

Gyimesközéploki ivóvizek szennyezettségének vizsgálata

Hallgató: ing. László Szilvia – *Marosvásárhelyi George Emil Palade Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Orvosi biotechnológia mesterszak*

Témavezetők: dr. Máthé István – egyetemi docens

dr. Salamon Pál- egyetemi tanársegéd

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Kar, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda

Marosvásárhely
2024. április 26-27.

Tartalomjegyzék

Tartalom

1. Kivonat	3
2. Elméleti bevezető.....	4
2.1. Románia vízrajza	4
2.2. Baktériumok sokszínűsége vízi környezetekben.....	5
2.3. Antibiotikum rezisztencia a környezetben	7
2.4. Rezisztencia gén átadása	9
2.5. Antibiotikum rezisztencia vizsgálata	11
2.5.1. Tetraciklin	12
2.5.2. Eritromicin	13
2.5.3. Sztreptomycin	14
2.5.4. Ampicillin	15
2.5.5. Augmentin.....	15
2.6. A vizek kémiája	16
3. Céltűzés.....	18
4. A kutatás módszertana	19
4.1. Vizsgálati pontok és mintavétel	19
4.2. Helyszíni fizikai-kémiai mérések.....	19
4.3. Laborkémiai mérések	20
4.4. vízminőségi, higiéniai vizsgálatok	21
4.5. Baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának vizsgálata	22
4.6. Baktériumok azonosítása MALDI-TOF-MS segítségével.....	22
5. Kutatási eredmények bemutatása és tárgyalása	24
5.1. Helyszíni fizikai mérések eredményei	24
5.2. Vízkémiai mérések eredményei	26
5.3. vízminőségi, higiéniai vizsgálatok eredményei	26
5.4. Baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának vizsgálata	29
5.5. Baktériumok azonosítása MALDI-TOF-MS segítségével.....	30

1. Kivonat

A víz az élőségszükségletének eleme, amely nélkülözhetetlen az élőlények számára. Nagyon fontos, hogy megőrizzük vizeink tisztaságát, ugyanis a tiszta és biztonságos ivóvíz létfontosságú mindenki számára. A vízi környezet bolygónk legjelentősebb mikrobiális élőhelyei közé tartozik. A vizekbe azonban bekerülhetnek különböző szennyező baktériumok, így például coliformok is, amelyek egyes képviselői az emberi szervezetbe jutva képesek enyhe vagy súlyos betegségeket okozni (a legismertebb fajok: *Escherichia coli* és a *Klebsiella pneumoniae*). Azokon a vidékeken, ahol jelentős az állattartás és nem megfelelő a szennyvíznek az elvezetése gyakran bekerülnek ezek a mikrobák a talajba, talajvízbe, onnan pedig az ivóvízbe a műtrágyának, növényvédő szereknek és állati ürülékeknek köszönhetően.

A gyakran felelőtlen gyógyszerhasználat következményeként az antibiotikum rezisztencia világszerte az egyik legfontosabb közegészségügyi probléma, egy olyan jelenség, amely során a kórokozók (például baktériumok vagy vírusok) ellenállóvá válnak az antibiotikumokkal szemben. Ennek eredményeként az antibiotikumok, amelyek korábban hatékonyan kezelték ezeket a kórokozókat, már nem tudják őket elpusztítani vagy gátolni a növekedésüket.

Jelen kutatás célja a Gyimes-völgyében található Boros patak mentén különböző kutakból, illetve forrásokból származó vízminták alapján meghatározni a térség vizeinek mikrobiális terheltségét (pl. coliformok, *E. coli*, fekális *Enterococcus*, *Clostridium* fajok jelenléte). Továbbá célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az izolált és azonosított baktériumokat antibiotikumot tartalmazó közegben, ezáltal meghatározni az antibiotikum rezisztencia jelenlétét.

Kutatásunk során kapott eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az általunk feldolgozott minták közül a forrásvizek 100 %-a coliform baktériumokkal terhelte, továbbá a minták közül volt olyan, amely fekális *Enterococcus*okkal és *Clostridium*okkal is fertőzött volt. Az antimikrobiális terheltséget tekintve több antibiotikumra is vizsgáltuk a mintákat (tetraciklin, eritromicin, sztreptomycin, ampicillin és amoxicillin). Megfigyeltünk rezisztenciát tetraciklin, eritromicin, sztreptomycin és ampicillin esetében.

2. Elméleti bevezető

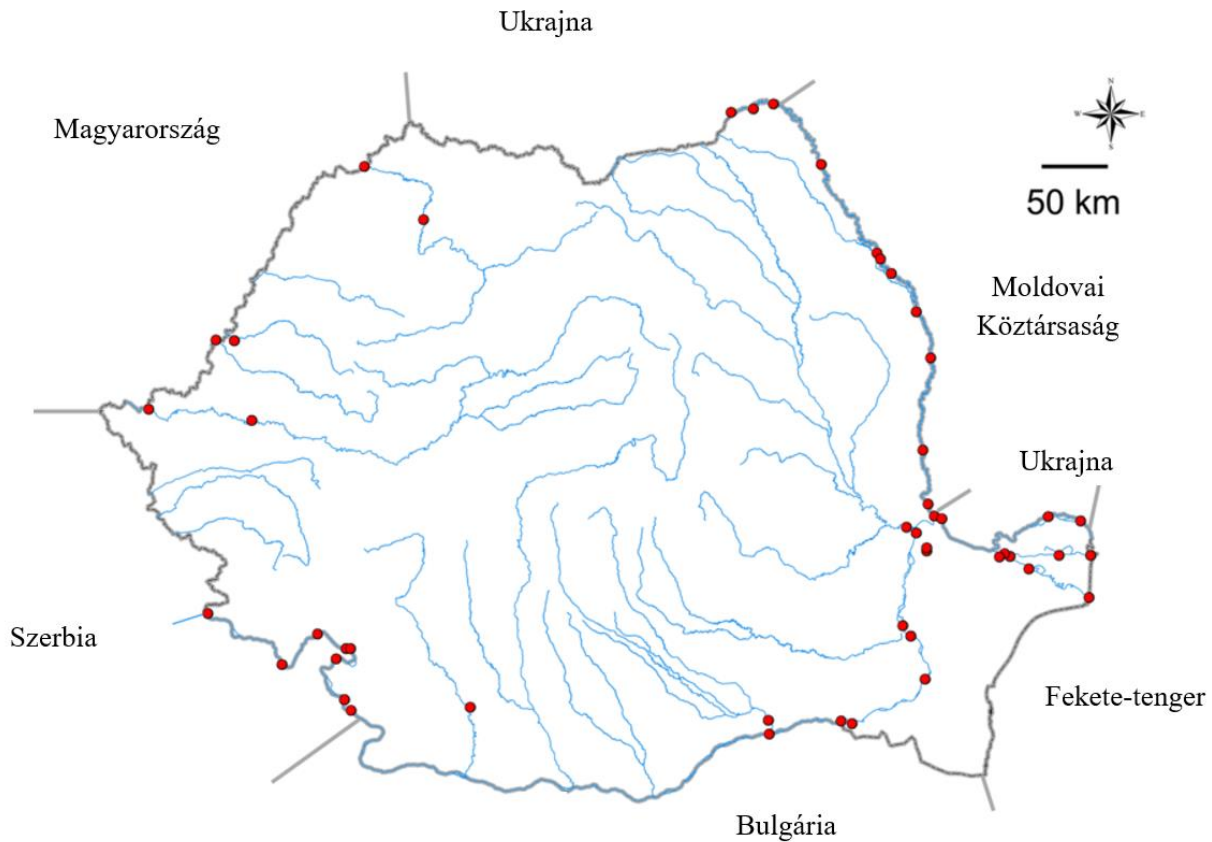
A víz az élési alapvető eleme, amely nélkülözhetetlen az élőlények számára az élet fenntartásához, az egészséghez és a növekedéshez. Fontos szerepet játszik az ökológiai egyensúlyban, hiszen az élőlények életében és környezetükben is alapvető jelentőségű. Emellett a víz fontos a gazdaság, az ipar és az energiatermelés szempontjából is. Románia vízkészlete gazdag, számos folyó, tó és víztározó található itt, a legjelentősebb a Duna folyó, amely Románián is keresztül folyik, és Európa egyik legnagyobb vízi útja. Ezenkívül Románia számos ásványvízforrással és földalatti vízforrással rendelkezik. A víz döntő szerepet játszik Románia gazdaságában, mezőgazdaságában és idegenforgalmában.

Nagyon fontos, hogy megőrizzük vizeink tisztaságát, ugyanis a tiszta és biztonságos ivóvíz létfontosságú mindenki számára. A vízi környezet bolygónk legjelentősebb mikrobiális élőhelyei közé tartozik. A vizekbe azonban bekerülhetnek különböző szennyező baktériumok is, amelyek az emberi szervezetbe jutva képesek enyhe vagy súlyos betegségeket okozni (a legismertebb fajok: *Escherichia coli* és a *Klebsiella pneumoniae*). Azokon a vidékeken, ahol jelentős az állattartás és nem megfelelő a szennyvíznek az elvezetése, gyakran bekerülnek akár potenciálisan patogén mikrobák is a talajba, talajvízbe, onnan pedig az ivóvízbe a műtrágyának, növényvédő szereknek és állati ürüléknek köszönhetően (Some és mtsai. 2021). Összességében elmondható, hogy a víz az élet egyik legfontosabb elemévé vált, és megfelelő kezelése és védelme elengedhetetlen a jövő generációk számára.

2.1. Románia vízrajza

Románia vízrajza változatos és gazdag. Az országban számos folyó, patak, tó és hegyi patak található (1. ábra). A legnagyobb folyó Romániában a Duna, amely a déli határon átfolyik. Más fontos folyók közé tartozik a Tisza, a Szamos, a Maros és az Olt. A folyók vízminőségének ellenőrzése rendkívül fontos, mivel ezeket a vízkészleteket általában többféle célra használják, mint például: ivóvízellátás, háztartási és lakossági vízellátás, mezőgazdaság (öntözés), vízerőművek, közlekedés és infrastruktúra, turizmus, rekreáció és egyéb emberi vagy gazdasági vízfelhasználási formák (Dunca 2018; Gurzau és mtsai. 2010).

Emellett Románia számos tava közismert, például a Fekete-tenger partján fekvő Constanta-tó és a Bucsin-tó a Kárpatokban. A hegyvidéki területeken gyakoriak a vízesések és források is. Összességében Románia vízrajza változatos és lenyűgöző.



1. ábra Románia vízrajza (Martyn 2019.)

2.2. Baktériumok sokszínűsége vízi környezetekben

A víz az egyik legfontosabb bakteriális élőhely a Földön. Mint ilyen, a víz a baktériumok különböző környezeti terek közötti elterjedésének egyik fő útját is jelenti. Az emberi tevékenységek az úgynevezett városi vízkörforgás kialakulásához vezettek, amely különböző szektorokat (hulladék-, felszíni-, ivóvíz) foglal magában, amelyek között a baktériumok feltételezhetően cserélődhetnek. Ezért a baktériumok mobilizálódhatnak a nem tiszta vízi élőhelyek (pl. szennyvíz) és a tiszta vagy érintetlen vízi környezetek (pl. fertőtlenített és forrásból származó ivóvíz) között, és végül eljuthatnak az emberhez. Ezenkívül a baktériumok

mobil genetikai elemeket is átadhatnak a különböző víztípusok, más környezetek (pl. talaj) és az ember között. Ezek a folyamatok antibiotikum-rezisztens baktériumokat és antibiotikum-rezisztenciagéneket is magukban foglalhatnak (Tamames és mtsai. 2010).

Az édesvízi élőhelyek a leggazdagabb baktériumdiverzitással rendelkező természetes élőhelyek közé tartoznak (Tamames és mtsai. 2010). A természetes és mesterséges élőhelyek baktériumközösségeit összehasonlítva a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a talaj és az édesvíz, amelyet a víztartó rétegek (talajvíz, tavak, folyók, ivóvíz és szennyvíz) kötnek össze azok a természetes élőhelyek, amelyek a baktériumcsaládok legnagyobb számú és legváltozatosabb csoportjának adnak otthont.

