VAS ÉS EZÜST NANORÉSZECSKÉK KÖRNYEZETBARÁT ELŐÁLLÍTÁSA ÉS ALKALMAZÁSÁNAK VIZSGÁLATA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

RÓNAVÁRI ANDREA

TÉMAVEZETŐK:
DR. KÓNYA ZOLTÁN
DR. KIRICSI MÓNICA

KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ALKALMAZOTT ÉS KÖRNYEZETI KÉMIAI TANSZÉK

SZEGED
2017

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. SZÉNHIDROGÉNEK	9
2.1.1. KLÓROZOTT ALIFÁS SZÉNHIDROGÉNEK	9
2.2. KÖRNYEZETI KÁRMENTESÍTÉS	12
2.2.1. REMEDIÁCIÓS ELJÁRÁSOK ÉS CSOPORTOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI	12
2.3. KLÓROZOTT ALIFÁS SZÉNHIDROGÉNEK <i>IN SITU</i> REMEDIÁCIÓS LEHETŐSÉGEI	15
2.3.1. BIOREMEDIÁCIÓ	15
2.3.1.1. Biológiai remediáció klórozott szénhidrogének esetében	16
2.3.1.2. Klórozott alifás szénhidrogének biodegradációja.....	18
2.3.1.3. Anaerob lebontás	19
2.3.1.4. Biodegradációban résztvevő baktériumok kimutatása	21
2.3.1.5. Kompetitív mikroorganizmusok a reduktív deklorináció során	23
2.3.2. KÉMIAI LEBONTÁS – <i>IN SITU</i> KÉMIAI REDUKCIÓ	25
2.3.2.1. Nulla vegyértékű vas nanorészecskék általános jellemzése	25
2.3.2.2. Nulla vegyértékű vas nanorészecskék szerepe a környezeti remediálásban	26
2.3.2.2.1. A nulla vegyértékű vas hatásának kémiai alapjai	28
2.3.2.2.2. Nulla vegyértékű vas alkalmazása klórozott szénhidrogének kárméntesítésében.....	29
2.3.3. VAS NANORÉSZECSKÉK HATÁSA A TALAJBAN ÉLŐ BAKTÉRIUMOKRA	32
2.3.4. VAS NANORÉSZECSKÉK ELŐÁLLÍTÁSA	35
2.3.4.1. Kémia redukció.....	35
2.3.4.2. Mikroemulziós eljárás	38
2.3.4.3. Ultrahangos kezelés	39
2.3.4.4. Elektrodepozíció	40
2.3.4.5. Kémiai gőzfázisú leválasztás.....	40
2.3.4.6. Karbotermikus eljárás	41
2.3.4.7. Termikus bomlás	41
2.3.4.8. Hidrotermális eljárás.....	41
2.3.4.9. Poliol módszer	42
2.3.4.10. Zöld szintézis.....	42
2.3.4.11. Vas nanorészecskék stabilizálása	45
2.4. EZÜST NANORÉSZECSKÉK ELŐÁLLÍTÁSA ZÖLD SZINTÉZISSSEL	47
3. CÉLKITŰZÉS	50
4. KÍSÉRLETI RÉSZ.....	52
4.1. A KÍSÉRLETI MUNKA SORÁN FELHASZNÁLT ANYAGOK	52
4.2. VAS ÉS EZÜST NANORÉSZECSKÉK ELŐÁLLÍTÁSA	52
4.2.1. VAS NANORÉSZECSKÉK ELŐÁLLÍTÁSA FÉLIG-ZÖLD MÓDSZERREL	52

4.2.2.	VAS NANORÉSZECSEKÉK ELŐÁLLÍTÁSA ZÖLD MÓDSZERREL – NÖVÉNYI KIVONATOK	54
4.2.3.	EZÜST NANORÉSZECSEKÉK ELŐÁLLÍTÁSA ZÖLD MÓDSZERREL – NÖVÉNYI KIVONATOK	55
4.3.	VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	55
4.3.1.	TRANZMISSZIÓS ELEKTRONMIKROSKÓPIA (TEM).....	55
4.3.2.	RÖNTGENDIFFRAKTOMETRIA (XRD).....	56
4.3.3.	ENERGIADISZPERZÍV RÖNTGENSPEKTROSKÓPIA (EDS)	56
4.3.4.	REDOXPOTENCIÁL (ORP) – REDUKCIÓS KAPACITÁS.....	56
4.3.5.	HATÉKONYSÁG VIZSGÁLAT – HIDROGÉNGÁZ FEJLŐDÉS	57
4.3.6.	HATÉKONYSÁG VIZSGÁLAT – ILLÉKONY KLÓROZOTT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK VIZSGÁLATA	58
4.3.7.	TEREPI TESZT.....	58
4.3.8.	INDUKTÍV CSATOLÁSÚ PLAZMA-TÖMEGSPEKTROMETRIA (ICP-MS).....	59
4.3.9.	ULTRAIBOLYA-LÁTHATÓ ABSZORPCIÓS SPEKTROMETRIA (UV-VIS)	59
4.3.10.	DINAMIKUS FÉNYSZÓRÁS (DLS)	60
4.3.11.	INFRAVÖRÖS SPEKTROSKÓPIA (FT-IR)	60
4.3.12.	MIKROKOZMOSZ RENDSZEREK	60
4.3.13.	ANAEROB HETEROTRÓF ÉLŐ SEJTSZÁM	61
4.3.14.	DNS PREPARÁLÁS	61
4.3.15.	POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR) ÉS DENATURÁLÓ GRADIENS GÉLELEKTROFORÉZIS (DGGE)	62
4.3.16.	KVANTITATÍV POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (QPCR)	63
4.3.17.	SEJT PROLIFERÁCIÓS ÉS CITOTOXICITÁS VIZSGÁLATOK	65
4.3.17.1.	Sejtkultúrák.....	65
4.3.17.2.	Sejtproliferációs vizsgálat	65
4.3.17.3.	Citotoxicitás vizsgálat	66
4.3.18.	ANTIMIKROBIÁLIS VIZSGÁLATOK	66
4.3.18.1.	Vizsgált törzsek	66
4.3.18.2.	Agar-diffúziós módszer	66
4.3.18.3.	Élőcsíraszám meghatározásos módszer.....	67
5.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	68
5.1.	NULLA VEGYÉRTÉKŰ VAS NANORÉSZECSEKÉK KÖRNYEZETBARÁT ELŐÁLLÍTÁSA ÉS REMEDIÁCIÓBAN VALÓ ALKALMAZHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA.....	68
5.1.1.	KÉMIAI REDUKCIÓVAL ELŐÁLLÍTOTT NULLA VEGYÉRTÉKŰ VAS NANORÉSZECSEKÉK JELLEMZÉSE.....	68
5.1.1.1.	Transzmissziós elektronmikroszkópia – morfológia és méret	69
5.1.1.2.	Röntgendiffraktometriás vizsgálatok – kristályszerkezet.....	71
5.1.1.3.	Redoxpotenciál mérések – redukciós kapacitás	72
5.1.1.4.	Hidrogéngáz fejlődés vizsgálat – hatékonyság.....	75

5.1.1.5.	Illékony klórozott szénhidrogének bontásának vizsgálata laboratóriumi körülmények között	76
5.1.1.6.	Vas nanorészecskék alakját befolyásoló védőmolekula adagolása	80
5.1.1.7.	A kiválasztott minta terepi tesztelése	82
5.2.	MIKROKOZMOSZ VIZSGÁLATOK: NULLA VEGYÉRTÉKŰ VAS NANORÉSZECSKÉK HATÁSA A KLÓROZOTT ALIFÁS SZÉNHIDROGÉNEK DEGRADÁCIÓJÁRA ÉS A DEKLORINÁCIÓBAN RÉSZTVEVŐ SZERVEZETEKRE.....	85
5.2.1.	KÜLÖNBÖZŐ NULLA VEGYÉRTÉKŰ VAS NANORÉSZECSKÉK HATÁSA A MIKROBIÁLIS ÖSSZETÉTELRE.....	86
5.2.1.1.	Anaerob heterotróf élő sejtszám	86
5.2.1.2.	Biomassa mennyiség	88
5.2.1.3.	Eubaktérium összetétel (DGGE vizsgálatok).....	89
5.2.1.4.	A biodegradációban részt vevő baktériumok relatív mennyiségének változása	90
5.2.1.	NANOVASAK HATÁSA A KÉMIAI ÖSSZETÉTELRE	92
5.2.1.1.	Vas ionok koncentrációja	92
5.2.1.2.	Reduktív deklorináció a mikrokozmosz rendszerekben a különböző nanovas adagolás mellett.....	93
5.3.	NÖVÉNYI KIVONATOKKAL ELŐÁLLÍTOTT EZÜST NANORÉSZECSKÉK KÉMIAI ÉS BIOLÓGIAI AKTIVITÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA.....	96
5.3.1.	A NÖVÉNYI KIVONATOKKAL ELŐÁLLÍTOTT EZÜST NANORÉSZECSKÉK JELLEMZÉSE 97	
5.3.1.1.	Transzmissziós elektronmikroszkópia – morfológia és méret	97
5.3.1.2.	Röntgendiffraktometriás vizsgálatok – kristályszerkezet.....	97
5.3.1.3.	Dinamikus fényszórás – hidrodinamikai átmérő.....	98
5.3.1.4.	Ultraibolya-látható abszorpciós spektrometria - szerkezet.....	99
5.3.1.5.	Infravörös spektroszkópia.....	99
5.3.2.	A NÖVÉNYI KIVONATOKKAL ELŐÁLLÍTOTT EZÜST NANORÉSZECSKÉK TOXICITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	101
5.3.2.1.	A növényi kivonatokkal előállított ezüst nanorészecskék toxicitásának vizsgálata	101
5.3.2.1.1.	Sejtproliferációs vizsgálat	101
5.3.2.1.2.	Citotoxicitás.....	101
5.3.2.2.	Antibakteriális és antifungális hatás	102
5.3.2.3.	Ezüst ionok koncentrációja.....	105
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	107
7.	SUMMARY	110
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	113
	IRODALOMJEGYZÉK	114

1. BEVEZETÉS

Társadalmunk egyre égetőbb problémája a talaj, a víz és a levegő óriási mértékű elszennyeződése. A növekvő népesség egyre fokozódó szükségleteinek kielégítő biztosítása nagymértékű környezetterhelést eredményez világszerte. A múlt század elejétől jelentősen megnövekedett ipari és mezőgazdasági tevékenység, az ásványi nyersanyagok meg gondolatlan ütemű és mennyiségű kitermelése és felhasználása, az urbanizáció, a szennyezőanyagok utólagos felismerése és nem megfelelő kezelése mind hozzájárultak környezetünk jelenlegi szennyezettségi állapotához. A természetes (biogén vagy geokémiai) anyagok mellett a környezetünkbe kerülő számos antropogén eredetű, élő szervezetekre sokszor mérgező vegyület komoly kihívást jelent a környezet számára, mivel a természetes rendszerek nincsenek felkészülve ezeknek az anyagoknak a gyors lebontására.

A fenntartható fejlődés érdekében és az egészséges környezetben éléshez való jog alapján a fentiekből következően alapvető társadalmi célkitűzésként fogalmazódik meg a ma még utópikusan hangzó drasztikus szemléletváltás mellett a környezetterhelés csökkentése, valamint a kármentesítési technológiák fejlesztése és optimalizálása, amelyekkel a földtani közegek és felszín alatti vizek eredményesen kezelhetőek.

Az Egyesült Államokban és a fejlett nyugati országokban már a 70-es években felismerték a veszélyt, és felhívták a figyelmet a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezés felmérésének fontosságára, a szennyezett területek azonosítására és helyreállítására, a környezeti értékek megóvására, illetve ennek jogi szabályozására. Számos, a természetes környezetet ért káros hatás visszaszorításával, a szennyezett területek felmérésével és kezelésével foglalkozó környezetvédelmi határozatot és törvényt hagytak jóvá, valamint környezetvédelmi programokat (pl. az amerikai Superfund és a német Altlasten program) indítottak. Kezdetben csak a talajokat és a felszín alatti vizeket veszélyeztető környezetvédelmi problémák, források azonosításával foglalkoztak. Később, felismerve e területek kulcsfontosságú szerepét a mindennapi életünkben, hatékony, költségkímélő és környezetbarát kármentesítési eljárások kidolgozásával és azok fejlesztésével folytatták a munkát.

Magyarországon a 90-es évek elejéig sajnálatos módon semmilyen környezetvédelmi jogszabály nem korlátozta az ipari, mezőgazdasági és katonai fejlesztéseket, beruházásokat¹.

A XX. század második felében a felgyorsult iparosodás, a mezőgazdaság kemizálása és gépiesítése miatt exponenciálisan megnőtt a különböző környezeti elemek, a talaj, a víz és a levegő szennyezése². A 90-es évek elején már nem lehetett figyelmen kívül hagyni ezt a

súlyos környezetvédelmi problémát, a kármentesítés iránt egyre fokozódó társadalmi és gazdasági igény jelentkezett. Így a fejlett országok tapasztalatait figyelembe véve, 1996-ban hazánkban elindították az Országos Környezeti Kármentesítési Programot (OKKP)³, melynek célja a földtani közegben és a felszín alatti vizekben felhalmozódott és hátramaradt szennyeződések és azok minőségének és mennyiségének felderítése, a környezeti károk mérséklése, lehetőség szerinti felszámolása, továbbá az újabb szennyeződések kialakulásának megakadályozása. A felmérések alapján hazánkban a szennyezett területek száma megközelítőleg 30-40 ezerre tehető.

Magyarországon a lakossági vízhasználat 95%-a felszín alatti vizekből származik, ezért különösen fontos ezeknek a vizeknek védelme és a talajvíz, illetve a talajba kerülő szennyeződések kezelése. A hazai környezetvédelmi gyakorlat egyik leggyakoribb kihívása a felszín alatti vizek és a földtani közeg szénhidrogén szennyezettségének felderítése és megszüntetése. Jelenleg a legnagyobb környezeti szennyezést a halogénezett szénhidrogének, köztük a klórozott rövid szénláncú vegyületek (CAH - Chlorinated Aliphatic Hydrocarbon) (pl. tetraklóretén [PCE], triklóretén [TCE], diklóretén [DCE], vinil-klorid [VC], szén-tetraklorid, kloroform, diklórmétán és klórmétán) okozzák⁴⁻⁷.

Ezeket a vegyületeket kedvező kémiai és fizikai tulajdonságaik miatt széleskörűen és nagy mennyiségben alkalmazták és alkalmazzák még ma is az iparban, a mezőgazdaságban és az egészségügyben (pl. oldószerként, csíraölőként vagy zsírtalanítóként). A melléktermékként képződött, valamint az alkalmazás után visszamaradt klórtartalmú szénhidrogének mind a mai napig komoly környezeti és egészségügyi problémát jelentenek, mivel perzisztensek, a víznél nagyobb sűrűségűek, aerob körülmények között nem, vagy csak alig biodegradálhatóak, némelyek karcinogének, mutagének és toxikus hatásúak a környezetre és ránk nézve is.

Az elmúlt két évtized tényfeltáró felméréseinek, kutatási projektek eredményeinek és gyakorlati tapasztalatainak köszönhetően napjainkban már talajtisztítási technológiák százai állnak rendelkezésünkre, melyek döntően fizikai, kémiai, biológiai, termikus vagy szigeteléses eljárások.

A kármentesítés során – a fenntartható fejlődést szem előtt tartva – a bioremediációs folyamatoknak kell előtérbe kerülniük. Ezen eljárások a talajban folyó természetes szennyezőanyag-csökkentő folyamatokon alapulnak, kihasználva a talaj saját biológiai aktivitását. A bioremediáció előnye, hogy legtöbbször *in situ* kivitelezhető, nem igényel komolyabb infrastruktúrát, alacsonyabb költséggel jár, mint más, műszaki megoldásokat is igénylő remediációs módszerek. Ugyanakkor ennek az eljárásnak vannak korlátai is, például a köztes bomlástermékek esetleges felhalmozódása vagy a technológia időigényessége.

A nanotechnológia és az egyre égetőbb környezetszennyezési problémák, valamint az egyre fontosabb környezetvédelmi szempontok találkozása hívta életre az ún. nanoremediációs eljárásokat. Ahogy az elnevezésből is látszik, ezek olyan kármentesítési folyamatok, amelyek során nanoméretű anyagot alkalmazunk. A nanotechnológia megjelenése a kármentesítési programokban – csakúgy, mint az élet egyéb területein – hatalmas mértékben felgyorsította a technológiai fejlődést. Ezek a „kis” anyagok hatalmas problémákra nyújtanak és nyújthatnak megoldást. Számos publikációban számoltak be fém vagy fém-oxid nanorészecskék sikeres felhasználásáról a remediációs folyamatokban⁸. A környezeti gyakorlatban legtöbbször nulla vegyértékű vas nanorészecskéket alkalmaznak halogénezett szénhidrogénekkel szennyezett talajvizek *in situ* kármentesítésére⁹. A felhasználásnak leggyakrabban az előállítási költségek szabhatnak gátat, így napjaink elsődleges feladata egy olyan gazdaságilag és ipari méretben kivitelezhető előállítási módszer kidolgozása, ami a nanoméretű anyagokat még inkább alkalmassá teszi a környezet védelmének szolgálatára.

Az alkalmazás további feltétele, hogy ismerjük a felhasznált nanoméretű vasrészecske teljes ökoszisztémára gyakorolt hatását, esetleges toxicitását, alkalmazhatóságának határait. Ehhez fontos felmérnünk, hogy a nulla vegyértékű vas nanorészecskék milyen hatással vannak a kármentesítés során kezelt közegben élő szervezetekre, hogyan és milyen mértékben változtatják meg a bakteriális közösség diverzitását, faji összetételét.

A fentiek alapján és a szennyezett természeti elemek (pl. földtani közeg, felszín alatti vizek) állapotának megismerésével és kármentesítésével foglalkozó tudományos fórumok, és lezárt, sikeres projektek sora bizonyítja, hogy igény van az innovatív, környezeti, gazdasági és társadalmi szempontból egyaránt előnyös technológiákra. A kockázatmenedzsment fejlődésével és a jövőbeni használatokból eredő hasznok figyelembevételével az optimálisan kombinált biológiai és a nanoremediációs eljárások versenyképes alternatívát jelenthetnek.

Doktori munkám során különböző reaktivitású és morfológiájú vas nanorészecskéket állítottunk elő hagyományos és zöld szintézissel. A részecskék szerkezetét, morfológiáját és reaktivitását részletesen jellemeztük, végül azt teszteltük, hogyan befolyásolják ezek a tulajdonságok a nanorészecskék valós környezeti minták mikrobiális összetételére és diverzitására gyakorolt hatását. Megállapítottuk, hogy egy hosszabb távú kármentesítési beavatkozás során milyen tulajdonságú vas nanorészecske alkalmazása javasolt klórozott alifás szénhidrogének sikeres lebontására.

A különböző módon előállított vas nanorészecskéknél megfigyelt eltérő kémiai jellemzők és a nanorészecskék biológiai rendszerekre gyakorolt eltérő hatásának pontosabb

értelmezéséhez szükségesnek gondoltuk megfigyeléseink szélesebb körű kiterjesztését, melyhez egy jól ismert, az irodalomban konkrét referenciaértékekkel, meghatározott paraméterekkel rendelkező standard anyag, az ezüst nanorészecskék tanulmányozását választottuk. Az ezüst nanorészecskék jól definiált jellemzői lehetővé tették az általunk zöld szintézissel, növényi kivonatok segítségével előállított ezüst nanorészecskék teljes körű kémiai és biológiai összehasonlító elemzését, különös tekintettel a redukálószeres esetleges befolyásoló szerepére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Szénhidrogének

Az elmúlt évtizedekben az ipar és mezőgazdaság intenzív fejlődése, valamint a fejlett gazdasággal rendelkező országokban kialakult meggondolatlan fogyasztói magatartás következtében a környezetünkbe kerülő káros, természetidegen anyagok koncentrációja jelentős mértékben megemelkedett, számos környezetvédelmi problémát okozva. Ezáltal, a környezet védelmének fontossága napjaink egyik legaktuálisabb és egyben legaggasztóbb problémájává vált¹⁰.

Hazánkban, akárcsak az egész világon, a környezeti (talaj- és talajvíz) szennyezések nagy részét a földtani közegbe, illetve felszín alatti vizekbe jutó antropogén eredetű kőolajok és kőolajtermékek okozzák^{4,11}. Szénhidrogén összetételét tekintve a kőolaj különböző szerkezetű és molekulatömegű normál paraffinok, izoparaffinok, cikloparaffinok és poliaromás szénhidrogének elegye. A kiterjedt ipari, mezőgazdasági és lakossági felhasználás miatt szinte mindenütt számíthatunk kőolaj eredetű szennyezésre, továbbá figyelembe kell vennünk a kőolaj kitermelése és feldolgozása során keletkező, valamint a helytelen tárolásból, szállításból, illetve egyéb ipari balesetekből származó lehetséges szennyezőforrásokat is⁴.

Széles körű felhasználásukkal összefüggésben környeztkárosító hatásuk is meglehetősen nagy¹². A káros hatás függ a környezetbe kikerült szennyezőanyag koncentrációjától, eloszlásától, anyagi minőségétől, az expozíciós időtől, a környezeti feltételektől (pl. éghajlati, időjárási tényezők – csapadék mennyisége, domborzat – talaj elhelyezkedése, talajvíz mélysége), a közegben előforduló más anyagok jelenlététől, illetve az azokkal és az élő szervezetekkel (érintkezés, bejutás, esetleges lebontás) történő kölcsönhatástól¹³.

2.1.1. Klórozott alifás szénhidrogének

Számos, nagy mennyiségben előállított és kedvező fizikai-kémiai tulajdonsága (pl. nagyfokú ellenálló képesség és stabilitás, specifikus hatás) miatt alkalmazott vegyszerről bizonyosodott be, hogy felhalmozódva a környezetben, közvetve vagy közvetlenül veszélyezteti az embert és a környezetet¹⁴.

Sajnálatos módon sok vegyszer esetében a megfelelő hatástanulmány (a termékek természeti környezetre, élővilágra gyakorolt hatásának felmérése) elkészítésére csak jóval azután került sor, amikor az alkalmazási területen már jelentős egészségügyi, környezeti

problémák jelentkeztek és a beavatkozás elkerülhetetlen volt. Ilyenek a halogéntartalmú szerves vegyületek is, melyek között kiemelkedő helyet foglalnak el a főként oldószerként, zsírtalanító szerként, vagy extraháló szerként alkalmazott klórozott szénhidrogének¹⁵.

A klórozott rövid szénláncú vegyületek (pl. tetraklóretén, triklóretén, diklóretén, vinil-klorid, szén-tetraklorid, kloroform, diklórmétán és klórmétán) a talaj és a talajvíz rendszerek leggyakoribb, és különösen káros szennyezői közé tartoznak¹⁶. Az Országos Környezeti Kármentesítési Program felmérése szerint, csak hazánkban több ezer helyen található ilyen jellegű szennyezés^{3,11}. A dolgozatban vizsgált legfontosabb klórtartalmú alifás vegyületeket a 2.1. táblázatban mutatom be¹⁷.

2.1. táblázat. Klórozott alifás etilén származékok

Név	Összegképlet	Jellemzők	Felhasználás
vinil-klorid	C_2H_3Cl	színtelen, szagtalan, gyúlékony, édeskés szagú, narkotikus hatású	polimerek (PVC) előállítása, hűtőfolyadék, oldószer
1,1-diklóretilén	$C_2H_2Cl_2$	színtelen, jellegzetes szagú	komonomerek
1,2-diklóretilén	$C_2H_2Cl_2$	színtelen, nagyon gyúlékony, jellegzetes szag, cisz- és transz izomer	komonomerek
triklóretilén	C_2HCl_3	színtelen, jellegzetes szag, nem gyúlékony	fémek felületi kezelése, zsírtalanítószer, oldószer
tetraklóretilén	C_2Cl_4	színtelen, nem gyúlékony	száraz vegytisztítás, fűregirtószer

Ezen vegyületek közös jellemzője, hogy stabilak, nehezen bomlanak, perzisztensek, anoxikus felszín alatti környezetben könnyen akkumulálódnak, tehát nehezen hozzáférhetőek. Vízrel kétfázisú rendszert alkotnak és a vizes fázis alatt helyezkednek el ún. DNAPL szennyezést okozva (Dense Non-Aqueous Phase Liquid: víznél nagyobb sűrűségű, vízzel nem elegyedő folyadék). A talajvíz szintje alá is leszivárognak a talajban, így nem csak a talajvizet, de a mélyebb rétegekben elhelyezkedő vizeket is veszélyeztetik. A víz alatti rétegből folyamatosan szennyezőanyagot bocsáthatnak a vízbe – ami a talajvíz áramlásával messzire eljuthat, ivóvizeinket veszélyeztetve – így a kármentesítés során nehézséget okoz már az elhelyezkedésük megállapítása is, a források pontos azonosítása és lehatárolása mellett¹⁸.

A klórozott vegyületek ipari felhasználhatóságát a bennük lévő szén-klór kötés erőssége és az ebből adódó stabilitása határozza meg. Ugyanakkor a melléktermékként képződött és az alkalmazás után feleslegessé vált klórtartalmú vegyületek nagyon lassan

bomlanak le, így potenciális környezetszennyezőként kell kezelnünk őket. A nem megfelelő kezelés és elhelyezés eredményeként a természetes felszíni és talajvizekbe, valamint a talajba és a levegőbe jutnak, lokális, regionális és globális problémákat okozva.

Bekerülve a talaj- és rétegvízbe, transzportjuk jelentős, így környezetkárosító hatásaik mellett figyelembe kell vennünk a humán egészségügyi hatásukat is. Az általuk okozott tüneteket és szervi elváltozásokat a 2.2. táblázat tartalmazza¹⁹. Gőzeiket belélegezve vagy bőrön, illetve szájon keresztül is bejuthatnak szervezetünkbe, ahol felhalmozódhatnak a zsírszövetben, vagy károsíthatják a központi idegrendszert, a májat vagy a vesét. Mivel lassan ürülnek és hosszú a féléletidejük, felhalmozódásuk rosszindulatú daganatok kialakulásához vezethet.²⁰ Minden alifás klórozott etilén toxikus, a vinil-klorid bizonyítottan humán karcinogén. Problémát okoz továbbá, hogy a részleges lebontásuk során keletkező köztitermékek gyakran toxikusabbak, mint a kiindulási anyagok²¹.

2.2. táblázat. Szénhidrogének által okozott tünetek és elváltozások

Érintett szervek	Tünetek
Légzőszervek	Nehézlégzés, cianózis, vérköpés, tüdőödéma, tüdőgyulladás
Központi idegrendszer és perifériás idegek	Depresszió, zavartság, egyensúlyvesztés, hányinger, hányás, fáradtság, kimerültség, alvászavar, tudatvesztés, érző- és motoros idegek károsodása (paralízis), Parkinson tünetek
Gyomor és bélrendszer	Hányinger, hányás, hasmenés, hasfájdalom
Máj	Májenzimértékek emelkedése, gyulladás, fibrózis
Vese	Akut tubuláris nekrózis, fehérjevizelés, vérvizelés
Vér és vérképző szervek	Véralvadászavar, hemolitikus anémia, csontvelő károsodás, akut leukémia
Bőr	Kiütések, eritémák, allergiás elváltozások

A fentieket figyelembe véve kijelenthetjük, hogy napjainkban a hazai környezetvédelmi gyakorlat egyik legfontosabb kihívása a felszín alatti vizek és a földtani közeg klórozott alifás szénhidrogén szennyezettségének felderítése és megszüntetése.

2.2. Környezeti kármentesítés

Magyarországon a környezetszennyezések okozta károk csökkentése, megszüntetése és a környezet védelme csak az utóbbi évtizedekben került előtérbe. Napjainkra elfogadottá vált az a tény, hogy a termelés során szinte minden esetben számolni kell a különböző szennyezések környezetbe kerülésével, így minden potenciálisan veszélyes tevékenység megkezdése előtt részletes hatástanulmányt kell készíteni. Ez a környezetvédelmi előírások szigorítását és a betartásukhoz szükséges technológiák fejlődését is eredményezte. Ezenfelül, számos környezetvédelmi határozatot és programot hoztak létre, melyek a természetes környezetet ért káros hatások visszaszorításával, a szennyezett területek felmérésével és kezelésével foglalkoznak³.

A környezetszennyezés okozta károk csökkentésének legegyszerűbb módja a megelőzés, a szennyezők emissziójának megakadályozása lenne. Sajnos ez sok esetben nem oldható meg, mivel ezek a vegyületek már a környezetbe kerültek korábbi mezőgazdasági vagy ipari tevékenység során. Ezért legfontosabb szempontként azt kell szem előtt tartani, hogy a technológiai fejlődés olyan irányba mutasson, amely a lehető legkisebb környezeti szennyezéssel jár (BAT - Best Available Techniques)²².

A múlt évszázadban nem tulajdonítottak nagy jelentőséget ezeknek az irányelveknek, így az alkalmazott technológiák jelentős környezeti károkat okoztak¹¹. Annak ellenére, hogy a jelenlegi jogszabályozási háttérnek köszönhetően már nem lehetséges nagymértékű környezetvédelmi szennyezés kockázatával járó gazdasági tevékenységbe kezdeni, a jórészt megszűnt egykori környezetszennyező tevékenységek által hátrahagyott szennyeződések felmérése és kármentesítése még mindig napjaink egyik legfontosabb feladata. Az ilyen „örökölt” szennyeződések legveszélyesebb jellemzői, hogy rejtve vannak, nehezen hozzáférhetőek, illetve a talajban és a talajvízben hosszútávon toxikus hatásúak. Hazánkban az ipari fejlődést követően számos olyan klórozott alifás szénhidrogénnel szennyezett terület maradt hátra¹¹, amelyek további hasznosítása feltételezi a terület szennyezettségének megszüntetését, kármentesítését.

2.2.1. Remediációs eljárások és csoportosítási lehetőségei

A remediáció (a latin *remedium* – gyógyszer, gyógyítás szóból) a szennyezett környezeti elemek és/vagy fázisok (a talaj, a felszíni és felszín alatti vizek stb.) környezeti kockázatának elfogadható mértékűre csökkentése, valamint multifunkcionalitásának megőrzése, helyreállítása.

A környezeti remediációs eljárások alatt minden olyan környezetvédelmi céllal végzett műszaki, gazdasági, igazgatási tevékenységet és intézkedéssorozatot értünk, amelynek a célja az, hogy a szennyező anyagok és a környezet kölcsönhatásait felügyelt feltételek mellett módosítsa és elindítson egy ellenőrzött lebontási folyamatot, amelynek eredményeként a szennyező anyag mennyisége csökken vagy veszélytelen vegyületté alakul át.

A hazai környezetvédelemben a kilencvenes évek eleje óta alkalmazzák azokat a kármentesítési (remediációs) technológiákat, amelyekkel a földtani közegek és a felszín alatti vizek eredményesen kezelhetők, illetve a bekövetkezett károk mérsékelhetők.

A szennyezőanyag(ok) tulajdonságainak függvényében számos kármentesítési eljárás ismert, amelyeknek előnyei és hátrányai meghatározzák alkalmazhatóságukat az adott helyzetben. A megfelelő kármentesítési technológia kiválasztása során a következő szempontokat kell figyelembe venni²³: a kármentesítendő közeg meghatározása; a rendelkezésre álló és kivitelezhető technológiák vizsgálata; a beavatkozás sürgősségének és több terület esetében a fontossági sorrend megállapítása; a szennyezett terület elhelyezkedése, nagysága és egyéb jellemzői; a szennyezőanyag jellemzői; a szennyezett terület szennyezőanyag kibocsátása, a szennyeződés terjedése; a szennyeződés terjedésének felmérése; a mentesítési határérték meghatározása; a remediációs folyamatok idő- és költségigénye; a kármentesítés humán és környezeti kockázata, ezek mérséklése; a kármentesített terület utóhasznosításának lehetőségei.

Az eljárásokat többféle szempont alapján csoportosíthatjuk, azonban meg kell jegyezni, hogy mivel a szennyezett közegre általában a szennyezők nagyfokú heterogenitása jellemző, így a környezetvédelmi kármentesítési gyakorlatban legtöbbször különböző technológiák kombinációját alkalmazzák. A kármentesítési módszereket lehet a tisztítási elv szerint is csoportosítani^{1,23}:

- *Kémiai-fizikai eljárások*: a cél egyaránt lehet a szennyező komponensek immobilizálása, illetve közvetlenül a mennyiségük csökkentése. Ilyen eljárások pl. kémiai oxidáció vagy redukció, talajmosás, talajlevegőztetés, stabilizáció.
- *Termikus eljárások*: a beavatkozások célja lehet a komponensek immobilizálása vagy éppen ellenkezőleg, a mobilizálásának serkentése. Ilyen eljárások pl. égetés, pirolízis.
- *Biológiai eljárások*: cél a szennyező komponensek mobilizálása vagy immobilizálása. Olyan beavatkozások tartoznak ide, melynek során a szennyeződés környezeti kockázat csökkentése mikroorganizmus(ok) vagy növények átalakító, biodegradáló vagy bioakkumuláló tevékenységén keresztül valósul meg, pl. biostimuláció, bioaugmentáció.

- *Ökomérnöki eljárások*: A technológiai céllal kialakított, a szennyeződés specifikumait szem előtt tartva ún. mezokozmoszt, vagyis több fajt tartalmazó vízi, sekélyvízi vagy szárazföldi ökoszisztémát alkalmaznak, pl. eleven iszapos szennyvíztisztítás, fitoremediáció.

Az eljárásokat a beavatkozás helye szerint, alapvetően két csoportba sorolhatjuk²³:

- *In situ* (eredeti helyzetben) eljárások: ebbe a körbe tartozik valamennyi olyan eljárás, amikor a szennyezett földtani közeget, beleértve az egyes talaj fázisokat is természetes kifejlődésük környezetéből nem távolítják el, nem termelik ki a tisztítás során.
- *Ex situ* (nem eredeti helyzetben) eljárások: ide tartoznak azok a beavatkozások, amelyek nem a szennyeződés eredeti helyén valósulnak meg.

Megjegyzendő, hogy szinte minden fizikai, kémiai vagy biológiai remediálási módszer alkalmazható *in situ* is, az alkalmazhatóságot általában a szennyezett talaj mennyisége, a hozzáférhetőség és a technológia költsége limitálja.

A klórozott alifás vegyületek további kezelést igényelnek a korábban (2.1.1 fejezet) említett káros ökológiai hatásaik megelőzése, csökkentése érdekében. A már környezetbe kikerült szennyezések esetén kármentesítési eljárásokra van szükség. A nagy kiterjedésű, nehezen hozzáférhető klórozott szénhidrogénnel szennyezett területek kármentesítésénél az *in situ* technológiák alkalmazása az előnyös, mert:

- helyben kivitelezhetőek,
- lakott, beépített terület is kármentesíthető,
- a környezet csak minimálisan változik meg, a remediáció során is hasznosítható,
- szállítási költségeket lehet megtakarítani,
- mivel nincs közeg kiemelés, így nem kell az esetleges hulladékok kezelésével számolni,
- nagy hatékonyságuk mellett gyakran olcsóbbak, mint az *ex-situ* technológiák,
- az egyes kármentesítési eljárások jól adaptálhatók/alkalmazhatók a szennyeződés típusához,
- kombinálhatóak más remediációs technikával.

Az *in situ* remediáció hátránya, hogy a maradék szennyezettség és a köztitermékek miatt a munkálatok során fokozott kockázattal kell számolni, hiszen a szennyezett környezeti elem/fázis nincs izolálva a nem szennyezett környezettől²⁴.

2.3. Klórozott alifás szénhidrogének *in situ* remediációs lehetőségei

A halogénezett vegyületek korábban ismertetett széles körű felhasználása (2.1.1 fejezet) speciális tulajdonságaiknak köszönhető. A bennük lévő szén-halogén kötés igen erős, így stabilak, a kötés ereje a halogén atom növekvő molekulatömegével csökken. A halogén szubsztituens csökkenti a vízzoldékonyságot és növeli a lipofil tulajdonságot, melynek következménye a biológiai hozzáférhetőség csökkenése, a felhalmozódás növekedése. A halogén szubsztituens mennyisége, formája és mérete szintén hatással van a vegyület tulajdonságaira, pl. toxicitás, mutagenitás²⁵. A remediáció kulcsfontosságú lépése a halogénezett szénhidrogének lebontásánál a halogén atom és szénatom közötti kötés megbontása²⁶.

Amennyiben az *in situ* eljárás feltételei teljesülnek, akkor a klórozott alifás szénhidrogénekkel szennyezett területek kármentesítésére az egyik legelterjedtebben alkalmazható módszerek a biodegradáción és a kémiai lebontáson alapuló módszerek. A következő pontokban ezeket ismertetjük részletesen.

2.3.1. Bioremediáció

A fenntarthatóság jegyében, a jelenlegi környezetvédelmi irányelveket figyelembe véve minden olyan esetben, ahol lehetséges, a biológiai módszerek alkalmazását kell előnyben részesíteni. Ezek az eljárások tekinthetők a legtermészetesebb kármentesítési módszernek. Biodegradáció alatt a mikroszervezetek biokémiai anyagcsere folyamatain keresztül megvalósuló, lebontási (katabolitikus), illetve átalakítási (transzformációs) folyamatokat értjük. A bioremediáció során a mikrobák ezen képességeit kihasználva tudjuk a környezetszennyező anyagokat lebontani. Ezek alapján elmondható, hogy a bioremediációs technológiák közös feladatai a mikrobiális anyagcsere serkentése és fenntartása. A következő bioremediációs módszereket különböztetjük meg:

- *Öntisztulás – Természetes szennyezőanyag csökkenés*

Mesterséges beavatkozástól mentes, a szennyezett közegben megjelenő környezethez alkalmazkodva (adaptálódva) a kárhelyen lévő mikroszervezetek közül azok szaporodnak fel, amelyek képesek a szennyező anyag hasznosítására, lebontására.

- *Biostimuláció – Természetes biodegradáció fokozása*

A szennyezett területen lévő őshonos vagy a szennyezéshez már adaptálódott mikrobák növekedését és aktivitását serkentik fermentálható szerves szubsztrát vagy egyszerű elektrondonorok (pl. hidrogén, melasz, tejsavó, acetát) adagolásával. A

további adalékok lehetnek még szerves tápanyagok (általában nitrogén, foszfor, kálium és élesztő kivonat), amelyek a mikrobák növekedését serkentik, pH-t szabályozó vegyületek, vagy szerves adalékanyagok, amelyek biogeokémiai folyamatokat stimulálnak.

- *„Ösztönös” talajoltás*

A módszer során a kármentesítendő közegből izolálják a degradációs tulajdonsággal rendelkező mikroszervezeteket és az – általában szelektív táptalajokon kiválogatott – törzseket szaporítják, majd nagy mennyiségben visszajuttatják (inokulálják) a szennyezett közegbe.

- *Bioaugmentáció – „Tervezett” talajoltás*

Ha az őshonos mikroba populáció nem képes a szennyezők hatékony lebontására, faji szinten identifikált, ismert degradációs, patogenitási és érzékenységi stb. tulajdonságokkal rendelkező mikrobákat adagolnak a kármentesítendő közegbe.

