

Tudományos Diák Köri dolgozat

Készítette:

Petrovics Tünde

Gödöllő
2012



SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

**Környezeti eredetű *Pseudomonas aeruginosa* rokonsági kapcsolatainak és
egészségkockázatainak vizsgálata**

Készítette:

Petrovics Tünde

Környezetmérnök (MSc) I. évfolyam

Belső témavezetők:

Dr. Kaszab Edit

egyetemi tanársegéd

Dr. Szoboszlai Sándor

egyetemi docens

Gödöllő
2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Kármentesítési technológiák	5
2.2. Biodegradáció és bioremediáció	6
2.3. A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> jellemzése.....	8
3. Anyag és módszer	12
3.1. A vizsgálandó törzsek kiválasztásának szempontjai.....	12
3.2. A multilokusz szekvencia tipizálás (MLST) módszer kivitelezése	14
3.3. Szénhidrogénbontó-képesség meghatározása	22
3.4. Szerológiai vizsgálatok	23
3. Eredmények és értékelésük	24
4.1. Az MLST vizsgálatok eredményei	24
4.2. A gravimetriás vizsgálatok eredményei	28
4.3. Szerológiai vizsgálatok eredményei.....	29
4.4. Vizsgálati eredményeink összevetése antibiotikum rezisztenciára és virulenciára vonatkozó vizsgálati adatokkal.....	31
Következtetések, javaslatok	35
Összefoglalás.....	36
Köszönetnyilvánítás	37
Irodalomjegyzék.....	38
Mellékletek.....	42

1. Bevezetés

Mai társadalmunkban és mindennapi tevékenységünk számos területén használunk fosszilis energiahordozókat, melyek közül a kőolaj-alapú termékek kiemelkedő szerepet játszanak. Itt gondolhatunk a motorhajtóanyagokra, fűtőanyagokra, vagy a petrolkémia, vegyipar, műanyagipar és növényvédőszer-gyártás alapanyagaira. E nyers és feldolgozott anyagok és termékek esetében számos alkalommal és helyen történhet véletlenszerű, vagy havária jellegű kibocsátás a környezeti elemekbe.

A szénhidrogén szennyeződések tényfeltárása során a műszeres analitika segíti a szakemberek munkáját a megfelelő kármentesítési technológia kiválasztásában. A gyakorlatban számos alkalommal választják a bioremediációt, amely során mikrobiológiai beavatkozás segítségével történik a szennyeződés felszámolása. Ez a technológia viszont, nagy szaktudást igényel, ugyanis a megfelelő biológiai ágens kiválasztása nagyban befolyásolja a folyamat eredményességét és környezetbiztonságát.

A bioremediációs beavatkozások tervezésekor számos esetben kerülhetnek patogén mikroszervezetek is a környezetvédelmi szakemberek látókörébe, mivel számos, betegség kiváltására képes mikroorganizmus kiváló szénhidrogén-bontó képességgel is rendelkezik. Ilyen baktériumfaj a környezetben általánosan előforduló, ám humán-egészségügyi aggályokat is keltő *Pseudomonas aeruginosa*. Törzseit külföldön, több helyen a mikrobiális oltóanyagban található baktérium-konzorcium tagjaként szerepeltetik és használják fel a remediációs tevékenységek során. Hazánkban a szigorú jogi szabályozásnak köszönhetően – mint patogén mikroszervezet – nem kerülhet a kármentesítésekre szánt oltóanyagba, ám e faj képviselőinek spontán módon történő felszaporodásával, a szénhidrogénnel szennyezett kármentesítési területeken, folyamatosan számolni kell.

A szakirodalomban eltérő megítélés alá esnek a klinikai (nozokomiális) és környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek. Míg utóbbinak napjainkig nem tulajdonítanak jelentősebb egészségügyi kockázatot, a klinikai törzsekről bebizonyosodott, hogy számos betegség kialakulásában játszanak kóroki szerepet és több antibiotikum-hatóanyagcsoporttal szemben rezisztensek lehetnek.

A szakirodalomban megnyilvánuló kettős megítélés feloldása érdekében vizsgálataim céljául tűztem ki, hogy fényt derítsek a környezeti és klinikai eredetű törzsek közötti filogenetikai (rokon) kapcsolatokra. Megvizsgálva ezzel, azt a lehetőséget, hogy a nemzetközi gyakorlatban jogosan különítik-e el a két jellemző előfordulási helyen izolálható *P. aeruginosa* törzseket egymástól és megalapozott-e, az a feltételezés, hogy a környezeti törzsek nem jelentenek humán-egészségügyi kockázatot. Ezen kérdések megválaszolásához a molekuláris biológia egyik új módszerét a multilokusz szekvencia tipizálást (MLST) választottam, melynek vizsgálati

eredményeit alapul véve – nemzetközi adatbázisokkal való összevetést követően – megállapíthatóvá válhat a rokonsági fok mértéke a faj eltérő származású izolátumai között.

Az MLST vizsgálatok a tudomány szempontjából újdonságot jelentő, ám a gyakorlati környezetvédelem számára korlátozott információt hordozó adatokat jelentenek, ezért munkámat kiegészítettem három további vizsgálati iránnyal, a szénhidrogén-bontó képesség megállapításával, a környezeti izolátumok szerotípusának és antibiotikum-rezisztenciára vonatkozó képességeik értékelésével.

A munkám során feladatul tűztem ki:

- 20, szénhidrogénnel szennyezett területről izolált és 2 klinikai törzs esetében a multilokusz szekvencia tipizálás módszerén alapuló vizsgálatok elvégzését.
- A vizsgáltba vont 22 db izolátum szénhidrogén-bontási képességének értékelését gravimetriás eljárással,
- Reprezentatív számú, 65 db izolátum esetében megállapított szerológiai vizsgálatok eredményeinek értékelését, mely teszteket az Országos Epidemiológiai Központban hajtottak végre,
- 22 db izolátum esetében, a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék munkatársai által korábban meghatározott antibiotikum-rezisztencia eredmények összevetését az új vizsgálati eredményekkel.

A fent említett vizsgálatok alapján átfogó képet nyerhetünk a környezeti és klinikai izolátumok filogenetikai kapcsolatrendszeréről, esetleges humán-egészségügyi jelentőségéről, illetve a környezetvédelmi vonatkozásban jelentős szénhidrogén-degradációra vonatkozó tulajdonságokról.

Eredményeinket a szakirodalmi adatok, illetve a korábbi, antibiotikum rezisztenciára, virulenciára irányuló vizsgálatok fényében értékeltük és értelmeztük, mely az elmélet és a gyakorlat számára egyaránt hasznosítható információhalmazt jelenthet.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Kármentesítési technológiák

A vonatkozó jogszabályban szereplő definíció szerint a **kármentesítés** olyan helyreállítási tevékenység, intézkedés, amely a természetben okozott kár enyhítésére, az eredeti, vagy ahhoz közeli állapot helyreállítására, valamint a faj, élőhely, terület által nyújtott szolgáltatás helyreállítására vagy azzal egyenértékű szolgáltatás biztosítására irányul [91/2007. (IV.26.) Korm. rendelet].

A kármentesítés szakaszai [91/2007. (IV.26.) jogszabály alapján]:

a) **tényfeltárás**; b) **beavatkozás**; c) az a) és b) pontokban meghatározott szakaszokban, illetve azokat követően folytatott **monitoring**. A kármentesítés bármely szakasza a kármentesítés lezárásáig szükség szerint elrendelhető, illetve megismételhető. A kármentesítés során biztosítani kell, hogy: a) a természetben okozott károsodás ne tevődjön át más környezeti elemre, illetve a felszín alatti víz, a földtani közeg nem szennyezett részeire; b) a lehető legkisebb környezeti terheléssel járjon. A kármentesítést az Országos Környezeti Kármentesítési Program keretében kell elvégezni.

A kívánt mértékű kármentesítés technológiai a helyszín szerint, alapvetően két csoportba sorolhatók (NÉMETH, 2001):

- **in situ** (= eredeti helyzetben kivitelezett) megoldások. Idetartozik valamennyi olyan technológia, amikor a szennyeződött földtani közeget és/vagy felszín alatti vizet kitermelés, elmozdítás nélkül tisztítják meg a szennyezést okozó kockázatos anyag(ok)tól.
- **ex situ** (= nem eredeti helyzetben) megoldások. Az ebbe a csoportba tartozó technológiákat további két alcsoportba lehet osztani, úgymint
 - a) **ex situ on site**: a tisztítást nem a földtani közeg kifejlődésének természetes helyzetében végzik, hanem kitermelik. A kitermelt szennyezett talajt és/vagy felszín alatti vizet nem szállítják el a munkaterületről, hanem azon belül bioágyakon, termikusan, vagy talajmosással tisztítják stb. (remediáció), majd a kívánt mértékben megtisztított földtani közeget és/vagy felszín alatti vizet visszahelyezik a munkagödörbe.
 - b) **ex situ off site**: az idetartozó technológiák megegyeznek az ex situ on site megoldásokkal. Az alapvető különbség, az hogy a szennyezett talajt, és a felszín alatti vizet nem a munkaterületen belül kezelik, hanem egy távolabbi tisztító telepre szállítják, majd a kezelt talajt visszaszállítják az eredeti munkagödörbe. A megtisztított felszín alatti vizet élővízbe, vagy közcsatornába vezetik.

Technológiai típusok áttekintése (SZOBOSZLAY ÉS KRISZT, 2006):

➤ **Fizikai eljárások:** talajmosás (pump and treat); levegőztetés, talajlevegő elszívás (talajszellőztetés, átlevégőztetés, légbekeverés + talajgáz kitermelés, sztrippelés); gázkitermelés vákuummal (kúton belüli sztrippelés); elválasztás/szeparáció/ (gravitációs, szűrési, desztillációval, fordított ozmózissal, membrán-szűréssel); megszilárdítás, stabilizálás (bitumenes, aszfalt emulzióba keverés, portland cementbe keverés, oldható foszforozás, meszezés, iszap-stabilizálás).

➤ **Kémiai eljárások:** kémiai kivonás /extrakció/ (oldószeres kivonás, savas kivonás); kémiai oxidáció/redukció; elválasztás/szeparáció/ (gravitációs, szűrési, desztillációval, fordított ozmózissal, membrán-szűréssel); megszilárdítás, stabilizálás (bitumenes, aszfalt emulzióba keverés, portland cementbe keverés, oldható foszforozás, meszezés, iszap-stabilizálás); aktív szenes szűrés; ioncsere; kicsapás és elválasztás (koaguláció, flokkuláció); UV oxidáció.

➤ **Biológiai eljárások:** biodegradációs eljárások (ellenőrzött spontán (természetes) biodegradáció, stimulált (irányított) biodegradáció); levegő (oxigén) közléses eljárások (bioventilláció, intenzifikált bioremediáció); talajlazításos eljárások (komposztálás, bioágyas kezelés, talajművelési kezelés, agrotechnikai kezelés); tartályos eljárások (iszapfázisú biológiai kezelés, bioreaktor), tudatos/ tervezett oltóanyag-használat, fitoremediációs eljárások.

➤ **Termikus eljárások:** égetés; (forgódobos kemence, infravörös kemence, fluidágyas kemence, olvasztóágyas kemence); pirolízis (hőbontás); termikus deszorpció (alacsony hőmérsékletű/90-320°C/, magas hőmérsékletű/320-560°C/).

➤ **Izolációs (szigeteléses) eljárások:** résfalazás; szádfalazás, hidraulikus szigetelés/gát/; felső szigetelés /lezárás/.

2.2. Biodegradáció és bioremediáció

A biodegradáción azt az aerob vagy anaerob folyamatot értjük, amely során a talaj szaprofita mikroszervezetei feltárják és a növények számára ismét felvehető szerves anyagok állapotba hozzák azokat a biogén elemeket, amelyek részt vesznek a szerves anyagok felépítésében, az energia raktározásában és transzportjában (KOVÁCS, 2005).

A biodegradáció lehet teljes és részleges, illetve aerob vagy anaerob. A teljes biodegradáció, vagy mineralizáció során a kiindulási szerves vegyületek, enzimkatalizált reakciók egymásra épülő sorozatán keresztül, szén-dioxidra és vízre oxidálódnak. Aerob körülmények között a végső elektronakceptor a levegő oxigénje, míg anaerob környezeti feltételek mellett, alternatív elektronakceptorként leggyakrabban a nitrát, a szulfát, a ferri ionok, ill. a szén-dioxid szolgál. Ezek a folyamatok a lebontást végző mikroszervezetek számára szén és/vagy energiaforrással szolgálnak a sejt szaporodása során (SZOBOSZLAY ÉS KRISZT, 2010).

A részleges biodegradációnak három alapvető típusa ismeretes:

- a lebontást, átalakítást végző enzimek közül valamelyik hiányzik,
- a kometabolizmus (kooxidáció), amely során a kiindulási vegyület részleges lebontása bekövetkezik ugyan, de a biodegradációt végző mikroszervezetek a folyamatból származó energiát, ill. anyagokat nem használják fel,
- a harmadik típusnál polimerizáció, vagy más szintézis folyamatok révén a kiindulási anyagoknál összetettebb, és/vagy stabilabb vegyületek keletkeznek.

A részleges biodegradáció termékei néhány esetben akár a kiindulási anyagoknál is toxikusabbak, veszélyesebbek lehetnek a környezetre (SZOBOSZLAY ÉS KRISZT, 2010), ám az esetek többségében a biológiai lebomlás együtt jár a szennyezőanyagok detoxifikációjával is.

A bioremediáció, olyan technológia, amely élő sejtek vagy szervezetek, esetleg azok valamely termékének vagy biológiai stabilizáló képességét állítja a technológia középpontjába. A remediációhoz felhasználhatók az ökoszisztéma endogén tagjai vagy közösségei, közülük izolált és vagy mesterségesen felszaporított mikroorganizmusok és/vagy növények, vagy külső forrásból származó aktív közösségek. A bioremediáció, mind ex situ, mind in situ technológiaként alkalmazható. Előnye, hogy viszonylag kis költséggel nagy területek kezelésére is alkalmas, a talaj tulajdonságait, élővilágát, biológiai aktivitását megőrzi. Hátránya, hogy viszonylag nagy az időigénye, időjárás- és klímfüggő és szennyezőanyag-maradékkal sok esetben számolni kell (LÁNG, 2002).

Kármentesítések szempontjából többféle biodegradációról beszélhetünk. Az egyik a spontán biodegradáció, mely során a szennyezett közegben olyan mikroszervezetek jelennek meg, amelyek a szénhidrogén vegyületeket képesek hasznosítani. A szennyezés ebben az esetben lassan és rossz határfokkal, nagy koncentráció esetén pedig egyáltalán nem degradálódik. A támogatott spontán biodegradációs eljárások alkalmazásakor a talaj adott CH- bontó mikroszervezeteit tápanyaggal, nedvességgel és elektronakceptorral látják el. Általában ismert tulajdonságokkal rendelkező laboratóriumi törzstenyészetből vagy kárhelyről származó mikroszervezetekkel dolgoznak a szakemberek, melyet jogszabály is előír (16/2002. EÜM rendelet). Az ilyen tudatos, mikroszervezeteket felhasználó módszert talajoltásnak vagy bioaugmentációnak nevezik. Ezek a mikroszervezetek a kárhelyen viszonylag gyorsan és hatékonyan képesek lebontani a talajba került szénhidrogén vegyületeket (SZOBOSZLAY ET AL., 2004).