Különböző víztípusok azonban a baktériumok diverzitásának eltérő mintázatát mutatják. Egyes víztípusok esetében látszólagos specifikitást figyeltek meg. Például a *Betaproteobacteria* osztály és a *Bacteroidetes* törzs tagjait gyakran mutatták ki a felszíni, ásványi és ivóvízben, de kevésbé gyakran a szennyvízben. A *Firmicutes*-t viszont gyakran jelentették a szennyvízben. Az kommenzalista baktériumok olyan kevésbé specializálódott baktériumok, amelyek különböző környezetekben is elő fordulhatnak, többek között a városi vízkörforgásban vagy a levegő-víz-talaj határfelületen (Tamames és mtsai. 2010). Az ezekbe a csoportokba tartozó baktériumok és más, még nem azonosított baktériumok valószínűleg képesek a különböző vízi élőhelyek között cirkulálni, átfogva a teljes városi vízkörforgást. A nagy áteresztőképességű szekvenálási módszerek új perspektívát hoztak a vízi élőhelyek baktériumdiverzitásának kutatása terén, ahol a baktériumok < 0,1%-a tenyésztethető. Ez azon baktériumtörzs/osztály esetében hozhat előrelépést, amelyek a látszólagos gyenge tenyésztethetőség ellenére gyakori vízlakók. Mindazonáltal a tenyésztéstől független módszerek (még a nagy áteresztőképességű szekvenálás is) egyes baktériumcsoportok, különösen a kevésbé gyakori szervezetek kimutatásában kudarcot vallhatnak. Különböző torzítások (pl. DNS-kinyerés, PCR vagy szekvenciaadatok elemzése) akadályozhatják egyes közösségek tagjainak kimutatását. Még a 16S rRNS-gén szekvenciaelemzése (különösen az olyan kis génfragmentumoké, mint amilyenek a nagy áteresztőképességű szekvenálási módszerekkel keletkeznek) sem biztos, hogy lehetővé teszi a baktériumok megbízható, akár faji szintű azonosítását. E baktériumok alacsony gyakoriságát a vízi élőhelyeken, még a fekáliával szennyezettekben is, a tenyésztési eljárások is sugallják. Az *Escherichia* vagy *Enterococcus* tenyésztéséhez általában szelektív táptalajok használata szükséges. Bár a két azonosítási módszer kiegészíti egymást, egy

ökoszisztéma baktériumdiverzitásának feltárásában, a tudomány jelenlegi állása azt sugallja, hogy a tenyésztéstől függő illetve attól független módszerek szinkronizálása gyenge. Ez komoly korlátot jelent a baktériumdiverzitás átfogó elemzésében, főként akkor, ha egy adott csoport olyan jellemzőinek értékeléséről van szó, mint az anyagcsere, a fiziológia, a genetika, a virulencia és az antibiotikum-rezisztencia. Várhatóan a tenyésztéstől független módszerek bevezetésének egyik legfontosabb eredménye a tenyésztési módszerek fejlesztése és a tiszta kultúrákon alapuló vizsgálatok megerősítése lesz. Ezek az előrelépések nélkülözhetetlenek lesznek a különböző mikrobiomok közötti lehetséges kapcsolódási pontok alapos értékeléséhez, például a környezet és ember (Tamames és mtsai. 2010) mikrobiótája között.

2.3. Antibiotikum rezisztencia a környezetben

A természetes környezetet az antimikrobiális rezisztencia (AMR) terjedésének és elterjedésének egyik fontos pontjaként azonosították. A víz a Föld egyik legfontosabb bakteriális élőhelye. A vízi környezetet érinti az antibiotikumoknak ellenálló baktériumok számának növekedése. Az emberi tevékenységek az úgynevezett városi vízkörforgás kialakulásához vezettek, amely különböző szektorokat (hulladék, felszíni-, ivóvíz) eredményeztek, amelyek között a baktériumok cserélődhetnek. Ezért a baktériumok mobilizálódhatnak a szennyezett vízi élőhelyek (pl. szennyvíz) és a tiszta vagy érintetlen vízi környezet (pl. fertőtlenített és forrásból származó ivóvíz) között, és végül eljuthatnak az emberhez (Alawi és mtsai. 2022). Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó, antibiotikumokkal szemben rezisztens Gram-negatív baktériumok előfordulását gyakran jelzik az ivóvízben és a természetes vízrendszerekben. Az antibiotikum- rezisztens gének (ARG-k) közül elsősorban a β -laktám antibiotikumokkal, aminoglikozidokkal, fluorokinolonokkal, makrolidokkal és tetraciklinnel szembeni rezisztenciát okozó baktériumokat figyelték meg. Bizonyított az antropogén tevékenység nagymértékű hatása a környezetben (Abera és mtsai. 2016; de Boeck és mtsai. 2012; Tanner és mtsai. 2019; Vaz-Moreira és mtsai. 2014). A világ városi területeiről főként a klinikai gyakorlatban leginkább használt antibiotikumokkal szemben rezisztenciát mutató antibiotikum-rezisztenciagénekről számoltak be, amely problémát jelent az emberi és állati egészség szempontjából.

Ezenkívül a baktériumok mobil genetikai elemeket is átadhatnak a víz közvetítésével a környezetnek (pl. talaj) és ezáltal az embereknek is. Ezek a folyamatok antibiotikum-rezisztens baktériumokat és antibiotikum-rezisztenciagéneket is magukban foglalhatnak (Alawi és mtsai. 2022).

Az antibiotikum-rezisztencia globális egészségügyi kihívás, amely magában foglalja a baktériumok és a gének átvitelét az emberek, az állatok és a környezet között. Bár számos akadály korlátozza mind a baktériumok, mind a gének áramlását, a kórokozók rendszeresen új rezisztenciafaktorokat szereznek más fajoktól, ezáltal csökkentve a bakteriális fertőzések megelőzését és kezelését. Az evolúciós események, amelyek a kórokozókban új rezisztenciafaktorok megjelenéséhez vezetnek, ritkák és nehéz megjósolni őket, de hatalmas következményekkel járhatnak (Larsson és Flach 2022).

Az antibiotikumok növekvő használata napjainkban világszerte az egyik legnagyobb környezeti és egészségügyi problémává vált (Vaz-Moreira és mtsai. 2014). Az antibiotikumok és antibiotikum-rezisztens baktériumok (ARB) nyomokban való jelenléte a forrásvízben és az ivóvízben újonnan felmerülő minőségi és egészségügyi probléma. Széles körben elfogadott, hogy az antibiotikum-rezisztencia az antibiotikumok és antimikrobiális szerek túlzott használatából ered. Ezen antibiotikumok terápiás szint alatti mennyiségei a tisztított szennyvíz részeként vagy az állattenyésztő létesítményekből a folyókba, tavakba és vizes élőhelyekre kerülhetnek. A szerves és szervetlen szennyező anyagok szelektálhatnak az antimikrobiális szereknek ellenálló mikroorganizmusok (AMRM) között. Azt azonban, hogy a vízforrások milyen mértékben szolgálnak az AMRM-ek és az antimikrobiális szerekkel szemben rezisztens gének (AMRG) rezervoárjaként, viszonylag bizonytalan. Egy másik szempont, amely egyre nagyobb figyelmet kap, az antimikrobiális anyagok és AMRM-ek ivóvíztermelésre gyakorolt lehetséges hatásai. Ez hozzájárul az antibiotikum-rezisztencia gyors növekedéséhez, amely a bakteriális fertőzések kezelésének sikertelenségéhez vezethet a klinikai és állatorvosi környezetben. Ezt újkeletű globális egészségügyi problémaként azonosították (Bezuidenhout és mtsai. 2019).

A baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája a közegészségügyet érintő fő aggodalomforrássá vált. Az *Enterobacteriaceae* a leggyakoribb emberi kórokozók közé tartozik, és mind a közösségben, mind a kórházban szerzett fertőzéseket okozhat. A karbapenem-rezisztens *Enterobacteriaceae* család tagjait több mint 20 évvel ezelőtti első

azonosításuk óta egyre gyakrabban jelentik világszerte. A karbapenemázok három fő osztályát azonosították: Ambler A osztályú béta-laktamáz (KPC), B osztályú (metallo-enzimek) és D osztályú (OXA-48 típusú) (Cherak és mtsai. 2021). Az *Enterobacteriaceae* (bélbaktériumok) családjának kiterjesztett spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelő tagjai komoly globális problémát jelentenek. Az elmúlt években az ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok a kórházból a közösségbe és a környezetbe kerültek (Cherak és mtsai. 2021; Tanner és mtsai. 2019). Az ESBL-termelő *Enterobacteriaceae*-k az antibiotikum-használat, a betegek jellege és a kórházi körülmények közötti különbségek alapján változnak (Abera és mtsai. 2016).

A *Klebsiella pneumoniae* karbapenemázokat (KPC) először az 1990-es évek végén jelentették az Egyesült Államokban, azóta pedig világszerte (Cherak és mtsai. 2021).

Az antibiotikumok mellett, hogy toxikus hatást gyakorolnak a nem célzott szervezetre, jelenlétük a környezetben elősegíti a rezisztenciagének horizontális átvitelét, így növelve a rezisztens baktériumok jelenlétét a környezetben, és következésképpen a szuperrezisztens bakteriális fertőzések kockázatát (Vaz-Moreira és mtsai. 2014).

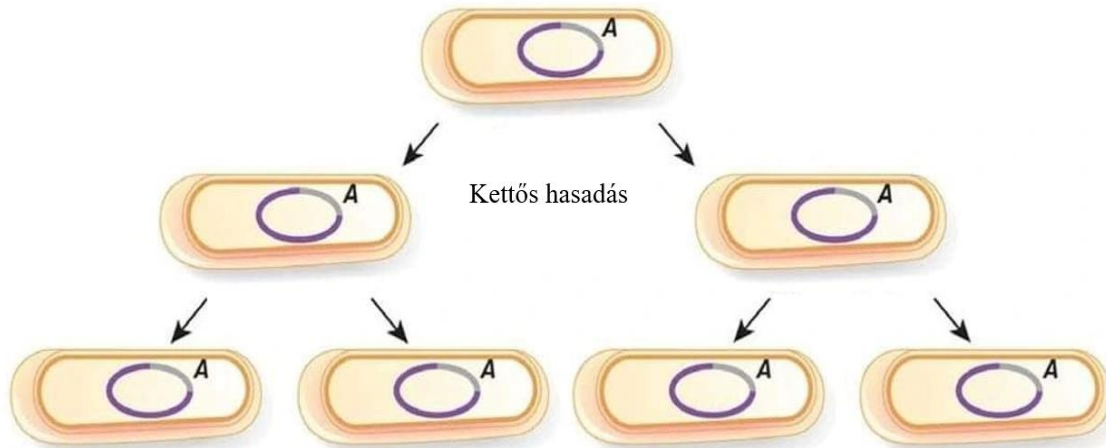
A plazmidok központi szerepet játszanak az antimikrobiális rezisztenciagének (ARG) környezetben való perzisztenciájában és gyors terjedésében. A természetes környezetből származó és az antropogén tevékenységek által szennyezett ivóvíz antimikrobiális rezisztens baktériumokat és ARG-ket tartalmazhat (Alawi és mtsai. 2022).