A biológiai alapon végezhető degradációs eljárások előnyei, hogy jelentős kiterjedésű területekre is alkalmazhatóak és a szennyezett terület minimális átalakításával járnak. Nem igényelnek komolyabb infrastruktúrát, a többi kármentesítési beavatkozáshoz képest kisebb a költségigény, míg a terület eredeti élővilágával, mikroba közösségével kíméletesebbek. Hátrányuk a köztes bomlástermékek esetleges felhalmozódása, az időigényesség, valamint a környezeti tényezőktől (pl. hőmérséklet, pH) való függőség. Továbbá a szennyezett közeg és a szennyező anyagok sajátosságai ezen módszerek hatékonyságát erőteljesen befolyásolják²³.

2.3.1.1. Biológiai remediáció klórozott szénhidrogének esetében

A természetes rendszerek kiszámíthatatlanságának és komplexitásának köszönhetően az *in situ* kísérletek gyakran bizonytalan és nem meggyőző eredménnyel járnak²⁷. Ezért azt, hogy az adott területen mely beavatkozás lehet sikeres, mindig az előzetes laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek döntik el. A mikrokozmosz kísérletek során kontrollált környezetben, kis térfogatban, komplex ökológiai rendszerben vizsgálhatjuk a szennyezőanyagok sorsát, a degradációt, a mikrobiális közösség szerkezetének változásait és az esetleges beavatkozás egyéb következményeit²³. Az eredmények segíthetnek megismerni és megérteni a területen zajló ökológiai folyamatokat, következtethetünk belőlük a beavatkozás hatékonyságára, így megkönnyíthetik a remediáció megtervezését²⁸.

Éppen ezért nem véletlenül alakult ki a környezetvédelmi gyakorlatban, hogy a klórozott szénhidrogénbontó közösség ujjlenyomat-mintázatának változását is gyakran követik mikrokozmosz kísérletek segítségével laboratóriumi körülmények között²⁹.

Bár évtizedekig a halogén atomot tartalmazó szerves vegyületeket kizárólag antropogén eredetűnek tartották, az utóbbi években több mint 3000, természetes úton keletkezett halogénezett szénhidrogént azonosítottak³⁰. Emellett kimutattak reduktív dehalogenációt végző mikrobákat természetes környezetben³¹. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy – az addig xenobiotikumnak tartott – halogénezett szerves vegyületek bioremediációs folyamataiban érdemes a dehalogenációt végző mikrobákra fókuszálni.

A biodegradációs folyamatok során a mikrobák (baktériumok és gombák) a lebontani kívánt vegyületet átalakíthatják és hasznosíthatják, mint szénforrást (osztódás, szaporodás céljából), vagy mint energiaforrást (ATP szintézis, energiatermelés céljából), illetve ún. aspecifikus, kometabolikus reakciókban (sem szénforrásként, sem energiaforrásként nem hasznosulnak). Energetikai szempontból a biodegradáció olyan elektronátadási folyamat, melyben a szerves anyagok szén- és energiaforrásként hasznosulhatnak, az oxidációjukból nyert energia pedig a sejtek felépítéséhez és azok fennmaradásához járul hozzá. Az elektronátadáshoz és az anyagcseréhez azonban szükség van elektronakceptorra is, mely az elektront felveszi. Az aerob biodegradáció során az oldott oxigén szolgál elektronakceptorként a mikroorganizmusok számára, míg az anaerob lebontási folyamatoknál molekuláris oxigén hiányában az anaerob mikroorganizmusok alternatív elektron-akceptorokat felhasználva oxidálják a környezetükben feldúsuló szerves anyagokat. Ebből adódóan a denitrifikáló mikroorganizmusok nitrátot, nitritet, a fémredukáló mikroorganizmusok mangán- vagy vas-oxidokat, a szulfátredukáló baktériumok szulfátot és a metanogén baktériumok szén-dioxidot használnak elektronakceptorként. Az elektrontranszport lánc révén minden olyan elektrondonor-elektronakceptor redox pár felhasználható energiatermésre, amelyek légzési láncba csatolásával legalább egy protonnyi proton hajtóerő jön létre. A halogénezett szénhidrogének reduktív deklorinációja során maga a halogénezett szénhidrogén vegyület a végső elektronakceptor, így e lebontási folyamatot általánosan dehalorespirációnak is nevezik. A folyamatban például klór esetén, a klór szénnél magasabb elektronegativitásából adódóan ($EN_{Cl}=3$; $EN_C=2,5$) a szerves molekulában nem a szén, hanem a klór veszi fel az elektront.

2.3.1.2. Klórozott alifás szénhidrogének biodegradációja

A klórozott etilének közül a PCE, TCE mikrobiológiai úton történő lebontása redukció útján lehetséges, a DCE és VC oxidatív (ún. aerob) és redukzív (ún. anaerob) körülmények között is lebontható³². A mai napig nem írtak le olyan szervezetet, mely aerob körülmények között képes volt a PCE-t és a TCE-t, mint egyedüli szénforrást hasznosítani.

A szennyezett területeken általában az anaerob folyamatok dominálnak, mivel nagyobb mélységekben az oxigén már nem elérhető elektronakceptor a mikroorganizmusok számára²⁸. A környezeti feltételek és a mikrobiális kompetíció egyértelműen meghatározzák, mely anaerob biodegradációs folyamatok dominálhatnak (2.1. ábra). Anoxikus talajvíz rétegben a termodinamikailag kedvezőbb folyamatok jelennek meg, először a denitrifikáció, ezt követik a mangán- és a vasredukciós folyamatok, majd a szulfátredukció, végül a metanogenezis²⁸.

2.1. ábra. Redukáló zónák a szennyezett területen³³

Számos kevert és tiszta kultúrával végzett kutatás eredménye igazolta, hogy a klórozott etilének bontásában a meghatározó anyagcsere folyamat az anaerob redukzív dehalogenáció folyamata, de előfordul oxidatív (pl. *Pseudomonas stutzeri*, ami az elsőként leírt anoxikus, denitrifikáló körülmények között a 2-klóretanolt szén és energiaforrásként hasznosítani képes baktérium) és fermentatív (pl. *Dehalobacterium formicoaceticum* a diklórmétánt fermentálja acetáttá és formiáttá) mechanizmus is oxigénhiányos környezetben³⁴.

Mivel a dolgozatban anaerob körülmények között végeztük a vizsgálatainkat így csak az anaerob redukzív lebontást mutatjuk be részletesen.

2.3.1.3. Anaerob lebontás

Anaerob, azaz oxigénmentes környezetben a klórozott alifás szénhidrogének lebontása ún. dehalorespiráció vagy redukzív deklorináció útján történik (2.2. ábra). Ez a folyamat végbemehet kometabolikus vagy metabolikus útvonalon.

Anaerob kometabolikus redukzív deklorinációt figyeltek meg metanogén³⁵, acetogén³⁶, illetve szulfátredukáló³⁷ baktériumok esetén. Ezen anaerob baktériumok a reakciót nem energiaszerző, hanem kometabolikus útvonalon végzik, különböző enzimek vagy kofaktorok által katalizálják a redukzív deklorinációt.

Energiaszerző folyamat során a mikroba a klórozott szénhidrogént, nem szénforrásként, hanem terminális elektronakzeptorként használja fel az energiatermelő folyamataiban³⁸.

A dehalorespiráció során a szerves szénforrás lebomlása közben felszabaduló hidrogén ($H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$) az anaerob klórléző baktériumok segítségével átadódik az illékony klórozott vegyületre, amely ilyen módon redukzívan deklórozódik. Tehát a hidrogenolitikus redukzív deklorináció során a $PCE \rightarrow TCE \rightarrow DCE \rightarrow VC$ vegyületek konszekutív redukcója történik, és minden egyes lépésnél egy klorid/hidrogén ion szubsztitúció játszódik le (2.2. ábra).

2.2. ábra. A klórozott alifás szénhidrogének redukzív deklorinációs útvonala

Először a *Desulfomonile tiedjei* törzsnél figyelték meg ezt a folyamatot, 3-klórbenzoáttal³⁹, majd később kimutatták, hogy a törzs képes a klórozott alifás vegyületek,

így a PCE és TCE deklorinálására is⁴⁰. Azóta számos törzset azonosítottak, amelyek képesek a redukív dehalogenáció bizonyos lépéseit végrehajtani, pl. a PCE-t, a TCE-t vagy a klórbenzoátot használják elektronakceptorként a biológiai energiaszerzésben. Ilyen baktériumok például a *Dehalococcoides mccartyi* (korábban *Dehalococcoides ethenogenes*)⁴¹, a *Desulfitobacterium chlororespirans*⁴² és a *Dehalobacter restrictus*⁴³.

A kármentesítés célja a poliklórozott etilénszármazékok teljes, etilénig, illetve etánig történő lebontása³⁰. Megfelelő mikrobiális összetétel esetén, ha kellően negatív redoxpotenciál (-200-tól -400 mV-ig) és elegendő mennyiségű kiegészítő tápanyag áll rendelkezésre, a redukív deklorináció elméletben teljesen végbemehet, PCE-től etilénig. Azonban gyakran tapasztalható részleges deklorináció, és ezzel párhuzamosan DCE, illetve VC köztitermékek felhalmozódása. Sokszor ez a felhalmozódás okozza a legnagyobb problémát, mivel a kevésbé klórozott etilének toxikusabbak, mint a PCE vagy a TCE²¹.

A *Dehalococcoides mccartyi* 195 volt az első és az egyetlen azonosított baktérium törzs, ami egymaga képes véghezvinni a deklorinációt: PCE-t, illetve TCE-t etilénig alakítani^{41,44}. Azonban itt a deklorináció során csak a VC eléréséig történik energiaszerző redukció, az utolsó lépés, ahol a VC etilénné alakul, kometabolikus és lassú folyamat⁴⁵.

A *Dehalococcoides* sp. BAV1 az elsőként felfedezett törzs, amely képes a cDCE összes izomerjét és a VC-t, mint elektronakceptort hasznosítani⁴¹. Az utóbbi 10 évben további, a klórozott etilének bontásában résztvevő *Dehalococcoides* törzseket is sikeresen izoláltak, amelyeket szintén a *Dehalococcoides mccartyi* fajhoz soroltak. Ezek a következő törzsek: CBDB1, FL2, GT és VS⁴⁶. A hat törzs (195, BAV1, CBDB1, FL2, GT és VS) 16S rRNS génjének bázissorrendje több mint 98%-os hasonlóságot mutat. Filogenetikai elemzések alapján a Chloroflexi csoportba tartoznak (2.3. táblázat, 2.3. ábra).

2.3. táblázat. PCE, TCE bontására képes *Dehalococcoides* törzsek

Törzs	Elektronakceptor	Elektrondonor
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195	PCE, TCE, DCE, VC, klóretánok, klórbenzének	H ₂
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BAV1	DCE, VC	H ₂
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> FL2	TCE, DCE, VC	H ₂
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> GT	TCE, DCE, VC	H ₂
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> VS	DCE, VC	H ₂

Nem minden *Dehalococcoides* törzs képes a PCE vagy a TCE teljes deklorinációjára (2.3. ábra)^{44,47}. Az egyes *Dehalococcoides* törzseket vizsgálva azt tapasztalták, hogy vannak

olyan törzsek, amelyek az egyes klórozott alifás szénhidrogéneket más mechanizmussal bontják. Pl. a *Dehalococcoides* FL2 törzs redukciós deklorinálja a TCE-t és cDCE-t, viszont a PCE-t és a VC-t kometabolizmussal bontja. A *Dehalococcoides* BAV1 törzs pedig a DCE-t és VC-t képes terminális elektronakzeptorként hasznosítani, míg a PCE-t és TCE-t kometabolizmussal bontja⁴⁸.

2.3. ábra. A klórozott etilének bontásában résztvevő mikrobák⁴⁹

2.3.1.4. Biodegradációban résztvevő baktériumok kimutatása

A környezeti kármentesítés során kiemelt jelentőségű a degradációban résztvevő mikrobák azonosítása és jellemzése. Ezáltal meg tudjuk becsülni a mikrobák fontosságát, bontási képességét és a közösségi anyagcserében betöltött szerepét.

Habár a talajmikrobák közösségeit éveken keresztül tenyésztésen és izoláláson alapuló módszerekkel vizsgálták, ma már molekuláris biológiai módszerek használatosak, ugyanis ezek a mikrobák sokszor laboratóriumi körülmények között nem tenyésztethetők (a prokarióta fajok <1%-a vonható tenyésztésbe), vagy a kevert kultúrák esetében annyira kevés van belőlük, hogy jelenlétük nem mutatható ki hagyományos módszerrel⁵⁰.

Mint korábban már említettük, az ismert *Dehalococcoides* törzsek közül csak a *Dehalococcoides mccartyi* 195-nél igazolható, hogy képes a PCE teljes deklorinációjára (PCE-től etilénig), de ezen kívül számos *Dehalococcoides* törzsről igazolták, hogy a deklorináció egy vagy több lépését képesek véghezvinni⁴⁶.

Egy környezeti mintánál a *Dehalococcoides* 16S rRNS gén kimutatása egy jó indikátor arra, hogy a területen feltételezhető olyan endemikus mikroflóra, mely képes a klórozott alifás szénhidrogének deklorinációjára. A 16S rDNS régió egy meglehetősen konzervált szakasz, mely az adott baktérium filogenetikai besorolására alkalmas, de a közeli rokonságban lévő törzsek esetében is vannak reprezentatív eltérések (V2 és V6 hipervariábilis régió)⁵¹. Például az egyes *Dehalococcoides* izolátumok 16S rRNS génszekvenciák alapján három ún. alcsoportba sorolhatóak: Cornell (ide tartozik pl. a *Dehalococcoides mccartyi* 195 is), Victoria (pl. *Dehalococcoides mccartyi* VS) és Pinellas (*Dehalococcoides mccartyi* BAV1, CDBD1, FL2 és GT)⁴⁶.

16S rRNS gént vizsgálva, világszerte számos klórozott etilénnel szennyezett területen mutattak ki *Dehalococcoides* törzseket⁵². Ugyanakkor a *Dehalococcoides* 16S rRNS gén jelenléte és diverzitása nem tükrözi a tényleges deklorinációs potenciált, önmagában nem igazolja a teljes deklorináció végbemenetelét⁴⁷. Az, hogy a teljes deklorináció végbemege-e egy területen, mindig attól függ, hogy kialakult-e olyan baktérium konzorcium, mely együttesen képes a deklorináció összes lépésnek véghezvitelére. Ezért a *Dehalococcoides* 16S rRNS gén mellett érdemes megvizsgálni, hogy kimutathatóak-e olyan gén szekvenciák, melyek az egyes deklorinációs lépéseket katalizálják. Ilyen specifikus, katabolikus gének a redukzív dehalogenáz gének (*rdhA*, RDáz)⁵³. Ezek a gének felelősek a redukzív dehalogenáz enzim katalitikus aktivitásáért, amelyek a redukzív deklorináció során egy klór atomnak egy klórozott etilén molekulából történő kihasítását katalizálják³⁰. Az első redukzív dehalogenáz, melyet izoláltak, a *Desulfomonile tiedjei* 3-klorobenzoát redukzív dehalogenáza volt. Számos deklorináló *Dehalococcoides* törzs redukzív dehalogenáz génjeit azonosították már a mai napig, azonban jelenleg csak keveset tudunk a *Dehalococcoides* és RDáz gének változásáról, diverzitásáról terepi körülmények között.

Ismert redukzív dehalogenáz enzimet kódoló gének:

- *pceA* gén (PCE redukzív dehalogenáz; amely a perkloroetilén (PCE) RDáz enzimet kódolja, izolálták és azonosították a *Dehalococcoides mccartyi* 195, és a *Dehalococcoides* sp. CBDB1 törzsekben, valamint *Dehalospirillum multivorans*-nál^{44,54});
- *tceA* gén (TCE redukzív dehalogenáz; amely a triklóretén (TCE) RDáz enzimet kódolja, megtalálható a *Dehalococcoides mccartyi* 195 és FL2 törzsek genomjában^{54,55});
- *vcrA* gén (vinil-klorid redukzív dehalogenáz; amely a vinil-klorid (VC) RDáz enzimet kódolja, izolálták és azonosították a *Dehalococcoides* sp. VS és GT törzsekben^{56,57});

- *bvcA* gén (vinil-klorid redukzív dehalogenáz; amely a vinil-klorid (VC) RDáz enzimet kódolja, izolálták és azonosították *Dehalococcoides* sp. BAV1 törzsben⁵⁴).

A felsorolt gének mind egy-egy redukciós lépésért, egy-egy dehalogénezésért felelős enzimet kódolnak.

Az esetek többségében a talajok tartalmaznak egy természetes anaerob mikroflórát, ahol anoxikus körülmények között, aktív szulfátredukáló és metanogén szervezetek is okozhatják a PCE és TCE vegyületek redukcióját cDCE-ig. A problémát sok esetben az okozza, hogy a deklorinációs útvonal a cDCE-nél vagy VC-nál leáll. Ezért érdemes olyan enzimmódoló gének vizsgálatát is elvégezni, melyek a cDCE és azt követően a VC redukciójáért felelős enzimek jelenlétét igazolják (*vcrA* és *bvcA*)⁵³. Ezen enzimek detektálásával kimutatható, hogy a vizsgált környezetben van-e olyan baktérium, amely képes a redukzív deklorináció során a cDCE és a VC átalakítására.

2.3.1.5. Kompetitív mikroorganizmusok a redukzív deklorináció során

A közeg fizikai, kémiai jellemzői és a baktériumpopuláció összetétele mellett, a deklorináció hatékonysága nagyban függ a rendelkezésre álló hidrogén mennyiségétől, az uralkodó redox körülményektől, az elérhető elektronakceptorok és elektrondonorok mennyiségétől, illetve a szénforrás elérhetőségétől.

Sok esetben a CAH szennyezéssel érintett terület tartalmaz olyan endemikus mikroflórát, mely képes a szennyezés redukzív úton történő eliminációjára. Mivel a vegyületek elektronakceptorként vesznek részt a folyamatban, szükséges a mikrobiológiai aktivitás fokozásához elektrondonor biztosítása (ún. biostimulációs eljárás alkalmazása). Az elektrondonor vegyületek elsősorban hangyasav vagy hidrogén, melyet anaerob fermentatív szervezetek cukrok, szerves savak vagy alkoholok lebontásával biztosítanak.

Az elektrondonorok azonban nem csak a deklorinációt végző mikroflóra aktivitását segíthetik, hanem olyan egyéb endemikus baktériumok szaporodását is, melyek az alkalmazott elektrondonor vegyületet képesek hasznosítani⁵⁸. Ilyenek például a metanogén, acetogén vagy szulfátredukáló baktériumok, melyek kompetitív szervezetek lehetnek a deklorinációt végző mikrobák számára. Ha az adott területen a nem megfelelő mikroflóra feldúsítása történik, az nemkívánatos végtermékek (pl. metán, kénhidrogén stb.) keletkezéséhez vagy a részleges deklorinációból keletkező toxikus metabolitok felhalmozódáshoz vezethet.

A redukzív deklorinációban kulcsfontosságú elektrondonor a hidrogén. A felszín alatti közegben a hidrogén biztosítására legalkalmasabb módszer az anaerob fermentáció

alkalmazása. Azonban anaerob mikroflórában a hidrogénért, mint elektrondonorért versengés alakul ki a deklorináló baktériumok és egyéb kompetitív mikrobák között. Számos tanulmányban vizsgálták, hogy a hidrogénért folytatott verseny során mely mikrobiális reakció domináns, a H_2 koncentráció csökkenése alapján a következő sorrend a valószínűsíthető: acetogenezis > metanogenezis > deklorináció és szulfátredukció > Fe (III) redukció > Mn (IV) redukció > denitrifikáció (2.4. táblázat).

2.4. táblázat. A H_2 koncentráció határértékei

Reakció	H_2 koncentráció (nmol/L)	Hivatkozás
Acetogenezis	400	Yang és McCarty (1998) ⁵⁹
Metanogenezis	7-11	Yang és McCarty (1998) ⁵⁹ , Lovely (1994) ⁶⁰
Deklorináció	<2	Yang és McCarty (1998) ⁵⁹ , Smatlak (1996) ⁶¹
Szulfátredukció	1-4	Lovely (1994) ⁶⁰ , Chapelle (1996) ⁶²
Fe (III) redukció	0,1-0,8	Lovely (1994) ⁶⁰ , Chapelle (1996) ⁶²
Mn (IV) redukció	<0,05	Lovely (1994) ⁶⁰
Denitrifikáció	<0,05	Lovely (1994) ⁶⁰

A legtöbb szerző egyetért abban, hogy alacsony (kisebb, mint 0,3 nmol/L) hidrogénkoncentráció kedvező a deklorinációnak, míg 5-95 nmol/L tartománynál már a metanogén baktériumok dominálnak⁶³. Éppen ezért preferált a lassan fermentálható (alacsony hidrogénkoncentrációt biztosító), metanogén baktériumok számára nem felvehető szubsztrátok alkalmazása, mint például butirát vagy propionát vagy politejsav, illetve emulzifikált növényi olajok használata⁶⁴.

A deklorináló és szulfátredukáló baktériumok közötti versengés már vitatottabb, mivel a szulfátredukció hidrogénkoncentráció küszöbértéke 1-4 nmol/L, ami már megközelíti a deklorinációnak kedvező 0,3 nmol/L értéket. A szerzők véleménye megoszlik, van, aki szerint a szulfátredukció nincs gátló hatással a deklorinációra, más szerzők szerint azonban gátló hatás léphet fel⁶⁵.

Tehát a fentiek alapján elmondható, hogy a szubsztrátok és ebből keletkező elektrondonorok adagolásával szabályozható a klórozott alifás szénhidrogének lebontása. A lebontó klororespiráló közösség számára hozzáférhető hidrogén mennyiségét és arányát megfelelő körülményekkel megállapítva, minimálisra csökkenthető a hidrogén kompetíció más mikroba csoportokkal, mint pl. metanogén, acetogén és szulfátredukáló baktériumok. A lassan felhasználódó szubsztrátok alkalmazása költségtakarékossági szempontból is előnyös, ugyanis ezzel csökkenthető a beavatkozások száma⁴⁸.

2.3.2. Kémiai lebontás – *In situ* kémiai redukció

A már említett, számos elérhető kémiai elven alapuló remediációs technológia közül a dolgozathoz kapcsolódóan a nulla vegyértékű nanoméretű vassal megvalósuló kármentesítési eljárást (*in situ* kémiai redukció) fogjuk részletesebben bemutatni ebben a fejezetben.

2.3.2.1. Nulla vegyértékű vas nanorészecskék általános jellemzése

Az elmúlt pár évtizedben a több tudományágat is átfogó nanotechnológiai kutatásokban robbanásszerű fejlődés következett be, melynek következményeként olyan új, nagyhatékonyságú anyagokat, illetve eszközöket ismertünk meg, amelyek jelentős segítséget nyújthatnak az iparosodott világ egyik legnagyobb kihívásával, a környezetszennyezéssel szemben. Ebbe egyrészt beletartoznak a továbbfejlesztett analitikai módszerek, újszerű adszorbensek és szennyezőanyag-kibocsátást szabályozó készülékek, valamint a korábbiaknál jobban teljesítő talaj- és talajvíz remediációs technológiák. Utóbbiak közé sorolhatók az olyan elemi állapotú fémet (ilyen pl. vas, magnézium, cink stb.) felhasználó módszerek, ahol a fém alkalmas vizes közegben, szerves komponensek (klórozott alifás, nitro-aromás, poliklórozott bifenilek, peszticidek stb.) redukciójára^{66,67}. A szakirodalomban fellelhető adatok alapján a nulla vegyértékű vas nanorészecskék (nZVI=nano zero valent iron, nanovas, nFe⁰) kezdettől fogva fontos szerepet játszottak a nanotechnológia környezetvédelmi alkalmazásában (nanoremediáció)^{68,69}.

A vas nanorészecskék vizes közegben és oxigén jelenlétében kémiaiilag nem stabilak. Az oxigén redukciója során keletkező hidroxid-ionok és a vas oxidációja során keletkező Fe²⁺ ionok reakciója Fe(OH)₂, majd Fe₂O₃ vegyületek képződéséhez vezet, ez okozza a felületi oxidréteg megjelenését is. A kialakuló külső oxidréteg miatt a nanovas részecskék héjas szerkezetűek, ahol a nagy reaktivitású fém a héjon belül, a magban található (2.4. ábra). Az ilyen nanorészecske tulajdonságait döntően befolyásolja az, hogy milyenek a héj transzport tulajdonságai és milyen a kémiai természete. Az ilyen rendszer viselkedése jóval összetettebb, mint a csak fémből álló részecskéké, különösen akkor, ha figyelembe vesszük, hogy tulajdonságai módosulnak a környezet megváltozása során és az idő múlásával⁷⁰.

2.4. ábra. A vas részecske héjas szerkezete, és a felületén végbemenő redukációs reakciók⁷⁰

Mindezek mellett a részecske reakcióba lép a környezetével is, a reakciópartner lehet pl. a víz vagy az oldat valamilyen egyéb komponense, illetve a jelenlévő szennyezések. Az eltelt idő itt is komoly tényező lehet. Mivel a fém vas termodinamikailag a legtöbb környezetben nem stabil, ezért várható, hogy a hosszabb távú tárolás során oxidáció vagy egyéb reakciók fognak végbemenni az anyagban. Bár a tömbfázisú vas esetén a kismértékű rozsdásodás még nem okoz jelentős változásokat az anyag tulajdonságaiban, viszont az ugyanekkora korrózió már jelentősen megváltoztatja a nanoméretű részecskék kémiai jellemzőit. Bár a vas nanorészecskéket igyekeznek inert környezetben tárolni (oxigéntől elzárva, száraz helyen, esetleg vákuumban), azonban az idő előrehaladtával így is megfigyelhető a korrodálódás következménye.

2.3.2.2. Nulla vegyértékű vas nanorészecskék szerepe a környezeti remediálásban

A nulla vegyértékű vasat (Fe^0) – részecskemérettől függetlenül – már régóta ismerik, mint kiváló elektrondonor reakciópartnert. A hétköznapi életből a legjobb példa erre a vastárgyak oxidálódás általi korróziója. A rozsdásodás során a fém vas Fe^{2+} (ferro-), illetve Fe^{3+} (ferri-) ionná oxidálódik a levegőben lévő oxigén hatására, ami eközben vízzé redukálódik. Érdekes módon, miközben a vas korróziójának káros hatása évezredek óta ismert, ugyanennek a folyamatnak a környezettechnológiai alkalmazása egészen az 1980-as évek közepéig váratott magára⁷¹. Miután megfigyelték, hogy a talajvízmintákban található, klórozott szénhidrogént tartalmazó oldószerek vasból és acélból készült tárgyak jelenlétében

elbomlanak, gyorsan megnőtt az érdeklődés a viszonylag olcsó és nem toxikus vas, mint potenciális talajvíztisztító anyag iránt⁷².

A nulla vegyértékű vas nanorészecske újfajta lehetőséget teremt a szennyezett talaj és talajvíz kezelésében. Kis (0-100 nm közötti) méretükből adódóan a vas nanorészecskék nagyon reaktívak (sokkal reaktívabbak, mint a szemcsés vas, aminek használata bevett módszernek számít a reaktív gátnál), így sokkal könnyebb őket eljuttatni a szennyezés helyére, segítségükkel megoldható a szennyezések *in situ* ártalmatlanítása is. A nanorészecskéknek közvetlenül a felszín alá történő bejuttatása sikeres módszernek bizonyult: segítségükkel hatékonyan alakíthatóak át a klórtartalmú szerves anyagok is⁷³. A nagyobb reakcióképesség következtében hígabb szuszpenzió formájában alkalmazhatóak, ami jelentősen megnöveli az egy pontban történő bejuttatás hatásterületét, vagyis sokkal kevesebb injektálopontot kell kialakítani, mint a szemcsés vas alkalmazása esetén, és lényegesen kevesebb vas bejuttatására van szükség. A gyors reakció miatt, kevésbé költséges, rövidebb kezelési idő szükséges. A redukció eredményeként nem-toxikus végtermékek keletkeznek (pl. TCE lebontása során etán a végtermék⁷⁴). Az *in situ* kezelés miatt kevesebb felszerelésre és felszíni berendezésre van szükség, ami csökkenti a költségeket, illetve az embereket és környezetet is kevesebb hatás éri. Ezenkívül a nanovas alkalmazásával gyorsabb lebontást (pl. TCE lebontásánál) figyeltek meg a szintén remediációban használt szemcsés vas alkalmazásával szemben⁷⁵. További előnye, hogy a nanorészecskék olyan reakciókban is részt vehetnek, amelyek a szemcsés vasra nem jellemzőek, mint például a poliklórozott bifenilek lebontása⁷⁶.

A nanorészecskék emellett nagyon rugalmasan használhatók fel, akár *in situ*, akár *ex situ* helyzetben. Például a nanorészecskék könnyen elhelyezhetők zagyreaktorokban, ahol hatékonyan képesek részt venni a szennyezett talaj, az üledék és a szilárd hulladék kezelésében. Egy másik lehetőség az, ha a nanorészecskéket szilárd hordozóhoz rögzítjük, pl. aktivált szénhez vagy zeolithoz, az így kapott anyag felhasználható a víz, a szennyvíz vagy éppen gázelegyek megtisztítására is^{77,78}.

Az évek során számos, különböző tulajdonságokkal rendelkező nanorészecskét sikerült előállítani, és a már ismert szintézismódszereket jelentősen továbbfejlesztették. Továbbá, rengeteg laboratóriumi és helyszíni kísérletet végeztek el, és egyre több szennyező anyag ártalmatlanítására találták meg a megfelelő technológiát. Ennek eredményeként a vas nanorészecskék mára a környezetre ártalmas vegyületek jelentős részével szemben hatékonyan alkalmazhatóak: a nanovas nagyon ígéretes a nehézfémek (pl. Cr(VI), Hg²⁺ és Ni²⁺) és a radionuklidok (UO₂²⁺) immobilizálása szempontjából, továbbá felhasználható

klórtartalmú vegyületek (pl. klórozott etének/etánok, klórbenzolok, bifenilek), peszticidek (pl. DDT, lindán), vagy szervesetlen anionok (pl. perklorát, nitrát) ártalmatlanítására is^{9,66,68,69,79}.

2.3.2.2.1. A nulla vegyértékű vas hatásának kémiai alapjai

Az elemi vas (Fe^0) közepesen erős redukálószer, vagyis képes elektrondonorként viselkedni a megfelelő reakciópartnerrel szemben:

A nulla vegyértékű vas és a Fe^{2+} ionok által alkotott redoxi pár standard elektródpotenciálja (E^0) -440 mV, ami lehetővé teszi, hogy a vas, számos, a környezetben előforduló vegyülettel reakcióba lépjen. Ilyenek például a hidrogénion (proton), az oldott oxigén, nitrátok, szulfátok vagy karbonátok⁸⁰. Aerob körülmények között például a vas az alábbi reakció szerint reagál az oldott oxigénnel:

Ennek a reakciónak 25 °C-on a teljes redoxpotenciálja +1710 mV, ami azt jelzi, hogy termodinamikai szempontból nagyon kedvezményezett folyamatról van szó⁸¹. A sztöchiometria szerint a reakcióban négy elektron szabadul fel a vas felületéről, és a protonfogyasztás miatt növekszik az oldat pH-ja. Ha további oldott oxigén is jelen van, akkor a képződött Fe^{2+} ionok továbboxidálódnak Fe^{3+} ionokká. A megnövekedett pH azonban kedvez a vas-hidroxid és a karbonát alapú csapadék kiválásának, ami passziválhatja a reaktív fém felületét⁸⁰.

Anaerob körülmények között, de legalábbis a talajvíz kisebb oldott oxigén szintje esetén a víz fogja oxidálni a fém vasat, aminek következtében a Fe^{2+} mellett hidroxidion és hidrogéngáz is keletkezik:

Az oldott oxigén redukciójával ellentétben a vízzel való reakció termodinamikailag nem kedvező, ahogy azt a -390 mV-os standard redoxpotenciál is jelzi⁸¹. Továbbá, ez és más, természetes vizekben végbemenő reakciók kinetikai szempontból elég lassúak, és általában nem jutnak el a kémiai egyensúly állapotába⁸².

A (2.2) és (2.3) egyenletek alapján elmondható, hogy a vas részecskék adagolásának hatására jelentősen megnő a rendszer pH-ja és lecsökken a redoxpotenciálja. Erősen redukáló környezet jön létre, mivel a vas elfogyasztja az oxigént és más oxidálószerket a rendszerből, és a reakciókban H_2 gáz keletkezik.

A laboratóriumi kísérletekkel szemben a természetes környezetben a pH és a redoxpotenciál változása nem mindig ilyen nagymértékű, mivel a diffúzió és a keveredés igyekszik visszaszorítani ezeket a hatásokat. A pH növekedése és a redoxpotenciál csökkenése kedvez az anaerob mikroorganizmusoknak, ami gyorsabb biodegradációt tesz lehetővé. A képződő hidrogéngáz és a Fe^{2+} ionok szintén előnyösek lehetnek ebből a szempontból. Ezért a kármentesítésben a szennyezőanyagok lebontására a nulla vegyértékű vas alkalmazásának bioremediációval való kombinálása egy optimális technológiát feltételez.

A leggyakrabban előforduló természetes elektronakceptorok mellett a vas reakcióba lép számos redukálható szennyező anyaggal is. A kármentesítés reduktív folyamatában a szennyező és a reaktív vas közötti kémiai termodinamikai egyensúly hiányát használják fel. Minél nagyobb a redoxpárok standard redoxpotenciál értékei közötti különbség, annál nagyobb a termodinamikai hajtóerő. A perkloroetilén reduktív dehalogénezése például (a PCE/TCE redoxpár E^0 -értéke kb. 580 mV) vassal (Fe^0/Fe^{2+} E^0 -értéke kb. -440 mV) sokkal spontánabban zajlik le, mint a diklóroetilén vinil-kloriddá való redukálása (cDCE/VC E^0 -értéke kb. 360 mV). Az első esetben a potenciálkülönbség kb. 1020 mV, a másodikban kb. 800 mV⁸³.

2.3.2.2.2. Nulla vegyértékű vas alkalmazása klórozott szénhidrogének kármentesítésében

Számos jól bevált technológia ismert az illékony szerves anyagok ártalmatlanítására, de csak nagyon kevés olyan megoldás ismert, amellyel megoldható a sűrű, nem vízfázisú folyadékok (DNAPL) eltávolítása. Mint már említettük (2.1.1 fejezet), a klórozott szénhidrogének okozta szennyezések nehezen kezelhetők, mivel ezek az anyagok hidrofóbok és nagyon perzisztensek. A felszín alatt egyre messzebb jutnak el, és lassan beleoldódnak a talajvízbe. Mivel diffúziókontrollált folyamatokról van szó, ez az oldódás akár évtizedekig is eltarthat.

A szakirodalmi adatok alapján a nulla vegyértékű nanovas szemcsék klórozott vegyületek *in situ* környezeti remediálásban betöltött vezető szerepe vitathatatlan^{68,69,80,84,85}. A következőkben a vas részecskék ezen vegyületek lebontásában vizsgált szerepét ismertetjük részletesebben.

A vegyületcsalád reakciójának standard redoxpotenciálja a +500 és +1500 mV közötti tartományban változik, így vassal történő redukálásuk termodinamikailag kedvezményezett⁸⁰.

A klórozott szénhidrogének lebontása többféle redukciós útvonalon is végbemehet⁸⁶. Közülük az egyik a hidrogenolízis vagy redukatív dehalogénezés, amelynek során a halogénatomok egymást követő lépésekben cserélődnek ki hidrogénre. Egy általános, klórozott alifás szénhidrogén (RCl) hidrogenolízise a következőképpen zajlik:

Ez az útvonal a halogénezett metán⁸⁰ és ecetsav⁸⁷ származékok redukálásánál tekinthető domináns reakciónak. A perkloroetilén (PCE) hidrogenolízis útján történő teljes deklórozásához több lépésre van szükség: a PCE-ből előbb triklóretilén (TCE), majd diklóretilén (DCE), vinil-klorid (VC), végül pedig etilén, majd etán keletkezik⁸⁶. Ez a reakciósor a 2.5. ábra folytonos nyilai mentén követhető végig.

2.5. ábra. A PCE deklórozásának lépései: hidrogenolízis (folytonos nyíl), β -elimináció (pontozott nyíl) és hidrogénezés (szaggatott nyíl)⁷⁹.

Ezeknél a reakciólépéseknél különösen fontosak az egyes reakciók relatív sebességei, mivel ezek határozzák meg, hogy egyes perzisztens és veszélyes köztitermékek (pl. a vinil-klorid) felhalmozódnak-e. Mint ismertettük ez a lebontási útvonal jellemző a bioremediációban is.

A dehalogénezés másik fontos útvonala két halogénatom együttes eliminációjával játszódik le, amelynek során a klóratomok hátrahagynak egy-egy elektront, amiből a szénatomok között π -kötés jön létre. Ha a reakcióban szomszédos szénen lévő klóratomok eliminálódnak, akkor vicinális dehalogénezésről vagy β -eliminációról beszélünk. A PCE bomlásának β -eliminációs lépéseit a szaggatott nyilak jelzik (2.5. ábra). A vassal végzett redukálás 70-90%-ban β -eliminációs lépéseken keresztül zajlik le elsősorban akkor, ha a szennyező anyag közvetlenül érintkezhet a vassal. Általánosságban a vicinális dihaloalkénekből alkének, a vicinális dihaloalkánokból pedig alkének jönnek létre⁷⁹; a TCE β -eliminációja során például az első lépésben klóracetilén keletkezik.

A két fő reakciótípus mellett további, kisebb jelentőségű reakciók is szerepelnek a deklórozási reakciósorban⁸⁶. Az egyik ilyen a hidrogénezés, amelynek során hidrogén addicionálódik a szén-szén kettős vagy hármas kötésre, a másik pedig a dehidrohalogénezés, ami egy proton és egy halogenid anion eliminációjával, ezt követően pedig egy szén-szén π -kötés kialakulásával jár. A hidrogénezés akkor kap nagyobb szerepet, ha olyan kétfémes katalizátort használnak, amely a fém vas szemcsék mellett egy katalitikusan aktív fém, pl. palládiumot is tartalmaz⁸⁸. A másik folyamat, a dehidrohalogénezés nem jellemző a Fe^0 reakcióira, annak ellenére sem, hogy báziskatalizált folyamatról van szó, így a vas korróziójával járó pH-növekedés felgyorsíthatja a reakciót⁸⁶.

Fontos, hogy a szennyezők lebontása teljes legyen, mert ha csupán részleges, akkor átmeneti vegyületek képződnek, és ezek szintén toxikus hatásúak lehetnek a talaj mikroflórájára^{21,89}. A felhasznált reaktív nanovas nem specifikusan reagál a szennyezőanyaggal, hanem redukálószerként minden olyan anyaggal reakcióba lép, amely oxidált állapotban van, azaz elektronakceptor. Ez egyben azt is jelenti, hogy a redukálószer egy része nem a célvegyület ártalmatlanítására fordítódik, ezért az alkalmazott reagens mennyiségét ehhez kell igazítani a beavatkozás során. Ugyanakkor nagyfokú szennyezés esetén nagy mennyiségű redukálószerre van szükség, így a technológiák gazdaságosabbá tételére nagy az igény.

