

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

**SZÉNHIDROGÉNNEL SZENNYEZETT TERÜLETEK KÖRNYEZETHIGIÉNÉS
VIZSGÁLATA**

Készítette: Radó Júlia
Környezetgazdálkodási agrármérnök MSc I. évfolyam

Témavezetők: Dr. Szoboszlai Sándor, egyetemi docens
Dr. Kaszab Edit, egyetemi tanársegéd

Gödöllő
2012.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1. Környezetvédelem általánosságban	4
2.2. A környezetvédelem jogszabályi háttere Magyarországon	4
2.3. Szénhidrogén szennyezések - a kőolaj és származékai	5
2.3.1. Összes alifás szénhidrogén (TPH- Total Petroleum Hydrocarbon).....	5
2.3.2. Aromás szénhidrogének	6
2.3.2.1. BTEX vegyületek – Benzol és alkilbenzokok	6
2.3.2.2. PAH vegyületek – Policiklusos aromás szénhidrogének	7
2.4. Kármentesítési eljárások	7
2.4.1. A kármentesítési módszerek csoportosítása	7
2.4.2. Fizikai-kémiai eljárások	8
2.4.3. Termikus (hőkezeléses) eljárások	8
2.4.4. Izolációs (szigeteléses) eljárások.....	8
2.4.5. Biodegradációs eljárások.....	8
2.5. Jellegetes patogén mikrobák a szénhidrogénnel szennyezett területeken.....	11
2.5.1. <i>Acinetobacter</i> nemzetség.....	12
2.5.1.1. Az <i>Acinetobacter</i> nemzetség általános bemutatása	12
2.5.1.2. Az <i>Acinetobacter</i> fajok humánegészségügyi jelentősége	13
2.6. Antibiotikumok szerepe a humán gyógyászatban	14
2.7. Antibiotikum rezisztencia a klinikai viszonyok között	15
2.7.1. Multirezisztencia	16
2.8. Antibiotikum rezisztencia a környezetben	17
3. MÓDSZEREK	19
3.1. Mintavételezés	19
3.2. <i>Acinetobacter</i> fajok növekedésének vizsgálata általános és szelektív táptalajokon.....	19
3.3. <i>Acinetobacter</i> nemzetség tagjainak izolálására szolgáló módszeregyüttes fejlesztése	20
3.3.1. <i>Acinetobacter</i> dúsító tápoldat.....	20
3.3.2. Leeds <i>Acinetobacter</i> Medium (LAM)	21
3.4. Környezeti eredetű <i>Acinetobacter</i> fajok identifikálása	21
3.4.1. Oxidáz-, Kataláz-teszt, Gram-próba.....	22
3.4.2. Faj szintű identifikáció 16S rDNS teljes szekvencia analízissel	22
3.4.2.1. DNS izolálás.....	23
3.4.2.2. Polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction – PCR)	23
3.4.2.3. Agaróz gélelektroforézis.....	24
3.4.2.4. PCR termék tisztítása	24
3.4.2.5. Szekvenáló PCR reakció	24
3.4.2.6. A jelölt DNS visszanyerése – etanol-precipitáció	25
3.4.2.7. Kapilláris gélelektroforézis.....	25
3.5. Antibiotikum rezisztencia vizsgálat	26
3.6. Gravimetria	27
3.7. Szénhidrogén bontásért felelős génszakaszok molekuláris genetikai vizsgálata	28
4. EREDMÉNYEK.....	29
4.1. Az <i>Acinetobacter</i> fajok növekedésének vizsgálata általános és szelektív táptalajokon	29
4.2. <i>Acinetobacter</i> fajok izolálásának és identifikálásának eredményei	30
4.2.1. <i>Acinetobacter</i> izolálás elődúsítást követően, szelektív LAM táptalajjal	30
4.2.2. <i>Acinetobacter</i> törzs jelöltek identifikációjára vonatkozó eredmények	32
4.3. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei.....	33
4.3.1. Az Aminoglikozid antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei.....	34
4.3.2. A Béta-laktám antibiotikumok vizsgálatának eredményei	34
4.3.3. A Fluorokinolon antibiotikumok vizsgálatának eredményei.....	36
4.3.4. A Glicilciklin antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei	36
4.3.5. A Rifamycin antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei.....	36
4.3.6. Multirezisztenciára utaló eredmények.....	37
4.4. A szénhidrogén bontás megállapítását célzó gravimetriás mérés vizsgálatainak eredményei	37
4.5. A szénhidrogén bontás megállapítását célzó molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei	39
5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	40
6. ÖSSZEFOGLALÁS	43
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	44
8. IRODALOMJEGYZÉK	45
MELLÉKLET.....	48

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Napjainkban egyes a környezetben is általánosan elterjedt fakultatív patogén kórokozók mind nagyobb környezetegészségügyi problémát jelentenek, mivel nem csak klinikai körülmények között fertőzhetnek, hanem számos esetben kórházi környezeten kívül is képesek betegség kialakítására. Humán egészségügyi vonatkozásban jelentőségüket fokozza az antibiotikum rezisztencia kialakulása és terjedése, mely egyes mikrobanemzetségek esetében többszörös rezisztenciához, multirezisztenciához vezethet. Számos opportunist kórokozó ugyanakkor – ismert patogén tulajdonságai mellett – kiváló bioremediációs képességgel is rendelkezik, így szénhidrogénnel szennyezett területeken, számukra kedvező körülmények között felszaporodhat és az átlagos környezeti detektálhatóságukhoz képest nagyobb jelentőséggel bírhat.

Az utóbbi időben a hasonló tulajdonságokkal (patogenitás, többszörös rezisztencia, biodegradációs jelentőség) jellemezhető csoportok közül egyre nagyobb figyelmet fordítanak a szakemberek az *Acinetobacter* nemzetség törzseire. A nozokomiális megbetegedésekért felelős fakultatív patogén baktériumok körében képviselői a leggyakrabban kimutatható mikroszervezetek közé tartoznak, az antibiotikumokkal szemben mutatott ellenállásuk fejlődése és terjedése pedig komoly kihívások elé állítja az orvostudományt.

A nemzetség környezeti eredetű képviselőivel kapcsolatban azonban kevesebb információ áll a rendelkezésünkre a szakirodalomban, így munkánk során e környezetegészségügyi és környezetbiztonsági szempontból jelentős témakör kutatását tűztük ki célul.

Célkitűzések:

- Szénhidrogénnel szennyezett területekről származó *Acinetobacter* törzsgyűjtemény létrehozása és bővítése a szakirodalom alapján rendelkezésre álló izolálási módszerek adaptálásával és optimalizálásával, valamint az izolátumok identifikálása molekuláris genetikai módszerrel (16S rDNS szekvencia analízis).
- Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok végrehajtása (kvantitatív E-teszt módszerrel) a klinikai terápiában alkalmazott készítményekkel szemben.
- Szénhidrogén-bontási képesség megállapítása gravimetriás méréssel, valamint molekuláris genetikai vizsgálatokkal.

Céljaink megvalósítása érdekében a tanszéken rendelkezésre álló környezeti törzsgyűjtemény *Acinetobacter* izolátumait, illetve a saját munkánk keretében azonosított mikroszervezeteket egyaránt felhasználtuk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Környezetvédelem általánosságban

A környezetvédelem, mint az egész világra kiterjedő társadalmi mozgalom az 1960-as években kezdett kialakulni. Rachel Carson *Néma tavasz* című könyve, mely a növényvédőszeres káros hatásaira hívta fel a figyelmet, világszerte ismertté vált, és kellő alapot adott a környezetvédelmi mozgalom elindulásához. Egyre többen ismerték fel a meglévő és fenyegető problémákat, amelyek globális veszélyt jelentenek az emberiség számára.

A környezetvédelmi tevékenységek során elsősorban azokra a kérdésekre kell választ találnunk, hogy mit, mitől és hogyan kell megvédenünk. Mivel a környezetvédelem elsődleges célja a megfelelő életkörülmények biztosítása az ember számára, valamint az anyagi és szellemi javak védelme, így az első kérdésre könnyen választ kaphatunk. Az ember és annak természetes, valamint művi környezete igényli az elsődleges védelmet, az emberi faj védelme pedig egyúttal az egész környezet védelmét is jelenti (MOSER – PÁLMAI, 1992).

Napjainkban különböző forrásokból származó ártalmakkal kell szembe néznünk, mint például hulladékok keletkezése, káros sugárzások, erózió, vizek elszennyeződése, élőlények kipusztulása, vagy túlzott elszaporodása stb., beleértve a korábban kis, vagy elhanyagolható jelentőséggel bíró fertőző ágensek megjelenését, térnyerését környezetünkben.

Magyarországon először a *környezet védelmének általános szabályairól szóló 1995. évi LIII. Törvény*ben foglalkoztak átfogóan a környezetvédelmet érintő kérdésekkel, melyben meghatározták a legalapvetőbb fogalmakat és definíciókat (környezeti elem, környezet, környezetvédelem).

A környezeti problémák kialakulásának alapvető oka az emberiség létszámának drasztikus mértékű növekedése, melynek következtében egyre több nyersanyagot von ki a természetből, egyre nagyobb mértékű anyag- és energiaátalakítást visz véghez. Ennek következménye a folyamatos és egyre növekvő szennyezőanyag kibocsátás. A kibocsátott környezetszennyező anyagok közvetlenül veszélyeztetik, károsítják az ember egészségét, az élővilágot, az élettelen természeti környezetet (pl. felszín alatti vizek) és akár az épített környezetet is.

2.2. A környezetvédelem jogszabályi háttere Magyarországon

A hazai környezetvédelmi jogi szabályozás alapja a már említett *1995. évi LIII. Törvény, a környezet védelmének általános szabályairól*, illetve rendeletek sora szabályozza az egyes környezeti elemek védelmére irányuló intézkedéseket.

Jelenleg Magyarországon a földtani közeg és a felszín alatti vizek védelmével kapcsolatban a 219/2004. (VII.21.) Kormányrendelet előírásai irányadóak. A rendelet 1. számú mellékletében

tartalmazza a földtani közeg és felszín alatti víz szempontjából fontos, Magyarországi viszonylatban jelentőséggel bíró szennyezőket. A környezeti szempontból kockázatos anyagokat toxicitás, lebomlás és az emberi szervezetben való felhalmozódás szempontjából K1 (nagy kockázatot jelentő anyagok, I. jegyzék) és K2 (kis kockázatot jelentő anyagok, II. jegyzék) minősítésű csoportokba sorolja. A rendelet továbbá a kármentesítés során alkalmazandó határértékeket is definiálja, így szerepelteti az *(A) háttér-koncentráció*, az *(Ab) bizonyított háttér-koncentráció*, a *(B) szennyezettségi határérték*, a *(D) kármentesítési célállapot határérték*, valamint az *(E) egyedi szennyezettségi határérték* fogalmát, amelyek közül azonban a környezetvédelmi gyakorlatban már csak a *B (szennyezettségi)*, és a *D (kármentesítési célállapot) határértékek* élnek.

A kormányrendelet kiegészítéseként a 10/2000. (VI.2.) KöM-EüM-FVM-KHVM együttes rendeletet felváltotta a 6/2009. (IV.14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet „a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről”, mely tartalmazza a jelenleg hatályos *(B) szennyezettségi határértékeket*, valamint a legfontosabb környezetszennyező vegyi anyagokat és csoportosításukat, valamint a 3. számú mellékletben 2010. december 22-i hatállyal további szennyezőanyag csoportok (így például a ftalátok, illetve a nonil- és oktil-fenolok) esetében állapít meg szennyezettségi határértéket.

