

Zárójelentés

OTKA-azonosító: 101484

Típus: K

A világ nagyvárosaiban kialakult levegőszennyezettség egyik bizonyítottan legveszélyesebb alkotója az aeroszol részecskék belélegezhető frakciója, a „szálló porként” ismert PM_{10} , mely részecskék a légutakba és a tüdőbe kerülve súlyos légzőszervi megbetegedéseket okoznak. Koncentrációját nagymértékben befolyásolja a gépjárműközlekedés, ami a közvetlen kibocsátás, a fékbetétek és a gumiabroncsok kopásából származó részecskék mellett a korábban már kiülepedett por részecskéket is felveri. Továbbá ezen levegőszennyező komponens koncentrációját a szél is befolyásolja, amely a kiülepedett részecskéket újra a levegőbe juttatja. Több nemzetközi tanulmány utal arra, hogy ezen kiülepedett porban feldúsulnak a mérgező, rákkeltő vagy mutagén vegyületek, ezért ezen aeroszol forrás a légköri PM_{10} egyik legveszélyesebb alkotója.

A nemzetközi irodalomban városi kiülepedett por reszuszpenzióját laboratóriumban végzik szitálás során a gyűjtött porminták méret szerinti leválasztásával. Ezen módszer azonban a finom aeroszol részecskék elvesztését, így a részecskeméret-eloszlás módosulását eredményezi. A mintavételi hibák kiküszöbölésére kifejlesztettünk egy „on-line” mintavételi módszert, mely során a pormintát közvetlenül az útfelületen reszuszpendáltuk és gyűjtöttük. Ehhez egy mobil mintavevő berendezést építettünk, mely egy PARTISOL aeroszol mintavevőt tartalmaz, mely lehetővé tette, hogy a mintákat két frakcióban (PM_{1-10} és PM_1), nagy mennyiségben gyűjtsük, így lehetőség nyílt a források azonosítását lehetővé tevő analitikai vizsgálatok és ökotoxikológiai tesztek korábban példa nélküli együttes alkalmazására.

A mintavevő berendezés kialakítása során egy 400×600 mm nagyságú, rozsdamentes acélból készült előleválasztót rögzítettünk egy laboratóriumi kézikocsi elejére a felszíntől 0,5 cm magasságban, melyhez két bemenet segítségével (65° -os szögben) egy lombfúvót (Makita UB1101) csatlakoztattunk műanyag flexibilis csövön keresztül. Az így kialakított egység belsejében turbulencia alakul ki, mely biztosítja az útfelületen található szilárd részecskék reszuszpenzióját. A levegőáram sebességét mértük az előleválasztónál található bemenetnél, mely így kb. 65 km h^{-1} -nak adódott. Az előleválasztót egy 1,8 m hosszú, 30 mm belső átmérőjű műanyag csőrendszerrel csatlakoztattuk egy alumíniumból készült tokhoz, amely tartalmazza a PM_{10} mintavevő fejet. A tok két részből áll, mely hermetikusan zárható,

térfogata pedig $24,5 \text{ dm}^3$. A mintavevő berendezés egy PARTISOL-FRM MODEL 2000 aeroszol mintavevőt tartalmaz, melyet egy laboratóriumi kézikocsira rögzítettünk. A mintavevő ciklon-leválasztóban gyűjti ún. „bulk” formájában a reszuszpendált PM_{1-10} frakciót, illetve 47 mm átmérőjű szűrőre a PM_1 frakciót. A mintavevő berendezést hordozható generátorral (Honda EU10i) működtettük, melyet szintén a laboratóriumi kézikocsira rögzítettünk.

A mintavevő berendezést városi reszuszpendált por gyűjtésére Veszprémben teszteltük. A mintavételi időszakra jellemző meteorológiai és levegőminőség szempontjából fontos paramétereket a helyi meteorológiai állomás és az Országos Légszennyezettségi Mérőhálózat adatbázisa szolgáltatta. A PM_1 frakció tömegkoncentrációja meghatározható az alkalmazott kvarc szűrő tömegének mérésével mintavétel előtt és után analitikai mérleg (Sartorius) segítségével. A Partisol mintavevő ciklon-leválasztójában gyűjtött PM_{1-10} frakció pedig teflon borítású spatula segítségével átvihető 2 ml-es üvegcsékbe, melyek tömege szintén mérhető mintavétel előtt és után, így meghatározható ezen frakció tömegkoncentrációja is. Az abszolút tömegkoncentráció értékek a mért tömegek különbségeként határozhatók meg. A reszuszpendált porminták „bulk” formájában való gyűjtésének köszönhetően ezen levegőszennyező forrás fázisösszetételének meghatározásának lehetősége újdonság a levegőkémiai kutatások területén, melyet röntgenpordiffraktométer használatával valósítottunk meg. A mennyiségi meghatározás Rietveld-analízis alkalmazásával történt. A reszuszpendált porminták morfológiai tulajdonságainak és elemi összetételének meghatározása energiadiszperzív röntgenspektrométerrel rendelkező pásztázó elektronmikroszkóp alkalmazásával történt, mely során a PM_{1-10} frakcióban gyűjtött részecskéket egy grafit felületre vittük fel. Ezen módszer alkalmazásával meghatároztuk a részecskék méretét és morfológiai tulajdonságait. A PM_{1-10} frakció teljes széntartalmát (TC) magas hőmérsékletű katalitikus oxidáció során TOC analizátor segítségével határoztuk meg. A vízoldható szervesetlen ionokat ionkromatográffal mértük. A poliaromás szénhidrogén (PAH) tartalom meghatározása fluoreszcens detektorral rendelkező folyadékkromatográffal történt. A Whatman kvarc szűrőre gyűjtött PM_1 frakció TC, illetve PAH tartalmát a fent említett módszerek segítségével vizsgáltuk. A szűrő típusából és a rendelkezésre álló kevés mintamennyiségből adódóan ezen frakció elemi- és fázisösszetételét, illetve a vízoldható szervesetlen iontartalmát nem tudtuk meghatározni. Ezen aeroszol forrás kutatásával kapcsolatban a mintavételezést szolgáló, általunk tervezett és épített speciális reszuszpendált aeroszol mintavevő berendezés felépítéséről, teszteléséről és az alkalmazható analitikai

módszerekről szóló cikk a *Journal of Aerosol Science* nevű nemzetközi folyóiratban jelent meg.