2.3.3. Vas nanorészecskék hatása a talajban élő baktériumokra

A nano mérettartományba tartozó anyagok a rendkívül kis méretük következtében minőségileg új tulajdonságokkal rendelkeznek, így más környezeti kockázattal is járhatnak, mint a szemcsés megfelelőik. A méretükből adódóan megváltozott kedvező tulajdonságaikat a fizika, a kémiai és az orvosbiológia területén hasznosítják, ugyanakkor a lehetséges környezeti kockázataikkal, sokkal kisebb mértékben vagy egyáltalán nem foglalkoznak⁹⁰. Ennek ellenére már több éve nagy mennyiségben használják őket és így közvetlenül, vagy közvetett utakon ki is kerülhetnek a természetbe⁹¹.

Mint ahogy bemutattuk, a nanovassal történő *in situ* remediáció a laboratóriumi és terepi tesztkísérletek alapján ígéretes innovatív technológiának mutatkozik. Különösen alkalmas lehet a klórozott szénhidrogénekkal szennyezett felszín alatti környezet remediációjára, mivel a közismert antimikrobiális tulajdonsága ellenére esélyes jelölt lehet egy bioremediációval kombinált kémiai lebontásban⁹². Ugyanakkor az alkalmazás során figyelembe kell venni azt is, hogy ez az anyag potenciális veszélyt jelent az élő környezetre: a beavatkozás során a földfelszín alá bejuttatott nanovas kapcsolatba kerülhet a felszíni vizekkel és annak élő szervezeteivel, akár toxikus hatást kifejtve, továbbá tartósan felhalmozódhat az ökoszisztémában.

Kármentesítés során, nanovas alkalmazásával sem lehetséges a talaj/talajvíz szennyeződések 100%-ban eliminálni. A legtöbb szennyezett területen a kármentesítési határértékek teljesítéséhez célszerű – költséghatékonysági szempontból – végső lépésként bioremediációt alkalmazni. Ebből kifolyólag fontos megérteni, hogyan hat a nanovas a kezelt terület geokémiai viszonyaira, valamint mikrobiális összetételére és diverzitására. A vas részecskék mellett, hogy erős redukálószer, az újabb kutatások szerint gátló vagy stimuláló hatást fejtenek ki a különböző baktériumok populációjára^{93,94}, habár a hatások pontos mechanizmusa még nem ismert.

Lee és munkatársai bebizonyították, hogy laboratóriumi tiszta *Escherichia coli* (*E. coli*) kultúrákba mg/L-es nagyságrendű koncentrációban beadagolt nanovas baktericid hatású mind aerob, mind anaerob körülmények között semleges pH-n⁹⁵. Ennek oka valószínűleg kettős: egyfelől a sejtmembrán szétesik, másrészt reaktív oxigéntartalmú szabadgyökök is keletkeznek, melyek szintén roncsolják a sejteket⁹⁶. A baktericid hatás kisebb mértékű volt nagyobb vasszemcsék, nanoméretű vas-oxid szemcsék vagy öregített nanovas részecskék alkalmazása esetén.

Li és munkatársai szerint, a nanovas részecskéken mesterségesen létrehozott, vagy természetes módon kialakult bevonatok csökkentik a toxicitást⁹⁷. Fang és munkatársai kimutatták, hogy a nanovas hatására szétesik a sejtmembrán, lipid peroxidáció és DNS roncsolódás következik be⁹⁸. A nanovásról felszabaduló ionok egyes enzimek inaktiválódásához vezethetnek⁹⁹.

A legtöbb tanulmányban tiszta kultúrán végzett vizsgálatról számolnak be^{95,100}. Az elérhető molekuláris biológiai módszerek egyre szélesedő tárháza lehetővé teszi a nanovasas, illetve a bioremediációval kombinált nanovasas beavatkozások kifinomultabb vizsgálatát is⁹². Azonban jelenleg még kevésbé ismert, hogy a különböző módszerekkel előállított nanovasas kezelés miként befolyásolja komplex rendszerek őshonos mikrobapopulációjának, úgymint a talajbaktériumok populációjának diverzitását^{101,102}, annak ellenére, hogy ezen mikrobaközösségek számos szennyezőanyag lebontásában fontos szerepet játszanak^{102,103}.

Mint már említettük, bizonyos *Dehalobacter* és *Dehalococcoides* törzsek képesek a klórozott alifás szénhidrogének teljes vagy részleges deklorinációjára^{47,104}, így a nanovas ezen baktériumokra gyakorolt hatásának feltérképezése kulcsfontosságú. Ebből a felismerésből adódóan számos publikáció született, amiben a nanovasnak anaerob környezetben végbemenő, a mikrobiológiai dehalogenizáció folyamatát stimuláló hatásáról számoltak be¹⁰⁵. Yin és munkatársai szerint a vas anaerob korróziója során keletkező molekuláris hidrogén, amely részt vesz a szennyezőanyagok redukciójában is, felelős a stimuláló hatásért¹⁰⁶. Ezzel ellentétben Diao és munkatársai, valamint Xiu és munkatársai azt tapasztalták, hogy 1 g/L-es koncentrációban a nanovas toxikus hatású lehet az őshonos baktériumok populációjára, gátolhatja a biológiai deklorináció folyamatát a remediáció során^{93,94}. Tilston és munkatársai szintén gátló hatást figyeltek meg a lebontásban résztvevő baktériumok csoportját vizsgálva, és kimutatták, hogy a nanovas adagolás egyértelműen megváltoztatta a talaj mikrobiális összetételét¹⁰⁷. Xiu kísérletei alapján azonban a TCE bontásában résztvevő baktériumokat csak kezdetben gátolta a nanovas, azonban egy idő után visszanyerték aktivitásukat⁹³. Fajardo és munkatársai szerint a nanovas nagyobb koncentrációban való alkalmazása (1; 5; 10 g/L) kezdetben jelentős toxikus hatást fejtett ki a talajbaktériumok populációjára, de 2 nap után már nem volt megfigyelhető a toxikus hatás, valószínűleg a részecskék aggregálódása miatt¹⁰¹. A terepi tesztek során a „hópehely” alakú vas nanorészecskék csak rövid ideig fejtettek ki enyhén toxikus hatást a deklórozó baktériumok populációjára¹⁰⁸.

A nanovas szulfátredukáló és metanogén baktériumokra gyakorolt hatását illetően a kutatók véleménye nem egységes¹⁰². Míg egyik tanulmányban a nanovas adagolása után a

deklorináló baktériumok gátlása mellett a velük hidrogénért versengő metanogén és szulfátredukáló baktériumok stimulálásáról számoltak be^{59,61}, addig egy másik publikációban a szulfátredukálókra nézve éppen a fordított hatásról olvashatunk tiszta kultúra esetében a vas nanorészecskék ugyanazon koncentrációja mellett¹⁰⁹. Kirschling és munkatársai három különböző szennyezett területről származó mintán vizsgálták az eltérő összetételű nanovas reagensek (poliaszpartát bevonattal ellátott nanorészecskék és a reaktív nanovas részecskék) hatását mikrokozmosz rendszerekben. A kvantitatív PCR eredménye alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a redukzív körülmények, valamint a nanovas hatására keletkező hidrogén együttesen stimulálták a szulfátredukáló és a metanogén mikrobákat. Továbbá, a mikrokozmoszokban nem volt megfigyelhető a teljes mikrobiális abundancia csökkenése a nanovas kezelés után, sőt a biodegradálható poliaszpartát bevonat serkentő hatással volt a baktérium populációkra, valószínűleg azért, hogy depolimerizációjukból könnyen metabolizálható szubsztrátokhoz jutnak a mikrobák¹⁰².

Ezen eredmények alapján felmerül a kérdés, hogy a hasonló populációkon végzett hasonló kutatások eredményei hogyan térhetnek el ennyire egymástól, minek köszönhető vajon a megfigyelt különböző hatás. Lehetséges, hogy a vas nanorészecskék szintéziskörülményei nem csak a kialakult részecskék kémiai-fizikai tulajdonságait határozzák meg, hanem hatással vannak a részecskék biológiai aktivitásra is.

A fentiekben látott egymásnak ellentmondó és az ezekhez hasonló, de még ismeretlen folyamatok azonosítása, valamint a különböző módon előállított nanovásnak a mikroflórára, különösképpen a klórozott etilének deklorinációjában résztvevő baktériumokra gyakorolt hatásának megismerése kulcsfontosságú a nanovas biztonságos környezeti alkalmazásához.

2.3.4. Vas nanorészecskék előállítása

Az egyre jobb teljesítménnyel rendelkező és sokszor költséghatékonyabb eljárásoknak köszönhetően a nanotechnológiát egyre gyakrabban alkalmazzák a környezeti kármentesítés során is¹¹⁰. A kisméretű nanorészecskék előállítására többféle mód is kínálkozik. Alapvetően kétféle stratégiát különböztetünk meg: egyrészt az ún. „top-down” eljárásokat, amelyek az anyag dezintegrálásán, méretének csökkentésén alapulnak, másrészt pedig az ún. „bottom-up”, vagyis alulról építkező módszereket¹¹¹. A vas nanorészecskék mind a kétféle megközelítéssel előállíthatóak, de az utóbbi a gyakoribb, vagyis általában önszerveződő rendszerekről van szó. A „top-down” módszerek legnagyobb gyengéi a magas előállítási költség, illetve, hogy speciális eszközöket igényelnek, általában lassú a szintézis és ezekkel a módszerekkel csak kis mennyiségben állíthatóak elő a nanorészecskék¹¹². Ilyen módszer például a fém vas nanorészecskék precíziós őrléssel történő előállítása golyósmalomban¹¹¹. Ezzel a technikával azonban szabálytalan alakú és könnyen aggregálódó részecskéket kaptak. Egy másik „top-down” módszer a vákuumban végrehajtott porlasztásos szintézis, mely során jól lehet szabályozni a részecskék képződését, és befolyásolni a bevonat tulajdonságait is, ugyanakkor magas a költség- és eszközigenye¹¹³. A „bottom-up” módszerek közül később ismertetünk részletesebben párat a teljesség igénye nélkül.

Hwang és munkatársai tanulmányukban rámutattak, hogy a különböző technikával gyártott nanorészecskék fizikai és kémiai tulajdonságai is eltérhetnek, és az oxid bevonat szerkezetében is találhatóak különbségek, ezért felhasználástól függően a megfelelő szintéziskörülményeket kell kiválasztani¹¹⁴.

Habár a vas nanorészecskék előállítása során a kémiai módszerek közül egyértelműen a redukciós eljárásokat alkalmazzák a legszélesebb körben, egyéb eljárások is ismertek. Tekintsük át a következőkben röviden a vas nanorészecskék előállítására kidolgozott szintézismódszereket, kitérve az előállított részecskék egy-egy jellegzetes tulajdonságára.

2.3.4.1. Kémia redukció

A legelterjedtebben alkalmazott módszerek a vas nanorészecskék előállítására a redukción alapuló szintézisek¹¹⁵. A redukció során prekursorként leggyakrabban Fe^{3+} - és Fe^{2+} -sókat alkalmaznak és az oldatban lévő vas-ionokat redukálják nulla vegyértékű vassá. A kiindulási vas vegyületek vizes és vagy etanos redukálására legtöbbször nátrium-borohidridet használnak¹¹⁶.

A laboratóriumi és helyszíni kísérletekben legelőször vas(III)-klorid prekursorból kiindulva állítottak elő vas nanorészecskéket^{76,117}. A szintézis során 0,25 M nátrium-borohidrid oldatot adagoltak 0,045 M koncentrációjú vas(III)-klorid oldathoz lassan, folytonos kevertetés mellett úgy, hogy a két oldat térfogata közel megegyezett. A kevertetés kb. 1 órán keresztül tartott. A reakció az alábbi egyenlet szerint ment végbe:

Ebben az összetételben a nátrium-borohidridet 7,4-szeres feleslegben adagolták a vas(III)-mal szemben, ezzel igyekeztek biztosítani a vas kristályok gyors és egységes méretű képződését. A kapott részecskéket ezután vákuumszűréssel különítették el az oldattól, és etanollal mosták. Az így előállított vas részecskék mérete 50-200 nm volt, a fajlagos felületük kb. 33,5 m²/g-nak adódott⁷⁶.

A vas(II)-szulfát prekuzorként való alkalmazására két jelentős probléma miatt volt szükség. Az erősen savas és higroszkópos vas(III)-klorid használata egészségügyi és biztonsági szempontból sem ajánlott, másrészt a vas(II)-szulfát használata jóval költségkímélőbb választás. Továbbá, ha Fe(II)-t tartalmazó nyersanyagot használunk a nanovas részecskék előállításához, akkor kevesebb redukálószerre van szükség, mint a jobban oxidált Fe(III)-nál.

Zhang és munkatársai kísérletükben a vas(II)-szulfátból kiinduló szintézis során 0,50 M nátrium-borohidridet adtak 0,28 M vas(II)-szulfát oldathoz 0,15 L/perc sebességgel, 1:1 térfogatarányban⁹. A reakció az alábbi sztöchiometria szerint ment végbe:

Ennél a reakciónál 3,6-szoros nátrium-borohidrid felesleget alkalmaztak, ami jóval kevesebb a fentebb említett vas(III)-kloridból kiinduló módszerhez használt feleslegnél. Emiatt a nátrium-borohidrid hozzáadását is lassabban végezték, hogy jobban tudják szabályozni a részecskék méretét. Éppen ezért a kisebb reagensigény miatti költségcsökkenést ellensúlyozta a szintézishez szükséges hosszabb idő. A képződött nanorészecskéket vákuum szűrővel leszűrték, majd desztillált vízzel és etanollal mosták, nitrogén alatt szárították. A kapott részecskék mérete 50-70 nm volt, továbbá 80%-uk kisebb volt, mint 100 nm, és 30%-uk még 50 nm-nél is kisebbnek adódott. A vas részecskék fajlagos felülete 35 m²/g volt, ami közelítőleg megegyezik a vas-kloridból előállított részecskék fajlagos felületével.

A röntgendiffraktometriás vizsgálatok alapján mindkét típusú nanorészecske esetében az elemi vasra jellemző reflexiók domináltak, azonban mindkét minta tartalmazott kisebb mennyiségben vas-oxidokat is. Fryxell és munkatársainak vizsgálatai alapján, a vas-oxid megjelenése a levegővel való érintkezés következménye, és csak a részecskék felszínén van jelen, a vas részecskék belsejében nem található meg¹¹⁷. A szintézis után 48 órával elvégzett röntgendiffraktometriás mérések a vas-oxid reflexiójának növekedését mutatták, de az elemi állapotú vas jól láthatóan még mindig jelen volt. Ezért a részecskék passziválódásának elkerülése érdekében a redukációs eljárásokat inert környezetben végzik, általában nitrogén gáz bevezetésével, ez azonban jelentősen növeli a költségeket.

Wang és Zhang mindkét típusú vas részecskét sikeresen tesztelték klórozott etilének bontásában mind laboratóriumi, mind terepi teszt során. A szintézismódszereket bemutató cikket számos publikációban hivatkozták, amelyekben a hasonlóan előállított részecskéket vizsgálták, elsősorban szennyezőanyagok lebontásában. A vas nanorészecskék segítségével a környezetre ártalmas vegyületek jelentős része felszámolható, pl. megoldható a nehézfémek immobilizálása, az illékony halogénezett szénhidrogének, a nitroaromás vegyületek, vagy a szervesetlen anionok ártalmatlanítása^{9,68-70,95}.

A nátrium-borohidrid drága és veszélyes vegyszer, a vas nanorészecskék szintézise során oxidált bórvegyületek keletkeznek, melyek nagyon nehezen választhatóak el a végterméktől, miközben több országban is tilos bórvegyületeket a talajba vagy a talajvízbe juttatni¹¹⁸. A kármentesítés során a vas nanorészecskék nagyobb mennyiségben való alkalmazására van szükség, így egyéb költséghatékonyabb, környezetkímélőbb, ipari méretekben is felhasználható eljárások kidolgozása indokolt.

Magas pH-n, oxigén jelenlétében a nátrium-ditionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) is használható a Fe(II) -sók redukálására, és ezáltal nanovas előállítására a következő egyenlet szerint¹¹⁸⁻¹²⁰:

A nátrium-ditionit a nátrium-borohidridnél jóval olcsóbb és sokkal kevésbé mérgező vegyület, továbbá a vas-ionokkal reagálva nem fejlődik veszélyes hidrogén, így a kezelése is egyszerűbb és a reakció köztes termékei sem veszélyes anyagok. Emellett, a passzivált nanovas részecskék redukáló kapacitását is képes visszaállítani¹¹⁹. Ma és munkatársai a szintéziseik során Fe(II) -klorid kiindulási vas vegyületet használva állítottak elő nanovas részecskéket, melyeket sikeresen teszteltek a triklóretilén bontásában¹²¹. Eredményeik alapján, habár a részecskék nem rendelkeztek akkora redukációs kapacitással, mint a

nátrium-borohidriddel előállított minták, alkalmasnak bizonyultak a triklóretilén lebontására. Továbbá, ezen részecskék előállítása 6-szor kevesebbe került, mint a borohidrides módszerrel¹²².

Amellett, hogy a nátrium-ditionitos módszerben felhasznált vegyszerek olcsóbbak, mint a nátrium-borohidrides szintézis során használtak, leginkább azért tekinthető ún. „félig-zöld” módszernek az előbbi eljárás, mert nem érzékeny az oxigén jelenlétére. Így akár kezeletlen csapvíz is felhasználható a reakcióban és nincs szükség inert atmoszféra vagy költség- és energiaigényes technológiák (pl. N₂ buborékoltatás, nyomásszabályozó eszközök) alkalmazására. A költségek további csökkentése érhető el egyéb olcsóbb, nem toxikus vas(II)-vegyületek (pl. vas-szulfát) alkalmazásával. Ezáltal a nátrium-ditionitos módszer egy kis ökológiai lábnyommal rendelkező, ipari méretben „Open Air” kivitelezhető technológia.

Megjegyzendő, hogy a redukciós módszerrel kétfajta fém tartalmazó (bimetál) nanorészecske előállítására is van lehetőség. A második fém a vas mellett lehet például a palládium, ami katalizálhatja a hidrogénnel történő redukciót. Ilyen esetben az etanollal mosott vas nanorészecskét olyan etanolos oldathoz adják, amely kb. 1% palládium(II)-acetátot tartalmaz, amit az elemi állapotú vas redukálni fog fém palládiummá. Wang és munkatársai kutatásuk során, mikroszemcsés (mZVI), nanoméretű (nZVI) és palládiumot tartalmazó (nZVI/Pd) elemi állapotú vasat hasonlítottak össze szén-tetraklorid bontásában⁷⁶. A szén-tetraklorid lebontása tipikus példája a klórozott szénhidrogének ártalmatlanításának. A legjobb deklórozási teljesítményt a nZVI/Pd-mal sikerült elérni, ezt követte a nZVI, majd pedig a mZVI. A nZVI/Pd két nagyságrenddel gyorsabban bontotta el a szén-tetrakloridot, mint a mZVI. A három reakcióban ugyanazok a termékek képződtek (kloroform, diklórmétán és metán), de eltérő arányban. A diklórmétán – ami toxikusabb, mint a kiindulási vegyület – legkisebb százalékban a nZVI/Pd-mal végzett redukcióban keletkezett, és itt volt a legnagyobb a metán kitermelés. A nZVI/Pd jobb teljesítményét két dologra vezették vissza. Egyrészt a nZVI fajlagos felülete jócskán meghaladta a mikrométeres szemcsékét, másrészt a palládium jelenléte lehetőséget biztosít a katalitikus redukció számára is¹²³. Xu és Zhang hasonló módszerrel sikeresen állított elő bimetál részecskéket, ahol a vas mellett a másik fém platina, nikkel, ezüst, kobalt és réz volt¹²⁴.

2.3.4.2. Mikroemulziós eljárás

Mikroemulziós szintézisek során két egymással nem elegyedő fázisból hoznak létre inverz (fordított) micellás rendszert, melynek vizes fázisában a nanorészecskék kialakulásához szükséges prekursorok vannak feloldva. Nagyon kézenfekvő megoldásról van

szó, hiszen a mikroemulziós cseppméret szabályozásával könnyedén befolyásolhatjuk a nanorészecskék méretét is. Ezzel a módszerrel milligrammos vagy a micellák stabilizálásával (kotenizdek) akár több grammos mennyiség is előállítható. Az így előállított nanorészecskék általában monodiszperzek, viszont problémát jelenthet a részecskék elválasztása és begyűjtése, mivel ilyen körülmények között a részecskék a szuszpendált állapotot preferálják. A részecskék összegyűjtéséhez használt módszerek – pl. a micella destabilizálása – azonban a részecskék aggregálódásához vezetnek. A micella technikával előállított egyedi nanorészecskék felületét tehát szinte mindig valamilyen felületaktív anyag foglalja el.

Li és szerzőtársainak kísérletei során a V/O (inverz) mikroemulzió szerves fázisát az n-oktán alkotta, a felületaktív anyag cetiltrimetilammónium-bromid (CTAB) volt, a kotenzid pedig az 1-butanol¹²⁵. A fenti elegyhez 0,1 M koncentrációjú vas(III)-klorid vizes oldatot adtak, majd szilárd nátrium-borohidridet, ami a Fe^{3+} ionokat redukálta a korábban már leírt egyenlet szerint. Az előállítás teljes folyamata nitrogén atmoszférában történt. A kapott vas részecskék közel gömb alakúak és egységes méretűek voltak, az átlagos részecskeméret 10 nm alatt volt. Ezzel szemben a hasonló módszerrel, oldatban előállított vas részecskék mérete 20 és 70 nm között változott, az átlagos átmérő 50 nm körül volt, és a részecskeklaszterek láncszerűen helyezkedtek el. Méréseik alapján a mikroemulzióban előállított vas nanorészecskék energiadiszperzív röntgenanalízise szerint az anyag csak fém vasat tartalmazott és 5 g/L-es koncentrációban alkalmazva 100 mg/L-es TCE teljes redukálásához 75 órára volt szükség.

Wang és szerzőtársai hasonló körülmények között CTAB alkalmazása mellett vas-szulfát prekursorból kiindulva állítottak elő levegőn is stabil vas nanorészecskéket, azonban a micella destabilizálása után a részecskék könnyen aggregálódtak¹²⁶. Li és szerzőtársai Tween 60 és Span 80 felületaktív anyagok együttes felhasználásával szintén vas-szulfát prekursorból kiindulva kálium-borohidriddel sikeresen szintetizáltak monodiszperz, kerekded vas részecskéket, hasonlóan megfigyelve a részecskék aggregálódását a demulgeálás után¹²⁷.

2.3.4.3. Ultrahangos kezelés

Jamei és munkatársai az ultrahangos kezelés hatását vizsgálták a vas nanorészecskék szintézise során¹²⁸. Megfigyelték, hogy az ultrahangos besugárzás hatással volt a részecskék növekedésére és aggregációs hajlamára. Azt tapasztalták, hogy növelve a besugárzás teljesítményét a gömbszerű részecskékből előbb lemez alakú, majd tűszerű szerkezetek alakultak ki. Továbbá megfigyelték, hogy a besugárzás hatására csökkent a részecskék

mérete, nőtt a fajlagos felületük és nagyobb kristályossági fokkal rendelkeztek összehasonlítva a hagyományos nátrium-borohidrides módszerrel előállított részecskékkel. Ugyanakkor a részecskék aggregációs hajlama drasztikusan nőtt a méretük csökkenésével. Andreas és szerzőtársai levegőn stabil részecskéket állítottak elő a vas prekursor (vas-pentakarbonil) 3 órás ultrahangos kezelésével¹²⁹. A szintézis során különböző étolajokat (repce és kukorica) is felhasználtak, aminek eredményeként az ultrahangos kezelés során keletkezett vas részecskék egy vegyes összetételű polimermátrixba ágyazódtak be. Ezt az anyagot azután argonban felmelegítették, és a hőkezelés hatására a polimer karbonizálódott. A vas egy része elreagált a szén bevonattal, és vas-karbid keletkezett. A kapott anyag hat hónapon keresztül stabil maradt, klórozott szénhidrogének lebontásában sikeresen alkalmazták.

2.3.4.4. Elektrodepozíció

Banerjee és munkatársai az elektrodepozíciós technika alkalmazásával szilikagéles mátrixban állítottak elő olyan α -vas nanorészecskéket, amelyek átmérője 4,9 és 11,1 nm között változott¹³⁰. Az elektrondiffrakciós vizsgálatok azt mutatták, hogy a vasrészecskék felületén vas-oxidból (Fe_3O_4 vagy $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) álló héj található. Kiindulásként vas(III)-kloridból és szilícium-dioxidból különböző összetételű géleket készítettek. Az elektrodepozícióhoz a gélekből desztillált vízzel összekeverve pasztát készítettek, amivel bevonták az alkalmazott vas katód felületét. Ezután a vas anódot a gél pasztára helyezve 10, illetve 20 V feszültség mellett végrehajtották az elektrodepozíciót. A különböző összetételű gélből más-más feszültségen leválasztott vas nanorészecske minták átmérőinek mediánja és a hozzájuk tartozó szórások alapján megállapították, hogy a vas részecskék mérete csökkenthető, ha növeljük a kiindulási Fe^{3+} koncentrációt, vagy nagyobb feszültséget alkalmazunk.

2.3.4.5. Kémiai gőzfázisú leválasztás

Choi és munkatársai a kémiai gőzfázisú leválasztás (CVD) módszerével állítottak elő közel gömb alakú, 6-25 nm átlagos átmérőjű vas nanorészecskéket¹³¹. Vas-pentakarbonilt használtak prekursorként, ennek pirolízise eredményezte a vas szemcséket, amelyek részben elreagáltak a jelenlévő kevés oxigénnel, így oxidbevonatú vas nanorészecske keletkezett. Megfigyelték, hogy a pirolízis hőmérsékletének növelésével a minták kristályossági foka nőtt. Ugyanakkor az átlagos részecskeméret a pirolízis hőmérsékletével együtt csökkent, 400 °C-on az átmérő minimális volt, a méreteloszlás pedig szimmetrikus. Ennél alacsonyabb hőmérsékleten nem sikerült előállítani a nanorészecskéket. A hőmérséklet növelésével a

méreteloszlás egyre szélesebb és egyre aszimmetrikusabb lett. Észrevették, hogy a hőmérséklet-növelés hatására a részecskeátmérő mediánja eltérő mértékben növekszik argonban és héliumban. A növekedés azzal magyarázható, hogy a nagyobb hőmérséklet miatt a telített gőznyomás is növekszik, ami fokozza a vas részecskék növekedését. Továbbá a gázfázisú vas részecskék kinetikus energiája is megnő, így gyakoribbak lesznek az ütközések köztük, ami szintén kedvez a részecskék növekedésének. Hélium atmoszférában ez a növekedés jóval lassabb, valószínűleg a hélium nagyobb mobilitása és hővezető képessége miatt, ami miatt a vas részecskék gyorsabban kondenzálódnak.

2.3.4.6. Karbotermikus eljárás

A vas nanorészecskék karbotermikus redukcióval is előállíthatóak¹³². Az eljárás során valamilyen vas-oxidot (pl. a természetben előforduló vasércet – goethit) általában szénnel, szén-dioxiddal vagy szén-monoxiddal redukálnak magas hőmérsékleten. A technológia előnye, hogy a kiindulási anyagok nagy mennyiségben, olcsón rendelkezésre állnak, ugyanakkor a magas hőmérséklet miatt költséges módszerről beszélünk.

2.3.4.7. Termikus bomlás

A termikus bontás szintén használható vas nanorészecskék előállítására^{132,133}. Park és munkatársai vas-pentakarbonilt (vastartalmú fémorganikus prekurzormolekula) trioktil foszfin oxidhoz adagolva 320 °C-on argon atmoszférában gömbszerű részecskéket állítottak elő¹³². Az így előállított nanorészecskék homogén eloszlásúak és extrém kis méretűek lettek (2 nm). Az eljárásnak számos hátránya van más egyszerűbb technológiához képest, a kiindulási vas pentakarbonil erősen toxikus és nem stabil, továbbá a módszer energiaigényes, és jelentős mennyiségű toxikus szén-monoxid keletkezik melléktermékként.

2.3.4.8. Hidrotermális eljárás

Vas nanorészecskék előállíthatóak hidrotermális eljárással is¹³⁴. Az eljárás során teflonbélésű, rozsdamentes acélköpennyel ellátott, nyomástartó autoklávokat használnak a szükséges nyomás és hőmérséklet biztosításához. Sun és munkatársai sikeresen állítottak elő glükóz és vas(III)-nitrát oldatából kiindulva 10 nm nagyságú szén gömbökbe ágyazott vas részecskéket, amik nitrogén atmoszférában maguktól redukálódtak. A technológia hátránya, hogy energiaigényes és az előállítás és szétválasztás viszonylag bonyolult.

2.3.4.9. Poliol módszer

2010-ben Joseyphus és munkatársai állítottak elő először vas nanorészecskéket poliol módszer segítségével hexakloro-platina(IV)-savat használva¹³⁵. Tapasztalataik alapján növelve a hexakloro-platina(IV)-sav mennyiségét, a részecskék mérete csökkent. Továbbá észrevették, hogy ha a részecskék mérete 25 nm-nél nagyobb volt, akkor kocka alakkal rendelkeztek. 25 nm alatt nagyfokú aggregáció volt megfigyelhető. A részecskék a polioloknak köszönhetően levegőn is stabilak maradtak. A módszer hátránya, hogy a szintézis során erősen maró anyagokat használnak.

2.3.4.10. Zöld szintézis

Mint bemutattuk, a nanorészecskék szintézise hagyományos fizikai vagy kémiai eljárásokkal rendszerint rendkívül energia-, idő- és költségigényes, mindemellett a felhasznált vegyszerek számottevő környezeti terhelést jelentenek. A fenntartható fejlődés és a környezetvédelem érdekében a terhelés csökkentésére törekvő módszerek, úgynevezett zöld kémiai eljárások nagyjából két évtizede jelentek meg új irányvonalként a vegyiparban. Céljuk, hogy felváltsák a klasszikus előállítási módszereket, illetve alternatívát kínálnak a környezet védelmében a gazdaságosság megtartása mellett¹³⁶. Ebbe a csoportba tartoznak a korábban említett ún. félig-zöld kémiai eljárások is, melyek használata kétségtől előnyös. Azonban az ideális szintézis olyan, amely során csökkenthető vagy megszüntethető a veszélyes anyagok alkalmazása vagy képződése a nanorészecskék előállítása során, illetve kiküszöbölhető a magas energia- és költségigény (nincsenek magas hőmérséklet- és/vagy nyomásigényű reakciós lépések).

Ezeknek a szempontoknak az ún. zöld vagy bioszintézisek felelnek meg, melyek nyilvánvaló előnyeik miatt valóban egy potenciális alternatívát kínálnak a hagyományos eljárásokkal szemben. A fém nanorészecskék zöld szintézise az utóbbi évtizedben hatalmas figyelmet kapott, a témában számos publikációt olvashatunk (809 000 találat a „green synthesis of metal nanoparticles” kifejezésre Google Scholar alapján). Számos olyan innovatív, környezetbarát szintézismódszert fejlesztettek ki, amellyel alacsony költség mellett, környezetkímélő és egyszerű módszerekkel állíthatóak elő fém nanorészecskék. Továbbá, a zöld szintézisek során általában környezeti hőmérsékletet és nyomást, valamint nem mérgező, környezetkímélő oldó-, redukáló- és stabilizálószereket alkalmaznak, így a hagyományos kémiai eljárásoknál kisebb ökológiai lábnyommal rendelkeznek és sokkal biztonságosabbnak tekinthetők¹³⁷.

Gyakran élő, elsősorban prokarióta (baktérium) és eukarióta (gomba, alga) szervezetek segítségével állítják elő a kívánt nanorészecskéket. A mikrobák közvetetten vagy közvetlenül szerepet játszanak számos geokémiai-biológiai folyamatban, így a talajban lévő fémek már az élet kezdete óta egyfajta természetes kapcsolatban vannak a biológiai komponensekkel is. Ezt az érdekes tényt felhasználva rengeteg publikáció született, ahol mikroorganizmusokat, vagy valamelyik aktív komponensüket felhasználva állítottak elő nanorészecskéket¹³⁸. Például Kaul és munkatársai, valamint Pavani és munkatársai különböző gombák (*Pochonia chlamydosporium*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus wentii*, *Curvularia lunata*, *Chaetomium globosum*, *Aspergillus sp.*) és baktériumok (*Alcaligenes faecalis* és *Bacillus coagulans*) alkalmazásával állítottak elő vas nanorészecskéket^{139,140}.

Sajnos a mikroorganizmusokat felhasználó szintézisek sokszor lassúak, az eljárás során alkalmazott különböző fajok elérhetősége és fenntartása körülményes, továbbá az előállított részecskék sokszor nem monodiszperzek¹⁴¹. A különböző növények részeiből (levél, szár, mag, gyökér, gyümölcs) készült kivonatokat felhasználó szintézisek egyszerűek, költség-, idő- és energiahatékonyak, jól reprodukálhatók, gyors és akár ipari méretben is alkalmazható eljárások¹⁴². A növényi kivonatokkal előállított nanorészecskék kialakulásának mechanizmusát többen vizsgálták¹³⁸. A kutatások eredményei alapján nem egy biomolekula felelős a fémionok redukálásáért, hanem több, másodlagos metabolitban gazdag növényi komponens. Ilyen aktív komponensek a különféle enzimek, fehérjék, aminosavak, vitaminok, poliszacharidok, alkaloidok, polifenolok, flavonoidok és szerves savak, amelyek közismerten nem toxikus, biológiai úton lebontható anyagok, emellett a szintézis során segíthetik a részecskék kialakulását és gátolhatják az aggregációt, tehát a szintézisben redukáló- és stabilizálószerként is részt vesznek^{137,142}. A fémionok növényi kivonattal történő redukálása során formálódó részecskék keletkezésének mechanizmusát már korábban bemutatták az Au⁺-dihidromiricetin¹⁴³ és Ag⁺-hidrolizálható tannin¹⁴⁴ párokon. A fémionok először komplexet képeznek a biomolekula fenolos hidroxilcsoportjaival, majd ezután fémmé redukálódnak, miközben a biomolekula egyrésztől oxidálódik, másrészt sokszor stabilizálja is a részecskéket („capping”), így nincs szükség külön stabilizálószerre a szintézis során. Az ilyen szintézisek általában nagyon egyszerűek: a fémsó oldatát a növényi kivonattal összekeverve a nanorészecskék spontán alakulnak ki. A részecskék formálódásának ideje a pár perc és egy nap között mozog a felhasznált fém-kivonat pártól függően. Azt is érdemes megjegyezni, hogy a polifenolok és flavonoidok konjugált π -elektron rendszere lehetővé teszi az elektronok donációját a hidroxilcsoportokról a különböző szabadgyökök felé, így ezek a molekulák antioxidáns kapacitással rendelkeznek, ami meghosszabbíthatja a vas

nanorészecskék élettartamát is¹⁴⁵. Továbbá számos vegyület, elsősorban a flavonoidok, az átmeneti fémionok hatékony kelátorai, ezzel a tulajdonságukkal csökkentik a Fenton- és Haber-Weiss reakcióban keletkező aktív oxigén intermedierek számát¹⁴⁶. Ráadásul e vegyületek megőrzik antioxidáns és szabadgyök-befogó kapacitásukat a flavonoid-fémion-komplex kialakulása után is^{147,148}.

A felhasznált kivonat redukáló- illetve stabilizálószer tartalma meghatározza a keletkező részecskék méretét, így a későbbi reakciókban való reaktivitását is. Ashokkumar és munkatársai megfigyelései szerint a részecskék mérete csökkent, ha növelték az alkalmazott növényi extraktum koncentrációját¹⁴⁴. Másik tanulmányban leírtak szerint a kialakuló részecskék száma korrelált az alkalmazott növényi extraktum mennyiségével¹⁴². A bioredukálószer adagolásának ütemét változtatva alakszelektivitást figyeltek meg¹⁴⁹.

Növényi kivonatokkal készült vas nanorészecskékre rengeteg példát találunk a szakirodalomban¹⁵⁰⁻¹⁵⁴. A zöld tea számos országban olcsón elérhető termék, így kivonatát gyakran használják vas nanorészecskék előállítására. Hoag és munkatársai 2009-ben sikeresen állítottak elő vas nanorészecskéket egy lépéses környezetbarát bioszintézis útján tea (polifenolok) segítségével¹⁵⁰. Kísérletükben zöld tea kivonatát reagáltatták vas(III)-klorid vizes oldatával pár percig szobahőmérsékleten, a reakció végén stabil nanorészecskéket kaptak. Megállapították, hogy a teában lévő polifenolok a reakció során nem csak redukálószerként, hanem stabilizálószerként is közreműködtek. Huang és munkatársai háromféle (zöld, oolong és fekete) tea kivonatával állítottak elő vas nanorészecskéket, amit malachitzöld bontásában teszteltek¹⁵¹. Magas polifenol/koffein tartalmának köszönhetően a zöld tea teljesített a legjobban. Machado és szerzőtársai 26 különféle növény levelének potenciális bioredukálószerként való alkalmazhatóságát vizsgálták¹⁵². Eredményeik alapján a legnagyobb antioxidáns kapacitással a tölgy, a gránátalma és a zöld tea rendelkezett, ezek kivonatával sikeresen állítottak elő vas nanorészecskéket.

Hasonlóan környezetkímélő, egy lépéses szintézis útján állítottak elő vas nanorészecskéket kávé, szőlő, eukaliptusz, rózsa, henna, gardénia, illetve különböző gyümölcsfák, úgymint golgotavirág, cseresznye, őszibarack, avokádó, narancs stb. leveléből készült kivonat segítségével^{69,152,153}. A felsoroltak és további összegző tanulmányok is rávilágítottak arra, hogy a bioredukálószer körülmények kiválasztása nagyon fontos, mert a Fe^{3+} ionok redukálása nem mindig teljes, továbbá a zöld szintézissel előállított vas nanorészecskék degradációs kapacitása is sokszor alulmarad a hagyományos eljárással előállított részecskék kapacitásához képest¹⁵⁴.

Mint látható a zöld szintézisek jó alternatívát kínálnak a hagyományos eljárások kiváltására. Mindazonáltal, a zöld szintézismódszerek további fejlesztésére van szükség, elsősorban olyan növények bevonásával, melyek nagy mennyiségben és könnyen hozzáférhetőek, és felhasználásuk révén a szintézis kivitelezése ipari méretekben is megoldható.

2.3.4.11. Vas nanorészecskék stabilizálása

A nanofázisú anyagok környezettechnológiai alkalmazásában a legnagyobb kihívást az aggregálódásra való hajlam, a gyors ülepedés, és a vizes közegbeli csekély mobilitás jelenti. A vas nanorészecskék aggregálódásának megelőzésére és mobilitásának növelésére egy jó megoldás lehet a részecskék felületének módosítása. A sztérikus stabilizálás (polimerrel való stabilizálás) széles körben alkalmazott módszer kolloid diszperziók előállításában: a részecskék köré épülő polimer adszorpciós réteg sztérikus stabilizálást biztosít, gátolva a részecskék aggregációját. Phenrat és szerzőtársai három anionos polielektrolit stabilizáló képességét vizsgálták, miközben az egyes polimerek moláris tömegének hatását is értékelték¹⁵⁵. A háromféle polimer a poli(sztírol-szulfonát), a karboximetil-cellulóz és a poliaszpártát volt. A kísérletek eredményei szerint a diszperzió stabilitása, vagyis a nem aggregálódó részecskék aránya egyaránt függ a polielektrolit felületi többletkoncentrációjától és az adszorpciós réteg vastagságától.