2.4. Rezisztencia gén átadása

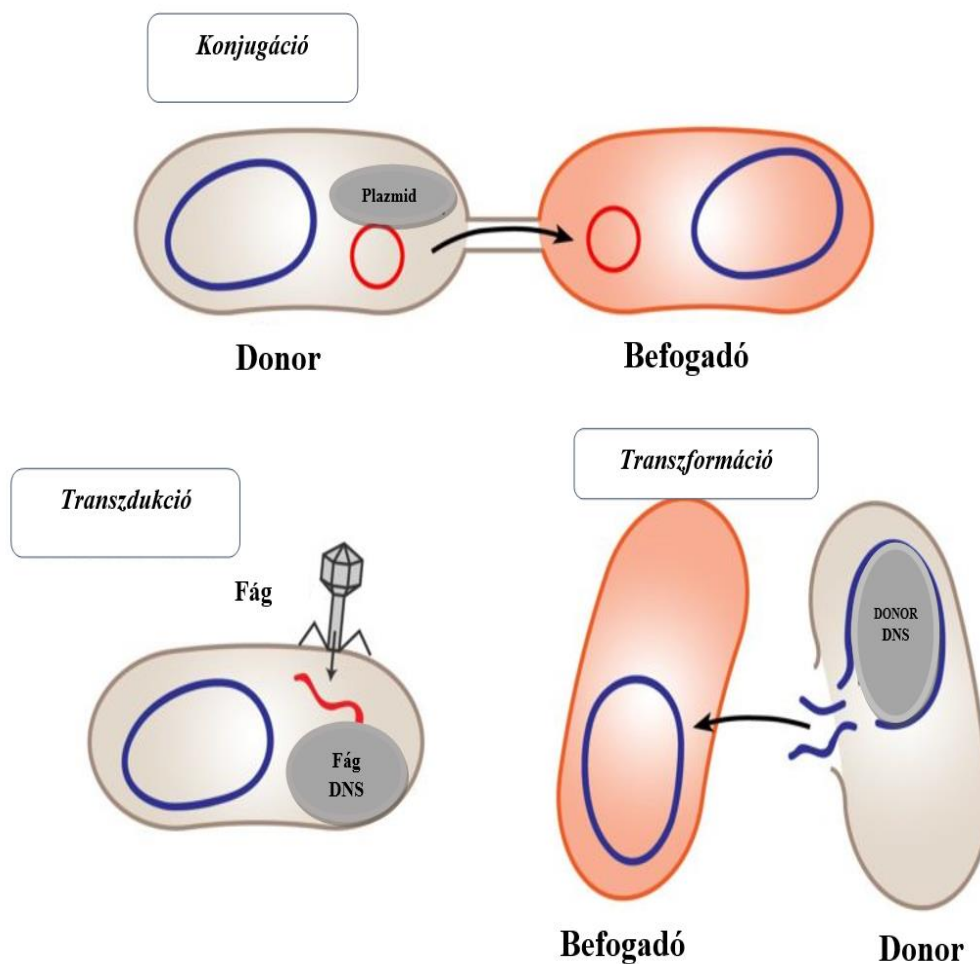
Az antibiotikum-szennyezés nemcsak a rezisztens baktériumok jelenléte miatt fontos, hanem a rezisztenciagének terjedése miatt is. Ezek a gének a szelekciós nyomás megszűnése után is fennmaradhatnak a környezetben vagy a baktériumpopulációban, ezért környezetszennyező anyagoknak tekinthetők. Az antibiotikum-rezisztencia gének (ARG) a szelekciós nyomás miatt könnyen átvihetők az azonos vagy különböző fajú baktériumok között. Genetikailag átvihető elemekben találhatók, más antibiotikum-rezisztencia génekkel vagy más szennyező anyagokkal szembeni rezisztenciát biztosító génekkel együtt (Amato és mtsai. 2021).

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) megszerezhető genetikai mutációkon keresztül, amelyek a vertikális géntranszferként (2. ábra) ismert folyamat során továbbadhatnak a

következő generációknak is. Egy másik lehetőség arra, hogy a mikroorganizmusok átadják egymásnak a rezisztencia géneket a horizontális géntranszfer (HGT - 3. ábra) mechanizmusai révén történő; *transzformáció* (azaz a DNS felvétele a környezetből a kompetens sejtek által); *transzdukción* (azaz genetikai átvitel vírusvektoron keresztül) és *konjugáción* (azaz a DNS átvitele közvetlen sejt-sejt érintkezés útján). Bár számos AMR-vizsgálat fő fókuszában a klinikai kórokozókban előforduló AMR állt, nyilvánvaló, hogy az AMR a természetes környezetben is létezik. A vízi környezetet az antimikrobiális rezisztens baktériumok (ARB) és az antimikrobiális rezisztenciagének (ARG) szaporodásának és elterjedésének fontos helyszíne. Az ARG-k ezen környezetben való fennmaradásának egyik fő módja a rezisztenciaplazmidok HGT-je. A biofilmek kialakulása révén az ivóvíz elosztócsövek ideális környezetet biztosítanak a konjugatív HGT kialakulásához, mivel a baktériumközösségek közel vannak egymáshoz. Ezt elősegítik az antropogén tevékenységek, valamint a vízkezelési hibák, amelyek nem-kommunális fekáliás szennyeződések juttatnak az ivóvízbe (Alawi és mtsai. 2022).



2. ábra Vertikális génátadás baktériumoknál.



3. ábra. Horizontális génátadás típusai mikrobáknál

2.5. Antibiotikum rezisztencia vizsgálata

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatának célja az ivóvizekben az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásának és terjedésének monitorizálása, valamint az emberi egészség védelme. Az antibiotikum rezisztencia egy olyan jelenség, amikor a baktériumok ellenállóká válnak az antibiotikumokkal szemben, ami megnehezíti vagy lehetetlenné teszi az antibiotikumokkal történő kezelést (Amato és mtsai. 2021; Vaz-Moreira és mtsai. 2014).

Az ivóvizekben mért antibiotikum rezisztencia mutatója lehet a vízforrásokban vagy a víztisztítási folyamatok során jelen lévő antibiotikumoknak, azok maradványainak, valamint a környezetben előforduló antibiotikum rezisztens baktériumoknak. Az ivóvizekben fellelhető antibiotikum rezisztens baktériumok potenciális veszélyt jelenthetnek az emberi egészségre,

mivel az ivóvíz által továbbadódhatnak, vagy közvetlenül fertőzést okozhatnak (Amato és mtsai. 2021; Bezuidenhout és mtsai. 2019; Vaz-Moreira és mtsai. 2014).

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálata az ivóvizekben fontos a közegészségügyi fenyegetések felismerésében és megelőzésében. A kutatások szerint az ivóvizekben található antibiotikum rezisztens baktériumok és az antibiotikumok maradványainak jelentősége lehet az antibiotikum rezisztencia problémájának terjedésében és a közegészségügyi kockázatokban (Amato és mtsai. 2021; Bezuidenhout és mtsai. 2019).

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálata során többféle antibiotikumot is vizsgáltunk, köztük a tetraciklint, eritromicint, sztreptomicint, ampicillint és augmentint (amoxicillint). Az ampicillin és amoxicillin a béta-laktám antibiotikumok csoportjába tartozik, molekulájukban béta-laktám gyűrűt tartalmaznak. A béta-laktám antibiotikumok a baktériumsejtek falán található peptidoglikán szintézisét gátolják, ami a baktériumok növekedéséhez és szaporodásához szükséges. A sztreptomicin aminoglikozid típusú antibiotikum, olyan vegyületcsoport, amelyek a baktériumsejt fehérjékhez kötődnek, és gátolják a fehérjesszintézist. A tetraciklin a tetraciklin antibiotikumok csoportjába tartozik. A tetraciklin típusú antibiotikumok közé tartozik a tetraciklin antibiotikum, amelynek hatásmechanizmusa a bakteriális fehérjesszintézis gátlásán alapul. Az eritromicin egy makrolid típusú antibiotikum. A makrolidok a baktériumok fehérjesszintézisét gátolják, így megakadályozzák a baktériumok növekedését és szaporodását. Ezeket a különböző típusú antibiotikumokra azért esett a választásunk, mert rendkívül fontosak az orvosi és mezőgazdasági gyakorlatban, széles körben alkalmazzák a baktériumok elleni küzdelemben (Amato és mtsai. 2021; Bezuidenhout és mtsai. 2019; Sánchez-Baena, Caicedo-Bejarano, és Chávez-Vivas 2021; Vaz-Moreira és mtsai. 2014)

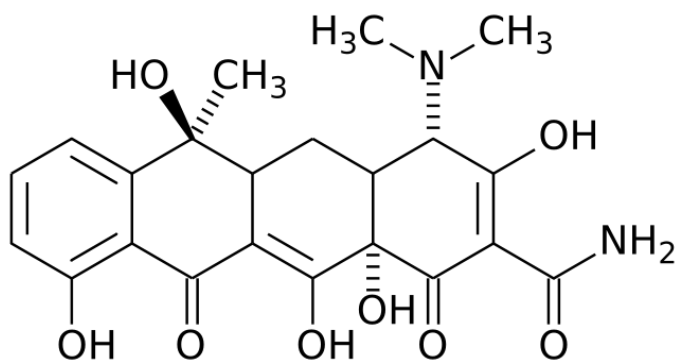
2.5.1. Tetraciklin

A tetraciklin típusú antibiotikumok hatásmechanizmusa a bakteriális fehérjesszintézis gátlásán alapul. Ennek a folyamatnak az elnyomása blokkolja a baktériumok számára szükséges egyes fehérjék létrehozását, amely a baktériumok növekedését és szaporodását akadályozza (Chopra és Roberts 2001). A tetraciklin molekula szerkezete a 4. ábrán látható.

A tetraciklinek a bakteriális riboszómák 30S régiójához kötődnek, és gátolják a tRNS molekuláknak (transzfer-RNS) a riboszómákhoz való kapcsolódását. Ez a mechanizmus

megakadályozza a riboszómákban a peptidkötés kialakulását, amely az új fehérjék szintézisének leállításához vezet (Connell és mtsai. 2003).

Azáltal, hogy megzavarják a bakteriális fehérjeszintézist, a tetraciklin antibiotikumok hatékonyan képesek elpusztítani a kórokozókat és kezelni a bakteriális fertőzéseket. Fontos azonban megjegyezni, hogy a tetraciklinek hatása szelektív, kizárólag a bakteriális fehérjeszintézisre korlátozódik, és nem károsítja az emberi sejteket, ami az antibiotikumok relatív biztonságát biztosítja a betegek számára (Connell és mtsai. 2003).

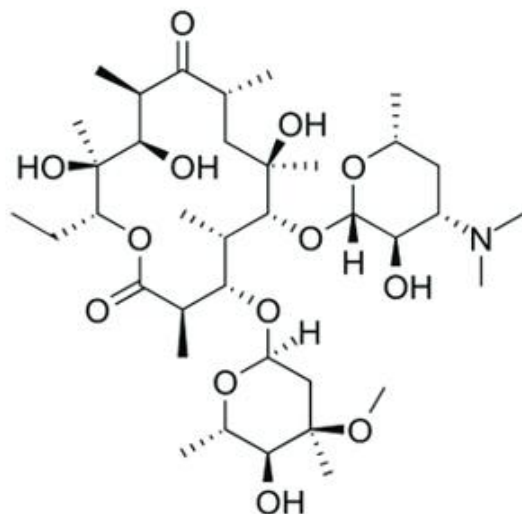


4. ábra A tetraciklin szerkezete (De Cazes és mtsai. 2014)

2.5.2. Eritromicin

Az eritromicin hatásmechanizmusa a bakteriális fehérjeszintézis gátlásán alapul. Ez azt jelenti, hogy az eritromicin megakadályozza a baktériumokban új fehérjék szintézisét, ami a baktériumok növekedésének és szaporodásának leállításához vezet. Az eritromicin molekula szerkezete a 5. ábrán látható.

Az eritromicin egy makrolid típusú antibiotikum, ami a 70S riboszómák 50S alkotórészéhez kötődik, és gátolja a peptidkötés kialakulását a riboszómán. Ez a mechanizmus blokkolja a riboszómákban az aminosavak szekvenciális összekapcsolását, ami szükséges az új fehérjék szintéziséhez. Ennek eredményeként a bakteriális sejtek nem képesek létrehozni a szükséges fehérjéket, és elpusztulnak (Retsema és Fu 2001).