A fakultatív patogén (opportunist, másnéven gyengültségi kórokozó) baktériumok megjelenésének kockázata különösen nagy a szénhidrogénnel szennyezett területeken, ugyanis nagy számban vannak köztük olyan fajok, melyek hatékonyan tudják az ilyen szennyezőanyagokat kizárólagos tápanyag- és energiaforrásként hasznosítani. Ezt igazolja, hogy a szénhidrogén-bontásra

képes mikrobanemzetségek – *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Norcadia*, *Rhodococcus*, ***Pseudomonas***, *Vibrio* – 301 faja közül 69 minősül humán patogén mikroszervezetnek (CLAUS, 1992). Ilyen patogén és ugyanakkor szénhidrogénbontásra képes faj az általunk vizsgált *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3. A *Pseudomonas aeruginosa* jellemzése

Taxonómiai besorolása (HTTP1):

Prokarióták

Domén: *Bacteria*

Törzs: *Proteobacteria*

Osztály: *Gammaproteobacteria*

Rend: *Pseudomonadales*

Család: *Pseudomonadaceae*

Genus: *Pseudomonas*

Faj: *Pseudomonas aeruginosa*



1. számú ábra: A *Pseudomonas aeruginosa* elektromikroszkópos felvétele (HTTP2)

A *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negatív pálca alakú baktérium. $0,5\text{--}0,8\text{ }\mu\text{m} \times 1,5\text{--}3,0\text{ }\mu\text{m}$ nagyság körüli. Egy vagy két poláris csillója segítségével mozog, valódi tokja nincs. A környezetben bárhol előfordul, azaz ubikviter. Kórházakban számos rezervoárja lehet, így megtalálható lélegeztető készülékekben, ételekben, lefolyókban, csaptelepekben. Minimális tápanyagigényű, rezisztens magas só-koncentrációra, kiszáradásra, antiszeptikumokra és az antibakteriális szerek széles spektrumára (PIRNAY ET AL., 2009).

Opportunista és nozokomiális patogén, azaz elsősorban kórházi környezetben képes arra hajlamos, legyengül személyekben megbetegedést okozni. Az Amerikai Egyesült Államok adatai szerint (CDC – Centers for Disease Control and Prevention) a negyedik leggyakrabban izolált nozokomiális patogén (JARVIS AND MARTONE, 1992). Vezető helyet foglal el az intenzív osztályok nozokomiális fertőzéseiben: első helyen áll a légúti infekciókban (17,5%), a negyedik leggyakoribb kórokozó a húgyúti infekciókban (12,1%), a harmadik leggyakoribb baktérium a sebfertőzésekben (10,9%), és hatodik helyen állt a szepszisekben (FILETÓTH, 1995).

A *P. aeruginosa* előfordulása a környezetben:

Az USA-ban (Dél-Karolina) végzett vizsgálatok szerint a természetes állapotú, nem szennyezett talajok kb. 16%-ában fordul elő *P. aeruginosa* (FERGUSON ET AL., 2001). Szennyvizekből gyakran kimutatható, emellett megtalálható mélyfúrású kutak vizében, desztillálókban, székletben, növényekben és élelmiszerekben.

Élősejt-számára jellemző hazai adatok: folyókban, patakokban 10^2 - $10^3/\text{cm}^3$, víztározókban 10^1 - $10^2/\text{cm}^3$, házi szennyvízben $10^3/100 \text{ cm}^3$, székletben 10^3 - $10^5/\text{g}$ (NÉMEDI ET AL., 1998). Szénhidrogénnel szennyezett területeken szakirodalmi források alapján az egyik leggyakrabban izolálható mikroszervezet (CHAYABUTRA AND JU, 2000).

2.3.1. A környezeti és a klinikai törzsekkel végzett eddigi kutatások áttekintése

a) Antibiotikum-rezisztenciára vonatkozó vizsgálatok

A *P. aeruginosa* egyike azoknak az ún. probléma-baktériumoknak, melyek kezelése mind a nagyobb kihívás elé állítja az orvostudományt (FILETÓTH, 1995). Számos kutatás irányult a faj antibiotikum rezisztenciájának vizsgálatára, elsősorban klinikai viszonylatban.

A *P. aeruginosa* számos rezisztencia mechanizmussal rendelkezhet, melyek között kiemelten jelentős az efflux pumpát szabályozó génen történő mutáció. Ez a rendszer túlműködésében nyilvánul meg, ami különféle, kémiaiilag nem rokon szerkezetű antibiotikumokkal szembeni egyidejű rezisztenciát eredményez (β -laktámok, beleértve a carbapenemeket, aztreonamot, fluorokinolokat, aminoglikozoidokat és egyéb klinikailag nem jelentős szereket). A *P. aeruginosa* ezen kívül könnyen szerezhethet olyan transzferábilis genetikai elemeket, amelyek szintén antibiotikum rezisztenciát kódolnak. Az antibiotikumok széleskörű használata napjainkban olyan hiperrezisztens törzsek felbukkanásához vezetett, amelyek mutáció vagy rezisztencia gének megszerzése vagy mindkét genetikai folyamat révén valamennyi antibiotikummal szemben rezisztenssé váltak (KONKOLY, 2003).

b) Szerocsoport meghatározásra vonatkozó vizsgálatok

A szerocsoport meghatározás a Gram-negatív mikroszervezetek epidemiológiai vizsgálatának egyik meghatározó ága. A vizsgálat során specifikus antitestek (antiszérum) segítségével azonosítjuk a baktériumsejt valamely szerkezeti elemén található antigéneket. A szerológiai csoportosítás kialakítása Kauffmann nevéhez kötődik, aki az 1940-es években azonosította az első 20 O (szomatikus) antigén kötő helyet, melyet napjainkban is rutinszerűen alkalmaznak a *P. aeruginosa* tipizálásában (JAY ET AL., 2005). Számos kutatás irányult a faj egyes törzseinek szerotípus-azonosítására, illetve ennek összefüggéseire egyéb tulajdonságokkal.

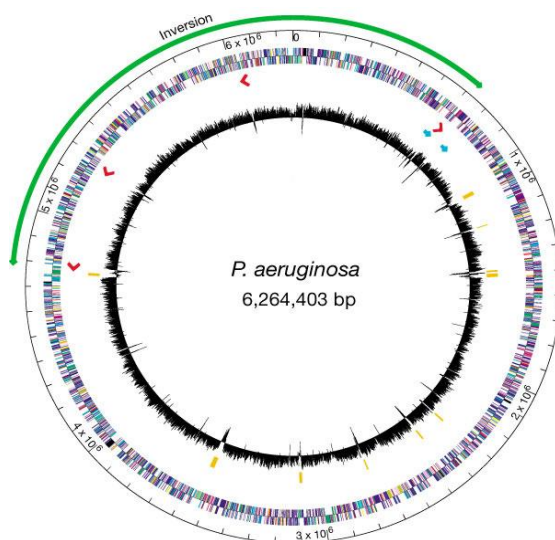
A klinikai, illetve környezetben detektálható szerocsoportok tulajdonságaira vonatkozóan számos publikáció jelent meg az elmúlt években (YOKOTA AND NOGUCHI, 1994; HOSTACKÁ AND MAJTÁN, 1997, ENGLENDER ET AL., 1990, ORSI ET AL., 1994, MILLESIMO ET AL., 1995, POH ET AL., 1988, RAVAOARINORO ET AL., 1996), melyek saját vizsgálataink összevetéséhez is alapot jelentettek. Részletes ismertetésükkel így az Eredmények és értékelésük fejezetben foglalkozunk.

c) Virulenciára vonatkozó vizsgálatok

A *P. aeruginosa* faj számos virulencia faktorra rendelkezik, melyek szerepet játszanak az esetleges patogenezisben, azaz a betegség kialakulásában. Ilyenek lehetnek a szervezet védekezőképességével szembeni ellenállására szolgáló toxikus proteinek, illetve enzimek, a hemolitikus aktivitás, valamint a biofilmképzés (BERTÓK, 1998). Ezek közül kiemelt jelentőséggel bírnak az ún. exotoxinok, melyek speciális szekréciós rendszer segítségével juthatnak a baktériumsejt környezetébe, illetve a hemolízisre való képesség, mely a vörösvértest-károsító képességre utal. E tulajdonságok jelenlétéből, illetve hiányából következtethetünk adott baktériumtörzs esetleges patogenitására. Az exotoxinok termeléséért felelős génszakaszok (név szerint: *exoA*, *exoU*, *exoY*, *exoS* és *exoT*) környezeti törzsek közötti gyakoriságára, illetve a hemolitikus aktivitásra vonatkozó vizsgálatok a közelmúltban történtek a SZIE-KKBT-n (PÉK, 2010).

2.3.2. A *Pseudomonas aeruginosa* faj evolúciójának, epidemiológiájának, filogenetikai kapcsolatainak vizsgálata

A *P. aeruginosa* faj genomja 5,2-7,4 Mbp (megabázispár) méretű (SCHMIDT ET AL., 1996), mely nagyságrend számos evolúcióra és epidemiológiára irányuló módszer használatát teszi lehetővé. A faj molekuláris genetikai alapokon nyugvó taxonómiájában komoly háttérrel jelent, hogy egy kiválasztott típustörzs (*P. aeruginosa* PAO1) esetében elkészült a faj teljes Genom Projekt-je (lásd 2. sz. ábra).



2. számú ábra: A *P. aeruginosa* PAO1 jelzésű izolátumának teljes genomjának körkörös megjelenítése (STOVER ET AL., 2000)

Az ismert genom (PAO1) vizsgálatai alapján napjainkban kialakult az a feltételezés, hogy a *P. aeruginosa* környezeti és klinikai (cisztás fibrózisban szenvedő betegekből izolált) törzseinek génkészlete – csupán 0,5% nukleotid-eltérés mellett – több mint 80%-os átfedésben van (SPENCER

ET AL., 2003). DENAMUR ET AL. (1993) és PICARD ET AL. (1994) elméletei szerint a faj populációinak összefüggése pánmiktikus¹ szerkezetet mutat, ám KIEWITZ és TUMMLER (2000) hálójellegű struktúrát feltételez.

Az elmúlt időszakban számos vizsgálat irányult a *P. aeruginosa* faj tipizálására és a törzsek közötti kapcsolatrendszer feltárására (GRUNDMANN ET AL.,1995), ám ezek nem egységes szempontrendszer alapján mentek végbe. Egységesítés végül egy olyan séma, a **multilokusz szekvencia tipizálás (Multilocus sequence typing, MLST)** kidolgozásakor alakult ki, mely lehetővé teszi a *P. aeruginosa* izolátumok diverz (környezeti és klinikai) kollekciójának jellemzését (CURRAN ET AL., 2004). Ennek a módszernek az alkalmazása napjainkban széles körben elfogadottá vált mind hazai (LIBISCH ET AL., 2009), mind nemzetközi szinten, így munkám során ezt a kutatási módszert vettem alapul.

¹ pánmiktikus populáció: a genetikai információ cseréje random módon jelentkezik.

3. Anyag és módszer

A bevezetésben ismertetett (MLST, szénhidrogén-bontás megállapítását célzó, illetve szerológiai) vizsgálataink első lépése a vizsgálandó izolátumok kiválasztása volt.

3.1. A vizsgálandó törzsek kiválasztásának szempontjai

A Szent István Egyetem- Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszékén 2002 óta zajló monitoring tevékenységnek köszönhetően létrejött egy 191 izolátumból álló és jelenleg is bővülő *P. aeruginosa* izolátum-gyűjtemény, mely elsősorban szénhidrogénnel szennyezett és komposzt eredetű törzsekből áll (a kollekció kialakításának főbb lépéseit foglalja össze a Melléklet 1. sz. ábrája). Ez a jelentősnek mondható kollekció állt rendelkezésemre a vizsgálataimhoz, mely kiegészült 5 db összehasonlító klinikai izolátummal.

Kutatási tervem elkészítésekor ebből a környezeti és klinikai törzseket tartalmazó törzsgyűjteményből az MLST, valamint szénhidrogén-bontás megállapítását célzó vizsgálatokhoz 22 törzset (20 környezeti eredetű és 2 klinikai származású izolátumot) választottunk, melyek esetében a célkitűzéseimben megfogalmazott vizsgálatok végrehajtását terveztük. A klinikai és környezeti izolátumok tulajdonságait az 1. és 2. táblázatban mutatom be. A szerológiai vizsgálatok esetében reprezentatív eredmény elérésére törekedtünk, így ebbe a vizsgálati irányba 65, környezeti eredetű törzset vontunk be (részletes tulajdonságaikat lásd 5. számú táblázatában).

1. számú táblázat: A kiválasztott klinikai izolátumok tulajdonságai

Minta jele	Mintavétel ideje	Mintavétel helye	Mintavételi közeg	Faji identifikáció eredménye	Virulencia faktorok gyakorisága (PÉK, 2010)	Rezisztencia (összes/rezisztens) (SZABÓ,2009)
ATCC 27853	1971	Medeiros, Boston, USA	Emberi vérből izolált	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/2
KPS-3	2005-2007	OKI	Emberi sebfertőzésből izolált	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/0

2. számú táblázat: Az MLST és gravimetriás vizsgálatokhoz kiválasztott környezeti törzsek tulajdonságai

Minta jele	Mintavétel ideje	Mintavétel helye	Mintavételi közeg (szénhidrogénnel szennyezett közeg)	Minták maximális TPH (C ₅₋₄₀) koncentrációja (mg/kg, µg/L) ²	Faji identifikáció eredménye	Virulencia faktorok gyakorisága (PÉK, 2010)	Rezisztencia (összes/rezisztens) (SZABÓ, 2009)
P9	2003	Diósd	felszín alatti víz	630	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/1
P14	2003	Tököl	felszín alatti víz	16800	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/3
P22	2003	Túrkeve	földtani közeg	11300	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/0
P28	2003	Polgár	földtani közeg	7300	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/2
P30	2004	Szabadszállás	felszín alatti víz	78500	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/2
P32	2004	Komádi	felszín alatti víz	362	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/3
P39	2004	Algyő	felszín alatti víz	569	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/2
P42	2005	Mezőtúr	földtani közeg	705	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/0
P43	2005	Ópusztaszer	felszín alatti víz	8500	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/6
P46	2005	Budapest	felszín alatti víz	27500	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/4
P50	2005	Bátonyterenye	felszín alatti víz	n.d.	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/1
P53	2006	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	63500	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/3
P62	2006	Szarvas	felszín alatti víz	>100000	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/0
P65	2005	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	31400	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/0
P69	2007	Nagyszénás	felszín alatti víz	3630	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/4
P71	2007	Debrecen	felszín alatti víz	4880	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/1
P77	2007	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	31400	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/0
P83	2008	Tiszaújváros	finomítói szennyvíz	304	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/1
P85	2008	Zalaegerszeg	finomítói szennyvíz	132	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/0
P109	2008	Siklós	komposzt	n.d.	<i>P. aeruginosa</i>	5/4	10/1

n. d. – nincs adat

A kiválasztás alapja az alábbi szempontrendszer volt:

Klinikai törzseknél szerepeljen:

- Általános, nemzetközi összehasonlításra alkalmas törzs - az **ATCC 27853** törzsgyűjteményi jellel ellátott, a nemzetközi laboratóriumi gyakorlatban széles körben alkalmazott izolátum,
- Hazai összehasonlítást lehetővé tevő törzs - a **KPS-3** törzsgyűjteményi jelű, Magyarországon izolált, klinikai sebfertőzésből származó nozokomiális izolátum.

