

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A DIHIDROTESZTOSZTERON,
MINT ANDROGÉN HATÁSÚ MIKROSZENNYEZŐ VIZSGÁLATA
BIODEGRADÁCIÓS ELJÁRÁSOKBAN**

Készítette:

Balázs Adrienn

Ökotoxikológus MSc

Szent István Egyetem

Gödöllő

Belső témavezető:

Dr. Krifaton Csilla

tanszéki mérnök

Szeged

2013

Tartalom

1	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1.1	HORMONHÁZTARTÁST MEGZAVARÓ ANYAGOK, CSOPORTOSÍTÁSUK, EMBERRE ÉS ÁLLATOKRA GYAKOROLT HATÁSUK:	3
1.2	SZTEROID HORMONOK (ÖSZTROGÉNEK, ANDROGÉNEK)	4
1.2.1	Környezeti előfordulás	4
1.2.2	Dihidrotesztoszteron	5
1.3	SZERVES SZENNYEZŐK DETEKTÁLÁSÁRA ALKALMAS MÓDSZEREK:	8
1.3.1	Kémiai analitika	8
1.3.2	Biológiai hatásmérő tesztek	10
1.4	AZ ENDOKRIN RENDSZERT ZAVARÓ ANYAGOK ELIMINÁLÁSÁRA ALKALMAZHATÓ MÓDSZEREK	14
1.4.1	Fizikai-kémiai módszerek	14
1.4.2	Biodegradáció	14
1.5	A BIODEGRADÁCIÓRA ALKALMAS <i>RHODOCOCCUS</i> ÉS <i>CUPRIAVIDUS</i> NEMZETSÉG JELLEMZÉSE	16
1.5.1	<i>Rhodococcus</i> nemzetség	16
1.5.2	<i>Cupriavidus</i> nemzetség	17
2	CÉLKITŰZÉS.....	18
3	MÓDSZEREK.....	19
3.1	A HORMONHATÁS ÉS A CITOTOXIKUS HATÁS KIMUTATÁSÁRA ALKALMAZOTT BIOLUMINESZCENS ÉLESZTŐ ALAPÚ BIORIPORTER RENDSZEREK	19
3.1.1	Előkísérlet, a teszt standardizálása	20
3.2	BONTÁSI KÍSÉRLET	21
3.2.1	A bontási kísérletek biológiai hatáselemzése	23
3.2.2	A bontási kísérlet értékelése kémiai analitikai mérésekkel	24
3.3	STATISZTIKA	24
4	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	25
4.1	AZ ELŐKÍSÉRLET EREDMÉNYEI	25
4.1.1	Dihidrotesztoszteron	25
4.2	A BONTÁSI KÍSÉRLET EREDMÉNYEI	26
5	KITEKINTÉS, JAVASLATOK	32
6	ÖSSZEFOGLALÁS.....	34
7	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	35
8	FELHASZNÁLT IRODALOM.....	36
9	FÜGGELÉK.....	41
10	NYILATKOZAT.....	43

1 Irodalmi áttekintés

1.1 Hormonháztartást megzavaró anyagok, csoportosításuk, emberre és állatokra gyakorolt hatásuk:

A hormonháztartást megzavaró vegyületek (Endocrine Disrupting Compounds) olyan exogén vegyületek, amelyek megzavarják a testben a homeosztázis fenntartásáért, a reprodukcióért, fejlődésért és/vagy viselkedésért felelős természetes hormonok szintézisét, szekrécióját, transzportját, kötődését, működését vagy eliminációját. (USEPA 1997)

Az EDC-ket a következőképpen csoportosíthatjuk (Burkhardt-Holm 2010):

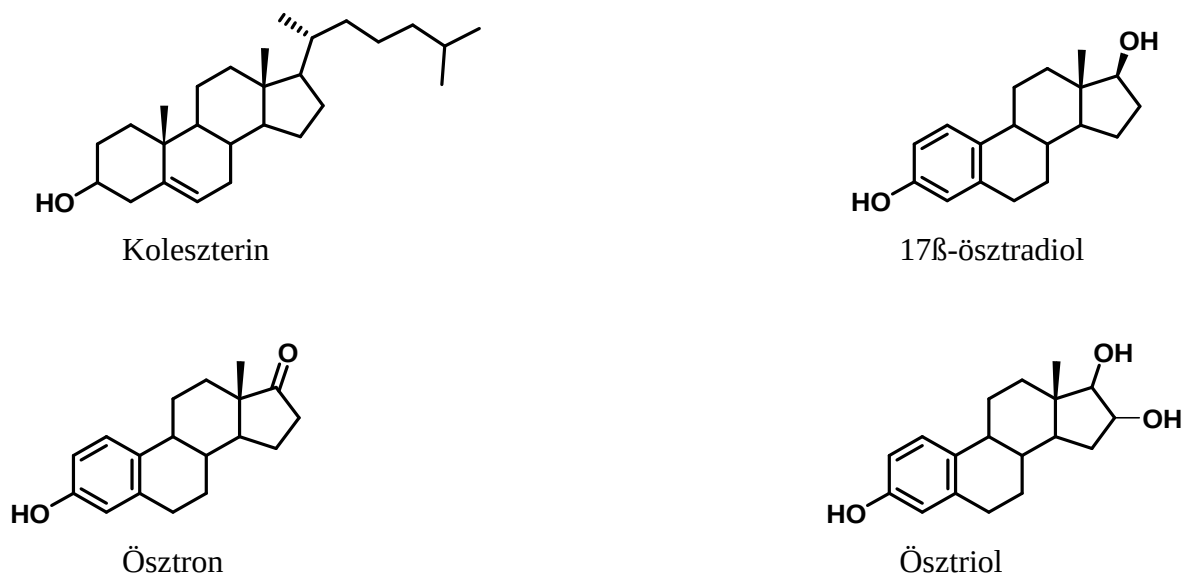
- Természetes hormonok és metabolitjaik (pl. 17β -ösztradiol, ösztron, ösztriol)
- Szintetikus hormonok (pl. dietilsztilbösztrol, 17α -etinilösztradiol és más hormonális fogamzásgátlók)
- Fito- és mikoösztragének (pl. izoflavonok, lignánok, coumestánok, sztilbének, zearalenone)
- Hormonális mellékhatással rendelkező gyógyszerek (pl. klorfibrát)
- Ipari és háztartási vegyi anyagok (pl. poliklórozott bifenilek, égésgátlók, festékek, lágyítók (pl. biszfenol-A, ftalátok), alkilfenol-etoxilát detergens, UV-szűrők)
- Peszticidek és metabolitjaik (pl. DDT (diklór-difenil-triklóretán), methoxychlor, kepone, dieldrin, lindan, endoszulfán, toxaphene)
- Ipari és háztartási tevékenységek melléktermékei (pl. policiklusos aromás szénhidrogének, dioxinok)
- Fémek (pl. kadmium, ólom)

Az EDC-k különböző módon fejthetik ki hatásukat: utánozhatják endogén hormonok, mint például ösztrogének és androgének hatását; antagonizálhatják a normál, endogén hormonokat, megváltoztathatják a természetes hormonok szintézisének és metabolizmusának folyamatát, vagy módosíthatják a hormonok hatását receptor szinten (Sonnenschein & Soto 1998). A rendellenességek kialakulásához sokszor nagyon csekély mennyiségű EDC is elegendő. Érdekes módon, e vegyületekkel kapcsolatban azt tapasztalták, hogy kisebb koncentrációban károsabb hatást fejtenek ki, mint nagyobb koncentrációban. (Diamanti-Kandarakis et al., 2009)

Az EDC-knek való kitettség számos forrásból eredhet. Bekerülhetnek a szervezetünkbe e vegyületekkel szennyezett víz vagy táplálék elfogyasztásával, szennyezett levegő belélegzésével, szennyezett talajjal való érintkezéssel, illetve e vegyületekkel való munkafolyamatok során.

1.2 Szteroid hormonok (ösztrogének, androgének)

A szteroidok alapváza három hattagú és egy öttagú széngyűrűből áll, melyhez számos funkciós csoport, illetve oldallánc kapcsolódhat. A szteroidok bioszintézisének kiinduló vegyülete a koleszterin (1. ábra). A három fő természetes ösztrogén (ösztradiol, ösztрон és ösztриol) 18 szénatomot tartalmaz (1. ábra). Az androgének 19 szénatomból állnak, és a férfi jellegek szabályozásában van szerepük. (Streck, 2009)



1. ábra: A koleszterin és 3 fő természetes ösztrogén szerkezeti képlete

1.2.1 Környezeti előfordulás

Számos szteroid hormon kerül alkalmazásra a gyógyászatban, legfőképpen hormonális fogamzásgátló tabletták hatóanyagaként. Az állattenyésztés során az állatok növekedésének elősegítésére is alkalmazzák. Az emberek és állatok által kiürített természetes és szintetikus hormonok a felszíni vizekbe kerülhetnek közvetlenül vagy befolyó szennyvizek vagy mezőgazdasági területekről való lefolyás következtében (Trinh et al., 2011). Az androgének további forrása a papírgyártás, illetve a természetes fitoszterolok degradációja során is keletkeznek (Streck, 2009). Mivel a legtöbb szennyvíztisztító nem alkalmas az EDC-k eliminálására, így e szennyezők és metabolitjaik akadály nélkül juthatnak ki a kezeletlen szennyvízzel az élővizekbe (Bolong et al., 2009). A szennyvíziszap mezőgazdasági területeken való alkalmazása hozzájárul a szteroidok talajokba és felszín alatti vizekbe való bejutásához. (Trinh et al., 2011)

A kommunális szennyvizekben jelenlévő természetes hormonok fő forrása az emberi vizelet. A természetes hormonok vizeletben való előfordulásának vizsgálata során 15 ösztrogén vegyületet tudtak kimutatni, főként konjugátum formában. A nők naponta átlagosan néhány

mikrogramm mennyiségben ürítenek vizelettel 1-1 ösztrogén vegyületet, azonban ez az érték terhes nők esetében több nagyságrenddel magasabb lehet. Férfiaknál, az androgének vizelettel való ürítésének mértéke átlagosan néhány 10 vagy néhány száz mikrogramm naponta 1-1 vegyület esetében. A DHT-nál ez az érték 14,1 µg/nap, azonban e vegyület magas androgén aktivitással rendelkezik, így jobban hozzájárul a teljes androgén hatáshoz, mint azok az androgén vegyületek, melyek nagyobb mértékben ürülnek, de kisebb az androgén aktivitásuk. (Liu et al., 2009)

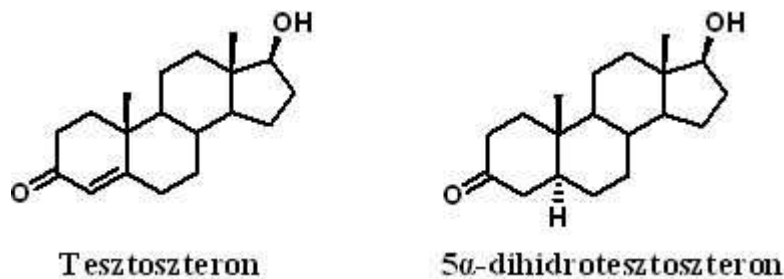
Liu és munkatársai (2011) Kínában 2 szennyvíztisztítóból és a Danshui-folyóból származó mintákból határozták meg 28 szteroid koncentrációját. Mindkét szennyvíztisztító befolyó vizében az androgének közül a DHT fordult elő a legnagyobb koncentrációban (621 ng/L és 326 ng/L). Az egyik **szennyvíztisztító kifolyó vizében a DHT 77,3 ng/L** koncentrációt ért el, míg a másik szennyvíztisztító kifolyó vizében nem volt kimutatható. A szennyvíziszapban a DHT szintén nem volt kimutatható. A **DHT a víztelenített szennyvíziszapban 94 ng/g** koncentrációban volt jelen. Mindkét szennyvíztisztítóban a víztelenített szennyvíziszap tartalmazott 300 ng/g feletti koncentrációban androgén vegyületet. A **Danshui-folyóban a DHT koncentrációja 38,6 ng/L és 55,3 ng/L között változott** a felső, illetve alsó szakasz között. E felszíni vízben szintén a DHT érte el a legmagasabb koncentrációt az androgének közül.

Bellet és munkatársai (2012) Franciaországban 6 szennyvíztisztító befolyó vizét vizsgálták. A minták jelentős ösztrogén aktivitást mutattak. Az ösztroon és az ösztriol voltak a jellemző vegyületek. Az androgén aktivitás változó volt az egyes minták között, azonban nagyobb volt a kisebb kapacitású szennyvíztisztítóknál az ösztrogén aktivitásnál. A legnagyobb koncentrációban a tesztoszteron, DHT és epiandroszteron fordult elő.