A felszíni vizek védelmével kapcsolatban a legfontosabb hazai rendelkezéseket a következő hatályos jogszabályok tartalmazzák (HTTP1):

- 1995. évi LIII. tv. a környezet védelméről
- 1995. évi LVII. tv. a vízgazdálkodásról
- 220/2004. (VII.21.) Korm. rendelet a felszíni vizek minősége védelmének szabályairól
- 221/2004. (VII. 21.) Korm. rendelet a vízgyűjtő-gazdálkodás egyes szabályairól
- 208/2004. (XII. 25.) KvVM rendelet a vízszennyező anyagok kibocsátására vonatkozó határértékekről és alkalmazásuk egyes szabályairól

A levegővédelemmel kapcsolatban hatályos jogszabály a 306/2010. (XII. 23.) Korm. rendelet a levegő védelméről.

Az ismertetett jogszabályi háttér alapján a veszélyeztetett környezeti elem típusától függően tehát eltérő határértérendszer és a szennyezőanyagok más-más csoportjai bírhatnak jelentőséggel. A továbbiakban ezek közül a munkám szempontjából és a vizsgált környezeti elem (felszín alatti víz) alapján legnagyobb jelentőséggel bíró szerves (szénhidrogén típusú) vegyületek környezetvédelmi jelentőségét ismertetem részletesen.

2.3. Szénhidrogén szennyezések - a kőolaj és származékai

2.3.1. Összes alifás szénhidrogén (TPH- Total Petroleum Hydrocarbon)

A csoport tagjai közé tartoznak az 5-40-ig terjedő szénatom számmal rendelkező alifás (nyílt szénláncú) szénhidrogének, azonban a külföldi gyakorlatban tágabban értelmezik ezt a kategóriát:

minden olyan kőolaj eredetű szénhidrogén vegyületet ide sorolnak, amely a C₅₋₄₀ szénatom szám tartományban kimutatható.

A TPH vegyületek elsősorban a kőolajban és a kőolaj-származékokban találhatóak meg, így napjainkban szinte bárhol, bármikor a környezetbe kerülhetnek.

Kémiaiilag két fő csoportra oszthatóak. A telített (szénatomok között egyszeres kötéssel rendelkező) és telítetlen (kettes, hármas kötéseket is tartalmazó) csoport tagjai egyaránt lehetnek egyenes, elágazó, és gyűrűs szénláncúak.

A TPH vegyületeken belül illékonyság alapján elkülöníthetjük az illékony alifás szénhidrogén vegyületeket (VALPH - Volatile Aliphatic Petroleum Hydrocarbon), amelyek 5-10(12) szénatom számúak, és elsősorban gázolinban, benzinben, kerozinban fordulnak elő, valamint a 10(12)-40 szénatom számú, kevésbé illékony, vagy nem illékony alifás szénhidrogén vegyületeket (EPH - Extractable Petroleum Hydrocarbon), melyek a gázolajok, fűtőolajok, kenőolajok, hidraulikai olajok fő összetevői (NÉMETH, 2003).

A TPH vegyületek viszonylag könnyen biodegradálhatóak, a lebonthatóság esélye azonban a szénatomszám növekedésével romlik. A csoport tagjai potenciális felszíni- és felszín alatti vízszennyezők, a talajvízbe kerülve, azzal messzire eljuthatnak, ivó- és öntözővíz bázisokat és a természetes vizek élővilágát veszélyeztetve. Bizonyos vegyületek toxikus, mutagén, teratogén, illetve karcinogén hatásúak lehetnek (SZOBOSZLAY – KRISZT, 2010).

2.3.2. Aromás szénhidrogének

2.3.2.1. BTEX vegyületek – Benzol és alkilbenzolok

A monoaromás szénhidrogének (BTEX) közé tartozik a benzol (C₆H₆) és alkilezett származékai, a toluol, az etil-benzol és az orto-, meta- és para-xilol. A legfontosabb névadó vegyületek mellett kibővítették a csoportot úgynevezett teszt üzemanyagokkal: trimetil-benzol, etil-metil-benzol, izopropil-benzol, tetrametil-benzol, dietil-benzol, stb. Az ásványolaj eredetű termékekben, különösen az üzemanyagokban, különbözően szubsztituált benzolvegyületek is megtalálhatóak, mint például a sztirol, vagy lineáris alkilbenzolok (LAB) (KvVM, 2010).

Felhasználásuk rendkívül széles körben történhet, oldószerként, ólommentes benzinek adalékanyagaiként, szerves vegyületek szintézisének, gyógyszer előállításban, festékgyártásban hasznosítják e vegyületeket.

A benzol kiemelkedik a csoportból környezeti veszélyességével; emberben bizonyítottan karcinogén hatású, elsődlegesen a vérképző szervekben okozhat rákot (leukémia). Emellett káros lehet az immunrendszerre, csökkenti a szervezet védekezőképességét (SZOBOSZLAY – KRISZT, 2010, HTTP2).

2.3.2.2. PAH vegyületek – Policiklusos aromás szénhidrogének

A policiklusos aromás szénhidrogének megtalálhatóak többek között a kőszénkátrányban, kőolajban, karbolsavban, tetőkátrányban, de néhány vegyületet felhasználnak a gyógyszer-, műanyag-, gyomirtószer-, és festékgyártásnál is (HTTP3). A vegyületcsoport nagyszámú, (kettő, vagy több kondenzált aromás gyűrűt tartalmazó) vegyületet foglal magában, melyek a naftalinok kivételével nem illékonyak. Az anyagcsoport tagja 3 naftalin vegyület (2 gyűrűs), és 16-féle 3-7 gyűrűs vegyület. Eddig 7 PAH vegyületről bizonyították, hogy emberben rákkeltő hatású. Ezek a benz(a)antracén, krizén, benz(b)fluorantén, benz(k)fluroantén, benz(a)pirén, indenol(1,2,3-c,d)pirén, dibenz(a,h)antracén (HTTP4).

Ubikviter környezetszennyezőként megtalálhatóak a levegőben, a talajban, az üledékben, általában kis mennyiségben, leszámítva a forrásaik környékét. A földtani közeg PAH szennyezése gyakran a kőszén feldolgozó üzemekből származik, ahonnan általában összetett szennyezések kerülnek ki. A PAH vegyületek szilárdak, oldhatósági jellemzőik igen eltérőek, de általában nem oldódnak vízben. A felszíni vízbe jutásuk történhet ülepedéssel, bemosódással is. A környezetben a PAH vegyületek nagy része a talaj szerves anyag tartalmához kötődik, vagy elillannak, fotolízisen mennek keresztül, oxidálódnak, lebomlanak. Többségük súlyosan károsítja a vízi ökoszisztémákat (KVVM, 2010; SZOBOSZLAY – KRISZT, 2010; HTTP3; HTTP5).

2.4. Kármentesítési eljárások

A talajban és a felszín alatti vizekben bekövetkező szennyeződéseket a legtöbb esetben csak évekkel-évtizedekkel később ismerjük fel. Azonban a szennyezett környezeti elemek állapotának megismerése, a megtisztításukra irányuló tevékenység az elmúlt két évtizedben rohamos fejlődésnek indult. A feltárt szennyeződések gyarapodó száma, az egyre pontosabb tényfeltérési módszerek, a szennyezést okozó kockázatos anyagok viselkedésének, hatásmechanizmusának kutatási eredményei és nem utolsósorban a gyakorlati tapasztalatok, a talaj és a felszín alatti vizek tisztítási eljárásainak bővülését eredményezte (NÉMETH, 2001).

2.4.1. A kármentesítési módszerek csoportosítása

A földtani közeg és a felszín alatti víz kármentesítésére alkalmas módszerek lehetnek fizikai-kémiai, termikus, izolációs, illetve biológiai eljárásokon alapulók. A megvalósulás helye szerint alapvetően két csoportba sorolhatjuk őket. Az *in situ* (= eredeti helyzetben) megoldásoknál olyan eljárásokkal tisztítják meg a szennyezett közeget, melynek során nem termelik ki a földtani közeget, vagy a felszín alatti vizet. Az *ex situ* (=nem eredeti helyzetben) eljárásoknál további két alcsoportba lehet osztani az alkalmazott technológiákat. Az *ex situ - on site* tisztítás során a

kitermelt szennyezett talajt és/vagy felszín alatti vizet nem szállítják el a munkaterületről, hanem azon belül, pl. bioágyakon, termikusan, vagy talajmosással tisztítják, majd a kívánt mértékben megtisztított földtani közeget visszahelyezik a munkagödörbe, a felszín alatti vizet pedig visszanyeletik, vagy szikkasztják a munkaterületen belül. Az *ex situ* - *off site* beavatkozások során az alapvető különbség, 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 általában élővízbe, vagy közcsatornába vezetik (NÉMETH, 2001).

2.4.2. Fizikai-kémiai eljárások

Különböző fizikai és kémiai eljárásokon alapuló *in situ* és *ex situ* módszerekkel történhet a földtani közeg és a felszín alatti víz kármentesítése, melyek közé tartozik például a talajmosás, a talajlevegő elszívás, a kúton belüli sztrippelés, az extrakció, a kémiai oxidáció/redukció, a megszilárdítás, az adszorpció és az ioncsere (SZOBOSZLAY – KRISZT, 2008A, BARÓTFI, 2000, HTTP6)

2.4.3. Termikus (hőkezeléses) eljárások

A termikus eljárások során a hőmérséklet emelésével távolítják el a szennyező anyagok a közegből. Ezek közé az eljárások közé tartozik az égetés, a pirolízis/hőbontás és a termikus deszorpció (SZOBOSZLAY – KRISZT, 2008A).

2.4.4. Izolációs (szigeteléses) eljárások

A technológia a szennyeződést nem szünteti meg, csak a terjedését akadályozza, a szennyezett, illetve a nem szennyezett közegek fizikai elválasztásával. Ilyen kármentesítési eljárás a résfalazás, a szádfalazás, a hidraulikus szigetelés (gát) és a felső szigetelés (lezárás) (SZOBOSZLAY – KRISZT, 2008A).

2.4.5. Biodegradációs eljárások

A mikroorganizmusokban - mint minden élő sejtben - állandóan zajlanak kémiai átalakulások, szintetizálódnak a sejt biomolekulái, lebomlanak a tápanyagok és a már szükségtelenné vált molekulák (BOROSS - SAJGÓ, 1993). Ez az anyagcsere enzimekkel katalizált reakciók összessége. Az enzimek fehérjék, melyek aktív centrummal rendelkeznek, meghatározott szubsztrát kapcsolódását segítve, így katalizálják a kémiai reakciókat (SZEBERÉNYI, 2004). A mikroorganizmusok egy része olyan természetes katalizátorokat, enzimeket termel, melyek a szerves vegyületeket (így például a környezetszennyezésben kiemelt jelentőséggel bíró szénhidrogén vegyületeket) széndioxid (CO₂), metán (CH₄), víz és szervesetlen sók képződése mellett

bontják le. A teljes lebontás a mineralizáció, vagy ásványosítás. Ez a folyamat azonban nem mindig megy végbe teljesen, ilyenkor köztes anyagcseretermékek keletkeznek és részleges lebontásról, vagy átalakításról (transzformáció) beszélünk. A biodegradációs eljárások a folyamat eredményessége alapján tehát két fő csoportba sorolhatóak:

A **teljes biodegradáció**, vagy mineralizáció esetében a kiindulási szerves vegyületek enzimek által katalizált reakciók során szén-dioxidra és vízre oxidálódnak.