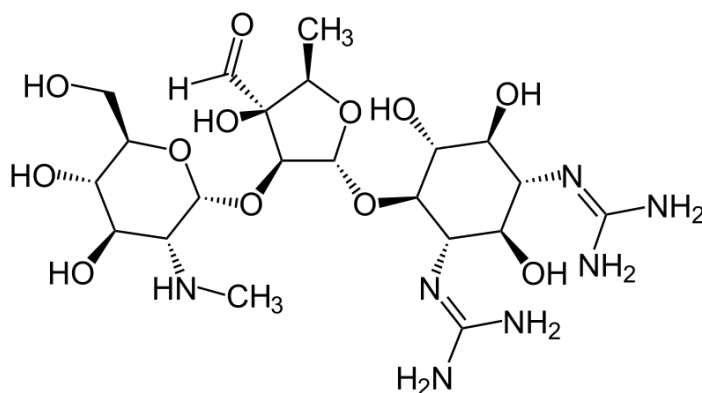


5. ábra Az eritromicin szerkezete (Tita és mtsai. 2013)

2.5.3. Sztreptomicin

A sztreptomicin aminoglikozid típusú antibiotikum, és hatásmechanizmusa a bakteriális fehérjeszintézis gátlásán alapul. A sztreptomicin molekula szerkezetét a 6. ábra mutatja.

A sztreptomicin aminoglikozid típusú antibiotikum, amely a bakteriális fehérjeszintézist gátolja. A sztreptomicin a 30S riboszómákhoz kötődik, és megakadályozza a riboszómák helyes működését. Ennek eredményeként a baktériumok nem képesek megfelelően szintetizálni az új fehérjéket, amely a bakteriális növekedés és szaporodás leállításához vezet (Bryan, Kowés, és Van den Elzen 1979).

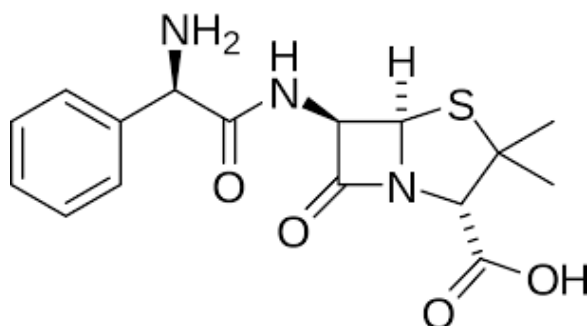


6. ábra A sztreptomicin szerkezete (Kwiatkowska és mtsai. 2013)

2.5.4. Ampicillin

Az ampicillin a baktériumok sejtfalának szintézisét gátolja, ami végül a baktériumok pusztulásához vezet.

Az ampicillin a béta-laktám antibiotikumok csoportjába tartozik, amelyek a penicillin családhoz tartoznak. A béta-laktám antibiotikumok azért kapták ezt a nevet, mert molekulájukban van egy béta-laktám gyűrű, amely az antibiotikum hatásmechanizmusának alapját képezi. Az ampicillin és más béta-laktám antibiotikumok hatékonyak a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok ellen is. A béta-laktám antibiotikumok gátolják a peptidoglikán szintézisét, amely a bakteriális sejtfal fontos összetevője. Ennek eredményeként a bakteriális sejtek sejtfalának integritása megsérül, és a sejtek szétesnek vagy elhalnak (Guliy és mtsai. 2005). Az ampicillin molekula szerkezete a 7. ábrán látható.



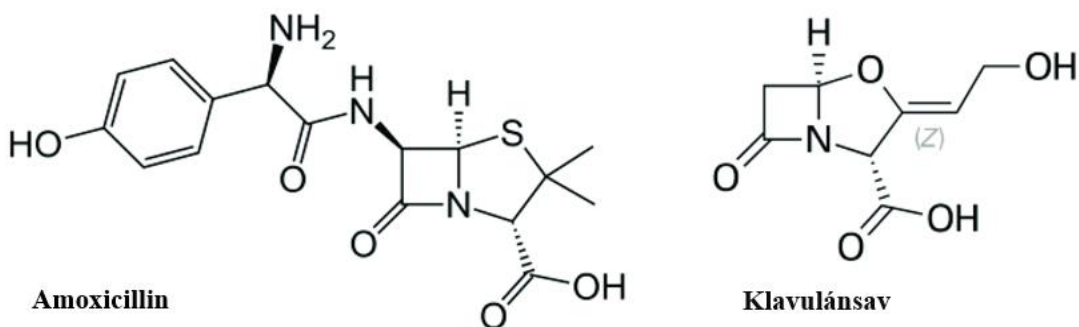
7. ábra Az ampicillin szerkezete (Qarah és mtsai. 2020)

2.5.5. Augmentin

Az Augmentin egy kombinált antibiotikum, amely amoxicillinből és klavulánsavból áll. Az amoxicillin egy béta-laktám antibiotikum, amely a penicillin csoportba tartozik (széles spektrumú antibiotikum, amelyet különféle Gram-pozitív és Gram-negatív fertőzések kezelésére használnak), míg a klavulánsav egy béta-laktamáz inhibitor, amely megakadályozza bizonyos baktériumok béta-laktamáz enzimeinek működését. A klavulánsav segíti az amoxicillin hatékonyságának növelését, mivel a béta-laktamáz enzimek általában lebontják a béta-laktám antibiotikumokat, ezáltal rezisztenciát eredményeznek (Slay, Hatch, és Hewitt 2022; White és mtsai. 2004).

Az Augmentin hatásmechanizmusa tehát a következőképpen alakul: az amoxicillin gátolja a bakteriális sejtfal szintézisét, ami végül a baktériumok pusztulásához vezet, míg a

klavulánsav megakadályozza a béta-laktamáz enzimek által történő lebontását, így növelve az amoxicillin hatékonyságát (Slay és mtsai. 2022; White és mtsai. 2004). Az amoxicillin és klavulánsav molekulák szerkezete a 8. ábrán megfigyelhető.



8. ábra Az amoxicillin és klavulánsav szerkezete (Stocco és mtsai. 2020)

2.6. A vizek kémiai

Az ivóvíz minősége kritikus fontosságú az emberi egészség szempontjából, és számos tényező befolyásolja. Az ammónia és a nitrát olyan vegyületek, amelyek káros hatással lehetnek az ivóvíz minőségére, ha jelen vannak nagyobb koncentrációban. A túlzott mennyiségű ammónia vagy nitrit jelenléte az ivóvízben egészségügyi problémákat okozhat. A víz zavarossága is fontos tényező lehet az ivóvíz minőségének szempontjából. A zavarosság a vízben található részecskék jelenlétére utal, amelyek lehetnek szerves vagy szervetlen eredetűek.

A víz ammónia tartalmának meghatározása kritikus fontosságú a vízminőség és az emberi egészség megőrzése szempontjából. Az ammónia jelenléte a vízben potenciális egészségügyi veszélyt jelenthet az emberi szervezetre. Nagy mennyiségben irritálhatja a bőrt, a szemet és a légzőrendszert, valamint reakcióba léphet más vízben található szennyező anyagokkal, tovább növelve az egészségkárosodás kockázatát. E mellett az ammónia túlzott jelenléte negatív hatást gyakorolhat a környezetre és az ökoszisztémára is. Magas koncentrációban toxikus lehet a vízi élőlényekre, például a halakra és más vízi organizmusokra, veszélyeztetve ezzel az élőhelyek biodiverzitását.

A nitrát-tartalom fontossága a vízminőséget tekintve kiemelt figyelmet érdemel több szempontból is. Először is, a nitrátok jelenléte a vízben egészségügyi kockázatot jelenthet az emberek számára. A nitrátok nitritekké alakulhatnak át, ami a csecsemőknél és gyermekeknél methemoglobinémia kialakulásához vezethet, mely súlyos egészségügyi állapotot eredményezhet. Emellett a nitrátok túlzott jelenléte a vízben környezeti problémákat is okozhat. A mezőgazdasági műtrágyák és a szennyvíz nitrát formájában történő bejutása a vízbe károsíthatja a környezetet, például a vízi élőlényekre és a talajra gyakorolt hatásokon keresztül.

A víz pH-értékének fontossága nem hagyható figyelmen kívül több szempontból. Először is, a pH meghatározza a víz savasságát vagy lúgosságát, amely közvetlen hatással van az emberi egészségre. Túl alacsony vagy túl magas pH-jú víz fogyasztása irritálhatja a szájüreget, a gyomrot és az emésztőrendszert, komoly egészségügyi problémákat okozva. Emellett a víz pH-ja befolyásolhatja a környezetet és az ökoszisztémát. Túl alacsony vagy túl magas pH-szintű víz károsíthatja a vízi élőlényeket, például a halakat és más organizmusokat, ezáltal veszélyeztetve az ökoszisztéma egyensúlyát. A víz pH-jának megfelelő szinten tartása elengedhetetlen a vízkezelési folyamatok hatékonyságához is. Például a víztisztítás és más vízkezelési eljárások hatékonysága jelentősen függ a víz pH-jától. Az optimális pH-szint biztosítása lehetővé teszi, hogy a vízkezelő létesítmények hatékonyan működjenek, és biztonságos ivóvizet állítsanak elő.

3. Célkitűzés

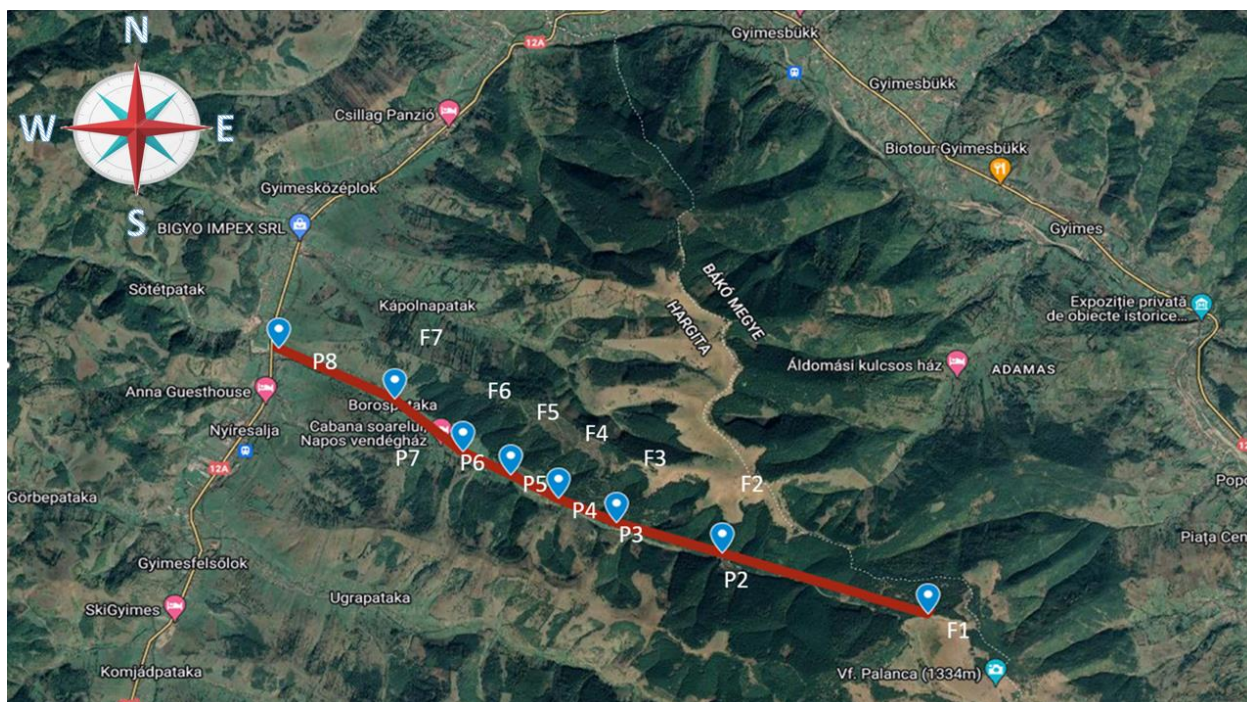
Jelen kutatás célja a Gyimes-völgyében található Boros patak vizéből, illetve a patak mentén forrásokból származó minták alapján meghatározni a térség vizeiben a szennyező mikrobiális terheltséget (pl. coliform, fekális *Enterococcus* sp., *Clostridium* sp. jelenléte). Továbbá célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk ezen minták esetében antibiotikumot tartalmazó közegben az antibiotikum rezisztens törzsek jelenlétét. Ezen célkitűzések fontosságát növeli, hogy a jelzett térségben az embereknek nem áll rendelkezésére tisztított, vezetékes víz, így családok általában fűrt kutakból vagy csorgóról hordják az ivóvizet. Néhány helyen vezetékes víz csak úgy van, ha nagy tartályokba felfogják a vizet és onnan kisebb hálózaton keresztül néhány család közösen használja (tisztítva azok a hálózatok sincsenek). A jelentős állattartás során a gazdák gyakran kezelik antibiotikummal az állataikat, amely a nem megfelelő használat következtében bekerülhet a talajba, vizekbe és rezisztencia alakulhat ki, amely az emberekre és állatokra is veszélyes lehet.