1.2.2 Dihidrotesztoszteron

1.2.2.1 Bioszintézise és élettani funkciói a szervezetben

Az 5α-androsztán-17β-ol-3-ont (dihidrotesztoszteron) (2. ábra) – mely a tesztoszteron androszteronná alakulása során egy közti lépésben keletkezik – 1967-ben fedezték fel. 1 évvel később igazolták, hogy a DHT számos, korábban a tesztoszteronnak tulajdonított hatás mediátora. A legtöbb faj hímnemű egyedében a DHT plazma koncentrációja a tesztoszteron koncentrációjának 10%-a, a legtöbb férfiban 50-65 ng/dL mennyiségben fordul elő. Azonban a DHT koncentrációja magasabb azokban az androgén célszövetekben, amelyek 5α-reduktáz aktivitást mutatnak. Mind a tesztoszteron, mind a DHT hatását ugyanaz a protein receptor közvetíti. (Bruchovsky & Wilson 1999)



2. ábra: A tesztoszteron és az 5 α -dihidrotesztoszteron szerkezeti képlete

A tesztoszteron hímnemű egyedekben fő szerepet játszik a luteinizáló hormon szekréciójának szabályozásában, a Wolff csövek kialakulásában és a spermatogenezis szabályozásában (Bruchovsky & Wilson 1999). A DHT a nemi szervek szöveteiben, de különösen a bőrben és a prosztatában játszik szerepet az androgén hatások kifejeződésében. Fontos szerepe van a prosztata fejlődésében és a másodlagos nemi jellegek megjelenésében (Horton 1992). A hímnemű nemi szervek kialakulásában is szerepet játszik, továbbá módosítja felnőttkorban a prosztata funkcióját. Felnőttekben a DHT és más androgének hozzájárulnak a prosztatában a sejtproliferáció és sejthalál közötti homeosztázis fenntartásához. A DHT növekedési faktorok termelődésének szabályozásával indirekt befolyásolja azoknak a géneknek az expresszióját, melyek a sejtproliferáció és sejtpusztulás ellenőrzéséért felelnek. Emberekben a DHT feltehetőleg növekedési faktorok termelését és kiválasztását serkenti, mint például hámnövekedési faktor (EGF), keratinocita növekedési faktor (KGF) és inzulin-szerű növekedési faktorok (IGFs) – melyek mind a sejtproliferációt segítik elő. A DHT feltehetőleg a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) aktivitását is befolyásolja, mely az apoptózis szabályozásáért felelős faktor. A DHT szerepe azonban a prosztata- és hámszöveten kívül még tisztázatlan. A DHT-nak nem találtak még olyan előnyös funkcióját, mely ne jellemezné a tesztoszteront is, így feltételezik, hogy a DHT alapvető szerepe az, hogy a tesztoszteron gyengébb hormonális hatását felerősítse. (Carson & Rittmaster 2003)

A DHT prekursora a tesztoszteron, mely legnagyobb mennyiségben a here Leydig sejtjeiben szintetizálódik a hipotalamuszból és hipofízisből érkező hormonális jel hatására. A DHT a tesztoszteronból 5 α -reduktáz hatására képződik. Az 5 α -reduktáz egy erősen lipofil enzim, mely intracelluláris membránokban található meg (pl. sejtmagmembrán). Két izoenzimet különböztethetünk meg. A 2-es típus túlnyomórészt a prosztatában és a nemi szövetekben, míg az 1-es típus az egész testben megtalálható, ahol az 5 α -reduktáz szintetizálódik, beleértve a prosztatát és a bőrt is. Mindkét izoenzim megtalálható a májban. A két izoenzim között különbség van a pH optimumukban, eltérő kromoszómán helyezkednek el a kódoló gének és nem azonos módon reagálnak az 5 α -reduktáz gátló vegyületekre. (Carson & Rittmaster 2003)

A DHT az androgén receptorhoz kapcsolódva válik fiziológiailag aktívvá. A leghatékonyabb endogén androgén hormon a DHT, melynek jelentősen nagyobb az affinitása az androgén receptorhoz, mint a tesztoszteronnak. A receptorhoz való kötődés után egy kaszkádrendszer aktiválódik, melynek eredményeképpen sejtnövekedést szabályozó faktorok termelődnek. A sejtmagban 2 DHT receptor dimert képezve magas affinitású DNS szekvenciákhoz kapcsolódik, így módosítva a gének expresszióját. (Carson & Rittmaster 2003)

1.2.2.2 A normál élettani koncentrációtól eltérő dihidrotesztoszteron szint hatásai:

Humán:

Jóindulatú prosztata megnagyobbodás: Mivel a DHT a sejt proliferáció és a sejtpusztulás közötti egyensúly fenntartásáért felelős a normál működésű prosztatában, így fontos szerepe van a jóindulatú prosztata megnagyobbodás kialakulásában a sejtproliferáció emelésével, illetve az apoptózis csökkentésével. A homeosztázis felborulása az androgén szint vagy funkció zavarából eredhet (például megváltozik az androgén receptor érzékenysége DHT stimuláció hatására), illetve a DHT hatására létrejövő növekedési faktorok mennyiségének vagy funkciójának megváltozásából (Carson & Rittmaster 2003). Jóindulatú prosztata megnagyobbodásban szenvedő betegeknél mindkét típusú 5α -reduktáz enzim mennyisége növekedett, és az androgén receptor jeladás mértéke is nőtt. A jóindulatú prosztata megnagyobbodás következményeként alsó húgyúti tünetek is jelentkezhetnek. (Welén & Damber 2011)

Prosztata rák: E betegség kialakulása a jóindulatú prosztata megnagyobbodáshoz hasonlóan több tényező függvénye, viszont szintén androgénfüggő. Az androgén hormonok mennyiségének csökkentése, különösen a tesztoszteron DHT-vá alakulásának megakadályozása az 5α -reduktáz enzim gátlásával a klinikai gyakorlatban általánosan használt, előnyös módszer, azonban a prosztatarák végleges megszüntetése komplex gyógymódot igényel, mely nem teljesen tisztázott még. (Welén & Damber 2011)

Hajhullás: A hajnövekedés, a szemérem-, hónalj és arcszőrzet növekedése androgénfüggő folyamat. Számos androgén célszövet, mint például a prosztata vagy a fejbőrön lévő hajtüszők férfiakban sokkal érzékenyebben reagálnak a DHT-ra, mint a tesztoszteronra. Az androgéntípusú hajhullás kialakulásában a DHT-nak és a 2-es típusú 5α -reduktáz enzimnek is szerepe van. A 2-es típusú 5α -reduktáz enzim gátlásával csökkenthető a hajhullás mértéke. (Drake et al., 1999)

Élővilág:

A DHT a környezetbe kikerülve változásokat idézhet elő a mikrobák működésében. A baktériumok rendelkeznek olyan receptorokkal, melyekhez emlősből származó hormonok képesek kapcsolódni és választ indukálni. A DHT bizonyos **baktériumok szaporodását**

felgyorsítja (például *Escherichia coli*), míg más baktériumokét (például *Pseudomonas aeruginosa*) lelassítja. A szaporodás mellett a DHT befolyásolja az **antibiotikum érzékenységet** is. A baktériumok érzékenysége bizonyos antibiotikumokra megnőhet, míg más antibiotikumokkal szemben nőhet a rezisztencia. Például a *Pseudomonas aeruginosa* érzékenysége növekedett a tobramycinnel és imipenemmel szemben, míg a cefepime-re növekedett a rezisztenciája. (Plotkin et al., 2003). A DHT egyes **enzimek mennyiségét** is befolyásolhatja, halakban pl. a vitellogenin szintézist. A nőtény tilápia (*Oreochromis mossambicus*) hepatocitáinak vitellogenin szintézise növekedett DHT hatására. Az inzulin-szerű növekedési faktor-I szintézisét a nőtény tilápiában gátolta, míg a hím tilápiában serkentette a DHT (Riley et al., 2004). Szivárványos pisztráng esetében mind a hímek, mind a nőtények vitellogenin szintjét, illetve a májban lévő összes P450 enzim mennyiségét csökkentette a DHT. (Shilling & Williams 2000)

A hím japán fürjek (*Coturnix japonica*) hangadó **viselkedését** nagymértékben androgén hormonok szabályozzák. Egy kísérlet során azt tapasztalták, hogy a DHT hatására szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest azon madarak százaléka, melyek vészhangot adtak ki, illetve csökkent a kiadott vészhang száma is. A vészhang adás napokkal korábban szűnt meg, mint a kontroll csoportban. A DHT feltehetőleg a középgagyban elhelyezkedő hangadást szabályozó területre volt hatással. Az agresszivitás vizsgálatakor viszont azt tapasztalták, hogy a madarak kevésbé voltak agresszívek, mint a kontroll csoportban lévők. A herék tömegének összehasonlításakor a kezelt csoportban szignifikánsan alacsonyabb heretömeget kaptak, mint a kontroll csoportban. (Chiba & Hosokawa 2006)

Patkányokkal végzett kísérletekben bebizonyosodott, hogy a DHT befolyásolja a nőtény patkányok **nemi érését** (McDonald & Doughty 1972). Petefészükét eltávolított patkányoknál testtömeg gyarapodást, a csontok ásványi anyag tartalmának növekedését és csonttömeg növekedést is előidézett. 17β -ösztradiollal együtt és önmagában is a **csontok** teljes kalcium tartalmának növekedését és csontnövekedést okozott (Coxam et al., 1996). A DHT nagymértékben gátolja a luteinizáló **hormon szekrécióját** és csökkenti a progeszteron hatását (Turgeon & Waring 1999). Hím patkányokat több héten keresztül DHT-val kezelve a prosztatata megnagyobbodását tapasztalták (Leav et al., 1988). Egér T-sejtekkel végzett in vitro kísérletben 10^{-7} mol/L DHT csökkentette a T-sejtek gamma-interferon, interleukin-4 és interleukin-5 termelését. Hasonló eredményt kaptak a kísérlet in vivo elvégzésével. (Araneo et al., 1991)

1.3 Szerves szennyezők detektálására alkalmas módszerek:

1.3.1 Kémiai analitika

Az EDC-k mérését és detektálását megnehezíti e vegyületek sokfélesége, az eltérő fizikai-kémiai tulajdonságaik. Azonosításuk a különböző környezeti mátrixokban igazi kihívást jelent.

Vízből, illetve szennyvízből való kimutatásuk esetén problémát jelent, hogy e szennyezők legtöbbször csak nyomokban fordulnak elő ($\mu\text{g/L}$ vagy ng/L). A legtöbb analitikai módszer nem képes e vegyületek ilyen kis mennyiségének direkt kimutatására. További problémát jelent, hogy a vegyületek eltérő fizikai-kémiai tulajdonságai nem teszik lehetővé egy standard, általánosan használható módszer alkalmazását az EDC-k monitorozásánál, hanem mindegyik vegyület egyedi technikát igényel. Az olyan összetett környezeti mátrixok, mint a szennyvíz, illetve szennyvíziszap az alacsony koncentrációjú vegyületek kimutatását bonyolulttá teszi, és erősen befolyásolja azok extrakcióját. (Bolong et al., 2009)

Extrakció és tisztítás:

Vizes fázisú, szteroidot tartalmazó minták esetében szűrést követően leggyakrabban szilárd fázisú extrakciót alkalmaznak. Szteroidok extrahálására a Strata-X és Strata C18-E töltetek alkalmasnak bizonyultak. További tisztításra legtöbbször nincs szükség. (Streck, 2009)

A szilárd mintákat általában oldószerrel extrahálják, ultrahang alkalmazása mellett. Az extrakciót követően szükség van további tisztítási lépésekre, mely legtöbbször elsőként szilárd fázisú extrakció alkalmazását jelenti. Második tisztítási lépésként alkalmazható a szilikagéllel töltött kromatográfiás oszlop. (Streck, 2009)

A szteroidok különböző csoportjainak (ösztrogének, androgének, progesztagének és glükokortikoidok) együttes extrakciójára eddig kevés módszer áll rendelkezésre. Szennyvíziszapok esetén erre ultrahangos extrakció alkalmazásával van lehetőség. (Liu et al., 2011)

Kromatográfiás módszerek:

A kromatográfiás elválasztás során a mintát alkotó komponensek két, egymással nem elegyedő fluid fázis között oszlanak meg. A vizsgált minta kis részletét a mozgófázisba juttatjuk, amely a kromatográfiás oszlopon úgy halad át, hogy az oszlopba töltött szilárd, szemcsés hordozóra felvitt állófázissal állandó érintkezésben van. Az állófázis folyadék, a mozgófázis gáz vagy folyadék halmazállapotú lehet. A minta komponensei különböző mértékben oszlanak meg a fázisok között, az eltérő vándorlási sebességük következtében az oszlop mentén szétválnak, majd külön-külön detektálásra kerülnek. (Kristóf 2000)

Gázkromatográfia:

A gázkromatográfiában mozgófázisként gázt, állófázisként szilárd adszorbenst vagy nem illékony folyadékot alkalmazunk. Az injektor egységbe adagolt 0,1-10 μL térfogatú folyadékminta gőzzé alakul, és a szabályozott áramlási sebességű vívőgázzal dugószerűen az oszlopra jut. A gázkromatográfiás oszlopok lehetnek töltött oszlopok vagy kapilláris kolonnák. Az injektor és az

oszlop hőmérsékletét legalább 10 °C-kal magasabb hőmérsékletre kell beállítani, mint a legkevésbé illó komponens forráspontja. (Kristóf 2000)

Egy szilárd fázisú extrakciót követően a gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS) alkalmazása megfelelő módszer a szteroid hormonok kimutatására, mivel komplex mátrixokban is alacsony detektálási limittel rendelkezik. A detektálás érzékenysége tovább növelhető, ha a gázkromatográfot tandem tömegspektrométerekkel kapcsolják össze (GC-MS/MS) (Trinh et al., 2011). A GC-MS módszereknek azonban vannak korlátaik is. A vizsgálandó komponensek illékonnyá tételéhez származékképzésre van szükség, mely 1 vagy több lépésből állhat, és a különböző szteroidok esetén eltérő lehet, mely bonyolulttá teszi a folyamatot. Egyes szteroidok esetében maga a származékképzés is nehezen valósítható meg. (Liu et al., 2011)

1.3.2 *Biológiai hatásmérő tesztek*

A bioriporterek olyan prokarióta (baktérium) vagy eukarióta (gomba, alga, állat) sejtek, melyek élő szenzorként jelzik a szennyező anyagokat, vegyi- és toxikus anyagokat. Olyan egyedi genetikai tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek segítségével képesek adaptálódni a környezetükben előforduló vegyi anyagokhoz, és így lehetővé válik számukra a túlélés és szaporodás, különböző élőhelyek benépesítése. (Xu et al., 2012)

Az alacsony szerveződési szinten lévő bioriporter élőlényeket alkalmazó módszerek számos előnnyel bírnak: gyorsak, pontosak, jól reprodukálhatók és a kémiai analitikához viszonyítva olcsóbbak is. Mindezek mellett a kísérletek nem vetnek fel etikai problémát. A vizsgálati módszerekre jellemző, hogy minél bonyolultabb a módszer, annál nagyobb a környezeti realizmusa, de ezzel együtt egyre inkább nő a hely- és időigénye, valamint a költsége (Calow 1993). A bioriporter rendszerek további előnye, hogy a tényleges hatásról adnak információt, azaz a vegyi anyag biológiailag elérhető mennyiségének hatásáról. Figyelembe kell venni azonban azt is, hogy ami egy bakteriális bioriporter számára hozzáférhető, az nem feltétlenül hozzáférhető egy növény vagy egy emlős számára, így a kapott adatokat nem lehet teljes mértékben az emberre, illetve más élőlényekre is vonatkoztatni (Xu et al., 2012). Az alacsony szerveződési szinten lévő élőlények alkalmazásának hátránya továbbá, hogy sokszor a laborban kapott eredmények nem vonatkoztathatók ténylegesen a környezetben lejátszódó folyamatokra, így alkalmazásuk csak az analitikai módszerekkel együttesen vezetnek célhoz (Calow 1993).