Környezeti törzseknél:

- Az izolátum szénhidrogénnel szennyezett területről származzon,
- A filogenetikai kapcsolatrendszer minél átfogóbb vizsgálata érdekében eltérő származási hely/minta
- Identifikációjuk szilárd molekuláris genetikai alapokon nyugodjon,

² A maximális TPH koncentrációra vonatkozó méréseket a Dr. E. Weßling Kémiai Laboratórium Kft. –végezte az MSZ EN ISO 9377 – 2:2001 és a DIN 38409 H18:1981 számú szabványok alapján.

- Virulenciájukat tekintve a kiválasztott izolátumok rendelkezzenek legalább két, egyidejűleg detektált virulencia faktorral, azaz feltehetően humán patogén tulajdonságokra utaló génkészlettel bírjanak. Ennek megállapításához a SZIE-KKBT által korábban elért és részben publikált, exoenzim és exotoxin kódoló gének (*exoA*, *exoS*, *exoT*, *exoU* és *exoY*) gyakoriságára, illetve hemolitikus aktivitásra utaló eredményeket vettük alapul (PÉK, 2010, KASZAB ET AL., 2010A).
- A Tanszék által publikált, antibiotikum rezisztenciára vonatkozó eredmények alapján (KASZAB ET AL., 2010C) a klinikai gyakorlatban jelentős antibiotikum-hatóanyagokkal szemben rezisztens illetve multirezisztens (több antibiotikum hatóanyag csoporttal szemben egyidejű rezisztenciát mutató) izolátum legyen.

3.2. A multilokusz szekvencia tipizálás (MLST) módszer kivitelezése

Az MLST nem más, mint, olyan nukleotid bázissorrend meghatározáson alapuló szekvencia tipizáló módszer, ahol több, különböző (általában 7) ún. housekeeping gene³ („háztartási gén”) belső fragmentjei kerülnek legalább két párhuzamos vizsgálatban szekvenálásra. A módszer végrehajtását a kiválasztott környezeti és klinikai izolátumok esetében az alábbi főbb lépésekben végeztük el:

- a DNS izolálása baktériumból,
- szakirodalmi ajánlások alapján kiválasztott háztartási gének kimutatása simplex PCR reakciókban,
- PCR termék ellenőrzése agaróz-gélelektroforézissel,
- PCR termék tisztítása,
- az izolált génszakasz belső fragmentjének didedoxi-láncreakcióban történő felszaporítása,
- az így nyert termék nukleotid-bázissorrendjének meghatározása,
- az eredmények értékelése összevetése nemzetközi adatbázisokkal és a Szekvencia Típuszám meghatározása.

3.2.1. DNS – izolálás baktériumból

A vizsgálatba vont törzsek esetében első lépésként a teljes DNS izolálást hajtottuk végre **mikrohullámú feltárás** segítségével. Ennek során a vizsgálandó baktériumtörzs tiszta tenyészetéből steril körülmények között, kiizzított bakteriológiai oltókacs segítségével, TGE-5 agar felszínére szélesztettünk (*TGE-5 agar összetétele: tripton,(5,0 g); élesztőkivonat,(2,5 g); glükóz,*

³ housekeeping gene: a sejt valamely alapvető életfunkcióját kódoló gén, mely konstitutív módon minden esetben expresszálódik.

(5,0 g); bakteriológiai agar, (15,0 g); desztillált víz, 1000 cm³; pH: 7,0. Sterilizés: 121 °C, 1 atm, 15 min). Ezt követően a petri- csészéket a *P. aeruginosa* faj igényeinek megfelelő körülmények között (28°C, 18 h) inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével az „Overnight” baktériumtenyészet különálló telepeiből kacsnyi mennyiséget steril, 1,5 ml-es Eppendorf csőbe kentünk, majd mikrohullám segítségével a sejtenyészetet feltártuk. Az így roncsolt sejteket 50 µl MQ- vízben szuszpendáltuk, majd a bakteriális DNS elválasztása érdekében 3 percig 14500 RPM fordulaton centrifugáltuk. A felülúszó fázist a további, PCR alapú vizsgálatokban templátként használtuk fel.

3.2.2. A *P. aeruginosa* MLST vizsgálatához használt háztartási gének

A *P. aeruginosa* esetében az MLST vizsgálatokhoz nemzetközi szakirodalmi ajánlások alapján kiválasztott háztartási gének a következők voltak (HTTP3):

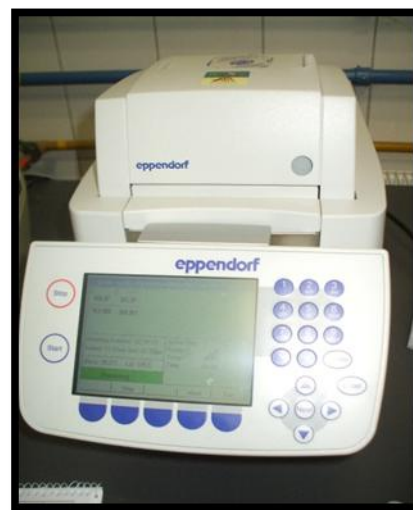
1. ***acsA***: A citromsavciklusban szerepet játszó acetyl-koenzim A szintézisében résztvevő Acetyl-koenzim A szintetáz enzim termeléséért felelős génszakasz (HTTP4).
2. ***aroE***: az aminosav-transzportban és metabolizmusban szerepet játszó shikimate (sikimát) átalakítását katalizáló Shikimate-dehidrogenáz enzim termeléséért felelős génszakasz [Reakció: sikimát + NADP(+) $\rightleftharpoons$ 3- dehidrosikimát + NADPH] (HTTP5).
3. ***guaA***: A xantozin-monofoszfátot guanozin-monofoszfáttá átalakító Guanozin-monofoszfát-szintetáz enzim termeléséért felelős génszakasz [Enzim által katalizált reakció: ATP + xantozin 5'-foszfát + α -glutamát + H₂O $\rightleftharpoons$ AMP + difoszfát + GMP + α -glutamát] (HTTP6).
4. ***mutL***: A DNS károsodását gátló MutL-protein termeléséért felelő génszakasz (HTTP7)
5. ***nuoD***: Az elektron-transzportban szerepet játszó NADH-dehidrogenáz enzim termelését kódoló génszakasz [Enzim által katalizált reakció: elektront leadó akceptor + NADH $\rightleftharpoons$ elektront felvevő akceptor + NAD] (HTTP8).
6. ***ppsA***: A foszfoenol-piruvát szintetáz termeléséért felelős génszakasz [Enzim által katalizált reakció: ATP + piruvát + H₂O $\rightleftharpoons$ AMP + Foszfoenol – piruvát + ortofoszfát] (HTTP9).
7. ***trpE***: Antralit-szintetáz komponenst kódoló génszakasz. A trp operonnak 5 struktúrgénje van, amelyek három enzim polipeptidláncát kódolják. Az enzimek a triptofán prekursorát, a korizminsavat alakítják át. Az első két gén, a trpE és a trpD termékei a reakcióút első lépését katalizáló enzim polipeptidjei (WEAVER AND HEIDRICH., 2000).

Ezek a háztartási gének, olyan gének, melyek a baktérium életben maradásához feltétlenül szükséges életfolyamatokban résztvevő enzimeket és proteineket kódolnak. Így ezek a gének a faj minden képviselőjében előfordulnak, konzervált génszakaszok, tehát filogenetikai összehasonlítás alapjául szolgálhatnak.

3.2.3. PCR – reakció bemutatása

A polimeráz –láncreakció (PCR) egy molekuláris biológiai technológiai módszer a DNS enzimatisz amplifikálására, azaz az adott génszakasz kópiáinak megsokszorozására, élő szervezet igénybevétele nélkül (HTTP10). Az enzimek egy indító oligonukleotid, a primer segítségével képesek lemásolni, a DNS-szál adott régióját. Ismételt működésük során a kívánt DNS szakasz - amire a primer specifikusan kapcsolódik - hatványozottan felsokszorozódik, ezért

kapta ez a módszer a polimeráz-láncreakció elnevezést (DEZSŐ ÉS NAGY, 2005). A PCR reakciókat az Eppendorf Mastercycler® készülék segítségével hajtottuk végre (3. számú ábra), mely a reakciócsöveket ciklikusan felhevíti és lehűti a megállapított hőmérsékletekre.



3. számú ábra: Eppendorf Mastercycler® készülék (saját kép)

A PCR alapú vizsgálatok kivitelezéséhez szükséges komponensek:

- **DNS-templát** – a 3.2.1.-es fejezetben bemutatott módszer szerint feltárt bakteriális DNS, mely tartalmazza az amplifikálandó régiót,
 - **specifikus primer-pár** – rövid, mesterséges oligonukleotid szakaszok, amelyek komplementerek az amplifikálandó DNS-szakasz elejével és végével,
 - **Taq-polimeráz** – az új DNS-szál felépítéséért felelős enzim.
- dNTP** (dezoxi-nukleotid-trifoszfátok) – amelyekből a DNS-polimeráz felépíti az új DNS-t,
- **Taq-puffer** – amely biztosítja a DNS- polimeráz működéséhez megfelelő kémiai környezetet: pH-t, ionerősséget és sókoncentrációt,
 - **MgCl₂** – a Taq-polimeráz működéséhez nélkülözhetetlen kofaktor (DEZSŐ ÉS NAGY, 2005).

Az eljárás 20-35 ciklus egymásutánjából áll, melynek során exponenciális-növekedés mellett, elérhető a kellő számú (10^6 - 10^9 kópia) ampliton. Mindegyik ciklus 3 fő lépést tartalmaz:

1. **Denaturáció:** a készülékben a kettős szálú DNS-t 94-98 °C-ra hevítjük, hogy a szálak szétváljanak. Ekkor két DNS-szálat összekötő hidrogén-híd- kötések felbomlanak. Az első ciklus előtt a DNS-t gyakran hosszabb ideig denaturálják, hogy a templát-DNS és a primerek kettős szálai is teljesen szeparálódjanak.

2. **Anelláció:** a DNS-szálak szeparálása után a hőmérsékletet csökkentjük a készülékben, így a primerek hozzá tudnak kapcsolódni a DNS-szálakhoz. A hőmérséklet ebben a fázisban függ a primerektől, és általában 5 °C-kal van a primerek olvadási hőmérséklete alatt. Ha a kapcsolódási lépésben a hőmérséklet nem megfelelő a primerek vagy egyáltalán nem kötődnek a templáthoz, vagy véletlenszerűen kapcsolódnak.
3. **Extenzió:** végül a DNS-polimeráz (Taq-polimeráz) létrehozza a hiányzó szálát. A munkát a kapcsolódott primernél kezdi és végigmegy a DNS-szálon. A szintetizálás ciklikus ismétlődése során az újonnan szintetizálódott nukleotid-szálak templátként szolgálnak. A lépés hőmérséklet- és időigénye függ az amplifikálandó DNS-szakasz hosszától és a DNS-polimeráztól (HTTP10).

Végső extenzió: A polimeráz láncreakciók sorozatának végén utolsó lépésben lehetőséget adunk a DNS polimeráznak, hogy lezárja a szintetizált szálakat.

A fenn ismertetett elvi alapokon nyugvó PCR reakció megvalósítása során az alábbiakban ismertetett anyagokat, módszereket, eszközöket használtuk:

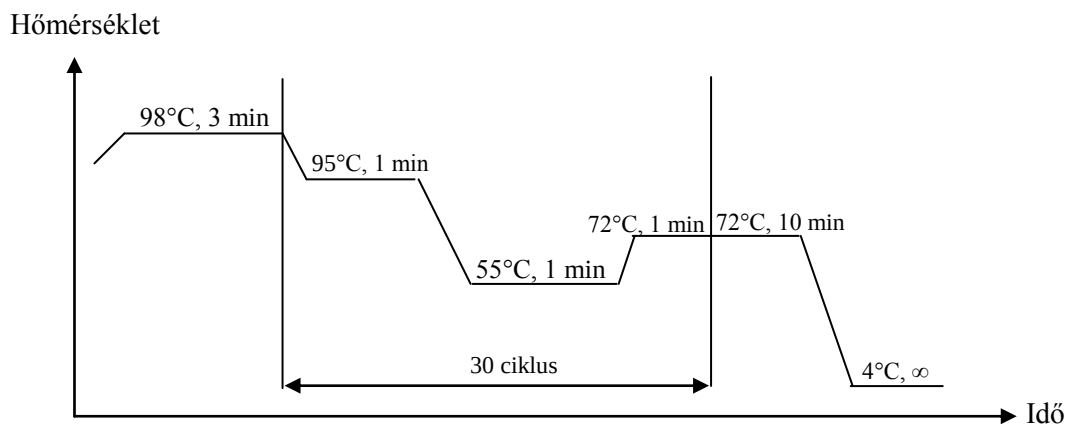
A kiválasztott génszakaszok amplifikálásához szükséges primerpárokat szakirodalmi ajánlás alapján választottuk (CURRAN ET AL., 2004). Főbb tulajdonságaikat foglalja össze a 3. sz. táblázat.

3. számú táblázat: Az MLST vizsgálatokban alkalmazott primerek tulajdonságai

Primer	Olvadási hőmérséklet	Bázispár-hosszúság	Amplifikáló primerek szekvenciája (5'→3')
acsA	73 °C	842	F: ACCTGGTGTACGCCT CGCTGAC R: GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT
aroE	65 °C	825	F: TGGGGC TATGACTGGAAACC R: TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA
guaA	71 °C	940	F: CGGCCTCGACGTGTGGATGA R: GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA
mutL	71 °C	940	F: CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG R: CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC
nuoD	55 °C	1042	F: ACCGCCACCCGTACTG R: TCTCGCCCATCTTGACCA
ppsA	73 °C	989	F: GGTCTGCTCGGTCAAGGTAGTGG R: GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG
trpE	64 °C	811	F: GCGGCCCAGGGTCGTGAG R: CCCGGCGCTTGTGATGGTT

A PCR reakció során alkalmazott reakcióelegy: (50 µl végtérfogatra számolva): 2 µl (~10 ng) templát DNS, 2-2 µl (1µM) Forward és Reverz primer, 10 µl (1mM), dNTP, 1 µl (2,5 U) Taq – polimeráz (Quiagen), 5 µl Taq – puffer (Quiagen), 3 µl (1,5 mM) MgCl₂, 23 µl MQ – víz, 2 µl DMSO (CURRAN ET AL., 2004).

Az **alkalmazott hőprofil** a 4. számú ábrán szemléltetem.