4. A kutatás módszertana

4.1. Vizsgálati pontok és mintavétel

Jelen kutatáshoz gyűjtött minták a Gyimesközéplokon található Boros-patakból, illetve a patak menti forrásokból származtak.

A megfelelő helyszínek kijelölése után a minták begyűjtése következett. A vízmintákat a higiéniai előírásoknak megfelelően gyűjtöttük be, figyelve arra, hogy ne fertőzzük be a vizet a mintavétel közben. Steril edényekben, hűtött környezetben szállítottuk a mintákat a feldolgozási helyszínre és 24 órán belül feldolgoztuk. A vizsgálati pontok pontos helyszínét az alábbi 9. ábra szemlélteti.



9. ábra A mintavételi pontok helyszínei

4.2. Helyszíni fizikai-kémiai mérések

A mintavételezés helyszínén elvégeztük egyes fizikai-kémiai paraméterek mérését: a hőmérséklet, pH, elektromos vezetőképesség és a víz zavarosságának a vizsgálatát. A hőmérsékletet, a pH-t és a vezetőképességet Hach HQ40D típusú multiparaméter mérőműszer segítségével mértük le, míg a zavarosságmérés Hanna HI93703 típusú zavarosságmérő fotométerrel történt.

A víz elektromos vezetőképessége az ásványi anyagok és ionok jelenlétének egyik fontos mutatója a vízben, a vízben oldott sótartalmat jellemzi. A víz vezetőképessége sokat árul el számunkra a vízminőségről, a szennyeződések jelenlétéről/hiányáról és az ökoszisztémák állapotáról. Ezért fontos monitorizálni és értelmezni ezt a mutatót a vízvédelem és az emberi egészség megőrzése érdekében.

A víz zavarossága közvetlenül kapcsolódik a víz átláthatóságához és tisztaságához. A magas zavarosság jelezheti a szennyeződések, például részecskéket vagy szuszpenziókat a vízben, amelyek befolyásolhatják az ivóvíz minőségét és biztonságát. A zavarosságmérés eredménye FTU-ban van megadva (FTU - Formazin Turbidity Unit). A 458/2002-es ivóvizekre vonatkozó törvény szerint egy ivóvíz zavarossága kisebb vagy egyenlő lehet mint 5.

4.3. Laborkémiai mérések

A vízmintákban található ammónia és nitrát koncentrációját DR6000 UV-VIS spektrofotométer segítségével határoztuk meg 425 nm, illetve 500 nm hullámhosszon. A vízminták ammónia tartalmát Nessler módszerrel mértük, míg a nitrát-tartalmat Hach NitraVer5 típusú kit segítségével határoztuk meg, a gyártó előírásainak megfelelően.

A vízminták előkészítése az ammónia-tartalom meghatározásához a következő protokoll szerint zajlott: 50 mL-es centrifugatubusokba 25 mL vízmintát töltöttünk, majd ehhez először 3 csepp ásványi stabilizáló oldatot adtunk, és alaposan összeráztuk az elegyet. Ezt követően további 3 csepp polivinil-alkoholt adtunk hozzá, majd újra alaposan összeráztuk. Végül 1 mL Nessler-reagenseket adtunk hozzá, és elegyítettük.

A vízminták előkészítése nitrát méréséhez a következő protokoll szerint zajlott: 50 ml-es centrifugatubusokba 10 ml vízmintát töltöttünk, amelyhez hozzáadtuk a NitraVer 5 reagenst. A reakcióidő 1 perc volt, amely alatt az elegyet végig kellett rázni. A reakcióidő letelte után 5 percet hagytunk állni, majd lemértük a koncentrációt. Kontrollként minden esetben saját, reagens nélküli vízmintát használtunk.

4.4. Vízminőségi, higiéniai vizsgálatok

A higiéniai-bakteriológiai vizsgálatok első lépéseként meghatároztuk az aerób mezofil baktériumok összcsíraszámát, ahol szélesztéses módszert alkalmaztunk. A Nutrient táptalaj előkészítése során 450 mL desztillált vízhez 0,45 g élesztő kivonatot és 9 g Nutrient tápagart adtunk. A táptalaj sterilizése ebben az esetben is autokláv segítségével történt, 121 °C-on 15 percig, majd steril Petri-csészékbe, steril körülmények között kiöntöttük a táptalajokat. Minden táptalajra 100 µL vízmintát pipettáztunk, majd alkoholba mártott és lelángolt szélesztőbot segítségével szélesztettük. A Nutrient tápagaron leoltott lemezeket 22 °C-on, illetve 37 °C-on inkubáltuk. A 22 °C-on kinőtt telepek leggyakrabban a vízminták autochton baktériumközösségét képviselték, míg a 37 °C-on kimutatott baktériumok emberektől vagy meleg vérű állatoktól származhattak.

A forrásvizekből gyűjtött mintákat három különböző specifikus táptalaj segítségével vizsgáltuk. Használtunk fekális *Enterococcus*, *coliform* és *Clostridium*-okra specifikus táptalajokat. A *coliform* illetve *Escherichia coli* baktériumok specifikus táptalajának elkészítéséhez 150 mL desztillált vízben 4,125 g HiCrome Agart oldottunk fel. A táptalaj sterilizése autokláv segítségével történt, 121 °C-on 15 percig, majd kitöltöttük azokat az előre előkészített, szárítószekrényben 160 °C-on 2 órán át sterilizett Petri-csészékbe, steril fülke alatt.

Az *Enterococcus*ok specifikus táptalajának elkészítéséhez 150 mL desztillált vízben 6,525 g Slanetz-Bartley tápagart oldottunk fel. A táptalaj sterilizése autokláv segítségével történt, 105 °C-on 15 percig. A táptalaj sterilizése után steril fülke alatt az előre előkészített steril Petri-csészékbe töltöttük. A *Clostridium*ok specifikus tápleveséhez 200 mL desztillált vízben 4,8 g Clostridial Differential Broth táplevest tettünk. A *Clostridium*ok specifikus autoklávozott táplevesét nem Petri-csészébe, hanem kémcsőbe töltöttük a sterilizés után, 8-8 mL-t minden kémcsőbe.

A táptalajok megszilárdulása után Merck típusú EZ-Stream™ Pump vákuum szűrő segítségével minden vízmintából, minden táptalajra/táplevesbe 100 mL vízmintát szűrtünk át Meck típusú 0,45 µm pórus átmérőjű mikroszálas steril szűrőpapír segítségével. A szűrőpapirokat a táptalajokra/ táplevesbe helyeztünk, majd betettük inkubálni 48 h-ra. A *coliform* és *Enterococcus* táptalajokat 37 °C-ra, a *Clostridium*okat 44 °C-ra.

4.5. Baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának vizsgálata

A baktériumok antibiotikumokkal szembeni vizsgálatának első lépésében Nutrient táplevesben dúsítottuk a vízmintákból származó baktériumokat, 9 mL tápoldathoz adtunk 1 mL vízmintát, majd inkubáltuk 37 °C-on 24 órát.

Az inkubálás után elkészítettük az antibiotikum oldatot, amely extrém magas koncentrációt 2048 µg/mL tartalmazott. Egy 96 férőhelyes mikrotitráló lemez segítségével elvégeztük az antibiotikum rezisztencia vizsgálatokat. Minden lyuk térfogata 200 µL, ezért 190 µL tápleveshez adtunk 10 µL előzőleg feldúsított kultúrát, majd inkubáltuk 37 °C-on 24 órát.

A pozitív lyukakból mintát vettünk és szelektív Condolab CCA (Kromogén Coliform Agar) táptalajra szélesztettük. A táptalaj elkészítése során 13,22 g médiumot oldottunk fel 500 mL vízben. A szélesztés után 37 °C-on 24 órán át inkubáltunk. Az 5. táblázat a kísérlethez használt 96 lyukú titráló lemezen a minták elhelyezkedését mutatja be. A forrásokból származó mintákat F-el, a patakból vett mintákat P-vel, míg a kontrollokat K-val jelöltük (F1-től F7-ig forrás minták, P1-től P8-ig patak minták). Az öt alkalmazott antibiotikum a tetraciklin (Tetr.), eritromicin (Erit.), sztreptomycin (Sztr.) ampicillin (Amp.) és augmentin (Aug) volt.

4.6. Baktériumok azonosítása MALDI-TOF-MS segítségével

A MALDI („mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria”) alkalmazásának előnye az érzékenység, mely lehetővé teszi kis anyagmennyiségű minta hatékony azonosítását, ezért a mintát szilárd táptalajról direkt módon a mintahordozóra vihetjük fel. Mivel a vizsgálat célja a riboszómális fehérjék mennyiségi meghatározása, ezért komplexebb sejtfalstruktúrájú mikroorganizmusok (például Gram pozitív baktériumok) esetében szükség lehet a sejtfal roncsolására a mintahordozón, 70%-os hangyasavval. Egyes esetekben azonban mintafelvitelt megelőzően mechanikai sejtfalroncsolásra és kémiai protein extrakciós lépésekre is szükség lehet a megfelelő tömegspektrum elérése érdekében (Van Belkum és mtsai. 2017; Vrioni és mtsai. 2018).

Mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizáció során a vizsgálandó minta mátrixhoz kötött állapotban kerül analizálásra, mely mátrix az ionizáció során elnyeli a lézer energiáját, majd továbbadja a felvett energiát a vizsgálandó molekulának, miközben vákuumba deszorbeálnak. Az így létrejövő komplexeket magas feszültség alkalmazásával felgyorsítják és az analizátorba juttatják, ahol repülési idő detektor segítségével történik az analízis. Az így érkező molekulákat egy reflektor a detektorhoz irányítja, növelve a repülési távolságot és fókuszálva a molekulákat. A molekulák detektorhoz érkezésének ideje egyenesen arányos a molekula méretével, ugyanis a kisebb molekulák gyorsabban teszik meg a detektorhoz vezető utat (Van Belkum és mtsai. 2017; Vrioni és mtsai. 2018).

Az ismeretlen mikroorganizmusokat tartalmazó táptalajról egyetlen telepet kiválasztottunk, felvittük a mintahordozóra, majd körkörös mozdulatokkal egyenletesen eloszlattuk a mintahordozó felületén. A mintafelvitellel párhuzamosan a mintapozíciókhoz hozzárendeltük az ismeretlen mikroorganizmust tartalmazó Petri-csésze azonosítóját. A felvitt mintákat pár percig száradni hagytuk, majd hozzáadtunk mindenik mintához 1 μ L hangyasavat. Pár percig száradni hagytuk, majd a mintákhoz 1 μ L HCCA mátrixot adtunk. A száradást követően a mintahordozót műszerbe helyezve elindítjuk a mérést, majd kiértékeljük az eredményt.

Az azonosítás során kapott eredményeket három kategóriába lehet sorolni (1. táblázat), zölddel jelöltük azokat a baktériumokat amelyeknek az azonosítása nagy megbízhatóságú volt, sárgával azokat amelyek eredménye kis megbízhatóságú volt és pirossal azokat, amelyeket nem tudott a műszer azonosítani.