A vinil-alkoholból, vinil-acetátból és itakonsavból álló PV3A kopolimerrel stabilizált vas részecskéknél megfigyelték, hogy a kopolimer hozzáadása a sztérikus stabilitás mellett jelentős elektrosztatikus taszítást is eredményezett, így a részecskék várhatóan nem fognak adszorbeálódni a főleg szintén negatív töltésű talajkolloidok felületén¹⁵⁶.

Choi és munkatársai az alkalmazott polimer (polivinil-pirrolidon – PVP) mennyiségének változtatásával érték el alakszelektív szintézist¹⁵⁷. Vizes közegben nátrium-borohidriddel történő redukcióval állítottak elő vas nanorészecskéket. Ha az alkalmazott PVP mennyisége kisebb volt, mint 0,3% akkor a megszokott kerekded részecskéket figyelték meg, ha nagyobb volt, mint 1%, akkor nem alakultak ki elemi állapotú részecskék. Ha az előállítás során felhasznált PVP mennyisége 0,3-1% között változott, akkor szálak szerkezetű novosavat sikerült előállítaniuk. A nanoszálak méretét (átmérő: 1-10 nm és hossz: 10-1000 nm között) a polimer koncentrációjának változtatásával tudták változtatni.

Cirtiu és munkatársai megfigyelték, hogy a védőpolimerként alkalmazott karboximetil-cellulóz (CMC) mennyiségének növelésével csökkent a részecskék mérete¹⁵⁸. A magyarázat valószínűleg az, hogy a nagyobb CMC koncentráció miatt a polimer hamarabb

borítja be a képződő kristálygócokat, ezzel megakadályozva további növekedésüket. Zhou és munkatársai megfigyelték, hogy amellet, hogy a CMC-vel stabilizált vas nanorészecskék stabilitása és diszpergálhatósága nőtt, a polimer bevonat miatt kevésbé fértek hozzá a sejtekhez, így kevésbé bizonyultak citotoxikusnak¹⁵⁹. Ugyanakkor Dror és munkatársai megállapították, hogy a polimer bevonat a nanovas szennyezőanyagokkal szembeni lebontási hatékonyságának csökkenését is eredményezte, ezért a kármentesítési eljárás során nagyon fontos a megfelelő stabilizálószer kiválasztása^{160,161}.

2.4. Ezüst nanorészecskék előállítása zöld szintézissel

Napjainkban a széles körű alkalmazási lehetőségeiknek köszönhetően az ezüst nanorészecskék (AgNP, nanoezüst) előállítása és felhasználása iránti igény exponenciálisan nő (becsült termelés: több száz tonna/év)¹⁶². Az ezüst nanorészecskéket optikában, elektronikában, katalízisben, háztartási termékekben, ruházati cikkekben, kozmetikumokban, és az orvostudomány különböző területein egyre nagyobb mértékben használják^{163,164}. Rendkívül nagymértékű alkalmazásuk széles spektrumú antimikrobiális hatásuknak tulajdonítható, mivel képesek Gram negatív és Gram pozitív baktériumok, valamint patogén gombák elpusztítására, de emellett antivirális szerként is hatékonyak bizonyultak¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. A nanotechnológia innovatív eredményeinek köszönhetően új stratégiák alakultak ki a rákos megbetegedések terápiáját célzó fejlesztések területén is. Számos tanulmány bizonyítja az ezüst nanorészecskék kiemelkedő tumorellenes hatását, melyet az *in vitro* eredmények után több *in vivo* kísérleti rendszerben is megerősítettek^{166,168-172}.

A vas nanorészecskéknél ismertett fizikai-kémiai eljárásokkal előállíthatók az ezüst nanorészecskék is. A fotokémiai, termikus, szonokémiai és mikrohullám alapú módszerek mellett a leggyakrabban az ezüst nanorészecskéket is kémiai redukcióval vagy elektrokémiai eljárásokkal állítják elő¹⁷³. Azonban ezen eljárások során gyakran toxikus vegyszereket használnak, így a környezetre és az egészségre ártalmasak¹⁷⁴. Például stabil nanoméretű ezüstöt tartalmazó kolloid oldat „bottom-up” kémiai előállításához is gyakran nátrium-borohidridet használnak redukálószerként¹⁷⁵. Mint már korábban bemutattuk, a nátrium-borohidrid alkalmazása amellet hogy meglehetősen költséges, oxidált bőrvegyületek keletkezéséhez vezet, amelyek nehezen választhatóak el a kívánt nanorészecskéktől. Az ilyen nem kívánt kémiai anyagok jelenléte komoly korlátot jelenthet az előállított nanoméretű anyagok felhasználási lehetőségeiben és biológiai alkalmazásában. Ezek után nyilvánvaló, hogy az ezüst nanorészecskék esetében is szükség van a nanorészecskék olyan előállítási módjaira, amelyek innovatívak, kis költséggel járnak, környezetkímélők és kevesebb toxikus vegyszert használnak, valamint minimális mennyiségű veszélyes anyag keletkezésével járnak^{137,175}. Az utóbbi évtizedben számos, az ezüst nanorészecskék zöld szintéziséről szóló kutatás jelent meg, melyek a hagyományos kémiai eljárásoknál sokkal biztonságosabb, költséghatékonyabb és kisebb ökológiai lábnyommal rendelkező szintézismódszereket ismertettek¹⁷⁶. A vas nanorészecskékhez hasonlóan az ezüst nanorészecskéket is elő lehet állítani élő szervezetek vagy sejtalkotók segítségével, azonban a növényeket alkalmazó zöld eljárások idő-, költség- és energiahatékonyabbak, továbbá a növények általában jobban

hozzáférhetőek, így ezen módszerek esetleges ipari méretben való kiterjesztése megoldható^{163,176,177}.

Shankar és munkatársai az elsők között számoltak be az ezüst nanorészecskék gyors, zöld úton történő előállításáról. Kísérleteik során nagymennyiségű ezüst nanorészecskét állítottak elő gólyaorr (*Pelargonium graveolens*) és indiai orgona (*Azadirachta indica*) leveléből készült növényi extraktum alkalmazásával, melyet ezüst-nitrát vizes oldatával keverték össze^{178,179}. A szerzők az eljárás vitathatatlan előnyei közül a gyorsaságot emelték ki: a növényi kivonattal történő redukálás során sokkal gyorsabban alakultak ki a nanorészecskék, mint korábbi kísérleteik során, ahol mikroorganizmusokat használtak.

Egyéb növényi kivonatot is használtak már redukáló- és stabilizálószerként ezüst nanorészecskék előállítása során, például közönséges kámforfa (*Cinnamomum camphora*), citromfű (*Melissa officinalis*), közönséges paprika (*Capsicum annuum*), vöröskérgű fenyő (*Pinus desiflora*), páfrányfenyő (*Ginko biloba*), japán liliomfa (*Magnolia kobus*), keleti platán (*Platanus orientalis*) és bortermelő szőlő (*Vitis vinifera*) kivonatát alkalmazták már sikeresen^{177,180}. Ezek a növények nagy mennyiségben tartalmaznak olyan aktív összetevőket (pl. polifenolok, flavonoidok), amelyek alkalmasak a fémionok redukciójára^{152,181}. Baharara és munkatársai szerint az ezüst ionok redukálásáért a növényi kivonatokban lévő fenolos csoportok és a fehérjék a felelősek¹⁸². Ajita és csoportja kimutatta, hogy a növényi kivonatok aktív komponenseiben (flavonoidok, terpenoidok, fenolok, fehérjék) lévő hidroxil- és karbonilcsoportoknak tulajdonítható az ezüst ionok redukciója¹⁸³. Továbbá bemutatták, hogy a fehérjék és peptidek védőbevonatot képeznek a részecskék körül, ezáltal növelik a partikulumok stabilitását és megelőzik az aggregációjukat. Nadagouda és munkatársai kávé és tea extraktum segítségével elsőként állítottak elő ezüst nanorészecskéket¹⁸⁴. Munkájukban bemutatták, hogy a növényi kivonatok alkalmazása mellett nem volt szükség egyéb stabilizálószerre, a növényi kivonatok aktív összetevői szolgáltak mind redukáló-, mind stabilizálószerként a szintézis során. Ezt az egyszerű, egylépéses szintézismódszert kiterjesztették palládium, arany és platina nanorészecskék előállítására is. A részecskék kialakulási mechanizmusát a vas nanorészecskéknél bemutatott lépésekre bontották: 1) a fémionok a biomolekulákkal komplexet képeznek, 2) a fémionok elemi fémmé redukálódnak, 3) a 2. lépéssel párhuzamosan a biomolekula oxidálódik és stabilizálja a kialakult nanorészecskéket. Pörkölt kávé (*Coffea arabica*), zöld tea és fekete tea vizes-alkoholos oldatával is állítottak már elő ezüst nanorészecskéket^{181,185,186}. A szerzők megállapították, hogy a kivonatokban lévő koffein és teofillin felelősek az előállított nanorészecskék

stabilizálásáért. Dhand és munkatársai szerint a kávé komponensei közül a klorogénsav a legfőbb fenolos komponens, ami szerepet játszik az ezüst ionok redukciójában¹⁸¹.

A kiindulási fém-só oldat és Aloe vera növényi kivonat koncentrációjának változtatásával előállított ezüst nanorészecskék alak- és méretszelektivitását érték el Chandran és munkatársai¹⁸⁷. Loo csoportja zöld tea kivonatóval állított elő kerekded ezüst nanorészecskéket¹⁸⁶. Kísérleteik során megfigyelték, hogy a kivonatok koncentrációjának növelésével a nanorészecskék mérete csökkent, miközben a számuk nőtt¹⁸⁸.

A különböző zöld szintézisekkel előállított ezüst nanorészecskék eltérő biológiai rendszerekre gyakorolt hatását is többen vizsgálták. A különböző teafélékkel előállított ezüst nanorészecskéknél megfigyelt profilaktikus hatást Moulton és munkatársai a részecskék felületén jelenlévő antioxidáns csoportoknak tulajdonították¹⁸⁹. Fekete teával előállított nanorészecskék biológiai hatásainak vizsgálatakor kiderült, hogy a részecskék gátolják humán emlőrák (MCF-7) sejtek növekedését és a gátló hatás fordítottan arányos a részecskemérettel¹⁶⁹. Mikrobiológiai tesztek során megfigyelték, hogy a zöld teával előállított részecskék kevésbé bizonyultak toxikusnak *E. coli* ellen, mint a tisztán kémiai úton előállított, nem stabilizált részecskék¹⁹⁰. A megfigyelt kisebb mértékű toxicitást a nagyobb stabilitással magyarázták, mivel kevesebb ezüst ion tudott felszabadulni a nanorészecskék felszínéről, amit a növény aktív komponensei stabilizáltak. Hasonló eredményről számoltak be Ajita és munkatársai, vizsgálatukban a kisebb méretű nanorészecskék bizonyultak hatásosabbnak a tesztelt mikroorganizmusok ellen.

Egy 2016-ban megjelent összefoglaló tanulmányban kifejtették, hogy a különböző kivonatokkal előállított részecskék antimikrobiális hatása nemcsak a kialakult nanorészecskék méretétől és alakjától függ, hanem a szintézis során alkalmazott redukáló- és stabilizálószerrel is¹⁶³.

Habár a nanorészecskék zöld úton történő előállítása kiemelt figyelmet kapott az utóbbi évtizedben, csak kevés tanulmányban vizsgálták, illetve hasonlították össze az előállított nanorészecskék komplex (antibakteriális, antifungális, antivirális és citotoxikus) biológiai aktivitását, különös tekintettel a szintézis során alkalmazott különböző növényi kivonatok hatásának függvényében. Azonban a zöld úton előállított ezüst nanorészecskék mindennapi életben történő biztonságos használatához nagyon fontos felmérnünk, hogy a szintézis során használt, esetünkben növényi eredetű anyagok milyen hatással vannak a kialakult részecskék későbbi felhasználásakor, elsősorban az élő rendszerekre nézve. Az alkalmazás előtt ezért a nanorészecskék átfogó vizsgálata szükséges, hogy fel tudjuk mérni az élő rendszerekben tanúsított viselkedésüket és hatásukat.

3. CÉLKITŰZÉS

Napjainkban a környezetvédelmi gyakorlat egyik leggyakoribb és legfontosabb megoldandó kihívása a felszín alatti vizek és a földtani közeg klórozott alifás szénhidrogén szennyezettségének felderítése és megszüntetése. Ehhez olyan innovatív, környezeti, gazdasági és társadalmi szempontból egyaránt előnyös technológiákra van szükség, melyek az utóbbi évek tapasztalatai alapján a nanotechnológiai kutatások segítségével oldhatóak meg. A nanotechnológia megjelenése a kármentesítési programokban – csakúgy, mint az élet egyéb területein – hatalmas mértékben felgyorsította a technológiai fejlődést, sokszor a költségek jelentős csökkentése mellett. Az elmúlt években a Szegedi Tudományegyetem Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszékén többféle anyagból állítottak elő nanorészecskéket, melyek sikeresen alkalmazhatóak a különböző problémák megoldására a fizika, a kémia és a biológia tudományterületein. Ehhez kapcsolódva, doktori munkám céljául nulla vegyértékű vas nanorészecskék előállítását, morfológiájuk és felhasználhatóságuk lehetőségeinek vizsgálatát, valamint kémiai és biológiai rendszerekben való viselkedésük átfogó tanulmányozását tűztük ki.

Kutatásom kezdeti szakaszának célja különböző vas-prekurzorok és redukálószeres felhasználásával előállított vas nanorészecskéket tartalmazó szuszpenziók (nanovas szuszpenziók) előállítása volt, melyek sikeresen alkalmazhatóak klórozott szénhidrogénnel szennyezett talajvíz *in situ* környezeti kármentesítésben. Továbbá a kidolgozott, optimalizált szintézismódszer megfeleljen a valós életben elvárt, alkalmazhatóságot erősen korlátozó szempontoknak: legyen gazdaságos és környezetbarát, ipari méretben hatékonyan alkalmazható, a további környezetterhelés minimalizálása mellett. Ennek megvalósításához fontosnak tartottuk,

- hogy alacsony költségű és jobban hozzáférhető prekurzorokat és redukálószereseket keressünk, valamint a szintézis körülményeit környezetkímélőbbé és költséghatékonyabbá tegyük;
- hogy a hagyományos kémiai eljárások nyilvánvaló korlátai miatt zöld úton, növényi kivonatok segítségével is előállítsunk vas nanorészecskéket;
- hogy az előállított vas nanorészecskéket anyagvizsgálati módszerekkel (TEM, XRD, EDS, reaktivitás vizsgálat stb.) jellemezzük, összehasonlítsuk, ami elengedhetetlen a későbbi alkalmazási lehetőségeik felderítéséhez;

- hogy az előállított vas nanorészecskék illékony klórozott szénhidrogén bontó hatékonyságát laboratóriumi és terepi mérésekkel megvizsgáljuk.

Munkánk második szakaszában a vas nanorészecskék kármentesítési munkák során történő alkalmazhatóságának további feltételeit vizsgáltuk. Mivel a szakirodalomban kevés adat ismert arról, hogy a vas nanorészecskék milyen hatással vannak a talajban/talajvízben élő baktériumokra, ezért a kutatás következő célja a különböző morfológiájú és reaktivitású vas nanorészecskék anaerob baktériumokra (különös tekintettel a redukív deklorinációban résztvevő baktériumok populációjára) gyakorolt hatásának tanulmányozása, esetleges toxicitásának kimutatása volt. Ennek megállapításához

- mikrokozmosz rendszerekben, az illékony klórozott szénhidrogének összetétel változásának monitorozása mellett, DNS alapú mérésekkel kívántuk megvizsgálni, hogy a különböző tulajdonságú vas nanorészecskék hogyan és milyen mértékben befolyásolják a kármentesítés során kezelt közeg mikroflórájának összetételét.

Végül munkánk harmadik szakaszában a különböző módon előállított vas nanorészecskéknél megfigyelt kémiai és biológiai rendszerekre gyakorolt hatás szélesebb körű vizsgálatához szükségesnek gondoltuk,

- hogy összehasonlításként szintén zöld módszerekkel, növényi kivonatokkal előállítsunk nulla vegyértékű ezüst nanorészecskéket;
- hogy a különböző növényi kivonatok segítségével előállított ezüst nanorészecskék kémiai jellemzőit meghatározzuk (TEM, XRD, DLS, UV-VIS);
- hogy a kapott ezüst nanorészecskék különböző biológiai rendszerekben való viselkedését tanulmányozzuk, különös tekintettel a redukálószeres esetleges befolyásoló szerepére.

4. KÍSÉRLETI RÉSZ

4.1. A kísérleti munka során felhasznált anyagok

Vas nanorészecskék előállításához felhasznált anyagok

Vas(II)-klorid 4-hidrát ($\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich Kft., 98%

Vas(III)-klorid 6-hidrát ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich Kft., 98%

Vas(II)-szulfát 7-hidrát ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), Molar Chemicals Kft., 99,97%

Nátrium-ditionit (vízmentes, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), Sigma-Aldrich Kft., 82%

Nátrium-borohidrid (NaBH_4), Alfa Aesar, 98%

Nátrium-hidroxid (mikroszemcsés, NaOH), Molar Chemicals Kft., 99,93%

Kávét, Tchibo Family

Zöld tea, Twinings of London, Green Tea&Lemon

Abszolút etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Molar Chemicals Kft.

Ioncserélt és csapvíz

Ezüst nanorészecskék előállításához felhasznált anyagok

Ezüst nitrát (AgNO_3), Sigma-Aldrich, 99,0%

Kávét, Tchibo Family

Zöld tea, Twinings of London, Green Tea&Lemon

Ioncserélt víz

4.2. Vas és ezüst nanorészecskék előállítása

4.2.1. Vas nanorészecskék előállítása félig-zöld módszerrel

A nanovas tartalmú szuszpenziók félig-zöld előállítása során vas(II)-klorid, vas(III)-klorid és vas(II)-szulfát vizes oldatát redukáltuk nátrium-borohidriddel vagy nátrium-ditionittal szobahőmérsékleten levegő jelenlétében illetve inert atmoszférán. A lejátszódó reakciókat következő egyenletek írják le (4.1), (4.2), (4.3), (4.4):

A szintézisek során a bemérendő vas-sók és redukálószer mennyiségét a fenti egyenletek alapján határoztuk meg: a reagenseket 1:1 (nátrium-ditionittal előállított minták), 1:2 (Fe^{2+} tartalmú prekursorok és nátrium-borohidrid reakciója), illetve 1:3 (Fe^{3+} tartalmú prekursorok és nátrium-borohidrid reakciója) molarányban mértük össze. A nanovas szuszpenziókat 2500, 5000 és 10000 ppm koncentrációban is előállítottuk. Minden esetben vizet használtunk oldószerként (levegő jelenlétében csapvizet, inert atmoszférában deoxigenizált ioncserélt vizet), a reakciók végtérfogata 250 mL volt. A szintézis során intenzív keverés mellett (Velp Scientifica, Stirrer ES keverőmotorhoz rögzített üveg keverőbot) az elkészített vas-só-oldatokhoz először megfelelő mennyiségű nátrium-hidroxid oldatot (lúgos közeg biztosítására), majd a megfelelő redukálószer oldatát adtuk. A nátrium-borohidrid oldatát 6 csepp/perc sebességgel adagoltuk a keletkező hidrogéngáz kontrollálása végett, a nátrium-ditionit oldatát egyben hozzáöntöttük a vas-oldatokhoz. Az összeöntés után a mintákat 5 (nátrium-borohidrid esetében) illetve 40 percig (nátrium-ditionit esetében) kevertettük, majd a végterméket vízzel és etanollal mostuk. A kapott mintákat frissen felhasználtuk vizsgálatainkhoz. Az így előállított vas nanorészecskéket tartalmazó minták elnevezéseit a 4.1. táblázat foglalja össze.

4.1. táblázat. A félig-zöld módszerrel előállított vas nanorészecskét tartalmazó szuszpenziók elnevezései

Mintaazonosító	Összetétel
nZVI _{Cl2} ^B	FeCl ₂ + NaBH ₄
nZVI _{Cl2} ^D	FeCl ₂ + Na ₂ S ₂ O ₄
nZVI _{Cl3} ^B	FeCl ₃ + NaBH ₄
nZVI _{Cl3} ^D	FeCl ₃ + Na ₂ S ₂ O ₄
nZVI _S ^B	FeSO ₄ + NaBH ₄
nZVI _S ^D	FeSO ₄ + Na ₂ S ₂ O ₄

Az inert atmoszférán előállított nanovas szuszpenziók előállítása során egy gázbevezetési üvegreaktort használtunk, az oldatok adagolása egy csiszolattal ellátott beöntő nyíláson keresztül történt (4.1. ábra). A szintézis paraméterei megegyeztek a levegőn előállított nanorészecskék szintézisének körülményeivel, kivéve, hogy ezen szintézisek során deoxigenizált ioncserélt vizet használtunk és a reakció nitrogéngáz bevezetése mellett történt.

A polivinil-pirrolidon (PVP) adagolásának termék-morfológiára és reaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatához a mintákat az előzőekhez hasonlóan készítettük el deoxigenizált ioncserélt vízzel, inert atmoszférán, a vas mennyiségére nézve 0,3%-nyi PVP adagolása mellett.

4.1. ábra. A nanovas szuszpenziók előállítására szolgáló reaktor sémája

4.2.2. Vas nanorészecskék előállítása zöld módszerrel – növényi kivonatok

A vas nanorészecskéket növényi – kávé, zöld tea és vadszőlő – kivonatok (extraktumok) segítségével is előállítottuk. A vadszőlő kivonatóval készült nanorészecskék szintéziséhez a vadszőlő leveleket (*Parthenocissus quinquefolia*, Virginia creeper) tavasszal, friss hajtás után gyűjtöttük. A levelek felületén lévő esetleges szennyezéseket ioncserélt vizes mosással távolítottuk el, majd a leveleket tömegállandóságig szárítottuk környezeti feltételek mellett. A kivonat elkészítéséhez a megszáradt, porított levelekből 5 g-ot 100 mL ioncserélt vízhez adtunk, majd az így előállított „oldatot” 80 °C-on 80 percig forraltuk, végül visszahűlés után 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn szűrtük, további felhasználásig pedig 4 °C-on tároltuk. Hasonlóan jártunk el a kávé és zöld tea kivonatok elkészítése során is, kivéve, hogy a vásárolt kávé és zöld tea levelek nem igényeltek előzetes tisztító-szárító lépést, és az extraktum előállításához a kávéból 2 g-ot, a zöld tea levelekből 5 g-ot mértünk 100 mL csapvízhez. A hőkezelés a kávé esetében 5, a zöld tea esetében 20 percig tartott 80 °C-on.

A vas nanorészecskék szintézise során 0,1 M vas(III)-klorid csapvízes oldatát a megfelelő kivonattal reagáltattuk 1:1 térfogatarányban 24 órán keresztül szobahőmérsékleten. A kapott részecskéket desztillált vízzel és etanollal mostuk, majd a mintákat frissen felhasználtuk vizsgálatainkhoz. A zöld szintézismódszerekkel előállított vas nanorészecskéket tartalmazó minták elnevezését a 4.2. táblázat foglalja össze.

4.2. táblázat. Az növényi kivonatokkal előállított vas nanorészecskét tartalmazó szuszpenziók elnevezései

Mintaazonosító	Összetétel
nZVI ^K	FeCl ₃ + kávé kivonat
nZVI ^{ZT}	FeCl ₃ + zöld tea kivonat
nZVI ^V	FeCl ₃ + vadszőlő kivonat

4.2.3. Ezüst nanorészecskék előállítása zöld módszerrel – növényi kivatok

Az ezüst nanorészecskék előállításához az előzőekben ismertett módon készült kávé és zöld tea kivonatát használtuk fel, annyi kivétellel, hogy a kivatok elkészítéséhez ioncserélt vizet használtunk minden esetben. A szintézis során 0,1 M ezüst-nitrát vizes oldatát a megfelelő kivonattal reagáltattuk 1:1 térfogatarányban 24 órán keresztül szobahőmérsékleten. A kapott részecskéket ioncserélt vízzel mostuk, majd a felhasználásig 4 °C-on tároltuk. A kávé kivonatóval redukált mintát C-AgNP-nek, a zöld tea kivonatóval előállított ezüst nanorészecskét GT-AgNP-nek neveztük el.

4.3. Vizsgálati módszerek

Az előállított vas és ezüst nanorészecskék tulajdonságait számos módszerrel vizsgáltuk. Jellemeztük a részecskék morfológiáját, reaktivitását és szerkezetét. A vas nanorészecskék anaerob mikroba populációra gyakorolt hatását mikrokozmosz modellrendszer segítségével követtük. Az ezüst nanorészecskék biológiai aktivitását különböző antimikrobiális és citotoxicitás tesztekkel vizsgáltuk. A vizsgálatok során minden esetben legalább két (általában 3-5) párhuzamos, egymástól független mérést végeztünk, átlagot és szórást számoltunk, amennyiben nagyobb eltérést észleltünk a mérések vagy kiértékelés közben, megismételtük a minta előállítását és vizsgálatát.

4.3.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

Az elektron sugárnyalábot használó transzmissziós elektronmikroszkóp szilárd testek szubnanométeres laterális képi felbontású leképezésére alkalmas módszer. A képalkotáshoz a mintán áthaladó nagy energiára felgyorsított elektronokat használjuk. A TEM segítségével tanulmányozhatóak a nanoméretű anyagok, információt nyerhetünk többek között a nanoszerkezetek méretéről és morfológiai sajátosságairól.

Az előállított nanorészecskék morfológiáját és méretét FEI TECNAI G2 20 X-Twin, 200 kV-os gyorsítófeszültséggel üzemelő transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A mérésekhez a minták nagy hígítású etanolos szuszpenziójából pár cseppet 3 mm átmérőjű,

szénfilmmel bevont rézrostélyra (grid-re) cseppentettünk, majd az adott mintára jellemző területekről felvételeket készítettünk. A nanorészecskék méretét ImageJ program segítségével határoztuk meg¹⁹¹.

4.3.2. Röntgendiffraktometria (XRD)

A röntgensugarak diffrakciója a kristályokon a kristály szerkezeti és anyagi minőségére jellemző információt szolgáltat. A módszer alapja a röntgensugár és a kristályrács kölcsönhatása. Röntgensugarakat kristályos anyagon átbocsátva elhajlás és interferencia jelenség lép fel. Az így keletkező interferenciakép egyértelmű információt szolgáltat a kristály szerkezetéről és anyagi minőségéről.

A különböző szintézisek során előállított nanorészecskék anyagi minőségét röntgendiffrakciós módszerrel azonosítottuk. Méréseinket $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,154 \text{ nm}$) sugárforrással felszerelt Rigaku Miniflex II készülékkel végeztük $2\theta = 5\text{--}80^\circ$ -os szögterületben. A mintákat porformában mértük, a kapott diffraktogramokat felhasználva a minták azonosítását JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) kártyák és irodalmi adatok alapján végeztük el.

4.3.3. Energiadiszipperzív röntgenspektroszkópia (EDS)

Az energiadiszipperzív röntgenspektroszkópia a minta kémiai összetételéről ad információt az elektrongerjesztéssel kiváltott karakterisztikus röntgensugárzás detektálása és kvantitatív értékelése révén.

Kísérleteinkben ezt a módszert alkalmaztuk a vas nanorészecskék vastartalmának igazolására, illetve az egyes szintézisek során használt csapvízből esetlegesen visszamaradó potenciális szennyeződések kimutatására. Az energiadiszipperzív röntgenspektroszkópiás méréseket egy Hitachi S-4700 pásztázó elektronmikroszkópba (SEM) beépített Röntec QX2 spektrométerrel végeztük 20 kV gyorsítófeszültség alkalmazásával.

4.3.4. Redoxpotenciál (ORP) – redukciós kapacitás

Redukciós-oxidációs (redox) reakciók legfontosabb paramétere a redoxpotenciál. Egy redoxrendszer redoxpotenciálja az az egyensúlyi elektródpotenciál, amelyet egy inert fémelektrod az illető redoxrendszerrel érintkezve felvesz. A redukciós-oxidációs reakció folyamán az egyik anyag (redukálószer) elektront ad le, a másik anyag (oxidálószer) elektront vesz fel: A redoxpotenciál az oxidáló- illetve redukálóképesség mértéke, és mint ilyen, önmagában nem, csak más rendszerek redoxpotenciáljához képest értelmezhető: mindig a

negatívabb redoxpotenciálú rendszer képes redukálni a pozitívabbat. Általában, minél negatívabb egy redoxpotenciál, annál redukálóbb a rendszer.

A vas nanorészecskék redoxpotenciálját Consort-SK10B vezetőképesség mérő elektróddal felszerelt Consort-C533 típusú multiméter segítségével határoztuk meg a méréseink során.

4.3.5. Hatékonyság vizsgálat – hidrogéngáz fejlődés

Az egyes minták nulla vegyértékű vastartalmának meghatározására kénsavas (H_2SO_4 , Sigma-Aldrich Kft., 95,0-98,0%) reakciót alkalmaztunk. Az elemi vas a kénsavval az alábbi reakció szerint reagál el (4.5):

A két anyag reakciója közben keletkező hidrogéngáz mennyiségéből számolni lehet a mintában lévő elemi vas tartalmát. A mérések során az egyes mintákból 100 mL-nyit jól lezárt és előzőleg nitrogéngázzal átöblített gömbloblikba öntöttünk (4.2. ábra).

4.2. ábra. Az egyes nanovas szuszpenziók hatékonyságának vizsgálatára szolgáló rendszer

A lombik két nyílással rendelkezett: az egyik, szeptummal zárt nyíláson keresztül adagoltuk injekciós tűvel a vas szuszpenziókhöz a kénsavat; a másik nyílást egy gázbürettához kapcsoltuk, így a keletkező hidrogéngáz a bürettában levő vizet kiszorította. A gázbürettában levő folyadék szintje a keletkező gázzal arányosan csökkent. Az egyensúly beállta után leolvastuk a fogyást és meghatároztuk a szuszpenziók elemi vas tartalmát a (4.6)

képlettel számolva. A 100%-os hatékonyságnak azt vettük, amikor a rendszerben jelenlévő összes vas (sztöchiometriailag) elreagált a kénsavval, vagyis az összes vas Fe^0 állapotúnak tekinthető.

$$H\% = \frac{n_{\text{Fe(mért érték)}}}{n_{\text{Fe(kalkulált érték)}}} \cdot 100 \quad (4.6)$$

4.3.6. Hatékonyság vizsgálat – Illékony klórozott szénhidrogének bontásának vizsgálata

Az előállított nanovas szuszpenziók degradációs hatékonyságát egy illékony klórozott szénhidrogénnel szennyezett területről származó talajvíz mintában (a mintát egy kármentesítés alatt lévő területről kaptuk) vizsgáltuk. A mérések során a különböző módon előállított vas nanorészecskéket 6 órán keresztül reagáltattuk a szennyezett talajvízzel, majd az egyes minták gázkromatográfiás-tömegspektrometriás vizsgálatát egy akkreditált laborban végezték. A 2500, 5000 és 10000 ppm koncentrációjú nanovas szuszpenziók degradációs hatékonyságát is vizsgáltuk, és az ekvimoláris mennyiségű adagolás mellett, kétszeres és háromszoros felesleg alkalmazásával is végeztünk méréseket.

A lebontó hatást hatékonysággal fejeztük ki, amely fogalom alatt a talajvíz mintában található illékony klórozott szénhidrogének valamilyen mértékű nanovas általi lebontását értjük. A lebontási hatékonyság százalékos értékét a következőképpen számoltuk ki: a 6 óra után jelen lévő illékony klórozott szénhidrogének összkoncentrációját elosztottuk a kiindulási illékony klórozott szénhidrogének összkoncentrációjával; a 100%-os hatásfok így azt jelenti, amikor a talajvízből az összes illékony klórozott szénhidrogént sikeresen eltávolítjuk.

4.3.7. Terepi teszt

A nZVI_s^D szuszpenzió terepi tesztelése egy nagyméretű remediációs projekt keretén belül valósult meg 2014-2015-ben az Alföld délkeleti részén. A területen azonosított legfőbb szennyezők az illékony klórozott szénhidrogének voltak: perklóretilén (PCE), triklóretilén (TCE), diklóretilén (DCE, cisz- és transz együttesen) és vinil-klorid (VC). A szennyezők kezdeti koncentrációját a talajvízben 2014. 09. 17-én mérték, az első injektálás 2014. 09. 19-én, a második injektálás 2014. 11. 26-án történt. Mindkét injektálás alkalmával több, mint 500 dm^3 5000 ppm koncentrációjú nZVI_s^D szuszpenziót juttattak a talajba -12 méternél, majd rácsszerűen elhelyezett monitoring kutak segítségével követték a szennyezők összetételének és mennyiségének alakulását egészen 2015. január végéig. A monitoring kutak az injektáló

ponttól 5 méter távolságra helyezkednek el. A mintákat szilikon csöveken keresztül vették és a teljesen megtöltött üvegedényeket sötétben, 4 °C-on tárolták a vizsgálatok elvégzéséig.

4.3.8. Induktív csatolású plazma-tömegspektrometria (ICP-MS)

A nanorészecskék felületéről felszabaduló ionok koncentrációjának meghatározását induktív csatolású plazma-tömegspektrometriás (ICP-MS) méréssel határozták meg (Agilent Model 7700x). Ennél az emissziós spektroszkópiai módszernél a gerjesztett atomok és ionok előállítása induktív csatolású plazma segítségével történik, amelybe porlasztva bevezetik az analizálandó minta vizes oldatát. Az alkotóelemek elektronokkal és más töltött részecskékkel való ütközései során elektronokat adnak le, illetve vesznek fel. Ennek eredményeként az adott kémiai elemre jellemző hullámhosszúságú elektromágneses sugárzás jön létre. Az emittált sugárzás intenzitásából a mintában előforduló elem koncentrációjára lehet következtetni.

A vas nanorészecskék esetében a mikrokozmoszokból vett minták oldott vas tartalmát határoztuk meg ezzel a módszerrel salétromsavas feltárást követően. A növényi kivonatokkal előállított ezüst nanorészecskékről felszabaduló ionok mennyiségét is ennek a módszernek a segítségével adtuk meg. A nanorészecskéket 17,5 mg/mL-es koncentrációban 10% borjú szérumot (FBS – Fetal Bovine Serum), 2 mM L-glutamint, 0,01% sztreptomcint és 0,005% ampicillint tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM) inkubáltuk 24 órán keresztül 37 °C-on, 5%-os CO₂-termosztátban, majd centrifugálás (20 perc, 10285 g) után a mintákat salétromsavval feltártuk. A fenti kondíciókat a citotoxicitás mérés körülményeihez hasonlóan állítottuk be.

4.3.9. Ultraibolya-látható abszorpciós spektrometria (UV-VIS)

Az ultraibolya (UV, 200 nm ≤ λ ≤ 400 nm), ill. látható (VIS, 400 nm ≤ λ ≤ 800 nm) fény elnyelése során megváltozik a molekulák, atomok elektroneloszlása; az elektronok a kisebb energiájú pályákról nagyobb energiájúakra ugranak át, vagyis gerjesztődnek. Egy molekula azon részleteit, amelyekben az elektronátmenetek létrejönnek (azaz elnyelik a fényt), kromoforoknak nevezzük. A fényelnyelés mértéke az abszorbancia (4.7):

$$A_{\lambda} = \lg \frac{I_0}{I}, \quad (4.7)$$

ahol A_{λ} az adott hullámhosszhoz tartozó abszorbancia, I_0 a besugárzott, I pedig a detektált fény intenzitása. Ha az abszorbancia mértékét a besugárzott elektromágneses hullám energiájának (hullámhosszának) függvényében vizsgáljuk, abszorpciós spektrumot kapunk.

Az abszorpciós színekben megjelenő elnyelési sávok helye minőségi információkat szolgáltat.

Méréseinket Ocean Optics 355 DH-2000-BAL UV-VIS spektrofotométerrel végeztük 350-800 nm hullámhossz között vizes közegben, 1 cm-es kvarcküvetében, szobahőmérsékleten.

4.3.10. Dinamikus fényszórás (DLS)

A dinamikus fényszórás (DLS) a részecskék méretének, és a méreteloszlást jellemző polidiszperzitás meghatározására szolgáló módszer. A mérés elve azon alapszik, hogy a fényt szóró részecskék a Brown-mozgás miatt folyamatosan változtatják szóró centrumuk orientációját és helyzetét. Minél kisebb a részecske, annál gyorsabb a mozgása, azaz annál nagyobb a translációs diffúziós együttható, melyet a szórt fény fluktuációjának analizisével lehet megállapítani. Az Einstein-Stokes összefüggés értelmében a translációs diffúziós együttható és a részecskeméret között fordított arányosság áll fenn¹⁹².

A nanorészecskék méretét Zetasizer NanoZS (Malvern) (fényforrás: egy 4 mW teljesítményű, 633 nm hullámhosszú He-Ne lézer) dinamikus fényszórásmérő berendezés segítségével határoztuk meg.

4.3.11. Infravörös spektroszkópia (FT-IR)

Infravörös spektroszkópiás mérés során infravörös hullámhossztartományba eső fénnel sugározzuk be a mintát, mely a molekulák különböző kvantált rezgéseivel kölcsönhatva bizonyos hullámhosszokon elnyelést szenved. Az elnyelés hullámhossza jellemző az anyagban található kémiai kötésekre, így információt nyerhetünk a mintát felépítő elemekről, a közöttük fennálló kötésekről, illetve kristályos anyagok esetén a kristályszerkezetben bekövetkező átrendeződésekről.

Méréseinket transzmissziós módban, Bruker Vertex 70 spektrofotométerrel végeztük 450-4000 cm^{-1} hullámszám tartományban, 4 cm^{-1} -es spektrális felbontás mellett. A mintákat 100 mg KBr-dal összekeverve elporítottuk, majd pasztilláztuk. Referenciaként tiszta KBr pasztillákat használtunk.

4.3.12. Mikrokozmosz rendszerek

A mikrokozmosz vizsgálatokat 100 mL-es steril poli(tetrafluoroetilén) (PTFE) kupakkal zárható üvegben végeztük. A vizsgálatokhoz 75 mL 3-(N-morfolino)propánszulfonsav (MOPS) pufferelt anaerob tápoldathoz 25 mL

10^5 db sejt/mL *Dehalococcoides*, szulfátredukáló és metanogén baktériumokat tartalmazó talajvizet adtunk, melyhez a különböző szintézissel készített nanovasakat 0,1 g/L koncentrációban adtuk és a TCE koncentrációt 3 mg/L-re állítottuk be.