A további kutatásaink során a kifejlesztett speciális reszuszpendált aeroszol mintavevő berendezés segítségével Budapesten egy teljes éven keresztül évszakosan PM_1 illetve PM_{1-10} mintákat gyűjtöttünk nagyvárosokra jellemző reszuszpendált aeroszol forrásainak azonosítása céljából. A mintavételi helyek kiválasztása a rendelkezésre álló Országos Levegőszennyezettségi Mérőhálózat budapesti adatainak elemzése alapján történt. Az így kiválasztott mintavételi helyszínek: Pesthidegkút, Széna tér, Dózsa György út, Teleki tér, Kosztolányi tér, Budatétény, Csepel, Gilice tér, Kőrakás park és Gergely utca. A felsorolt mintavételi helyszínek között volt városi háttér, lakóterületi, városi és közlekedési besorolású egyaránt. A reszuszpendált városi aeroszol mintavételezése évszakosan (ősz, tél, tavasz, nyár) történt 2013-2014 folyamán. A Budapesten gyűjtött aeroszol minták PM_{1-10} frakciójából a fázisösszetétel meghatározása röntgen pordiffrakciós módszer (XRD) alkalmazásával, az elemi összetétel megállapítása pedig részecskeindukált röntgenemisszió (PIXE) segítségével történt. Ezen analitikai vizsgálatok segítségével lehetőségünk nyílt a reszuszpendált városi aeroszol elsődleges forrásainak azonosítására.

Az aeroszol részecskék kristályos fázisainak meghatározása a levegőkémiával foglalkozó tanulmányokban eddig nem volt lehetséges a minta kis mennyisége és a szűrő mátrixhatása miatt. Az ásványi összetétel mennyiségi meghatározása azonban értékes kiegészítő információja lehet a légköri aeroszol forrásainak azonosítása során, különösen olyan speciális aeroszol típusok esetén, mint például a reszuszpendált városi aeroszol. A röntgen-pordiffrakciós meghatározás PW 3020 típusú goniométerrel rendelkező Philips PW 3710 típusú diffraktométer alkalmazásával történt az alábbi paraméterek mellett: csőfeszültség 50 kV, csőáram 40 mA, a sugárforrás egy széles fókuszú Cu röntgencső, a monokromátor hajlított grafit egykristály, goniométersebesség $0,02^\circ \text{ s}^{-1}$, a felvételi technika pedig folyamatos scan mód. Az egyes reszuszpendált városi aeroszol mintákból 7 mg-ot vittünk fel egy üveg felületre a minták izopropil-alkohollal készített szuszpenziójából, amelyből az oldat elpárolog a vizsgálat megkezdéséig. A mennyiségi meghatározás (m/m%) Rietveld-analízis (X'Pert Highscore Plus szoftver) alkalmazásával történt, amely egy szerkezet finomítási módszer. A módszer alkalmazása során teljes profil készült a vizsgált mintáról. A finomítás során a program a szerkezeti paramétereket (atom pozíciók, hőmérsékleti tényezők, betöltöttségi faktorok), skála faktort, elemi cella paramétereket és a háttérrel leíró tényezőket, a csúcsok alakját és szélességét leíró profil paraméterekkel együtt addig változtatja a legkisebb

négyszögletes módszerrel, míg az elméleti modell alapján kiszámított diffraktogram a lehető legjobban le nem fedti a megfigyelt diffrakciós spektrumot. A Rietveld analízis legnagyobb előnye, hogy több kristályos fázist tartalmazó minták diffrakciós csúcsait modellezi és összegzi, ezzel egyidejűleg pedig az elemi cella paraméterek is meghatározhatók az egyes kristályos fázisokra. Az azonosított fő ásványi fázisok a reszuszpendált porban a következők voltak: kalcit [CaCO_3], kvarc [SiO_2], dolomit [$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$], klorit [$(\text{Mg,Fe})_6(\text{Si,Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$], plagioklász földpátok (főként albit [$\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$]), kálföldpátok [$(\text{K,Na})\text{AlSi}_3\text{O}_8$], kaolinit [$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$] és csillámok (főként muszkovit [$\text{KAl}_2\text{Si}_3\text{AlO}_{10}(\text{OH})_2$]). A mintákban 5–10% amorf tartalom feltételezhető, mely becslés azonban jelentős hibával ($\pm 10\%$) terhelt. Az eredmények alapján elmondható, hogy Budapesten a reszuszpendált részecskékre jellemző kristályos fázisok közül a kalcit, a kvarc és a földpátok (káli- és plagioklász földpátok) dominálnak. Ezen kristályos fázisok jelezhetik a részecskék közvetlen talaj- illetve kőzet eredetét, azonban forrásként építkezési és bontási munkálatokra is utalhatnak. A dolomit kisebb arányban található meg a budapesti PM_{1-10} mintákban, mint Veszprémben, ami nem meglepő, hiszen a Veszprém környékén domináns alapkőzet kiporzásának kisebb a szerepe a fővárosban. Azonban helyenként Budapesten is jelentős ezen ásványi fázis hozzájárulása, ami a nem pormentesített utak felporzására utalhat, mivel a dolomit a murva fő komponense. A reszuszpendált aeroszolban nem elhanyagolható arányban azonosított klorit is lehet elsődlegesen talajeredetű, illetve származhat építési-bontási munkálatokból is. A Budapesten gyűjtött minták némelyikében nyomnyi mennyiségben találtunk csillámot, illetve kaolinitet, melyek jelenléte szintén a talajok kiporzására utalhat. A városi reszuszpendált aeroszol kristályos fázisainak mennyiségi összetételére vonatkozó eredményeinket hazai konferencián mutattuk be (*9. Téli Ásványtudományi Iskola 2014*).