1. táblázat – Az eredmények tartományát, szimbólumát, színét és értelmezését összesítő táblázat

Tartomány	Értelmezés	Szimbólum	Szín
2,00-3,00	Nagy megbízhatóságú azonosítás	(+++)	Zöld
1,70-1,99	Alacsony megbízhatóságú azonosítás	(+)	Sárga
0,00-1,69	Nincs azonosítható mikroorganizmus	(-)	Piros

5. Kutatási eredmények bemutatása és tárgyalása

A mérési eredmények egyszerűbb tárgyalása érdekében, az alábbi táblázatokban a mintáknak egyedi azonosítót adtunk. A forrásokból származó mintákat F-el (F_1 - F_7), míg a patakokból származó mintákat P-vel (P_1 - P_8) jelöltük. Az antibiotikumok neveinek rövidítései a következők: tetraciklin - Tetr, eritromicin – Erit, sztreptomycin – Sztr, ampicillin – Amp és augmentin – Aug.

5.1. Helyszíni fizikai mérések eredményei

A forrásokból származó vízminták hőmérsékletének, pH-jának, vezetőképességének, valamint zavarosságának mérési eredményeit a 2. táblázatban összesítettük.

Megfigyeltük, hogy a hőmérsékletet tekintve a legalacsonyabb értéke az F_2 vízének van, míg legmagasabb az F_5 . A pH minden forrásvíz esetében enyhén bázikus, a semleges pH-hoz a legközelebb az F_6 vize állt, amely pH értéke 7,93 volt. A legbázikusabb víz az F_4 vize, amelynél 8,76-os pH értéket mértünk. A vezetőképesség vizsgálatakor a legmagasabb értéket, 547,33 $\mu\text{S}/\text{cm}$ az F_6 esetében mértük, míg a legalacsonyabb az F_5 esetében volt, 315,67 $\mu\text{S}/\text{cm}$. A zavarosság esetében a 458/2002-es ivóvizekre vonatkozó törvény értelmében egy ivóvíz zavarossága kisebb vagy egyenlő kell legyen 5 FTU-val. A forrásminták esetében két mintánál tapasztaltunk a határértéken felüli eredményt, az F_5 , illetve az F_6 esetében. A többi paraméter (pH, elektromos vezetőképesség) nem haladta meg az előírt határértékeket.

2. táblázat A forrás vizeken elvégzett fizikai mérések eredményei (a 458/2002-es ivóvizekre vonatkozó határértékeket zárójelben adtuk meg)

Minták	Hőmérséklet (°C)	pH (Határérték: 6,5 - 9,5)	Vezetőképesség (µs/cm) (Határérték: max. 2500 µs/cm)	Zavarosság (FTU) (Határérték:0- 5)
F ₁	5,9	8,09	468,66	0,39
F ₂	3,0	8,32	333,33	2,32
F ₃	7,1	8,23	398,67	3,35
F ₄	4,9	8,76	478,67	1,26
F ₅	10,5	8,11	315,67	340,67
F ₆	5,2	7,93	547,33	6,65
F ₇	6,0	8,23	393,33	1,68

A 3. táblázatban összesítettük a patakból származó vízminták helyi, fizikai-kémiai méréseink eredményeit. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a patak hőmérséklete egy kiugró érték (P₆) kivételével folyamatos növekedést mutat. A pH értékek tekintetében, pedig a patak vonalán fentről lefele haladva folytonos növekedést figyeltünk meg.

3. táblázat A patakból vett minták fizikai-kémiai paramétereinek mérési eredményei

Minták	Hőmérséklet (°C)	pH
P ₁	-	7,55
P ₂	3,9	8,37
P ₃	4,7	8,45
P ₄	6,6	8,47
P ₅	7,3	8,53
P ₆	8,6	8,55
P ₇	7,5	8,63
P ₈	7,6	8,82

5.2. Vízkémiai mérések eredményei

A vízkémiai mérések eredményeit a 4. táblázat foglalja össze. Az ammónia mérése során 425 nm-es hullámhosszt alkalmaztunk. A protokoll szerinti minimális mérési tartomány 0,02 mg/L – 2,5 mg/L. Az F₇ esetében az ammónia mennyisége a mérési határ alatt volt, (<0,02), a legmagasabb értéket az F₅ esetében mértük, 0,31 mg/L. A nitrát méréséhez 500 nm-es hullámhosszt használtunk, protokoll szerinti mérési tartománya, 0,3 mg/l – 30,0 mg/L. A nitrát esetében, a legalacsonyabb értéket az F₅ forrásnál mértük, míg a legmagasabbat az 5. forrás esetében. Egyik mintavételi pont esetében sem haladta meg az ammónia- illetve a nitrát-tartalom az előírt határértékeket.

4. táblázat A forrásvizek kémiai vizsgálatának eredményei

Minták	Ammónia (mg/L) Határérték: 0,5 mg/L)	Nitrát (mg/L) (Határérték: 50 mg/L)
F ₁	0,02	3,00
F ₂	0,06	3,50
F ₃	0,05	2,10
F ₄	0,07	2,70
F ₅	0,31	4,23
F ₆	0,13	3,23
F ₇	<0,02	3,10

5.3. vízminőségi, higiéniai vizsgálatok eredményei

A vízmikrobiológia és részletes vízkémiai vizsgálatokat csak a forrásvizek esetében végeztük el, amelynek eredményeit az 5. táblázat foglalja magába. Az első nagyobb, átfogóbb vizsgálat a forrásmintákra terjedt ki, amelyet követett a patakok vizsgálata, annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk a térség ivóvizeinek állapotáról. A forrásvizek fizikai-kémiai vizsgálata során azt a következtetést vontuk le, hogy a forrásvizek az ivóvizekre vonatkozó határértékeket nem

haladták meg sem a pH, sem az ammónia, sem pedig a nitrát tekintetében, így a patakok esetében az antibiotikum rezisztenciával kapcsolatos vizsgálatokat végeztük csak el.

A 48 órás inkubálás után leszámoltuk a telepeket és megadtuk az eredményeket TKE (telepképző egységben), amelyeket az 4. táblázatban összesítettük. Ez alapján elmondhatjuk, hogy az összcsíraszám 22 °C-on minden vizsgált forrás esetében fejlődtek ki telepek. A legkevesebb telep az F₇-ből (6 TKE), míg az F₃ mintából nőtt ki a legtöbb telep (>300 TKE), amely érték meghaladja az ivóvizekre, palackozott vizekre vonatkozó max. 100 TKE/ml határértéket. . A 37 °C-on inkubált minták összcsíraszám vizsgálatának során, azt eredményt kaptuk, hogy az F₁, az F₂ és az F₄ minták esetében nem fejlődött ki egyetlen telep sem, a legtöbb telepet pedig az F₅ esetében számoltuk (24 TKE), ez az érték meghaladja a határértéket (max. 20 TKE/ml).

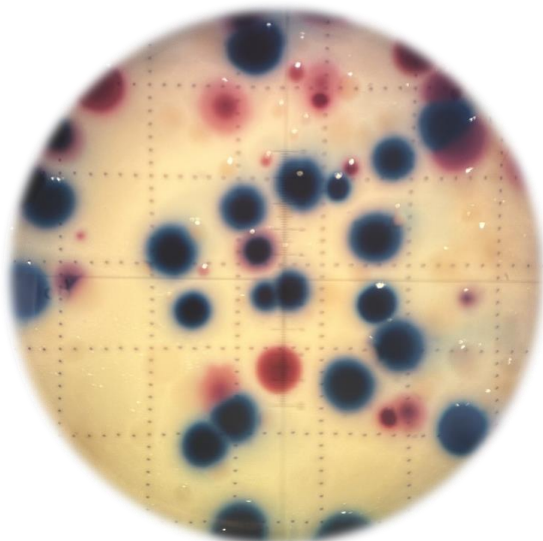
A coliform baktériumok vizsgálatának tekintetében, elmondhatjuk, hogy minden vizsgált forrás esetében fejlődtek ki telepek, annak ellenére, hogy ivóvíz minőségű vizekben nem megengedett a coliformok jelenléte (határérték: 0 TKE/100 ml). A legtöbb telep az F₄ és az F₅ mintákból fejlődött ki (mind a két esetben >300 TKE), a legkevesebb pedig az F₁ minta esetében (51 TKE). Ezen coliform telepek közül azonban néhány telep fekális coliform, azaz *E. coli*, a legtöbb (35 TKE) az F₅ minta esetében fejlődött ki, míg az F₇ esetében egyetlen *E. coli* telep sem nőtt ki. Ivóvizek nem tartalmazhatnak *E. coli* baktériumot (határérték 0 TKE/100 ml)

A Fekáliás *Enterococcus*-ok tekintetében csupán két forrás esetében nőttek ki telepek, az F₅ (38 TKE) és F₆ (1 TKE), ezen csoport esetében is a határérték 0 TKE/100 ml)

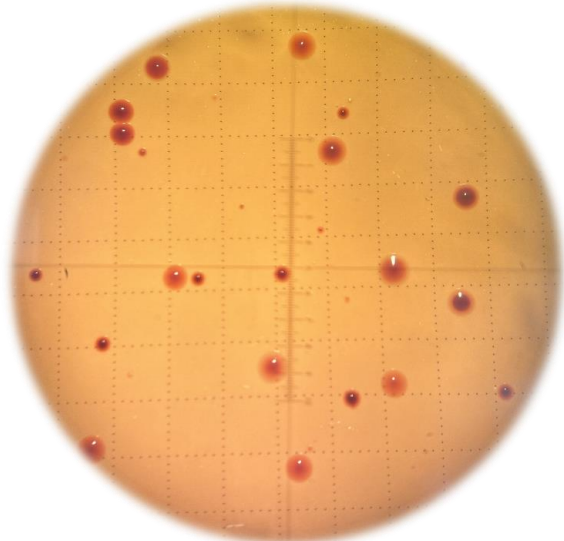
Az anaerób szulfid-redukáló baktériumok (*Clostridium* sp.) esetében a tápveleshasználat miatt nincs lehetőségtelepképző egységben kifejezni az eredményt, csak ezen miróbacsoport jelenlétét vagy hiányát detektáltuk. Pozitív eredményt mutattak az F₃ és F₅ minták. *Clostridium* fajok jelenléte nem kívánatos az ivóvizben.

5. táblázat A forrásvizek higiéniai-bakteriológiai vizsgálatának eredményei

Minták	Összcsíraszám 22 °C (max. 100 TKE/ml)	Összcsíraszám 37 °C (max. 20 TKE/ml)	Koliform (TKE/100 mL) (0 TKE/100 ml)	<i>E. coli</i> (TKE/100 mL) (0 TKE/100 ml)	Fekáliás <i>Enterococcus</i> (TKE/100 mL) (0 TKE/100 ml)	<i>Clostridium</i> sp. (0 TKE/100 ml)
F ₁	9	0	51	2	0	negatív
F ₂	25	0	111	8	0	negatív
F ₃	>300	10	104	2	0	pozitív
F ₄	55	0	>300	4	0	negatív
F ₅	100	24	>300	35	38	pozitív
F ₆	41	4	140	1	1	negatív
F ₇	6	2	96	0	0	negatív



10. ábra. Coliform baktériumok (piros telepek),



11. ábra Fekális *Enterococcus*ok (vörös telepek)

E. coli (kék telepek)

5.4. Baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának vizsgálata

A 6. táblázatban összesítettük az antibiotikum rezisztencia vizsgálatának eredményeit. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a P₄-es minta rezisztenciát mutatott a tetraciklinnel és az ampicillinnel szemben. Az F₁ és az F₃ minták az eritromicinnel és az ampicillinnel, míg az F₅ minta csak az eritromicinnel szemben mutatott rezisztenciát. A P₁ és P₇ minták az eritromicinnel és az ampicillinnel, míg a P₂ és P₆ minták az eritromicinnel, sztreptomicinnel és az ampicillinnel szemben is rezisztenciát mutattak. Az F₂, F₄, F₆, F₇ és P₃ minták csak az ampicillinnel szemben mutattak rezisztenciát.