A biológiai hatásmérés elvi háttere:

A genetikai háttér megértését követően bármely nukleinsav alapú manipulációs technikával ellenőrizhetővé tehetjük egy adott sejt vegyületek, illetve vegyületek egy csoportjának hatására történő fénykibocsátását. Az eredeti sejtben a promóter régió szabályozza azokat a géneket, melyek

a vegyi anyagokra, toxinokra való válaszáért felelnek. A bioripporter sejtben a promóter régió és az adott gén közötti kapcsolatot megszüntetik, és helyette egy riporter gént iktatnak közbe. A bioripporter élőlények egyik fő csoportjánál, ha a sejtet külső hatások érik, akkor a promóter régió aktiválódik és a riporter gén átíródik egy olyan riporter fehérjére, mely fluoreszkáló, biolumineszkáló vagy kolorimetriás jel kibocsátásáért felelős. (Xu et al., 2012)

A biolumineszcencia esetében, azoknál a bioripporterekénél, melyeknél a promóter régió és riporter gén specifikusan egy adott vegyületre vagy vegyületcsoportra ad választ, a fénykibocsátás azonosítja az adott vegyületet vagy vegyület csoportot, a fényintenzitás növekedése pedig azok koncentrációjával arányos. Nem specifikus bioripporter élőlényeknél a kibocsátott fény intenzitásának növekedése általános stresszhatásra vagy DNS károsodásra utal. A bioripporter élőlények másik fő csoportjába azok a sejtek tartoznak, melyeket folyamatos fénykibocsátásra terveztek. Jelen esetben a fényintenzitás csökkenése utal a vegyi anyag okozta sejtkárosodásra vagy a metabolizmus károsodására. (Xu et al., 2012)

A toxicitás indikátorai:

- **Biolumineszcencia:** A biolumineszcencia az élőlény által, kémiai folyamat révén generált fény, melyet széleskörűen alkalmaznak a környezeti biomonitoring során. A bakteriális (*Vibrio*, *Photobacterium* és *Photobacterium* nemzetségek) luciferin egy redukált riboflavin-foszfát (FMNH_2), melyet a luciferáz enzim oxidál egy hosszúláncú aldehiddel együtt, molekuláris oxigén jelenlétében. A reakció genetikailag egy 5 génből (*luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD* és *luxE*) álló operon szabályozása alatt áll. A *luxA* és *luxB* gének (*luxAB*) termékei a luciferáz enzimet alkotják, míg a *luxC*, *luxD* és *luxE* (*luxCDE*) gének termékei a hosszúláncú aldehyd utánpótlásáért és regenerációjáért felelnek. A folyamat végeredményeként 490 nm hullámhosszú fény bocsátódik ki. A szentjánosbogárból (*Photinus pyralis*) származó *luc* gén esetében a gén által kódolt Luc protein katalizálja a redukált luciferin oxidációját ATP-Mg^{2+} és oxigén jelenlétében. A reakció eredményeképpen 562 nm hullámhosszú fény keletkezik. (Xu et al., 2012)
- **Fluoreszcencia:** A zölden fluoreszkáló protein fluorofór részének UV vagy kék fénnel való gerjesztését követően zöld fluoreszkáló fény bocsátódik ki. (Ehrig et al., 1995)
- **Kolorimetria:** A *lacZ* gén az *Escherichia coli* baktériumból származik és a β -galaktozidáz (β -gal) enzimet kódolja, mely katalizálja a β -galaktozid kötést tartalmazó diszacharidok monoszacharidokká való hidrolízisét. A β -galaktozidáz enzim az o-nitrofenil- β -D-galaktozid szubsztrátból (melyet külsőleg adunk a rendszerhez) színes terméket hoz létre, mely könnyen detektálható. (Xu et al., 2012)

Prokarióta bioripoter gének alkalmazása:

Bakteriális *lux* gének:

A legegyszerűbb *lux*-alapú bioripoterben csak a *luxAB* gének találhatóak meg, melynek eredményeképpen a bioripoter csak a luciferázt tudja előállítani, így az aldehidet – mely általában *n*-dekanal – külsőleg kell a reakcióhoz adni. Habár erősebb és könnyebben detektálható jelet kapunk a szubsztrát telítettség miatt, a jelzés megjelenése az aktiváló komponens külső hozzáadásának időpontjától fog függeni. Az állandó, szubsztrátfüggetlen biolumineszkáló jelhez olyan bioripoter rendszereket kell létrehozni, melyek a teljes *luxCDABE* génkazettát tartalmazzák. A *luxCDABE* gének széleskörűen alkalmazhatóak a hatékony génexpresszió révén. (Xu et al., 2012)

A BLYAS (Bioluminescent Yeast Androgen System) tesztstruktúra a humán androgén receptort kódoló gént tartalmazza, rendelkezik a teljes *luxCDABE* génekkel, melyek androgén válasz elemek ellenőrzése alatt állnak. Önálló fénykibocsátásra képes, azaz nem igényel külső szubsztrátot vagy másodlagos gerjesztést. További előnye, hogy már pár óra elteltével eredményt kaphatunk, a biolumineszcencia 6 óra elteltével eléri a maximumot (Eldridge et al., 2007). Sanseverino és munkatársai 68 vegyületet vizsgáltak a BLYAS törzsszel annak érdekében, hogy felderítsék e vegyületek androgén hatásának mértékét. A vizsgálatban a DHT standardként szolgált, EC_{50} értéként $1.1 \pm 0.5 \times 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációt állapítottak meg (Sanseverino et al., 2008)

A *lacZ* gén:

A Yeast Estrogen Screen (YES) vizsgálat olyan genetikailag módosított *Saccharomyces cerevisiae* élesztő sejteket alkalmaz, melyek plazmidja tartalmazza a humán ösztrogén receptort kódoló gént, és olyan ösztrogén válasz elemet, mely a *lacZ* riporter génhez van kapcsolva. Az ösztrogén hatású vegyület bejutva a sejtbe hozzákapcsolódik az ösztrogén receptorhoz, mely dimerizáció után az ösztrogén válasz elemhez kötődik, amely viszont beindítja a riporter gén átíródását. A keletkező β -galaktozidáz enzim a rendszerhez adott szubsztrátot elbontja, és színes termék keletkezik. Az ösztrogén hatás mértéke a színintenzitással arányos. A Yeast Androgen Screen (YAS) vizsgálat esetében az élesztők a humán androgén receptort kódoló gént tartalmazzák (Streck, 2009). E módszerek előnyei, hogy viszonylag olcsók, minőségi és mennyiségi meghatározásra is alkalmasak, továbbá a színintenzitás általánosan használt spektrofotométerrel mérhető (Eldridge et al., 2011). A 3-5 napos inkubációs idő miatt viszont kevésbé alkalmas módszerek nagyszámú szennyező vegyület vizsgálatához. A *lacZ*-alapú bioripoter rendszerek további hátránya, hogy a β -galaktozidáz enzim természetesen is jelen van környezeti mátrixokban, így magasabb háttéraktivitással kell számolni (Xu et al., 2012). A DHT esetében a YAS vizsgálatban kapott EC_{50} érték hasonló volt a BLYAS tesztben meghatározott EC_{50} értékhez (Eldridge et al., 2007).

Eukarióta bioriporter gének alkalmazása:

Szentjánosbogár *luc* gén:

A *luc* gén népszerű, mint riporter gén a magas, így jól detektálható fénykibocsátás és a gyors válaszadás következtében. A Luc protein nem igényel poszt-transzlációs módosítást és azonnal rendelkezésre áll, amint megtörtént az átíródás. A *luc* riporter rendszereknél viszont a luciferint külsőleg kell a rendszerhez adni, így a folyamatos, önműködő monitorozást nem teszi lehetővé. Mindazonáltal nagyon érzékeny detektálási rendszer, mely számos szerves vegyület, nehézfém és hormonháztartást megzavaró vegyület esetében alkalmazható. (Xu et al., 2012)

A *gfp* gén:

A zölden fluoreszkáló protein (GFP) egy fotoprotein, melyet az *Aequorea victoria* nevű medúzából származó *gfp* gén kódol. A fénykibocsátáshoz nincs szükség szubsztrátra, viszont külső fényforrást igényel a fluoreszkáló fény kibocsátásának aktiválásához. A GFP és változatai kvázi-folytonosan működő, közel valós idejű szenzorok, melyeket jól lehet alkalmazni a környezeti monitoring során. Különböző színű fénykibocsátásuk révén, két fotoproteint együttesen is alkalmazhatunk, ahol egy-egy szín különböző hatásokat jelez. A prokariótákkal szemben a GFP eukariótákban való alkalmazását nehezíti, hogy az eukarióta sejtben előfordulhatnak természetes, fluoreszkáló vegyületek, melyek révén magasabb lesz a háttérfluoreszcencia. Ezáltal csökken a jel detektálhatósága, különösen alacsony populációméret, illetve gyenge indukció esetén. (Xu et al., 2012)

Humán sejtvonalak, mint bioriporterek:

A humán sejt-alapú bioriporter rendszereknek leggyakoribb detektálási célpontja az ösztrogén, illetve androgén hatású vegyületek (Xu et al., 2012). A CALUX (Chemically Activated Luciferase) vizsgálat – mely humán mellrák sejtvonalat alkalmaz (T47D), és e sejtek a luciferáz enzimet kódoló gént tartalmazzák – ösztrogénekre adaptált változata az ER-CALUX, míg az androgénekre az AR-CALUX. Az E-Screen vizsgálat során szintén humán mellrák sejteket (MCF-7) alkalmaznak, azonban itt a sejtproliferáció a végpont. Ösztrogén hatású vegyület esetében növekszik a sejtproliferáció. Androgén hatású vegyületeknél az A-Screen vizsgálatot végzik. A mellrák sejtek ebben az esetben androgén receptort tartalmaznak, és a sejtproliferáció csökkenése utal az androgén hatásra. (Streck, 2009)

1.4 Az endokrin rendszert zavaró anyagok eliminálására alkalmazható módszerek

1.4.1 Fizikai-kémiai módszerek

A porított aktív szén az EDC-k nagy részét képes a vízből adszorpció útján eltávolítani. Az oxidáció szintén ígéretes módszer, különösen akkor, ha klórt vagy ózont alkalmaznak oxidáló szerként, azonban a módszer hátránya, hogy gyakran olyan reakciótermékek keletkeznek, melyek toxikusabbak a kiindulási vegyületnél. Az ultraibolya fotolízis és az ioncsere membránok habár hatékonyan távolítják el az EDC-ket, megvalósíthatóságuk a szennyvíztisztításban korlátozott. A membrán filtrációs módszerek - mint például a fordított ozmózis és a nanofiltráció – ígéretes alternatívák lehetnek e vegyületek kármentesítésére. A fordított ozmózis technika majdnem teljesen képes eltávolítani a szennyezést, viszont a nagy energiaigénye költségessé teszi, így kevésbé alkalmazott módszer. A nanofiltráció során többféle mechanizmus is szerepet játszik az EDC-k eltávolításában. E főbb folyamatok az adszorpció, a méretszelekció és töltéstasyítás. (Bolong et al., 2009)

1.4.2 Biodegradáció

A biodegradáció szerves vegyületek, szerves szennyezőanyagok komplexitásának csökkentése vagy teljes lebontása, mineralizációja biológiai hatásra. A biodegradáció történhet aerob vagy anaerob úton. Az élőlények közvetlenül vagy közvetett módon fejtik ki biodegradáló hatásukat. Közvetlen biológiai bontás során a biodegradálható szerves (szennyező)anyag szubsztrátként szolgál az élőlény számára, ilyenkor az élőlények enzimjeik segítségével leggyakrabban energiát termelnek (katabolizmus) a bontható vegyületből vagy kometabolizmus során bontják le azokat. A kometabolizmus során a mikroorganizmus számára tápanyagul nem szolgáló kosubsztrát biotranszformációja, módosulása, lebontása történik, gyakorta egy másik, tápanyagul szolgáló szubsztrát átalakulásával egybekötve. A kosubsztrátból kometabolizmussal nyert terméket a mikroorganizmus nem hasznosítja. Környezetünk élő szervezetei a biodegradálendő szubsztrátok nagy részét, főként a nagyobb méretű molekulákat a környezetbe kibocsátott exoenzimjeik segítségével bontják. A sejtől kibocsátott vagy a sejt pusztulásával a környezetbe kerülő enzimek hosszabb-rövidebb ideig működőképesek maradnak az élőlények jelenléte nélkül is és katalizálják a biodegradációs folyamatokat. A xenobiotikumok biodegradálhatósága függ a mikrobaközösség genetikai tulajdonságaitól, fiziológiai állapotától, a xenobiotikum biológiai hozzáférhetőségétől, mozgékonyaságától, vízdoldhatóságától, polaritásától, más szennyezőanyagokkal és a szennyezett környezeti elem fázisaival való kölcsönhatásától. A természetes biodegradációt környezetvédelmi biotechnológiákban hasznosítjuk, mind élőlények közösségeinek alkalmazásával, mind pedig enzimtechnológiákban. In situ remediációs technológia

alkalmazása esetén foglalkozni kell a bontatlan maradékok mennyiségével és minőségével, hiszen az eredeti vegyületnél toxikusabb vegyület is keletkezhet a biodegradáció során. (Gruiz et al., 2001)

A biodegradációs célra alkalmazni kívánt mikroszervezetek, biológiai készítmények felhasználási feltételeit a 16/2002. (IV. 10.) EüM rendelet szabályozza. Ennek értelmében az alkalmazott mikroszervezet nem lehet patogén, legalább faji szinten meghatározott, törzsgyűjteményben megtalálható és ismert bontási spektrummal rendelkezik.

1.4.2.1 Androgének bontására képes mikroszervezetek

A tesztoszteron átalakítására szakirodalmi adatok alapján a következő mikroorganizmusok képesek: *Mucor griseocyanus*, *Thamnostylum piriforme*, *Nectria haematococca*, *Fusarium culmorum*, *Cephalosporium aphidicola*, *Fusarium oxysporum* var. *cubense*, *Curvularia lunata*, *Pleurotus oestreatus*, *Botrytis cinerea*, *Bacillus stearothermophilus*. A bontás során olyan metabolitok keletkeztek, melyek még androgén aktivitással rendelkeztek, így e szervezetek nem tudják a hormonháztartás megzavarásának kockázatát teljes mértékben megszüntetni (Bhatti & Khera 2012). A tesztoszteron bontását viszont a *Comamonas testosteroni*, illetve a *Rhodococcus restrictus* már hatékonyan véghez tudta vinni (Horinouchi et al., 2012).