A Budapesten gyűjtött városi reszuszpendált PM_{1-10} aeroszol minták forráseloszlásának becslése céljából elvégeztük a minták fő- és nyomelem összetételének mennyiségi meghatározását részecske indukált röntgen emissziós (PIXE) módszer segítségével az ATOMKI (MTA Atommagkutató Intézet) pásztázó ion mikroszondáján. A besugárzó nyaláb jellemzői: H^+ nyaláb 2 MeV energiával, ~200 pA áramerősség mellett, a nyaláb mérete pedig $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$. Az aeroszol mintákból 0,5 cm átmérőjű pasztillák készültek rozsdamentes présszerszám alkalmazásával, adalékanyag hozzáadása nélkül. A pasztillák egy speciális mintatartó segítségével kerültek a vákuumkamrába. A vizsgált terület minden minta esetén véletlenszerűen kiválasztott 2 db $1,5 \text{ mm} \times 1,5 \text{ mm}$ terület volt. A vizsgálat két

röntgendetektorral történt párhuzamosan: egy ultravékony (utw) ablakú Si(Li) detektorral és egy Be ablakú Si(Li) detektorral. Az utw detektorral a C-Cu elemtartomány, míg a másik detektorral a S-U elemtartomány mérése történt. Az eredmények alapján elmondható, hogy Budapesten a reszuszpendált városi aeroszol (PM₁₋₁₀ frakció) több mint 98 m/m%-át a főelemek (Si, Ca, Al, Fe, Mg, Na, K) alkotják. A maradék ~ 2 m/m%-ot adják a nyomelemek (Ti, Mn, Rb, Sr, Zr, Cu, Zn, Cr, Ni, Ba, Pb). A városi reszuszpendált aeroszolban detektált elemek talaj eredetét dúsulási tényező (EF: enrichment factor) meghatározásával igazoltuk. Az eredmények alapján elmondható, hogy talaj eredetű elemek a Si, Ti, Al, Fe, Mg, Na, K, Mn, Rb, Sr, Ba és Zr, viszont talajra nézve antropogén a Ca, P, Pb, Zn és Cu. Építkezési munkálatokból és vasúti sínek kopásából származó aeroszol minták kémiai összetételét figyelembe véve elmondható, hogy a városi reszuszpendált aeroszolban detektált Si, Ti, Al, Fe, Mg, Ca, Na, Mn, Sr, Ba, Ni származhat egyaránt építkezési és bontási munkálatokból is, azonban Fe, Mn, Ni és Cu forrása lehet a vasúti sínpályák kopása is. Természetesen a reszuszpendált aeroszol mintákban megtalálható Pb, Zn és Cu közül az Pb a közlekedéssel, a Zn a gépjárművek mechanikai kopásával, a Cu pedig a fékbetétek kopásával is magyarázható. Az eredmények alapján azt is megállapítottuk, hogy az általunk gyűjtött minták kémiai összetétele hasonló a korábbi kutatások során gyűjtött, a közlekedést demonstráló városi reszuszpendált aeroszol összetételéhez. Fontos megemlíteni, hogy a Budapesten gyűjtött városi reszuszpendált aeroszol minták kémiai összetétele között évszakos változékonyságot nem tudtunk kimutatni. Azonban az eredményeket összegezve egyértelműen kijelenthető, hogy a városi reszuszpendált aeroszol durva frakciójának fő forrásai a talaj, illetve az építkezési és bontási munkálatok. A városi reszuszpendált aeroszol fázis- és elemi összetételét, illetve az ezen alapuló forráseloszlást bemutató cikkünk előkészületben van, melyet a közeljövőben rangos nemzetközi folyóiratban szándékozunk publikálni, illetve a témakörben kapott eredményeinket nemzetközi konferencián előadás formájában mutattuk be (*International Conference on Atmospheric Dust 2014*).

A reszuszpendált városi aeroszol környezetre gyakorolt hatásának vizsgálatára ökotoxikológiai tesztek végeztünk. A városi környezetben gyűjtött porminták egy részéből (2 mg) nagy tisztaságú ioncserélt vízzel szuszpenziót készítettünk, melynek ökotoxicitását Thermo Luminoscan Ascent műszer segítségével mértük. Az ökotoxicitás kifejezésére szolgáló EC₅₀ értékeket Ascent szoftver segítségével határoztuk meg, mely érték az aeroszol részecskék azon tömegkoncentráció értékét fejezi ki, amely 50 %-os gátlást okoz a teszt organizmus fénykibocsátásában adott állandó vizsgálati körülmények mellett. Az EC₅₀

értékeket μg mértékegységben fejeztük ki. Fontos megemlíteni, hogy az alacsonyabb EC_{50} érték jelent nagyobb ökotoxikológiai hatást.

Ehhez kapcsolódóan különböző aeroszol minták (biomassza égetés, cigarettafüst, gépjárművek kipufogógáz kibocsátása, téli és nyári városi légköri aeroszol) ökotoxicitásának vizsgálatára a levegőkémiai kutatások területén újdonságnak számító mintaelőkészítési módszert fejlesztettünk ki, mely során közvetlenül a kvarc szűrőre gyűjtött aeroszol mintákat mozsárban porítjuk, majd nagy tisztaságú ioncserélt vízzel szuszpenziót készítünk belőlük. Így lehetségessé vált különböző forrásokból származó aeroszol minták ökotoxicitásának összehasonlítása, illetve erősen szennyezett téli városi aeroszol ökotoxikológiai hatásának vizsgálata. Az eredmények azt mutatják, hogy a legalacsonyabb EC_{50} értékkel a cigarettafüst és a biomassza égetésből származó aeroszol minták rendelkeznek. Meglepő eredmény, hogy a gépjárművek kibocsátásának kisebb a fajlagos ökotoxikológiai hatása, mint a fatüzelésnek. A személygépjárművek kipufogógáz kibocsátásának EC_{50} értékei nagy szórással rendelkeznek a különböző motor típusok, azok állapota és a használt üzemanyag típusok függvényében. A dízelmotorral rendelkező buszokból származó aeroszol minták ökotoxicitás értékei jól korrelálnak a különböző környezetvédelmi besorolású motortípusokkal. Az EURO0 és EURO1 motorral rendelkező buszok kibocsátása a legtoxikusabb, viszont az EURO4 motorral rendelkező busz kibocsátása esetén nem mutatható ki ökotoxicitás. A reszuszpendált por esetén kaptuk a legnagyobb EC_{50} értékeket, ami a nem toxikus ásványi fázisok nagyarányú jelenlétével magyarázható.