Az anaerob tápoldat literenként a következő összetevőket tartalmazta: 1 g NaCl (17 mM), 0,41 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (2 mM), 0,27 g NH_4Cl (5 mM), 0,52 g KCl (7 mM), 0,15 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mM), 0,2 g KH_2PO_4 (1,5 mM), 0,25 mg resazurin (1 mM), 0,41 g nátrium acetát (5 mM), 1 mL mikroelem oldat (1000×törzsoldat) és 1 mL szelenit-wolframát oldat (1000×törzsoldat)¹⁹³. A tápoldatot forralás után nitrogén atmoszférában hűtöttük és 0,084 g NaHCO_3 (1 mM), 0,048 g $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mM) és 0,031 g L-ciszteinnel (0,2 mM) egészítettük ki. Ezt követően 121 °C-on 30 percig sterilizáltuk majd szűréssel sterilizett 20 mM MOPS pufferrel (1 M törzsoldat, pH 7,4), 0,5 mM titánium(III)nitrilotriacetáttal (25 mM törzsoldat) és vitamin oldattal egészítettük ki¹⁹⁴.

A kísérletek során, az előbbieken leírt módon összeállított batch rendszereket anaerob körülmények között, 20 °C-on, sötétben inkubáltuk. A mikrobiális összetétel változásának követéséhez 4, 10 és 20 nap inkubációt követően mintát vettünk az anaerob élősejtszám mérésekhez és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz. Ezzel párhuzamosan háromszor 2 mL mintát elküldtünk kémiai vizsgálatra (illékony klórozott alifás szénhidrogén összetétel változás és lebontás során keletkező köztitermékek nyomon követése).

4.3.13. Anaerob heterotróf élő sejtszám

A mikrokozmoszokból vett mintából 5 tagú 10-es léptékű hígítási sort készítettünk, majd 100-100 µL hígított mintát R2A táptalajra szélesztettünk. Az R2A táptalaj összetétele: 0,5 g élesztőkivonat; 0,5 g proteózpepton; 0,5 g kazein hidrolizátum; 0,5 g glükóz; 0,5 g keményítő; 0,3 g K_2HPO_4 ; 0,05 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g nátrium-piruvát; 15 g agar; 1 L desztillált víz, pH $7,2 \pm 0,2$. A táptalajra szélesztett mintákat anaerob körülmények között, 20 °C-on, sötétben inkubáltuk 2 napig. Az inkubációt követően a táptalajon képződött kolóniákat megszámloltuk és a hígítással korrigált sejtszám értékeket átlagoltuk.

4.3.14. DNS preparálás

A kiindulási DNS vizsgálatához 15 mL talajvizet 7068 g-n 30 percig 25 °C-on összecentrifugáltunk, majd a kapott üledékből MoBio PowerSoil® DNA Isolation Kittel (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA) DNS-t izoláltunk a gyártó utasítása szerint. A DNS mennyiségét Qubit 2.0 Fluorimeterrel (Invitrogen, Carlsbad, CA) mértük a gyártó utasításai szerint és agaróz gélelektroforézissel (1% agaróz koncentráció, 1 kb DNA Ladder marker

(GeneRuler) mellett 130 V-on 30 percig) ellenőriztük a DNS izolálás sikerességét. A PCR reakciók elvégzéséig minden DNS mintát -20 °C-on tároltunk.

4.3.15. Polimeráz láncreakció (PCR) és denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE)

A preparált genomiális DNS-mintákból a 16S riboszómális RNS kódoló gént (16S rDNS) eubaktérium specifikus primerekkel (EubB (27F) 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' és EubA (1552R) 5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3') PCR – reakció segítségével amplifikáltuk¹⁹⁵.

A denaturáló gradiens gélelektroforézishez (DGGE) szükséges „GC-clamp”-pel rendelkező és kb. 200 bp hosszúságú PCR termékeket DGGE PCR-reakcióval állítottuk elő, ahol a 16S rDNS PCR termékek szolgáltak templátként. A 16S rRNS gén V3 régiójának amplifikálásához a 16R 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' és a 16GC 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGG AGGCAGCAG-3' primereket alkalmaztuk¹⁹⁶. A reakciók során KOD (*Thermococcus kodakaraensis*, Novagen) polimerázt használtunk a gyártó utasítása szerint. Minden kísérletben alkalmaztunk pozitív és negatív kontrollreakciókat. A 16S PCR reakciókat 30 µL, a DGGE PCR reakciókat 50 µL végtérfogatban mértük össze, az amplifikálást PTC 200 Thermalcycler (MJ Research) készülékben végeztük az alábbi beállításokkal (4.3. táblázat):

4.3. táblázat A PCR amplifikációk körülményei

	Hőmérséklet	Idő	Ciklusszám
Elődenaturáció	95 °C	2 perc	1
Denaturáció	95 °C	20 másodperc	
Hibridizáció (annealing)	55 °C	10 másodperc	30
Extenzió	70 °C	40/10 másodperc*	
Végző extenzió	70 °C	5 perc	1

*extenzió ideje a 16S rRNS gén amplifikálásakor 40 másodperc, a V3 régió amplifikálásakor 10 másodperc volt

A denaturáló gradiens gélelektroforézist előzetes kísérleteink alapján 40-60%-os denaturáló gradiens koncentráció mellett¹, 8%-os poliakrilamid gélen (37:1 akrilamid (Sigma-Aldrich Kft.) - biszakrilamid (Sigma-Aldrich Kft.) keverék 1x TAE pufferben) végeztük. A denaturáló ágens urea (Sigma-Aldrich Kft.) és formamid (Molar Chemicals Kft.) volt.

¹ A 0 %-os koncentrációjú denaturáló oldat nem tartalmaz sem ureát, sem formamidot, a 100 ml 100%-os koncentrációjú denaturáló oldat definíció szerint 40 ml formamidot és 42 g ureát tartalmaz.

Közvetlenül a géöntés előtt 16 mL denaturáló oldathoz 6,5 μ L TEMED-et (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin, Serva Electrophoresis Kft.) és 160 μ L 10%-os APS-t (ammónium-perszulfát, AnalaR Normapur[®] Kft.) adva, 16x16 cm-es, 16 zsebes gélt öntöttünk a Bio-Rad géöntő rendszer segítségével a gyártó utasítása szerint. 50 μ L DGGE PCR termékhez 10 μ L 6x DNA Gel Loading Solution (Quality Biological Inc.) festéket kevertünk. A futtatáshoz minden mintából 25 μ L-t vittünk fel a géltre. A DGGE futtatást Bio-Rad DCode Universal Mutation Detection System készülékben 60 °C-on, 150V-on, 1x TAE pufferben 4 órán át végeztük. Az elektroforézis után a gélt 20 percig etídium-bromiddal (0,5 μ g/mL 1x TAE pufferben) festettük, majd UV fény alatt vizsgáltuk és VisionWorks[®] LS 5.5.0 szoftverrel dokumentáltuk.

Az egyes mintázatokról képzett hasonlósági mátrix alapján hierarchikus osztályozást végeztünk. A hierarchikus osztályozás a TotalLab Phoretics 1D Pro programmal és a távolság-optimalizáló UPGMA csoportátlag módszerrel (Unweighted Pair Group Method of Average - súlyozás nélküli pár csoport módszer számtani átlag) történt¹⁹⁷. A kapott eredményeket dendrogramon ábráztuk. A függőleges tengelyen a minták azonosítóját, vízszintesen pedig az osztályok összevonásának szintjeit, a távolságmértékeket (hasonlósági mértékek) tüntettük fel.

4.3.16. Kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

A kvantitatív polimeráz reakciók (qPCR) során a redukív deklorinációért felelős *Dehalococcoides* baktériumokra jellemző gének (16S rRNS gén, vinil-klorid redukív deklorinálásaért felelős *vcrA* gén, triklóretén redukív deklorinálásaért felelős *tceA* gén), a szulfátredukáló baktériumokra jellemző gének (adenozin-5'-foszfoszulfát (APS) reduktáz (*apsA*) és a disszimilatórikus szulfít-reduktáz (*dsrA*) gének) valamint a metanogén archebaktériumokra jellemző *mcrA* (metil-koenzim-M reduktáz) gén mennyiségét vizsgáltuk.

A qPCR reakciók során a relatív kvantifikálás módszerét alkalmaztuk, azaz a gének százalékos mennyiségét határoztuk meg a minták összes eubaktérium mennyiségéhez viszonyítva.

A reakciók során Taq (*Thermus aquaticus*, Fermentas) polimerázt használtunk a gyártó utasítása szerint. A génspecifikus qPCR reakciókat 20 μ L végtérfogatban mértük össze, az amplifikálást egy Lightcycler[®] 96 (Roche Life Sciences) készülékben végeztük, a reakcióelegy összetételét a 4.4. táblázat, az alkalmazott primerek szekvenciáját pedig a 4.5. táblázat mutatja. A primer hibridizáció (*annealing*) minden esetben 60 °C-on történt.

4.4. táblázat. A génspecifikus primerekkel végzett PCR reakcióelegyek összetétele

Roche (LighCycler 96)	µL
steril víz	7
2×Greenmaster Mix	10
forward primer 10 µM	1
reverz primer 10 µM	1
templát DNS (10 ng)	1
Össztérfogat	20

4.5. táblázat. A qPCR mérés során alkalmazott primerek és adataik

Primer	Célgén	Szekvencia (5' → 3')	Hivatkozás
1327F 1420R	eubaktérium	CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG ACT CCC ATG GTG TGA CGG	Corless (2000) ¹⁹⁸
mlas FmcrA-rev	metanogén archebaktérium <i>mcrA</i>	GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TAC GTT CAT BGC GTA GTT VGG RTA GT	Steinberg és Regan (2008) ¹⁹⁹
RH1-dsr-F RH3-dsr-R RH1-aps-F RH2-aps-R	szulfát- redukáló baktérium <i>dsrA</i> <i>apsA</i>	GCC GTT ACT GTG ACC AGC C GGG TGG AGC CGT GCA TGT T CGC GAA GAC CTK ATC TTC GAC ATC ATG ATC TGC CAG CGG CCG GA	Ben-Dov (2007) ²⁰⁰
vcr1022F vcr1093R	reduktív dehalogenáz <i>vcrA</i>	CGG GCG GAT GCA CTA TTT T GAA TAG TCC GTG CCC TTC CTC	Ritalahti (2006) ²⁰¹
tce1270F tce1336R	reduktív dehalogenáz <i>tceA</i>	ATC CAG ATT ATG ACC CTG GTG AA GCG GCA TAT ATT AGG GCA TCT T	

A qPCR kalibrálásához *Desulfovibrio desulfuricans* DSM642T és *Methanosarcina barkeri* Schnellen 1947 (DSM 804) referencia törzseket, valamint *Dehalococcoides* 16S rRNS gént és *vcrA*, *tceA* gént tartalmazó plazmid DNS-t alkalmaztunk.

A qPCR módszer kalibrálásához először egy relatív kvantifikációt adó kalibrációs görbe felvételére volt szükségünk. A relatív kvantifikáció esetén nem a minta tényleges szulfátredukáló baktérium tartalmát adjuk meg, hanem a szulfátredukáló baktériumok genomi DNS-ének arányát az összes tisztított bakteriális eredetű DNS-hez képest. Ehhez kétféle PCR reakcióra volt szükség, az egyiket a specifikus, a másikat univerzális oligonukleotidokkal mértük össze. A normál PCR-ben amplifikált termékeket kitisztítottuk, majd a mennyiségi meghatározás után a koncentrációjukat beállítottuk 10 ng/µL-re. Ezután különböző arányú

keverékeket állítottunk elő a specifikus és univerzális primerekkel kapott termékekből: 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 arányokban. Ezeken a keverékeken lefuttatva a kvantitatív PCR-t, a ΔCT értékeket kiszámítva felvehető volt egy kalibrációs egyenes, amely ábrázolja a keverési arányt a ΔCT függvényében. A mért CT értékek és az eubaktérium specifikus primerekkel kapott CT_{16S} értékekből számított ΔCT értékekkel az alábbi összefüggés (4.8) alapján határoztuk meg a kalibráló függvényt²⁰².

$$\Delta\Delta CT = (C_{T(\text{célgén})} - C_{T(16S)})_{\text{vizsgáltminta}} - (C_{T(\text{célgén})} - C_{T(16S)})_{\text{kontroll}} \quad (4.8)$$

4.3.17. Sejt proliferációs és citotoxicitás vizsgálatok

4.3.17.1. Sejtkultúrák

A humán HeLa (humán méhnyakrák epitelsejt, ATCC) sejteket 10 % borjú szérummal (FBS: Fetal Bovine Serum), 2 mM L-glutaminnal, 0,01%-os sztreptomicinnel és 0,005%-os ampicillinnel kiegészített, 1 g/L-es DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich Kft.) tartottuk fenn. A NIH/3T3 egér fibroblaszt sejteket (ATCC) 10% FBS, 2 mM L-glutamin, 0,01%-os sztreptomicin, 0,005% ampicillin tartalmú 4,5 g/L-es koncentrációjú DMEM médiumban tenyésztettük. A sejtkultúrákat 37 °C-on, állandó parciális nyomású CO₂ atmoszféra (5%) és 95%-os páratartalom mellett tenyésztettük.

4.3.17.2. Sejtproliferációs vizsgálat

Az MTT teszt a sejtek életképességének (viabilitásának) illetve proliferációjának vizsgálatára szolgáló módszer. A kísérletek során HeLa és NIH/3T3 sejtek mitokondriális aktivitását mértük. A HeLa és NIH/3T3 sejteket rendre 5000 sejt/lyuk és 2000 sejt/lyuk koncentrációban 96-lyukú tenyésztőedényben 24 órán keresztül növesztettük, majd különböző koncentrációjú nanoezüst oldatokkal kezeltük 24 órán keresztül. A kezelés végén foszfátpuffer oldatos (PBS) mosás után a proliferációra gyakorolt hatást MTT-esszé segítségével elemeztük ki. Ennek során a tenyésztőedényekben lévő tápfolyadékokhoz 0,5 mg/mL-es 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT, Sigma-Aldrich Kft.) oldatot adtunk. Egy órás 37 °C-on történő inkubációt követően az élő sejtek mitokondriumaiban található enzimek a sárga színű MTT-t lila színű formazánná redukálják. A keletkezett formazán kristályokat feloldottuk dimetil-szulfoxid (DMSO) oldatban és spektrofotométer (Synergy HTX, BioTek, Winooski, US) segítségével mértük az egyes lyukakban az 540 nm hullámhosszon mutatott abszorbanciát, amely arányos az adott

lyukban levő élő sejtek számával. Az így kapott eredményeket a kezeletlen minták (kontrollok) abszorbancia értékeihez viszonyítva százalékosan fejeztük ki és az AgNP koncentráció függvényében ábrázoltuk.

4.3.17.3. Citotoxicitás vizsgálat

A zöld úton előállított ezüst nanorészecskék citotoxikus hatását kristályibolya festéssel határoztuk meg. A sejteket 24-lyukú szövettenyésztő lemezen növesztettük. A konfluencia elérése után, a sejteket különböző koncentrációjú ezüst nanorészecskékkel kezeltük 24 óráig. A kezelés után a sejteket háromszor mostuk PBS oldattal, majd 70:30 arányú etanol:aceton keverékkel fixáltuk. A fixált sejteket 0,5%-os kristályibolya oldattal festettük, majd desztillált vízzel mostuk és levegőn megszáritottuk. A lemezeket lefényképeztük majd a kristályibolyát 400 µL 10%-os ecetsavval feloldottuk. Minden lyukból 100 µL oldatot átvittünk egy 96-lyukú lemezre, majd az abszorbanciát 590 nm-es hullámhosszon fotometriásan (Synergy HTX spektrofotométer) detektáltuk.

4.3.18. Antimikrobiális vizsgálatok

4.3.18.1. Vizsgált törzsek

Escherichia coli SZMC 0582

Pseudomonas aeruginosa SZMC 0568

Micrococcus luteus SZMC 0264

Bacillus cereus var. *mycoides* SZMC 0042

Cryptococcus neoformans IFM 5844

Candida albicans ATCC 10231

Candida parapsilosis CBS 604

Saccharomyces cerevisiae SZMC 20733

4.3.18.2. Agar-diffúziós módszer

Az ezüst nanorészecskék antimikrobiális aktivitását agar-diffúziós módszerrel vizsgáltuk baktérium és élesztőgomba törzseken. Az élesztőgombák tenyésztéséhez YPD (1% pepton, 1% glükóz, 0,5% élesztőkivonat és 2% agar), a baktériumok tenyésztéséhez pedig húskivonat-pepton (0,1% húskivonat, 0,5% pepton, 1% glükóz, 0,2% élesztőkivonat és 2% agar) táptalajt használtunk. A mikroba tenyészetekből steril desztillált vízben szuszpenziót

készítettünk (1 kacsnyi tenyészet/5 mL desztillált víz). A táptalaj felszínre masszív oltással vittük fel a szuszpenziókat.

A 17,5 mg/mL koncentrációjú ezüst nanorészecske szuszpenziókból 5 µL-t pipettáztunk a mikrobákkal leoltott táptalaj felszínre. A tenyészeteket 30 °C-on 24 órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő elteltével meghatároztuk a gátlási zónák méretét.

4.3.18.3. Élőcsíraszám meghatározásos módszer

Az ezüstrészecskék mikroba sejtekre gyakorolt toxikus hatását a telepképző egységek (colony forming unit, CFU) számának változásával vizsgáltuk *Cr. neoformans* IFM 5844 és *E. coli* SZMC 0582 törzsek esetében. *Cr. neoformans* tenyészetből 4×10^6 sejt/mL, míg *E. coli* tenyészetből 2×10^7 sejt/mL koncentrációjú szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziókat 17,5; 70; 175; 350 and 1750 µg/mL koncentrációjú C-AgNP illetve GT-AgNP oldattal kezeltük 24 órán keresztül. Az inkubációs idő végén a sejteket centrifugálással kiülepítettük az oldatból (5 perc, 1900 g), majd steril vizes mosás után 1 mL desztillált vízben szuszpendáltuk fel őket. Négy lépcsőben tízszeres léptékű hígítási sorozatot készítettünk, majd a hígítási sorozat minden egyes tagjából 25 µL-t szélesztettünk YPD vagy húskivonat-pepton táptalaj felszínére, 3 párhuzamos kísérletben. A tenyészeteket 30 °C-on 48 órán keresztül inkubáltuk, majd meghatároztuk a telepképző egységek számát.

Minden kísérletet 3 párhuzamosban 3 alkalommal végeztünk el.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Nulla vegyértékű vas nanorészecskék környezetbarát előállítása és remediációban való alkalmazhatóságának vizsgálata

A környezetbarát eljárások kidolgozásánál, a hatékonyságot fenntartva, a költségek optimalizálása a szintézis paramétereinek változtatásával, pl. a felhasznált vegyszerek mennyiségének csökkentésével, a veszélyes anyagok „zöldebb” helyettesítésével, vagy a szintézis energiaigényének csökkentésével érhető el.

A vas nanorészecskék szintézise általában kémiai redukciós úton történik, mivel az eljárás gyors, egyszerű és nem igényel bonyolult vagy költséges felszerelést¹¹⁵. Ezáltal a sikeres szintézismódszerek kiterjesztése könnyebben megoldható ipari méretekben is. Az irodalmi áttekintésben bemutatott hátrányai miatt a nátrium-borohidridet redukálószerként alkalmazó módszerekben szükségessé vált egyéb, költséghatékonyabb, környezetbarát, helyettesítő redukálószer felkutatása és alkalmazása.

A szakirodalom áttekintése után, a nátrium-ditionitot és a különböző növényi kivonatokat (kávé, tea, vadszőlő) találtuk a legmegfelelőbb jelölteknek. Mindegyik kiválasztott redukálószer megfelelt a következő, elsősorban kissé ellentmondásos szempontoknak: hatékonyság, gazdaságosság és a további környezeti terhelés minimalizálása.

A következőkben részletesen bemutatjuk, hogy a különböző vas-prekursorok és redukálószer felhasználásával, kezeletlen csapvíz alkalmazásával szobahőmérsékleten, levegőn előállított vas nanorészecskéket tartalmazó szuszpenziók (nanovas szuszpenziók) milyen tulajdonsággal rendelkeztek. Továbbá próbáljuk megválaszolni azt a kérdést, hogy a vas nanorészecskék szintézise során a nátrium-ditionit és a különböző növényi extraktumok valós alternatívái lehetnek-e a nátrium-borohidridnek, illetve, hogy az előállított szuszpenziók közül melyek alkalmazhatók sikeresen klórozott szénhidrogénnel szennyezett talajvíz *in situ* környezeti kármentesítésében.

5.1.1. Kémiai redukcióval előállított nulla vegyértékű vas nanorészecskék jellemzése

Minden reakció eredményeként a nulla vegyértékű elemi vasra jellemző fényes, sötét fekete színű szuszpenziókat kaptunk. A kapott nanorészecskéket a szintézist követően különböző módszerekkel jellemeztük, ezek eredményeit a következőkben mutatjuk be.

5.1.1.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia – morfológia és méret

Az 5.1. ábra az ún. zöld és félig-zöld módszerekkel előállított vas nanorészecskék egy-egy jellemző TEM felvételét mutatja. Mind a kilenc minta izotróp (irány szerint egyenlő, a tér mindhárom irányába hasonló szimmetriájú térrácsok) morfológiát mutatott. A TEM képek alapján 7 mintánál, a $nZVI_{Cl_2}^D$, a $nZVI_{Cl_2}^B$, a $nZVI_{Cl_3}^D$, a $nZVI_S^B$ minták esetében és mindhárom növényi kivonattal előállított vas minta esetében ($nZVI^K$, $nZVI^{ZT}$ és $nZVI^V$), a szintézis során egységes méretű és kerekded, gömbszerű nanorészecskék alakultak ki. A $nZVI_{Cl_3}^B$ és $nZVI_S^D$ minták részecskéi jellemzően szögletesebbek voltak, éles sarkokkal és háromszöghöz közelítő alakkal rendelkeztek.

A nanorészecskék átlagos átmérőjének meghatározásához az ImageJ szoftvert használtuk¹⁹¹. Jól látható, hogy a növényi kivonatokkal készült vas nanorészecskék közül kettő, a kávé és a zöld tea kivonattal redukált vas nanorészecskék (a $nZVI^K$ és a $nZVI^{ZT}$ minták) elektronmikroszkópos képe nagyon hasonlónak adódott. Megfigyeltük, hogy a nanorészecskék könnyen aggregátumokat képeztek mindkét esetben. Ezen nanorészecskék TEM képek alapján mért átlagos részecskemérete rendre $124,2 \pm 31,8$ nm és $119,6 \pm 25,8$ nm volt. A további hét nanovas minta mindegyikében 100 nm alatt volt a mért átlagos részecskeméret – $nZVI^V$, $nZVI_{Cl_2}^B$, $nZVI_{Cl_2}^D$, $nZVI_{Cl_3}^B$, $nZVI_{Cl_3}^D$, $nZVI_S^B$, $nZVI_S^D$ – a részecskék átlagos átmérője rendre $47,5 \pm 8,8$; $23,5 \pm 4,1$; $70,9 \pm 7,0$; $25,2 \pm 3,5$; $25,7 \pm 4,3$; $36,1 \pm 5,2$ és $19,7 \pm 2,2$ nm volt. A TEM felvételek alapján egyik mintában sem figyeltünk meg szennyeződést.

Fontos megjegyeznünk, hogy mivel a szintézisek során kezeletlen csapvizet használtunk, elméletben lehetséges, hogy az előállított nanorészecskék kétfémes (ún. bimetál) részecskék lesznek, melyek vasból és egy redukált, a kezeletlen csapvízben szennyeződésként jelenlévő második fémből állnak. Azonban a magyarországi ivóvizek megengedett fémion tartalmának határértéke szigorúan korlátozott, köszönhetően a merev jogi szabályozásnak – 201/2001 (X.25) számú Kormányrendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről²⁰³. A helyhatósági, városi vízművek folyamatos monitorozó tevékenységének köszönhetően a csongrádi régióban a víz különösen jó minőségűnek számít.

5.1. ábra. Az előállított vas nanorészecskék jellemző TEM felvételei. Az első sorban a növényi kivonatokkal előállított nZVI^{ZT} (A), nZVI^{K} (B), nZVI^{V} (C) minták; a második sorban a nátrium-borohidriddel előállított $\text{nZVI}_{\text{Cl}_2}^{\text{B}}$ (D), $\text{nZVI}_{\text{Cl}_3}^{\text{B}}$ (E), $\text{nZVI}_{\text{S}}^{\text{B}}$ (F) minták; a harmadik sorban a nátrium-ditionittal előállított $\text{nZVI}_{\text{Cl}_2}^{\text{D}}$ (G), $\text{nZVI}_{\text{Cl}_3}^{\text{D}}$ (H), $\text{nZVI}_{\text{S}}^{\text{D}}$ (I) minták láthatók.

A vártak megfelelően, az energiadiszipatív röntgenspektroszkópiás (EDS) méréseink során sem tudtunk azonosítani a vason kívül más fémet az előállított mintáinkban (az 5.2. ábra egy nulla vegyértékű vas nanorészecskére jellemző EDS röntgenspektrumot mutat), ami szintén igazolja a csapvízben található fémes jellegű szennyezés alacsony koncentrációját (az általunk használt spektrométer 1 atom%-os kimutatási határral rendelkezik).

5.2. ábra. Nulla vegyértékű vas nanorészecskékre jellemző energiadiszipatív röntgenspektrum

Tehát bár feltételezhetjük, hogy a vas nanorészecskék szintézise során kétfémes részecskék is formálódhatnak a kiindulási vasvegyületből és a kezeletlen csapvíz fémes szennyeződéseiből, jelen munkánk eredményei alapján ezen bimetal részecskék mennyisége a tiszta vas nanorészecskékhez képest annyira kicsi, hogy gyakorlati szempontból bármilyen hatásuk nyugodtan elhanyagolható.

5.1.1.2. Röntgendiffraktometriás vizsgálatok – kristályszerkezet

A nanorészecskék röntgen diffraktogramján (5.3. ábra) az elemi állapotú vasra jellemző reflexiók azonosíthatóak 45° és $65^\circ 2\theta$ szögeknél. A JCPDS kártyák alapján ezekhez a csúcsokhoz a (110) és (200) Miller indexek tartoznak. Ezek a reflexiók a nátrium-borohidriddel redukált vas minták ($nZVI_{Cl_2}^B$, $nZVI_{Cl_3}^B$ és $nZVI_s^B$ minták) esetében hangsúlyosabban jelennek meg. A megfigyelhető egyéb, kevésbé intenzív reflexiók a vas-oxid állapothoz tartoznak. A szakirodalom alapján a vas nanorészecskéket a felületükön kialakult, vékony vas-oxid réteg veszi körül⁷⁰, így mérési eredményeink alapján elfogadhatjuk azt, hogy mintáink a nulla vegyértékű vas nanorészecskék mellett részben vas-oxidokat is tartalmazhatnak.

5.3. ábra. Az előállított vas nanorészecskék röntgendiffraktogramjai

A diffraktogramokat áttekintve jól látható, hogy a nZVI_S^D minta volt a legkevésbé érzékeny az oxigén jelenlétére, míg a három zöld módszerrel előállított és a $\text{nZVI}_{\text{Cl}_2}^D$ minta volt a legkevésbé toleráns az oxidációval szemben (5.3. ábra).

5.1.1.3. Redoxpotenciál mérések – redukciós kapacitás

Korábbi tanulmányok alapján elmondható, hogy a nanovas szuszpenziók redukzív dehalogenizációs képességének meghatározásában a redoxpotenciál érték egy jó indikátor lehet²⁰⁴. A félig-zöld és a zöld módszerekkel előállított 5000 ppm koncentrációjú nanovas szuszpenziók redoxpotenciál értékeinek változását az eltelt idő függvényében az 5.4. ábra szemlélteti. A redoxpotenciál mérések eredményeit, átlag-szórás értékeit 5 független kísérlet alapján határoztuk meg.

5.4. ábra. A különböző redukálószerrel előállított nanovas szuszpenziók redoxpotenciál értékeinek változása az idő függvényében

A kapott eredmények alapján a növényi kivonatok segítségével előállított vas nanorészecskék redoxpotenciál értékei a -250 mV és a -100 mV közötti intervallumba estek közvetlenül a szintézis után, majd a redukációs kapacitásuk az idő múlásával lineárisan csökkent. Megfigyeléseink alapján a kiindulási redoxpotenciál értékeket nem befolyásolta, ha a szintézis időtartamát 24 óra helyett 36 vagy 48 órára növeltük. A zöld nanovas minták közül a legnegatívabb (-241 mV) és legpozitívabb (-125 mV) kiindulási redoxpotenciál értéket a zöld teával, illetve a kávéval előállított vas nanorészecskék esetében mértük. Meglepő módon, a vadszőlőlevél segítségével készült vas nanorészecske redukációs kapacitása (-198 mV) felülmúlta az irodalomban dicsért kávékivonattal készült nanovas aktivitását²⁰⁵. Bár ez egyrészt magyarázható ez előbbi magas antioxidáns tartalmával²⁰⁶, másrészt lehetséges, hogy olyan márkájú kávéval választottunk ki kísérleteinkhez, amely az átlagosnál kevesebb antioxidáns hatással rendelkező aktív komponens tartalmazott.

A félig-zöld eredetű nanovas szuszpenziók redoxpotenciál értékei alacsonyabbak voltak, tehát ezek a vas minták jobb redukációs kapacitással rendelkeztek, mint a teljesen zöld szintézismódszerrel előállított minták, kivéve a gyengén teljesítő $nZVI_{Cl_2}^D$ mintát. Ezek az értékek ugyancsak növekedtek az idő múlásával, tehát a minták redukációs kapacitása csökkent. A legjobb kezdeti redoxpotenciál értéket, azaz a legnagyobb reaktivitást, a $nZVI_{Cl_2}^B$

és $\text{nZVI}_{\text{Cl3}}^{\text{B}}$ minták esetében mértük, ami összhangban van az irodalomban fellelhető eredményekkel^{207,208}. Másrészt viszont meg kell említenünk azt is, hogy ezek a minták voltak azok, éppen a nagy reaktivitásuk miatt, amelyek az idő múlásával a leggyorsabb ütemben, tehát a leghamarabb veszítették el a redukciós kapacitásukat. Figyelemreméltó, hogy az $\text{nZVI}_{\text{S}}^{\text{D}}$ minta kiegyensúlyozott teljesítményt nyújtott a kísérlet során, mivel a szintézis után közvetlenül a harmadik legjobb kezdeti redoxpotenciál értékkel rendelkezett és redukciós kapacitása is csupán lineárisan csökkent.

Az 5.5. ábra a redoxpotenciál értékek változását mutatja be abban az esetben, amikor az nZVI mintákat 1 ekvivalens mennyiségű, szennyezett területről származó illékony klórozott szénhidrogént tartalmazó talajvíz mintával reagáltattuk.

5.5. ábra. A különböző redukálószerrel előállított nanovas szuszpenziók redoxpotenciál értékeinek változása 1 ekvivalens mennyiségű, szennyezett területről származó illékony klórozott szénhidrogént tartalmazó talajvíz mintával való reagáltatás során

A görbe „telítettsége” jelzi a reakció tulajdonképpeni végpontját. Mind a kilenc minta esetében azt tapasztaltuk, hogy a redukciós kapacitás kezdetben nagyon gyorsan lecsökkent. Ez a változás a vas nanorészecskék és az illékony klórozott szénhidrogének között végbemenő dehalogenizációs reakció egyértelmű jeléül szolgált.

Míg a kávé és a zöld tea kivonatokkal előállított nanovas minták esetében tapasztalt dehalogenizációs aktivitás megerősíti a korábban publikált eredményeket, a vadszőlő kivonat

segítségével előállított vas nanorészecskék tulajdonságairól elsőként közöltünk az irodalomban adatokat²⁰⁹.

Ahogy az várható volt, azok a vas minták, amik nagyobb kezdeti redukciós kapacitással rendelkeztek, sokkal tovább maradtak aktívak. Míg a $nZVI^K$ minta 3 óra múlva teljesen elvesztette a redukciós kapacitását, addig a $nZVI_{Cl_2}^B$, $nZVI_{Cl_3}^B$ és $nZVI_S^D$ minták legalább 24 órán keresztül aktívak maradtak. Érdekes megfigyelni, hogy pontosan ennél a három mintánál kaptuk a legkisebb méretű nanorészecskéket (lásd TEM analízis), ami alátámaszthatja megtartott redukciós aktivitásukat. Ugyanis minél kisebbek a részecskék, annál nagyobb a fajlagos felületük, következésképpen nagyobb aktív felülettel rendelkeznek az illékony klórozott szénhidrogének lebontására. Ugyanakkor a nagyobb reaktív felület az oldott oxigén által indukált oxidatív deaktiválás (passziválás) lehetőségét is növeli. A mérések alapján ezt a lehetséges káros mellékhatást az említett három minta esetén a nagyon kis méretű nanorészecskék nagy száma és igen erős aktivitása kétségtelenül ellensúlyozza.

Összegezve, a fentiek alapján megállapítható, hogy a növényi kivonatokkal előállított vas szuszpenziók alkalmazása környezeti kármentesítésben nem, vagy csak nagyobb kompromisszumok mellett javasolt. Mivel a kávé és tea kivonattal készült vas nanorészecskék nagyobb részecskemérettel rendelkeztek, szintézis után könnyen aggregálódtak, redukálóképességük gyorsan lecsökkent. Habár a vadszőlő kivonat alkalmazásával megfelelőbb méretű vas nanorészecskéket sikerült előállítanunk, ez a minta is hamar, 3 óra elteltével elvesztette redukciós kapacitását. Így a továbbiakban csak a félig-zöld módszerrel előállított vas nanorészecskék lehetséges remediációs alkalmazásának vizsgálatát folytattuk.

5.1.1.4. Hidrogéngáz fejlődés vizsgálat – hatékonyság

A félig-zöld módszerrel előállított vas szuszpenziók hatékonyságát kénsavas reagáltatással vizsgáltuk. A koncentrált kénsav és a félig-zöld úton előállított nanovas minták reakciója közben felszabaduló hidrogén mennyiségét oxigén jelenlétében, csapvízben és oxigénmentes, inert környezetben (a szuszpenziók előállítása és vizsgálata nitrogéngáz bevezetése mellett történt) is megfigyeltük.

A kapott eredményekből ún. $nZVI$ hatékonysági százalékot számoltunk, ahol a 100%-os hatékonyságnak azt vettük, amikor a rendszerben jelenlévő összes vas (sztöchiometriailag) elreagál a kénsavval, vagyis az összes vas Fe^0 állapotúnak tekinthető. A kapott eredményeket az 5.6. ábra foglalja össze.

Jól látható, hogy a mért eredmények összhangban vannak a redoxpotenciál méréseknél kapott eredményekkel, a legjobb hatékonyságot mindkét mérésorozatban a nátrium-borohidriddel redukált vas minták ($nZVI_{Cl_2}^B$, a $nZVI_{Cl_3}^B$ és $nZVI_S^B$ minták) mutatták.

5.6. ábra. A különböző redukálószerrel előállított nanovas szuszpenziók hatékonysága. A hatékonyság a nanovas szuszpenziók koncentrált kénsavval való reagáltatása során fejlődő hidrogéngáz mennyiségéből számolt érték. A piros körök (●) az oxigén jelenlétében, csapvízben; a fekete négyzetek (■) az oxigénmentes, inert környezetben kapott értékek.

Érdemes megjegyezni, hogy a röntgendiffrakciós mérések eredményeivel egybevetően, ennél a kísérletsorozatnál is a $nZVI_{Cl_2}^D$ minta volt a legkevésbé toleráns az oxigén jelenlétére ($\Delta=28,7\%$). Míg a legrobosztusabbnak a $nZVI_S^D$ minta bizonyult, mivel az oxigénmentes és a terepi körülmények között mért hatékonyságok itt tértek el a legkisebb mértékben egymástól ($\Delta=17,8\%$).

5.1.1.5. Illékony klórozott szénhidrogének bontásának vizsgálata laboratóriumi körülmények között

Mind a hat félig-zöld kémiai módszerrel előállított nanovas szuszpenzió degradációs hatékonyságát vizsgáltuk egy illékony klórozott szénhidrogénnel szennyezett területről származó talajvíz mintában.

A környezetvédelmi kármentesítési gyakorlatban bevett szokás, hogy az esetleges redukciós kapacitás csökkenés kompenzálása végett a redukálószeret feleslegben

alkalmazzák a remediáció során. A redukciós kapacitás csökkenése oxidatív környezetben bekövetkezik, például az egyéb, nem-dehalogenációs reakciók lejárásának miatt⁷⁴.

Meg szeretnénk vizsgálni, hogy a szuszpenziók feleslegben való adagolása, valamint a szuszpenziók koncentrációjának növelése hogyan befolyásolja a szuszpenziók illékony klórozott szénhidrogén lebontó hatását. Ezért a nanovas szuszpenziókat mind a hat félig-zöld szintézismódszerrel 2500, 5000 és 10000 ppm koncentrációban is elkészítettük, és az ekvimoláris mennyiségű adagolás mellett, kétszeres és háromszoros felesleg alkalmazásával is végeztünk méréseket.

A szennyezett talajvízhez adagolva a különböző szuszpenziókat, 6 óra elteltével, a talajvízben található illékony klórozott szénhidrogénre nézve mért redukciós hatékonyságok adatait az 5.7. ábra mutatja. A lebontó hatást hatékonysággal fejeztük ki, amely fogalom alatt a talajvíz mintában található illékony klórozott szénhidrogének valamilyen mértékű nanovas általi lebontását értjük. A lebontási hatékonyság százalékos értékét a következőképpen számoltuk ki: a 6 óra után jelen lévő illékony klórozott szénhidrogének összkoncentrációját elosztottuk a kiindulási illékony klórozott szénhidrogének összkoncentrációjával; a 100%-os hatásfok így azt jelenti, amikor a vízből az összes illékony klórozott szénhidrogént sikeresen eltávolítjuk.

Az 5.8. ábra mutatja a szennyezett talajvíz illékony klórozott szénhidrogén összetételének általunk megfigyelt jellemző változását a különböző vasrészecskékkal való reagáltatás során. Az ábra az 5000 ppm-es koncentrációjú nZVI_s^B mintával való reakciót mutatja. Mindegyik vas adagolásánál hasonló tendenciájú, kissé eltérő mértékű bontást figyeltünk meg (5.7. ábra). Jól látható, hogy a fő szennyezők (TCE, cDCE) mennyisége jelentősen lecsökkent (~60%), és az egyéb toxikus köztitermékek sem halmozódtak fel.

A hatékonysági vizsgálat adatai alapján a következő megfigyeléseket tehetjük:

- 1) Az alkalmazott nanovas mennyiségének növelése kedvező hatással van az illékony klórozott szénhidrogén eltávolítására: az oldat koncentrációjától és az alkalmazott szintézistől függetlenül a nanovas háromszoros feleslegben adagolása megközelítőleg megduplázta a dehalogenizációs potenciált.
- 2) Az előállítás módja ugyancsak jelentősen befolyásolja a minták teljesítményét: ugyanolyan körülmények között, mindhárom koncentráció esetén, a leghatékonyabbnak nevezhető nZVI_{Cl3}^B minta csaknem háromszorosan felülmúlta a leggyengébben teljesítő nZVI_{Cl2}^D mintát.
- 3) Eredményeink alátámasztják az irodalomban közölt eredményeket, melyek szerint a nátrium-borohidrid segítségével előállított vas minták nagyobb

hatékonyságot mutatnak a szennyezők lebontása során, mint a nártium-ditionittal redukált vas minták¹¹⁸.

