastic colonizer



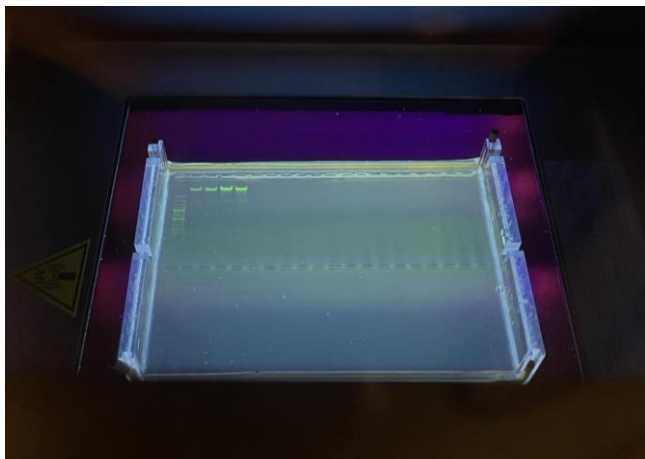
3. kép: Plastic colonizer begyűjtése,
közeg mintavételezése



4. kép: Kinőtt baktériumtelepek, R2A
táptalajon



5. kép: Kinőtt, átolott baktériumtelepek,
R2A táptalajon



6. kép: Gélelektroforézis



7. kép: Millipore szűrő

8 Irodalomjegyzék

- [1.] Ahrens H. R., Essel R., Engel L., Craus M.: Quellen für Mikroplastik mit Relevanz für den Meeresschutz in Deutschland, www.umweltbundesamt.de, 2015
- [2.] Aleksza L.: Hulladékgazdálkodás, Szent István Egyetem, Gödöllő, 2017
- [3.] Anschober R., Heinisch W.M.: Mikroplastik auf der Spur: Die ersten Ergebnisse der grossen Österreich-Studie „Kunststoffe in der Donau“ für OÖ, Landes MedienInfo, 2015
- [4.] Babay, L. É., Horányi, D., Rigó, J. Jr., Nagy, Gy. R.: Next generation sequencing and its applications in non-invasive prenatal testing of aneuploidies, *Orv. Hetil.*, 2015, 156(26), 1041–1048
- [5.] Batra P., Mathur P., Misra C. M.: *Aeromonas* spp.: An Emerging Nosocomial Pathogen
- [6.] Bergmann M, L. Gutow, M. Klage: A Brief History of Marine Litter Research, Berlin Springer, 2015
- [7.] Bíró I., Galambos I., Gerencsér-Berta R.: Biofilmek jelenléte az ivóvízelosztó hálózatokban, 2017
- [8.] Bordós G., Jens R.: Mikroműanyagok a környezetben és a táplálékláncban, Élelmiszervizsgálati közlemény, 2016
- [9.] Chaieb K., Hagar M., Radwan N. R. E.: Biodegradation and decolorization of azo dyes by adherent *Staphylococcus lentus* strain
- [10.] Chen F-L., Wang G-C., Teng S-O., Ou T-Y., Yu F-L.chen: Clinical and epidemiological features of *Chryseobacterium indologenes* infections: Analysis of 215 cases, *Journal of Microbiology*, 2012
- [11.] Cingotti, N.; Jensen, G.K.; Health and Environment Alliance (HEAL). Food Contact Materials and Chemical Contamination; Health and Environment Alliance: Brussels, Belgium, 2019.
- [12.] Czikovszky T., Nagy P., Gaál J.: A polimertechnika alapjai, Műgyetem Kiadó, Budapest, 2000
- [13.] Dutkiewicz, J; Mackiewicz, B; Kinga Lemieszek, M; Golec, M; Milanowski, J: *Pantoea agglomerans*: A mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: Infections of humans, animals and plants, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2016
- [14.] Erdei R.: Műanyag hulladék anyagokból készült bálák bontására alkalmas gépek tervezése, Miskolc, 2007 (33-34)
- [15.] Flores-Gallegos, A. C., Vargas-Suárez, M., Aguilar-González, M. A., Cruz-Camarillo, R., & Bideshi, D. K. (2015). *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*
- [16.] Galambosi R., Gellért G., Polyák É., Műanyag élelmiszer tároló edények potenciális genotoxikus hatásának vizsgálata vizes élelmiszermodellben, Táplálkozástudomány és dietetika szemle, 2021
- [17.] Garlotta D. : A literature review of Poly (Lactic Acid), *Journal of Polymers and the Environment* Vol. 9 No. 2, 2001
- [18.] Horton H: New Disease caused by plastics discovered in seabirds, *The Guardian*, 2023
- [19.] Horváth T., Szabó T. J., Marossy K.: Polilactic acid as a potential alternatives of traditional plastic packagings in food industry, *International Journal of Engineering and Management*, 2021
- [20.] Huys G., Kampfer P., Altwegg M., Kersters I. et al.: *Aeromonas popoffi* sp. nov., a Mesophilic Bacterium Isolates from Drinking Water Production Plants and Reservoirs
- [21.] Ivleva: Mikroplastik in aquatischen Ökosystemen, *Angew.Chem*, 2017
- [22.] Izaguirre-Anariba D. E., Sivapalan V.: *Chryseobacterium indologenes*, an Emerging Bacteria: A Case Report and Review of Literature, *Cureus*, 2020
- [23.] Jadhav S. S., David M.: Biodegradation of flubendiamide by a newly isolated *Chryseobacterium* sp. strain SSJ1
- [24.] Jorgensen N. O. G., Brandt K. K., Nybroe O., Hansen M.: *Vogesella mureinivorans* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from lake water, *Pubmed.gov*, 2009
- [25.] Khan, Z., Al-Rashed, F., Al-Salamah, A. A., Al-Obaid, K., & Al-Humaidan, H. (2013). *Comamonas terrigena*: a rare opportunistic pathogen. *Journal of infection and public health*, 6(6), 467-471
- [26.] Kim, H. K., Lee, Y., Kim, J., Lee, K., & Yong, D. (2017). *Raoultella terrigena* bacteremia in a patient with pancreatic cancer. *Annals of laboratory medicine*
- [27.] Kim, J. Y., Lee, J. K., & Lee, B. C. (2012). Pectinase production from *Flavobacterium pectinovorum* HY-03 using agricultural by-products as carbon sources. *Journal of microbiology and biotechnology*
- [28.] Kim, M., Jang, J., Lee, J., & Lee, J. Biodegradation potential of *Acidovorax* sp. NA4 for naphthalene under various pH and temperature conditions. *Environmental technology*, 2018
- [29.] Kovács M.: Levegőből hulló műanyag, *Élet és tudomány*, 2020
- [30.] Kugler G., Erdősi Cs.: Az előny maradt, a felhasználás változott: Többrétegű műanyag csövek alkalmazása ma, illetve tizenkilenc évvel ezelőtt, *Víz, gáz és fűtésteknika: épületgépészeti szaklap*, 2019
- [31.] Lim, Jeong-A; Lee, Dong Hwan; Kim, Byoung-Young; Heu, Sunggi. Draft genome sequence of *Pantoea agglomerans* R190, a producer of antibiotics against phytopathogens and foodborne pathogens, *Journal of Biotechnology*, 2014