A **részleges biodegradáció**nak további, három típusát különböztethetjük meg:

- a lebontást végző enzimek valamelyikének hiányában a folyamat megreked valamely köztterméknél; a keletkezett energiát a mikroszervezet hasznosítja;
- a kiindulási vegyület részlegesen oxidálódik, azonban a mikroszervezet nem hasznosítja a képződött energiát (kometabolizmus);
- a kiindulási anyagoknál összetettebb és/vagy stabilabb vegyület keletkezik polimerizáció, vagy más szintézis során.

A **biodegradáció** általános definíciója ennek megfelelően: a mikroorganizmusok által végzett biológiai-biokémiai történések sorozatán keresztül megvalósuló, lebontási (katabolikus), illetve átalakítási (transzformációs) folyamatok összessége (SZOBOSZLAY-KRISZT, 2008A). A **biodegradálhatóság** fogalmán a szerves vegyületek biológiai bonthatóságát értjük, amely a környezetbe kerülésük és a biótával való kölcsönhatásuk eredményeképpen nyilvánul meg. A vegyi anyagok biodegradálhatóságuk alapján lehetnek könnyen, vagy nehezen biodegradálható és perzisztens, azaz nem biodegradálható vegyületek (HTTP7).

A biodegradációs folyamatok képezik a **bioremediáció** alapját, amely fogalom alatt a szennyezett talaj, talajvíz, felszíni víz, vagy felszíni vízi üledék környezeti kockázatának csökkentését értjük biológiai módszerekkel. A bioremediáció olyan technológia, amely élő sejtek vagy szervezetek, esetleg azok valamely termékének (pl. enzim) biodegradációs, bioakkumulációs, vagy biológiai stabilizálóképességét állítja a technológia középpontjába; ezeknek a biológiai folyamatoknak biztosít optimális körülményeket az alkalmazott technológiai paraméterekkel, adalékanyagokkal (HTTP7).

Az emberi beavatkozás intenzitása szerint a biodegradációs kármentesítési technológiák két csoportra oszthatóak. **Ellenőrzött spontán biodegradációról** beszélünk akkor, amikor a földtani közegben és felszín alatti vízben a természetes biodegradáció, illetve más szennyeződés csökkenési folyamatok eredményét csak követik, ellenőrzik. Ilyen monitoring tevékenység a talajban, talajvízben élő mikroszervezetek által végzett természetes szennyezőanyag lebontás, átalakítás kémiai analitikai, biológiai (mikrobiológiai) nyomon követése (SZOBOSZLAY, 2003).

Ha célzott emberi beavatkozással felgyorsítjuk a szénhidrogén lebontás feltételeit, **irányított/stimulált biodegradációról** beszélhetünk.

A mikroszervezetek felhasználási módja szerint a biológiai módszereket a következő három csoportba sorolhatjuk (SZOBOSZLAY ET AL., 2002):

1. **Támogatott spontán biodegradáció:** A szennyezett közegben előforduló, bennszülött mikroszervezetek a szennyezéshez adaptálódva, azt lassan és általában rossz hatásfokkal bontják, ám tápanyag-kiegészítéssel és intenzív levegőztetéssel számuk és aktivitásuk növelhető. A módszer viszonylag olcsó, azonban nincs garancia, hogy olyan komplex szennyezések, mint a kőolaj esetében az összes vegyületcsoport bontása végbe megy, így megnőhet egyes nehezen degradálható, vagy toxikus komponensek koncentrációja. A módszer további hátránya, hogy egyes szénhidrogénbontásra képes, ugyanakkor patogén mikroszervezetek felszaporodhatnak, így potenciális környezetbiztonsági veszélyt jelenthetnek (KASZAB, 2010).

2. **„Ösztönös” talajoltás:** A módszer során a mentesítendő közegből izolált, feltehetően szénhidrogénbontó tulajdonsággal rendelkező mikroszervezeteket bioreaktorban felszaporítják, majd nagy mennyiségben visszajuttatják a talajba, tápanyag-kiegészítés és intenzív levegőztetés mellett. A gyors és nagymértékű olajlebomlással szemben, a módszer kiszámíthatatlan közegészségügyi kockázatokat is rejt, mivel a talajoltás a közreműködő mikroszervezetek faji hovatartozása, és egyéb tulajdonságaik meghatározása nélkül történik. Az így végrehajtott kármentesítés rendkívül veszélyes lehet, hiszen a talajvízáramlással a mikrobák nagy távolságokat tehetnek meg, így humán egészségügyi szempontból veszélyt jelentő biológiai ágensek szennyezhetik a talajvizet (KASZAB, 2010, SZABÓ, 2011, HTTP8).

3. **Tudatos talajoltás/bioaugmentáció:** Faji szinten azonosított, ismert bontási spektrummal rendelkező, patogénektől mentes, ismert szennyezőanyag tűrő képességgel jellemezhető, hazai, vagy nemzetközi törzsgyűjteményben letétbe helyezett mikroorganizmusok felszaporítása bioreaktorban, majd az így előállított inokulum (oltóanyag) szennyezett közegbe juttatása tápanyag-kiegészítés és levegőztetés mellett. A módszer hátránya a magasabb fejlesztési és oltóanyag-előállítási költség (KASZAB, 2010; SZOBOSZLAY – KRISZT, 2006).

A mikrobiológiai (elsősorban bakteriális) alapon végezhető biodegradációs eljárások előnyei, hogy *in situ* kivitelezés esetén a felszín minimális bolygatásával járnak (csekély a veszélye más közegek elszennyezésének), nagy területre kiterjedő szennyezettség esetén is alkalmazhatóak, költségük rövidtávon viszonylag alacsony, valamint a talaj élővilágával kíméletesek, a biológiai aktivitás megőrizhető. A jelenleg ismert kármentesítési eljárások közül a legtermészetesebb módszereknek a biológiai eljárások tekinthetők, melyek alkalmazását és előnyben részesítését az US-EPA (az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala) is ajánlja (SZABÓ, 2011, US EPA, 1995).

A biológiai módszerek mind gyakoribb alkalmazása mellett azonban a fenti ismertetés alapján belátható, hogy a patogén mikroszervezetek problémája bioremediációs eljárások kritikus

pontjának tekinthető. A továbbiakban ezért a biológiai eljárások biztonságát veszélyeztető mikroszervezetek ismertetésére térnek ki.

2.5. Jellegzetes patogén mikrobák a szénhidrogénnel szennyezett területeken

Patogén mikroszervezetnek az a fertőző ágens tekinthető, amely képes fogékony egyedben megbetegedést kiváltani (LOSONCZY, 2001). Megkülönböztetünk obligát patogén mikroorganizmusokat és fakultatív patogén, vagy másnéven opportunista kórokozókat. Míg előbbiek az ép és egészséges immunrendszerrel rendelkező egyénekben is képesek betegség kiváltására, addig az utóbbiak általában csak legyengült, immunológiai védekezésben gátolt szervezetben képesek betegséget okozni (SZOBOSZLAY-KRISZT, 2008B). Napjainkban azonban mind többször számolnak be olyan, opportunista kórokozóknak tulajdonítható megbetegedésekről, halálesetokről, melyek esetében predispozíció (hajlamosító tényező) nem játszott szerepet a betegségre való fogékonyság kialakításában (ARANCIBIA ET AL., 2002; HUHULESCU ET AL., 2011). Ennek alapján feltételezhető, hogy az opportunista kórokozók egy részének evolúciója a betegség kialakítási képesség előtérbe kerülésének irányába tart (BUCKLEY, 2004). Így napjainkban az opportunista mikroszervezeteket megkülönböztetjük az ún. alkalomszerűen patogén mikroorganizmusoktól, melyek esetében a betegség kialakítása egyedi és véletlenszerű.

A mikroszervezetek – így az opportunista kórokozók között is – széles körben elterjedt a szénhidrogén bontási képesség, amit a környezetvédelmi gyakorlat a bioremediációs eljárások során gyakran alkalmaz. A legjelentősebb szénhidrogénbontó baktériumok és Aktinomicéták 301 ismert faja az alábbi, 10 nemzetségbe sorolható: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Vibrio* (LEAHY - COLWELL, 1990). Az említett nemzetségeket képviselő fajok között azonban jelentős arányban (23%) fordulnak elő opportunista kórokozók is, melyek jelenléte a kármentesítés alatt álló területen, illetve a kezelt talaj-, talajvíz rendszerben nemkívánatos.

E humán egészségügyi jelentőséggel bíró fajok közül a környezetvédelmi beavatkozások területén az utóbbi években mind gyakrabban kerül azonosításra, illetve felhasználásra például a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó *Pseudomonas aeruginosa* faj (DAS - MUKHERJEE, 2007; KALIN ET AL., 2005). Ám ahogyan klinikai környezetben is folyamatosan számolni kell az újabb, korábban kis jelentőséggel bíró opportunisták térnyerésére, úgy a környezetvédelmi kármentesítések helyszínén is célszerű a mikrobaközösség újabb tagjait is megfigyelés alá vonni. Ilyen, potenciálisan köz- és környezetegészségügyi problémát jelentő mikroszervezetek az *Acinetobacter* nemzetség képviselői is, melyekkel részletesen az alábbi alfejezetben foglalkozom.

2.5.1. *Acinetobacter* nemzetség

2.5.1.1. Az *Acinetobacter* nemzetség általános bemutatása

Az *Acinetobacter* nemzetség tagjai szabadon élő szaprofiták¹, ubikviter² szervezetekként bárhol fellelhetőek a környezetben. Jellemzően opportunista mikroszervezetek (HTTP9), melyek nem csak a talajban, talajvízben, szennyvízben és élelmiszerekben fordulnak elő, hanem klinikai környezetben is jelen vannak számos nozokomiális³ fertőzést okozva. Sokoldalú metabolikus tulajdonságaiknak köszönhetően fontos szerepet játszhatnak különböző ipari-környezeti biotechnológiai folyamatokban, mint például számos környezeti szennyezőanyag biodegradációjában (TOWNER, 2006).