Az androszténdion metabolizmusát *Mucor piriformis*, *Thamnostylum piriforme*, *Rhodococcus* sp., *Cephalosporium aphidicola*, *Curvularia lunata* és *Beauveria bassiana* mikrobákkal vizsgálták, azonban ebben az esetben is androgén aktív metabolitokat kaptak. (Bhatti & Khera 2012)

Az androszt-4-én-3-on részleges bontására a *Fusarium culmorum* és a *Cephalosporium aphidicola* volt képes. (Bhatti & Khera 2012)

A dehidroepiandroszteront a *Mucor piriformis* és a *Rhizopus stolonifer* alakította át. (Bhatti & Khera 2012)

A gyógyászatban jelentős szteroidok közül az adrenoszteront a *Cephalosporium aphidicola*, a *Fusarium lini* és a *Trichothecium roseum*, míg a meszterolont az előbbi kettőn kívül a *Rhizopus stolonifer* bontotta. (Bhatti & Khera 2012)

1.4.2.2 Szteroid bontó enzimek

A szteroidok katabolizmusában szerepet játszó enzimekről jelenleg még kevés ismeretünk van, annak ellenére, hogy a szterol bontó *Rhodococcus*-ok iránt mind az ipar, mind a gyógyszergyárak felől nagy az érdeklődés. A szteroidok bakteriális transzformációjának további nagy jelentősége, hogy egyes köztitermékek felhasználhatóak, mint gyógyszerkészítmények hatóanyagai (De las Heras et al., 2012). A szteroid bontó enzimek és a metabolikus útvonalak

megismerése a környezetvédelem szempontjából is fontos lenne, hiszen idővel ezen enzimek akár szennyvíztisztítóknak is felhasználhatóak lehetnek a szteroidok hatékony eltávolítására.

- A hidroxiszteroid-dehidrogenázok (HSD-k) a rövidláncú dehidrogenázok/reduktázok vagy aldo-keto reduktázok szupercsaládjába tartozó enzimek, melyeknek fontos szerepük van a szteroid hormonok metabolizmusában. A HSD-k a szteránváz 3-as, 7-es, 12-es, 17-es és 20-as szénatomján lévő hidroxil- vagy ketocsoportján mutatnak aktivitást (Kisiela et al., 2012).
- A 3-ketoszteroid- Δ^1 -dehidrogenáz (KstD) enzimek (melyek tulajdonképpen flavoproteinek) szintén kulcsszerepet játszanak a szteroidok mikrobiális metabolizmusában. Az egyes KstD izoenzimek eltérő szubsztrátspektrummal és funkcióval rendelkeznek. A KstD1 és KstD2 enzimek a 3-keto-4-én szerkezetű szteroid szubsztrátokat részesítik előnyben, míg a KstD3 enzim a telített A gyűrűvel rendelkező 3-ketoszteroidokat részesíti előnyben. A KstD enzimek a szteránváz 1-es szénatomján az α , míg a 2-es szénatomján a β állású hidrogén eliminációját katalizálják, és a 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz (Ksh) enzimmal együtt a szteránváz B gyűrűjének felnyílását okozzák (De las Heras et al., 2012).
- A Ksh-ok valójában 2 komponensű enzimrendszerek, melyek egy terminális oxigenázból (KshA) és egy ferredoxin reduktázból (KshB) állnak. Az enzimrendszer e két tagját kódoló géneket, a *kshA*-t és a *kshB*-t először a *Rhodococcus erythropolis* SQ1 törzsben fedezték fel, mely törzs legalább 3 *kshA* homológot tartalmaz. (Petrusma et al., 2011)
- A szteroidok bontásában dioxigenáz enzimek is részt vesznek, melyek aromás gyűrű felnyitásában játszanak szerepet (Skowasch et al., 2002). A szteránváz megnyitásával olyan metabolitok keletkeznek, melyek bontása már egyszerűbb enzimatis folyamatokat igényel, azonban a teljes bontási út még nem teljesen feltárt (Horinouchi et al., 2012).

1.5 A biodegradációra alkalmas *Rhodococcus* és *Cupriavidus* nemzetség jellemzése

1.5.1 *Rhodococcus* nemzetség

A *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó baktériumok az *Actinomycetales* renden és *Nocardiaceae* családon belül helyezkednek el. Nagyon változatos csoportot képviselnek és számos élőhelytípusban előfordulnak. Több szerves vegyület degradációjára is képesek, melyek között toxikus és nehezen bomló vegyületek is megtalálhatók. A *Rhodococcus* baktériumok képesek lebontani rövid és hosszú szénláncú alkánokat, halogénezett és nitro csoportot tartalmazó aromás

vegyületeket, heterociklusos és policiklusos aromás vegyületeket. Az aromás vegyületek degradációját az teszi lehetővé e baktériumok számára, hogy számos dioxigenáz enzimmel rendelkeznek. A széles bontási spektrumhoz hozzájárul még, hogy a *Rhodococcus* baktériumok többféle monooxygenáz enzimmel is jellemezhetőek. A bontásban résztvevő enzimeik sokféleségét nagyméretű genomjuk teszi lehetővé. A bontásért felelős gének lineáris plazmidokon helyezkednek el, melyek szerepet játszanak a géntranszferben és a rekombinációban is. Hatékony biodegradációs képességük fiziológiai tulajdonságaiknak is köszönhető, mint például a különféle szubsztrátokkal, illetve oldószerekkel szembeni tolerancia (Larkin et al., 2005). A toxikus hatásokkal szembeni ellenálló képességük annak tulajdonítható, hogy a membránjuk zsírsav összetételét meg tudják változtatni. A hidrofób szubsztrátok metabolizációjához hozzájárul, hogy sejtfaluk mikolsavat tartalmaz, mely a hidrofób vegyületek felvételét segíti elő. Felületaktív anyagok termelésével e baktériumok képesek hidrofób felületekhez kapcsolódni és a hidrofób vegyületeket diszpergálni. Biofilm képző tulajdonságuk előnyössé teszi alkalmazásukat biotechnológiai célokra, illetve növeli a toxikus hatásokkal szembeni toleranciájukat. A *Rhodococcus* baktériumok tápanyagszegény körülmények között is fennmaradnak, továbbá a szennyezőanyagok degradációját nem mérséklük akkor sem, ha környezetükben könnyebben bontható szénforrások is előfordulnak. (Martínková et al., 2009)

1.5.2 *Cupriavidus* nemzetség

A *Betaproteobacteria* osztályba és *Cupriavidus* nemzetségbe tartozó baktériumok aerob, Gram-negatív, pálcika alakú baktériumok. Fenolok, különböző alifás alkoholok, az etanol és a metanol degradációjára is képesek. Ezenkívül számos fém toxikus hatásával szemben rezisztenciát mutatnak. (Friman et al., 2012)

2 Célkitűzés

Munkánk során célunk volt egy olyan vizsgálati rendszer kialakítása, amellyel megbízhatóan mérhető a DHT-val terhelt rendszerben az androgén hatás. Ennek érdekében egy biolumineszcencia alapú, a hormon- és citotoxikus hatás mérésére alkalmas élesztő alapú bioripporter rendszert alkalmaztunk, amely tesztrendszer a *Saccharomyces cerevisiae* genetikailag módosított törzseit alkalmazza tesztstruktúráként: egyrészt az androgén hatás mérésére alkalmas BLYAS törzset, valamint a citotoxicitás mérésére alkalmas BLYR törzset. Mindezek alapján a fénykibocsátás változásból következtethetünk az adott minta hormon-, illetve citotoxikus hatására. E vizsgálatokat párhuzamosan kémiai analitikai mérésekkel egészítettük ki.

További célunk volt a DHT biodegradációjára alkalmas mikroorganizmusok kiválasztása céljából egy meglévő, szénhidrogén bontási potenciállal rendelkező törzsgyűjtemény vizsgálata. Célkitűzéseink között szerepelt a jó bontási potenciállal rendelkező törzsek közül azok szelekciója, amelyek toxikus metabolitok nélkül képesek a DHT degradációjára.

Célkitűzéseink alapján az alábbi hipotéziseket vizsgáltuk:

- H0: A bontási kísérletben felhasznált törzsek közül egyik sem képes a DHT bontására a 72 órás vizsgálat alatt.
- H1: A bontási kísérletben felhasznált törzsek közül legalább egy képes lesz a DHT bontására a 72 órás vizsgálat alatt.

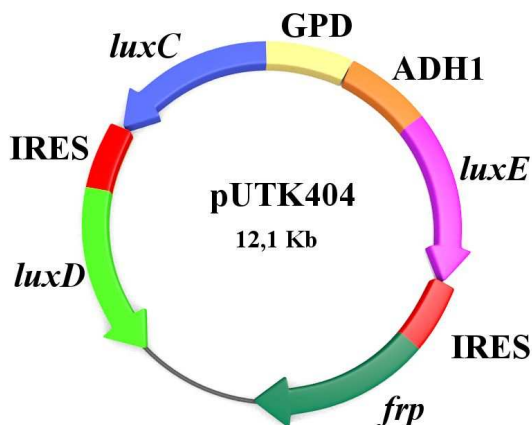
Ellenhipotézisünk alapját a *Rhodococcus* és *Cupriavidus* nemzetségbe tartozó baktériumok gyűrűs szerkezetű vegyületeket bontó képességéről, továbbá e baktériumokban jelen lévő, a szteroidok (DHT) bontásában részt vevő enzimekről szóló szakcikkek képezik. (Cserhádi et al., 2012; De las Heras et al., 2012; Friman et al., 2012; Kisiela et al., 2012; Kriszt et al., 2012; Larkin et al., 2005; Martínková et al., 2009; Petrusma et al., 2011; Yoshimoto et al., 2004).

3 Módszerek

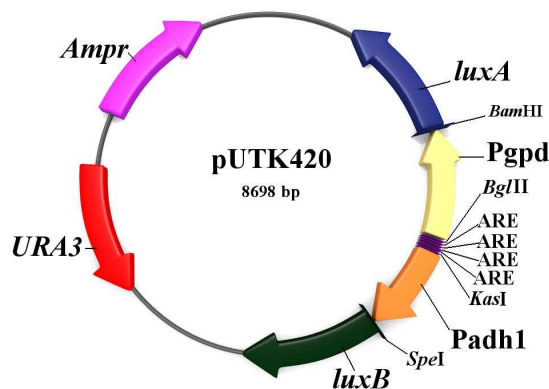
A kísérletekhez a DHT-t a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be, és acetonban oldva 0,1 µg/ml-es koncentrációjú törzsoldatot készítettünk.

3.1 A hormonhatás és a citotoxikus hatás kimutatására alkalmazott biolumineszcens élesztő alapú bioriporter rendszerek

A *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS olyan genetikailag módosított élesztő tesztorganizmus, mely saját biolumineszcenciával rendelkezik és androgén hatású vegyületek detektálására alkalmazható. A biolumineszcencia keletkezésében a sejt kromoszómáján található, humán androgén receptort (hAR) kódoló gén, illetve a pUTK404 és pUTK420 plazmidokon elhelyezkedő gének vesznek részt (3. és 4. ábra). A pUTK404 plazmidon a *Photorhabdus luminescens* baktériumból származó, a FMNH₂-ot kódoló *luxC*, *luxD* és *luxE* gének helyezkednek el, valamint a *Vibrio harveyi* baktériumból származó *frp* gén, mely a flavin oxidoreduktáz enzimet kódolja (Eldridge et al., 2007). A *luxC* és *luxE* gének egyidejű, kétirányú átírását az ADH1 és GPD divergens (szétágazó) promóterek biztosítják. A *luxD* és *frp* géneknek az előbbi génekkel való együttes átírását a *luxC* és *luxD*, valamint a *luxE* és *frp* gének közé inszertált közbenső riboszóma belépési hely (IRES) teszi lehetővé (Gupta et al., 2003). A pUTK420 plazmidon – melyet a pUTK401 plazmid módosításával hoztak létre – 4 androgén válasz elem (ARE) található. A pUTK401 plazmid tartalmazza a *luxA* és *luxB* géneket, melyek átírását az ADH1 és GPD divergens promóterek szabályozzák. Az androgén válasz elemeket e két promóter közé inszertálták, létrehozva így a pUTK420 plazmidot. Ha androgén hatású vegyületek jutnak be a sejtbe, akkor összekapcsolódnak a hAR-ral. Ezután e komplex kölcsönhatásba lép az androgén válasz elemekkel, melyek beindítják a plazmid átíródását. (Eldridge et al., 2007)



3. ábra: A pUTK404 plazmid felépítése Sanseverino et al. (2005) alapján



4. ábra: A pUTK420 plazmid felépítése Eldridge et al. (2007) alapján

A BLYR (Bioluminescent Yeast Reporter) teszt segítségével a szennyező vegyületek citotoxikus hatását mérhetjük. E tesztrendszerben az élesztők állandó fénykibocsátásra képesek, a citotoxikus hatást a biolumineszcencia gátlása jelzi. (Eldridge et al., 2007)

3.1.1 Előkísérlet, a teszt standardizálása

Az élesztők szaporításához uracil és leucin szelektív tápoldatot ($YMM_{ura-, leu-}$) alkalmaztunk, amelyet 5 további oldattal egészítettünk ki: vitamin oldat (mely tiamint, piridoxint, pantoténsavat, inozitolt és biotin oldatot tartalmaz), 20%-os glükóz oldat, L-aszparaginsav oldat, L-treonin oldat és réz-szulfát oldat (lásd függelék). Minden összetevőt autoklávbán steriliztük (121°C , 1,2 bar, illetve a glükóz oldat esetében 110°C , 1 bar) a vitamin oldat és a réz-szulfát oldat kivételével, amelyeket pedig $0,2\ \mu\text{m}$ pórusátmérőjű membránszűrőn szűrtünk át. Az összeállítást lamináris boxban, steril eszközökkel végeztük a befertőződés elkerülése végett. Miután tápoldatunk elkészült, a -80°C -on tárolt BLYAS és BLYR inokulumot 300 ml-es Erlenmeyer lombikban szaporítottuk 30 ml tápoldatban, majd termosztátban rázattuk (28°C , 200 rpm). A törzsszuspenziót egy éjszakán keresztül szaporítottuk, majd sejtsűrűségét 600 nm-en (OD_{600}) 1-re állítottuk be (Sanseverino, 2008).