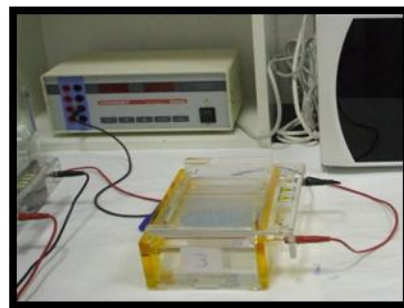
4. számú ábra: Az MLST PCR reakciójában alkalmazott hőprofil

3.2.4. Agaróz-gélelektroforézis

A PCR-termék azonosítása agaróz-gélelektroforézissel történik. A reakcióban alkalmazott primerek specifikus helyen történő feltapadása pontosan megszabja a PCR-termék méretét. Ismert marker mellett végzett egyidejű gélelektroforézissel tehát vizuálisan meghatározhatjuk a DNS-fragmentek hosszát, így ellenőrizhetjük a keresett DNS-szakasz jelenlétét a termékben (DEZSŐ ÉS NAGY, 2005).

Az eljárás során agaróz gélbe injektáljuk a PCR-elegyet (ami tartalmazza a felszaporított DNS-fragmenteket). Ezt követően a gélen elektromos áramot vezetünk át, aminek hatására az enyhe negatív töltéssel rendelkező DNS-szálak a gél pórusain keresztül az ellenkező pólus felé vándorolnak. A DNS-molekula elektroforetikus migrációjának mértékét 5 jellemző határozza meg: a gél koncentrációja az alkalmazott elektromos térerő, a DNS-molekula hossza, töltése, konformációja⁴ (DEZSŐ ÉS NAGY, 2005).

A gélelektroforézis során az első zsebbe ún. DNS-létrát (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) injektálunk, ami ismert hosszúságú DNS-fragmenteket tartalmaz, így a vizsgálandó PCR-termékek hossza becsülhetővé válik. A DNS-fragmentumok gélben történő detektálására a legalkalmasabb az ethidium-bromid, amely a DNS-molekulába



5. számú ábra: OWL- típusú futtatókád (saját kép)



6. számú ábra: Gél dokumentációs rendszer (saját kép)

⁴konformáció: Egy molekula lehetséges térszerkezetei, melyek egy-egy kötéstengely körüli átfordulással átmehetnek egymásba.

kerülve UV-fény hatására fluoreszkál (DEZSŐ ÉS NAGY, 2005). Ez géldokumentációs rendszerrel ellenőrizhető. A folyamat során használt eszközöket szemlélteti az 5-6. számú ábra.

A gél összeállításához szükséges anyagok: 60 ml 1%-os TBE- (TRIS, bórsav, EDTA) puffer, 0,48 g agaróz por, 3,6 µl ethidium-bromid

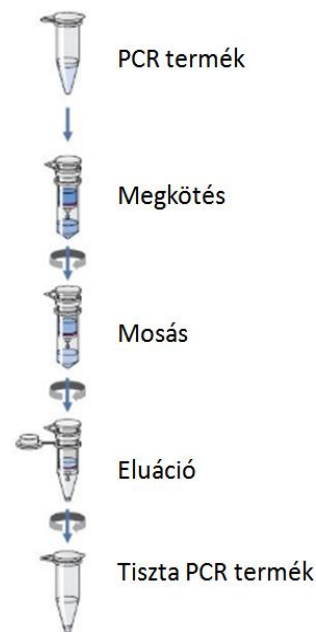
A PCR termék előkészítéséhez szükséges komponensek: 2-3µl Stop-TBE (50% szacharóz, 20 nM Na-EDTA, 0,1% brómfenolkék), 8 µl PCR- termék.

Futtatás: 110 mV, 30 min OWL típusú futtatókádban (lásd 5. számú ábra).

3.2.5. A PCR- termék tisztítása

A PCR- reakció során nyert PCR-terméket (amplikont) MinElute UF PCR purification Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk a gyártó útmutatásának megfelelően. A tisztított amplikon kerülhet végül szekvenáló reakcióban felhasználásra. A többlépcsős tisztítási eljárás folyamatában a tisztítani kívánt amplikont kísérő szükségtelen alkotók (maradék dNTP, primer dimerek) eltávolíthatóak, így csak az izolált fragment kópiái maradnak vissza.

A tisztítás folyamata (lásd 7. sz. ábra): a rendelkezésünkre álló PCR-terméket kétszeres térfogatú NT pufferben felvesszük, majd szilika-membránra visszük. A membránt gyűjtőcsőbe helyezve 1 perces 11000 RPM fordulaton végzett centrifugálás következik, majd 700 µl NT3 puffert mérünk a membránra. Újabb 1 perc, ill. 2 perces centrifugálások következnek, melyek után tiszta Eppendorf-csövet helyezünk a gyűjtőcső helyére. 30 µl NE- puffer hozzáadását követően szobahőmérsékleten 1 perc inkubáció következik, majd 1 percig 11 000-es fordulaton centrifugálás. Az így az átszűrt mennyiség lesz a tisztított termék, mely agaróz-gélelektroforézissel történő ellenőrzést követően, -20 °C-on tárolható felhasználásig.



7. számú ábra: A PCR termék tisztításának lépései (HTTP11)

3.2.6. Szekvenáló PCR reakció és kicsapatás

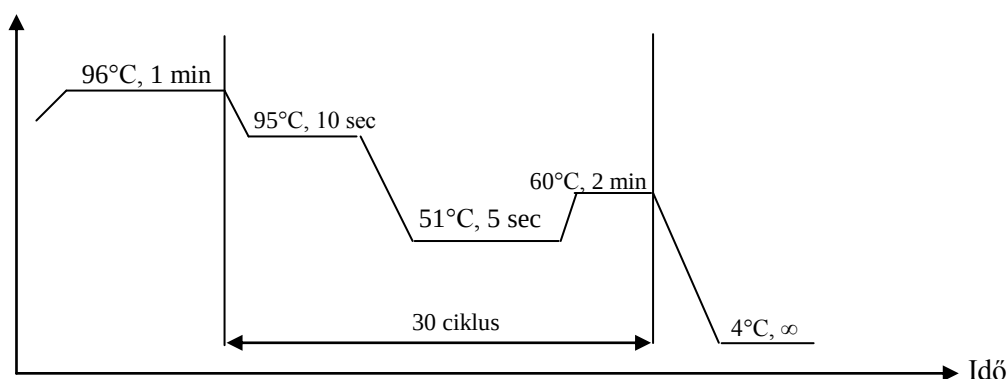
A fragmentek szekvencia meghatározását BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit® felhasználásával, Eppendorf Mastercycler® készülékkel végeztem, mely az ún. dideoxi-, vagy Sanger-féle láncterminációs módszeren alapszik. A ciklusok során a reakció-specifikus polimeráz enzim a templát DNS-szál mellé kettősen jelölt dideoxy nukleotidokat (ddNTP) is beépít. Ezek az ún. terminátor molekulák, melyek esetében a ribóz 2' és 3' helyéről is hiányzik az oxigén. A DNS szál szintézise a jelölt nukleotidok beépülésével megszakad, a reakció során egyre növekvő hosszúságú molekulák szintetizálódnak.

A reakció paramétereit az alábbiak szerint alakultak:

A szekvenáló PCR reakció során alkalmazott reakcióelegy (1 mintára, 10 µl végtérfogat mellett): 1 µl Big Dye, 1,5 µl Big Dye puffer, 0,5 µl primer, 3,5 µl DNS- templát (tisztított PCR - termék), 3,5 µl MQ-víz.

Az **alkalmazott hőprofil** a 8. számú ábrán szemléltetem.

Hőmérséklet



8. számú ábra: Az MLST szekvenáló PCR reakciójában alkalmazott hőprofil

A szekvenáló PCR reakcióhoz olyan primerpárokat alkalmaztunk, melyek az izolált háztartási gének belső fragmentjeire specifikusak, így segítségükkel lehetővé vált adott bázispár-hosszúságú termék szekvenciájának meghatározása. A primer-párok tulajdonságait a 4. számú táblázat tartalmazza.

4. számú táblázat: A szekvenáló primerek tulajdonságai

Szekvenáló primer	Olvadási hőmérséklet	Amplikon (bázispár)	Szekvenáló primerek szekvenciája (5' -> 3')
seq –acsA	62 °C	390	F: GCCACACCTACATCGTCT AT R: GTGGACAACCTCGGCAACCT
seq – aroE	62 °C	495	F: ATGTCACCGTGCCGTTCAAG R: TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG
seq –guaA	63 °C	372	F: AGGTCCGTTCTCCTCAAGGTC R: TCAAGTCGCACCACAACGTC
seq- mutL	60 °C	441	F: AGAAGACCGAGTTCGACCAT R: ATGACTTCCTCTATGGCACC
seq – nuoD	64 °C	366	F: ACGGCGAGAACGAGGACTAC R: TTCACCTTCACCGACCGCCA
seq – ppsA	62 °C	369	F: GGTGACGACGGCAAGCTGTA R: TCCTGTGCCGAAGGCGATAC
seq – trpE	64 °C	441	F: TTCAACTTCGGCGACTTCCA R:GGTGTCCATGTTGCCGTTCC

Etanol precipitáció: A szekvenáló PCR reakciót követő feladat a jelölt DNS visszanyerése a szekvencia meghatározásához. Ennek megvalósításához ún. acetát-mixet alkalmaztunk melynek összetétele 1 mintára, 40 µl végtérfogat esetén az alábbiak szerint alakult: 1,5 µl Nátrium-acetát (2 M), 7,25 µl MQ-víz, 31,25 µl 95%-os etanol.

A szekvenáló PCR-termékéhez 40 µl-t adunk az acetát-mix-ből, vortexeljük és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezt követően 4600 RPM fordulaton 4 °C-on 30 percig centrifugáljuk. A felülúszó fázist dekantáljuk, az üledéket 180 µl, 70 %-os etanollal felvesszük. Újabb centrifugálást követően (20 min, 4°C, 4600 RPM) az etanolt maradéktalanul eltávolítjuk, majd mintánként 20 µl Hi-Di formamiddal vesszük fel a kicsapott DNS-t. Ezt 4°C-on 1 napig tároljuk.

3.2.7. Kapilláris gélelektroforézis

Az ABI Genetic Analyser Model 3100 (Applied Biosystems) készülék által végzett automatikus kapilláris gélelektroforézis során hajtjuk végre a jelölt DNS fragmentek szeparálását, mely után következik, a szintén automatizált detektálás. Ehhez szükséges a kettősen jelölt terminátor molekulák alkalmazása. A lézer fény hatására gerjesztődő fluoreszcín molekulák energia transzfer útján gerjesztik a nukleotid specifikus rodamin festék molekulákat, amik karakterisztikus hullámhosszú fényt emittálnak, ilyen módon identifikálva a vizsgálandó DNS szakasz minden egyes nukleotidját (szekvencia kromatogram). A kettős jelölés megnöveli a módszer érzékenységét és specifikitását. Az adatok kiértékelését a szekvenciák meghatározását, tárolását szoftver végzi.

A szekvenáló PCR-mix, a szekvenálási reakció, a szeparálás (a kapilláris állapota), valamint a detektálás folyamatának ellenőrzése a gyártó által biztosított referencia anyag (M13 jelű tisztított templát DNS) vizsgálatával történik.

3.2.8. Allélikus profil és szekvencia típus meghatározás

A fenn ismertetett többlépcsős molekuláris genetikai vizsgálatok eredményeképp két párhuzamos (Forward, illetve Reverz irányban megállapított) szekvenciát kaptunk minden egyes háztartási génre nézve. A következő lépésben DNA Baser v 3.0.16.195 program (Heracle BioSoft) segítségével a két szekvenciát illesztettük és az ún. mismatch-eket (hibákat) manuálisan kijavítottuk.

Az így nyert kb. 450-500 bázispár hosszúságú fragmentek szekvenciái nemzetközi adatbázissal (www.pubmlst.org/paeruginosa) összevethetővé váltak, így megállapíthattuk az adott lokuszon⁵ található allél⁶ számát, illetve minden egyes észlelt nukleotid különbséghez lokuszonként egy (az előzőektől különböző) allélszámot rendelhattunk. A hét génszakasz esetében meghatározott

⁵ Lokusz: másnéven génhely. Adott gén, vagy szekvencia kromoszómán, vagy genetikai térképen elfoglalt helye.

⁶ Allél: másnéven génváltozat. Adott lokuszon elhelyezkedő gén variációja.

allélok kombinációja alapján pedig megállapíthatjuk az adott törzs szekvencia-típusszámát (ST). Az adatbázissal való összehasonlítás eredményeként a vizsgált törzs ST száma alapján meghatározható és felderíthető a jellemző előfordulási helyekről izolált törzsek közti kapcsolatrendszer.

3.3. Szénhidrogénbontó-képesség meghatározása

A *Pseudomonas aeruginosa* izolátumok szénhidrogénbontó képességének vizsgálatát ún. gravimetriás eljárás segítségével hajtottuk végre (RÚZS-MOLNÁR, 1994). A vizsgálat lépéseit szemlélteti a Melléklet 2. számú ábrája.

A vizsgálat első lépésében a kiválasztott izolátum 48 órás TGE ferde agar tenyészetéből szuszpenziót készítettünk, melynek 1 cm³-ével beoltottunk 300 cm³-es Erlenmeyer-lombikban lévő 50 ml TGE-5 táplevest (*TGE-5 agar összetételét lásd a 3.2.1. alfejezetben*). Ezt követően 48 órás, 28°C-on 200 RPM fordulaton végzett rázatás után a törzstenyészet 5 cm³-ével beoltottunk 300 cm³-es Erlenmeyer lombikban lévő 100 cm³ OIR III táplevest (*OIR III tápleves összetétele: 5,0 g (NH₄)₃SO₄, 0,5 g KH₂PO₄, 1,0 g K₂HPO₄, 0,5g MgSO₄*7H₂O, 0,2g CaCl₂ (vizes)*6H₂O, 0,01 g Fe₂SO₄*7H₂O, 0,5 g pepton, 0,5 g élesztőkivonat, 100 ml desztillált víz, pH: 7,0. Sterilizés: 121°C, 1 atm, 20 min*).

Az OIR III oldat egyetlen szénforrásként 2 cm³ gázolaj-kőolaj (3:2 arányú) keveréket tartalmazott. Ez után ismételt inkubáció következett 28 °C-on, 200 RPM fordulatszám, 76 órán keresztül. Az inkubációt követően megállapíthatóvá vált, hogy a vizsgált baktériumtörzs milyen hatékonysággal volt képes szénforrásként hasznosítani a rendelkezésére álló gázolaj-kőolaj keveréket.

A szénhidrogén-tartalom, illetve bontás mennyiségi (szemikvantitív) gravimetriás meghatározása az alábbi lépésekben történt (SZOBOSZLAY ET AL., 2004):

A folyékony tenyészet 100 cm³-ét, 250 cm³-es választótölcsérben, 3x50 cm³ petroléterrel, majd 1x50 cm³ kloroformmal kiráztatjuk. Az oldószeres fázisokat Düren 619 G ¼ szűrőpapíron átszűrjük és ismert tömegű gömblombikokba öntjük. 50-60°C-os vízfürdőn desztilláljuk, hogy a maradék oldószert is eltávolítsuk, majd a lepárlási maradékot századgramm-pontossággal visszamérjük. Az esetlegesen visszamaradt víz eltávolítása érdekében a mérés előtt a mintákat 50°C-on súlyállandóságig szárítjuk. Kontrollként szénhidrogént ugyanilyen arányban tartalmazó, oltatlan, de rázatott folyékony tenyészetet használtunk. (Az ismertetett munkafázisok elszívófülke alatt zajlanak).