A nemzetség tagjai első azonosításuk óta különböző szerzők által számos eltérő néven kerültek leírásra. Az *Acinetobacter* nemzetség elnevezés először 1954-ben lett rendszeresítve, és egy heterogén csoportot jelzett, melynek tagjai mozgásra képtelen Gram-negatív szaprofiták voltak, amiket más hasonló baktériumoktól a pigmentáció hiánya különböztetett meg. 1971-ben az *Acinetobacter* nemzetség az előző csoportból már csak az oxidáz-negatív törzseket tartalmazta. A Bergey's-féle baktériumhatározó 1984-ben a *Neisseriaceae* családba sorolta a nemzetséget, azonban újabb molekuláris taxonómiai tanulmányok eredményeként ma már egy újabb család, a *Moraxellaceae* tagjaiként tartják őket számon. Ez az új család tartalmazza az *Acinetobacter*, a *Moraxella*, a *Psychrobacter* nemzetségeket és a hozzájuk tartozó mikroszervezeteket. Ma a nemzetség hivatalos érvényben lévő taxonómiai besorolása a következő (HTTP10):

Prokarióták

Domén: *Bacteria*

Törzs: *Proteobacteria*

Osztály: *Gammaproteobacteria*

Rend: *Pseudomonadales*

Család: *Moraxellaceae*



1. sz. ábra: *Acinetobacter baumannii* elektronmikroszkópos felvétele (http11)

A nemzetség leggyakrabban vizsgált típusfaja az *Acinetobacter baumannii* (1. sz. ábra). Az *Acinetobacter*-ek Gram-negatív, nem fermentáló, szigorúan aerob baktériumok. Morfológiai jellemzésük során kicsi, telt pálcákat, vagy coccobacillusokat figyelhetünk meg, melyek gyakran állnak párban, vagy láncba kapcsolódva. Nem spóráképző, és flagellumok, csillók hiányában alapvetően mozgásra képtelen mikroszervezetek, azonban félfolyékony tápközegben bizonyos speciális mozgásformák mégis megfigyelhetők esetükben (TOWNER, 2006). A telepek általában nem pigmentáltak, de vannak törzsek melyeknél

¹ szaprofiták: másnéven korhadéklakók, melyek képesek holt szervesanyag hasznosítására

² ubikviter: mindenütt előforduló, megtalálható

³ nozokomiális: kórházi körülmények között kialakult fertőzés

előfordulhat fehéres krémszín. A telepek átmérője 1-2 mm, ép szélűek, felületük lehet sima, vagy fényes, nyálkás. Az *Acinetobacter* nemzetség képviselői széles hőmérsékleti tartományban szaporodnak, a legtöbb törzs hőoptimuma 33°C, de néhány környezeti izolátum jobban szaporodik 20-30°C-on. A klinikai törzsek általában 37°C-on növekednek legjobban, de előfordulnak olyanok is, amelyeknek a 42°C kedvez (TOWNER, 2006).

Minden *Acinetobacter* oxidáz negatív és kataláz pozitív. A legtöbb törzs annak ellenére, hogy nem képes a nitrátot nitritté redukálni, nitrogénforrásként hasznosítani tudja mindkét vegyületet. Az *Acinetobacter*-ek jelentős része nem képes hasznosítani a glükózt, mint szénforrást, de előfordulnak olyan ritka törzsek, melyek az Entner-Doudoroff⁴ úton keresztül fel tudják azt használni energiaforrásként (TOWNER, 2006).

A nemzetség számos tagja képes lebontani különböző vegyületeket, beleértve alifás alkoholokat, aminosavakat, zsírsavakat, egyenes láncú szénhidrogéneket, cukrokat, és számos, viszonylag nehezen lebomló aromás vegyületet, mint a benzoát, az n-hexadekán, a ciklohexanol és a 2,3-butándiol. A nemzetség tagjai különösen alkalmasak a ritka biokémiai utak tanulmányozására, és szerepet játszhatnak számos szennyező és ipari termék – például a poliklórozott bifénilek – lebontásában. Képesek a szennyvízből eltávolítani a foszfátot, csökkentve ezzel az eutrofizáció problémáját a szennyvíztisztító telepeken (TOWNER, 2006).

Izoláltak olyan *Acinetobacter* törzseket, amelyek motorolajból származó, hosszú láncú n-paraffinokat bontottak és nagymértékben csökkentették az olaj mennyiségét a szennyezett talajban (KOMA ET AL., 2001). Bioaugmentációs eljárás során egy *A. baumannii* törzs 90 nap alatt 89,3-ról 53,9 g/talaj kg-ra csökkentette a közegben mérhető TPH szennyezést. Laboratóriumi körülmények között rázólabdikos kísérletben is tesztelték ugyanazon törzs bontási képességét, és a kezdeti TPH szint több, mint 50%-os csökkenést mutatott 120 óra elteltével (MISHRA ET AL. 2004). Az *Acinetobacter lwoffii* kevert mikrobatenyészetben metil-terc butil éter biodegradációja képes (ACUNA-ASKAR ET AL., 2000). Az *Acinetobacter calcoaceticus* biofilm képzésre hajlamos törzs, mely képes olajszármazékok jelenlétében növekedésre, illetve az alifás és aromás szénhidrogének emulgeálására (MARÍN ET AL., 1996).

2.5.1.2. Az *Acinetobacter* fajok humánegészségügyi jelentősége

Az *Acinetobacter* nemzetség tagjai opportunisták, és az utóbbi években a nozokomiális fertőzések mind gyakoribb kórokozói: különösen nagy veszélyt jelentenek az intenzív osztályok betegeire. Elsődlegesen tüdőgyulladást okozhatnak, főként immunhiányos betegeknél, akik műtéten, vagy traumán estek át (égési sérülés stb.). Általuk okozott fertőzés még a vérmérgezés, a

⁴ Entner-Doudoroff út: a baktériumoknál a glükóz lebontásának (piruvátig) egyik útja, csak prokariótákra jellemző.
Eredménye: 1 ATP, 1 NADH

szívbelhártya gyulladás, az agyhártyagyulladás, a bőr- és sebfertőzések, valamint a húgyúti fertőzés. A nemzetségen belül, kórházi környezetből leggyakrabban izolált kórokozócsoport az *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* komplex (GIAMARELLOU ET AL., 2008), mely a két faj nehézkes elkülöníthetősége miatt egyben önálló taxonómiai egység (fajcsoport).

Az *Acinetobacter* nemzetség képviselői által kiváltott egészségkockázatot súlyosbítja, hogy rendkívül gyorsan fejlesztenek rezisztenciát a legtöbb potenciális antibiotikummal szemben, aminek az egyik fő oka, hogy a kórházakban túlélő törzsek a kezeléseik során túlzott és helytelen mértékben alkalmazott antibiotikumokhoz adaptálódnak, és így ellenállóvá válnak velük szemben. A nemzetség képviselői különböző rezisztencia mechanizmusokkal védekezhetnek az antibiotikumok széles körével szemben. Az *A. baumannii* egyik jellegzetessége a kromoszómálisan kódolt *bla*_{OXA-51} csoportba tartozó -laktamáz gén hordozása, mely a Karbapenemekkel szembeni rezisztenciát kódolja (PÁSZTI ET AL., 2011). Ellentétben a *Moraxellaceae* család más tagjaival, a nemzetség legtöbb tagja rezisztens a penicillinnel, valamint számos klinikai izolátum a Cefalosporinokkal szemben a kromoszómális cefalosporináz enzim termelése miatt. Az antibiotikumokkal szemben mutatott rezisztencia összefüggésben van a plazmidokon kódolt tulajdonságokkal (TOWNER, 2006), a megszerzett tulajdonságot a törzsek ugyanis gyakran mobilis genetikai elemek közvetítésével át tudják adni egymásnak, terjesztve ezzel a rezisztenciát. Ilyen módon vált a klinikai *A. baumannii* törzsek nagy része az utóbbi években a Karbapenemekkel, Fluorokinolonokkal és Aminoglikozidokkal szemben ellenállóvá.

Multirezisztens *Acinetobacter* izolátumokat világszerte, számos kórházban észlelnek, Európából, az Egyesült Államokból, Kínából, Hong Kongból, Koreából és Japánból is jelentettek ilyen törzseket (GIAMARELLOU ET AL., 2008). A multirezisztens törzsek száma folyamatosan emelkedik, ami hazai körülmények között is jelentős problémát okoz. 2007-ben Magyarországon 84 beteg fertőződött meg multirezisztens *A. baumannii*-val, ami 2009-re elérte a 230-at, 2010-ben pedig már 352-re emelkedett (PÁSZTI ET AL., 2011).

2.6. Antibiotikumok szerepe a humán gyógyászatban

A fertőző betegségek gyógyításának kemoterápiás korszaka bő fél évszázadra tekint vissza. Ezt az időszakot az új és hatásos antimikrobiális szerek folyamatos kifejlesztése, bevezetése, valamint a kórokozó mikrobák rezisztenciájának kifejlődése és elterjedése jellemezte. Napjaink klinikusainak a hatékony antibiotikumok széles köre áll rendelkezésére az érzékeny patogén mikrobákkal szemben, ám a multirezisztens (többszörösen rezisztens) mikroorganizmusok kezelése mind nagyobb kihívást jelent (LOSONCZY, 2001).

Az antimikrobiális szerek hatásának alapja a szelektív toxicitás, vagyis a szer legyen erősen toxikus a kórokozóra és nem, vagy alig ártalmas a gazdaszervezetre, az emberre nézve. Ez oly

módon lehetséges, hogy hatásukat vagy olyan sejtalkotóra fejtik ki, amely az emberi sejtben nincs, vagy a kórokozónak olyan életfolyamatát gátolják, amely az emlősszervezetben más útvonalon megy végbe. Valódi oki gyógymódot jelentenek, mivel a betegséget a patogén mikroorganizmus elpusztításával (baktericid hatás), vagy szaporodásának gátlásával (bakteriosztatikus hatás) szüntetik meg (FÜRST, 2004). Hatásmechanizmusuk alapján megkülönböztethetők baktériumfal felépítését gátló szerek, nukleinsavszintézis gátlók, a DNS kettős spirál kialakulását akadályozó készítmények, folsavszintézis gátlók, fehérjeszintézis gátlók, illetve a DNS-t citotoxikus metabolitokkal károsító hatású készítmények (FÜRST, 2004).

Antibiotikum adható terápia, illetve profilaxis (megelőzés) céljából. Terápiás antibakteriális kezelés szükséges, ha a beteg bizonyítottan, vagy a klinikai jelek alapján feltételezhetően bakteriális fertőzésben szenved. Ha a beteg klinikai tünetei egyértelműen erre utalnak és megfelelő mikrobiológiai diagnosztikai módszerrel alá lehet támasztani a fertőzés tényét (pl.: kórokozó baktérium kitenyésztése), akkor célzott kezelésre nyílik lehetőség. Ma már ismeretes a legtöbb klinikai kép hátterében lévő kórokozók köre, így az antibiotikumok hatékonyságának tudatában nagy valószínűséggel hatásos terápia kezdhető. Profilaktikusan csak akkor adható antibiotikum, ha közvetlenül fenyegető fertőzést akarunk kivédeni (FÜRST, 2004).

Az antibiotikumok használata az elmúlt 50 évben jelentősen csökkentette a fertőző betegségekben megbetegedettek számát és a letalitást. Ugyanakkor, ezzel párhuzamosan, sok kórokozó – különböző mértékben – rezisztenssé vált velük szemben (SZALKA, 2003).

2.7. Antibiotikum rezisztencia a klinikai viszonyok között

Az antibiotikumok, melyeket a gyógyításban használnak és a mikroorganizmusok, amelyek kolonizálják, vagy fertőzik a betegeket, folyamatosan versenyben állnak egymással. Az 1960-as évektől figyelhető meg a rezisztens kórokozók gyakoribbá válása. A Gram-pozitív baktériumok közül a Penicillin-rezisztencia a *Staphylococcus aureus* törzseknél az 1960-as évek elején vált epidémiássá és napjainkban klinikai viszonylatban már természetesnek tekinthető. A '60-as évek végén az MRSA (meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*) okozta kórházi járványok terjedtek el, először Európában, majd az Egyesült Államokban. Az 1980-as években a béta-laktamáz enzimek újabb családja jelent meg az *Enterobacteriaceae* csoportba tartozó baktériumok körében, rezisztenciát okozva további Cefalosporinokkal szemben. A *Staphylococcus* és *Pseudomonas* törzseknél az 1990-es években jelentkezett a rezisztencia az új Fluorokinolonokat illetően (LOSONCZY, 2001).