A téli városi aeroszol minták sokkal ökotoxikusabbak, mint a nyári minták. Ez magyarázható a nagy ökotoxikológiai hatással rendelkező gépjármű kibocsátás és a fatüzelés nagyarányú hozzájárulásával. Továbbá télen a légköri fotooxidáció mértéke sokkal kisebb, mint nyáron, illetve a légköri keveredés is kisebb mértékű az alacsonyabb keveredési rétegmagasság következtében. Ráadásul a téli alacsonyabb napi átlaghőmérsékletek kedveznek a közepesen illékony szerves vegyületek (pl. biomassza égetésből) kondenzációjának az aeroszol részecskék felületén. Vizsgáltuk erősen szennyezett téli városi aeroszol mintákra jellemző ökotoxikológiai hatás, a biomassza égetés nyomjelző vegyületeként ismert levoglukozán (LGS) koncentráció és a közlekedésre jellemző NO_x tömegkoncentráció értékek közötti összefüggést. A LGS meghatározást szililezés után végeztük GC-MS módszer alkalmazásával, a NO_x tömegkoncentráció értékeket és a meteorológiai paramétereket pedig az Országos Meteorológiai Szolgálat adatbázisából nyertük. A téli városi aeroszolra jellemző $\text{EC}_{50}/\text{NO}_x$ és $\text{EC}_{50}/\text{LGS}$ arányok hasonlóképpen

változnak, és az értékek változása követi a keveredési réteg magasságának változását. Ez arra utal, hogy magas szennyezettség esetén a lokálisan kibocsátott elsődleges aeroszol részecskék relatív hozzájárulása megnövekszik, mely magasabb ökototoxicitást eredményez a kisebb mértékű légszennyezettségi állapothoz képest. Korábbi tanulmányok alapján mondhatjuk, hogy nyáron a $PM_{2.5}$ aeroszol alkotói meghatározóan biológiai forrásból származó szerves vegyületek légköri átalakulási folyamataiból keletkeznek. Nyáron a városi PM_{10} aeroszolhoz ezen kívül a reszuszpendált por is hozzájárulhat, mely elsősorban inert, kis ökotoxicitású komponenseket tartalmaz. Ezek a tényezők önmagukban is magyarázzák a nyári aeroszol kisebb ökotoxicitás értékeit. Feltételezhető továbbá, hogy a légköri átalakulási folyamatok (öregedés, fotooxidáció) csökkentik az elsődleges részecskék és az illékony szerves anyagok ökotoxicitását. A különböző aeroszol források ökotoxikológiai hatásainak összehasonlítását bemutató cikkünket az *Atmospheric Chemistry and Physics* nevű nemzetközi folyóiratban publikáltuk, továbbá a témakörben kapott kutatási eredményeinket több hazai és nemzetközi konferencián bemutattuk előadás formájában (*European Aerosol Conference 2013; XI. Magyar Aeroszol Konferencia 2013; XI. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia 2013*).

II. Reszuszpendált porminták PM_{10} -es frakció baktérium tartalmának vizsgálata NGS szekvenálás technika segítségével

Szakmai előzmények

A bioaeroszlok biológiai eredetű lebegő részecskék (pl. baktériumok, gombák, pollenek és vírusok) illetve ezek metabolitjai, mint pl. endotoxinok, mikotoxinok vagy egyéb részecskék. Az atmoszféra biomasza tartalma mennyiségében ugyan jócskán elmarad a bioszféra egyéb elemeiben található biomasza mennyiségétől, de arányaiban a diszpergált részecskék jelentékeny hányadát adja. A $PM_{2.5}$ frakció például 3-11 tömegszázalékban tartalmaz biológiai eredetű elemeket (ez az arány a szerves szénvegyületeket tekintve sokkal nagyobb, egyes becslések szerint bizonyos körülmények között a 25%-ot is meghaladhatja (Peccia et al., 2006)).

A levegő mikroorganizmus összetételének vizsgálata – elsősorban humán egészségügyi vonatkozásban – már régóta fontos kutatási terület (Burge, 1995). Az alacsony nedvesség és tápanyagtartalom, az erős UV sugárzással párosulva nagyon barátságatlan

környezetté teszi a földi atmoszférát, ezért azt sokáig csak szállító közegnek, nem pedig valódi élőhelynek tekintették (Brodie et al., 2006., Korzeniewska 2011).

A korábbi kutatásokban az atmoszféra mikroba összetételét elsősorban klasszikus tenyésztési eljárásokkal valamint mikroszkópiás módszerekkel vizsgálták. (Stetzenbach et al., 2004). A molekuláris biológia fejlődésével a közelmúltban az aerobiológiában is egyre elterjedtebbé váltak a tenyésztés független vizsgálati módszerek (pl. PCR-DDGE, klónozás, szekvenálás) amelyek radikálisan átalakították a levegő mikroorganizmus tartalmáról alkotott képünket (Cho et al., 2011.). Az NGS (új generációs szekvenálás) megjelenésével taxonómiai forradalom kezdődhetett, és először nyílt lehetőség a Föld nagyszámú habitatjának jellemzésére. (Whiteley et al., 2012) Az NGS alkalmazása az atmoszféra mikrobiális vizsgálatában is megkezdődött (DeLeon-Rodriguez et al. 2012., Bowers et al., 2009).