- [32.] Liu Y-C., Young L-S., Lin A-Y., Hameed A., Hsu Y-H., Lai W-A., Shen F-T., Young C-C.: *Pseudomonas guguanensis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from a hot spring, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013
- [33.] Liu, Y., Yang, H., & Ma, L. (2019). Transcriptome analysis of *Flavobacterium pectinovorum* reveals differential gene expression in response to pectin. BMC microbiology
- [34.] Macskásy H.: A műanyagok világa, Műszaki könyvkiadó, 1983
- [35.] Markó Cs.: Egyszer használatos műanyag termékek, ZIP, 2021
- [36.] Mikroplastik und andere Kunsstoffe in Kosmetika, www.bund.net, 2020
- [37.] Mohapatra, B. R., & Bapuji, M. (2005). Utilization of agroindustrial waste for the production of cellulase by *Bacillus sonorensis* MTCC 9872. Bioresource technology, 96(4), 413-416
- [38.] Monti R. M., Smania A. M., Fabro G., Alvarez M. E., Argarana C. E.: Engineering *Pseudomonas fluorescens* for Biodegradation of 2,4-Dinitrotoluene
- [39.] Mukherjee K., Mandal S., Mukhopadhyay B., Mandal C. N., Sil A. K.: Bioactive compound from *Pseudomonas synxantha* inhibits the growth of Mycobacteria, Microbiological Research, 2014
- [40.] Naegelen I.: Mikroplastik als Gesundheitsgefahr für den Menschen, Treffpunkt Forschung, Luxemburg, 2019
- [41.] Nagata Y, Ohtsubo Y, Endo R, et al. Microbial diversity of a full-scale activated sludge plant performing enhanced biological phosphorus removal investigated by pyrotag sequencing. J Biosci Bioeng. 2013
- [42.] Németh B.: Ipari technológiák, PTE, 2012
- [43.] Nisihara T., Okamoto T., Nishiyama N.: Biodegradation of didecyltrimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge, Applied Microbiology International, 2001
- [44.] Ossmann B. E., Sarau, Schmitt, Holtmannspötter h., Christiansen S.H., Dicke W.: Mikroplastik- ein Thema des Verbraucherschutzes, www.lgl.bayern.hu, 2017
- [45.] Öllös G.: A környezetvédelem, Új Levédia, Gödöllő, 2012
- [46.] Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2016
- [47.] Palm J. G., Reisky L., Böttcher D., Müller H., Michels A. P. E., Walczak C. M., Berndt L., Weiss S. M., Bornscheuer T. U., Weber G.: Structure of the plastic-degrading *Ideonella skaiensis* MHETase bound to a substrate, Nature Communication, 2019
- [48.] Primpke S., Imhof H., Piehl S., Lorenz C., Löder M., Laforsch C., Gerdts G.: Mikroplastik in der Umwelt, Chem. Unserer Zeit, 2017
- [49.] Primpke S., Imhof H., Piehl S., Lorenz C., Löder M., Laforsch C., Gerdts G.: Mikroplastik in der Umwelt, Chem. Unserer Zeit, 2017
- [50.] Pukánszky B., Moczó J.: Műanyagok, Typotex, Budapest, 2011 (43-47) (189-199)
- [51.] Puskás A.: Ipari mikrobiológiai gyakorlatok, Műegyetem Kiadó, Budapest, 1993
- [52.] Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P.: Plasticenta: Microplastic in Human Placenta, 2020
- [53.] Rodriguez-Morales A. J., Castaneda-Hernandez D. M.: Bacteria: *Aeromonas*, Preference Module in Food Science, 2019
- [54.] Sahagun L.: An ecosystem of our own making could pose threat, Los Angeles Times, Science and Medicine, 2013
- [55.] Sánchez-Peña, M. A., Flores-Gallegos, A. C., Ochoa-Martínez, L. A., Rodríguez-Durán, L. V., Castillo-Cadena, J., Arévalo-Niño, K., ... & Bideshi, D. K. (2021). Potential uses of *Bacillus tequilensis*: a comprehensive review. Microbial Cell Factories
- [56.] Shim H., Hwang B., Lee S-S., Kong S-H.: Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic condition, 200
- [57.] Stoll P.: Mikroplastik Vorkommen in unserem Trinkwasser, Maturaarbeit, 2018
- [58.] Stöven K., Jacobs F., Chung E.: Mikroplastik: Ein selbstverschuldetes Umweltproblem im Plastikzeitalter, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 2015
- [59.] Szabó A.: Műanyagok újrahasznosítása Magyarországon és Németországban, Debrecen, 2009
- [60.] Talagrand-Reboul E., Jumas-Bilak E., Lamy B.: The Social Life of *Aeromonas* through Biofilm and Quorum Sensing Systems, Frontiers in Microbiology, 2017
- [61.] Tsai MS, Wu YH, Lin CY, Lai YC, Hu A. Case report: *Aeromonas media* bacteremia and liver abscess in a patient with liver cirrhosis. J Microbiol Immunol Infect. 2019
- [62.] Van Delden, C. (2004): Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. 3-47. p. In: Ramos, J.L. : *Pseudomonas*. Virulence and gene regulation. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA
- [63.] Wiesner M.: Mikroműanyagok a Dunában, Wessling, 2018
- [64.] Zhang, H., Zhang, S., Wang, X., & Lu, F. (2017). Biotechnological potential of *Bacillus atrophaeus*: A brief review. Applied biochemistry and biotechnology