- 4) Emellett minden összetételnél megfigyelhető, hogy az 5000 ppm-es koncentrációjú minták mutatták a legnagyobb hatékonyságot. A jelenség azzal magyarázható, hogy míg alacsonyabb vas koncentráció (2500 ppm) mellett a vas nanorészecskéket felhasználó mellékreakciók kapnak viszonylag fontosabb szerepet (a kevesebb vas nanorészecske arányosan nagyobb része passzíválódik), addig magas vas koncentráció (10000 ppm) esetén megnő a részecskék aggregációjának valószínűsége (térfogat-felület arány kedvezőtlenebbé válik). Mivel mindkét folyamat a redukciós kapacitás csökkenéséhez járul hozzá, ezért javasolt a köztes, az 5000 ppm-es koncentráció alkalmazása.

5.7. ábra. A különböző redukálószerrel előállított nanovas szuszpenziók redukálóképessége. A nanovas szuszpenziókat 2500 ppm (A), 5000 ppm (B) és 10000 ppm (C) koncentrációban reagáltattuk illékony klórozott szénhidrogénnel szennyezett talajvízzel.

5.8. ábra. A kezelt talajvíz illékony klórozott szénhidrogén összetételének változása a nanovas adagolás (5000 ppm $nZVI_S^B$) hatására. Az ábrán szereplő szennyezőanyagok: tetraklóretilén (PCE), triklóretilén (TCE), cisz- és transz diklóretilén (c- és tDCE), vinil-klorid (VC), triklórmétán (TCM) és 1,1,2-triklóretán (1,1,2 TCA).

5.1.1.6. Vas nanorészecskék alakját befolyásoló védőmolekula adagolása

A félig-zöld szintézis során a mintákhoz a redukálószer mellett polivinil-pirrolidont (PVP) adagoltunk inert atmoszférában, a szintézis többi paraméterét nem változtatva, hogy megvizsgáljuk a keletkező nanorészecskék morfológiájára gyakorolt hatását. Az irodalomból jól ismert, hogy a PVP mint védőmolekula befolyásolja a szilárd kristály különböző lapjainak növekedési sebességét, anizotróp kristálynövekedést eredményezve²¹⁰.

A vizsgált négy minta ($nZVI_S^D$, $nZVI_{Cl_3}^D$, $nZVI_{Cl_3}^B$ és $nZVI_S^B$) esetében, a 0,3%-os adagolás során alakszelektivitást figyeltünk meg, hasonlóan Choi és munkatársai által leírtakhoz¹⁵⁷. Habár a TEM felvételek alapján a szálak szerkezet kialakulása csak a $nZVI_{Cl_3}^D$ minta esetében volt domináns, a $nZVI_S^D$ és $nZVI_{Cl_3}^B$ mintáknál is megfigyelhetők anizotróp nanoszálak a nanorészecskék mellett (5.9. ábra). A kapott nanoszerkezetek jellemzőit az 5.1. táblázat foglalja össze. Jól látható, hogy a különböző alakú nanoszerkezetek hatékonysága hasonló volt a PVP adagolás nélküli minták hatékonyságához (5.7. ábra). Kisebb mértékű hatékonyság csökkenés volt tapasztalható a $nZVI_{Cl_3}^D$ és $nZVI_S^B$ minták esetében, ami valószínűleg a kialakult nanoszerkezetek eltérő fajlagos felületével magyarázható¹¹⁶, de ezt

külön nem vizsgáltuk. Valószínűsíthetően a reakció idejének növelésével a $\text{nZVI}_\text{S}^\text{B}$ mintában is megfigyelhetőek lettek volna az anizotróp nanoszerkezetek¹⁵⁷. Habár a PVP segítségével befolyásolható a kialakuló nanokristályok alakja, a folyamatban betöltött pontos szerepe és maga a folyamat mechanizmusa csak hiányosan ismert²¹¹.

5.9. ábra. A PVP adagolás hatására kialakult nanoszerkezetek TEM felvételei: $\text{nZVI}_\text{S}^\text{D}$ (A), $\text{nZVI}_{\text{Cl}_3}^\text{D}$ (B), $\text{nZVI}_{\text{Cl}_3}^\text{B}$ (C) és $\text{nZVI}_\text{S}^\text{B}$ (D)

5.1. táblázat A PVP adagolás hatására kialakult nanoszerkezetek jellemzői

	Nanorészecske átmérő (nm)	Nanoszál hossz (nm)	Nanoszál átmérő (nm)	Hatékonyság (%)
$\text{nZVI}_\text{S}^\text{D}$	$43,1 \pm 17,7$	$64,9 \pm 23,8$	$9,0 \pm 3,3$	$70,9 \pm 2,2$
$\text{nZVI}_{\text{Cl}_3}^\text{D}$	-	$105,9 \pm 36,0$	$2,5 \pm 2,6$	$83,0 \pm 2,5$
$\text{nZVI}_{\text{Cl}_3}^\text{B}$	$29,6 \pm 10,1$	$74,9 \pm 32,5$	$1,3 \pm 1,5$	$96,0 \pm 3,1$
$\text{nZVI}_\text{S}^\text{B}$	$48,1 \pm 13,2$	-	-	$93,1 \pm 2,7$

5.1.1.7. A kiválasztott minta terepi tesztelése

A mai napig számos publikációban számoltak be a szennyezett talajvizek helyreállításában sikeresen alkalmazható nulla vegyértékű vas nanorészecskék szintéziséről és jellemző tulajdonságairól²¹². Ugyanakkor jelenleg csak csekély számban érhetőek el a vas nanorészecskék terepi méretű felhasználásáról szóló beszámolók²¹³⁻²¹⁷.

A mintánk terepi tesztelése egy nagyméretű remediációs projekt keretén belül valósult meg 2014-2015-ben az Alföld délkeleti részén. A terepi tesztekhez a félig-zöld módszerrel előállított nZVI_S^D mintát választottuk a következő okok miatt:

1. jelentősen jobb redoxpotenciál értékkel rendelkezett, mint bármelyik növényi kivonattal előállított nanovas szuszpenzió;
2. laboratóriumi tesztjeink során az illékony klórozott szénhidrogének lebontásába kiegyensúlyozott teljesítményt nyújtott mind a redoxpotenciálon alapuló, mind a gázkromatográfiás mérések alapján;
3. költséghatékonysága mellett nem szennyezi mérgező bórvegyületekkel a környezetet.

A szennyezett területen az injektáláshoz és a talajvíz monitorozásához szükséges kutakat rácsszerűen helyezték el. A mintákat szilikon csöveken keresztül vették és a teljesen megtöltött üvegedényeket sötétben, 4 °C-on tárolták a vizsgálatok elvégzéséig. A mintavételek tervezetten csapadégmentes időszakban történtek: a talajvíz felszíni forrásból történő (hó vagy eső) esetleges hígításának elkerülésére a mintákat legalább 2 száraz, csapadégmentes nap után vették. Az 5.2. táblázat tartalmazza az injektálási és mintavételi napok időjárási viszonyait.

5.2. táblázat. Időjárási viszonyok az injektálási és mintavételi napok

Dátum	Levegő hőmérséklete (°C)	Csapadék (mm)	Páratartalom (RH%)	Légnyomás (hPa)	Szélesség (km·h ⁻¹)
2014.09.17.	16	0	88	1020	0
2014.09.19. (injektálás)	21	0	41	1021	1,8
2014.10.27.	4	0	95	1033	3,6
2014.11.24.	8	0	44	1028	3,6
2014.11.26. (injektálás)	1	0	99	1026	7,2
2014.12.03.	8	0	93	1021	9,3
2014.12.19.	8	0	81	1019	20,4
2015.01.21.	6	0,1	100	1015	3,7

A kezelt terület talajrétegei a következőképpen néznek ki: a legfelső vékony réteg a 10-15 cm vastag termőtalaj. Ezt az agyagos réteg követi -3 méterig, majd -5 méterig a homokos-földes-agyag réteg található. Ezután -5 és -12 méter között váltakozva homokos-földes-agyag és iszapos agyag rétegek vannak, majd -12 és -25 méter között egy agyag réteg következik. -22 méternél egy 0,5 méter vastag homokos-agyagos réteg van az agyagrétegbe ágyazva. A talajvíz szintje -5 méternél volt a beavatkozás területén. A vizsgált területen a pórusnyomás-gradiens értéke $40 \text{ kPa} \cdot \text{m}^{-1}$ volt, azonban -12 méternél a várt 480 kPa helyett egy jóval alacsonyabb, 100-180 kPa pórusnyomást lehetett mérni, ami megkönnyítette az injektálást ebben a mélységben.

A területen azonosított legfőbb szennyezők az illékony klórozott szénhidrogének voltak: perklóretilén (PCE), triklóretilén (TCE), diklóretilén (DCE, cisz- és transz együttesen) és vinil-klorid (VC). A szennyezők kezdeti koncentrációját a talajvízben 2014. 09. 17-én mérték, majd 2014. 09. 19-én történt az első injektálás. Az első injektálás alkalmával több, mint 500 dm^3 5000 ppm koncentrációjú nZVI_S^D szuszpenziót juttattak a talajba -12 méternél. Ezután megkezdődött a monitorozás fázisa. A monitoring kutak az injektáló ponttól 5 méter távolságra helyezkednek el. A második injektálás teljesen hasonló környezeti és műszaki paraméterek mellett történt 2014. 11. 26-án. A talajvíz monitorozása 2015 januárjában fejeződött be. Az 5.10. ábra mutatja a legfőbb illékony klórozott szennyezők koncentrációjának változását a beavatkozás ideje alatt a kiválasztott monitoring kútban.

5.10. ábra. A megvalósult terepi teszt eredménye: Az 5000 ppm koncentrációjú nZVI_S^D szuszpenzióval kezelt illékony klórozott szénhidrogénekkel szennyezett területen a szennyezők koncentrációjának változása az idő függvényében egy kiválasztott monitoring kútban. A pirossal jelölt pontok az injektálások dátumait jelölik.

Jól látható, hogy sem a PCE, sem a TCE nem volt kimutatható az utolsó mintavétel során a talajvízmintákban, valamint a DCE és VC mennyisége is $15 \mu\text{g/L}$ alá csökkent. Az eredmények alapján tehát elmondhatjuk, hogy a félig-zöld szintézis során előállított $\text{nZVI}_\text{S}^\text{D}$ minta terepi tesztelése sikeres volt, alkalmazása egy környezetkímélőbb, költséghatékonyabb alternatívát jelenthet a környezeti kármentesítésben.

Összegezve, sikeresen állítottunk elő szobahőmérsékleten, környezeti körülmények mellett különböző vas nanorészecskéket erőforrás-igényes deoxigenált oldószerek helyett csapvíz használatával. Meghatároztuk az előállított vas nanorészecskék átlagos szemcseméretét, kristályszerkezetét és redukációs kapacitását. Habár a félig-zöld úton előállított vas nanorészecskék kisebb átlagos átmérővel és nagyobb redukációs potenciállal rendelkeztek, mint a teljesen zöld szintézissel készült minták, az utóbbiak is elfogadható teljesítményt nyújtottak kísérleteink során.

Ezenkívül a szakirodalomban elsőként írtunk a vas nanorészecskék sikeres szintéziséről vadszőlőlevél (*Parthenocissus quinquefolia*, Virginia creeper) kivonat felhasználásával²⁰⁹.

Emelet kimutattuk, hogy mivel a nátrium-borohidrid sokkal drágább és toxikusabb vegyszer, mint a nátrium-ditionit, ezenfelül a belőle származó szintén toxikus bórvegyületek esetleges környezetbe kikerülése további környezetvédelmi problémát okoz, eredményeink alapján a környezeti remediációban egy fenntartható, hatékony, gazdaságos alternatív megoldás lehet a vasszulfátból nátrium-ditionittal redukált vas nanorészecskék ($\text{nZVI}_\text{S}^\text{D}$) alkalmazása. Ugyanakkor további vizsgálatok és terepi tesztek szükségesek – úgy, mint a vas nanorészecskék talajban élő szervezetekre gyakorolt hatásának felmérése – a vas nanorészecskékkel történő remediációs beavatkozás pontos tervezéséhez, megértéséhez, hosszú távú hatásainak felbecsléséhez és egyéb szennyezett területeken való sikeres alkalmazásához.

5.2. Mikrokozmosz vizsgálatok: Nulla vegyértékű vas nanorészecskék hatása a klórozott alifás szénhidrogének degradációjára és a deklorinációban résztvevő szervezetekre

Mint már bemutattuk, a klórozott alifás szénhidrogénekkal szennyezett területek a korábbi katonai, mezőgazdasági és ipari tevékenység hatására, számos helyen találhatóak hazánkban és az EU országaiban^{4,6,11}. Ezeken a területeken a legtöbb esetben a talajvizek és a rétegvizek is szennyezettek, ami közvetlenül fenyegeti az ivóvízbázisokat, így hatékony kármentesítésük kiemelt fontosságú.

Az előző 5.1. fejezet eredményei alapján láttuk, hogy a vas nanorészecskék illékony klórozott szénhidrogének környezeti kármentesítésben sikeresen alkalmazhatóak. Ugyanakkor kimutattuk, hogy a szintézis során alkalmazott kiindulási vas-sók, redukálószeres és egyéb stabilizáló anyagok jelentősen befolyásolják a kapott vas nanorészecskék morfológiáját és aktivitását (hatékonyságát). Ezek után felmerül a kérdés, hogy vajon az eltérő tulajdonsággal rendelkező nanovasak a remediációs kezelés során hogyan befolyásolják a biológiai rendszereket, más-e a részecskék biológiai aktivitása is. A beavatkozás tervezésénél nagyon fontos, hogy figyelembe vegyünk a remediáció közben és után a szennyezett területen kialakult mikroflóra állapotát, ami a későbbiekben meghatározhatja a megtisztított közeg hasznosíthatóságát.

Munkánk második részében a nanovasas beavatkozás hatékonyságának meghatározása mellett fel akartuk térképezni, hogy komplex ökológiai rendszerben a különböző típusú nanovasak milyen hatással vannak a klórozott alifás szénhidrogénnel szennyezett, nehezen hozzáférhető földtani közegek anaerob mikroflórájára, kiváltképp a deklorinációban résztvevő baktériumokra.

A környezeti kármentesítésnél a szennyezőanyagok sorsát, a degradációt, a mikrobiális közösség szerkezetének változásait, és a beavatkozás egyéb következményeit vizsgálhatjuk mikrokozmosz modellkísérletekben, amelyek a természetes környezet mesterségesen korlátozott részhalmazai, a természetes ökoszisztéma biológiai modelljei²⁹. Segítségükkel pontosabban tervezhetővé válik a víznél nagyobb sűrűségű, nehezen hozzáférhető, felszín alatti, klórozott alifás szénhidrogének *in situ* kezelése.

Kísérleteink során, a 4.3.12 fejezetben ismertetett módon összeállított mikrokozmosz rendszerekben anaerob körülmények között vizsgáltuk négy különböző tulajdonságú, félig-zöld módszerrel előállított nulla vegyértékű vas nanorészecske ($nZVI_S^D$, $nZVI_{Cl_3}^D$,

$nZVI_{Cl_3}^B$ és $nZVI_S^B$) hatását a klórozott szénhidrogének degradációjára és az anaerob mikroflórára, különös tekintettel a deklorinációban résztvevő baktériumokra.

Az előállított nulla vegyértékű vas nanorészecskék közül úgy választottunk ki négyet, hogy a szintézis során alkalmazott különböző redukálószer anaerob mikroflórára gyakorolt esetleges hatását meg tudjuk vizsgálni. A minták közül kettő nátrium-ditionit, másik kettő pedig nátrium-borohidrid felhasználásával készült ugyanazon két kiindulási vas-só (vas(II)-szulfát és vas(III)-klorid) alkalmazásával, mindegyik minta tartalmazott továbbá 0,3%-nyi PVP-t is. Habár a szintézis során adagolt PVP meghatározó befolyással volt a kialakuló részecskék morfológiájára egyes mintákban, a szakirodalmi adatok alapján, a biológiai rendszerek mikrobiális összetételére gyakorolt hatása ilyen koncentrációban elhanyagolható²¹⁸. Mindegyik minta eltérő morfológiával és reaktivitással rendelkezett (5.9. ábra, 5.1. táblázat). A batch kísérletekben a vas nanorészecskéket minden esetben 0,1 g/L-es koncentrációban alkalmaztuk, ami jóval alacsonyabb koncentráció, mint az előző fejezetben bemutatott vizsgálatok során alkalmazott koncentrációk. Alapos megfontolás után azért választottuk ezt a sokkal kisebb koncentrációt, mert habár a környezeti remediációban a nanovasat tízszer nagyobb (1 g/L és felette) koncentrációban alkalmazzák, számos publikációban számoltak be baktériumok növekedésének gátlásáról a vas részecskék 0,1-0,25 g/L-es koncentrációban történő alkalmazása mellett^{93,94,107}.

A különböző vas nanorészecskék adagolásának hatását mikrokozmosz rendszerekben tanulmányoztuk. DNS alapú mérésekkel követtük a reduktív deklorinációban résztvevő baktériumok jelenlétét, mennyiségét, ezen felül pedig elemeztük a mikroba közösség összetételét, illetve változását a különböző nanovas adagolás hatására. Az illékony klórozott szénhidrogének összetételének változását gázkromatográfiás mérésekkel vizsgáltuk. A mikrokozmoszokból a kiindulási, a 4., a 10., és a 20. napon vettünk mintákat.

5.2.1. Különböző nulla vegyértékű vas nanorészecskék hatása a mikrobiális összetételre

5.2.1.1. Anaerob heterotróf élő sejtszám

Anaerob heterotróf lemez értékeléssel (R2A agar, 25 °C, 48 óra inkubáció, anaerob környezet) meghatároztuk a tenyésztethető heterotróf sejtek számát. Az 5.11. ábra mutatja a baktériumok szaporodásának dinamikáját. A vártan megfelelően a biotikus kontroll mintában a sejtszám közel állandó volt (ún. stationer szakasz). A vas nanorészecskék adagolásának (az ábrán nyíllal jelölve) hatására kezdetben mindegyik mikrokozmoszban

lecsökkent az élő, tenyésztető sejtek száma, majd ezt követően sejtszám növekedést figyeltünk meg.

5.11. ábra. Az anaerob tenyésztető sejtek számának változása 0,1 g/L-es koncentrációban adagolt különböző típusú nanovas hatására.

A nyíl a nanovas adagolás időpontját jelöli.

A nátrium-borohidriddel redukált vas minták esetében a baktériumok hamarabb elérték a stacioner szakaszt, az élő csíraszám a 10. naptól kezdve állandósult a kontroll mintához képest egy alacsonyabb értéken. Ezzel szemben a nátrium-ditionittal redukált nanovasas kezelés hatására a kezdeti sejtszám csökkenés után sejtszám növekedést figyeltünk meg, amely a 20. nap körül már elérte a kontroll minta sejtszámának értékét.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a nanovasas kezelés kezdetben drasztikus sejtszám csökkenést eredményez, majd az új környezethez alkalmazkodás (adaptálódás) után mindkét típusú nanovas adagolása esetén megindul a túlélő baktériumok sejtszámának növekedése – bár a nátrium-borohidrides mintáknál kisebb mértékben –, ami egy idő után beáll egy konstans értékre.

Megjegyzendő, hogy ez a módszer nem alkalmazható a nem tenyésztető baktériumok kimutatására, így a biodegradációban résztvevő *Dehalococcoides*, metanogén vagy szulfátredukáló baktériumok számának meghatározására, ezért ezen közösségek arányának változását génspecifikus kvantitatív PCR-rel követtük nyomon (lásd később 5.2.1.4. fejezet) a kísérlet során.

5.2.1.2. Biomassza mennyiség

A DNS koncentráció információt ad a mikrokozmoszban lévő összes biomassza mennyiségéről, így a tenyészthető és nem tenyészthető baktériumok mennyiségéről is. Az 5.12. ábra mutatja a különböző típusú nanovas adagolás mellett megfigyelt összes DNS koncentráció változásokat a mikrokozmosz rendszerekben.

5.12. ábra A mikrokozmosz rendszerek DNS koncentrációjának változása a különböző típusú nanovas adagolás hatására

Az adagolás nélküli biotikus kontroll esetében az idő előrehaladtával a vártnak megfelelően, nem tapasztaltunk változást a kiindulási DNS koncentrációhoz képest illetve a tenyészthető baktériumok számában.

Az első mintavételnél, tehát 4 nappal a nulla vegyértékű vas nanorészecskék adagolása után, mikrobiális biomassza csökkenést figyeltünk meg mindegyik kezelt minta esetében. Ez a csökkenés valószínűleg a vas nanorészecskék toxikus hatásának köszönhető, ahogy azt már korábban mások is bemutatták⁹³. A 10. mintavételi naptól a biomassza mennyiségének a növekedése volt jellemző mind a négy kezelt mintában. A 20. mintavételi napon pedig jól látható, hogy mindegyik kezelt minta túlnőtte a biotikus kontrollt. Érdekes módon a nátrium-ditionittal redukált vas nanorészecskék alkalmazása esetében figyeltük meg a legnagyobb DNS koncentráció növekedést, a nátrium-borohidriddel redukált vas részecskék adagolása kisebb mértékű biomassza növekedést eredményezett. Xiu és munkatársai hasonló tendenciát figyeltek meg a kísérleteik során: a nanovas adagolás kezdetben gátolta a

baktériumok növekedését, de a kezdeti toxikus hatás után a környezethez adaptálódott mikroflóra alakult ki, majd növekedésnek indult⁹³.

5.2.1.3. Eubaktérium összetétel (DGGE vizsgálatok)

A DGGE módszerrel nyomon követhető a bakteriális közösség diverzitás változása a különböző adalékanyagok hatására. A nested PCR során a 16S rDNS (16S riboszómális RNS-t kódoló gén) variábilis V3 régióját amplifikáltuk eubakteriális primerek segítségével. A vizsgálattal arról próbáltunk információt kapni, hogy milyen a nem kezelt, kontroll mikrokozmosz közösség komplexitása, valamint arról, hogy ez miként módosult a különböző vas nanorészecskés kezelés hatására. A 20. napi, 40-60%-os denaturáló koncentrációjú DGGE gélről készült felvételen (5.13. ábra) látható, hogy a megfigyelt csíkok (band-ek) száma nagyon hasonló volt mindegyik sávban (line). Kis eltéréseket figyeltünk meg a csíkok intenzitásában a vas nanorészecskék szintézise során alkalmazott redukálószer függvényében, tehát a kezelés után kis mértékben megváltozott a bakteriális közösség diverzitása. A nátrium-borohidriddel redukált vas nanorészecskék ($\text{nZVI}_{\text{Cl}_3}^{\text{B}}$ és $\text{nZVI}_{\text{S}}^{\text{B}}$) adagolása esetén a minták DGGE profilján látható csíkok intenzitása és száma hasonló eloszlást mutatott a kontroll mintában megfigyeltékével. A nátrium-ditionittal előállított vas nanorészecskékkel történő kezelés hatására több csík kieresődését észleltük, amiből néhány eddig alulreprezentált törzs előtérbe kerülésére következtethetünk.

5.13. ábra. A biotikus kontroll és a különböző nanovassal kezelt rendszerek DGGE elemzésének eredménye a 20. napon

5.2.1.4. A biodegradációban részt vevő baktériumok relatív mennyiségének változása

Ahogy azt 5.2.1.2 fejezetben bemutattuk, a kísérlet során a minták összes baktérium mennyisége kezdetben csökkent, majd nőtt a kezelés hatására függetlenül attól, hogy melyik nanovast alkalmaztuk.

A biodegradációban fontos szerepet játszó *Dehalococcoides* törzsek, szulfátredukáló és metanogén baktériumok relatív mennyiségének változását is szeretnénk volna vizsgálni a különböző vas nanorészecskék adagolásának hatására. A változás meghatározása kvantitatív PCR (qPCR) segítségével történt, az egyes génekre meghatározott értékeket a teljes eubaktérium mennyiséghez viszonyítottuk. A specifikus PCR reakciók során vizsgáltuk a *dhc*, *vcrA*, *tceA*, *dsrA*, *apsA* és *mcrA* gének mennyiségének alakulását a mikrokozmosz rendszerekben. Az eredményeket az 5.3. táblázat foglalja össze.

Jól látható, hogy a különböző baktérium nemzetségeket és enzimeket kódoló gének relatív mennyiségének változása erősen függ a vas nanorészecskék szintézise során alkalmazott redukálószerrel. Kivétel ez alól a *Dehalococcoides* törzsek arányának változása. Ebben az esetben azt tapasztaltuk, hogy függetlenül attól, hogy melyik vas nanorészecskét adagoltuk, a *Dehalococcoides* törzsek relatív aránya csökkent. Tehát a *Dehalococcoides* törzsek mennyiségének relatív változása független volt a vas nanorészecskék előállítás körülményeitől, azaz a szintézis során felhasznált kiindulási vas-sóktól és redukálószerektől. Azonban a redukatív dehalogenáz génnel (*tceA* és *vcrA*) rendelkező *Dehalococcoides* törzsek mennyisége nem csökkent olyan mértékben, mint a teljes *Dehalococcoides* populáció, tehát mindegyik típusú vas nanorészecske kevésbé gátolta azokat a *Dehalococcoides* törzseket, amik a redukatív deklorinációért felelősek. A kezdeti toxikus hatás után kialakult átrendeződés után, a 20. napon megfigyelhető volt, hogy a redukatív dehalogenáz géneket tartalmazó *Dehalococcoides* törzsek mennyisége visszaállt a biotikus kontroll arányainak megfelelően.

A szulfátredukáló baktériumok mennyiségének változását a disszimilatörikus szulfít-reduktáz (*dsrA*) és adenzin-foszfoszulfát-reduktáz (*apsA*) gének, mint filogenetikai markerek alkalmazásával vizsgáltuk. A nátrium-borohidriddel előállított nanovassal történő kezelés esetén az ezeket a reduktáz géneket tartalmazó baktériumok populációjában csak kismértékű változás (kisebb növekedés, majd csökkenés) történt. Ugyanakkor a nátrium-ditionittal redukált vas nanorészecskék alkalmazása a szulfátredukáló baktériumok számának növekedését eredményezte, ami arra enged következtetni, hogy ezek a vas nanorészecskék segítik a szulfátredukálók életben maradását és növekedését.

A metil-koenzim-M reduktáz génnel (*mcrA*) rendelkező baktériumok populációjában mind a négy nanovas alkalmazásánál csökkenést figyeltünk meg a 20. nap végére, a csökkenés mértéke kissé nagyobb volt a nátrium-ditionitos minták esetében. Megjegyzendő, hogy a $nZVI_S^B$ mintánál kezdetben nagymértékű növekedést, majd hirtelen lecsökkenést figyeltünk meg. Mivel a kísérletek során a nanovasak hozzáadását követően nem történt szubsztrát adagolás, így a metanogén baktériumok csökkenését a szubsztrát elfogyása is okozhatta.

5.3. táblázat. A biodegradációban résztvevő mikroorganizmusok és a reduktív dehalogenáz gének relatív arányának változása a különböző nanovas adagolás hatására

	Inkubációs idő (nap)	Biotikus kontroll	$nZVI_S^D$	$nZVI_{Cl_3}^D$	$nZVI_{Cl_3}^B$	$nZVI_S^B$
<i>Dehalococcoides</i> 16S gén %-os aránya az eubaktérium 16S gén mennyiséghez (<i>dhc</i> gén/eubaktérium)	4	8,1	5,1	4,0	7,0	8,3
	10	7,3	2,3	2,4	4,8	5,8
	20	6,9	2,0	2,0	3,2	5,0
vinil-klorid reduktáz gén %-os aránya az eubaktérium 16S gén mennyiséghez (<i>vcrA</i> gén/eubaktérium)	4	21,0	8,0	5,5	23,0	29,0
	10	20,2	15,3	12,6	14,1	19,7
	20	18,9	12,5	13,3	12,6	18,4
triklóretilén reduktáz gén %-os aránya az eubaktérium 16S gén mennyiséghez (<i>tceA</i> gén/eubaktérium)	4	12,8	6,7	5,7	16,0	17,0
	10	12,7	11,9	11,0	15,6	19,0
	20	12,6	11,8	11,8	15,7	16,4
disszulfid szulfid-reduktáz gén %-os aránya az eubaktérium 16S gén mennyiséghez (<i>dsrA</i> gén/eubaktérium)	4	4,8	11,2	17,2	4,6	5,1
	10	4,9	26,9	26,5	1,3	8,9
	20	4,7	10,0	12,8	1,2	1,5
adenozin-foszfoszulfát-reduktáz gén %-os aránya az eubaktérium 16S gén mennyiséghez (<i>apsA</i> gén/eubaktérium)	4	4,5	19,3	35,5	9,3	9,9
	10	5,1	36,0	40,9	7,2	13,5
	20	4,6	9,7	23,6	3,0	3,4
metil-koenzim-M reduktáz gén %-os aránya az eubaktérium 16S gén mennyiséghez (<i>mcrA</i> gén/eubaktérium)	4	37,4	36,9	34,8	34,9	56,6
	10	36,5	18,8	16,6	37,6	46,0
	20	37,2	7,6	9,1	16,4	15,4

A vas nanorészecskék anaerob korrozója során keletkező hidrogéngáz (5.1.1.3, 5.1.1.4 és 5.1.1.5 fejezet) a biodegradáló mikroorganizmusok számára elektrondonorként

szolgálhat. Ha a kémiai nanovas általi lebontás és a mikrobiológiai deklorináció folyamata szinergikus, akkor a vas nanorészecskék képesek lebontani a szennyezők nagy részét, majd a vas által kialakult kedvező redukív környezetben a maradék klórozott etilének lebontását a deklorináló baktériumok végzik.

Kapott eredményeink csak részben korrelálnak a szakirodalomban fellelhető adatokkal. Számos publikációban kimutatták, hogy a vas nanorészecskék elektrondonorként serkenthetik a metántermelődést és a szulfátredukálás folyamatát. További vizsgálatok szükségesek az általunk vizsgált vas nanorészecskék metanogenezist gátló folyamatának pontos megismeréséhez.

5.2.1. Nanovasak hatása a kémiai összetételre

5.2.1.1. Vas ionok koncentrációja

Az előző mérések alapján elmondhatjuk, hogy a vas nanorészecskék a kezelés során, kezdetben gátló hatást fejtenek ki a talajbaktériumok populációjára, ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a vas esszenciális tápanyagként szolgál számos baktérium számára. Központi szerepet játszik a sejtnövekedésben, részt vesz a DNS szintézisben, enzimek kofaktoraként betöltött szerepe messze a legfontosabbá teszi a mikrotápelemeknek is nevezett fémionok között. Vas hiányában megszűnhet az egyes oxidoreduktáz enzimekben nélkülözhetetlen kofaktorok, a citokrómok bioszintézise. A vas eddig említett élettani szerepein kívül alapvető szerepet játszik számos biokémiai reakcióban, mint például a légzés, fotoszintetikus transzport, nitrát szintézis vagy nitrogén fixálás. Ezért valószínűsíthető, hogy a betáplált nulla vegyértékű vas nanorészecskékből származó vas-ionokat számos baktérium hasznosíthatja anyagcsere folyamatai során²¹⁹, ezt azonban nem vizsgáltuk a munkánk során.

Azonban fontosnak találtuk az egyes mikrokozmoszok vas-ion tartalmának meghatározását, ezért a 20. napon vett mintákon ICP-MS méréseket végeztünk. Az 5.4. táblázat adatai alapján elmondható, hogy a nem kezelt, biotikus minta esetében alacsony oldott vastartalom figyelhető meg ($0,19 \pm 0,10$ mg/L).

A különböző nanovassal kezelt mikrokozmoszok esetében az oldott vas ionok koncentrációja a nátrium-ditionittal redukált vas mintáknál kissé alacsonyabb volt ($nZVI_S^D$: $0,56 \pm 0,10$ mg/L és $nZVI_{Cl_3}^D$: $0,69 \pm 0,12$ mg/L), mint a nátrium-borohidriddel előállított nanovas minták esetében ($nZVI_S^B$: $0,82 \pm 0,10$ mg/L és $nZVI_{Cl_3}^B$: $0,91 \pm 0,14$ mg/L). Tehát mindegyik mikrokozmosz modellben a vas ionok lassú oldódása következett be, ami kedvező

hatással lehet a vas redukálásából energiát szerző baktériumok növekedésére²¹⁹, azonban ezt részletesen nem vizsgáltuk.

5.4. táblázat. A mikrokozmoszokban mért vas ionok mennyisége

	Biotikus kontroll	nZVI _S ^D	nZVI _{Cl3} ^D	nZVI _{Cl3} ^B	nZVI _S ^B
Vas ionok koncentrációja (mg/L)	0,19±0,10	0,56±0,10	0,69±0,12	0,82±0,10	0,91±0,14

5.2.1.2. Reduktív deklorináció a mikrokozmosz rendszerekben a különböző nanovas adagolás mellett

A mikrokozmosz rendszerekben a kiindulási modellszennyező vegyületként használt triklóretilén és származékainak koncentráció változását gázkromatográfiás mérésekkel követtük nyomon. A négy vas nanorészecske alkalmazásakor eltérő deklorináló profilokat figyeltünk meg (5.14. ábra és 5.15. ábra). A triklóretilén bontása megvalósulhat kémiai útvonalon, a nulla vegyértékű vas nanorészecskék által, vagy mikrobiológiai úton, a deklorináló szervezetek segítségével. A vas által indukált kémiai útvonalon végtermékként a β -eliminációból acetilént, a hidrogenolizisből pedig etilént kapunk. A klórozott köztitermékek megjelenése a biológiai dehalogenizációra utal (2.5. ábra).

A biotikus kontroll esetében, nanovas részecskék nélkül, a triklóretilén konszekutív reakciókban etilénné alakult. 0,1 g/L nanovas tartalom mellett a mikrokozmoszok cisz-diklóretilén és vinil-klorid koncentrációja nem változott. Ezek az eredmények alátámasztják az eddigi méréseinket, miszerint a nanovas már ebben az alkalmazott koncentrációban, a szintézis során felhasznált redukálószerrel függetlenül, gátló hatással van a biológiai deklorinációra.

A legnagyobb különbségeket a mikrokozmoszok gázterének összetételében tapasztaltuk (5.15. ábra). Négy nap inkubáció után csak a nátrium-borohidriddel redukált vas nanorészecskék esetén figyeltünk meg etán- és acetiléngáz fejlődést – ami a másik két nanovas alkalmazásánál egyáltalán nem jelent meg –, továbbá itt a TCE redukciója során is jobb eredményeket kaptunk. Ebből arra következtettünk, hogy a borohidrides minták esetén a kémiai lebontás dominált, a biológia deklorináló aktivitás lecsökkent. Emellett a nátrium-borohidriddel redukált minták jelenléte jelentősen serkentette a metanogenezist: 20. nap alatt a metán mennyisége $2 \pm 0,1$ μ molról $32 \pm 1,8$ μ molra emelkedett ezeknél a mintáknál, míg a biotikus kontroll esetében mindössze 6-9 μ mol között maradt.

5.14. ábra. A TCE és cDCE kémiai és mikrobiológiai reakciója 0,1 g/L nanovas szuszpenziók (B-E) adagolása mellett. A biotikus kontroll (A) csak a deklorináló baktériumokat tartalmazza.

5.15. ábra. A deklorináló baktériumokat tartalmazó mikrokozmosz rendszerek kumulatív metán (A), etán (B), etilén (C) és acetilén (D) hozama 0,1 g/L különböző típusú nanovas adagolása mellett

Összegezve, megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a környezeti kármentesítés során a remediáció fokozása érdekében nagyon fontos a megfelelő vas nanorészecske körültekintő kiválasztása, mivel a szintézis során alkalmazott prekursorok és redukálószeres jelentősen befolyásolják a kialakult nanorészecskék morfológiája és hatékonysága mellett az anaerob baktériumokra és a deklorináló folyamatokra gyakorolt hatását is.

Eredményeink összefüggnek a szakirodalmi adatokkal és a fellelhető terepi tesztek eredményeivel, melyek szerint a nanovas alkalmazása mellett a kezdeti toxicitás után az adaptálódó deklorináló mikroorganizmusok segítették a szénhidrogének lebontását^{89,93,220}. Mindez kiválóan megalapozza az előállított vas nanorészecskék alkalmazhatóságát későbbi terepi tesztek során, lehetővé téve egy kombinált kémiai-biológiai kezelés kidolgozását.

5.3. Növényi kivonatokkal előállított ezüst nanorészecskék kémiai és biológiai aktivitásának összehasonlító vizsgálata

A nanorészecskék mindennapi életben való biztonságos használatához nagyon fontos felmérnünk, hogy az egyes részecskék jellemző tulajdonságait, életszerű környezetben való viselkedését milyen tényezők határozzák meg. Az előző fejezetek eredményei alapján elmondható, hogy a vas nanorészecskék szintézise során alkalmazott kiindulási vas-sók, redukálószeres és egyéb stabilizáló anyagok jelentősen befolyásolják a kapott nanorészecskék aktivitását (hatékonyságát) és morfológiáját, illetve biológiai aktivitását. A redukálószeres befolyásoló hatását egy másik, napjainkban széleskörűen alkalmazott nanorészecske előállításában és karakterisztikus tulajdonságainak vizsgálatában folytattuk.

Köszönhetően a széles körű alkalmazási lehetőségeiknek az ezüst nanorészecskék előállítása és felhasználása iránti igény egyre nő. Habár az utóbbi években egyre inkább előtérbe kerültek a növényi kivonatokat felhasználó zöld szintézismódszerek, csak kevés tanulmány született az előállított nanorészecskék komplex (antibakteriális, antifungális, antivirális és citotoxikus) biológiai aktivitásának vizsgálatáról, különös tekintettel a szintézis során alkalmazott különböző növényi kivonatok hatásának függvényében.

Munkánk harmadik részében meg akartuk vizsgálni, hogy az ezüst nanorészecskék szintézise során felhasznált redukálószeres, esetünkben növényi kivonatok milyen hatással vannak a kialakult részecskék karakterisztikus tulajdonságaira és későbbi alkalmazási lehetőségeire. Tanulmányoztuk, hogy a kávéból és zöld teából készült növényi kivonatok mennyire alkalmasak ezüst nanorészecskék zöld módszerrel történő előállítására, illetve hogy a szintetizált anyagok különböző biológiai rendszerekre gyakorolt hatásai között milyen különbségek vannak. Mivel a szakirodalom alapján a kávé és zöld tea kivonatával is állítottak már elő sikeresen nanorészecskéket, így munkánk célja elsősorban nem az volt, hogy megállapítsuk, hogy melyik kivonat alkalmazása kedvezőbb a szintézis során, hanem, hogy feltárjuk az így kialakult nanorészecskék kémiai és biológiai tulajdonságainak esetleges különbözőségét, ami az eltérő redukálószer alkalmazásából ered.

Ezen eltérések kimutatásához kávé és zöld tea kivonatával ezüst nanorészecskéket állítottunk elő, amelyeket átfogó, komplex kémiai és biológiai vizsgálatoknak vetettük alá.