Az antibiotikum-rezisztencia legáltalánosabb mechanizmusa valamilyen, az antibiotikumot inaktiváló enzim termelése. Ilyenek a Béta-laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát eredményező béta-laktamázok és az Aminoglikozidokat módosító enzimek. Megváltozhat továbbá a

sejtfal permeabilitása, mely rezisztenciát okozhat például a Karbapenemek, vagy a Fluorokinolonok esetében. További lehetőség az aktív efflux, de rezisztenciához vezethet egy megkerülő metabolikus út kialakulása, vagy a sejtfal antibiotikum-kötő helyein (pl.: PBP, penicillin-kötő fehérjék) történő változások bekövetkezése (LOSONCZY, 2001).

A rezisztencia kialakulásának genetikai háttere lehet kromoszomális vagy extrakromoszomális (plazmidhoz kötött) eredetű. A kromoszomális eredetű rezisztencia spontán mutációval és szelekcióval jön létre, és általában egy antibiotikum, vagy antibiotikum-csoporttal szemben alakul ki. Ezzel ellentétben a plazmiddal terjedő rezisztencia adott mikrobapopulációban gyorsan jelentkezik, és gyakran több, egymástól különböző antibiotikummal szemben alakul ki. A plazmidok nem csak egyes speciesek, hanem különböző genusok között is átadódhatnak és szétszóródhatnak (LOSONCZY, 2001).

Régi tapasztalat, hogy az antibiotikumok profilaktikus, vagy terápiás adagolása elősegíti a betegekben a rezisztens patogén törzsek szelekcióját. Egy bizonyos antibiotikum kiterjedt és folyamatos alkalmazása visszaszorítja a rá érzékeny mikrobákat, megteremtve a rezisztensek számára a növekedés és terjedés (kolonizáció), vagy éppen a dominancia feltételeit. Más megerősített feltételezés szerint, az ilyen antibiotikum-kezelés egyenesen stimulálja a rezisztens mikrobák növekedését (LOSONCZY, 2001). A nem kellő körültekintéssel megválasztott terápia, hosszútávon jelentkező veszélye, hogy a felügyelet nélkül használt antimikrobiális szereink elveszíthetik hatékonyságukat, amire a közeli múlt is számos példával szolgál (BARCS, 2006).

2.7.1. Multirezisztencia

Multirezisztencián, vagy polirezisztencián általában azt értjük, ha egy baktériumtörzs kettő, vagy több, a klinikai terápiában kezelésére alkalmasnak tekintett antibiotikum csoportba tartozó készítményekkel szemben rezisztens (LOSONCZY, 2001; DRAGHI ET AL., 2006). A tapasztalatok szerint a legtöbb rezisztens mikrobatorzs forrásai a kórházban kolonizált, vagy fertőzött betegek, a legjelentősebb terjesztő tényező pedig a személyzet, a látogatók, a használati eszközök stb. Többször igazolták már a rezisztens Gram-pozitív törzsek (pl.: MRSA) terjedési lehetőségét a személyzeten keresztül, a Gram-negatív mikrobák hordozása azonban - kivéve kézen – nagyon ritka. Az *Acinetobacter* egyike ama kevés Gram-negatív baktériumnak, amely a normál bőrflorában is megtalálható lehet, és okozott már visszatérő kisebb járványt (LOSONCZY, 2001). Leírtak továbbá olyan kórházi járványokat is, amit gyakorlatilag az összes antibiotikumra rezisztens *Acinetobacter* törzs okozott (LOSONCZY, 2001).

2.8. Antibiotikum rezisztencia a környezetben

Az Európai Közösség által kiadott beszámoló szerint az antimikrobiális rezisztencia a környezetben is széles körben elterjedt. Rezisztens baktériumok izolálhatóak a felszíni és a felszín alatti vizekből, valamint talajból és szennyezett vízzel kezelt növényekből. Az utóbbi 20 évben a vizekben és az üledékekben a rezisztencia géneket hordozó baktériumtörzsek aránya 10-46%-ra nőtt, míg a szennyvizekben ez az arány a 76%-ot is meghaladja (OPINION OF THE SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE, 1999).

A környezeti antibiotikum rezisztencia lehetséges oka, hogy a környezetbe és ezáltal a felszíni-, felszín alatti vizekbe, illetve földtani közegbe került és folyamatosan kerülő antibiotikum szermaradványok szelekciós nyomást fejthetnek ki a mikroszervezetekre (KASZAB, 2011). A környezetbe kerülő antibiotikumok forrásai lehetnek:

- **Lakossági antibiotikum-használat:** Az antibiotikumok jelentős része kiválasztódik az emberi szervezetből, és a szennyvízbe kerül. Gyakran a lejárt szavatosságú gyógyszereket is a csatornába engedik, Németországban feltehetően a háztartások 20-40%-ában cselekszenek így. Ezáltal a különböző antibiotikumok a szennyvíztisztító telepekre jutnak, ahonnan a lebontási folyamatokkal szemben meglehetősen ellenálló szerek a felszíni vizekbe, vagy akár az ivóvízbe kerülhetnek (KÜMMERER ET AL., 2000).

- **Mezőgazdasági antibiotikum-használat:** Az antibiotikumok célzott terápiás és profilaktikus felhasználásán kívül számításba kell venni az állatgyógyászati és mezőgazdasági felhasználást is, például a növényvédelemben, vagy hozamnövelő takarmányadalékként az állattartásban (BARCS, 2006). Egészen a közelmúltig hozzávetőlegesen az összes antibiotikum-használat 33%-át használták az állatgyógyászatban és 15%-át az állattenyésztésben (OPINION OF THE SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE, 1999). Napjainkban a nutritív célú állattakarmányozási felhasználás európai döntés értelmében nem megengedett: 2006. január 1-től az Európai Unió korlátozta az antibiotikum jellegű takarmánykiegészítők (kivéve kokcidiosztatikumok és hisztomonosztatikumok) alkalmazását és eltávolította azokat az engedélyezett készítmények Közösségi Nyilvántartásából (CASTANON, 2007).

- **GMO szervezetek:** Napjaink újkeletű kihívása a genetikailag módosított szervezetek alkalmazása és az ebből eredő környezeti kockázatok. Genetikailag módosított szervezetek esetében ugyanis jellemző az antibiotikum rezisztencia marker gének alkalmazása, melyek környezeti és humán-egészségügyi vonatkozásai az antibiotikum rezisztencia terjedése tekintetében jelenleg is tudományos viták tárgyát képezik (OPINION OF THE SCIENTIFIC PANEL, 2004).

Összességében tehát a szakirodalom áttekintése alapján megállapítható, hogy

- az *Acinetobacter* nemzetség klinikai jelentősége az általuk kiváltott megbetegedések gyakoriságával, illetve a terápiás lehetőségek csökkenésével, az antibiotikum rezisztencia mechanizmusok terjedésével egyre nő, így korunk és a közeljövő egyik probléma-baktérium nemzetségével állunk szemben. Kiemelkedő jelentőségű az *A. baumannii* faj, illetve az *A. baumannii-calcoaceticus* komplex, melynek képviselői mind gyakrabban jelentenek kihívást az orvostudomány számára és fejlődésük, evolúciójuk egyértelműen a betegség kialakító képesség fejlődésének irányába tart.
- az *Acinetobacter* nemzetség képviselői számos olyan metabolikus útvonallal rendelkeznek, melyek alapján képesek a környezetszennyező vegyi anyagok (elsősorban szénhidrogének) degradációjára. Ennek következtében szénhidrogénnel szennyezett kárhelyeken más fakultatív patogén mikroszervezetekhez hasonlóan megjelenhetnek. Több tudományos közlemény számolt be továbbá direkt bioremediációs célú tesztelésükről, illetve felhasználásukról.
- környezetegészségügyi kockázatuk mértékét meghatározza, hogy mely közegben (talaj, talajvíz) milyen elősejtszámban és gyakorisággal lelhetők fel, illetve, hogy a környezeti izolátumok milyen tulajdonságokkal (antibiotikum rezisztencia, patogenitás, szénhidrogén bontó képesség) jellemezhetőek. E tulajdonságokról azonban jelenleg elenyésző információkkal rendelkezünk, így a kutatás keretében vállalt célkitűzések e feladatok köré rendeződtek.

3. MÓDSZEREK

Az *Acinetobacter* fajok környezeti detektálására, azonosítására, valamint részletes tulajdonságaik (antibiotikum rezisztencia, szénhidrogén-bontás) feltárására irányuló vizsgálatokat a Szent István Egyetem Környezetvédelmi- és Környezetbiztonsági Tanszékén, valamint a Környezetipari Regionális Tudásközpontban végeztük. Munkánk során az előírásoknak megfelelően steril körülmények között, lamináris bokszt igénybevételevel dolgoztunk, a szükséges védőfelszerelések (gumikesztyű, maszk, védőszemüveg) használatával. A felhasznált eszközöket és táptalajokat 20 percig, 121°C-on, 1 atm túlnyomáson autoklávban sterilizáltuk.

Céljaink megvalósítása érdekében első lépésben szénhidrogénnel szennyezett kárhelyekről származó talajvíz mintákat vételeztünk és e mintákból izoláltunk és identifikáltunk *Acinetobacter* nemzetségbe tartozó törzseket, melyeket az 1. sz. melléklet ábráján összefoglalt, többlépcsős vizsgálati rendszeren vittük végig.

3.1. Mintavételezés

Az *Acinetobacter* fajok izolálása céljából az ország különböző pontjain elhelyezkedő, szénhidrogénnel szennyezett kárhelyekről (Bábolna, Balassagyarmat, Baracska, Békéscsaba, Bugyi, Debrecen, Dunavarsány, Kunhegyes, Miskolc, Orosháza, Polgár, Siklós, Százhalombatta, Szigetszentmiklós, Vác, Zalaegerszeg) történt talajvíz mintavételezés a vonatkozó Magyar Szabványnak megfelelően (MSZ 21464: 1998. Mintavétel felszín alatti vizekből). A talajvíz mintavétele minden esetben a kárhelyen létesített észlelő kút igénybevétele, steril acél bailer segítségével történt (2. sz. ábra), majd a minták megfelelő hőmérsékleten (~4°C) szállítva kerültek laboratóriumba mikrobiológiai és kémiai analitikai vizsgálatok céljából.



2. sz. ábra: Talajvíz mintavétel Orosházán (2011.08.23., saját felvétel)

3.2. *Acinetobacter* fajok növekedésének vizsgálata általános és szelektív táptalajokon

Az *Acinetobacter*-ek környezeti talajvíz mintákból történő izolálására a szakirodalom alapján és a laboratóriumi rutin szerint több lehetőség is rendelkezésünkre állt, melyek a következők voltak:

- Általános táptalajok pl. TGE-5, vagy nutrient agar
- *Acinetobacter* dúsító tápközeg alkalmazása (BAUMANN, 1968)
- Szelektív és/vagy differenciáló táptalajok
 - MacConkey táptalaj (MERCK)

- Cetrimid agar (MERCK)
- Leeds *Acinetobacter* Medium (LAM) szelekciós ágensek nélkül (HTTP12)
- LAM szelekciós ágensekkel (JAWAD ET AL., 1994)

Munkánk során kísérletet tettünk a vizsgálati lehetőségek egyesével történő tesztelésére és a javasolt tápközegek laboratóriumi optimalizálására, melynek eredményeit a 4.1. sz. alfejezetben ismertetjük. Ennek megvalósításához a Tanszék környezeti eredetű mikroba-törzsgyűjteményben már rendelkezésünkre álló 8, szintén szénhidrogénnel szennyezett kárhelyről származó *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*, *A. venetianus*, *A. johnsonii*, *A. beijerinckii*) izolátumot használtuk fel. E baktériumtörzseket bevontuk továbbá a munkánk keretében tervezett további vizsgálati irányok (antibiotikum rezisztencia, szénhidrogén bontó képesség) végrehajtásába is.