A kísérletek során a mintákat fehér microtiter lemezekben vizsgáltuk. A DHT-ból hígítási sort készítettünk, 2 párhuzamosban. A hígítási sort a szakirodalomban megadott EC_{50} értékhez igazítva (Sanseverino et al., 2008) $3,44\text{E-}07\ \text{mol/dm}^3$ ($0,1\ \mu\text{g/ml}$) koncentrációról indítottuk, melyet 1:2 hígítással $1,68\text{E-}10\ \text{mol/dm}^3$ ($4,8\text{E-}05\ \mu\text{g/ml}$) koncentrációig hígítottunk.

Két negatív kontroll használata is szükséges volt: (1) a hígításhoz használt oldószert és a tesztstruktúrát tartalmazó kontroll, valamint (2) magát a tesztstruktúrát tartalmazó kontroll.

A hígítási sor elkészítése, illetve a minták és az oldószer kiadagolása (20 µl/microwell) után a beállított sejtsűrűségű tesztstruktúra 200 µl-ét adagoltuk a microplate megfelelő részeibe és a microlemez 30°C-on inkubáltuk 5 órán keresztül. Ellenőriztük a kezdő fénykibocsátást, majd óránként mértük VictorX Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer Inc.) segítségével.

Az eredmények értékelése során első lépésként kiszámítottuk a negatív kontrollok százalékos arányát, hogy meggyőződjünk értékeink hitelességéről. Ez az arány határozta meg azt, hogy a mérés során kapott eredmények hitelesek illetve elfogadhatóak-e. Amennyiben ez az érték meghaladja a 150%-ot, akkor a hígító oldat nagy valószínűség szerint tartalmaz valamilyen szervezetre ható anyagot, így a mérést meg kell ismételni. (Sanseverino et al., 2008)

A BLYAS tesztstruktúra értékelése során az EC₅₀ értéket határoztuk meg. Az X tengelyen a koncentráció értékek logaritmusát, míg az Y tengelyen a biolumineszcencia értékeket ábrázoltuk, így a görbénk szabályos szigmoid alakot mutatott. Az S-görbe egyenes szakaszára lineáris függvényt illesztettünk, melynek egyenlete alapján kaptuk meg a minta fénykibocsátásának a kontrollhoz viszonyított 50%-os növekedését eredményező koncentrációt.

3.2 Bontási kísérlet

A DHT-nal végzett vizsgálataink során szénhidrogénnel szennyezett területekről (*Rhodococcus*) és szennyezetlen talajból (*Cupriavidus*) izolált, már meglévő törzsgyűjteménybe tartozó mikroszervezetekkel dolgoztunk. Továbbá alkalmaztunk egy nem bontó törzset (*Escherichia coli*) tartalmazó és egy mikrobamentes kontrollt (vak) is. A fenti mikroszervezeteket bontási kísérletbe állítottuk, a bontási rendszerekből származó felülúszó mintákat pedig egy komplex vizsgálati rendszerrel vizsgáltuk, amely magába foglalta a biológiai (BLYAS, BLYR) és kémiai analitikai (GC-MS) módszereket.

A bontási kísérletbe vont mikroszervezetek:

- *Rhodococcus erythropolis* AK35
- *Rhodococcus globerulus* AK36
- *Rhodococcus pyridinivorans* AK37
- *Rhodococcus gordoniae* AK38
- *Rhodococcus ruber* AK41
- *Rhodococcus aetherivorans* AK44

- *Rhodococcus coprophilus* N774
- *Rhodococcus pyridinivorans* K402
- *Cupriavidus basilensis* BRB6A
- *Cupriavidus basilensis* ÓR16

Az inokulum előállítása:

A bontási kísérletre választott, -80°C-on tárolt törzseket LB agarra szélesztve inkubáltuk (28°C) 72 órán keresztül. A telepek tisztaságának ellenőrzése után 50 ml LB tápoldatot oltottunk be egyetlen tiszta telepből származó inokulummal és ráztunk (28°C, 200 rpm) 72 órán keresztül. Az inokulumok sejtsűrűségét beállítottuk OD600 = 0,6-ra.

Kísérleti rendszerek:

A biodegradációs kísérletek Erlenmeyer lombikban (300 ml) folytak, 3 párhuzamos rendszer beállításával. A bontási kísérletek közege 100 µg/ml DHT-val (50 µl) kontaminált LB tápoldat (45 ml) volt, amelyet 5 ml inokulummal oltottunk be. A bontás során alkalmazott mikrobamentes kontroll szintén 100 µg/ml DHT-val (50 µl) kontaminált LB tápoldatot (50 ml) tartalmazott.

A párhuzamos bontási rendszereket 3 napon keresztül inkubáltuk (28°C, 200 rpm) és naponta mintáztuk (1. kép). A mintákat lecentrifugáltuk (15000 rpm, 4°C, 20 min.), a felülúszót dekantáltuk és a pellettől külön tároltuk -20°C-on a további vizsgálatokig.

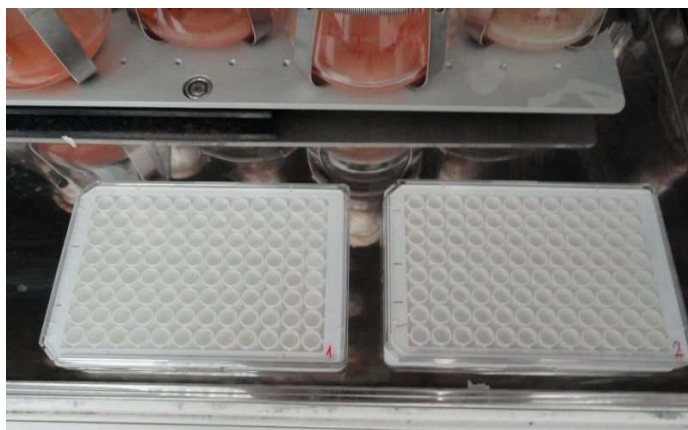
A degradációs kísérlet felülúszó mintáit biológiai hatáselemzés alá vontuk, amely során két biolumineszcens élesztő alapú bioripporter tesztorganizmust – a BLYAS hormonhatást vizsgáló és a BLYR citotoxikus hatást vizsgáló tesztorganizmust – alkalmaztunk.



1. kép: A bontási rendszerek a termosztátban

3.2.1 A bontási kísérletek biológiai hatáselemzése

Az élesztő tesztorganizmusok előkészítése az előkísérletben is alkalmazott eljárás szerint történt. A vizsgálandó felülúszókból 20 µl-t adagoltunk a microplate megfelelő részeibe. A vizsgálatok során pozitív kontrollként a bontási kísérletből származó pozitív kontrollokat (mikrobamentes kontroll, illetve *E. coli*) használtuk. Negatív kontrollként metanolt, LB tápoldatot és élesztő tesztorganizmust tartalmazó, illetve csak a tesztorganizmust tartalmazó kontrollt használtunk. Ezután a beállított sejtsűrűségű tesztorganizmust 200 µl-ét adagoltuk a microplate megfelelő részeibe és a microlemezt 30°C-on inkubáltuk 5 órán keresztül (2. kép). Ellenőriztük a kezdő fénykibocsátást, majd óránként mértük VictorX Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer Inc.) segítségével.



2. kép: A vizsgálatra előkészített microplate az inkubáció során

A bontási kísérlet felülúszó mintái esetében, az androgén hatás értékelése során egy lumineszcencia intenzitási értéket határoztunk meg Froehner és munkatársai (2002) által kidolgozott, de módosított egyenlet alapján. Az egyenlet által kapott eredmény reciprok értékének alkalmazásával nem biolumineszcencia gátlási, hanem intenzitási értékben adtuk meg százalékos arányban a kontrollhoz viszonyított fénykibocsátás változást.

$$\text{Intenzitási érték (\%)} = \left[\left(\frac{K - M}{K} \right) * 100 \right] * (-1)$$

ahol a K a teszt során alkalmazott negatív kontroll biolumineszcencia értékét, M pedig a minta fénykibocsátási értékét jelenti.

A citotoxikus hatás számszerűsítésére szintén a Froehner és munkatársai által kidolgozott egyenletet használtuk, de módosítás nélkül, így biolumineszcencia gátlási értékben kaptuk meg a kontrollhoz viszonyított százalékos fénykibocsátás változást.

3.2.2 A bontási kísérlet értékelése kémiai analitikai mérésekkel

A kémiai analitikai méréseket a Wessling Nemzetközi Kutató és Oktató Központ Közhasznú Nonprofit Kft. (WIREC) végezte. A felülúszók esetében, a mintaelőkészítés során a mintákat eredeti mintatartó edényükben deuterált epitesztoszteron kísérőstandarddal adalékolták 25 µg/L-es koncentrációsinten és homogenizálták. A pelletek esetében 25 ng deuterált epitesztoszteron kísérőstandardot adagoltak a mintákhoz. Mindkét mintatípust 2x1 ml ciklohexánnal extrahálták. A ciklohexános fázisokat nitrogénáramú bepárlóval szárazra párolták, és a bepárlási maradékokat származékolták. A származékolt célvegyületek meghatározása GC-MS technikával történt. A módszer a felülúszó esetében 0-100 µg/L koncentrációtartományban lineáris, az alsó meghatározási határ 1 µg/L. A pellet esetében 0-100 µg/L koncentrációtartományban lineáris a módszer, az alsó meghatározási határ 0,66 µg/L, mivel az eredményeket a kezdeti 1,5 ml inokulumra vonatkoztatták.

3.3 Statisztika

Munkánk során a statisztikai értékelést STATISTICA 7 (StatSoft Hungary Kft.), PAST (Hammer et al., 2001) és Microsoft EXCEL (Microsoft Inc., 135 Redmond, USA) szoftverrel végeztük.

Elsőként az egyes mintákra kapott biológiai és analitikai eredmények közötti összefüggést állapítottuk meg pontfelhő diagram segítségével. E diagram nemcsak az összefüggés jellegéről, hanem a kiugró értékekről is ad információt. (Reiczigel et al., 2010)

Második lépésként, az összefüggés ismeretében, a Pearson-féle korrelációs együtthatót számítottuk ki az értékek közötti korreláció megállapítására. A Pearson-féle korrelációs együttható akkor alkalmazható, ha a változóink közötti kapcsolat monoton és lineáris. Az együttható értéke -1 és +1 közé esik. A nulla körüli értékek gyenge, a -0,6 és -1 közötti értékek erős negatív, míg a +0,6 és +1 közötti érték erős pozitív korrelációs kapcsolatokat jeleznek. (Reiczigel et al., 2010)

A fentiekén kívül, az eredmények kiértékeléséhez az alábbi ökotoxikológiai mérési végpontokat alkalmaztuk:

- Hatásos koncentráció érték (Effect concentration): A minta azon koncentrációja, amely a vizsgálati végpont 50%-os változását okozza.
- Káros hatást még nem mutató vegyi anyag koncentráció (No Observed Effect Concentration; NOEC): Az a legnagyobb koncentráció, amelynek még nincs megfigyelhető hatása.
- IC₂₀ (Inhibitory Concentration): A minta azon koncentrációja, mely a vizsgálati végpont 20%-os csökkenését okozza a kontrollhoz képest.

4 Eredmények és értékelésük

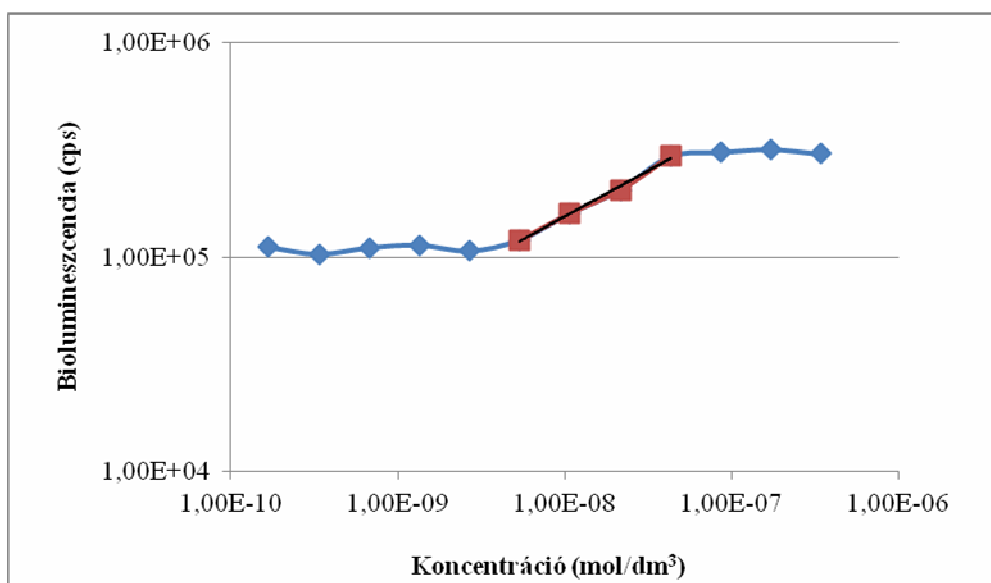
4.1 Az előkísérlet eredményei

A biológiai hatáselemzés kivitelezésekor a vizsgálatok első részeként a DHT androgén hatását ellenőriztük a tesztorganizmokra.