Internetes hivatkozások:

http1: <https://www.europarl.europa.eu/news/hu/headlines/society/20181212STO21610/a-muanyag-hulladek-mennyisege-es-ujrahasznositasa-az-eu-ban-infografika>

http2: <http://polimerek.hu/2020/08/24/magyarorszag-muanyagipara-2019-ben/>

http3: <https://www.canstockphoto.hu/k%C3%A9miai-polimer-polisztirol-szerkezet-31713600.html>

http4: <https://www.europeanbioplastics.org/bioplastics/>

http5: <https://www.ecocatering.hu/blog/mi-az-a-PLA>

http6: <https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/chemie/kontaminanten/mikroplastik/?fbclid=IwAR0FuiIZozupAwESKObkSrCf1ZadLPgfLErNkT1WjiGBfW4v4PT6-cUrTiA>

http7: <https://www.kavosz.hu/uzleti-bulvar/egyszer-hasznaltos-muanyagtermekek-hetmilliard-forint-segiti-az-atallast/>

http8: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=legisum:ev0010>

http9: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/ALL/?uri=LEGISSUM:waste_hierarchy

http10: <https://chemicalsinourlife.echa.europa.eu/hu/chemicals-in-plastic-products>

http11: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1014CNH.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2011+Thru+2015&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C11thru15%5CTxt%5C00000040%5CP1014CNH.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C->

[&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL#](#)

http12: <https://hu.geoview.info/csornafoktoicsatorna,150528570w>

http13: dmrvzrt.hu