Az új technikáknak köszönhetően a levegőben található mikroorganizmusok szerepe és jelentősége egészen átértékelődött: ma már bizonyított, hogy még az extrém alacsony hőmérsékletű felhőcseppekben is vannak olyan mikroorganizmusok, amelyek nemcsak, hogy életben maradnak, de növekedésre is képesek (Peccia et al., 2006). A lebegő mikroorganizmusok gyakran por vagy pl. tüszentésből, köhögésből vagy környezeti víztestekből származó vízcseppekhez kötődnek. A víz elpárolgásával a mikroorganizmusok cseppmagokat képeznek, így hosszú ideig a levegőben maradhatnak, és a légmozgások segítségével messzire elsodródhatnak. (Tringe et al., 2008). A levegőben található mikrobiális közösség fajgazdagsága a talajéhoz mérhető, és úgy tűnik, hogy jellemző térbeli és időbeli változások figyelhető meg benne (Vaitilingom et al., 2012.). Az atmoszférában található mikroorganizmusok reaktív frakciót képeznek, jelentősen befolyásolhatják az aerokémiai reakciókat, valamint fontos szerepet tölthetnek be a felhőképződésben, továbbá jelentős távolságokat tehetnek meg a légkörben, miközben megőrzik életképességüket (Peccia et al., 2006.). Ezek alapján az atmoszféra mikrobiális felépítése alapvető környezeti, meteorológiai, mezőgazdasági, ökológiai illetve humán és állategészségügyi jelentőséggel rendelkezik, összetételéről és dinamikájáról azonban ennek ellenére is nagyon keveset tudunk (Peccia et al., 2006., Brodie et al., 2006.).

A levegőben szuszpendált részecskék méretüknek megfelelő gyorsasággal, a környezeti tényezők függvényében különböző idő alatt ülepednek. A reszuszpendáció az előzőleg atmoszférából kiülepedett részecskék bizonyos idő utáni ismételt szuszpendálódását jelenti (Hosiokangas et al., 2004). Mivel számos helyen a reszuszpendált frakció adja a lebegő részecskék legnagyobb részét, feltételezhető, hogy a levegő mikrobiális összetételének

kialakításában jelentős szerepe lehet. Ennek ellenére ismereteink szerint eddig nem történt vizsgálat a reszuszpendált frakció mikroorganizmus összetételének vizsgálatára.

Kísérletek menete:

2012. október 5. és november 9. közötti időintervallumban Budapest 6 pontjáról, illetve 2013. március 9-én egy tipikusnak tekinthető istállóból a reszuszpendált por belélegezhető (PM₁₀) frakciójának (10 µm és 1 µm közötti átmérőjű részecskék) begyűjtését végeztük el a mintavevő eszközzel.

A minták DNS tartalmának kivonásához több szerző talaj DNS kivonó kitek alkalmazását ajánlja, mivel a pormintákban számos PCR gátló anyag (pl. huminsavak) található, amelyek akadályozhatják a munkát (Georgacapolous et al., 2008, Wilson et al., 2002). A kis mintamennyiség (kb. 60 mg) miatt mágneses DNS kötő gyöngyök alkalmazása mellett döntöttünk. A DNS kinyeréshez az Omega EZNA talaj DNS kivonó kittjét alkalmazzuk. A mágneses DNS kötő gyöngyök használatával Maher és munkatársai 10² db baktérium érzékelési határral képesek voltak használható DNS mennyiséget kivonni (Maher et al., 2001).

A metodika optimalizálásával 20-30 baktériumból megfelelő minőségű DNS kinyerését sikerült elérnünk. A kinyert DNS-ből genomiális PCR segítségével felszorzottuk a 16S rRNS gén meghatározott szakaszát. A forward primereket Whiteley és munkatársai (2012) által leírt módszer alapján bárkódoltuk és a fragmentumokat PGM (Ion Torrent Personal Genome Machine) szekvenálásnak vetettük alá, majd a megfelelő hosszúságú readeket Meyer (2008) és munkatársai által leírt módszerek alapján filogenetikai analízisnek vetettük alá.

Az istálló minta bakteriális összetétele

Istállózott lovaknál gyakori kórkép a COPD (közismert nevén kehesség). Világszerte megközelítőleg a lovak 50% szenved ebben a betegségben (Bowles et al., 2002). Kiváltó oka gombatoxinok jelenléte a levegőben, elsősorban a nem megfelelő minőségű alom illetve széna használatakor (Art et al., 2002). Éppen ezért istállók esetében monitorozzák a PM₅ frakciót (lovak esetében ez a mérettartomány, amely már az alsó légutakat veszélyezteti) (pl. Clements és Pirie, 2007), ill. a mikroszkopikus gombák, esetleg toxinok jelenlétét (Berndt et al., 2010). Ebbe a mérettartományba eső részecskék ugyanakkor gombaspórákon kívül egyéb

mikroorganizmusokat, baktériumokat is továbbíthatnak (Fleming et al., 2008). Vizsgálatunk célja a baktériumközösség általános jellemzése mellett annak a megállapítása volt, mekkora a kockázata annak, hogy a reszuszpendált por olyan patogéneket is közvetít, amelyek kockázatot jelenthetnek az istállózott lovak egészségére. Eddig tenyésztéses eljárást alkalmaztak a szálló poron levő baktériumközösség meghatározására (Tanner et al., 1997; Samadi et al., 2009), ismereteink szerint ez az első eset NGS ‘bevetésére’.

A mintát egy tipikusnak tekinthető hazai istállóban vettük, maga az istálló a tulajdonossal történt egyeztetés után anonym maradt. Az istállóban 20 box található, a lovak az időjárástól függően, lehetőség szerint a napot a legelőn töltik. A létesítmény jól szellőzött. A mintavétel megközelítőleg 2 órán keresztül tartott, ez elégnek bizonyult ahhoz, hogy a minimális mintamennyiségnek tekintett 30 mg összegyűljön.