A negatív kontrollok százalékos aránya mindegyik tesztorganizmet esetében 150% alatt volt. A BLYAS törzsnél 60,3 %-ot, míg a BLYR törzsnél 81,8 %-ot kaptunk, így eredményeinek hitelesnek tekinthetők

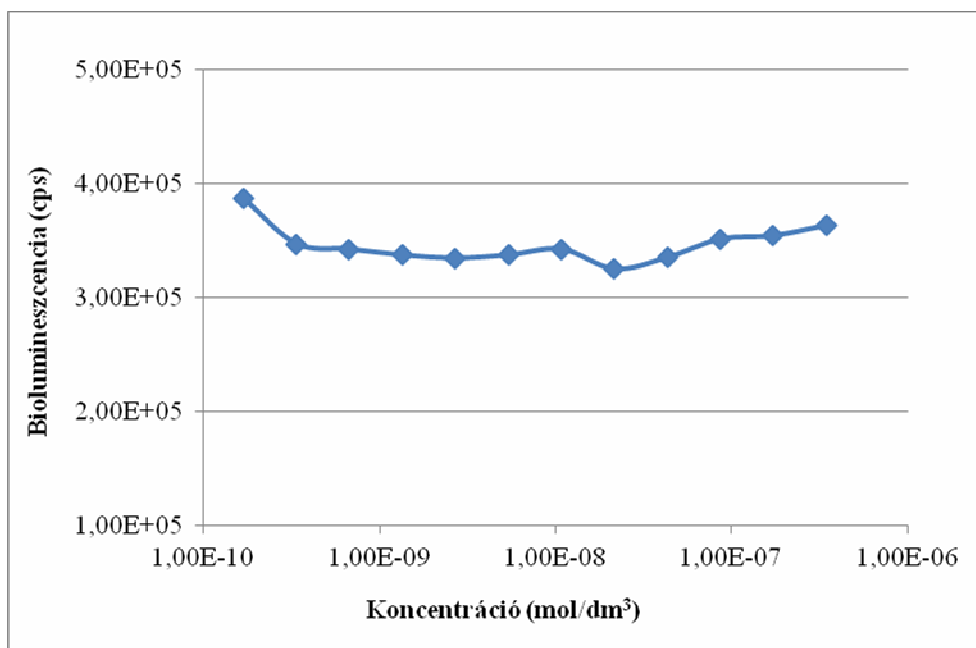
4.1.1 Dihidrotesztoszteron

A DHT mérése során az 5 órás inkubációs időt figyelembe véve, saját eredményeink az 5. ábrán látható görbét adták. Az EC_{50} értékre 5,52 ng/ml ($1,90E-08$ mol/dm³) koncentrációt kaptunk, mely megfelel a szakirodalomban leírt koncentrációnak (Sanseverino et al., 2008). A NOEC érték $1,62E-03$ µg/ml ($5,58E-09$ mol/dm³) a grafikon alapján. A bontási kísérletben figyelembe véve a kapott EC_{50} és NOEC értékeket, 0,1 µg/ml kiindulási végkoncentrációt állítottunk be.



5. ábra: A BLYAS tesztorganizmet biolumineszcencia változása dihidrotesztoszteron hatására a standardizálás során

A hígítási sor kezdő koncentrációjának megválasztásánál figyelmet fordítottunk arra is, hogy a DHT ne legyen citotoxikus hatással a tesztorganizmokra. A 6. ábrán látható, hogy a DHT az adott koncentrációkban nem okozott a kontrollhoz képest biolumineszcencia gátlást, azaz nem volt citotoxikus hatással a BLYR tesztorganizmetre.

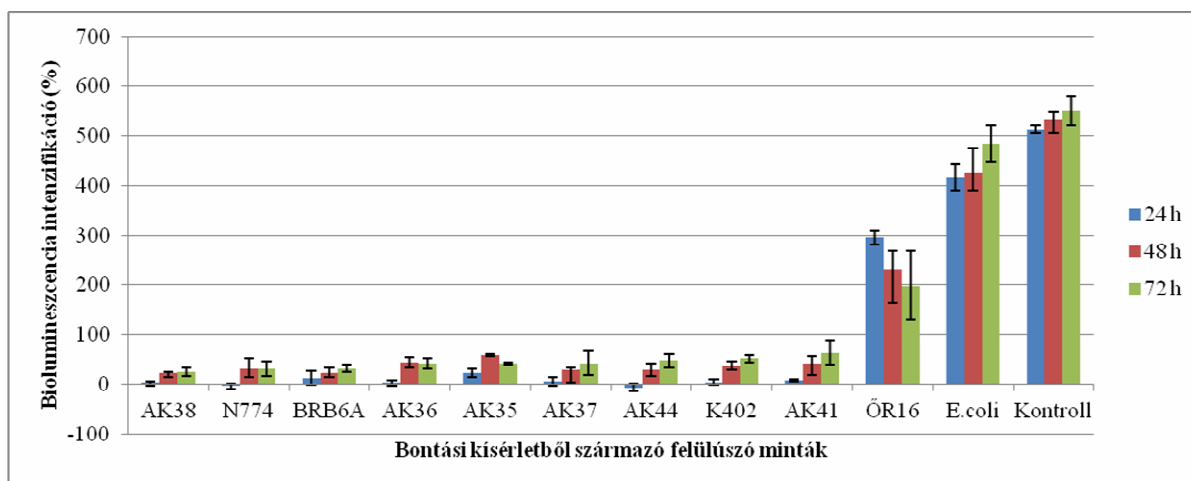


6. ábra: A dihidrotesztoszteron hígítási sorhoz tartozó biolumineszcencia értékek BLYR tesztszervezettel

4.2 A bontási kísérlet eredményei

A DHT bontása során, a 72 óra alatt nem keletkeztek citotoxikus bomlástermékek a BLYR tesztszervezetre alapozott vizsgálatok alapján, mivel a biolumineszcencia gátlás egyik vizsgált törzs esetében sem érte el a 20%-ot. Magasabb szerveződési szintekre extrapolálva ezen eredményeket, azt feltételezhetjük, hogy nincs káros sejtnövekedést gátló hatása a bomlástermékeknek. Mindemellett az eredmények azt is jelzik, hogy a DHT és bomlástermékei az androgén hatás vizsgálatára alkalmazott BLYAS tesztszervezetre sem voltak gátló hatással, azaz a BLYAS törzs megbízhatóan fogja a hormonhatást jelezni.

A bontási kísérletből származó felülúszó minták eredményei láthatók a 7. ábrán. A bontási kísérletbe vont törzsek – a *Cupriavidus basilensis* ÓR16 kivételével – már 24 óra alatt szinte teljesen megszüntették a hormonhatást. A *Cupriavidus basilensis* ÓR16 törzs esetében habár az egymást követő napokon 20%-ot meghaladó mértékben csökkent a biolumineszcencia intenzifikáció, a 72. órában még jelentősebb hormonhatást észleltünk.



7. ábra: A dihidrotesztoszteron bontási kísérletből származó felülűsző mintákban tapasztalt hormonhatás változás BLYAS tesztszervezettel

Az analitikai vizsgálatok eredményei a bontási kísérlet végpontjának mintáiból áll rendelkezésünkre (1. táblázat). Az összes vizsgált törzsünkénél a felülűszőban és a pelletben kimutatási határérték alatt volt a DHT koncentrációja. Az analitikai vizsgálatok azt is megerősítették, hogy a kontrollokban a 72. órában is megmaradt a kiindulási DHT végkoncentráció, azaz a DHT mennyiségének csökkenése csak a vizsgált törzseknek tulajdonítható (1. táblázat).

A biológiai vizsgálat 72. órában kapott eredményei alapján 3 csoportba sorolhatjuk a vizsgált törzseket:

- 1. csoport: kiváló biodetoxifikáló potenciállal rendelkező törzsek, melyeknél a biolumineszcencia intenzifikáció 40% alatti.
- 2. csoport: jó biodetoxifikáló potenciállal rendelkező törzsek, melyeknél a biolumineszcencia intenzifikáció 40-50% közötti.
- 3. csoport: elégtelen biodetoxifikáló potenciállal rendelkező törzsek, melyeknél a biolumineszcencia intenzifikáció 50% feletti.

1. táblázat: A bontás 72. órájának biológiai és kémiai analitikai eredményei

Baktériumfaj	Mintajel	GC-MS		BLYAS teszt	BLYR teszt
		DHT koncentráció [µg/L]		Biolumineszcencia intenzifikáció [%]	Biolumineszcencia gátlás [%]
		Felülűsző	Pellet*	Felülűsző	Felülűsző
<i>R. gordiniae</i>	AK38	<1	<0,66	24,5	-9,2
<i>R. coprophilus</i>	N774	<1	<0,66	30,7	-14,1
<i>C. basilensis</i>	BRB6A	<1	<0,66	31,6	-9,2
<i>R. globerulus</i>	AK36	<1	<0,66	41,2	-11,5
<i>R. erythropolis</i>	AK35	<1	<0,66	41,7	-10,7
<i>R. pyridinivorans</i>	AK37	<1	<0,66	42,2	-8,2
<i>R. aetherivorans</i>	AK44	<1	<0,66	46,7	-9,6
<i>R. pyridinivorans</i>	K402	<1	<0,66	51,5	-7,8
<i>R. ruber</i>	AK41	<1	<0,66	63,7	-18,6
<i>C. basilensis</i>	ÖR16	<1	<0,66	198,3	-8,1
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	70	10,4	484,6	-6,5
-	Kontroll	117	n.a.	550,3	-10,5

Jelmagyarázat:

* 1,5 mL mintára vonatkoztatva

	kiváló biotetoxifikációs tulajdonsággal rendelkező törzsek
	jó biotetoxifikációs tulajdonsággal rendelkező törzsek
	elégtelen biotetoxifikációs tulajdonsággal rendelkező törzsek
	Bontási potenciállal nem rendelkező és a mikrobamentes kontroll minták

Kiváló biotetoxifikáló potenciállal rendelkező törzsek: A *Rhodococcus gordoniae* AK38, *Rhodococcus coprophilus* N774 és *Cupriavidus basilensis* BRB6A törzsek a DHT bontása során nem hoztak létre olyan metabolitokat, melyek detektálható androgén potenciállal rendelkeztek. A 3 törzs közül a *Rhodococcus gordoniae* AK38 emelhető ki, mely törzsnél csak 24,5%-os biolumineszcencia intenzifikáció volt tapasztalható, míg a másik két törzsnél ez az érték elérte a 30-31%-ot is (1. táblázat). A vizsgált mikrobáink közül e 3 törzs feltehetőleg olyan bontó enzim készlettel rendelkezik, mellyel hatékonyan képesek a DHT bontására, ráadásul a keletkezett bomlástermékek citotoxikus hatással sem rendelkeznek.

A DHT magas androgén potenciáljához számos tényező járul hozzá. Az androgén aktivitásban a szteránváz 17-es szénatomján lévő, β helyzetű OH-csoportnak esszenciális jelentősége van, mivel az androgén receptorhoz való kötődésben játszik szerepet. Az androgén aktivitást az 5-ös szénatomon lévő hidrogén térállása is befolyásolja. Az α helyzet nagyobb androgén aktivitással jár, mint a β helyzet, mivel az α térállás miatt a molekula hatékonyabban tud a receptorhoz kötődni. Az androgén aktivitást csökkenti, ha a 3-as szénatomon lévő keto-csoport OH-csoporttá alakul, illetve ha a 3-as szénatomon lévő OH-csoport β helyett α térállásba kerül (Bovee et al., 2008). Ezek alapján a DHT androgén potenciáljának csökkentéséhez több olyan enzim is

szükséges, melyek a molekula androgén hatásért felelős részén mutatnak aktivitást. A DHT környezeti eliminálásához e három törzs lenne a legalkalmasabb, hiszen ezek képesek a legkisebb kockázattal megszüntetni a szennyezést.

Jó biodetoxifikáló potenciállal rendelkező törzsek: Ebbe a csoportba sorolható a *Rhodococcus erythropolis* AK35, *Rhodococcus globerulus* AK36, *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 és *Rhodococcus aetherivorans* AK44. A 3 előbbi törzshöz 41-42%-os biolumineszcencia intenzifikációs érték tartozik, míg a *Rhodococcus aetherivorans* AK44-hez majdnem 47%, mely értékkel már az elégtelen biodetoxifikációs potenciállal rendelkezők csoportjához közelít (1. táblázat). Ezek a törzsek feltehetőleg már kevesebb bontó enzimmel rendelkeznek, mint az 1. csoportba tartozók. A metabolikus útvonalak és a bontó enzimek tisztázása céljából azonban alkalmasak lehetnek további vizsgálatokra.

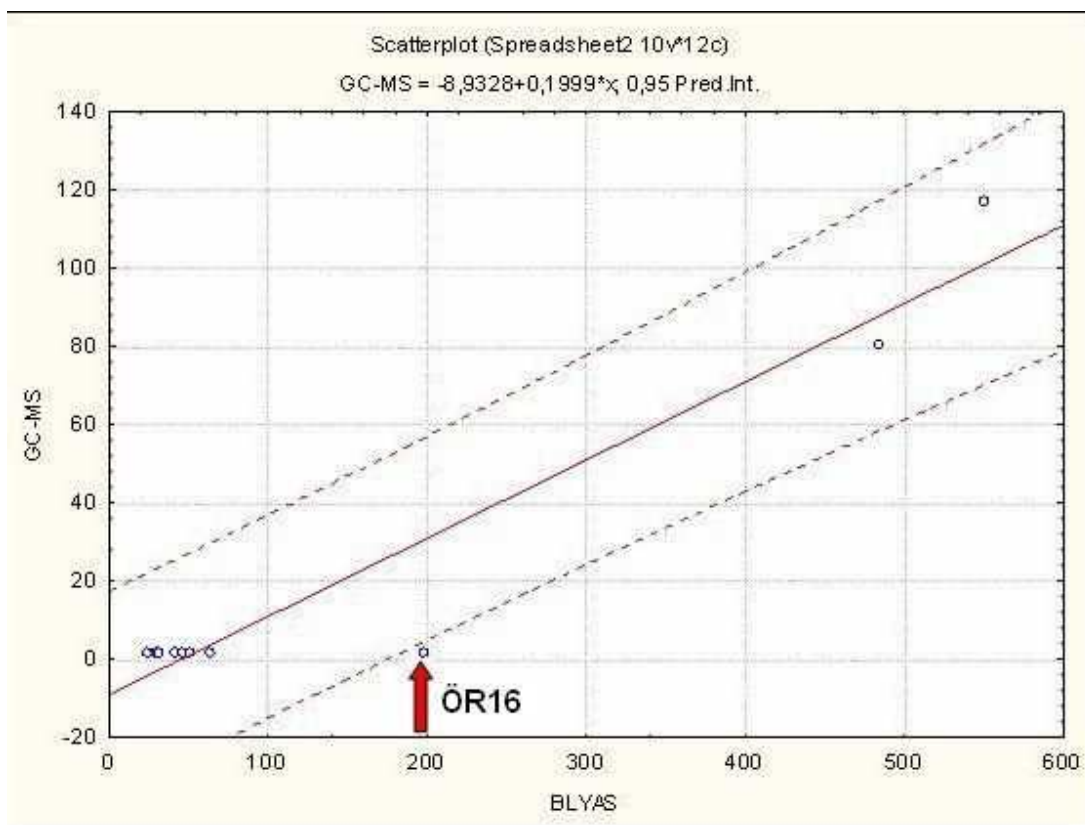
Elégtelen biodetoxifikáló potenciállal rendelkező törzsek: A *Rhodococcus pyridinivorans* K402, *Cupriavidus basilensis* ÖR16 és *Rhodococcus ruber* AK41 törzsek habár nem alakítottak ki citotoxikus metabolitokat a bontás során, a 72 órás vizsgálat végén még jelentékeny androgén hatást tapasztaltunk, így a DHT környezeti eliminációjára nem alkalmasak. E három törzs közül a *Rhodococcus pyridinivorans* K402 volt a leghatékonyabb 51%-os biolumineszcencia intenzifikációs értékével, ezt a *Rhodococcus ruber* AK41 követi közel 64%-os értékkel, viszont a *Cupriavidus basilensis* ÖR16 törzs a legeredménytelenebbnek bizonyult a kiemelkedően magas 198%-os értékkel (1. táblázat).