3.4. Szerológiai vizsgálatok

A *P. aeruginosa* szerológiai vizsgálatait az Országos Epidemiológiai Központ - Fágtipizálási és molekuláris epidemiológiai osztálya végezte, a Bio-Rad Magyarország Kft. által forgalmazott savókészlettel, a gyártó útmutatásai szerint. 65 törzs esetében készült szerotipizálás a reprezentatív nagyságú adathalmaz elérése érdekében. A vizsgálatba vont törzsek tulajdonságait, a származási helyére vonatkozó információkat foglalja össze az 5. számú táblázat.

5. számú táblázat: A *P.aeruginosa* izolátumainak szerocsoport azonosítása során vizsgált izolátumok tulajdonságai és szerotipizálásuk eredménye (OEK vizsgálatok alapján)

Törzsgyűjteményi jel	Származási hely	Mintavétel ideje	Szerocsoport	Törzs	Származási hely	Mintavétel ideje	Szerocsoport
P2	Diósd	2002	ONT	P62	Szarvas	2006	O3
P3	Órbottyán	2002	ONT	P63	Tiszaújváros	2008	O4
P4	Órbottyán	2002	O3	P64	Zalaegerszeg	2008	O6
P5	Órbottyán	2002	ONT*	P65	Zalaegerszeg	2006	O8
P6	Órbottyán	2002	O3	P66	Kecskemét	2008	O4
P7	Órbottyán	2002	O1	P67	Kecskemét	2008	ONT
P9	Diósd	2003	ONT	P69	Nagyszénás	2007	O6
P10	Diósd	2003	Polyaggl.**	P70	Nagyszénás	2007	O1
P11	Diósd	2003	O5	P71	Debrecen	2007	O1
P14	Tököl	2003	O3	P72	Dunaharaszti	2007	O6
P17	Tököl	2003	ONT	P73	Dunaharaszti	2007	O6
P18	Tököl	2003	O3	P77	Zalaegerszeg	2007	O8
P22	Túrkeve	2003	ONT	P83	Tiszaújváros	2008	O4
P28	Polgár	2003	O1	P84	Zalaegerszeg	2008	O6
P30	Szabadszállás	2004	O3	P85	Zalaegerszeg	2008	O4
P31	Komádi	2004	O8	P90	Kecskemét	2008	O3
P33	Tököl	2004	O8	P91	Kecskemét	2008	ONT
P35	Szabadszállás	2004	O3	P92	Kecskemét	2008	O4
P36	Szabadszállás	2004	O3	P93	Kecskemét	2008	O6
P37	Szabadszállás	2004	O3	P96	Kecskemét	2008	O3
P38	Ópusztaszer	2004	O10	P97	Kecskemét	2008	O4
P39	Algyő	2004	O6	P101	Kecskemét	2008	O7
P42	Mezőtúr	2005	O6	P103	Kecskemét	2008	O3
P43	Ópusztaszer	2005	ONT	P106	Kecskemét	2008	O8
P45	Budapest	2005	O10	P108	Kecskemét	2008	O3
P46	Budapest	2005	O6	P109	Siklós	2008	O3
P49	Bátonyterenye	2005	O6	P112	Zalaegerszeg	2008	O1
P50	Bátonyterenye	2005	O6	P114	Balatonfüzfő	2009	O1
P53	Zalaegerszeg	2006	O6	P121	Balatonfüzfő	2009	O7
P55	Gödöllő	2006	O1	P122	Balatonfüzfő	2009	O6
P56	Gödöllő	2006	O6	P123	Balatonfüzfő	2009	O4
P60	Gödöllő	2006	O6	P124	Zalaegerszeg	2009	ONT
P61	Kecskemét	2008	O3				

* a vizsgált izolátum egyik vizsgált szérummal sem mutatott pozitív reakciót

** a vizsgált izolátum több vizsgált szérummal is pozitív reakciót mutatott

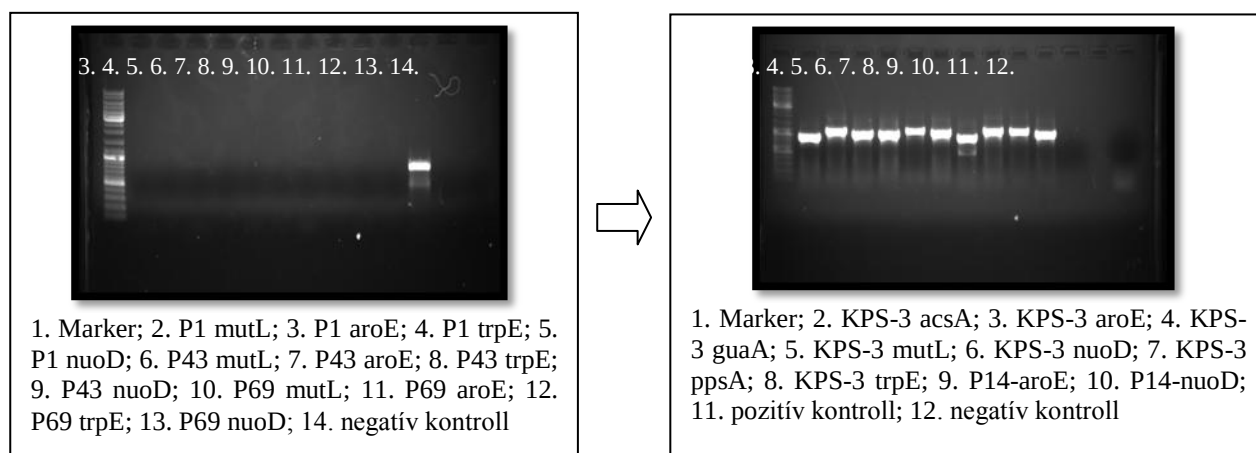
3. Eredmények és értékelésük

4.1. Az MLST vizsgálatok eredményei

4.1.1. Az MLST módszer adaptálása

Az MLST módszer alkalmazásának bevezetésekor szakirodalmi információkra támaszkodtunk, ám a vizsgálatok kivitelezésekor nem várt problémákba ütköztünk. Vizsgálataink kezdetén a háztartási gének azonosítására irányuló PCR-reakciók sorra negatív eredményt hoztak. Ennek oka a sikertelen bakteriális DNS izolálás volt. Kezdetben az izolálás FAST DNA KIT® segítségével történt, ám a módszer során a többszörös pipetta-használat valószínűsíthetően roncsolta a baktériumból izolált DNS-t. Ezért a mikrohullámú feltárás mellett döntöttünk, mivel itt lényegesen kevesebb az esély a DNS további roncsolására a kevesebb pipettázás által. További finomításra volt szükség a PCR reakciókban alkalmazott MasterMix-el kapcsolatban, mivel a mikrohullámú feltárás alkalmazása után sem sikerült megfelelő mennyiségű PCR-terméket előállítanunk. Számos alkalommal változtattunk a reakcióhoz szükséges alkotók mennyiségén, koncentrációján, végül a vizsgálataink alapjául szolgáló cikktől (CURRAN ET AL., 2004) minimális mértékben eltérve változtattunk a hőprofilon és a reakcióelegyen is.

A kívánt eredményt (lásd. 9. számú ábra) **2µl DMSO** hozzáadásával, illetve a **3.2.3. alfejezetben bemutatott hőprofil alkalmazásával** értük el.



9. számú ábra: A DMSO hozzáadásának eredménye (saját kép)

Ezen problémák leküzdését követően **16 törzsre sikerült szekvencia típusszámot meghatároznunk** (6. számú táblázat) és **elhelyezni azt a filogenetikai törzsfán** (10. számú ábra), illetve további 5 törzs esetében (P22, P50, P65, P83, P109) megállapítani 23 allélikus profilt, mely szerint **a módszer adaptációja sikeresnek mondható.**

A 16 környezeti eredetű izolátum esetében sikerült meghatározni mind a 7 háztartási génszakasz bázissorrendjét, illetve a www.pubmlst.org/paeruginosa honlapon elérhető adatbázis segítségével a hozzájuk rendelhető allélikus profilt. **A kapott allélszámokat a nemzetközi**

adatbázissal összevetve az alábbi szekvencia típusszámokat kaptuk eredményül (lásd 6. táblázat).

6. számú táblázat: A MLST vizsgálat eredményei

Izolátum törzsgyűjteményi jele	Háztartási gének							ST- szám
	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE	
	Allélszámok							
P9	103	8	5	5	1	6	4	377
P14	11	5	26	5	3	40	7	293
P22	16	-	11	74	2	7	10	F
P28	17	2	11	70	3	7	19	251
P30	11	5	11	11	3	27	7	198
P32	16	5	6	2	3	4	60	Új ST***
P39	39	28	45	3	1	3	7	Új ST***
P42	28	88	1	21	3	53	7	521
P43	4	4	16	12	1	6	3	253
P46	11	'17'***	11	18	3	4	3	ÚJ ST***
P50	11	-	11	18	-	4	-	F
P53	11	5	83	2	4	13	7	575
P62	11	5	11	11	3	27	7	198
P65	6	-	-	11	-	-	20	F
P69	6	68	20	11	4	4	7	439
P71	38	8	5	67	2	40	13	971
P77	6	14	12	11	1	4	20	455
P83	6	3	-	3	-	14	1	F
P109	11	5	11	11	-	-	7	F*
ATCC-27853	28	5	36	3	3	13	7	155
KPS-3	4	4	16	12	1	6	3	253

* F- Meghatározása folyamatban van.

**1 bázis különbség van az allélikus profilban, de az adatbázis alapján a 17-es allélszámhoz áll a legközelebb

*** A www.pubmlst.org adatbázis alapján eddig ismeretlen, új szekvencia típus

Az 6. számú táblázatban bemutatott MLST –eredmények alapján elmondható, hogy **egy** általunk vizsgálatba vont, Magyarországon izolált klinikai törzs (KPS-3) esetében és egy a KKBT munkatársai által azonosított és vizsgálatba vont környezeti törzs (P43) esetében is azonos (253-as) szekvencia típusszámot határoztuk meg. A P30 és P62-es jelzésű törzsek

esetében szintén ugyanazt a ST- számot határoztuk meg, ez esetben ez a szám a 198-as ST szám volt. A 10. számú ábrán bemutatott filogenetikai törzsfá az ST-számok alapján felállított rokoni szorosságát jól szemlélteti. **Vizsgálataink során a P32, P39 és P46 jelzésű izolátum esetében a nemzetközi adatbázisban még nem szereplő új szekvencia-típuszámot sikerült meghatároznunk.** A többi izolátum ST- számát összevetettük a nemzetközi adatbázisra már korábban más kutatócsoportok által feltöltött adatokkal. Az általunk izolált környezeti eredetű törzsek szekvencia típuszámait a nemzetközi szakirodalommal összehasonlítva számos egyezést találtunk igazoltan patogén, nozokomiális izolátummal. Ezen összevetés eredményeit a 7. számú táblázatban foglaltam össze. Az összehasonlítás alapján elmondható, hogy KIDD ET AL. (2007), WAINE ET AL. (2006), CURRAN ET AL., (1999), MANSFELD ET AL. (2007), által, cisztás fibrózisban szenvedő páciens köpetmintájából, vagy szövetmintájából kitenyésztett klinikai izolátumok esetében végzett multilokus szekvencia tipizálási eredményekkel található hasonlóság.

7. számú táblázat: A KKBT munkatársai által izolált *P. aeruginosa* faj szekvencia típuszámainak összevetése a nemzetközi szakirodalmi adatokkal

A KKBT munkatársai által izolált és vizsgált törzsek			ST-szám	Szakirodalmi hivatkozás az adott ST- számra			
Törzsgyűjteményi jel	Származási hely	Minta jellege		Izolálta	Dátum***	Származási hely	Minta jellege
P9	Diósd	felszín alatti víz	377	Kidd et al.	2007	Ausztrália	CF*
P14	Tököl	felszín alatti víz	293	Zecevic et al.	2007	Ausztria	CF*
P28	Polgár	földtani közeg	251	Waine et al.	2006	Anglia	CF*
P30	Szabadszállás	felszín alatti víz	198	Curran et al.	1999	Kanada	CF*
P42	Mezőtúr	földtani közeg	521	Mansfeld et al.	2007	Svédország	CF*
P43	Ópusztaszer	felszín alatti víz	253	Kidd et al.	2007	Ausztrália	CF*
P53	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	575	Mansfeld et al.	2007	Svédország	CF*
P62	Szarvas	felszín alatti víz	198	Curran et al.	1999	Kanada	CF*
P69	Nagyszénás	felszín alatti víz	439	Boulianne et al.	2002	Franciaország	klinikai izolátum
P71	Debrecen	felszín alatti víz	971	Lee et al.	2010	n .d.	n. d.**

P77	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	455	Arduino et al.	2007	Ausztrália	klinikai izolátum
ATCC- 27853	ATCC	klinikai	155	Kidd et al.	2007	Ausztrália	CF*
KPS-3	OKI	klinikai	253	Kidd et al.	2007	Ausztrália	CF*

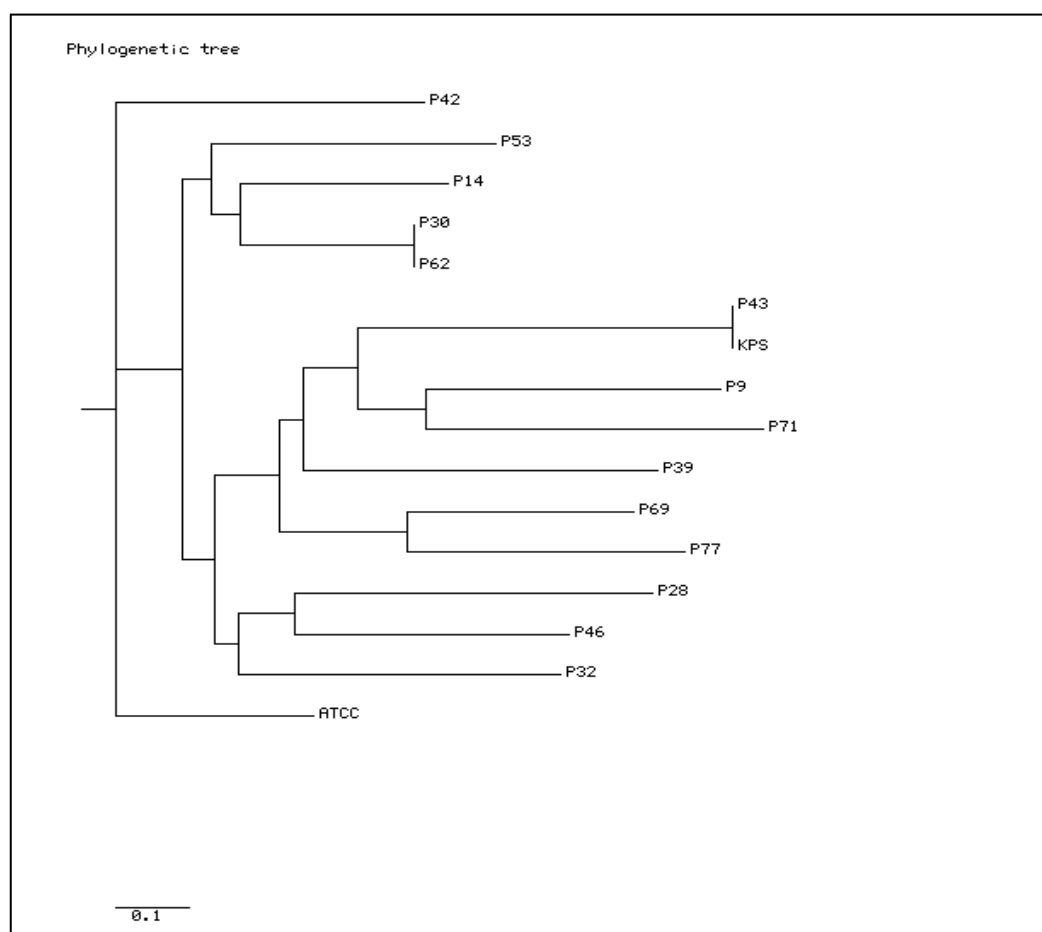
* CF - Cisztás fibrózisban (genetikailag örökíthető tüdőbetegség) szenvedő páciens köpetéből

** n. d. – nincs adat

*** Az adatbázisban szereplő dátum

A www.pubmlst.org/paeruginosa honlapon található adatbázisban ezen ST- számokra már számos találatot kapunk. Az izolátumok jellege különböző, de túlnyomó részben klinikai eredetű izolátumok esetében található egyezés, az általunk azonosított ST- számokkal.