A szekvenálás során összesen 1491 taxont azonosítottak, ezek közül 384-t fajszinten, 961-t genus szinten. Összes egyedszám (read count) 14 382 volt. A taxonok törzsek szerinti megoszlása a következő:

Phylum	Rel. abundancia	Read count
<i>Acidobacteria</i>	4.58	657
<i>Planctomycetes</i>	4.82	692
<i>Bacteroidetes</i>	12.44	1784
<i>Chloroflexi</i>	1.70	244
<i>Gemmatimonadetes</i>	0.98	140
<i>Proteobacteria</i>	31.15	4467
<i>Verrucomicrobia</i>	1.60	230
<i>Cyanobacteria</i>	0.75	108
<i>Actinobacteria</i>	10.02	1437
<i>Firmicutes</i>	29.90	4288

Legnagyobb részaránnyal a *Staphylococcus* genus fordul elő (total read count 1064, 7,419%), ezek közül is a *S. succinus* (read count 711, rel. abundancia 4,957%. Ez az eredmény nem meglepő: egy baromfitenyészetben végzett hasonló felmérés szerint ez a genus (*Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus sciuri*, és *Staphylococcus chromogenes*) az izolált baktériumok 42 %-t tette ki (Bródka et al., 2012). A *Staphylococcus*

genusban, előzetes várakozásunk ellenére, lovakra patogén szervezetet nem találtunk, találtunk viszont humán patogén törzseket: *S. succinus* (read count 711, rel. abundancia 4.957%) (Nováková et al., 2006); *S. equorum* (read count 118, rel. abundancia 0.823%) (Nováková et al., 2006; Bija et al., 2013). *S. xylosus* (read count 14, rel. abundancia 0.098%) (Siqueira & Lima, 2002). A lovak számára legnagyobb egészségügyi kockázatot jelentő, istálló aeroszol mintákban bizonyítottan előforduló (Kuskie et al., 2011, Muscatello, 2012) *Rhodococcus equi* fajt nem találtuk meg. Általánosságban elmondható, hogy a baktériumok jelentős százaléka jellemzően talajlakó, ill. szerves közegben (széna, szalma) megtalálható szervezet (pl. a *Pedobacter*, nemzetség tagjai, ez a genus összesen 28 fajjal/törzsszel képviseltette magát, total read count 275, az összminta 1,934%-a, ill. pl. *Rhizobium* fajok).

Érdekessége az adatsornak, hogy több olyan fajt/törzset is találtunk, amelyeket eddig földrajzilag távol eső helyeken izoláltak (a teljesség igénye nélkül):

- *Brevundimonas mediterranea*: Gram-negatív, Földközi-tengerből izolált (Fritz et al., 2005)
- *Deinococcus reticulitermitis*: Gram-negatív, természetből izolált (Chen et al., 2012)
- *Flavisolibacter ginsengisoli*: Gram-negatív, ginzengföldről (Korea) izolált (Yoon & Im, 2007)
- *Mesorhizobium alhagi*: Gram-negatív, szimbióta baktérium, a (kínai) *Alhagi sparsifolia* gyökérgümőjéből izolált (Chen et al., 2010)
- *Mucilaginibacter ximonensis*: Gram-negatív, tibeti talajból izolált (Luo et al., 2009)
- *Paenibacillus xylanexedens*: Gram-pozitív, alaszakai tundrán izolált (Nelson et al., 2009)
- *Pedobacter composti*: Gram-negatív, komposztból (Korea) izolált (Lee et al., 2009).
- *Pedobacter ginsengisoli*: Gram-negatív, ginzengföldről (Korea) izolált (Ten et al., 2006)
- *Planomicrobium glaciei*: Kínában, gleccserből izolált (Zhang et al., 2009).
- *Pseudomonas xanthomarina*: Gram-negatív, a tengeri *Didemnum* és *Halocynthia* fajokból izolált (Romanenko et al., 2005)
- *Streptomyces sedi*: Gram-pozitív, egy (kínai) *Sedum* sp. gyökeréből izolált (Li et al., 2009)

A talajból, komposztból izolált törzsek hazai előfordulása ('öshonossága') Magyarországon eddig nem bizonyított, de nem is kizárt. Azok a fajok viszont, amelyeket

földrajzilag távol eső területeken, Magyarországon nem előforduló gazdaszervezetből/szimbiontából izoláltak, feltehetőleg légköri aeroszollal jutottak el ide. Egyes szerzők szerint ez a terjedési mechanizmus hozható összefüggésbe a baktériumközösségek diverzitásának változásával (Vařilingom et al., 2012).

Városi aeroszol minták

A városi aeroszol minták kiértékelésekor az egyes élőhelyekről származó baktériumközösségek eltérését/hasonlóságát tárgyaljuk. Ehhez a mintavételi helyszíneken a mikroorganizmusok élettevékenységét/túlélését befolyásoló környezeti paraméterei közül 3 fokozatú skálán értékeltük pl. az Árnyékoltság (növény), Árnyékoltság (épület), Növény borítottság, beton borítottság, épületek távolsága, úttest szélessége paramétereket, illetve prezencia-abszencia alapján a Vízelvezés módja (árok, csatorna, úttest szélén), buszmegálló, kutyafuttató, egészségügyi intézmény, iskola stb. változókat. A különböző helyszíneken azonosított baktérium csoportokon genusz, család és osztály szinten is PCA analízist végeztünk.

A mintavételek helyszínéről a baktériumösszetétel meghatározásához használt reszuszpendált mintákon kívül ezekkel közel egy időben elemi összetétel meghatározáshoz, és összes ásványi anyag meghatározására is gyűjtöttünk mintát, és a baktériumösszetételt (genusz és család szinten) a helyszíni paraméterekkel, az ásványi anyag illetve elemi összetétellel összevetve redundancia-analízist (RDA) végeztünk.