Törzseink bontó enzim készletének nagy változatosságát feltételezhetjük az alapján is, hogy olyan szoros rokonságot mutató mikrobák, melyek egy fajba, de külön törzsbe tartoznak, a biodetoxifikációs potenciáljuk alapján eltérő csoportba kerültek. A *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 a jó bontási potenciállal rendelkezők csoportjába került, míg a *Rhodococcus pyridinivorans* K402 az elégtelen bontók csoportjába sorolható. A *Cupriavidus basilensis* BRB6A kiváló bontónak bizonyult, viszont a *Cupriavidus basilensis* ÖR16 elégtelen bontó volt.

A BLYAS törzzsel kapott eredmények azt mutatják, hogy még jelentős biolumineszcencia intenzifikációt okoz a *Cupriavidus basilensis* ÖR16 törzshöz tartozó felülúszó. Az analitikai vizsgálat eredménye alapján azonban a felülúszó DHT koncentrációja kimutatási határérték alatt volt (1. táblázat). Ez azzal magyarázható, hogy feltehetőleg a *Cupriavidus basilensis* ÖR16 törzs magasabb androgén potenciállal rendelkező bomlástermékeket hozott létre. Ez alapján

valószínűsíthető, hogy e törzs nem rendelkezik az összes, a többi vizsgált törzsben meglévő bontó enzimmel.

A fenti eredményt statisztikai elemzéssel is alátámasztottuk. Az átlagos biolumineszcencia intenzifikáció és az analitikai eredmények közötti összefüggést a 8. ábrán láthatjuk. A grafikon alapján elmondható, hogy ahol a DHT koncentrációja kimutatási határérték alá csökkent, ott a BLYAS tesztszervezettel is alacsony biolumineszcencia intenzifikációt detektáltunk, kivéve egy kiugró értéket, mely a *Cupriavidus basilensis* ÖR16 törzshöz tartozik.



8. ábra: Az átlagos biolumineszcencia intenzifikáció és az analitikai eredmények közötti összefüggés pontfelhő diagrammon

A Pearson-féle korrelációs együttható meghatározásával állapítottuk meg a fenti változók közötti korrelációs viszonyt. Az együttható értéke 0,96 lett, ami a BLYAS tesztszervezettel és az analitikai mérésekkel kapott eredmények közötti szoros, egyenes arányú összefüggésre utal. A statisztikai eredmények megerősítik, hogy a BLYAS tesztszervezettel megbízhatóan nyomon követhetők biodetoxifikációs folyamatok.

Bontási kísérletünkkel megvalósítottuk célkitűzéseinket. Olyan komplex mérési rendszert hoztunk létre, mellyel megbízhatóan mérhető az androgén és a citotoxikus hatás jelenléte vagy

hiánya. A különböző országok szennyvíztisztítóiban és felszíni vizeiben mért androgén, illetve DHT koncentrációk nagy eltéréseket mutatnak. Általában a néhány ng/L-től a több száz ng/L-ig tartó koncentráció tartományban fordulnak elő e vegyületek. A BLYAS tesztszervezettel már jóval e koncentráció tartomány alatt, a szubnanogramm/L-es tartományban is képesek vagyunk detektálni az androgén hatást. E módszer érzékenysége sokszor meghaladja más, analitikai módszerek detektálási határait.

Nullhipotézisünk szerint a bontási kísérletben felhasznált törzsek közül egyik sem képes a DHT bontására a 72 órás vizsgálat alatt. A fenti eredményeink alapján a nullhipotézisünket el kell vetnünk és az alternatív hipotézisünket kell elfogadnunk, mivel a 72 órás bontási kísérlet során volt legalább 1 törzs, mely képes volt a DHT bontására. Kísérletünkben 3 olyan kiváló bontási képességgel rendelkező törzset különíthettünk el, melyek bontásuk során nem alakítottak ki citotoxikus és jelentősebb androgén hatású bomlástermékeket. E törzsek a *Rhodococcus gordoniae* AK38, a *Rhodococcus coprophilus* N774 és a *Cupriavidus basilensis* BRB6A, melyek közül is a *Rhodococcus gordoniae* AK38 volt a legsikeresebb bontó törzs.

A *Cupriavidus basilensis* ÖR16 törzs eredményei rámutatnak arra a tényre, hogy sokszor az analitikai vizsgálatok önmagukban nem elegendőek biológiai folyamatok nyomonkövetésére, hiszen olyan metabolitok is keletkezhetnek a bontás során, amelyekre nem számítunk, így analitikai módszerekkel nem is vizsgáljuk őket.

5 Kitekintés, javaslatok

Előkísérletünkben meghatároztuk az androgén hatású DHT BLYAS tesztorganizmra mutatott hatását. Eredményként teljes dózis-válasz görbét kaptunk és az EC_{50} érték (5,52 ng/ml) is megegyezett a szakirodalmi adattal. A fenti eredmények alapján a DHT-t bontási kísérletbe állítottuk, ahol a kapott analitikai és biológiai eredmények szoros összefüggése alapján javasolható a tesztorganizmunk screening módszerként való alkalmazása biodegradációs kísérletekben.

A DHT bontásért felelős enzimeket kódoló génszakaszok jelentős tárháza található meg a *Rhodococcus* és *Cupriavidus* nemzetség tagjai között:

- A *Comamonas testosteroni* baktériumból izolált 3α -HSD az androgének metabolizmusának egyik kulcsenzime, mivel számos szteroid, mint pl. androsztándion, DHT, androszteron oxidoredukciójában vesz részt (Kisiela et al., 2012). A DHT-ből 3α -HSD segítségével androsztán- $3\alpha,17\beta$ -diol keletkezik (http1). A *C. testosteroni*-ből izolált 3α -HSD enzimmel homológ enzimeket több baktériumban is kimutattak. Főként az *Actinobacteria* törzsbe, illetve kisebb mértékben a *Proteobacteria* törzsbe tartozó baktériumoknál találtak homológ enzimeket (pl. *Rhodococcus opacus* B4, *Rhodococcus jostii* RHA1, *Cupriavidus taiwanensis*). (Kisiela et al., 2012)
- A KstD3 enzim a legnagyobb aktivitást az. 5α -androsztán-3,17-dion, illetve DHT vegyületeken mutatja. A KstD3 enzim génjei konzervatív génszakaszok között helyezkednek el, mely génszakaszokon szintén a szteroid katabolizmusban szerepet játszó gének találhatók. A KstD enzimek széleskörben megtalálhatóak az *Actinobacteria* törzsbe tartozó mikrobákban, különösképpen *Rhodococcus* fajokban (De las Heras et al., 2012). A KstD enzimmel homológ enzimet a *Proteobacteria* törzshöz tartozó baktériumoknál (pl. *Cupriavidus taiwanensis*) is találtak (Kisiela et al., 2012).
- A *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 törzsben 5 különböző *kshA* homológot (*kshA1-kshA5*) azonosítottak. E gének által kódolt enzimek számos 3-ketoszteroidon aktivitást mutatnak, a szteránváz 9-es szénatomján α helyzetű hidroxil-csoportot alakítanak ki. A KshA5 enzim rendelkezik a legszélesebb szubsztrátkörrel, viszont nincs olyan szubsztrát, melyet különösebben előnyben részesítene. Egyedülálló tulajdonsága viszont, hogy a KshA enzimek közül a KshA5 az egyetlen, mely a DHT-t és a 11β -hidrokortizont át tudja alakítani. (Petrusma et al., 2011)

Az általam vizsgált törzsek közül a *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 és a *Cupriavidus basilensis* ÖR16 genomjának feltérképezése készült el. A *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 törzsben olyan enzimeket kódoló géneket is találtak, melyek alapján a törzs szteroid bontó képessége feltételezhető. Ilyen enzimek a 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz, 3-ketoszteroid- Δ -dehidrogenáz, 3-ketoszteroid-1-dehidrogenáz és szteroid- Δ -izomeráz (Kriszt et al., 2012). A *Cupriavidus basilensis* ÖR16 habár jó szénhidrogén és mikotoxin bontó törzsnek bizonyult, és számos módon képes aromás gyűrű felnyitására (Cserháti et al., 2012), mégsem rendelkezik olyan enzimekkel, melyek a bontás során az androgén aktivitás megszűnését eredményeznék. A fenti szakirodalmi adatok és saját eredményeink alapján azonban feltételezhetjük, hogy a többi vizsgált törzsünk rendelkezik a *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 törzsben megtalálható, a szteroid bontásban szerepet játszó enzimekkel.

A szteroidok bontásában résztvevő enzimek és a metabolikus útvonal megismerése fontos lenne a továbbiakban ahhoz, hogy más baktérium törzsek szteroid bontó képességét előre tudjuk jelezni azzal, ha a bontásban résztvevő enzimeket kódoló géneket ki tudjuk mutatni az adott törzsből. A DHT bontásért felelős gének beazonosításában segítséget nyújthat egy transzpozonmutagenézis-könyvtár létrehozása. A transzpozon-mutagenézissel előállított könyvtár könnyedén screenelhető a DHT bontásra a dolgozatomban bemutatott biológiai hatáselemző rendszerrel (BLYAS/BLYR teszt), kiválaszthatók a nullmutánsok, és beazonosíthatók a DHT bontásért felelős enzimeket kódoló génszakaszok.

A szteroidok biológiai környezeti kármentesítésénél figyelembe kell vennünk azt is, hogy azok az enzimek, melyek hatásosak voltak egy adott szteroid bontásánál, még nem biztos, hogy egy másik szteroid bontását is hatékonyan el tudják végezni. A DHT-t kiválóan bontó törzseink a 17 α -etinilösztadiolt már nem tudták elbontani, még akkor sem, ha az inkubációs időtartamot 7 napra növeltük. A vizsgálatba további *Rhodococcus* törzseket vontunk be, azonban szintén sikertelen volt a bontás.

6 Összefoglalás

Egyre több környezetbe kibocsátott vegyületről igazolódik be napjainkban hormonháztartást megzavaró hatása, valamint az EDC vegyületek citotoxikus, karcinogén, mutagén, immuntoxikus, illetve allergén hatással is rendelkezhetnek. Az EDC-k környezeti eliminációjára alkalmas fizikai-kémiai módszereken kívül hatékony alternatívát jelenthetnek a biológiai eljárások, amelyek alapja a mikroorganizmusok biodegradációs képessége.

Célkitűzéseink között szerepelt különböző környezeti mikroszennyezők kimutatására alkalmas biológiai hatáselemzésen alapuló rendszerrel az androgén hatású dihidrotesztoszteron (DHT) vizsgálata. Ennek érdekében a *Saccharomyces cerevisiae* genetikailag módosított törzseit alkalmazzuk tesztstruktúráként. Az androgén hatás mérésére a BLYAS, míg a konstitutív kontroll törzsként alkalmazott BLYR a citotoxicitás mérésére hivatott.

További célként tűztük ki egy a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék által kialakított bizonyítottan szénhidrogén bontási potenciállal rendelkező törzsgyűjtemény screening vizsgálatát. A DHT biodegradációjára alkalmas mikroorganizmusok közül azok kiválasztása az optimális, amelyek káros metabolitok nélkül képesek a DHT lebontására. Ennek érdekében adaptáltuk a BLYAS/BLYR tesztrendszert biodegradációs kísérletekhez, hogy a bontás utáni maradék káros (androgén, citotoxikus) hatást detektáljuk. A biológiai vizsgálatokat analitikai mérésekkel egészítettük ki.

Az előkísérletek során a tesztstruktúrák érzékenységét teszteltük a DHT-ra. Megállapítottuk, hogy 5,52 ng/ml DHT okoz 50%-os fénykibocsátás növekedést a BLYAS törzs lumineszcenciájában, míg a BLYR törzs esetében nem tapasztaltunk a vizsgált koncentráció tartományban fénykibocsátás változást.

A BLYAS/BLYR tesztrendszert adaptáltuk biodegradációs kísérletekhez, és kiválasztottuk a legmegfelelőbb mikrobákat, amelyek maradék káros hatás nélkül végzik a DHT bontását. Ezen törzsek *Rhodococcus* és *Cupriavidus* nemzetségből kerültek ki. Mindemellett vizsgálataink rámutattak, hogy kiváló DHT bontás mellett is lehetséges maradék androgén hatás, amely hangsúlyozza a biotesztek fontosságát a biodegradációs eljárások során.

A kialakított komplex rendszerrel megbízhatóan kiválaszthatóak a legmagasabb bontási potenciálú biztonságos törzsek akár több száz egyedből álló törzsgyűjtemény esetén is. Ezen felül új lehetőséget nyit a metabolizmuskutató területén, hiszen segítségével könnyedén screenelhető egy mutagenézis könyvtár, majd beazonosíthatók a DHT bontásért felelős kulcsenzimek.

7 Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom konzulensemnek, *Dr. Krifaton Csillának* támogatásáért, türelméért, értékes tanácsaiért, az irodalmi áttekintéshez biztosított számos szakcikkért és a gyakorlati munkában nyújtott segítségéért, melyekkel dolgozatom elkészítését lehetővé tette.

Köszönettel tartozom *Padla Zsófiának*, aki végtelen türelemmel és számos értékes tanáccsal segített a laborgyakorlat elsajátításában és a dolgozatomhoz szükséges labormunka kivitelezésében, továbbá a kísérleti munkában vállalt önzetlen segítségéért.

Szeretném megköszönni *Cserháti Mátyásnak*, hogy segítséget nyújtott a Wessling Hungary Kft-vel való kapcsolattartásban.

Köszönettel tartozom a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék vezetőjének, *Dr. Kriszt Balázs* tanár úrnak, hogy lehetőséget nyújtott a tanszéki munkára.

Köszönet illeti a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék és a Regionális Egyetemi Tudásközpont munkatársait, akik mind gyakorlati, mind elméleti segítséget biztosítottak számomra a laborban végzett munkám során.