5.3.1. A növényi kivonatokkal előállított ezüst nanorészecskék jellemzése

5.3.1.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia – morfológia és méret

A TEM felvételeken jól látható, hogy mind a zöld tea (GT-AgNP), mind a kávé (C-AgNP) kivonattal előállított ezüst nanorészecskék gömbszerűnek adódtak. A képek alapján a monodiszperz C-AgNP részecskék jól diszpergáltak voltak, azonban a kávé kivonatból visszamaradt mátrixba ágyazódtak. Ezzel szemben a GT-AgNP részecskék kicsit nagyobb méretűek, csekély polidiszperzitást és kismértékű részecskeaggregációt figyeltünk meg ebben az esetben (5.16. ábra). A TEM képek alapján számolt átlagos részecskeméret a C-AgNP minta esetében $3,2 \pm 1,2$ nm-nek, a GT-AgNP minta esetében pedig $12,7 \pm 5,8$ nm-nek adódott.

5.16. ábra. A kávé (A) és zöld tea (B) kivonattal előállított ezüst nanorészecskék jellemző TEM felvételei

5.3.1.2. Röntgendiffraktometriás vizsgálatok – kristályszerkezet

A szintetizált nanorészecskék kristályszerkezetét röntgendiffraktometriával (XRD) határoztuk meg (5.17. ábra). Mindkét kivonattal előállított ezüst nanorészecskék XRD mintázatában négy jellemző, éles reflexiót figyelhetünk meg a $38,2^\circ$, $44,3^\circ$, $64,4^\circ$ és $77,4^\circ$ 2θ szögeknél, amelyeket rendre a lapcentrált köbös rendszerben kristályosodó fém ezüst (111), (200), (220) és (311) kristálylapjaihoz tartozó reflexióként azonosítottunk (JCPDS #87-0717)²¹⁰.

5.17. ábra. A kávé (C-AgNP) és zöld tea (GT-AgNP) kivonattal előállított ezüst nanorészecskék diffraktogramjai

5.3.1.3. Dinamikus fényszórás – hidrodinamikai átmérő

A nanorészecskék hidrodinamikai részecskeátmérőjét DLS készülékkel mértük meg (5.18. ábra). A TEM méréseknél megfigyelt méretbeli különbségeket a DLS mérések során is detektáltuk: jól látható, hogy a C-AgNP minta átlagos mérete 8-20 nm között változott, míg a GT-AgNP minta részecskéinek hidrodinamikai átmérője kissé nagyobbak adódott, 20 és 50 nm között volt. Ezenkívül a GT-AgNP mintában megfigyelhető volt egy további csúcs 400 nm körül, amely a részecskék mérsékelt aggregációjára utalt.

5.18. ábra. A kávé (C-AgNP) és zöld tea (GT-AgNP) kivonattal előállított ezüst nanorészecskék hidrodinamikai átmérőjének eloszlásai

5.3.1.4. Ultraibolya-látható abszorpciós spektrometria - szerkezet

A kávé és zöld tea kivonatokkal készült AgNP minták UV-VIS spektrumát az 5.19. ábra szemlélteti. Jól látható, hogy mindkét ezüst nanorészecske rendelkezett felületi plazmon rezonancia maximummal, melyek értéke $\lambda_{\max}=496$ nm volt C-AgNP esetén, míg $\lambda_{\max}=456$ nm GT-AgNP esetén. Ez az ezüstre jellemző karakterisztikus elnyelésbeli eltérés eredhet a részecskék TEM és DLS vizsgálatokkal igazolt méretbeli különbségéből¹⁶².

5.19. ábra. A kávé és zöld teával előállított ezüst nanorészecskék UV-VIS spektrumai

5.3.1.5. Infravörös spektroszkópia

Hogy pontosabb képet kapjunk a részecskék tulajdonságait is meghatározó redukálószer befolyásoló hatásáról, a növényi kivonatok (kávé-C, zöld tea-GT) és a segítségükkel előállított AgNP minták kémiai összetevőinek funkciós csoportjait infravörös spektroszkópiával vizsgáltuk (5.20. ábra).

A spektrumokon 3400 cm^{-1} -nél található intenzív széles sáv elsősorban a hidroxil csoportokra jellemző O-H vegyértékrezgéshez tartozik, ami alapján mindegyik minta tartalmazott alkoholos, fenolos és karboxil funkciós csoportokat; valamint ennek a sávnak az intenzitásához járul hozzá a primer és szekunder aminok és amidok N-H vegyértékrezgése is.

5.20. ábra. A növényi kivonatok (kávé-C, zöld tea-GT) és a segítségükkel előállított AgNP minták FT-IR spektrumai

Ez a sáv ugyancsak köthető a nem disszociált kötött vízmolekulákhoz is, amik jelenléte egyértelműen látszik a deformációs rezgéshez tartozó 1620 cm^{-1} -nél megfigyelhető sávból. Az 1145 cm^{-1} -nél látható sáv a primer és szekunder aromás aminok C-N vegyértékrezgésének tudható be, a $900\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ közötti sávok pedig a primer és szekunder aminok és amidokhoz tartoznak (-NH_2 síkra merőleges deformációs rezgés). A ketonok, aldehidek, kininek és észterek jelenlétére utalnak az $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ közötti sávok, amelyek a karbonil csoportok C=O rezgéséből származhatnak. A 2920 cm^{-1} -nél lévő sáv az alkánok C-H vegyértékrezgéséhez köthető. Az 1630 cm^{-1} körül található sáv az aromás szerkezetek C=C rezgésének tudható be, míg a fenolos csoportok C-O vegyértékrezgésére jellemző sávot láthatunk 1245 cm^{-1} -nél. Az 1040 cm^{-1} -nél lévő másik széles sáv az aromás észterek és a poliszacharidok jele lehet (C-O-C vegyértékrezgés)¹⁶⁵. A kávé és zöld tea kivonatainkban a karbonil csoportok fehérjék jelenlétére utalnak, míg az -OH funkciós csoportok jelenlétéből arra következtethetünk, hogy a kivonatok fenolos vegyületeket is tartalmaznak.

A FT-IR mérés eredményei alapján arra következtethetünk, hogy a kávé és tea kivonatainkból származó szerves vegyületek megtalálhatóak az előállított ezüst nanorészecskék felületén ($900\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ közötti sávok). Ezen megfigyelésünk összhangban van az irodalomban közölt adatokkal, azaz bizonyos fehérjék, valamint egyéb egyszerű- és/vagy makromolekulák képesek a nanorészecskék felületén megkötődni és ezzel stabilizálni, védeni azokat az aggregációtól²²¹.

5.3.2. A növényi kivonatokkal előállított ezüst nanorészecskék toxicitásának vizsgálata

5.3.2.1. A növényi kivonatokkal előállított ezüst nanorészecskék toxicitásának vizsgálata

Az előállított nanorészecskék alkalmazásának egyik feltétele, hogy pontosan ismerjük az élő rendszerekre gyakorolt hatását, esetleges előnyös vagy káros biológiai aktivitását. Munkánk során a kávé és zöld tea kivonatával előállított ezüst nanorészecskék antiproliferatív és citotoxikus hatását humán tumoros HeLa és nem-tumoros NIH/3T3 egér embrionális fibroblaszt sejteken vizsgáltuk.

5.3.2.1.1. Sejtproliferációs vizsgálat

Az MTT tesztek alapján megállapítottuk, hogy a GT-AgNP nagyobb mértékben gátolta mindkét sejttípus proliferációját, mint a C-AgNP (5.21. ábra). A számolt IC_{50} koncentrációértékek alapján a NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtek sokkal érzékenyebbek (GT-AgNP: $\sim 5 \mu\text{g/mL}$, C-AgNP: $272,14 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$) bizonyultak az ezüst nanorészecskék jelenlétére, mint a HeLa sejtek (GT-AgNP: $14,26 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, C-AgNP: $655,3 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$). Továbbá elmondhatjuk azt is, hogy mindkét sejtvonal esetén a GT-AgNP körülbelül 50-szer erősebb gátló hatást tanúsított a sejtek proliferációjára mint a C-AgNP.

5.3.2.1.2. Citotoxicitás

A zöld úton előállított ezüst nanorészecskék citotoxikus hatását kritályibolya festéssel határoztuk meg (5.21. ábra). A kávé kivonattal szintetizált ezüst nanorészecskék az alkalmazott koncentrációtartományban nem bizonyultak toxikusnak sem a humán, sem az egér sejtek esetében. Ezzel szemben a zöld teával előállított nanoezüst minták erősen citotoxikus hatást mutattak mind a HeLa, mind a NIH/3T3 sejtek esetén, valamint az utóbbiak érzékenyebbek bizonyultak a GT-AgNP jelenlétére.

Az eredményeink alapján megállapítható, hogy a zöld teával szintetizált nanoezüst részecskék sokkal nagyobb mértékű antiproliferatív és citotoxikus hatással rendelkeztek, mint a kávéval előállított ezüst nanorészecskék.

5.21. ábra. A növényi kivonatok segítségével előállított ezüst nanorészecskék antiproliferatív és citotoxikus hatása. A C-AgNP és GT-AgNP-val való kezelés mindkét sejttípus (humán HeLa-A, eger NIH/3T3 fibroblaszt sejtek-B) proliferációját gátolta. A zöld úton előállított ezüst nanorészecskék citotoxikus hatását kristályibolya festéssel határoztuk meg (C, D). A kristályibolyát visszaoldottuk, majd a minták abszorbanciáját spektrofotometriásan mértük (E, F) (* $P \leq 0,001$, kétutas ANOVA, a kontroll abszorbanciáját 100%-nak véve).

5.3.2.2. Antibakteriális és antifungális hatás

Vizsgálataink során fel akartuk térképezni, hogy az előállított ezüst nanorészecskék rendelkeznek-e antibakteriális és/vagy antifungális hatással, illetve ha igen, akkor melyik növényi kivonattal előállított nanoezüst tanúsít nagyobb toxikus hatást a kiválasztott mikrobatorzsekkal szemben. Az előállított nanoezüst részecskék antimikrobiális hatását *B. cereus* var. *myocides*, *M. luteus*, *E. coli* és *P. aureuginosa* baktériumokon, illetve nem patogén *S. cerevisiae*, valamint patogén *C. parapsilosis*, *C. albicans* és *Cr. neoformans* élesztőgombákon teszteltük (5.22. ábra). Jól látható, hogy mind a kávé, mind a zöld tea kivonatok segítségével előállított nanorészecskék hatékonynak bizonyultak a vizsgált

baktériumtörzsek ellen. A baktériumokhoz hasonlóan a patogén gombafajok (*Cr. neoformans*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*) is érzékenyek voltak mindkét típusú nanoezüst részecske jelenlétére, amit a körülöttük kialakult széles gátlási zóna jól mutat (5.22. ábra, 5.5. táblázat). Az alkalmazott koncentrációkban egyik nanoezüst részecske sem volt gátló hatással az apatogén *S. cerevisiae* fajra, ebben az esetben nem észleltük gátlási zóna kialakulását (5.22. ábra).

Mivel az agar-diffúziós módszer önmagában nem alkalmas a C-AgNP és GT-AgNP hatékonyságának kvantitatív összehasonlítására, ezért a nanoezüst mintákat különböző koncentrációban teszteltük *E. coli* és *Cr. neoformans* törzseken, miközben meghatároztuk a mikrobák túlélési arányát. A bemutatott eredmények alapján jól látható, hogy a C-AgNP esetében dózisfüggő toxikus hatást figyelhetünk meg: a részecskék koncentrációjának növelésével fokozatosan egyre kevesebb mikroba élte túl a kezelést. Ezzel szemben a GT-AgNP minta még a legkisebb alkalmazott koncentrációban is 100%-os toxicitást okozott a vizsgált *E. coli* illetve *Cr. neoformans* kultúrákban.

5.22. ábra. A növényi kivonatokkal előállított ezüst nanorészecskék antimikrobiális aktivitása. Agar diffúziós módszer (A-B): A lemezeket *B. cereus var. mycoides*, *M. luteus*, *P. aeruginosa* és *E. coli* (A) valamint *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *C. albicans* és *Cr. neoformans* (B) törzsekkel oltottuk le. C-AgNP és GT-AgNP kezelés hatása az *E. coli* (C) és *Cr. neoformans* túlélési arányára (D).

5.5. táblázat. Gátlási zónák az ezüst nanorészecskék jelenlétében

Mikroorganizmus	C-AgNP gátlási zóna (mm)*	GT-AgNP gátlási zóna (mm)*
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	1,38±0,24	1,63±0,13
<i>M. luteus</i>	3,00±0,00	4,00±0,00
<i>E. coli</i>	1,75±0,14	2,25±0,14
<i>P. aeruginosa</i>	< 1,00	1,00±0,00
<i>C. albicans</i>	4,00±0,00	4,00±0,57
<i>Cr. neoformans</i>	4,50±0,20	4,75±0,14
<i>C. parapsilosis</i>	< 1,00	1,66±0,57
<i>S. cerevisiae</i>	0,00	0,00

*Az ezüst nanorészecskéket 17,5 mg/mL koncentrációban alkalmaztuk.

5.3.2.3. Ezüst ionok koncentrációja

A C-AgNP és a GT-AgNP minták eltérő biológiai aktivitásának lehetséges magyarázatát próbáltuk feltérképezni az ezüst nanorészecskékről felszabaduló ionok mennyiségének meghatározásával. ICP-MS vizsgálattal meghatároztuk, hogy 1 nap sejtkultúra médiumban való inkubálás alatt mennyi ezüst ion szabadult fel a nanorészecskékről. Ehhez mindkét ezüst minta esetében az előállított nanorészecskékből DMEM médiumban 17,5 mg/mL koncentrációjú oldatot készítettünk. A mintákat 37 °C-on 24 órán keresztül inkubáltuk, majd a felülúszókat centrifugálással kinyertük és előkészítettük az ICP-MS méréshez.

A mérési adatok szerint az oldott ezüst koncentrációja a C-AgNP esetén 0,59±0,02 mg/mL, míg a GT-AgNP esetén 1,92±0,07 mg/mL volt, vagyis a GT-AgNP-ről nagyjából három és félszer annyi ezüst ion tudott felszabadulni, mint a C-AgNP-ről. Ezek az eredményeink arra engednek következtetni, hogy habár a kávéval előállított nanorészecskék mérete négyszer kisebb volt, mint a zöld teával szintetizált nanorészecskéké, a C-AgNP minta esetében kevesebb ion tudott felszabadulni a részecskék felületéről. Valószínűsíthetően a TEM méréseknél megfigyelt, a részecskéket körülvevő stabilizáló mátrix akadályozta az ezüstionok kioldódását, ezáltal a részecskék toxicitása is csökkent.

Eredményeink alapján elmondható, hogy habár a növényi kivonatok alkalmazása az ezüst nanorészecskék szintézise során költséghatékony és környezetbarát, a kapott részecskék kémiai és biológiai tulajdonságait – csakúgy, mint a vas nanorészecskék esetében – jelentősen befolyásolja az alkalmazott redukálószer.

Általánosan ismert tény, hogy a kisebb méretű nanorészecskék nagyobb fajlagos felületéről több reaktív ezüst ion képes felszabadulni, így elméletben a kisebb részecskék nagyobb toxicitással rendelkeznek, a nagyobb méretű partikulumokhoz képest¹⁶⁷.

Ugyanakkor, érdekes módon minden vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy a nagyobb részecskemérettel rendelkező GT-AgNP minta bizonyult toxikusabbnak. További vizsgálataink (ICP-MS) eredményei alapján feltételeztük, hogy ez a jelenség annak köszönhető, hogy a C-AgNP részecskéket körülvevő stabilizáló mátrix miatt 3,5-ször kevesebb ezüstion tudott felszabadulni a C-AgNP részecskék felszínéről. Azonban, mivel a C-AgNP részecskék is hatékonyak bizonyultak az összes tesztelt mikroba ellen, viszont az emlős sejtekre nézve biokompatibilisabbak, így további ígéretes felhasználásukat elősegítő vizsgálatok elvégzése mellett számos érv szól.

Összegezve elmondható, hogy a különböző növényi kivonatok redukáló- és stabilizálószerként való alkalmazásával a részecskék biológiai aktivitása befolyásolható. Az eredményeink alapján a nanorészecskék szintézise során használt zöld kivonatok körütekintő kiválasztása és felhasználás előtt az előállított részecskék átfogó vizsgálata javasolt.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során különböző eljárások révén állítottunk elő, majd részletesen jellemztünk nulla vegyértékű vas nanorészecskéket. A teljesen zöld szintézismódszerek esetén növényi (kávé, zöld tea és vadszőlő) kivonatokat használtunk redukáló- és stabilizálószerként, míg a félig-zöld eljárásokban a vas nanorészecskék ugyan ipari vegyszerek (vas(II)- és vas(III)-klorid, vas(II)-szulfát, valamint nátrium-borihidrid vagy nátrium-ditionit) felhasználásával készültek, de minden reakciónál törekedtünk a szintézis paramétereit a költséghatékonyság, fenntarthatóság és környezetbarát zöld kémiai hármas egység jegyében tartani. Sikeresen állítottunk elő szobahőmérsékleten, környezeti körülmények mellett különböző kiindulási vas-sók és redukálószeres alkalmazásával vas nanorészecskéket erőforrás-igényes deoxigenált oldószerek helyett csapvíz használatával.

Meghatároztuk az előállított vas nanorészecskék átlagos szemcseméretét, kristályszerkezetét és redukációs kapacitását. Habár a félig-zöld úton előállított vas nanorészecskék kisebb átlagos átmérővel és nagyobb redukációs potenciállal rendelkeztek, mint a teljesen zöld szintézissel készült minták, az utóbbiak is elfogadható teljesítményt nyújtottak kísérleteink során.

Elsőként szintetizáltunk vas nanorészecskéket vadszőlőlevél (*Parthenocissus quinquefolia*, Virginia creeper) kivonat felhasználásával. Az előállított nanorészecskék jellemzőit röntgendiffrakciós, transzmissziós elektronmikroszkópiás és redoxpotenciál mérések segítségével határoztuk meg.

A kísérleti munka során valós környezeti mintában, illékony klórozott szénhidrogénnel szennyezett talajvízben teszteltük a félig-zöld szintézismódszerrel előállított vas nanorészecskék degradációs hatékonyságát. A vizsgálat során igazoltuk, hogy a vas nanorészecskék feleslegben adagolása minden esetben növelte a lebontás hatékonyságát. Emellett kimutattuk azt is, hogy a nanorészecskék előállítási módja ugyancsak jelentősen befolyásolta a vas részecskék redoxpotenciál értékeit és illékony klórozott szénhidrogén bontási teljesítményét: ugyanolyan körülmények között mindhárom vizsgált koncentrációban a nátrium-borohidriddel redukált vas nanorészecskék bizonyultak hatékonyabbnak.

Fontos megfigyelésünk továbbá, hogy a vas(II)-szulfátból nátrium-ditionittal redukált vas nanorészecskék ($nZVI_s^D$ minta) mutatták a legnagyobb hasonlóságot a nátrium-borohidriddel redukált vas nanorészecskék teljesítményéhez.

A megvalósult terepi teszt alapján a félig-zöld szintézis során előállított $nZVI_s^D$ minta alkalmasnak bizonyult illékony klórozott szénhidrogének lebontására.

Eredményeinkkel igazoltuk, hogy a környezeti remediációban egy fenntartható, hatékony, gazdaságos alternatív megoldás lehet a vas(II)-szulfátból nátrium-ditionittal redukált vas nanorészecskék alkalmazása.

Azt is bizonyítottuk, hogy a vas szintézis során felhasznált kiindulási vas-sók és redukálószeres nemcsak a kialakult nanorészecske reaktivitását és morfológiáját (nátrium-borohidrid esetén nagyobb aktivitással rendelkező részecskéket kaptunk, míg nátrium-ditionit esetén kisebb aktivitással rendelkező nanoszálak is képződtek) határozzák meg, hanem befolyásolják a vas részecskék anaerob baktériumokra gyakorolt hatását, azaz a biológiai aktivitását is. Ennek következtében a környezeti kármentesítés során a remediáció hatékonyságának fokozása érdekében a megfelelő vas nanorészecske körültekintő kiválasztása javasolt.

Megállapítottuk, hogy 0,1 g/L-es koncentrációban mindegyik nanovas adagolása hatással volt a mikrokozmosz rendszerek mikrobiális összetételére és a deklorináló folyamatokra. Vizsgálatainkból kiderült, hogy a felhasznált redukálószeres és vas-sók mindegyik kombinációjából előállított nanovas részecskék 0,1 g/L-es koncentrációban alkalmazva csökkentették a *Dehalococcoides* populáció méretét. A 16S rDNS és a dehalogenáz géneket tartalmazó baktériumok relatív mennyisége is lecsökkent mindegyik nanovas adagolása esetén, ugyanakkor a mikrokozmosz rendszerek összes mikrobaszáma nőtt.

A mikrokozmosz rendszerek gázkromatográfiás vizsgálata is megerősítette, hogy a biológiai deklorináló aktivitás lecsökkent a nanovas minták jelenlétében. A nátrium-ditionittal redukált nanovas minták mellett a szulfátredukáló baktériumok mennyisége megnőtt, a metanogén baktériumok mennyisége pedig lecsökkent. A deklorináló vizsgálatok azt mutatták, hogy metanogenezis csak a nátrium-borohidriddel redukált vas minták esetén történt.

A kapott eredményeink alapján elmondható, hogy ebben a koncentrációban mindegyik nanovas kezdetben gátolta a rendszerekben jelenlévő mikroflóra aktivitását, de a 20. napon a biotikus kontroll mintához közelítő értékeket kaptuk a populációk relatív arányában mindegyik minta esetén. Tehát kimutattuk — a szakirodalmi adatokkal egybehangzóan —, hogy a kezdeti gátló hatás után, az életben maradt populációk képesek voltak visszarendeződni a kiindulási mikroflóra összetételéhez hasonlóan, amely bizonyítottan redukatív dehalogenációs aktivitással rendelkezett. Mindez kiválóan megalapozza az előállított vas nanorészecskék alkalmazhatóságát későbbi terepi tesztek során, lehetővé téve egy kombinált kémiai-biológiai kezelés kidolgozását.

A vas nanorészecskéknél tett érdekes megfigyeléseinket sikerült egy a szakirodalomban jól ismert, meghatározott jellemzőkkel rendelkező referencia anyagra, az ezüst nanorészecskékre kiterjeszteni. Tapasztalataink alapján, legfontosabb megállapításunk, hogy mind a vas, mind pedig az ezüst nanorészecske esetében a felhasznált redukálószer nemcsak a nanorészecskék méretét, alakját, hanem biológiai rendszerekben való viselkedését is meghatározza. Ezáltal a részecskék biológiai aktivitása befolyásolható, szabályozható.

Kávé és zöld tea kivonattal is sikeresen állítottunk elő nanoezüst részecskéket, amelyeknek elvégeztük komplex kémiai és biológiai vizsgálatát. A kapott eredményeink alapján mindkét ezüst nanorészecske hatékonyan bizonyult a tesztelt mikrobák ellen, habár a zöld teával előállított ezüst nanorészecskék (GT-AgNP) minden esetben jelentősen nagyobb toxikus hatást fejtettek ki a vizsgált baktérium és gomba törzsekre, mint a kávéval előállított ezüst nanorészecskék (C-AgNP). Azonban azt is meg kell jegyeznünk, hogy a GT-AgNP részecske az emlős sejteket is nagymértékben elpusztította, mely széles körű biológiai felhasználhatóságát jelentősen korlátozza. Másrészt, amellet, hogy a C-AgNP kiemelkedő antimikrobiális hatással rendelkezett az *E. coli* és *Cr. neoformans* törzsek ellen, ezek a részecskék biokompatibilisnek bizonyultak az emlős sejtekre nézve.

A szakirodalomban elfogadott ténnyel szemben, meglepő módon minden vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy a nagyobb részecskemérettel rendelkező GT-AgNP minta bizonyult toxikusabbnak a C-AgNP-hez képest. ICP-MS méréseink alapján valószínűsítettük, hogy ez a jelenség annak köszönhető, hogy a C-AgNP részecskéket körülvevő stabilizáló mátrix miatt 3,5-ször kevesebb ezüstion tudott felszabadulni a C-AgNP részecskék felszínéről, és emiatt kisebb a C-AgNP nanorészecskék toxicitása. Mivel ezen nanorészecskék hatékonyan pusztították az összes tesztelt mikrobát, viszont az emlős sejtekre nézve biokompatibilisabbak, így további felhasználásuk mellett számottevő érvek sorakoznak.

Eredményeinket összegezve elmondható, hogy környezetbarát és költséghatékony eljárásokkal akár ipari méretben is előállíthatóak változatos tulajdonságú, specifikus célokra felhasználható nanorészecskék. A szintézis során alkalmazott redukáló-, és stabilizálószer - különösen a növényi kivonatok - jelentősen befolyásolhatják a nanorészecskék kémiai jellemzőit és biológiai aktivitását, ezért a felhasznált redukálószer körültekintő kiválasztása és az előállított nanorészecskék fizikai, kémiai és biológiai jellemzőinek teljes körű azonosítása a felhasználás előtt mindenképpen javasolt.

7. SUMMARY

In this dissertation the detailed characterisation of zero-valent iron nanoparticles produced by different synthesis methods have been discussed. The role of initial metal salts and reducing agents in the formation and characteristics of nanoparticles have also been studied. Plant (coffee, green tea and Virginia creeper) extracts were used as reducing and capping agents in case of green synthesis methods, while industrial chemicals (iron(II) and iron(III) sulphate, iron(III) chloride, sodium borohydride and sodium dithionite) were applied to prepare iron nanoparticles in case of semi-green procedures albeit trying to keep the synthesis parameters within the green chemical triangle of cost effectiveness, sustainability and environmental friendliness in all reactions. We successfully managed to produce iron nanoparticles at room temperature and ambient conditions applying different initial iron salts and reducing agents by using tap water instead of resource intensive deoxygenated solvents.

The average particle size, crystal structure and reduction capacity of the produced iron nanoparticles were determined. Although the iron nanoparticles prepared in the semi-green way had smaller average diameter and larger reduction potential than the samples made with green synthesis, the latter ones also showed good performance in our experiments.

It is also worth mentioning that we were the first to produce iron nanoparticles using Virginia creeper (*Parthenocissus quinquefolia*) extract. The produced nanoparticles were characterized by X-ray diffraction, transmission electron microscopy and oxidation/reduction potential measurements.

The reduction capacity of the iron nanoparticles prepared with the semi-green synthesis method was tested in a real environmental sample, in soil water contaminated by volatile chlorinated hydrocarbon. We have verified that with excessive dosing of the iron nanoparticles the efficiency of volatile chlorinated hydrocarbon decomposition increased in all the examined cases. It was also observed that the method of preparation of the iron nanoparticles largely influenced the performance of the samples: the nanoparticles reduced by sodium borohydride proved to be more efficient in reduction of volatile chlorinated hydrocarbons in all the three concentrations tested under the same conditions.

It was confirmed that the iron nanoparticles reduced by sodium borohydride outperformed the iron nanoparticles synthesized by using sodium dithionite both in the measured oxidation/reduction potential values, and in the volatile chlorinated hydrocarbon reduction tests. Another important observation was that the iron nanoparticles reduced from

ferrous(II) sulphate by sodium dithionite (nZVI_S^D) showed the highest similarity to the performance of the iron nanoparticles reduced by sodium borohydride.

It was demonstrated that the nZVI_S^D sample produced by the semi-green synthesis proved to be capable of reducing volatile chlorinated hydrocarbons based on the performed field test.

Our results confirmed that the application of iron nanoparticles reduced from ferrous(II) sulphate by sodium dithionite may be a sustainable, efficient and economical alternative in environmental remediation.

We proved that the initial iron salts and reducing agents used in iron synthesis do not only define the reactivity and morphology of the produced nanoparticles, but also influence the biological activity of the iron particles (their impact on anaerobic bacteria). Therefore in environmental remediation it is advisable to exercise great care in selecting the suitable iron nanoparticles in order to enhance remediation.

It was ascertained that the introduction of any nanoiron sample in the 0.1 g/L concentration had an impact on the microbial composition of the microcosm systems and on the dechlorinating processes. Our tests revealed that the iron nanoparticles, prepared from any combination of the used reducing agents and iron salts, applied in a 0.1 g/L concentration reduced the size of the *Dehalococcoides* population. The relative amount of 16S rDNA and dehalogenase genes containing bacteria also decreased with the addition of any nanoscale iron while the total amount of microbes increased.

The above results were also supported by the gas chromatography test of the microcosm systems, the biological dechlorination activity dropped in the presence of nanoiron samples. The amount of sulphate reducing bacteria increased and the amount of methanogenic bacteria decreased in the presence of the nanoiron samples reduced by sodium dithionite. The methanogenesis was observed only in case of the iron samples reduced with sodium borohydride as revealed by the dechlorinating tests.

Our findings showed that initially each nanoiron sample in this concentration inhibited the activity of the microflora present in the microcosm systems, however, the relative amount of the populations showed similar values close to the biotic control sample on the twentieth day in case of each of the samples. Thus it could be demonstrated – in line with the literature data – that following an initial inhibitory effect, surviving populations managed to achieve a similar composition like that of the initial microflora, which had a proven reductive dehalogenation activity. All these findings give an excellent basis for the applicability of the

produced iron nanoparticles for later field tests, enabling the elaboration of a combined biological and chemical treatment.

Finally we tried to extend the interesting observations we made with iron nanoparticles to silver nanoparticles, a reference material with defined features, which are well described in the literature. Our most important experience-based finding was that the reducing agent applied for nanoiron or nanosilver production can largely define not only the size and shape of the nanoparticles but also their behaviour in biological systems.

Silver nanoparticles were also successfully synthesized using coffee and green tea extracts, and their chemical and biological characteristics were investigated. It was proven in our experiments that it is recommended to have a circumspect selection of the green extracts used for the synthesis of nanoparticles, and a comprehensive screen of the products should be carried out prior their applications to delineate their behaviour in the presence of living systems. It was found that both AgNPs proved to be effective in the examined concentrations against nearly all the tested microbes; however, GT-AgNPs performed always markedly better in toxicity and antimicrobial screens than C-AgNP counterparts. It is also noteworthy that apart from their antimicrobial activity, GT-AgNPs were also highly toxic against mammalian cells, which limits their potential applications. On the contrary, C-AgNPs exhibited an extensive inhibitory action on *Cr. neoformans* as well as on *E. coli*; however, these particles were biocompatible with the tested HeLa and NIH/3T3 cells, showing no mammalian cytotoxicity.

Surprisingly, in every biological test we performed, in contrast to the literature data, we found that bigger sized GT-AgNPs resulted to be more effective than smaller C-AgNPs. In fact, ICP-MS measurements verified that ~3.5 times more silver ions can be released from GT-AgNPs than from C-AgNPs, which might be the direct consequence of the thick matrix, where C-AgNPs seem to be completely embedded. However, despite the lower Ag-ion-releasing capability of C-AgNPs, they were also effective against microbes without being cytotoxic, which renders C-AgNPs as attractive potential candidates for further applications.

The eco-friendly, cost-effective green synthesis of nanoparticles can be realized even on the industrial scale. However, as the chemical nature and the composition of the reducing and capping agents applied during synthesis – especially when biological extracts are utilized - can significantly modify the activity of the obtained nanoparticles in living systems, a thorough characterization of their physical, chemical and biological properties must obligatorily precede their large scale applications.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőimnek, *Dr. Kónya Zoltán* tanszékvezető egyetemi tanárnak és *Dr. Kiricsi Mónika* egyetemi adjunktusnak, akik biztosították a doktori disszertációm megírásához szükséges feltételeket. Köszönöm, hogy tanácsaikkal, biztató szavaikkal végigvezettek a doktori fokozat megszerzéséig vezető rögzös úton. Köszönöm *Dr. Kukovecz Ákos* egyetemi docensnek, hogy segítséget nyújtott eredményeim értelmezésében és publikálásában.

Szeretném megköszönni a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft. Biotechnológiai Divízió igazgatójának, *Dr. Kiss Istvánnak* és az intézet munkatársainak segítségét a biológiai vizsgálatok során. Külön köszönettel tartozom *Balázs Margitnak*, aki a kezdetektől fogva töretlenül hitt bennem és a közös munkánkban. Köszönöm az önzetlen támogatását, türelmét, segítsége nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Hálásan köszönöm *Dr. Pfeiffer Ilonának* a rengeteg segítséget és támogatást, amelyet munkám során nyújtott. Közös munkánk során sokat tanultam, mind a kísérlettervezésről, mind pedig az eredmények alapos kiértékeléséről. Köszönöm, hogy szakértelmével hozzájárult dolgozatom színvonalának emeléséhez. A humán sejtes kísérletek elvégzését és kiértékelését külön köszönöm *Kovács Dávidnak* és *Igaz Nórának*. Köszönöm a jó hangulatú megbeszéléseinket is.

Köszönetet szeretnék mondani *Dr. Tolmacsov Péternek* a gázkromatográfiás mérések és *Dr. Galbács Gábornak* az ICP-MS vizsgálatok elvégzésért.

Értékes elméleti és gyakorlati segítségnyújtásukért köszönet illeti *Dr. Rutkai Editet*, *Dr. Szvetnik Attilát* és *Németh Alexandrát*. Köszönöm *Dr. Guzsvány Valériának*, hogy példamutatásával és munkaszeretetével hozzájárult személyes és szakmai fejlődésemmhez.

Köszönöm a *tanszék összes dolgozójának*, elsősorban *Timinek*, *Dórinak*, *Lacinak*, *Balázsnak*, *Daninak*, *Iminek* a kellemes munkahelyi légkört és a szakmai segítséget. Külön köszönöm *Gábor* és *Peti* támogató személyes és szakmai tanácsait. Köszönöm *Marcynak*, *Zitának*, *Zolinak* és *Petinek* a nanolaboros éveket.

Szeretném megköszönni *barátaimnak* a támogatásukat. Köszönöm *keresztszüleimnek* és az *egész családomnak* a biztatást, különösen *Kati néninek* vagyok hálás az indíttatásért.

Végül a legfontosabb, hálával tartozom *Szüleimnek* és páromnak *Csabinak*, akik mindvégig mellettem álltak a nehézségek és kételyeim során, kitartóan támogattak és bátorítottak céljaim elérésében, és mindig mindenben számíthattam rájuk.

Hála érte *Istennek*!

IRODALOMJEGYZÉK

1. Puzder, T., Csáki, F., Gruiz, K., Horváth, Z., Márton, T. Sajgó, Z. , Kármentesítési kézikönyv 4. Környezetvédelmi Minisztérium: Budapest, 2001.
2. Kádár, I., Kármentesítési kézikönyv 2. A szennyezett talajok vizsgálatáról. Környezetvédelmi Minisztérium: 1998.
3. Országos Környezeti Kármentesítési Program - <http://www.kvvm.hu/>.
4. Barótfi, I., Környezettechnika. Mezőgazda Kiadó: Budapest, 2000.
5. Tsai, W.-T., Toxic volatile organic compounds (VOCs) in the atmospheric environment: regulatory aspects and monitoring in Japan and Korea. *Environments* 2016, 3, (3), 23.
6. Russell, C. S., Safe drinking water: current and future problems. Routledge: 2016.
7. Singh, R. L., Principles and applications of environmental biotechnology for a sustainable future. Springer: 2016.
8. Mueller, N. C.; Nowack, B., Nanoparticles for remediation: solving big problems with little particles. *Elements* 2010, 6, (6), 395-400.
9. Zhang, W., Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *Journal of Nanoparticle Research* 2003, 5, (3/4), 323-332.
10. Wcisło, E.; Bronder, J.; Bubak, A.; Rodríguez-Valdés, E.; Gallego, J. L. R., Human health risk assessment in restoring safe and productive use of abandoned contaminated sites. *Environment International* 2016, 94, 436-448.
11. Környezetvédelmi információ Honlap – Szennyezett területek Magyarországon, <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/6812>.
12. Gerarde, H. W., Toxicological studies on hydrocarbons. *Archives of Environmental Health: An International Journal* 1963, 6, (3), 329-341.
13. Samanta, S. K.; Singh, O. V.; Jain, R. K., Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology* 2002, 20, (6), 243-248.
14. Traiger, G. J.; Plaa, G. L., Chlorinated hydrocarbon toxicity. *Archives of Environmental Health: An International Journal* 1974, 28, (5), 276-278.
15. Goldberg, E. D., Halogenated hydrocarbons: past, present and near-future problems. *Science of The Total Environment* 1991, 100, 17-28.
16. Muftikian, R., A method for the rapid dechlorination of low molecular weight chlorinated hydrocarbons in water. *Water Research* 1995, 29, (10), 2434-2439.
17. Preisich, M., Vegyipari termékek. Műszaki Könyvkiadó: Budapest, 1974.
18. Dokou, Z.; Pinder, G. F., Optimal search strategy for the definition of a DNAPL source. *Journal of Hydrology* 2009, 376, (3-4), 542-556.
19. Szabó, I. Szénhidrogénekkal szennyezett területek mikroba populációjának jellemzése Phd Dolgozat. 2011.
20. Hellman, B.; Brandt, I., Effects of carcinogenic halogenated aliphatic hydrocarbons on [3H]thymidine incorporation into various organs of the mouse A comparison between 1,2-dibromoethane. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1986, 163, (2), 193-199.
21. Deng, B.; Burris, D. R.; Campbell, T. J., Reduction of vinyl chloride in metallic iron–water systems. *Environmental Science & Technology* 1999, 33, (15), 2651-2656.

22. Dijkmans, R., Methodology for selection of best available techniques (BAT) at the sector level. *Journal of Cleaner Production* 2000, 8, (1), 11-21.
23. Gruiz, K., A területhasználat, a környezeti kockázat és a természetes szennye-ző anyagcsökkenés összefüggései. Környezetvédelmi füzetek. BME OMIKK: Budapest, 2003; p 58-60.
24. Kreuk, J. F., Advantages of in-situ remediation of polluted soil and practical problems encountered during its performance. Springer Netherlands: 2005; Vol. 52, p 257-265.
25. Pliška, V.; Testa, B.; van de Waterbeemd, H., Lipophilicity in drug action and toxicology. VCH Verlagsgesellschaft GmbH: 1996.
26. de Jong, R. M.; Dijkstra, B. W., Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: different ways to cleave a carbon-halogen bond. *Current Opinion in Structural Biology* 2003, 13, (6), 722-730.
27. Abbott, W., Microcosm studies on estuarine waters I. The replicability of microcosms. *Journal (Water Pollution Control Federation)* 1966, 258-270.
28. Kao, C.; Prosser, J., Intrinsic bioremediation of trichloroethylene and chlorobenzene: field and laboratory studies. *Journal of hazardous materials* 1999, 69, (1), 67-79.
29. Gruiz, K., Soil testing triad and interactive ecotoxicity tests for contaminated soil. *Soil remediation series* 2005, 6.
30. Smidt, H.; de Vos, W. M., Anaerobic microbial dehalogenation. *Annual Review of Microbiology* 2004, 58, (1), 43-73.
31. Ahn, Y.-B.; Rhee, S.-K.; Fennell, D. E.; Kerkhof, L. J.; Hentschel, U.; Häggblom, M. M., Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied and environmental microbiology* 2003, 69, (7), 4159-4166.
32. Bradley, P. M.; Chapelle, F. H.; Lovley, D. R., Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64, (8), 3102-3105.
33. Stroo, H. F.; Ward, C. H., In situ remediation of chlorinated solvent plumes. 2010.
34. Middeldorp, P. J. M.; Luijten, M. L. G. C.; Pas, B. A. v. d.; Eekert, M. H. A. v.; Kengen, S. W. M.; Schraa, G.; Stams, A. J. M., Anaerobic microbial reductive dehalogenation of chlorinated ethenes. *Bioremediation Journal* 1999, 3, (3), 151-169.
35. Fathepure, B. Z.; Boyd, S. A., Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. strain DCM. *Applied and Environmental Microbiology* 1988, 54, (12), 2976-2980.
36. Terzenbach, D. P.; Blaut, M., Transformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene by homoacetogenic bacteria. *FEMS microbiology letters* 1994, 123, (1-2), 213-218.
37. Cole, J. R.; Fathepure, B. Z.; Tiedje, J. M., Tetrachloroethene and 3-chlorobenzoate dechlorination activities are co-induced in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Biodegradation* 1995, 6, (2), 167-172.
38. Leisinger, T., Biodegradation of chlorinated aliphatic compounds. *Current opinion in biotechnology* 1996, 7, (3), 295-300.
39. DeWeerd, K. A.; Mandelco, L.; Tanner, R. S.; Woese, C. R.; Suflita, J. M., *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* 1990, 154, (1), 23-30.
40. Bradley, P. M., History and ecology of chloroethene biodegradation: a review. *Bioremediation Journal* 2003, 7, (2), 81-109.