Eredmények

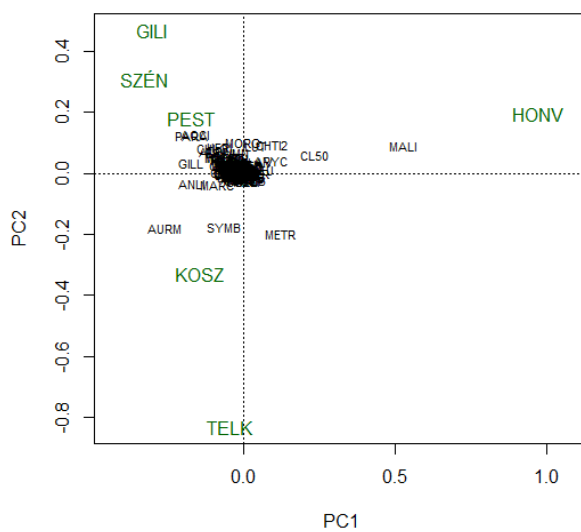
Minták és szekvenálás jellemzői

Név	Mintamennyiség	DNS kon.	OD260/280	OTU
Gilice tér (Gili)	30 mg	22,4 ng/μl	1,92	16136
Kosztolányi tér (Kosz)	52,19 mg	6,9 ng/μl	2,23	23221
Széna tér (Szen)	26,23 mg	24,7 ng/μl	1,84	1189
Honvéd telep (Honv)	27,04 mg	23 ng/μl	1,94	456
Pesthidegkút (Pest)	30 mg	11,6 ng/μl	2,13	8381

Teleki tér (Tel)	30 mg	19,4 ng/μl	1,79	1738
------------------	-------	------------	------	------

Baktérium összetétel

Genusz és család szinten is elvégeztük a különböző élőhelyek mikroorganizmus relatív abundancia értékeinek PCA analízisét (1. ábra). A két taxonómiai szinten végzett elemzések eredmény nem különbözött egymástól, és variancia sem csökkent számottevően a családokkal végzett összehasonlításban a genuszokhoz képest, ezért a továbbiakban a vizsgálatainkat a család szinten végeztük el.



1. ábra PCA analízis baktérium family

A PCA analízissel sikerült azonosítani olyan domináns genuszokat, amelyek alapján az élőhelyek jól csoportosíthatók, ezeknek a listája az 1. táblázatban látható.

	Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus
Honv	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus
	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Brevibacillus
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia-Shigella
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
Szen Gili Pest	Bacteria	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Hymenobacter
	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia
	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter
	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Flavisolibacter
Kosz Telk	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Rubellimicrobium
	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum
	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax
	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Derxia

1. táblázat A különböző élőhelycsoportokban azonosított meghatározó taxonok

Egyéb eredmények

Az egyes mintavételi pontokon gyűjtött mintákból több taxon kitenyésztését végeztük el, ezeket megfelelő körülmények között tároljuk. Közöttük található fajszenen nem azonosítható, feltehetően új fajt jelentő taxonok. A továbbiakban ezek egy részének leközlését tervezzük (ilyen jellegű tanulmányok leközlésére alkalmas folyóirat az International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology).

Minta	Tenyészetek száma
1. Széna tér	24
2. Honvéd telep	59
3. Gilice tér	49
7. Pesthidegkút	34
8. Teleki tér	58
10. Kosztolányi tér	50
13. Lovarda	40

Irodalom

- Art, T., McGorum, B.C., Lekeux, P., Environmental control of respiratory disease. In: Lekeux, P.(Ed.), *Equine Respiratory Diseases*, first ed. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA(<www.ivis.org>). (2002)
- Berndt, A., Derksen, F.J., Robinson, N.E. Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. *The Veterinary Journal* (2010) 183, 54–57.
- Bija, M.D., Luma, H.N., Mbida, P.A., Nguenkam, C. T., Ebongue, C.O., 2013. Cervical spondylodiscitis due to *Staphylococcus equorum* (Spondylodiscite cervicale à *Staphylococcus equorum*). *Lettres à la rédaction / Médecine et maladies infectieuses* 43, 254–257.
- Bowers, R.M., Lauber C.L., Wiedinmyer, C., Hamady, M., Hallar, A.G., Fall R., Knight R., Fierer N. Characterization of Airborne Microbial Communities at a High-Elevation Site and Their Potential To Act as Atmospheric Ice Nuclei. *Appl. Environ. Microbiol* (2009) 75, 5121–5130.
- Bowles, K.S., Beadle, R.E., Mouch, S., Pourciau, S.S., Littlefield-Chabaud, M.A., Le Blanc, C., Mistic, L., Fermaglich, D., Horohov, D.W. A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2002) 87, 385–389
- Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Parker, J.P.M., Zubietta, I.X., Piceno, Y. M., Andersen, G.L. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. (2007) 104, 299–304.
- Bródka, K., Kozajda, A., Buczynska, A., Szadkowska-Stanczyk, I. The variability of bacterial aerosol in poultry houses depending on selected factors. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* (2012) 25, 281–293.
- Burge, H.A. Airborne contagious disease. (1995). 25-47. in: *Burge, HA, (ed.). Bioaerosols. CRC/Lewis Press Boca Raton*
- Chen W., Wang B., Hong H., Yang H., Liu S-J. (2012). *Deinococcus reticulitermitis* sp. nov., isolated from a termite gut. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 78–83.
- Chen W-M., Zhu W-F., Bontemps C., Young J.P.W., Wei G.H. (2010). *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 958–962.
- Cho, B.C., Hwang, C.Y. Prokaryotic abundance and 16S RNA gene sequences detected in marine aerosols on the East Sea (Korea). *FEMS Microbiol Ecol* (2011) 76, 327–341.