Összességében elmondható, hogy a tetraciklinnel szemben csupán egy minta mutatott rezisztenciát, az eritromicinnel 7, a sztreptomicinnel 2 és az ampicillinnel 13. Az augmentinnel szemben pedig egy általunk vizsgált minta sem mutatott rezisztenciát.

6. táblázat A vizsgált vízminták antibiotikumokkal szembeni rezisztenciavizsgálat eredményei

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Tetr F1	Tetr F2	Tetr F3	Tetr F4	Tetr F5	Tetr F6	Tetr F7	Tetr P1	Tetr P2	Tetr P3	Tetr P4	Tetr P5
B	Tetr P6	Tetr P7	Tetr P8	Erit F1	Erit F2	Erit F3	Erit F4	Erit F5	Erit F6	Erit F7	Erit P1	Erit P2
C	Erit P3	Erit P4	Erit P5	Erit P6	Erit P7	Erit P8	Sztr F1	Sztr F2	Sztr F3	Sztr F4	Sztr F5	Sztr F6
D	Sztr F7	Sztr P1	Sztr P2	Sztr P3	Sztr P4	Sztr P5	Sztr P6	Sztr P7	Sztr P8	Amp F1	Amp F2	Amp F3
E	Amp F4	Amp F5	Amp F6	Amp F7	Amp P1	Amp P2	Amp P3	Amp P4	Amp P5	Amp P6	Amp P7	Amp P8
F	Aug F1	Aug F2	Aug F3	Aug F4	Aug F5	Aug F6	Aug F7	Aug P1	Aug P2	Aug P3	Aug P4	Aug P5
G	Aug P6	Aug P7	Aug P8	Tetr K	Erit K	Sztr K	Amp K	Aug K				

5.5. Baktériumok azonosítása MALDI-TOF-MS segítségével

Azon lyukakból mintát vettünk, amelyek valamely antibiotikummal szemben rezisztenciát mutattak, szelektív CCA (Kromogén Koliform Agar) táptalajra szélesztettük és inkubáltuk 37 °C-on 24 órát. A kinőtt telepekből mintát vettünk és MALDI-TOF-MS segítségével azonosítottuk. Az azonosítás során kapott eredményeket három kategóriába lehet sorolni (lásd 1. táblázat), a 7. táblázat bemutatja a baktérium azonosítás során elért eredményeinket. Nagy megbízhatósággal sikerült azonosítani a P₆ mintából sztreptomycin rezisztens *Raoultella ornithinolytica*, a P₄ mintából ampicillin rezisztens *Serratia fonticola*-t, valamint a P₇ mintából ampicillin rezisztens *Escherichia coli*-t. Alacsony megbízhatósággal sikerült azonosítani az F₂ mintából ampicillin rezisztens *Yersinia kristensenii*-t, az F₄ mintából ampicillin rezisztens *Serratia fonticola*-t, a P₂ mintából ampicillin rezisztens *Yersinia intermedia*-t és *Rahnella aquatilis*-t, valamint a P₆ mintából ampicillin rezisztens *Enterobacter cloacae*-t. A többi baktérium azonosítása sikertlennek bizonyult.

A *Raoultella ornithinolytica* egy Gram-negatív, oxidáz-pozitív baktérium, amely általában környezeti talajban, vízben és növényeken él. Bár általában ártalmatlan, az emberekben néha okozhat fertőzéseket, mint például húgyúti fertőzéseket, sebfertőzéseket, valamint légúti és hasi fertőzéseket. különösen azokban, akik immunhiányosak vagy súlyos egészségügyi problémákkal küzdenek (Podschun és Ullmann 1998).

A *Yersinia kristensenii* egy Gram-negatív, pálcika alakú baktérium, amely általában nem okoz súlyos betegségeket, de bizonyos esetekben, például csecsemőknél vagy idősebb embereknél, súlyosabb tüneteket és szövődményeket okozhat. A tünetek közé tartozhatnak a hasmenés, hasi fájdalom, láz, hányinger és hányás (Bottone 1997).

A *Yersinia intermedia* rendkívül ritkán hozható összefüggésbe embereket érintő betegségekkel (Agbonlahor 1986).

A *Serratia fonticola* egy Gram-negatív baktérium. Bár általában a környezetben él, egyes törzsei képesek emberi fertőzéseket okozni, különösen azokban az esetekben, amikor a beteg már valamilyen egészségügyi problémával vagy gyengült immunrendszerrel rendelkezik. A *Serratia*

fonticola híres kórházi környezetben előforduló fertőzésekről, például húgyúti fertőzések, légúti fertőzések és sebfertőzések kialakulásáról (Mahlen 2011).

A *Rahnella aquatilis* egy Gram-negatív, oxidáz-pozitív baktérium, amely általában környezeti forrásokban, például talajban, vízben és növényeken él. Bár általában ártalmatlan, egyes esetekben emberi fertőzéseket is okozhat, pl: húgyúti fertőzéseket különösen azokban az esetekben, amikor az immunrendszer legyengült (Guo és mtsai.2012).

Az *Enterobacter cloacae* egy Gram-negatív baktérium, amely a bélrendszerben található, egyes törzsei emberi fertőzéseket okozhatnak, különösen azokban az esetekben, amikor az immunrendszer valamilyen módon gyengült. Az *Enterobacter cloacae* gyakran okoz kórházi környezetben előforduló fertőzéseket, például húgyúti fertőzéseket, légúti fertőzéseket, sebfertőzéseket és hasi fertőzéseket (Bennett és mtsai. 2023).

Az *Escherichia coli* (*E. coli*) egy Gram-negatív baktérium, amely számos törzse közül néhány emberi betegségek kialakulását okozhatja. Az *E. coli* fertőzések széles skáláját okozhatják, kezdve enyhe hasmenéstől egészen súlyos, életveszélyes állapotokig. Néhány fontos betegség, amelyet az *E. coli* okozhat: húgyúti fertőzések, hasmenéses betegségek, bakteriális meningitis, epeúti fertőzések (Kaper és mtsai. 2004; Russo és Johnson 2000).

7. táblázat A MALDI-TOF baktériumazonosítási eredményeinek összefoglaló táblázata

Minta helye	Minta azonosítója	Organizmus (legnagyobb egyezés)	Pontszám értéke	Organizmus (második legnagyobb egyezés)	Pontszám értéke
D6 (+++)(A)	D7	Raoultella ornithinolytica	2,22	Raoultella ornithinolytica	2,07
D8 (+)(B)	D11	<i>Yersinia kristensenii</i>	1,70	<i>Yersinia kristensenii</i>	1,70
D10 (+)(B)	E1	<i>Serratia fonticola</i>	1,88	<i>Serratia fonticola</i>	1,76
E2 (+)(B)	E6	<i>Yersinia intermedia</i>	1,97	<i>Yersinia intermedia</i>	1,86
E2 (+)(B)	E6	<i>Rahnella aquatilis</i>	1,97	<i>Rahnella aquatilis</i>	1,86
E4 (+++)(A)	E8	<i>Serratia fonticola</i>	2,01	<i>Serratia fonticola</i>	1,98
E6 (+)(B)	E10	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,90	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,85
E7 (+++)(A)	E11	<i>Escherichia coli</i>	2,28	<i>Escherichia coli</i>	2,25

6. Következtetések

- A fizikai-kémiai vizsgálatok során megállapítottuk, hogy amíg a patakból származó vízminták hőmérséklete egy kivétellel folytonos növekedést mutat, addig a forrásokból származó vízminták a hőmérséklet szélesebb spektrumát fedik le, 3,0 °C-tól egészen 10,5 °C-ig. Ez annak köszönhető, hogy a források közül volt amelyik az erdős részen, fák között található, míg mások közvetlen az út mellett, ahol a fák hiánya miatt a napsütés jobban feltudta melegíteni.
- A pH minden forrásvíz esetében enyhén bázikus volt, akárcsak a patakból származó vizek esetében (ez utóbbi esetében a pH folyamatos növekedését figyeltük meg). A legalacsonyabb vezetőképessége az F₅ forrás vízének volt (315,67 µs/cm), ami annyit tesz, hogy ennek a forrásnak volt a legkisebb az oldott sótartalma. A legnagyobb oldott sótartalommal az F₆ forrás rendelkezett (547,33 µs/cm). Zavarosság tekintetében két forrás vize lépte át a megengedett határértéket, az F₆ (6,65 FTU), valamint az F₅ (340,67 FTU). Ez utóbbi esetben a rendkívül nagyon magas zavarossági érték arra utalhat, hogy emberi tevékenység zajlott a környéken, pl. fát huzattak, hiszen a mintavételi időpontban nem volt csapadék, amely egyúttal a többi forrásra is kihatott volna .
- Az ammónia mérése során a legnagyobb értéket az F₅ esetében mértünk (0,31 mg/L).. A nitrát mennyisége az F₃ minta esetében volt a legalacsonyabb (2,10 mg/L), a legmagasabb pedig az F₅ esetében (4,23 mg/L). Egyik forrás esetében sem haladta meg az ammónia és a nitrát az ivóvizekre vonatkozó határértékeket.
- A standard mikrobiológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a források vizeinek a minősége ivóvíz szempontból nem tekinthető elfogadhatónak, ugyanis a nagy számban mutattunk ki koliform baktériumokat, egy forrás kivételével (F₇) pedig az *E. coli* is jelen volt. Két forrásból (F₅, F₆) kimutattunk fekális *Enterococcus*-okat, szintén két forrásból pedig pedig *Clostridium* sp. jelenlétét (F₃, F₅ forrás).
- Az antibiotikum rezisztencia tekintetében elmondhatjuk, hogy minden forrásvíz rendelkezett rezisztenciával legalább egy antibiotikummal szemben. Az F₁, F₃ és F₅ forrásvízből származó minták az eritromicinnel és az ampicilinnel szemben mutattak rezisztenciát, míg az F₂, F₄, F₆,

F₇ forrásvízből származó minták csak az ampicilinnel szemben. A patakból származó vízminták közül egyedül a P₈ nem rendelkezett antibiotikum rezisztenciával. A P₁, P₇ minták az eritromicinnel és az ampicilinnel szemben mutattak rezisztenciát, a P₂, P₆ az eritromicinnel, a sztreptomicinnel és az ampicilinnel szemben, a P₄ a tetraciklinnel és az ampicillinnel, míg a P₃, P₅ minták kizárólag az ampicillinnel szemben voltak rezisztensek.

- A vizsgált antibiotikumok közül egyedül az augmentinnel szemben nem tudtunk rezisztenciát kimutatni, a többi antibiotikum esetében legalább egy esetben figyeltünk meg rezisztenciát, továbbá a legtöbb minta az ampicillinre mutatott rezisztenciát (13 minta).
- A rezisztens baktériumok azonosítása során nagy megbízhatósággal 3 fajt tudtunk beazonosítani, sztreptomicinre rezisztens *Raoultella omithinolytica*-t, valamint ampicillinre rezisztens *Serratia fonticola*-t és *Escherichia coli*-t.
- Alacsony megbízhatósággal sikerült azonosítani ampicillin rezisztens *Yersinia kristensenii*-t, *Serratia fonticola*-t, *Yersinia intermedia*-t, *Rahnella aquatilis*-t és *Enterobacter cloacae*-t.
- A MALDI-TOF módszerrel azonosított rezisztens baktériumok egy része fekális eredetű (pl. *E. coli*, *Enterococcus cloacae*) és opportunistá patogén, betegségeket, fertőzéseket okozhatnak. A törzsazonosítási eredmények megerősítik a tenyésztési higiéniai-bakteriológiai eredményeket, hogy a vizsgált források vize mikrobiológiai szempontból nem iható vízminőségűek, gyakran fekális szennyezést indikáló baktériumok vannak jelen (ezek lehetnek humán, vagy más emlős illetve madár eredetűek), amelyek rezisztensek egy vagy több antibiotikummal szemben.
- Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a vizsgált vizek fizikai-kémiai szempontból megfelelőek, kivéve az F₅ és F₆ forrásvizek, ahol a zavarosság túllépte a megengedett határértéket. A standard mikrobiológiai vizsgálatok viszont azt mutatták, hogy a forrásvizek nem alkalmasak ivóvíznek, a kimutatott nagy számú koliform baktériumok miatt. A vizsgált minták közül csupán a P₈ patak minta nem rendelkezett antibiotikum rezisztenciával és a vizsgált antibiotikumok közül csupán az augmentinnel szemben nem mutattunk ki rezisztenciát. Az azonosított antibiotikum rezisztens baktériumok okozhatnak betegségeket, fertőzéseket főleg immunhiányos emberek esetében. Nagyon fontos lenne a források tisztítása, időnkénti fertőtlenítése, illetve a vízminőség monitorizálása.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom, dr. Máthé István és dr. Salamon Pál vezető tanároknak a kísérletek elvégzése, kiértékelése, továbbá a dolgozat elkészítése során nyújtott támogatásért.