Köszönetemet fejezem ki *M. Eldridgenek* és *G. Saylernek* a BLYAS és BLYR tesztszervezetekért (The University of Tennessee, Knoxville, Tennessee).

OTDK dolgozatom a Baross Gábor Program-2009 (REG_KM_KFI_09; HALEDC09) és a TÁMOP-4.2.1B-11/2/KMR-2011-0003. támogatásával készíthettem el.

8 Felhasznált irodalom

- ARANEO B. A., DOWELL T., DIEGEL M., DAYNES R. A. (1991): Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and γ -interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. – *Blood*. 78(3): 688-699.
- BELLET V., HERNANDEZ-RAQUET G., DAGNINO S., SEREE L., PARDON P., BANCON-MONTINY C., FENET H., CREUSOT N., AÏT-AÏSSA S., CAVAILLES V., BUDZINSKI H., ANTIGNAC J.-P., BALAGUER P. (2012): Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. – *Water Research*. 46: 1912-1922.
- BHATTI H. N., KHERA R. A. (2012): Biological transformations of steroidal compounds: A review. – *Steroids*. 77: 1267–1290.
- BOLONG N., ISMAIL A. F., SALIM M. R., MATSUURA T. (2009): A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. – *Desalination*. 239: 229-246.
- BOVEE T. F. H., LOMMERSE J. P. M., PEIJNENBURG A. A. C. M., FERNANDES E. A., NIELEN M. W. F. (2008): A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. – *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 108: 121–131.
- BRUCHOVSKY N., WILSON J. D. (1999): Discovery of the role of dihydrotestosterone in androgen action. – *Steroids*. 64: 753-759.
- BURKHARDT-HOLM P. (2010): Endocrine disruptors and water quality: A state-of-the-art review. – *Water Resources Development*. 26(3): 477-493.
- CALOW P. (eds.) (1993): *Handbook of Ecotoxicology*. – Blackwell Science Ltd., pp. 487.
- CARSON III. C., RITTMASER R. (2003): The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. – *Urology*. 61(4A): 2-7.
- CHIBA A., HOSOKAWA N. (2006): Effects of androgens and estrogens on crowings and distress callings in male Japanese quail, *Coturnix japonica*. – *Hormones and Behavior*. 49: 4-14.
- COXAM V., BOWMAN B. M., MECHAM M., ROTH C. M., MILLER M. A., MILLER S. C. (1996): Effects of dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats. – *Bone*. 19(2): 107-114.
- CSERHÁTI M., KRISZT B., SZOBOSZLAY S., TÓTH Á., SZABÓ I., TÁNCSICS A., NAGY I., HORVÁTH B., NAGY I., KUKOLYA J. (2012): *De Novo* Genome Project of *Cupriavidus basilensis* OR16. – *Journal of Bacteriology*. 194(8): 2109.

- DE LAS HERAS L. F., VAN DER GEIZE R., DRZYZGA O., PERERA J., LLORENS J. M. N. (2012): Molecular characterization of three 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase isoenzymes of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. – *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 132: 271–281.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E., BOURGUIGNON J.-P., GIUDICE L. C., HAUSER R., PRINS G. S., SOTO A. M., ZOELLER R. T., GORE A. C. (2009): Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. – *Endocrine Reviews*. 30(4): 293-342.
- DRAKE L., HORDINSKY M., FIEDLER V., SWINEHART J., UNGER W. P., COTTERILL P. C., THIBOUTOT D. M., LOWE N., JACOBSON C., WHITING D., STIEGLITZ S., KRAUS S. J., GRIFFIN E. I., WEISS D., CARRINGTON P., GENCHEFF C., COLE G. W., PARISER D. M., EPSTEIN E. S., TANAKA W., DALLOB A., VANDORMAEL K., GEISLER L., WALDSTREICHER J. (1999): The effects of finasteride on scalp skin and serum androgen levels in men with androgenetic alopecia. – *Journal of the American Academy of Dermatology*. 41(4): 550-554.
- EHRIG T., O'KANE D. J., PRENDERGAST F. G. (1995): Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra. – *FEBS Letters*. 367: 163-166.
- ELDRIDGE M., SANSEVERINO J., UMBUZEIRO G. DE A., SAYLER G. S. (2011): Analysis of Environmental Samples with Yeast-Based Bioluminescent Bioreporters. – In: Dr Ema Ekundayo (eds.). *Environmental Monitoring*. InTech., pp. 4-22.
- ELDRIDGE M. L., SANSEVERINO J., LAYTON A. C., EASTER J. P., SCHULTZ T. W., SAYLER G. S. (2007): *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS, a New Bioluminescent Bioreporter for Detection of Androgenic Compounds. – *Applied and Environmental Microbiology*. 73(19): 6012-6018.
- FRIMAN H., SCHECHTER A., NITZAN Y., CAHAN R. (2012): Phenol degradation in bio-electrochemical cells. – *International Biodeterioration and Biodegradation*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.019>
- FROEHNER K., MEYER W., GRIMME L. H. (2002): Time-dependent toxicity in the long-term inhibition assay with *Vibrio fischeri*. – *Chemosphere*. 46: 987-997.
- GRUIZ K., HORVÁTH B., MOLNÁR M. (2001): Környezettoxikológia. Vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára. – Műegyetemi Kiadó, pp. 171.
- GUPTA R. K., PATTERSON S. S., RIPP S., SIMPSON M. L., SAYLER G. S. (2003): Expression of the *Photobacterium luminescens lux* genes (*luxA*, *B*, *C*, *D*, and *E*) in *Saccharomyces cerevisiae*. – *FEMS Yeast Research*. 4: 305-313.
- HAMMER R., HARPER D. A. T., RYAN P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. – *Palaentologia Electronica*. 4(1): 9 pp.

- HORINOUCI M., HAYASHI T., KUDO T. (2012): Steroid degradation in *Comamonas testosteroni*. – Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 129: 4-14.
- HORTON R. (1992): Dihydrotestosterone is a peripheral paracrine hormone. – Journal of Andrology. 13(1): 23-27.
- KISIELA M., SKARKA A., EBERT B., MASER E. (2012): Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria – A bioinformatic perspective. – Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 129: 31– 46.
- KRISTÓF J. (2000): Kémiai analízis II. (Nagyműszeres analízis). – Pannon Egyetemi Kiadó, Veszprém, pp. 192.
- KRISZT B., TÁNCICS A., CSERHÁTI M., TÓTH Á., NAGY I., HORVÁTH B., NAGY I., TAMURA T., KUKOLYA J., SZOBOSZLAY S. (2012): *De Novo* Genome Project for the Aromatic Degradar *Rhodococcus pyridinivorans* Strain AK37. – Journal of Bacteriology. 194(5): 1247.
- LARKIN M. J., KULAKOV L. A., ALLEN C. C. R. (2005): Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. – Current Opinion in Biotechnology. 16: 282-290.
- LEAV I., HO S.-M., OFNER P., MERK F. B., KWAN P. W.-L., DAMASSA D. (1988): Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. – Journal of The National Cancer Institute. 80(13): 1045-1053.
- LIU Z., KANJO Y., MIZUTANI S. (2009): Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: A review. – Science of the Total Environment. 407: 4975-4985.
- LIU S., YING G.-G., ZHAO J.-L., CHEN F., YANG B., ZHOU L.-J., LAI H. (2011): Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. – Journal of Chromatography A. 1218: 1367-1378.
- MARTÍNKOVÁ L., UHNÁKOVÁ B., PÁTEK M., NEŠVERA J., KŘEN V. (2009): Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. – Environment International. 35: 162-177.
- MCDONALD P. G., DOUGHTY C. (1972): Comparison of the effect of neonatal administration of testosterone and dihydrotestosterone in the female rat. – Journal of Reproduction and Fertility. 30: 55-62.
- PETRUSMA M., HESSELS G., DIJKHUIZEN L., VAN DER GEIZE R. (2011): Multiplicity of 3-Ketosteroid-9 α -Hydroxylase Enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 for Specific Degradation of Different Classes of Steroids. – Journal of Bacteriology. 193(15): 3931-3940.

- PLOTKIN B. J., ROOSE R. J., ERIKSON Q., VISELLI S. M. (2003): Effect of androgens and glucocorticoids on microbial growth and antimicrobial susceptibility. – *Current Microbiology*. 47: 514-520.
- REICZIGEL J., HARNOS A., SOLYMOSI N. (2010): *Biostatisztika nem statisztikusoknak*. – Pars Kft., Nagykovácsi, pp. 462.
- RILEY L. G., HIRANO T., GRAU E. G. (2004): Estradiol-17 β and dihydrotestosterone differentially regulate vitellogenin and insulin-like growth factor-I production in primary hepatocytes of the tilapia *Oreochromis mossambicus*. – *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*, 138: 177-186.
- SANSEVERINO J., ELDRIDGE M. L., LAYTON A. C., EASTER J. P., YARBROUGH J., SCHULTZ T. W., SAYLER G. S. (2008): Screening of Potentially Hormonally Active Chemicals using Bioluminescent Yeast Bioreporters. – *Toxicological Sciences*. Oxford University Press, pp. 1-56.
- SANSEVERINO J., GUPTA R. K., LAYTON A. C., PATTERSON S. S., RIPP S. A., SAIDAK L., SIMPSON M. L., SCHULTZ T. W., SAYLER G. S. (2005): Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid, Sensitive Detection of Estrogenic Compounds. – *Applied and Environmental Microbiology*. 71(8): 4455-4460.
- SHILLING A. D., WILLIAMS D. E. (2000): The non-aromatizable androgen, dihydrotestosterone, induces antiestrogenic responses in the rainbow trout. – *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 74: 187-194.
- SKOWASCH D., MÖBUS E., MASER E. (2002): Identification of a novel *Comamonas testosteroni* gene encoding a steroid-inducible extradiol dioxygenase. – *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 294: 560–566.
- SONNENSCHN C., SOTO A. M. (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. – *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 65(1-6): 143-150.
- STRECK G. (2009): Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. – *Trends in Analytical Chemistry*. 28(6)
- TRINH T., HARDEN N. B., COLEMAN H. M., KHAN S. J. (2011): Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry. – *Journal of Chromatography A*. 1218: 1668-1676.
- TURGEON J. L., WARING D. W. (1999): Androgen modulation of luteinizing hormone secretion by female rat gonadotropes. – *Endocrinology*. 140(4): 1767-1774.
- WELÉN K., DAMBER J.-E. (2011): Prostate diseases – role of sex steroids and their inhibitors. – *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 25: 355-367.

XU T., CLOSE D. M., SAYLER G. S., RIPP S. (2012): Genetically modified whole-cell bioreporters for environmental assessment. – Ecological Indicators.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.01.020>

YOSHIMOTO T., NAGAI F., FUJIMOTO J., WATANABE K., MIZUKOSHI H., MAKINO T., KIMURA K., SAINO H., SAWADA H., OMURA H. (2004): Degradation of Estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* Isolates from Activated Sludge in Wastewater Treatment Plants. – Applied and Environmental Microbiology. 70(9): 5283–5289.

Hivatkozott rendeletek, kiadványok:

16/2002. (IV. 10.) EüM rendelet a települési szilárd és folyékony hulladékkal kapcsolatos közegészségügyi követelményekről

U.S. EPA. (1997): Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC, 630/R-96/012

Internetes hivatkozások:

http1: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00140 (Letöltve: 2012-09-24)

9 Függelék

1.: Alkalmazott tápoldatok

YMM (leu-, ura-): leucin- és uracil szelektív alapmédium

- 13,61 g KH_2PO_4
- 1,98 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 4,2 g KOH (lemez)
- 0,2 g MgSO_4
- 1 ml FeSO_4 oldat (40 mg/50 ml víz)
- 50 mg L-hisztidin
- 50 mg adenin
- 20 mg L-arginin-HCl
- 20 mg L-metionin
- 30 mg L-tirozin
- 30 mg L-izoleucin
- 30 mg L-lizin-HCl
- 25 mg L-fenilalanin
- 100 mg L-glutaminsav
- 150 mg L-valin
- 375 mg L-szerin

1 liter desztillált vízben oldottuk a fenti anyagokat, majd autoklávban sterilizáltuk. Tárolása szobahőmérsékleten történt.

Growth Medium

1 literhez szükséges mennyiség:

- 854,5 ml YMM alapmédium
- 10 ml vitamin oldat
- 100 ml glükóz oldat
- 25 ml L-aszparaginsav oldat
- 8 ml L-treonin oldat
- 2,5 ml CuSO_4 oldat

Tárolása hűtőben, 4°C-on történt.

Vitamin oldat

- 20 mg tiamin
- 20 mg piridoxin
- 20 mg pantoténsav
- 100 mg inozitol
- 50 ml biotin oldat (2 mg/100 ml)

Az összetevőket 500 ml desztillált vízben oldottuk fel, majd 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrve sterilizáltuk. 4°C-on tároltuk.

D-(+)-glükóz oldat

20%-os glükóz oldatot készítettünk, majd autoklávban 10 percig sterilizáltuk. 4°C-on tároltuk.

L-aszparaginsav oldat

4 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk desztillált vízben oldva. Sterilizálás után szobahőmérsékleten tároltuk.

L-treonin oldat

Desztillált vízben oldva 24 mg/ml-es oldatot állítottunk össze. Sterilizálás után, szintén szobahőmérsékleten tároltuk.

CuSO₄ oldat

20 mM-os oldatot készítettünk desztillált vízben oldva. 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrtük, és szobahőmérsékleten tároltuk.

LB tápoldat

- 10 g pepton
- 5 g élesztőkivonat
- 9 g NaCl

Az összetevőket 1 liter desztillált vízben oldottuk, majd autoklávban sterilizáltuk.

LB agar

Az 1 liter LB tápoldatot 18 g agarral egészítettük ki.

10 Nyilatkozat

Alulírott Balázs Adrienn, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar 2012 decemberében végzett hallgatója nyilatkozom, hogy a XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferenciára (OTDK) benyújtott dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Jelen dolgozat a végzés fél évében bemutatott TDK-pályamunka egy korábban megkezdett, folyamatos tudományos műhelymunka eredménye.

A dolgozatban leírt munkafolyamatok közül:

- az előkísérletet, a teszt standardizálását
- a bontási kísérletet
- a bontási kísérlet biológiai hatáselemzését
- a statisztikai kiértékelést

végeztem el.

Az OTDK dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 2013, január 8.

.....

hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy az OTDK dolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

Az OTDK dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 2013, január 8.

.....

konzulens aláírása