Az MLST vizsgálatok eredményei tehát alátámasztják azt a feltételezésünket, hogy a klinikai és szénhidrogénnel szennyezett környezeti közegből származó izolátumok csoportjai nem különíthetők el egyértelműen egymástól. A vizsgálatba vont törzseket a szekvencia típuszámaik alapján sikerült elhelyezni a filogenetikai törzsfán, melyet a 10. számú ábrán szemléltetnek.



10. számú ábra: A vizsgáltba vont izolátumok elhelyezkedése a filogenetikai törzsfán (www.pubmlst.org)

4.2. A gravimetriás vizsgálatok eredményei

Az MLST vizsgálatokat kiegészítő szénhidrogén-bontási képesség meghatározására vonatkozó eredményeket - melyeket az MLST vizsgálatoknál ismertetett 22 törzs (20 környezeti, illetve 2 klinikai izolátum) esetében hajtottuk végre - a 8. számú táblázatban foglalom össze.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a klinikai és a környezeti eredetű izolátumok szénhidrogén-bontó képessége – származási helytől függetlenül – széles skálán mozog. A vizsgálatainkba vont környezeti törzsek között gyenge (P9: 6,22%) és kiváló (P83: 88,16%) biodegradációs képességet produkáló törzs egyaránt előfordult. A vizsgálataink alapján a két klinikai törzs (ATCC 27853 és KPS-3) jó (70% körüli) biodegradációs képességet mutatott.

8. számú táblázat: A szénhidrogén-bontó képesség számításának eredményei a *P. aeruginosa* faj vizsgált izolátumai esetében

Eredet	Gömblobbik tömege	Törzs jele	Gömblobbik tömege + olaj	Visszamaradt olaj tömege	Kontroll - visszamaradt olaj tömege	Szénhidrogén-bontási-képesség a kontrollhoz viszonyítva
Klinikai	120,40	ATCC 27853	120,83	0,43	1,06	71,10%
Klinikai	120,39	KPS-3	120,78	0,38	1,00	72,18%
Környezeti	120,87	P69	121,43	0,55	0,94	62,84%
Környezeti	119,65	P71	120,41	0,75	0,74	49,61%
Környezeti	120,00	P9	121,41	1,41	0,09	6,22%
Környezeti	119,69	P62	121,02	1,32	0,17	11,81%
Környezeti	120,00	P14	120,45	0,45	0,95	68,00%
Környezeti	119,06	P28	120,10	1,04	0,36	25,71%
Környezeti	98,93	P43	99,11	0,18	1,25	87,42%
Környezeti	120,86	P39	121,22	0,84	0,84	50,00%
Környezeti	120,38	P46	121,18	0,80	0,88	52,39%
Környezeti	119,64	P53	120,25	0,61	1,07	63,69%
Környezeti	116,36	P30	117,17	0,81	0,86	51,78%
Környezeti	120,90	P22	122,03	1,12	0,16	12,59%
Környezeti	118,94	P32	119,79	0,84	0,44	34,55%
Környezeti	119,68	P42	-	-	-	-
Környezeti	119,73	P50	120,13	0,40	0,88	68,96%
Környezeti	120,43	P65	120,80	0,36	0,92	71,70%
Környezeti	116,41	P77	116,94	0,53	0,76	58,66%
Környezeti	118,91	P83	119,07	0,15	1,13	88,16%
Környezeti	120,04	P85	121,03	0,99	0,30	23,06%
Környezeti	120,90	P109	121,15	0,24	1,04	81,47%
Kontroll	-	-	-	1,39-1,68 (egyedi vizsgálatokban eltérő módon)	-	-

Ezen eredmények összhangban állnak (ALONSO ET AL., 1999; KUMAR ET AL., 2008; DAS ET AL., 2007) vizsgálati eredményeivel, melyek a *P. aeruginosa* törzsek jó szénhidrogén bontó képességéről számolnak be, kiemelve a jó poliaromás szénhidrogén-degradáló kapacitásukat. DAS ET AL. (2007), illetve KUMAR ET AL. (2008) a *P. aeruginosa* izolátumok jó felületaktív és degradációs képességét a lipopeptidek és glikoproteinek komplex keverékének tulajdonították. Az emulzióképzést a kiváló bontási képességgel rendelkező törzsek esetében vizuális úton saját kísérleteink során is észleltük (lásd 11. sz. ábra).



11. számú ábra: A vizuálisan észlelhető emulzióképzés a KPS-3 törzs esetében a kontrollhoz viszonyítva (saját kép)

A szakirodalomban fellelhető publikációk közül ALONSO ET AL. (1999) klinikai és környezeti eredetű törzsek tulajdonságait vizsgálták és hasonlították össze. 7 környezeti eredetű (ebből 6, szénhidrogénnel szennyezett közegből izolált) törzs eredményeit vetették össze 17 cisztás fibrózisban szenvedő betegből, illetve véráram-fertőzésből származó izolátummal. Az összehasonlításból kiderült, hogy a klinikai környezetből izolált törzsek is képesek lehetnek kizárólagos szén- és energiaforrásként használni a tesztek során használt szénhidrogéneket, pl. a hexadekánt. A jelenséget szintén a jó emulziós képességekkel és a megfelelő enzimek kiválasztásával igazolták. Tehát **eredményeink, miszerint a klinikai és környezeti izolátumok egyaránt képesek lehetnek kiváló szénhidrogén-degradációra**, összhangban állnak az ALONSO és kutatócsoportja által tett megállapításokkal.

4.3. Szerológiai vizsgálatok eredményei

A vizsgálatainkba vont 65 környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzs között eredményeink alapján nagy arányban fordult elő O6-os szerocsoportba sorolható izolátum; a reprezentatív adathalmazból 21,5 % rendelkezett ezzel a szerotípussal. Ez összhangban áll a RAVAOARINORO ET AL. (1996) megállapításaival, aki szerint szennyezett felszíni vízből származó törzsek esetében (azaz kórházon kívüli környezetben) ez a leggyakoribb szerocsoport. Az O6 szerocsoport képviselőit más szerzők ugyanakkor megtalálták klinikai környezetben is. ORSI ET AL. (1994) 73 környezeti és klinikai izolátum vizsgálata alapján megállapította, hogy a klinikai (betegekből izolált) törzsek között az O6, O12, O2 és O5 túlsúlya jellemző.

A környezeti törzsek szerocsoport-azonosítással kapcsolatos részletes adatait az 5. számú táblázatában közlöm. A szerológiai vizsgálatok áttekintő eredményeit, illetve azok összevetését egy

reprezentatív, klinikai gyakoriságot bemutató szakirodalmi forrással (POH ET AL., 1986) a 9. táblázat tartalmazza.

9. számú táblázat: Klinikai szerocsoport-gyakoriság (POH ET AL., 1986) összevetve az OEK által végzett vizsgálatok eredményeivel

Szerocsoport	Izolátumok száma	Klinikai gyakoriság (%) (POH ET AL., 1986)	Izolátumok száma	Környezeti gyakoriság (%) (OEK)
O1	1	0,9 %	7	10,7 %
O2	2	1,8 %	0	0,0 %
O3	9	8,0 %	16	24,6 %
O4	12	10,7 %	7	10,7 %
O5	9	8,0 %	1	1,5 %
O6	8	7,1 %	14	21,5 %
O7	2	1,8 %	2	3,0 %
O8	2	1,8 %	5	7,6 %
O9	1	0,9 %	0	0,0 %
O10	6	5,4 %	2	3,0 %
O11	42	37,5 %	0	0,0 %
O12	5	4,5 %	0	0,0 %
O13	0	0,0 %	0	0,0 %
O14	0	0,0 %	0	0,0 %
O15	0	0,0 %	0	0,0 %
O16	1	0,9 %	0	0,0 %
O17	0	0,0 %	0	0,0 %
ONT*	10	8,9 %	10	15,3 %
Polyagglutinabilis**	2	1,8 %	1	1,5 %

* a vizsgált izolátum egyik vizsgált szérummal sem mutatott pozitív reakciót

** a vizsgált izolátum több vizsgált szérummal is pozitív reakciót mutatott

Az O3-as szerocsoport a reprezentatív adathalmazban található törzsek közül 24,6 % ebbe a csoportba tartozik (lásd 9. számú táblázat). A szakirodalomban az O3-at a nozokomiális fertőzéseknél jellemzően előforduló szerocsoportként tartják számon (LEGAKIS ET AL., 1982; OJENIYI AND HOJBY, 1991). Ezt támasztja alá a RAVAOARINORO ET AL. (1996) által végzett szerocsoport-azonosítás is.

A klinikai környezetben detektálható szerocsoportok közül (RAVAOARINORO ET AL., 1996; POH ET AL., 1986) az O1-es és O4-es szerocsoport 10,7 %-ban, míg az O10 kevesebb, mint 3,0 %-ban volt felfedezhető a vizsgálatba vont környezeti törzsek között. A környezeti mintákból izolált törzsek esetében emellett találtunk egy O5-ös szerocsoportba sorolható törzset, O2, O9, illetve O11-O17 szerotípus viszont nem volt kimutatható.

Eredményeink alapján nem jelennek meg a környezeti izolátumok között olyan szerocsoportok, mint az O11 és O12, melyeknek klinikai környezetben nagy jelentőséget tulajdonítanak. Az O11 jelentőségét és összefüggéseit a klinikai eredetű fertőzésekkel kapcsolatban több publikáció is alátámasztotta az elmúlt évek során (YOKOTA AND NOGUCHI, 1994; HOSTACKÁ AND MAJTÁN, 1997, ENGLENDER ET AL., 1990). Utóbbi (O12) szerotípust pedig MILLESIMO ET AL. (1995) összefüggésbe hozták a cisztás fibrózis megbetegedés során tapasztalható *P. aeruginosa* fertőzésekkel.

Összefoglalóan megállapítható, hogy a környezeti eredetű *P. aeruginosa* izolátumok között klinikai viszonylatban gyakran kimutatható szerocsoportok (pl. O6, O3, O1) is megtalálhatóak, azonban a dominancia-viszonyokban eltérés tapasztalható. Míg klinikai környezetben az O11, illetve O12 tekinthető több forrás alapján is a leggyakoribbnak, addig környezeti törzsek között ilyen szerocsoportot nem sikerült azonosítanunk.

4.4. Vizsgálati eredményeink összevetése antibiotikum rezisztenciára és virulenciára vonatkozó vizsgálati adatokkal

Munkánk utolsó fázisában vizsgálati eredményeinket a SZIE-KKBT-n elért és publikált, antibiotikum rezisztenciára és virulenciára vonatkozó adatokkal vontuk párhuzamba. Az összevetést a 12. számú összefoglaló táblázatban szemléltetem.

Sajnos az MLST vizsgálatok kivitelezése során nem sikerült elérnünk olyan méretű adathalmazt, mely egyéb tulajdonságokkal összefüggésben értelmezhető lenne; e hiány pótlása a jövő feladata. Az áttekintés során így a szerocsoport - szénhidrogén-bontás - antibiotikum rezisztencia - virulencia gének közötti esetleges kapcsolatokat tekintettük át.

Szerocsoport-szénhidrogén-bontó képesség:

A 12. táblázat alapján a legjobb szénhidrogén-bontási képességgel rendelkező környezeti törzsek nem köthetők egyértelműen szerocsoportokhoz, ám kiemelendő, hogy az O6 szerocsoport minden képviselője 50 %, illetve a feletti szénhidrogén-biodegradációt produkált.

Szerocsoport-antibiotikum rezisztencia:

A szerológiai vizsgálatok eredményei szakirodalmi adatok alapján összefüggésben állhatnak az antibiotikum-rezisztenciával. RAVAOARINORO ET AL. (1996) nagy ciprofloxacin-rezisztenciát tulajdonít az O6-os szerocsoportnak. Saját vizsgálataink alapján ezt ugyan nem sikerült igazolnunk, de az O6 szerocsoportba tartozó környezeti törzsek esetében Imipenem-rezisztenciára és a Cefotaxime hatástalanná válására utaló eredmények (rezisztens és átmeneti státusz) születtek. A további szerocsoportok esetében a kis elemszám miatt összefüggéseket nem tárhattunk fel.

Az antibiotikum - rezisztencia képesség esetében a 10. számú táblázatban bemutatott kategóriák alapján határozzuk meg azt, hogy az adott izolátum a vizsgált antibiotikumra érzékeny – átmeneti érzékenységgű vagy rezisztenciát mutat a hatóanyaggal szemben. Ha egy adott törzs legalább kettő vagy több antibiotikum-hatóanyagcsoportba tartozó készítménnyel szemben is rezisztenciát mutat, akkor azt az izolátumot, multirezisztensnek tekintjük (DRAGHI ET AL., 2006). Az antibiotikum-rezisztenciára vonatkozó eredményeket az 11. táblázatban szemléltetem.