Köszönettel tartozom továbbá, a Sapientia EMTE Csíkszeredai Karának és azon belül is a Biomérnöki Tanszéknek a tudományos kutatáshoz, valamint a dolgozat elkészítéséhez nyújtott támogatásért, a Marosvásárhelyi George Emil Palade Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, Gyógyszerészeti Karának, valamint Kárpát-medencei Tehetségkutató Alapítványnak (KMTA) a támogatásért.

8. Irodalomjegyzék

- Abera, Bayeh, Mulugeta Kibret, Wondemagegn Mulu. 2016. “Extended-Spectrum Beta (β)-Lactamases és Antibigram in Enterobacteriaceae from Clinical és Drinking Water Sources from Bahir Dar City, Ethiopia.” PLoS ONE 11(11):1–10.
- Alawi, Marwa, Trinidad Velasco Torrijos, Fiona Walsh. 2022. “Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in Drinking Water.” Environmental Advances 8(February):100191.
- Amato, Michela, Diego Dasí, Ana González, María Antonia Ferrús, és María Ángeles Castillo. 2021. “Occurrence of Antibiotic Resistant Bacteria és Resistance Genes in Agricultural Irrigation Waters from Valencia City (Spain).” Agricultural Water Management 256.
- M.G. Kelly, G. Chiriac, A. Soare-Minea, C. Hamchevivi, S. Birk. 2019. “Defining ecological status of phytobenthos in very large rivers: a case study in practical implementation of the Water Framework Directive in Romania” Hydrobiologia 828:353-367
- Bezuidenhout, C. C., L. G. Molale-Tom, C. Mienie, C. Ateba, K. Tsholo, R. Kritzinger, M. T. A. Plaatjie, N. Mahali, T. J. Sanko, és T. De Klerk. 2019. Antibiotic-Resistant Bacteria és Genes in Drinking Water. WRC Report No. 2585/1/19.
- de Boeck, Hilde, Berthe Miwés a, Octavie Lunguya-Metila, Jean Jacques Muyembe-Tamfum, Ellen Stobberingh, Youri Glupczynski, és Jan Jacobs. 2012. “ESBL-Positive Enterobacteria Isolates in Drinking Water.” Emerging Infectious Diseases 18(6):1019–1020.
- Bryan, L. E., S. K. Kowés, és H. M. Van den Elzen. 1979. “Mechanism of Aminoglycoside Antibiotic Resistance in Anaerobic Bacteria: Clostridium Perfringens és Bacteroides Fragilis.” Antimicrobial Agents és Chemotherapy 15(1):7–13.
- Cherak, Zineb, Lotfi Loucif, Abdelhamid Moussi, és Jean Marc Rolain. 2021. “Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Aquatic Environments: A Review.” Journal of Global Antimicrobial Resistance 25:287–309.
- Chopra, Ian, és Marilyn Roberts. 2001. “Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, és Epidemiology of Bacterial Resistance.” Microbiology és Molecular Biology Reviews 65(2):232–260.
- Connell, Sean R., Dobryan M. Tracz, Knud H. Nierhaus, és Diane E. Taylor. 2003. “Ribosomal Protection Proteins és Their Mechanism of Tetracycline Resistance.” Antimicrobial Agents és

- Chemotherapy 47(12):3675–3681.
- Dunca, És reea Mihaela. 2018. “Water Pollution and Water Quality Assessment of Major Transboundary Rivers from Banat (Romania).” *Journal of Chemistry* 8, 2018.
- Guliy, Olga I., Oleg V. Ignatov, Lubov N. Markina, Victor D. Bunin, és Vladimir V. Ignatov. 2005. “Action of Ampicillin és Kanamicin on the Electrophysical Characteristics of Escherichia Coli Cells.” *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 85(12–13):981–92.
- Gurzau, Anca Elena, Emilian Popovici, Aurelia Pinte, Ovidiu Popa, Cristian Pop, és Irina Dumitrascu. 2010. “Quality of Surface Water Sources from a Central Transylvanian Area as a Possible Problem for Human Security és Public Health.” *Carpathian Journal of Earth és Environmental Sciences* 5(2):119–26.
- Larsson, D. G. Joaki., és Carl Fredrik Flach. 2022. “Antibiotic Resistance in the Environment.” *Nature Reviews Microbiology* 20(5):257–69.
- Retsema, J., és Wenchi Fu. 2001. “Macrolides: Structures és Microbial Targets.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 18(SUPPL.1):3.
- Sánchez-Baena, Ana María, Luz Dary Caicedo-Bejarano, és Mónica Chávez-Vivas. 2021. “Structure of Bacterial Community with Resistance to Antibiotics in Aquatic Environments. A Systematic Review.” *International Journal of Environmental Research és Public Health* 18(5):1–20.
- Slay, Raymond M., Graham J. Hatch, és Judith A. Hewitt. 2022. “Evaluation of Amoxicillin és Amoxicillin-Clavulanate (Augmentin) for Antimicrobial Postexposure Prophylaxis Following Bacillus Anthracis Inhalational Exposure in Cynomolgus Macaques.” *Clinical Infectious Diseases* 75(3 Supplement):S402–10.
- Some, Sudip, Rittick Mondal, Debasis Mitra, Divya Jain, Devvret Verma, és Samanwita Das. 2021. “Microbial Pollution of Water with Special Reference to Coliform Bacteria és Their Nexus with Environment.” *Energy Nexus* :100008.
- Tamames, Javier, Juan José Abellán, Miguel Pignatelli, Antonio Camacho, Andres Moya. 2010. “Environmental Distribution of Prokaryotic Taxa.” *BMC Microbiology* 10: 85.
- Tanner, Windy D., James A. Vés erslice, Ramesh K. Goel, Molly K. Leecaster, Mark A. Fisher, Jeremy Olstadt, Catherine M. Gurley, És erson G. Morris, Kathryn A. Seely, Leslie Chapman, Michelle Korés o, Kalifa Amira Shabazz, És reea Stadsholt, Janice Vés eVelde, Ellen Braun-

- Howlés , Christine Minihane, Pamela J. Higgins, Michelle Deras, Othman Jaber, Dee Jette, és Adi V. Gundlapalli. 2019. “Multi-State Study of Enterobacteriaceae Harboring Extended-Spectrum Beta-Lactamase és Carbapenemase Genes in U.S. Drinking Water.” *Scientific Reports* 9(1):1–8.
- Vaz-Moreira, Ivone, Olga C. Nunes, és Célia M. Manaia. 2014. “Bacterial Diversity és Antibiotic Resistance in Water Habitats: Searching the Links with the Human Microbiome.” *FEMS Microbiology Reviews* 38(4):761–78.
- White, Anthony R., Clive Kaye, James Poupard, Rienk Pypstra, Gary Woodnutt, és Brian Wynne. 2004. “Augmentin® (Amoxicillin/Clavulanate) in the Treatment of Community-Acquired Respiratory Tract Infection: A Review of the Continuing Development of an Antimicrobial Agent.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(SUPPL. 1):3–20.
- Van Belkum, Alex, Martin Welker, David Pincus, Jean Philippe Charrier, and Victoria Girard. 2017. “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues?” *Annals of Laboratory Medicine* 37(6):475–83.
- Vrioni, Georgia, Constantinos Tsiamis, George Oikonomidis, Kalliopi Theodoridou, Violeta Kapsimali, and Athanasios Tsakris. 2018. “MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology for Detecting Biomarkers of Antimicrobial Resistance: Current Achievements and Future Perspectives.” *Annals of Translational Medicine* 6(12):240–240.
- Agbonlahor, D. E. 1986. “Characteristics of *Yersinia* Intermedia-like Bacteria Isolated from Patients with Diarrhea in Nigeria.” *Journal of Clinical Microbiology* 23(5):891–96.
- Bennett, William, Katrin Mende, Wesley R. Campbell, Miriam Beckius, Laveta Stewart, Faraz Shaikh, Azizur Rahman, David R. Tribble, and Joseph M. Yabes. 2023. “*Enterobacter Cloacae* Infection Characteristics and Outcomes in Battlefield Trauma Patients.” *PLoS ONE* 18:1–15.
- Bottone, Edward J. 1997. “*Yersinia Enterocolitica*: The Charisma Continues.” *Clinical Microbiology Reviews* 10(2):257–276.
- Guo, Yanbin, Ziwei Jiao, Lei Li, Di Wu, David E. Crowley, Yongjun Wang, and Wenliang Wu. 2012. “Draft Genome Sequence of *Rahnella Aquatilis* Strain HX2, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Isolated from Vineyard Soil in Beijing, China.” *Journal of Bacteriology* 194(23):6646–6647.

- Kaper, James B., James P. Nataro, and Harry L. T. Mobley. 2004. "Pathogenic Escherichia Coli." *Nature Reviews Microbiology* 2(2):123–40.
- Mahlen, Steven D. 2011. "Serratia Infections: From Military Experiments to Current Practice." *Clinical Microbiology Reviews* 24(4):755–91.
- Podschun, R., and U. Ullmann. 1998. "Klebsiella Spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors." *Clinical Microbiology Reviews* 11(4):589–603.
- Russo, Thomas A., and James R. Johnson. 2000. "Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of Escherichia Coli: ExPEC." *Journal of Infectious Diseases* 181(5):1753–54.
- De Cazes, M., M. P. Belleville, E. Petit, M. Llorca, S. Rodríguez-Mozaz, J. De Gunzburg, D. Barceló, and J. Sanchez-Marcano. 2014. "Design and Optimization of an Enzymatic Membrane Reactor for Tetracycline Degradation." *Catalysis Today* 236(PART A):146–52. doi: 10.1016/j.cattod.2014.02.051.
- Kwiatkowska, Brygida, Maria Maslinska, Malgorzata Przygodzka, Joanna Dmowska-Chalaba, Justyna Dabrowska, and Katarzyna Sikorska-Siudek. 2013. "Immune System as a New Therapeutic Target for Antibiotics." *Advances in Bioscience and Biotechnology* 04(04):91–101. doi: 10.4236/abb.2013.44a013.
- Qarah, Nagib A. S., Sameer A. M. Abdulrahman, Faisal K. Algethami, Kanakapura Basavaiah, and Ezzouhra El-Maaiden. 2020. "New Applications for Amoxicillin Determination in Pure Form and Pharmaceuticals Based on Iodate-Iodide Mixture: Titrimetry and Spectroscopy Studies." *Quimica Nova* 43(1):44–49. doi: 10.21577/0100-4042.20170455.
- Stocco, Gabriele, Marianna Lucafò, and Giuliana Decorti. 2020. "Pharmacogenomics of Antibiotics." *International Journal of Molecular Sciences* 21(17):1–20. doi: 10.3390/ijms21175975.
- Tita, Bogdan, Tunde Jurca, Gerlinde Rusu, Geza Bandur, and Dumitru Tita. 2013. "Thermal Behaviour of Active Substance versus Pharmaceutical Compounds for Ibuprofen." *Revista de Chimie* 64(10):1089–95.