- Clements, J.M., Pirie, R.S. Respirable dust concentrations in equine stables. Part1: Validation of equipment and effect of various management systems. *Research in Veterinary Science* 83 (2007) 256–262
- DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T.L., Rodriguez-R, L.M., Barazesh, J.M., Anderson B.E., Beyersdorf A.J., Ziemba L.D., Bergin, M., Nenes, A., Konstantinidis K.T. Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* (2012) doi: 10.1073/pnas.1212089110
- Fleming, K., Hessel, E.F., Van den Weghe, H.F.A. Generation of Airborne Particles from Different Bedding Materials Used for Horse Keeping. *Journal of Equine Veterinary Science* (2008) 28, 408-418.
- Fritz I., Strömpl C., Nikitin D.I., Lysenko A.M., Abraham W.R. (2005). *Brevundimonas mediterranea* sp. nov., a non-stalked species from the Mediterranean Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 479–486.
- Georgakopoulos, D. G. , Despr'es, V., Fröhlich-Nowoisky, J., Psenner, R., Ariya, P. A., Pósfai, M., Ahern, H. E., Moffett, B. F., Hill, T. C. J. Microbiology and atmospheric processes: biological, physical and chemical characterization of aerosol particles. *Biogeosciences Discuss.* (2008) 5, 1469–1510.
- Hosiokangas, J., Vallius, M., Ruuskanen, J., Mirme, A., Pekkanen, J. Resuspended dust episodes as an urban air-quality problem in subarctic regions. *Scand J Work Environ Health.* (2004) 2, 28–35.
- Korzeniewska, E. Emission of bacteria and fungi in the air from wastewater treatment plants - a review. *Front Biosci.* (Schol Ed). (2011) 3, 393–407.
- Kuskie, K.R., Smith, J.L., Sinha, S., Carter, C.N., Chaffin, M.K., Slovis, N.M., Brown, S.E., Stepusin, R.S., Takai, S., Cohen, N.D., 2011. Associations between the exposure to airborne virulent *Rhodococcus equi* and the incidence of *R equi pneumonia* among individual foals. *Journal of Equine Veterinary Science* 31, 463-469.
- Lee H.G., Kim S.G., Im W.T., Oh H.M., Lee S.T. (2009). *Pedobacter composti* sp. nov., isolated from compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 345–349.
- Li J., Zhao G.Z., Qin S., Zhu W.Y., Xu L.H., Li W.J. (2009). *Streptomyces sedi* sp. nov., isolated from surface-sterilized roots of *Sedum* sp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1492–1496.

- Luo X., Zhang L., Dai J., Liu M., Zhang K., An H., Fang C. (2009). *Mucilaginibacter ximonensis* sp. nov., isolated from Tibetan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1447–1450.
- Maher, N., Dillon, H.K., Vermund, S.H., Unnasch, T.R. Magnetic bead capture eliminates PCR inhibitors in samples collected from the airborne environment permitting detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *Applied and Environmental Microbiology* (2001) 67, 449–452.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E.M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., Edwards, R.A. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinforma.* (2008) 9, 386.
- Muscatello, G., 2012. *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal – Part 1: Pathogenesis and epidemiology. *The Veterinary Journal* 192, 20–26.
- Nelson D.M., Glawe A.J., Labeda D.P., Cann I.K.O., Mackie R.I. (2009). *Paenibacillus tundrae* sp. nov. and *Paenibacillus xylanexedens* sp. nov., psychrotolerant, xylan-degrading bacteria from Alaskan tundra. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1708–1714.
- Nováková, D., Sedláček, I., Pantuček, R., Štětina, V., Švec, P., Petráš, P., 2006. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology* 55, 523–528.
- Peccia, J., Hernandez, M. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. *Atmospheric Environment.*, (2006) 40, 3941–3961.
- Romanenko L.A., Uchino M., Falsen E., Lysenko A.M., Zhukova N.V., Mikhailov V.V. (2005). *Pseudomonas xanthomarina* sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian. *Journal of General and Applied Microbiology.* 51, 65–71.
- Samadi, S., Wouters, I.M., Houben, R., Jamshidifard, A-R., van Eerdenburg, F., Heederik, D.J.J. Exposure to Inhalable Dust, Endotoxins, $\beta(1/3)$ -Glucans, and Airborne Microorganisms in Horse Stables. *Ann.Occup.Hyg.*, (2009) 53, 595–603.
- Siqueira, J.F., Lima, K.C., 2002. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosus* in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. *Australian Endodontic Journal* 28, 61–63.

- Stetzenbach, L.D., Buttner, M.P., Cruz, P. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology*. (2004) 15, 170–174.
- Tanner, M.K., Swinker, A.M., Beard, M.L., Cosma, G.N., Traub-Dargatz, J.L, Martinez, A.B., Olenchock, S.A. Effect of phone book versus sawdust and straw bedding on the presence of airborne Gram-negative bacteria, fungi and endotoxin in horse stalls. *Journal of Equine Veterinary Science* (1998) 18, 457-461.
- Ten, L.N, Liu, Q.M, Im, W.T, Lee, M, Yang, D.C, Lee, S.T. *Pedobacter ginsengisoli* sp. nov., a DNase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field in South Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. (2006) 56, 2565–2570.
- Tringe, S.G., Zhang, T., Liu, X., Yu, Y., Lee, W.H., Yap, J., Yao, F., Suan, S.T., Ing, S.K., Haynes, M., Rohwer, F., Wei, C.L., Tan, P., Bristow, J., Rubin E.M., Ruan Y. The airborne metagenome in an indoor urban environment. *PLoS One*. (2008) 2, 1862.
- Vařtilingom, M., Attard, E., Gaiani, N., Sancelme, M., Deguillaume, L., Flossmann, A.I., Amato, P., Delort, A. Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France). *Atmospheric Environment* (2012) 56, 88–100.
- Whiteley, A.S., Jenkins, S., Waite, I., Kresoje, N., Payne, H., Mullan, B., Allcock, R., O'Donnell, A. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *J. Microbiol Methods*. (2012) 91, 80–88.
- Wilson, K.H., Wilson, W.J., Radosevich, J.L., DeSantis, T.Z., Viswanathan, V.S., Kuczmariski, T.A., Andersen, G.L., 2002. High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2535–2541.
- Yoon M.H., Im W.T. (2007). *Flavisolibacter ginsengiterrae* gen. nov., sp. nov. and *Flavisolibacter ginsengisoli* sp. nov., isolated from ginseng cultivating soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1834–1839.
- Zhang, D.C, Liu, H.C., Xin, Y.H., Yu, Y., Zhou, P.J., Zhou, Y.G. *Planomicrobium glaciei* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a glacier. *Int J Syst Evol Microbiol*. (2009) 59, 1387–1390.