A táptalaj tesztelés keretében 24 órás inkubációt követően megfigyeltük a rendelkezésünkre álló különböző *Acinetobacter* fajok növekedését és telepmorfológiáját a felsorolt laboratóriumi táptalajokon, így mérleghettük a rendelkezésre álló táptalajok alkalmasságát az *Acinetobacter* spp. laboratóriumi tenyésztésére.

3.3. *Acinetobacter* nemzetség tagjainak izolálására szolgáló módszeregyüttes fejlesztése

A rendelkezésünkre álló lehetőségek közül a tenyésztésre alkalmasnak ítélt tápközegek esetében kialakítottunk egy olyan módszeregyüttest, mely nagy arányban sikeres és a vizsgált nemzetségre nézve kellően szelektív izolálást tett lehetővé. Az alábbi alfejezetekben e módszeregyüttes megvalósításának főbb elemeit, az elődúsítás, illetve a LAM tápközegek felhasználásának részletes metodológiáját ismertetjük.

3.3.1. *Acinetobacter* dúsító tápoldat

Első lépésben a beérkezett környezeti mintákban esetlegesen jelen lévő *Acinetobacter* törzsek izolálásának céljából elődúsítást alkalmaztunk. A mintákból 5 ml-t pipettáztunk előzőleg sterilizett 20 ml *Acinetobacter* dúsító tápoldatot (BAUMANN, 1968) tartalmazó lombikba (lásd 3. sz. ábra, ill. 3. sz. melléklet).



3. sz. ábra: *Acinetobacter* dúsító tápoldat (saját felvétel)

A környezeti mintával beoltott rázó lombikokat ezt követően 48 órán át, 30°C-on inkubáltuk 160 rpm fordulatszám mellett. A 48 órás inkubáció után a dúsított környezeti minta felhasználásával tízes alapú hígítási sorokat készítettünk 10^1 - 10^6 nagyságrendig, 9 ml desztillált víz és Tween 80 keverékét tartalmazó hígító oldat segítségével. A hígításokból 1-1 ml-t petri-csészébe pipettáztunk, melyet követően lehetőségünk nyílt általános (pl.

TGE-5 tápagar, lásd 3. sz. melléklet) és szelektív/differenciáló táptalajjal (pl. Leeds *Acinetobacter* Medium, lásd 3. sz. melléklet) történő lemezöntésre.

3.3.2. Leeds *Acinetobacter* Medium (LAM)

A Leeds *Acinetobacter* Medium alkalmazására több szakirodalmi forrást is találtunk, melyek egyrészt a tápközeg differenciáló jellegét, másrészt antibiotikumokkal kiegészítve annak szelektív tulajdonságait használták fel az *Acinetobacter* törzsek kimutatására.

A LAM tápközegen az *Acinetobacter* nemzetség képviselői jellegzetes mályva színt mutatnak (lásd 4. sz. ábra), illetve a táptalaj fenolvörös tartalmának köszönhetően a telepek körül található rózsaszín, diffúz elszíneződés alapján jól elkülöníthetők. A tápközeg emellett három olyan antibiotikumból álló kombinációt is tartalmazhat, melyek lehetővé teszik a környezeti mintákban előforduló egyéb Gram-negatív és Gram-pozitív fajok jelentős hányadának szelektív gátlását.

A kiöntött lemezeket saját tapasztalataink és szakirodalmi utalások (TOWNER, 2006) alapján 28 °C-os hőmérsékleten, 48-72 órán át inkubáltuk, majd a típusos (mályva színű, kerek, ép szélű, kiemelkedő, fényes) telepeket tisztító szélesztés után, TGE-5 ferde agarra oltottuk, további vizsgálatok és törzsfenntartás céljából.

3.4. Környezeti eredetű *Acinetobacter* fajok identifikálása

Az *Acinetobacter* nemzetség tagjainak identifikálására vonatkozó szakirodalmi információk szűkösek voltak és elsősorban a molekuláris genetikai módszerekre fókuszáltak. A hagyományos, fenotípusos bélyegeken alapuló, elérhető módszerek köre korlátozott volt, szabványosított, nemzetközileg elfogadott eljárást pedig az irodalom áttekintése során nem találtunk. Ezek alapján a környezeti izolátumok identifikálásához a 16S rDNS szekvencia analízisen alapuló molekuláris genetikai módszert választottuk.

A molekuláris biológiai alapokon nyugvó fajazonosítás megvalósításához azonban szükség volt olyan elővizsgálatok végrehajtására, melyek az esetleges fals identifikációk számát minimálisra szorítják. Választásunk így az oxidáz és kataláz tesztre, illetve a Gram-próbára esett, és csupán a megfelelő profillal jellemezhető törzsek esetében hajtottuk végre a molekuláris genetikai módszereken nyugvó identifikációt.



4. sz. ábra: Az Sk-V (Siklós) környezeti mintából készített tisztító szélesztés Leeds *Acinetobacter* Medium (LAM) táptalaj felhasználásával (2011. 06. 27., saját felvétel)

3.4.1. Oxidáz-, Kataláz-teszt, Gram-próba

Oxidáz-teszt: Az aerob mikrobák légzési lánc gyakran tartalmazhat aa₃ típusú citokróm oxidázt, ami az oxigénre haladó elektrontranszport-lánc utolsó tagjaként az oxigén vízzé történő redukcióját végzi. Az aa₃ típusú citokróm oxidáz jelenlétét vizsgáló oxidáz teszt a baktérium identifikálás klasszikus tesztjei közé tartozik.

A vizsgálandó baktériumtörzs „overnight” (maximum 18 órás) ferde agar tenyészetéből üvegbottal szűrőpapír-szeletre kis mennyiségű baktériumtömeget vittünk fel, majd oxidáz reagenst (tetrametil-p-feniléndiamin-oxalát 1%-os vizes oldata) cseppentettünk rá. Pozitív reakció esetén azonnali, vagy 60 másodpercen belüli liláskék elszíneződést tapasztaltunk, mely a tetrametil-p-feniléndiamin redukciójából eredő „Wurster-kék” keletkezésének volt köszönhető. A negatív eredménynél semmilyen elszíneződés nem volt tapasztalható.

Kataláz-teszt: A baktériumok által termelt kataláz kvantitatív kimutatására szolgáló módszer. A kataláz enzim a legtöbb aerob és fakultatív anaerob baktériumban megtalálható, feladata a hidrogén-peroxid vízzé és oxigénné történő átalakulásának katalizálása.

Vizsgálatához zsírtalanított, lelángolt tárgylemezre üvegbot segítségével kis mennyiségű „overnight” baktériumtenyészetet vittünk fel, majd 1-2 csepp kataláz reagenst (3%-os hidrogén-peroxid) cseppentettünk rá Pasteur-pipetta segítségével. Pozitív reakció esetén azonnali pezsgést, buborékképződést tapasztaltunk.

Gram-próba: A baktériumok sejtfálszerkezet szerinti besorolásának Gram festésnél egyszerűbben kivitelezhető módszere. A Gram-negatív sejtfal ugyanis az általános laboratóriumi tapasztalat alapján 3%-os KOH oldat hatására feloldódik, míg a Gram-pozitív nem. A feloldódott Gram-negatív sejtekből kiszabaduló sejtalkotók következtében a KOH oldatban felvett tenyészetből kaccsal szál húzható, ellenben a Gram-pozitívaknál ez a folyamat nem megy végbe.

A vizsgálat során zsírtalanított és lelángolt tárgylemezre 3%-os KOH oldatot cseppentettünk, majd oltókacs segítségével a baktérium „overnight” tenyészetéből kacsnyi mennyiséget a KOH-ba vittünk. A kaccsal homogenizáltuk a szuszpenziót, majd elvégeztük a próbát.

3.4.2. Faj szintű identifikáció 16S rDNS teljes szekvencia analízissel

Az *Acinetobacter* nemzetség tagjai oxidáz-negatív, kataláz-pozitív és Gram-negatív baktériumok. Ahol a környezeti mintákból izolált törzseknél megfelelő profilt tapasztaltunk, további, genetikai vizsgálatokat végeztünk 16S rDNS szekvencia analízissel (LANE, 1991) a faj szintű meghatározás érdekében. A folyamat főbb lépései: DNS izolálás, 16S rDNS univerzális

szakaszainak amplifikálása PCR segítségével, illetve szekvencia analízis szekvenáló PCR reakciót követő kapilláris gélelektroforézissel.

3.4.2.1. DNS izolálás

Az *Acinetobacter*-jelölt törzsekből legfeljebb 24 órás folyékony tenyészetet hoztunk létre TGE-5 táptalajon, majd a MOBIO Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit segítségével DNS-t izoláltunk belőlük, a gyártó ajánlásainak megfelelően, melyet agaróz gélelektroforézissel ellenőriztünk (lásd 3.4.2.3. alfejezet).

3.4.2.2. Polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction – PCR)

A PCR reakció során tetszőleges DNS templátból nagyszámú másolatot hozhatunk létre forward és reverse primerek, valamint DNS-polimeráz segítségével. A PCR reakció három fő lépésből áll. A *denaturáció* során a kettős szálú DNS-t magas hőmérsékletre hevítjük, hogy a kettős szálak a hidrogénhid-kötések felbomlásával szétváljanak, és egyszálú templátot kapjunk. A második lépésben az *anelláció* során csökkentjük a hőmérsékletet, így a primerek hozzá tudnak kapcsolódni a DNS szálakhoz. A hőmérséklet ebben a fázisban a primerek olvadási hőmérsékletétől függ. Az *elongáció* szakaszában a DNS-polimeráz (Taq-polimeráz) a szabad nukleotidok beépítésével létrehozza a hiányzó szálakat.

A reakcióhoz szükséges komponensek (PCR mastermix):

- *DNS templát*: tartalmazza a DNS-szakasz amplifikálandó régióját
- *Forward és Reverse primer*: meghatározza az amplifikálandó szakasz elejét és végét
- *DNS-polimeráz*: lemásolja az amplifikálandó szakaszt
- *Taq-puffer*: biztosítja a DNS-polimeráz számára a megfelelő kémiai környezetet
- *dNTP* (deoxiribonukleotid-trifoszfátok): a polimeráz az új DNS szálakat ezekből építi fel
- *MQ-víz*: nagy tisztaságú víz, a végtérfogot beállításához

A reakció során felhasznált univerzális *Bacteria* domenspecifikus 27f és 1492r primerek szekvenciáit az 1. sz. táblázatban ismertetjük.

1. sz. táblázat: A 16S rDNS PCR során felhasznált primerek szekvenciái (LANE, 1991)

Primer jelölése	Amplifikáló primerek szekvenciája
27f	5' GAGTTGATCCTGGTCAG 3'
1492r	5'-TACGGGTACCTTGTTACGACTT-3'

A 16S rDNS alapú, faj szintű identifikációhoz használt PCR reakció során a szükséges alkotókat az alábbi mennyiségben használtuk (egy reakcióelegyre számolva, 50 µl végtérfogat mellett): 5 µl Taq-Buffer, 10 µl (1mM) dNTP, 0,25 µl Taq-polimeráz, 0,5 µl (1µM) forward primer (27f), 0,5 µl (1µM) reverse primer (1492r), 1 µl DNS templát, 32,75 µl MQ-víz.