10. számú táblázat: *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum – rezisztencia eredményeinek értékelésére szolgáló kategóriák (CLSI, 2007)

Antibiotikum csoportok	S (érzékeny)	I (átmeneti)	R (rezisztens)
Aminoglikozidok			
Gentamicin	<4	8	>16
Béta-laktámok (széles spektrumú Penicillinek)			
Piperacillin	<64	-	>128
Carbapenemek			
Imipenem	<4	8	>16
Cefalosporinok III-IV			
Cefoperazone	<16	32	>64
Cefotaxime	<8	16-32	>64
Ceftazidime	<8	16	>32
Ceftriaxone	<8	16-32	>64
Cefepime	<8	16	>32
Fluorokinolonok			
Ciprofloxacin	<1	2	>4
Ofloxacin	<2	4	>8

11. számú táblázat: A vizsgált *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum – rezisztencia eredményei (SZABÓ, 2009)

Antibiotikum hatóanyag	Jelölés	A vizsgált koncentráció grádiens (µg/ml)	A vizsgált törzsek jelölése és eredményei																						
			P9	P14	P22	P28	P30	P32 #	P39 #	P42	P43 #	P46 #	P50	P53 #	P62	P65	P69 #	P71	P77	P83 #	P85	P109	ATCC 27853	KQS3	
Cefoperazone / sulbactam (2/1)	CPS	0.016 -256	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	
Cefotaxime (high range)	CT/CTX	0.016 -256	S	R	I	I	I	R	I	I	R	R	I	R	I	I	R	I	I	R	S	I	I	S	
Ceftazidime	TZ/CAZ	0.016 -256	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	
Ceftriaxone (high range)	TX/CRO	0,016 -256	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I	S	R	I	S	I	S	R	R	I	
Cefepime	PM/FEP	0,016 -256	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Piperacillin	PP/PIP	0.016 -256	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	
Imipenem	IP/IMI	0.002 -32	R	S	S	R	R		R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	I	S	
Ciprofloxacin	CI/CIP	0,002 -32	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Ofloxacin	OF/OFX	0,002 -32	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	
Gentamicin (low range)	GM/CN	0.016 -256	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	

A multirezisztencia ismert definíciói (DRAGHI ET AL. 2006) alapján multirezisztens törzsek

Szerocsoport-virulencia:

A virulencia determinánsok közül az exotoxinokat kódoló génszakaszok gyakorisága nem vonható párhuzamba egyéb tulajdonságokkal. Összefüggést a hemolitikus aktivitással kapcsolatban figyelhettünk meg. Minden O6-os szerocsoportú törzs esetében hemolitikus aktivitás volt megfigyelhető, míg az O3 szerocsoportnál hemolitikus aktivitás nem, vagy csak kétségesen jelentkezett.

Szénhidrogén-bontó képesség-antibiotikum rezisztencia:

Az általunk vizsgált adathalmaz alapján következtetéseket e két tulajdonság összefüggésében nem alakíthattunk ki.

Szénhidrogén-bontó képesség-virulencia:

A hemolitikus aktivitás és a szénhidrogénbontó képesség összefüggését igazolja, hogy a legjobb szénhidrogén-bontó izolátumok mind hemolizáltak, míg a két gyenge bontási képességgel rendelkező törzs (P9: 6,22%, P62: 11,81%) esetében hemolitikus aktivitás nem volt tapasztalható.

Több szempont egyidejű értelmezésével megállapítható, hogy az egyik legjobb biodegradációs képességgel rendelkező törzs (P43) mutatta a legszélesebb körű antibiotikum rezisztenciát is a törzsek között, valamint több virulencia determinánssal is egyidejűleg rendelkezett. Ennek megállapításával átgondolandó az a gyakran tényként kezelt feltételezés, miszerint a rezisztencia kialakulásának „ára van”, azaz a rezisztens törzsek néha kevésbé életképesek, néha kevésbé virulensek (ARRUDA ET AL., 1999).

Vizsgálati eredményeink összefoglaló értékelésekor azonban figyelembe kell vennünk, hogy a kísérletek jelen stádiumában csupán kis elemszámú adathalmazzal rendelkezünk. A tulajdonságok közötti kapcsolatrendszer így az eredmények bővítését követően változhat, és reményeink szerint a jövőben lehetővé teszi az adatok átfogó statisztikai értékelését is.

12. számú táblázat: A *Pseudomonas aeruginosa* esetében végrehajtott vizsgálati eredmények összefoglalása

Minta jele	Mintavétel ideje	Mintavétel helye	Mintavételi közeg (szénhidrogénnel szennyezett közeg)	Minták maximális TPH (C ₅₋₄₀) koncentrációja (mg/kg, µg/L) ⁷	Szekvencia típusszám	Szénhidrogén-bontó képesség	Rezisztencia (összes/rezisztens) (SZABÓ,2009)	Hemolitikus aktivitás **	Szerocsoport (OEK)	Nemzetközi adatbázissal összevetve, ST – szám alapján, kapcsolat klinikai izolátummal *
P9	2003	Diósd	felszín alatti víz	630	377	6,22 %	10/1	-	ONT	+ (Kidd et al. 2007)
P14	2003	Tököl	felszín alatti víz	16800	293	68 %	10/3	+/-	O3	+ (Zecevic et al., 2007)
P22	2003	Túrkeve	földtani közeg	11300	F****	12,58 %	10/0	+	ONT	n. d.
P28	2003	Polgár	földtani közeg	7300	251	25,7 %	10/2	+	O1	+ (Waiane et al., 2006)
P30	2004	Szabadszállás	felszín alatti víz	78500	198	51 %	10/2	-	O3	+ (Curran et al., 1999)
P32 #	2004	Komádi	felszín alatti víz	362	ÚJ ST***	34,55 %	10/3	++	n. d.	n. d.
P39 #	2004	Algyó	felszín alatti víz	569	ÚJ ST***	64%	10/2	+++	O6	n. d.
P42	2005	Mezőtúr	földtani közeg	705	521	n. d.	10/0	+	O6	+ (Manseld et al., 2007)
P43 #	2005	Ópusztaszer	felszín alatti víz	8500	253	87.4 %	10/6	+++	ONT	+ (Kidd et al., 2007)
P46 #	2005	Budapest	felszín alatti víz	27500	ÚJ ST***	52 %	10/4	+	O6	n. d.
P50	2005	Bátonyterenye	felszín alatti víz	n. d.	F****	68,95 %	10/1	+++	O6	n. d.
P53 #	2006	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	63500	575	39 %	10/3	+	O6	+ (Mansfeld et al., 2007)
P62	2006	Szarvas	felszín alatti víz	>100000	198	11,81 %	10/0	-	O3	+ (Curran et al., 1999)
P65	2005	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	31400	F****	71.7 %	10/0	+	O8	n. d.
P69 #	2007	Nagyszénás	felszín alatti víz	3630	439	62,84 %	10/4	++	O6	+ (Boulianne et al., 2002)
P71	2007	Debrecen	felszín alatti víz	4880	971	49, 61 %	10/1	+	O1	+ (Lee et al., 2010)
P77	2007	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	31400	455	58,66 %	10/0	+	O8	+ (Arduino et al. 2007)
P83 #	2008	Tiszaújváros	finomítói szennyvíz	304	F	88, 16 %	10/1	-	O4	n. d.
P85	2008	Zalaegerszeg	finomítói szennyvíz	132	F	23,06 %	10/0	+++	O4	n. d.
P109	2008	Siklós	komposzt	n. d.	F****	81,47 %	10/1	++	O3	n. d.
ATCC 27853	1971	ATCC	klinikai	n. d.	155	71,10 %	10/2	+	n. d.	+ (Kidd et al. 2007)
KPS-3	2004	OKI	klinikai	n. d.	253	72,18 %	10/0	+	n. d.	+ (Kidd et al. 2007)

* Az ST- szám azonosításának dátuma feltüntetve a kutatók mellett **- nincs hemolízis; + gyenge hemolízis; ++ hemolízis; +++ intenzív hemolízis ***A www.pubmlst.org adatbázis alapján eddig ismeretlen, új szekvencia típus ****F – a vizsgálat folyamatban van
n. d. – nincs adat # multirezisztens törzs

⁷ A maximális TPH koncentrációra vonatkozó méréseket a Dr. E. Weßling Kémiai Laboratórium Kft. –végezte az MSZ EN ISO 9377 – 2:2001 és a DIN 38409 H18:1981 számú szabványok alapján.

Következtetések, javaslatok

Az MLST vizsgálatok kapcsán elmondható, hogy a módszer adaptációja sikeres volt. A vizsgálatba vont 22 *P. aeruginosa* izolátumok közül 16 esetében sikerült szekvencia típusszámot és további 5 törzs esetében 23 allélikus profilt meghatároznunk. A nemzetközi adatbázissal történő összevetést követően elmondható, hogy az általunk vizsgált környezeti eredetű törzsek esetében kimutatott szekvencia típusszámokat korábban nemzetközi kutatócsoportok több esetben klinikai eredetű – főleg cisztás fibrózisban szenvedő páciensektől vett - izolátumok esetében határoztak meg. Ez alapján feltételezhető, hogy a klinikai és a környezeti törzsek filogenetikai szempontból egyértelműen nem különíthetők el egymástól. A további kapcsolatok felderítése érdekében azonban javaslom a hiányzó és további törzsekre vonatkozó MLST vizsgálatok elvégzését, hogy szemléltetőbb képet kaphassunk a törzsek filogenetikai kapcsolatrendszeréről.

A szénhidrogén-bontás megállapítására irányuló vizsgálataink alapján elmondható, hogy a jó szénhidrogén-bontó képességet nem lehetett egyértelműen a környezeti törzseknek tulajdonítani, mivel a vizsgált klinikai izolátumok is kiváló degradációs képességet mutattak.

A szénhidrogén-bontást a szakirodalom a megfelelő enzimek kiválasztásával és a jó emulziós-képességgel magyarázza, melyet vizuálisan mi is megfigyelhettünk a vizsgálataink során. Napjainkban is születnek olyan tudományos munkák, melyek e felületaktív anyagok új típusait írják le (NIE ET AL., 2010), így az általunk vizsgált izolátumok esetében is célszerű lehet a jövőben hasonló tesztek elvégzése. Javasolt továbbá a szénhidrogén-bontó képesség alátámasztása olyan kvantitatív vizsgálatokkal, mint a gázkromatográfia.

A szerocsoport-vizsgálatok alapján elmondható, hogy több környezeti törzs esetében is találtunk olyan szerotípust (O1, O3, O6), mely a nemzetközi irodalomban a klinikai vonatkozásban fontos törzseknél fordul elő. Több esetben ezek a szerocsoportok (O6 és O3 szerotípus esetében) kapcsolatba hozhatóak az antibiotikum-rezisztenciával és a szénhidrogén-bontó képességgel.

Végkövetkeztetésként elmondható, hogy a *P. aeruginosa* faj klinikai és környezeti izolátumai nem különíthetők el egyértelműen egymástól, így a nemzetközi kármentesítési gyakorlatban célszerű a környezeti törzsek alkalmazását is kiváltani valamely veszélytelen biológiai ágenssel. Az MLST vizsgálatok kiterjesztése és a GC-MS vizsgálatok elvégzése után pedig a jövőben pontosabb képet nyerhetünk a környezetvédelmi gyakorlatban fontos szénhidrogén-bontási potenciálról és a lehetséges humán-egészségügyi kockázatokról.

Összefoglalás

A kármentesítések során a szénhidrogénnel szennyezett területeken dolgozó szakemberek sok esetben a bioremediációs tevékenységeket választják a szennyeződések felszámolására. E tevékenységek során mikroszervezetek segítségével történik a kármentesítés. Ezek a technológiák viszont nagy szaktudást igényelnek, hiszen a megfelelő biológiai ágens kiválasztása nagyban befolyásolhatja a szennyeződés felszámolásának eredményességét, ill. környezetbiztonsági szempontból is jelentős.

A kármentesítés alatt álló területeken a veszélytelen mikroszervezetek mellett megjelenhetnek patogén (betegséget okozó) mikroorganizmusok, melyek humán-egészségügyi problémákhoz vezethetnek. Ilyen mikroorganizmus a vizsgálataim tárgyául választott *Pseudomonas aeruginosa* is, melynek klinikai eredetű izolátumai számos betegség kialakulásában játszhatnak kóroki szerepet. Ugyanakkor a környezetben előforduló törzseinek napjainkban nem tulajdonítanak jelentősebb humán-egészségügyi kockázatot, így külföldön számos helyen megtalálhatjuk a biológiai kármentesítéseknél használt oltóanyag tagjaként.

Kutatásaim céljául tűztem ki, hogy megvizsgáljam azt a feltételezést, miszerint a klinikai és környezeti eredetű izolátumokat jogosan különíti-e el a szakirodalom. Ehhez a molekuláris filogenetika egyik új módszerét a multilokus szekvencia tipizálást (MLST) választottam. Ennek megvalósításához 22 (köztük 20, szénhidrogénnel szennyezett területről származó és 2 klinikai környezetből izolált) törzset választottam. Munkámat kiegészítettem továbbá a gyakorlati szempontból is jelentős szénhidrogén-bontó képesség megállapítását célzó vizsgálatokkal, az OEK által végrehajtott szerocsoport azonosítás és az antibiotikum rezisztenciára vonatkozó eredmények értékelésével.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a szénhidrogénnel szennyezett területekről származó törzsek között található számos olyan izolátum, mely az MLST vizsgálatok alapján klinikai eredetű törzssel azonos szekvencia típussal jellemezhető. Az általunk vizsgálatba vont egyik klinikai izolátum (KPS-3) is azonos ST - számmal (ST-253) rendelkezik, mint a P43-as jelzésű környezeti eredetű törzs. A szerocsoport azonosítás alapján a környezeti izolátumok között detektálhatóak voltak egyes klinikai viszonylatban is jelentős szerotípusok (így az O6, O3 és O1), ugyanakkor a nosokomiális fertőzésekben jelentős O11 és O12 szerocsoport nem volt a környezeti törzsek között azonosítható. A szénhidrogén-bontás tekintetében pedig megállapítottuk, hogy a klinikai és környezeti törzsek egyaránt rendelkezhetnek kiváló biodegradációs képességgel.

Az adatok komplex elemzéséhez a jelenlegi vizsgálati elemszám bővítése a jövőben mindenképp szükséges, azonban már jelen ismereteink alapján is megállapítható, hogy **a környezeti és klinikai eredetű törzsek jellemző tulajdonságaik alapján nem különülnek el egyértelműen egymástól. Környezetbiztonsági kockázatuk így hasonló mértékű lehet.**

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni, konzulenseimnek, Dr. Szoboszlai Sándor egyetemi docensnek és Dr. Kaszab Edit egyetemi tanársegédnek a TDK dolgozat elkészítéséhez nyújtott támogatásukért, a vizsgálatokhoz nyújtott segítségükért, és a rengeteg hasznos tanácsukért.

Továbbá szeretném kifejezni hálámat Veres Péter Gábornak a gravimetriás mérésekben nyújtott segítségéért.

Köszönetemet fejezem ki a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék, valamint a SZIE- Regionális Egyetemi Tudásközpont munkatársainak a vizsgálataim elvégzéséhez nyújtott segítségükért.

Külön köszönettel tartozom az Országos Epidemiológiai Központ - Fágtypizálási és Molekuláris Epidemiológiai osztály munkatársainak a munkájukért és a szerocsoport azonosításhoz nyújtott adataik felhasználásáért.

Kutatómunkánkat a TÁMOP-4.2.1B-11/2/KMR-2011-0003. pályázat támogatásával végeztük el.