41. He, J.; Ritalahti, K. M.; Aiello, M. R.; Löffler, F. E., Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69, (2), 996-1003.
42. Sanford, R. A.; Cole, J. R.; Löffler, F.; Tiedje, J. M., Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Applied and environmental microbiology* 1996, 62, (10), 3800-3808.
43. Holliger, C.; Wohlfarth, G.; Diekert, G., Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 1998, 22, (5), 383-398.
44. Maymo-Gatell, X.; Chien, Y.-t.; Gossett, J. M.; Zinder, S. H., Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 1997, 276, (5318), 1568-1571.
45. Maymo-Gatell, X.; Anguish, T.; Zinder, S. H., Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1, 2-dichloroethane by “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65, (7), 3108-3113.
46. Löffler, F. E.; Yan, J.; Ritalahti, K. M.; Adrian, L.; Edwards, E. A.; Konstantinidis, K. T.; Müller, J. A.; Fullerton, H.; Zinder, S. H.; Spormann, A. M., *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia classis* nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2013, 63, (2), 625-635.
47. Duhamel, M.; Mo, K.; Edwards, E. A., Characterization of a highly enriched *Dehalococcoides*-containing culture that grows on vinyl chloride and trichloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* 2004, 70, (9), 5538-5545.
48. Yu, S.; Semprini, L., Enhanced reductive dechlorination of PCE DNAPL with TBOS as a slow-release electron donor. *Journal of hazardous materials* 2009, 167, (1), 97-104.
49. Futagami, T.; Goto, M.; Furukawa, K., Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *The chemical record* 2008, 8, (1), 1-12.
50. Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* 1995, 59, (1), 143-169.
51. Yang, B.; Wang, Y.; Qian, P.-Y., Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics* 2016, 17, (1), 1.
52. Major, D. W.; McMaster, M. L.; Cox, E. E.; Edwards, E. A.; Dworatzek, S. M.; Hendrickson, E. R.; Starr, M. G.; Payne, J. A.; Buonamici, L. W., Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environmental Science & Technology* 2002, 36, (23), 5106-5116.
53. Scheutz, C.; Durant, N. d.; Dennis, P.; Hansen, M. H.; Jørgensen, T.; Jakobsen, R.; Cox, E. e.; Bjerg, P. L., Concurrent ethene generation and growth of *Dehalococcoides* containing vinyl chloride reductive dehalogenase genes during an enhanced reductive dechlorination field demonstration. *Environmental science & technology* 2008, 42, (24), 9302-9309.
54. He, J.; Sung, Y.; Krajmalnik - Brown, R.; Ritalahti, K. M.; Löffler, F. E., Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE) - and 1,

- 2 - dichloroethene - respiring anaerobe. *Environmental Microbiology* 2005, 7, (9), 1442-1450.
55. Taş, N.; Eekert, V.; Miriam, H.; De Vos, W. M.; Smidt, H., The little bacteria that can—diversity, genomics and ecophysiology of ‘Dehalococcoides’ spp. in contaminated environments. *Microbial biotechnology* 2010, 3, (4), 389-402.
56. Sung, Y.; Ritalahti, K. M.; Apkarian, R. P.; Löffler, F. E., Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring Dehalococcoides isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, 72, (3), 1980-1987.
57. Müller, J. A.; Rosner, B. M.; Von Abendroth, G.; Meshulam-Simon, G.; McCarty, P. L.; Spormann, A. M., Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from Dehalococcoides sp. strain VS and its environmental distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 2004, 70, (8), 4880-4888.
58. Fennell, D. E.; Gossett, J. M., Microcosms for site-specific evaluation of enhanced biological reductive dehalogenation. Springer: 2004; p 385-420.
59. Yang, Y.; McCarty, P. L., Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture. *Environmental Science & Technology* 1998, 32, (22), 3591-3597.
60. Lovley, D. R.; Chapelle, F. H.; Woodward, J. C., Use of dissolved H₂ concentrations to determine distribution of microbially catalyzed redox reactions in anoxic groundwater. *Environmental Science & Technology* 1994, 28, (7), 1205-1210.
61. Smatlak, C. R.; Gossett, J. M.; Zinder, S. H., Comparative kinetics of hydrogen utilization for reductive dechlorination of tetrachloroethene and methanogenesis in an anaerobic enrichment culture. *Environmental Science & Technology* 1996, 30, (9), 2850-2858.
62. Chapelle, F. H.; Bradley, P. M., Microbial acetogenesis as a source of organic acids in ancient Atlantic Coastal Plain sediments. *Geology* 1996, 24, (10), 925-928.
63. Ballapragada, B. S.; Stensel, H. D.; Puhakka, J.; Ferguson, J. F., Effect of hydrogen on reductive dechlorination of chlorinated ethenes. *Environmental science & technology* 1997, 31, (6), 1728-1734.
64. Henry, S. M.; Hardcastle, C. H.; Warner, S. D., Chlorinated solvent and DNAPL remediation: an overview of physical, chemical, and biological processes. *Chlorinated Solvent and DNAPL Remediation* 2003, 837, 1-20.
65. Townsend, G. T.; Suflita, J. M., Influence of sulfur oxyanions on reductive dehalogenation activities in Desulfomonile tiedjei. *Applied and environmental microbiology* 1997, 63, (9), 3594-3599.
66. Arnold, W. A.; Ball, W. P.; Roberts, A. L., Polychlorinated ethane reaction with zero-valent zinc: pathways and rate control. *Journal of Contaminant Hydrology* 1999, 40, (2), 183-200.
67. Lee, G.; Park, J., Reaction of zero-valent magnesium with water: Potential applications in environmental remediation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 2013, 102, 162-174.
68. Fu, F.; Dionysiou, D. D.; Liu, H., The use of zero-valent iron for groundwater remediation and wastewater treatment: a review. *Journal of Hazardous Materials* 2014, 267, 194-205.
69. Stefaniuk, M.; Oleszczuk, P.; Ok, Y. S., Review on nano zerovalent iron (nZVI): From synthesis to environmental applications. *Chemical Engineering Journal* 2016, 287, 618-632.

70. Li, X.-q.; Elliott, D. W.; Zhang, W.-x., Zero-valent iron nanoparticles for abatement of environmental pollutants: materials and engineering aspects. *Critical reviews in solid state and materials sciences* 2006, 31, (4), 111-122.
71. Gillham, R. W.; O'Hannesin, S. F., Enhanced degradation of halogenated aliphatics by zero - valent iron. *Ground water* 1994, 32, (6), 958-967.
72. Reynolds, G. W.; Hoff, J. T.; Gillham, R. W., Sampling bias caused by materials used to monitor halocarbons in groundwater. *Environmental Science & Technology* 1990, 24, (1), 135-142.
73. Taghavy, A.; Costanza, J.; Pennell, K. D.; Abriola, L. M., Effectiveness of nanoscale zero-valent iron for treatment of a PCE–DNAPL source zone. *Journal of Contaminant Hydrology* 2010, 118, (3-4), 128-142.
74. Liu, Y.; Majetich, S. A.; Tilton, R. D.; Sholl, D. S.; Lowry, G. V., TCE dechlorination rates, pathways and efficiency of nanoscale iron particles with different properties. *Environmental Science & Technology* 2005, 39, (5), 1338-1345.
75. Phenrat, T.; Schoenfelder, D.; Losi, M.; Yi, J.; Peck, S. A.; Lowry, G. V., Treatability study for a TCE contaminated area using nanoscale- and microscale-zerovalent iron particles: reactivity and reactive life time. 2010, 1027, 183-202.
76. Wang, C.-B.; Zhang, W.-X., Synthesizing nanoscale iron particles for rapid and complete dechlorination of TCE and PCBs. *Environmental science & technology* 1997, 31, (7), 2154-2156.
77. Zhu, H.; Jia, Y.; Wu, X.; Wang, H., Removal of arsenic from water by supported nano zero-valent iron on activated carbon. *Journal of Hazardous Materials* 2009, 172, (2-3), 1591-1596.
78. Kim, S. A.; Kamala-Kannan, S.; Lee, K.-J.; Park, Y.-J.; Shea, P. J.; Lee, W.-H.; Kim, H.-M.; Oh, B.-T., Removal of Pb(II) from aqueous solution by a zeolite–nanoscale zero-valent iron composite. *Chemical Engineering Journal* 2013, 217, 54-60.
79. Arnold, W. A.; Roberts, A. L., Pathways and kinetics of chlorinated ethylene and chlorinated acetylene reaction with Fe (0) particles. *Environmental Science & Technology* 2000, 34, (9), 1794-1805.
80. Matheson, L. J.; Tratnyek, P. G., Reductive dehalogenation of chlorinated methanes by iron metal. *Environmental Science & Technology* 1994, 28, (12), 2045-2053.
81. Snoeyink, V. L.; Jenkins, D., Water chemistry. Wiley: 1980.
82. Langmuir, D., Aqueous environmental geochemistry. 1997.
83. Geomechanics Kutató, F., Szolgáltató és Tanácsadó Betéti Társaság, Passzív kezelések: reaktív falak 2007.
84. Mueller, N. C.; Braun, J.; Bruns, J.; Černík, M.; Rissing, P.; Rickerby, D.; Nowack, B., Application of nanoscale zero valent iron (NZVI) for groundwater remediation in Europe. *Environmental Science and Pollution Research* 2011, 19, (2), 550-558.
85. Tosco, T.; Papini, M. P.; Viggi, C. C.; Sethi, R., Nanoscale zerovalent iron particles for groundwater remediation: a review. *Journal of Cleaner Production* 2014, 77, 10-21.
86. Tratnyek, P. G.; Scherer, M. M.; Johnson, T. L.; Matheson, L. J., Permeable reactive barriers of iron and other zero-valent metals. *Environmental Science and Pollution Control Series* 2003, 371-422.
87. Hozalski, R. M.; Zhang, L.; Arnold, W. A., Reduction of haloacetic acids by Fe0: Implications for treatment and fate. *Environmental science & technology* 2001, 35, (11), 2258-2263.

88. Wang, Y.; Zhou, D.; Wang, Y.; Wang, L.; Cang, L., Automatic pH control system enhances the dechlorination of 2,4,4'-trichlorobiphenyl and extracted PCBs from contaminated soil by nanoscale Fe0 and Pd/Fe0. *Environmental Science and Pollution Research* 2011, 19, (2), 448-457.
89. Xie, Y.; Dong, H.; Zeng, G.; Tang, L.; Jiang, Z.; Zhang, C.; Deng, J.; Zhang, L.; Zhang, Y., The interactions between nanoscale zero-valent iron and microbes in the subsurface environment: A review. *Journal of Hazardous Materials* 2017, 321, 390-407.
90. Savolainen, K.; Alenius, H.; Norppa, H.; Pylkkänen, L.; Tuomi, T.; Kasper, G., Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies—A review. *Toxicology* 2010, 269, (2-3), 92-104.
91. Foss Hansen, S.; Maynard, A.; Baun, A.; Tickner, J. A., Late lessons from early warnings for nanotechnology. *Nature Nanotechnology* 2008, 3, (8), 444-447.
92. Bruton, T. A.; Pycke, B. F. G.; Halden, R. U., Effect of nanoscale zero-valent iron treatment on biological reductive dechlorination: A review of current understanding and research needs. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2014, 45, (11), 1148-1175.
93. Xiu, Z.-m.; Jin, Z.-h.; Li, T.-l.; Mahendra, S.; Lowry, G. V.; Alvarez, P. J., Effects of nano-scale zero-valent iron particles on a mixed culture dechlorinating trichloroethylene. *Bioresource Technology* 2010, 101, (4), 1141-1146.
94. Diao, M.; Yao, M., Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. *Water research* 2009, 43, (20), 5243-5251.
95. Lee, C.; Kim, J. Y.; Lee, W. I.; Nelson, K. L.; Yoon, J.; Sedlak, D. L., Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on Escherichia coli. *Environmental science & technology* 2008, 42, (13), 4927-4933.
96. Marsalek, B.; Jancula, D.; Marsalkova, E.; Mashlan, M.; Safarova, K.; Tucek, J.; Zboril, R., Multimodal action and selective toxicity of zerovalent iron nanoparticles against cyanobacteria. *Environmental science & technology* 2012, 46, (4), 2316-2323.
97. Li, Z.; Greden, K.; Alvarez, P. J.; Gregory, K. B.; Lowry, G. V., Adsorbed polymer and NOM limits adhesion and toxicity of nano scale zerovalent iron to E. coli. *Environmental science & technology* 2010, 44, (9), 3462-3467.
98. Fang, J.; Lyon, D. Y.; Wiesner, M. R.; Dong, J.; Alvarez, P. J., Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environmental science & technology* 2007, 41, (7), 2636-2642.
99. Gogoi, S. K.; Gopinath, P.; Paul, A.; Ramesh, A.; Ghosh, S. S.; Chattopadhyay, A., Green fluorescent protein-expressing Escherichia coli as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir* 2006, 22, (22), 9322-9328.
100. Xiu, Z.-m.; Gregory, K. B.; Lowry, G. V.; Alvarez, P. J., Effect of bare and coated nanoscale zerovalent iron on tceA and vcrA gene expression in Dehalococcoides spp. *Environmental science & technology* 2010, 44, (19), 7647-7651.
101. Fajardo, C.; Ortiz, L.; Rodríguez-Membibre, M.; Nande, M.; Lobo, M.; Martin, M., Assessing the impact of zero-valent iron (ZVI) nanotechnology on soil microbial structure and functionality: a molecular approach. *Chemosphere* 2012, 86, (8), 802-808.
102. Kirschling, T. L.; Gregory, K. B.; Minkley, J., Edwin G.; Lowry, G. V.; Tilton, R. D., Impact of nanoscale zero valent iron on geochemistry and microbial populations in trichloroethylene contaminated aquifer materials. *Environmental science & technology* 2010, 44, (9), 3474-3480.

103. Ponder, S. M.; Darab, J. G.; Mallouk, T. E., Remediation of Cr (VI) and Pb (II) aqueous solutions using supported, nanoscale zero-valent iron. *Environmental Science & Technology* 2000, 34, (12), 2564-2569.
104. Holliger, C.; Schraa, G.; Stams, A.; Zehnder, A., A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Applied and Environmental Microbiology* 1993, 59, (9), 2991-2997.
105. F Chen, K.; Y Yeh, T.; M Kao, C.; P Sung, W.; C Lin, C., Application of nanoscale zero-valent iron (nZVI) to enhance microbial reductive dechlorination of TCE: a feasibility study. *Current Nanoscience* 2012, 8, (1), 55-59.
106. Yin, W.; Wu, J.; Li, P.; Lin, G.; Wang, X.; Zhu, B.; Yang, B., Reductive transformation of pentachloronitrobenzene by zero-valent iron and mixed anaerobic culture. *Chemical engineering journal* 2012, 210, 309-315.
107. Tilston, E. L.; Collins, C. D.; Mitchell, G. R.; Princivalle, J.; Shaw, L. J., Nanoscale zerovalent iron alters soil bacterial community structure and inhibits chloroaromatic biodegradation potential in Aroclor 1242-contaminated soil. *Environmental pollution* 2013, 173, 38-46.
108. Köber, R.; Hollert, H.; Hornbruch, G.; Jekel, M.; Kamptner, A.; Klaas, N.; Maes, H.; Mangold, K. M.; Martac, E.; Matheis, A.; Paar, H.; Schäffer, A.; Schell, H.; Schiwy, A.; Schmidt, K. R.; Strutz, T. J.; Thümmeler, S.; Tiehm, A.; Braun, J., Nanoscale zero-valent iron flakes for groundwater treatment. *Environmental Earth Sciences* 2014, 72, (9), 3339-3352.
109. Shu, Z.; Wang, J.; Huang, Y., Study of inactivating sulfate reducing bacteria with zero-valent iron nanoparticles. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue/[bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui" Huan jing ke xue" bian ji wei yuan hui.]* 2011, 32, (10), 3040-3044.
110. Gao, W.; Wang, J., The environmental impact of micro/nanomachines: a review. *Acs Nano* 2014, 8, (4), 3170-3180.
111. Li, S.; Yan, W.; Zhang, W.-x., Solvent-free production of nanoscale zero-valent iron (nZVI) with precision milling. *Green Chemistry* 2009, 11, (10), 1618-1626.
112. Iqbal, P.; Preece, J. A.; Mendes, P. M., Nanotechnology: The “top-down” and “bottom-up” approaches. 2012.
113. Wender, H.; Migowski, P.; Feil, A. F.; Teixeira, S. R.; Dupont, J., Sputtering deposition of nanoparticles onto liquid substrates: Recent advances and future trends. *Coordination Chemistry Reviews* 2013, 257, (17), 2468-2483.
114. Hwang, Y.-H.; Kim, D.-G.; Shin, H.-S., Effects of synthesis conditions on the characteristics and reactivity of nano scale zero valent iron. *Applied Catalysis B: Environmental* 2011, 105, (1-2), 144-150.
115. Lu, H.-J.; Wang, J.-K.; Ferguson, S.; Wang, T.; Bao, Y.; Hao, H.-x., Mechanism, synthesis and modification of nano zerovalent iron in water treatment. *Nanoscale* 2016, 8, (19), 9962-9975.
116. Yuvakkumar, R.; Elango, V.; Rajendran, V.; Kannan, N., Preparation and characterization of zero valent iron nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2011, 6, (4), 1771-1776.
117. Fryxell, G. E., Synthesis of nanostructured hybrid sorbent materials using organosilane self-assembly on mesoporous ceramic oxides. *Environmental Applications of Nanomaterials: Synthesis, Sorbents and Sensors*, ed. GE Fryxell and G. Cao, Imperial College Press, London 2007, 159-178.

118. Sun, Q.; Feitz, A. J.; Guan, J.; Waite, T. D., Comparison of the reactivity of nanosized zero-valent iron (nZVI) particles produced by borohydride and dithionite reduction of iron salts. *Nano* 2008, 3, (05), 341-349.
119. Xie, Y.; Cwiertny, D. M., Use of dithionite to extend the reactive lifetime of nanoscale zero-valent iron treatment systems. *Environmental science & technology* 2010, 44, (22), 8649-8655.
120. Su, C.; Ludwig, R. D., Treatment of hexavalent chromium in chromite ore processing solid waste using a mixed reductant solution of ferrous sulfate and sodium dithionite. *Environmental science & technology* 2005, 39, (16), 6208-6216.
121. Ma, X.; He, D.; Jones, A. M.; Collins, R. N.; Waite, T. D., Reductive reactivity of borohydride-and dithionite-synthesized iron-based nanoparticles: A comparative study. *Journal of hazardous materials* 2016, 303, 101-110.
122. Feitz, A.; Guan, J.; Waite, D. Process for producing a nanoscale zero-valent metal. 2004.
123. Li, T.; Farrell, J., Reductive dechlorination of trichloroethene and carbon tetrachloride using iron and palladized-iron cathodes. *Environmental Science & Technology* 2000, 34, (1), 173-179.
124. Xu, Y.; Zhang, W.-x., Subcolloidal Fe/Ag particles for reductive dehalogenation of chlorinated benzenes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2000, 39, (7), 2238-2244.
125. Li, F.; Vipulanandan, C.; Mohanty, K. K., Microemulsion and solution approaches to nanoparticle iron production for degradation of trichloroethylene. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2003, 223, (1), 103-112.
126. Wang, W.; Zhou, M., Degradation of trichloroethylene using solvent-responsive polymer coated Fe nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2010, 369, (1-3), 232-239.
127. Li, T.; Li, S.; Wang, S.; An, Y.; Jin, Z., Preparation of nanoiron by water-in-oil (W/O) microemulsion for reduction of nitrate in groundwater. *Journal of Water Resource and Protection* 2009, 1, (1), 16.
128. Jamei, M. R.; Khosravi, M. R.; Anvaripour, B., A novel ultrasound assisted method in synthesis of NZVI particles. *Ultrasonics Sonochemistry* 2014, 21, (1), 226-233.
129. Tiehm, A.; Kraßnitzer, S.; Koltypin, Y.; Gedanken, A., Chloroethene dehalogenation with ultrasonically produced air-stable nano iron. *Ultrasonics Sonochemistry* 2009, 16, (5), 617-621.
130. Banerjee, S.; Roy, S.; Chen, J.; Chakravorty, D., Magnetic properties of oxide-coated iron nanoparticles synthesized by electrodeposition. *Journal of magnetism and magnetic materials* 2000, 219, (1), 45-52.
131. Choi, C.; Tolochko, O.; Kim, B., Preparation of iron nanoparticles by chemical vapor condensation. *Materials Letters* 2002, 56, (3), 289-294.
132. Park, S.-J.; Kim, S.; Lee, S.; Khim, Z. G.; Char, K.; Hyeon, T., Synthesis and magnetic studies of uniform iron nanorods and nanospheres. *Journal of the American Chemical Society* 2000, 122, (35), 8581-8582.
133. Horikoshi, S.; Serpone, N., *Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons: 2013.
134. Sun, H.; Zhou, G.; Liu, S.; Ang, H. M.; Tadé, M. O.; Wang, S., Nano-Fe₀ encapsulated in microcarbon spheres: synthesis, characterization, and environmental applications. *ACS applied materials & interfaces* 2012, 4, (11), 6235-6241.

135. Joseyphus, R. J.; Shinoda, K.; Kodama, D.; Jeyadevan, B., Size controlled Fe nanoparticles through polyol process and their magnetic properties. *Materials Chemistry and Physics* 2010, *123*, (2), 487-493.
136. Anastas, P. T.; Warner, J. C., Principles of green chemistry. *Green chemistry: Theory and practice* 1998, 29-56.
137. Narayanan, K. B.; Sakthivel, N., Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Advances in Colloid and Interface Science* 2011, *169*, (2), 59-79.
138. Saif, S.; Tahir, A.; Chen, Y., Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications. *Nanomaterials* 2016, *6*, (11), 209.
139. Kaul, R. K.; Kumar, P.; Burman, U.; Joshi, P.; Agrawal, A.; Raliya, R.; Tarafdar, J. C., Magnesium and iron nanoparticles production using microorganisms and various salts. *Materials Science-Poland* 2012, *30*, (3), 254-258.
140. Pavani, K.; Kumar, N. S., Adsorption of iron and synthesis of iron nanoparticles by *Aspergillus* species Kvp 12. *American Journal of Nanomaterials* 2013, *1*, (2), 24-26.
141. Dhillon, G. S.; Brar, S. K.; Kaur, S.; Verma, M., Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 2011, *32*, (1), 49-73.
142. Iravani, S., Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry* 2011, *13*, (10), 2638.
143. Guo, Q.; Guo, Q.; Yuan, J.; Zeng, J., Biosynthesis of gold nanoparticles using a kind of flavonol: Dihydromyricetin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014, *441*, 127-132.
144. Ashokkumar, S.; Ravi, S.; Kathiravan, V.; Velmurugan, S., Retracted: Synthesis, characterization and catalytic activity of silver nanoparticles using *Tribulus terrestris* leaf extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2014, *121*, 88-93.
145. Bors, W.; Heller, W.; Michael, M., Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. Edited by CA Rice, E Vans and L Packer. Marcel Dekker, New York: 1998.
146. Shahidi, F.; Janitha, P.; Wanasundara, P., Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition* 1992, *32*, (1), 67-103.
147. Afanas'ev, I. B.; Dcrozko, A. I.; Brodskii, A. V.; Kostyuk, V. A.; Potapovitch, A. I., Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology* 1989, *38*, (11), 1763-1769.
148. Lugasi, A.; Hóvári, J.; Sági, K. V.; Bíró, L., The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis* 2003, *47*, (1-4), 119-25.
149. Mohanpuria, P.; Rana, N. K.; Yadav, S. K., Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research* 2007, *10*, (3), 507-517.
150. Hoag, G. E.; Collins, J. B.; Holcomb, J. L.; Hoag, J. R.; Nadagouda, M. N.; Varma, R. S., Degradation of bromothymol blue by 'greener' nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols. *Journal of Materials Chemistry* 2009, *19*, (45), 8671.
151. Huang, L.; Weng, X.; Chen, Z.; Megharaj, M.; Naidu, R., Green synthesis of iron nanoparticles by various tea extracts: Comparative study of the reactivity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2014, *130*, 295-301.

152. Machado, S.; Pinto, S. L.; Grosso, J. P.; Nouws, H. P. A.; Albergaria, J. T.; Delerue-Matos, C., Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. *Science of The Total Environment* 2013, 445-446, 1-8.
153. Gao, J.-F.; Li, H.-Y.; Pan, K.-L.; Si, C.-Y., Green synthesis of nanoscale zero-valent iron using a grape seed extract as a stabilizing agent and the application for quick decolorization of azo and anthraquinone dyes. *RSC Adv.* 2016, 6, (27), 22526-22537.
154. Machado, S.; Stawiński, W.; Slonina, P.; Pinto, A. R.; Grosso, J. P.; Nouws, H. P. A.; Albergaria, J. T.; Delerue-Matos, C., Application of green zero-valent iron nanoparticles to the remediation of soils contaminated with ibuprofen. *Science of The Total Environment* 2013, 461-462, 323-329.
155. Phenrat, T.; Saleh, N.; Sirk, K.; Kim, H.-J.; Tilton, R. D.; Lowry, G. V., Stabilization of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions by anionic polyelectrolytes: adsorbed anionic polyelectrolyte layer properties and their effect on aggregation and sedimentation. *Journal of Nanoparticle Research* 2008, 10, (5), 795-814.
156. Sun, Y.-P.; Li, X.-Q.; Zhang, W.-X.; Wang, H. P., A method for the preparation of stable dispersion of zero-valent iron nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2007, 308, (1), 60-66.
157. Choi, H.-C.; Kanel, S. R. Method of synthesizing zerovalent iron nanowires and application of the same to groundwater treatment. 2007.
158. Cirtiu, C. M.; Raychoudhury, T.; Ghoshal, S.; Moores, A., Systematic comparison of the size, surface characteristics and colloidal stability of zero valent iron nanoparticles pre- and post-grafted with common polymers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2011, 390, (1-3), 95-104.
159. Zhou, L.; Thanh, T. L.; Gong, J.; Kim, J.-H.; Kim, E.-J.; Chang, Y.-S., Carboxymethyl cellulose coating decreases toxicity and oxidizing capacity of nanoscale zerovalent iron. *Chemosphere* 2014, 104, 155-161.
160. Dror, I.; Jacov, O. M.; Cortis, A.; Berkowitz, B., Catalytic transformation of persistent contaminants using a new composite material based on nanosized zero-valent iron. *ACS applied materials & interfaces* 2012, 4, (7), 3416-3423.
161. Sakulchaicharoen, N.; O'Carroll, D. M.; Herrera, J. E., Enhanced stability and dechlorination activity of pre-synthesis stabilized nanoscale FePd particles. *Journal of Contaminant Hydrology* 2010, 118, (3-4), 117-127.
162. Ge, L.; Li, Q.; Wang, M.; Ouyang, J.; Li, X.; Xing, M. M., Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International journal of nanomedicine* 2014, 9, 2399.
163. Ahmed, S.; Ahmad, M.; Swami, B. L.; Ikram, S., A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research* 2016, 7, (1), 17-28.
164. Xing, M.; Ge, L.; Wang, M.; Li, Q.; Li, X.; Ouyang, J., Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine* 2014, 2399.
165. Guzman, M.; Dille, J.; Godet, S., Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2012, 8, (1), 37-45.
166. Rai, M. K.; Deshmukh, S. D.; Ingle, A. P.; Gade, A. K., Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 2012, 112, (5), 841-852.

167. Galdiero, S.; Falanga, A.; Vitiello, M.; Cantisani, M.; Marra, V.; Galdiero, M., Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules* 2011, 16, (12), 8894-8918.
168. Patra, S.; Mukherjee, S.; Barui, A. K.; Ganguly, A.; Sreedhar, B.; Patra, C. R., Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Materials Science and Engineering: C* 2015, 53, 298-309.
169. Rajawat, S.; Kurchania, R.; Rajukumar, K.; Pitale, S.; Saha, S.; Qureshi, M. S., Study of anti-cancer properties of green silver nanoparticles against MCF-7 breast cancer cell lines. *Green Processing and Synthesis* 2016, 5, (2).
170. You, C.; Han, C.; Wang, X.; Zheng, Y.; Li, Q.; Hu, X.; Sun, H., The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity. *Molecular Biology Reports* 2012, 39, (9), 9193-9201.
171. Locatelli, E.; Naddaka, M.; Uboldi, C.; Loudos, G.; Fragogeorgi, E.; Molinari, V.; Pucci, A.; Tsotakos, T.; Psimadas, D.; Ponti, J.; Franchini, M. C., Targeted delivery of silver nanoparticles and alisertib: in vitro and in vivo synergistic effect against glioblastoma. *Nanomedicine* 2014, 9, (6), 839-849.
172. Ong, C.; Lim, J. Z. Z.; Ng, C. T.; Li, J. J.; Yung, L. Y. L.; Bay, B. H., Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity. *Current Medicinal Chemistry* 2013, 20, (6), 772-781.
173. Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S.; Zolfaghari, B., Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in pharmaceutical sciences* 2014, 9, (6), 385.
174. Janardhanan, R.; Karuppaiah, M.; Hebalkar, N.; Rao, T. N., Synthesis and surface chemistry of nano silver particles. *Polyhedron* 2009, 28, (12), 2522-2530.
175. Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y., Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science* 2009, 145, (1), 83-96.
176. Hebbalalu, D.; Lalley, J.; Nadagouda, M. N.; Varma, R. S., Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers and microwaves. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2013, 1, (7), 703-712.
177. Mittal, A. K.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C., Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances* 2013, 31, (2), 346-356.
178. Shankar, S. S.; Ahmad, A.; Sastry, M., Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnology Progress* 2003, 19, (6), 1627-1631.
179. Shankar, S. S.; Rai, A.; Ahmad, A.; Sastry, M., Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004, 275, (2), 496-502.
180. Song, J. Y.; Kim, B. S., Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2008, 32, (1), 79-84.
181. Dhand, V.; Soumya, L.; Bharadwaj, S.; Chakra, S.; Bhatt, D.; Sreedhar, B., Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C* 2016, 58, 36-43.
182. Baharara, J.; Namvar, F.; Ramezani, T.; Mousavi, M.; Mohamad, R., Silver nanoparticles biosynthesized using *Achillea biebersteinii* flower extract: apoptosis induction in MCF-7 cells via caspase activation and regulation of Bax and Bcl-2 gene expression. *Molecules* 2015, 20, (2), 2693-2706.

183. Ajitha, B.; Reddy, Y. A. K.; Reddy, P. S., Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Lantana camara leaf extract. *Materials Science and Engineering: C* 2015, 49, 373-381.
184. Nadagouda, M. N.; Varma, R. S., Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract. *Green Chemistry* 2008, 10, (8), 859.
185. Begum, N. A.; Mondal, S.; Basu, S.; Laskar, R. A.; Mandal, D., Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2009, 71, (1), 113-118.
186. Loo, Y. Y.; Chieng, B. W.; Nishibuchi, M.; Radu, S., Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from Camellia sinensis. *International journal of nanomedicine* 2012, 7, 4263.
187. Chandran, S. P.; Chaudhary, M.; Pasricha, R.; Ahmad, A.; Sastry, M., Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnology Progress* 2006, 22, (2), 577-583.
188. Gröning, R.; Breitzkreutz, J.; Baroth, V.; Müller, R., Nanoparticles in plant extracts--factors which influence the formation of nanoparticles in black tea infusions. *Die Pharmazie* 2001, 56, (10), 790-792.
189. Moulton, M. C.; Braydich-Stolle, L. K.; Nadagouda, M. N.; Kunzelman, S.; Hussain, S. M.; Varma, R. S., Synthesis, characterization and biocompatibility of "green" synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols. *Nanoscale* 2010, 2, (5), 763.
190. Sun, Q.; Cai, X.; Li, J.; Zheng, M.; Chen, Z.; Yu, C.-P., Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014, 444, 226-231.
191. Rasband, W., ImageJ. Bethesda, MD: US National Institutes of Health. <http://rsb.info.nih.gov/ij> 1997, 1997-2007.
192. Zetasizer Nano User Manual, M. I. L.
193. Löffler, F. E.; Tiedje, J. M.; Sanford, R. A., Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halo-respiratory physiology. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65, (9), 4049-4056.
194. Rosner, B. M.; McCarty, P. L.; Spormann, A. M., In vitro studies on reductive vinyl chloride dehalogenation by an anaerobic mixed culture. *Applied and environmental microbiology* 1997, 63, (11), 4139-4144.
195. Suzuki, M. T.; Giovannoni, S. J., Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and environmental microbiology* 1996, 62, (2), 625-630.
196. Muyzer, G.; De Waal, E. C.; Uitterlinden, A. G., Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 1993, 59, (3), 695-700.
197. TotalLab honlapja, <http://totallab.com/cliqs-1d-pro/>.
198. Corless, C. E.; Guiver, M.; Borrow, R.; Edwards-Jones, V.; Kaczmarek, E. B.; Fox, A. J., Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *Journal of clinical microbiology* 2000, 38, (5), 1747-1752.
199. Steinberg, L. M.; Regan, J. M., Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating

- municipal wastewater sludge. *Applied and environmental microbiology* 2008, 74, (21), 6663-6671.
200. Ben-Dov, E.; Brenner, A.; Kushmaro, A., Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microbial ecology* 2007, 54, (3), 439-451.
201. Ritalahti, K. M.; Amos, B. K.; Sung, Y.; Wu, Q.; Koenigsberg, S. S.; Löffler, F. E., Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple Dehalococcoides strains. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, 72, (4), 2765-2774.
202. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods* 2001, 25, (4), 402-408.
203. 201/2001. (X. 25.) Korm. rendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről, <http://net.jogtar.hu>.
204. Kumar, K. M.; Mandal, B. K.; Kumar, K. S.; Reddy, P. S.; Sreedhar, B., Biobased green method to synthesise palladium and iron nanoparticles using Terminalia chebula aqueous extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2013, 102, 128-133.
205. Morikawa, C. K.; Shinohara, M., Heterogeneous photodegradation of methylene blue with iron and tea or coffee polyphenols in aqueous solutions. *Water Science and Technology* 2016, 73, (8), 1872-1881.
206. Kim, H. J.; Saleem, M.; Seo, S. H.; Jin, C.; Lee, Y. S., Two new antioxidant stilbene dimers, parthenostilbenins A and B from Parthenocissus tricuspidata. *Planta medica* 2005, 71, (10), 973-976.
207. Kerkez, D. V.; Tomašević, D. D.; Kozma, G.; Bečelić-Tomin, M. R.; Prica, M. D.; Rončević, S. D.; Kukovecz, Á.; Dalmacija, B. D.; Kónya, Z., Three different clay-supported nanoscale zero-valent iron materials for industrial azo dye degradation: a comparative study. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2014, 45, (5), 2451-2461.
208. Sun, Y.-P.; Li, X.-q.; Cao, J.; Zhang, W.-x.; Wang, H. P., Characterization of zero-valent iron nanoparticles. *Advances in colloid and interface science* 2006, 120, (1), 47-56.
209. Kozma, G.; Rónavári, A.; Kónya, Z.; Kukovecz, Á., Environmentally benign synthesis methods of zero-valent iron nanoparticles. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2016, 4, (1), 291-297.
210. Sun, Y.; Xia, Y., Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science* 2002, 298, (5601), 2176-2179.
211. Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E., Shape controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics? *Angewandte Chemie International Edition* 2009, 48, (1), 60-103.
212. O'Carroll, D.; Sleep, B.; Krol, M.; Boparai, H.; Kocur, C., Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Advances in Water Resources* 2013, 51, 104-122.
213. Kocur, C. M.; Chowdhury, A. I.; Sakulchaicharoen, N.; Boparai, H. K.; Weber, K. P.; Sharma, P.; Krol, M. M.; Austrins, L.; Peace, C.; Sleep, B. E., Characterization of nZVI mobility in a field scale test. *Environmental science & technology* 2014, 48, (5), 2862-2869.

214. Quinn, J.; Geiger, C.; Clausen, C.; Brooks, K.; Coon, C.; O'Hara, S.; Krug, T.; Major, D.; Yoon, W.-S.; Gavaskar, A., Field demonstration of DNAPL dehalogenation using emulsified zero-valent iron. *Environmental Science & Technology* 2005, 39, (5), 1309-1318.
215. Su, C.; Puls, R. W.; Krug, T. A.; Watling, M. T.; O'Hara, S. K.; Quinn, J. W.; Ruiz, N. E., A two and half-year-performance evaluation of a field test on treatment of source zone tetrachloroethene and its chlorinated daughter products using emulsified zero valent iron nanoparticles. *Water research* 2012, 46, (16), 5071-5084.
216. Wei, Y.-T.; Wu, S.-C.; Chou, C.-M.; Che, C.-H.; Tsai, S.-M.; Lien, H.-L., Influence of nanoscale zero-valent iron on geochemical properties of groundwater and vinyl chloride degradation: a field case study. *water research* 2010, 44, (1), 131-140.
217. Wei, Y.-T.; Wu, S.-c.; Yang, S.-W.; Che, C.-H.; Lien, H.-L.; Huang, D.-H., Biodegradable surfactant stabilized nanoscale zero-valent iron for in situ treatment of vinyl chloride and 1, 2-dichloroethane. *Journal of hazardous materials* 2012, 211, 373-380.
218. Zabetakis, K. M.; Niño de Guzmán, G. T.; Torrents, A.; Yarwood, S., Toxicity of zero-valent iron nanoparticles to a trichloroethylene-degrading groundwater microbial community. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 2015, 50, (8), 794-805.
219. Hantke, K., Iron and metal regulation in bacteria. *Current opinion in microbiology* 2001, 4, (2), 172-177.
220. Kocur, C. M. D.; Edwards, E. A.; O'Carroll, D. M., Long-term field study of microbial community and dechlorinating activity following carboxymethyl cellulose-atabilized nanoscale zero-valent iron injection. *Environmental Science & Technology* 2016, 50, (14), 7658-7670.
221. Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials* 2009, 8, (7), 543-557.