A PCR reakció az automata Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf, Németország) készülékben zajlott a következő hőprofil alapján: 98°C 5' 32x (94°C 10'' 94°C 30'' 52°C 30'' 72°C 45'') 72°C 10' 4°C ∞.

A folyamat végén a készülék 4°C-ra hűti a PCR terméket, amelyet felhasználásig szintén 4°C-on tároltuk.

3.4.2.3. Agaróz gélelektroforézis

A PCR sikerességét és a megfelelő méretű fragmentek képződését agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A folyamat végrehajtásához 80 ml 1 x TBE (10,8 g Tris; 10,5 borsav; 0,93 g EDTA-Na; 1000 cm³-re desztillált vízzel kiegészítve) pufferben 0,8 g nagy tisztaságú agarózt oldottunk fel, majd a kézmelegre hűtött oldatba 3,5 µl 1%-os ethidium-bromid festéket pipettáztunk. A gél fésűsorokat tartalmazó, OWL-típusú futtatókádban szilárdítottuk. A 8 µl PCR termék és a 2 µl Stop-TBE (50% szacharóz, 20 nM Na-EDTA, 0,1% brómfenolkék) oldat elegyét a fésűsorok eltávolítását követően kialakult zsebekbe pipettáztuk. Minden mintasor mellé standardként 3 µl DNS markert (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) vittünk fel, így a PCR termék hozzávetőleges méretének ellenőrzésére is lehetőségünk nyílt.

A DNS molekula foszfátcsoportjai miatt pH 7 értéken negatív össztöltéssel rendelkezik, így egyenáram hatására a DNS a pozitív pólus felé vándorol. A DNS-számba beépül az előzetesen a gélhez adott ethidium-bromid és UV fény alatt fluoreszkál, így a DNS könnyen kimutatható a gélben. A mintákat 110 V feszültségen 30 percig futtattuk, majd UV fény alatt a célszekvenciák hosszát a markerhez viszonyítva ellenőriztük.

3.4.2.4. PCR termék tisztítása

A megfelelő méretű és minőségű PCR termék elérése esetén a 16S rDNS amplifikált szakaszának szekvencia meghatározása érdekében a következő lépésben a számunkra szükségtelen alkotókat (maradék dNTP, primer dimerek) NucleoSpin Extract II DNA Clean-up szettel (Macherey-Nagel) a gyártó előírásainak megfelelően eltávolítottuk. Az így létrejött, tisztított terméket a későbbiekben a szekvenáló PCR reakcióhoz templátként használtuk.

3.4.2.5. Szekvenáló PCR reakció

Az amplifikált DNS szekvencia bázissorrendjének meghatározásához szekvenáló PCR reakciót hajtottunk végre BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit®, és Eppendorf Mastercycler® készülék segítségével. A folyamat az úgynevezett dideoxi-, vagy Sanger-féle láncterminációs módszeren alapszik. A reakcióban fluoreszcens festékkel jelölt, módosított dideoxi-nukleotidok - melyek esetében a ribóz 2' és 3' helyéről is hiányzik az oxigén - vesznek

részt. A ciklusok során a polimeráz enzim beépíti a módosított dideoxi-nukleotidokat is, így a hiányzó kapcsolódási pont (OH-csoport) miatt a beépülés helyén megszakad a lánc szintézise. Így a DNS templát különböző hosszúságú fragmentjei jönnek létre, melyek végén módosított fluoreszcens nukleotidok helyezkednek el. A szekvenáló reakcióelegy összetétele egy mintára számítva 10 µl végtérfogat mellett: 1 µl Big Dye, 1,5 µl Big Dye puffer, 0,5 µl primer (27f, 338f, 803f), 3,5 µl DNS templát (tisztított PCR termék), 3,5 µl MQ-víz.

A reakció a következő hőprofil alapján zajlott 96°C 1' 28x (96°C 10'' 51°C 5'' 60°C 4') 4°C ∞.

A készülék a reakciósort követően 4°C-ra hűti a mintákat, melyeket vagy azonnal felhasználtunk, vagy -20°C-on tároltunk. A kapott végtermék a teljes 16S rDNS szekvencia esetében körülbelül 1500 bázispár hosszúságú, amelyből az adott baktériumtörzs nagy pontossággal azonosítható.

3.4.2.6. A jelölt DNS visszanyerése – etanol-precipitáció

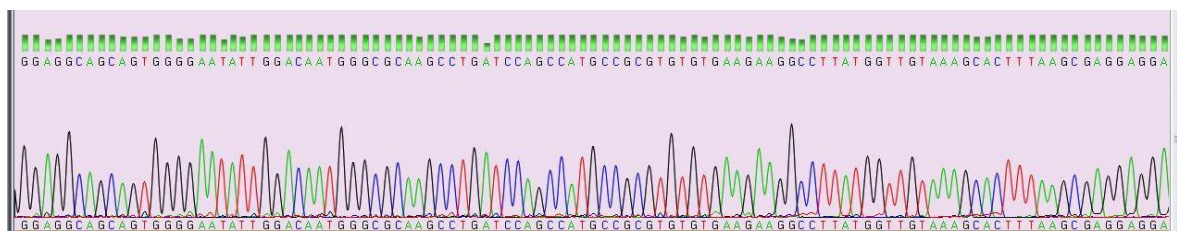
A szekvenciák meghatározásához a szekvenáló PCR reakciót követően a jelölt DNS visszanyerése szükséges. Ehhez a szekvenáló PCR termékét ún. acetát-mix-szel (3 µl Nátrium-acetát (3M), 62,5 µl EtOH (95%), 14,5 µl MQ-víz) vortexeltük, majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezt követően az elegyet 4600 rpm fordulaton, 30 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszó fázis leöntése után 180 µl 70%-os etil-alkoholt pipettáztunk a mintákra, majd 4600 rpm-en 20 percig, 4°C-on ismét centrifugáltuk. A felülúszót maradéktalanul eltávolítottuk, majd 20 µl Hi-Di formamidot mértünk a kicsapott DNS-re. Az így előkészített mintákat legalább 1 napig 4°C-on inkubáltuk.

3.4.2.7. Kapilláris gélelektroforézis

A szekvenáló PCR reakció előkészített termékét ABI Prism 310 Genetic Analyzer készülék segítségével vizsgáltuk a nukleotid sorrend megállapítása érdekében. A készülék méri a szekvenálás eredményeképpen kapott különböző hosszúságú fragmentek végén elhelyezkedő módosított dideoxi-nukleotidok fluoreszcenciáját, és jelöli a különböző nukleotidokat (lásd 5. sz. ábra).

Mivel a teljes 16S szekvencia egyetlen szekvenáló reakcióval nem fedhető le, a végső szekvenciát több, rövidebb fragment nukleotid sorrendjének szoftveres illesztésével értük el. A szekvenciák illesztését DNA Baser® v3 3.2.5.133 (Heracle BioSoft) program segítségével hajtottuk végre, és a folyamat során egyben manuálisan kijavítottuk a hibásan azonosított bázisokat (ún. mismatch-ek).

Az így kapott szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisával (HTTP14) a BLAST algoritmus alapján összehasonlítottuk, és így faj szinten meghatározhattuk az azonosításra váró baktériumtörzset.



5. sz. ábra: A PM 15/3 törzs 16S rDNS szekvenciájának részlete DNA Baser® programban (saját ábra)

3.5. Antibiotikum rezisztencia vizsgálat

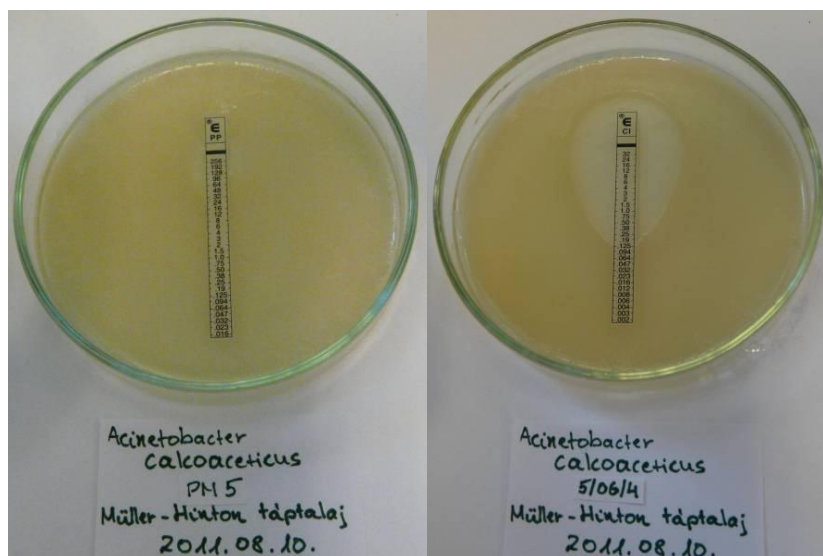
A környezeti eredetű *Acinetobacter* fajok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálatát fenotípusos módszerrel, az ún. E-teszt®-tel (AbBiodisk, Solna, Svédország) hajtottuk végre, mely az antibiotikum rezisztencia számszerű (kvantitatív) értékelését teszi lehetővé. A vizsgálatokat a CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) által meghatározott módszer szerint végeztük (CLSI, 2006).

A vizsgálatba vont törzsekből friss, legfeljebb 24 órás tenyészetet hoztunk létre, szilárd TGE-5 ferde agaron, majd 0,9 %-os NaCl-os fiziológiás sóoldatban 0,5 McFarland ($1-3 \times 10^8$ CFU) zavarosságú baktérium szuszpenziót készítettünk (MCFARLAND, 1907). Ezt követően steril vattapálca segítségével 20 ml előre kiöntött és megszilárdult Müller-Hinton agart tartalmazó, 9 cm átmérőjű petri csészékbe szélesztettük a homogén baktérium szuszpenziót. A Müller-Hinton agar az egyik legalkalmasabb táptalaj az antibakteriális szerekkel szembeni érzékenység vizsgálatához. A szélesztést követően a baktériumgyepre helyeztük az adott antibiotikum hatóanyagot koncentrációgradiens mentén tartalmazó E-teszt csíkokat (1 csík/petri csésze), majd a lemezeket 35°C-on, 24 óráig inkubáltuk.

A vizsgálatokban 7 hatóanyagcsoportba tartozó, 12 antibiotikum készítmény (Cephalosporinok – cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone; Kinolonok – ciprofloxacin, ofloxacin; Aminoglikozidok – gentamicin; Karbapenemek – imipenem, meropenem; Penicillinek – piperacillin; Rifamycinek – rifampicin; Glicilciklinek – tigecycline) vett részt. Az antibiotikumok a szakirodalom alapján, a klinikai gyakorlatban használt készítmények köréből kerültek kiválasztásra, mint az *Acinetobacter* fajok terápiájában fontos hatóanyagok, melyek esetében ugyanakkor az antibiotikum rezisztencia fokozódásának lehetősége is mind nagyobb jelentőséggel bír (CLSI, 2006, FÜRST, 2004).

Az inkubációt követően a tesztcsíkokon feltüntetett koncentráció gradiens segítségével könnyen meghatározhatóvá vált a minimális gátló koncentráció (MIC, Minimal Inhibitory Concentration). A csík körül – amennyiben tapasztalható gátlás – kialakul egy szimmetrikus gátlási

ellipszis. Ahol a gátlási ellipszis metszi a tesztcsíkot, a megadott lépték segítségével $\mu\text{g/ml}$ értékben leolvasható a MIC érték (lásd 6. sz. ábra).