Irodalomjegyzék

- ALONSO, A., ROJO F., MARTÍNEZ J. L.** (1999): Enviromental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Enviromental Microbiology*, 1(5): 421-430.
- ATZÉL B.** (2008). Bioaugmentációs eljárások monitoringja. Doktori (Ph.D.) értekezés, Gödöllő
- BERTÓK L.** (1998): Bakteriális endotoxinok és hatásaik. *Orvosi Hetilap*, 139(33): 1947-1953.
- CHAYABUTRA, C., JU, L.K.** (2000): Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2): 493-498.
- CLAUS, F.** (1992): Sichere Biotechnologie. Eingruppierung biologischer Agenzien: Bakterien. Heidelberg, Jederman-Verlag, 177p.
- CLSI** (2007): Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antibiocrobial Susceptibility Testing. *Seventeenth Informational Supplement*. M100-S17, 27(1) 1-182 p.
- CURRAN, B., JONAS, D., GRUNDMANN, H., PITT, T., DOWSON C.G.**(2004): Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12): 5644-5649.
- DAS, K., MUKHERJEE, A. K.** (2007): Crude petroleum- oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98: 1339-1345.
- DENAMUR, E., PICARD, B., DECOUX, G., DENIS, J.B. AND ELION, J.** (1993): The absence ocorrelation between allozyme and rrn RFLP analysis indicates a high gene flow rate within human clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 110: 275–280.
- DEZSŐ P., NAGY J.** (2005): A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatási alkalmazásai. *Magyar Kémiai Folyóirat – Összefoglaló közlemények*, 111(4): 153-158.
- DRAGHI, D.C., JONES, M.E., SAHM, D.F. & TILLOTSON, G.S.** (2006): Geographically-based evaluation of multidrug resistance trends among *Streptococcus pneumoniae* in the USA: findings of the FAST surveillance initiative (2003–2004). *International Journal of Antimicrobial Agents* 28(6): 525–531.
- ENGLENDER M, HAVELL M, GUTTMAN R, SEGAL S.** (1990): Typing of *Pseudomonas aeruginosa* ear infections related to outcome of treatment. *Journal of Laryngology & Otology*, 104: 678-681.
- FERGUSON, M. W., Maxwell, J. A., Vincent, T. S., Da Silva, J., Olson, J. C.**(2001): Comparison of the exoS gene and protein expression in soil and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 69: 2198-2210.
- FILETÓTH Zs.** (1995): A *Pseudomonas aeruginosa* okozta infekciók jelentősége az intenzív osztályokon. *Infektológia és klinikai mikrobiológia*, 2 (4): 146-149.
- GRUNDMANN, H., SCHNEIDER, C., HARTUNG, D., DASCHNER, F. D. AND PITT, T. L.** (1995): Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 528–534.
- HOSTACKÁ, A., MAJTÁN, V.** (1997): Serotyping and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Acta Microbiologica Hungarica*, 44: 141-146.
- JARVIS, W.R. AND MARTONE, W.J.** (1992): Predominant pathogens in hospital infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29 (suppl A): 19-24.
- JAY, J.M., LOESSNER, M.J., GOLDEN, D.A.** (2005): Modern food microbiology. Food science text series. Springer Science+Business Media Inc., USA, 790 p.

- JOHNSON, J.K., ARDUINO, S.M., STINE, O.C., JOHNSON, J.A., HARRIS, A.D.** (2007): Multilocus sequence typing compared to Pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11): 3707-3712.
- KASZAB E., PÉK N., FARKAS M., KRISZT B., SZOBOSZLAY S.** (2010a): Környezeti eredetű *Pseudomonas aeruginosa* törzsek virulenciájának vizsgálata. *Tájökológiai Lapok*, 8(1): 135-146.
- KASZAB, E., SZOBOSZLAY, S., DOBOLYI, CS., HÁHN, J., PÉK, N. & KRISZT, B.** (2010b): Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. *Bioresource Technology*, accepted for publication ([doi:10.1016/j.biortech.2010.08.027](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.027))
- KASZAB, E. KRISZT, B., ATZÉL, B., SZABÓ, G., SZABÓ, I., HARKAI, P., SZOBOSZLAY, S.** (2010c): The occurrence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* on hydrocarbon contaminated sites. *Microbial Ecology*, 59(1): 37-45.
- KIDD T.J., GRIMWOOD, K., RAMSAY, K. A., RAINEY, P. B., BELL, S. C.** (2011): Comparison of Three Molecular Techniques for Typing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1(49): 263-268 p.
- KIEWITZ, C., TUMMLER, B.** (2000): Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *Journal of Bacteriology*, 182: 3125-3135.
- KONKOLY THEGE M.** (2003): Hiperrezisztens *Pseudomonas aeruginosa*: a postantibiotikum éra előhírnöke. *Infektológia és klinikai mikrobiológia*, 10(3): 89-93.
- KOVÁCS T.** (2005): Magyar-Angol Környezetvédelmi értelmező szótár. Akadémiai Kiadó, Budapest 438p.
- KUMAR, M., LEÓN, W., DE SISTO MATERANO, A., ILZINS, O.A., LUIS, L.** (2008): Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp.. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1047-1057.
- LÁNG I. (szerk.)** (2002): Környezet- és Természetvédelmi Lexikon. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1256p.
- LEGAKIS, NJ., ALIFEROPOULOU, M., PAPAVALASSILIOU, J., PAPAPETROPOULOU M.** (1982): Serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical specimens in relation to antibiotic susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*, 16: 458-463.
- LIBISCH, B., BALOGH, B., FÜZI, M.** (2009): Identification of two multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clonal lineages with a Countrywide distribution in Hungary. *Current Microbiology*, 58: 111-116.
- MANSFELD R VAN., JONGERDEN, I., BOOTSMA, M., BUITING, A., BONTEN, M., WILLEMS, R.** (2010): The Population Genetics of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Different Patient Populations Exhibits High-Level Host Specificity. *PlosOne*, 5(10) e13482.
- MILLESIMO M, INTINIS GD, CHIRILLO MG, MUSSO T, SAVOIA D.** (1996): *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: serotype, resistance, phenotype, and plasmid profile. *European Journal of Epidemiology*, 12: 123-129.
- NÉMEDI L.** (1998): Kis valószínűségű és nagy hatókörű mikrobiológiai események előfordulása környezeti közegekben. In: ANDRIK et al. (1998) *Környezetbakteriológia 2* (bővített kiadás) Budapest, KGI, 12–39. p.
- NÉMETH T. (szerk.)** (2001): Kármentesítési Kézikönyv 4. Kármentesítési technológiák. Környezetvédelmi Minisztérium, Budapest, 170p.
- NIE, M., YIN, X., REN, C., WANG, Y., XU, F., SHEN, Q.** (2010): Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. *Biotechnology Advances*, 28: 635-643.
- OJENIYI, G.N., HOJBY N.** (1991): Comparison of different typing methods of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Jlomnia, J.Y., Tanimoto, F.T., Holder, J.A., Hojby, N., Doring, G. (eds): *P. aeruginosa* in Human Diseases. *Antibiotics & Chemotherapy*, Basel, Karger, 44: 13-22.

- ORSI, G.B., MANSI, A., TOMAO, P., CHIARINI, F., VISCA, P.** (1994): Lack of association between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital wards. *Journal of Hospital Infection*, 27: 49-60.
- PICARD, B., DENAMUR, E., BARAKAT, A., ELION, J. AND GOULLET, P.** (1994): Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA gene region. *Journal of Medical Microbiology*, 40: 313-322.
- PIRNAY, J.P., BILOCQ, F., POT, B., CORNELIS, P., ZIZI, M., VAN ELDERE, J., DESCHAGHT, P., VANEECHOUTTE, M., JENNES, S., PITT, T., DE VOS, D.** (2009): *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One*, 4(11): e7740.doi:10.1371/journal.pone.0007740.
- PÉK N.** (2010): Környezeti eredetű *Pseudomonas aeruginosa* törzsek virulenciájának vizsgálata. Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia, Tudományos Diákköri Konferencia dolgozat, Gödöllő.
- POH, C.L., YAP, E.H., TAY, L., BERGAN, T.** (1988) Plasmid profiles compared with serotyping and pyocin typing for epidemiological surveillance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 25: 109-114.
- RAVAOARINORO, M., MOHAPTRA, S., SHORE, J., RAWAL, S., OMRI, A., YAGHI, J., ORIOL, F.** (1996): Serotyping clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to infection site antibiotic susceptibility and beta-lactamase production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 7: 65-68.
- RÚZS-MOLNÁR S.** (1994): Mezőgazdasági területeket ért szénhidrogén-szennyezések környezetkímélő megszüntetése. TDK dolgozat, Gödöllő.
- SCHMIDT, K. D., TUMMLER, B. AND ROMLING, U.** (1996): Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *Journal of Bacteriology*, 178: 85-93.
- SPENCER, D. H., KAS, A., SMITH, E. E., RAYMOND, C. K., SIMS, E. H., HASTINGS, M., BURNS, J. L., KAUL, R. AND OLSON M.V.** (2003): Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185: 1316-1325.
- STOVER, C.K., PHAM, X. Q., ERWIN, A.L., MIZOGUCHI, S.D., WARRENER, P., HICKEY, M.J., BRINKMAN, F.S., HUFNAGLE, W.O., KOWALIK, D.J., LAGROU, M., GARBER, R.L., GOLTRY, L., TOLENTINO, E., WESTBROCK-WADMAN, S., YUAN, Y., BRODY, L.L., COULTER, S.N., FOLGER, K. R., KAS, A., LARBIG, K., LIM, R., SMITH, K., SPENCER, D., WONG, G.K., WU, Z., PAULSEN, I.T., REIZER, J., SAIER, M.H., HANCOCK, R.E., LORY, S. AND OLSON, M.V.** (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.
- SZABÓ, G.** (2009): Környezeti eredetű *Pseudomonas aeruginosa* izolátumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata fenotípusos és genetikai módszerekkel. Diplomadolgozat, Gödöllő.
- SZOBOSZLAY S., ATZÉL B., CSERHÁTI M., SZABÓ I.** (2004): Szénhidrogénnel szennyezett talajok bioremediációja. *Biokémia*, 28: 37-40.
- SZOBOSZLAY S., KRISZT B.** (2006): Környezeti elemek védelme II. Egyetemi Jegyzet, Gödöllő, 74p.
- SZOBOSZLAY S., KRISZT B.** (2010): Környezeti elemek védelme. Egyetemi Jegyzet, Gödöllő, 130p.
- WEAVER, R.F., HEDRICH, P. W.** (2000). Genetika. Panem Kiadó. 632.p.
- WAINE, D. J., HONEYBOURNE, D. SMITH, E. G., WHITEHOUSE, J.L., DOWSON, C.G.** (2009): Cross – Sectional and Longitudinal Multilocus Sequence Typing of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Sputum Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 11 (47):3444-3448.p.
- YOKOTA S.I., NOGUCHI H.** (1994) Epitopes for human monoclonal antibodies and serotyping antisera against the O-specific polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* O11. *Carbohydrate Research*, 261: 57-66.

Hivatkozott jogszabályok:

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

91/2007. (IV.26.) Kormányrendelet a természetben okozott károsodás mértékének megállapításáról, valamint a kármentesítés szabályairól

Internetes hivatkozások:

HTTP1: <http://www.uniprot.org/taxonomy/287>

HTTP2: http://www.genomenetwork.org/gnn_images/news_content/10_03/defensins/pseudomonas_aeruginosa.jpg

HTTP3: <http://pubmlst.org/paeruginosa/info/primers.shtml>

HTTP4: <http://hu.wikipedia.org/wiki/Citromsavciklus>

HTTP5: <http://www.pseudomonas.com:1555/PSEUDO/new-image?type=GENE&object=PA0025>

HTTP6: <http://www.pseudomonas.com:1555/PSEUDO/new-image?type=GENE&object=PA3769>

HTTP7: <http://www.ttk.pte.hu/biologia/genetika/atg/chap19/ch19c.htm>

HTTP8: <http://www.pseudomonas.com:1555/PSEUDO/new-image?type=GENE&object=PA2639>

HTTP9: <http://www.pseudomonas.com:1555/PSEUDO/new-image?type=GENE&object=PA1770>

HTTP10: <http://hu.wikipedia.org/wiki/PCR>

HTTP11: <http://www.qiagen.com>

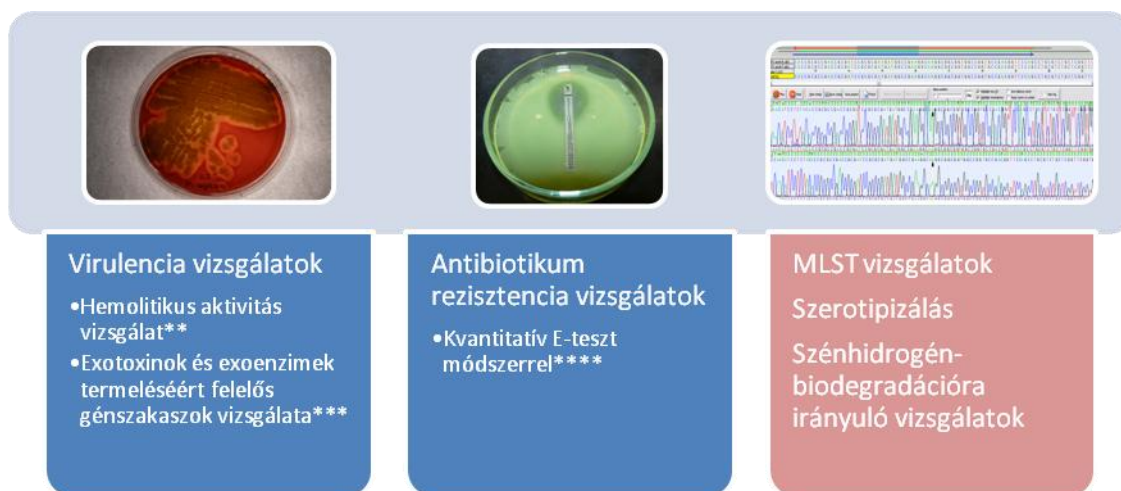
Mellékletek

1. számú ábra: A *Pseudomonas aeruginosa* faj laboratóriumi vizsgálatának főbb irányai, lépései, módszerei

1. fázis: Izolátum kollekció létrehozása

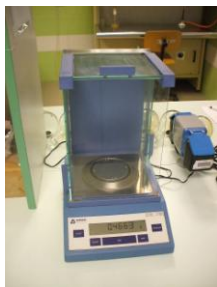


2. fázis: Vizsgálati irányok



*ATZÉL ET AL., 2008; **KASZAB ET AL., 2010A; ***KASZAB ET AL., 2010B; ****KASZAB ET AL., 2010C

2. számú ábra: A gravimetriás meghatározás menete (saját képek):



1. ábra: A gömblombikok tömegének meghatározása



2. ábra: Az illékony oldószerek használata miatt kötelező az elszívófülke használata



3. ábra: A minták mellé negatív kontrollt alkalmazunk viszonyítási alapként



4. ábra: 3x50 ml petroléterrel, majd 1x 50 ml kloroformmal történő rázatás következik



5. ábra: Az oldószeres fázisokat Dören 619 G ¼ szűrőnáníron átszűrjük



6. ábra: Az oldószeres fázisokat szétválasztjuk



7. ábra: A visszamaradt oldószert vízfürdőn desztilláljuk



9. ábra: A lepárlási maradékot századgramm pontossággal visszamérjük



8. ábra: A mérés előtt a mintákat 40°C-on súlyállandóságig szárítottuk

NYILATKOZAT

Alulírott, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar szak nappali tagozat I. évfolyamos hallgatója nyilatkozom, hogy a Tudományos Diák Köri dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem.

Gödöllő, 2012.hó.....nap

.....
hallgató aláírása

A Tudományos Diák Köri dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a dolgozatot áttekintettem és azt Tudományos Diák Köri Konferencián történő részvételre javaslom.

Gödöllő, 2012.hó.....nap

.....
konzulens aláírása