6. sz. ábra: E-teszt (antibiotikummal szemben rezisztens és érzékeny *Acinetobacter calcoaceticus* törzs) (saját felvétel)

A minimális gátló koncentráció értékeket a CLSI ajánlásai alapján értékeltük, a MIC érték függvényében adott törzs érzékeny (S – sensitive), átmeneti (I – intermediate), vagy rezisztens (R – resistant) besorolást kapott (CLSI, 2007). Az antibiotikum rezisztencia tesztek minőségellenőrzésére a nemzetközileg elfogadott, ATCC (American Type Culture Collection) gyűjteményből származó ATCC 25922 (*Escherichia coli*), valamint ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa*) referencia törzseket alkalmaztuk.

3.6. Gravimetria

A szénhidrogén bontó képesség szemikvantitatív meghatározására alkalmas gravimetriás eljárás első lépésében ferde agaron „overnight” tenyészetet hoztunk létre a vizsgálandó törzsből, amit 50 ml TGE-5 táplevest tartalmazó 300 ml-es Erlenmeyer lombikba mostunk. A lombikokat rázó termosztátba helyeztük, és 72 órán keresztül 28°C -on inkubáltuk, így nagy élősejtszámú folyékony tenyészetet hoztunk létre. A baktériumtenyészetből ezt követően 5 ml-t 100 ml „OIR III” ásványi tápközegbe (lásd 3. sz. melléklet) oltottunk, mely tartalmazott 2 ml 3:2 arányú gázolaj-kőolaj keveréket is, mint egyetlen szénforrást. A szénhidrogén tartalmú ásványi tápközegbe oltott baktériumtenyészetet ezt követően 120 órán keresztül szobahőmérsékleten (28°C) ráztattuk.

A 120 órás ráztatás után a mintákból gravimetriás méréssel, extraháló szerek (3x50 ml petroléter és 1x50 ml kloroform) segítségével a megmaradt olajat rázótölcsérben leválasztottuk. A rázótölcsérből a fázisok szétválása után a vizes fázist leengedtük, majd az olaj-oldószer keveréket

Düren 619 G ¼ szűrőpapíron szűrtük át, melyre előzőleg Na₂SO₄-et helyeztünk az esetlegesen megmaradt víz megkötésének céljából. Az átszűrt oldószeres olajat ismert tömegű gömblombikba öntöttük, majd az oldószereket és a szénhidrogéneket Heidolph típusú bepárlókészülékkel forráspont különbség alapján szétválasztottuk. A lombik tartalmát 50-60°C-os vízfürdőn desztilláltuk, így a maradék oldószert is eltávolítottuk.

Mérés előtt a maradék szénhidrogént 60°C-on, Memmert típusú szárítószekrényben súlyállandóságig szárítottuk. Kontrollként gázolaj-kőolaj keveréket szintén tartalmazó, rázatott, de baktériumtenyésztéssel be nem oltott tápoldatot használtunk. A maradék olaj tömegét a kontrollban visszamaradt mennyiséghez viszonyítva megkaptuk a %-ban kifejezett szénhidrogén bontási eredményt.

3.7. Szénhidrogén bontásért felelős génszakaszok molekuláris genetikai vizsgálata

A környezeti eredetű *Acinetobacter* törzsek szénhidrogén bontási képességét molekuláris genetikai módszerekkel is vizsgáltuk. Egy, alifás szénhidrogéneket bontó enzimet, az alkán-1-monooxygenáz kódoló génszakasz jelenlétét kutattuk a bakteriális genomban, melyhez PCR reakciót végeztünk. A reakció során felhasznált – az *Acinetobacter* nemzetségre nézve specifikus – AcalK forward és reverse primerpár szekvenciáit a 2. sz. táblázatban ismertetjük.

2. sz. táblázat: Az alkán-1-monooxygenáz enzimet kódoló génszakasz vizsgálata során a PCR reakcióhoz felhasznált primerek szekvenciái

Primer jelölése	Amplifikáló primerek szekvenciája
AcalK-M-F	5'-CATCA(C/T)AAGCGTGC(A/C)GC-3'
AcalK-M-R	5'-TTCCAGCTATGCTCTGGCAT-3'

A vizsgálatokhoz első lépésben DNS-t izoláltunk az *Acinetobacter* törzsekből a MOBIO Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit segítségével, a gyártó ajánlásainak megfelelően, melyet agaróz gélelektroforézissel ellenőriztünk (lásd 3.4.2.3. alfejezet).

A keresett génszakasz kimutatásának érdekében PCR reakciót futattunk az alábbi alkotók felhasználásával (egy reakcióelegyre számolva, 50 µl végtérfogat mellett): 5 µl Taq-Buffer, 10 µl (1mM) dNTP, 0,25 µl (2,5 U) Taq-polimeráz, 0,5 µl (1µM) forward primer, 0,5 µl (1µM) reverse primer, 1 µl DNS templát, 32,75 µl MQ-víz.

A PCR reakció az automata Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf, Németország) készülékben zajlott a következő hőprofil alapján: 95°C 3' 32x (94°C 30'' 54°C 30'' 72°C 30'') 72°C 10' 4°C ∞.

A folyamat végén a készülék 4°C -ra hűti a PCR terméket, amelyet ismételt agaróz gélelektroforézissel (lásd 3.4.2.3. alfejezet) ellenőriztünk.

4. EREDMÉNYEK

Eredményeinket három részre osztva mutatjuk be:

- az *Acinetobacter* nemzetségbe tartozó fajok környezeti mintákból történő izolálásának és identifikálásának laboratóriumi optimalizálása és eredményei szelektív és általános táptalajok használatával, valamint molekuláris genetikai módszerekkel.
- antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredménye fenotípusos vizsgálati módszer (E-teszt) alapján.
- szénhidrogén-bontási képesség vizsgálatának eredményei (gravimetriás mérés és molekuláris genetikai vizsgálatok alapján).

4.1. Az *Acinetobacter* fajok növekedésének vizsgálata általános és szelektív táptalajokon

Az *Acinetobacter* nemzetség laboratóriumi izolálására és fenntartására alkalmas tápközegek tesztelése során a 3.2. alfejezetben felsorolt általános és szelektív táptalajokon (TGE-5, nutrient, MacConkey, cetrimid, Leeds *Acinetobacter* Medium) való tenyésztés eredményeként képet kaptunk a nemzetség fajainak telepmorfológiájáról. A vizsgálatba vont *Acinetobacter* fajok képviselői a tanszéki környezeti eredetű gyűjtemény keretében rendelkezésünkre álló izolátumok voltak. A származásukra és identifikálásukra vonatkozó eredményeket foglalja össze a 3. sz. táblázat.

3. sz. táblázat: Az általános és szelektív táptalajok teszteléséhez rendelkezésünkre álló környezeti *Acinetobacter* törzsek származására és 16S rDNS alapú identifikációjára vonatkozó adatok

Faj	Törzs jelölés	Mintavétel helye	Mintázott közeg	Mintavétel	Identifikáció megbízhatósága (%)
<i>A. calcoaceticus</i>	TN6	TIFO/ Tiszaújváros	talajvíz	2008.11.19	>97%
<i>A. venetianus</i>	T3N6	TIFO/ Tiszaújváros	talajvíz	2009.03.04	>97%
<i>A. venetianus</i>	T3N9	TIFO/ Tiszaújváros	talajvíz	2009.03.04	>97%
<i>A. beijerinckii</i>	Z4N3	ZAFI/ Zalaegerszeg	talajvíz	2009.05.28	>97%
<i>A. johnsonii</i>	Z4SZ2	ZAFI/ Zalaegerszeg	talajvíz	2009.05.28	>97%
<i>A. calcoaceticus</i>	PT2/2	Pétfürdő	földtani közeg	2010.04.30.	99%
<i>A. calcoaceticus</i>	PT3/6	Pétfürdő	földtani közeg	2010.04.30.	98%
<i>A. calcoaceticus</i>	PT3/9	Pétfürdő	földtani közeg	2010.05.03.	99%

A vizsgált környezeti *Acinetobacter* törzsek különböző táptalajokon történő tenyésztés eredményeként tapasztalt morfológiai sajátosságai alapján megállapítható, hogy a környezeti mintákban általánosan detektálható Gram-pozitív és Gram-negatív fajok telepmorfológiájával összevetve az univerzális táptalajokon *Acinetobacter* fajokra jellemző típusos bélyeg nem, vagy nehezen különíthető el. Hasonló eredményre jutottunk a MacConkey agar kapcsán. A rendelkezésre álló szelektív/differenciáló táptalajok közül így eredményeink szerint **leghatékonyabban a LAM teszi lehetővé az *Acinetobacter* spp. Gram-pozitív fajtól való megbízható elkülönítését.**

Önmagában azonban a LAM sem alkalmas a Gram-negatív *Pseudomonas*-októl való elhatárolásra, mivel a táptalajon a két nemzetség hasonló telepmorfológiát mutat.

Ezt támasztották alá azok a molekuláris genetikai vizsgálatok is, melyeket a környezeti minták feldolgozása során elődúsítás nélkül, LAM lemezöntéssel izolált, mályvaszínű, diffúz pigmentációval jellemezhető telepek azonosítására hajtottunk végre: a 4. sz. táblázatban összefoglalt eredményeink alapján az elődúsítás nélkül leválasztott 8 különböző környezeti törzs elsősorban a *Pseudomonas*, és nem a megcélzott *Acinetobacter* nemzetség képviselőjének bizonyult.

4. sz. táblázat: Az elődúsítás nélkül végrehajtott izolálási kísérlet során azonosított környezeti törzsek származására és 16S rDNS alapú identifikációjára vonatkozó adatok

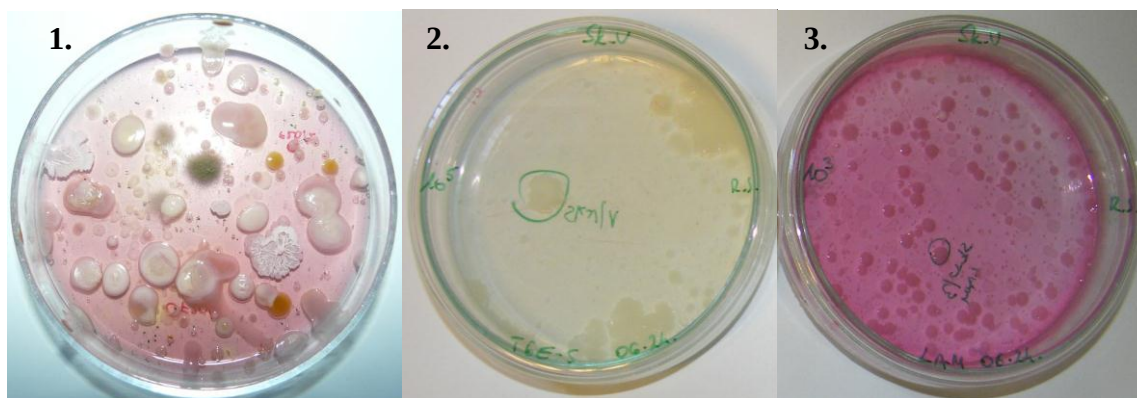
Izolátum jele	Mintavétel helye	Mintavétel ideje	Identifikáció eredménye	Identifikáció megbízhatósága
F-4/1	Szigetszentmiklós	2011.02.03	<i>Rahnella aquatilis</i>	99%
ST-2/1	Sikós	2011.02.08	<i>Pseudomonas veronii</i>	99%
ST-2/2	Sikós	2011.02.08	<i>Pseudomonas veronii</i>	99%
ST-2/3	Sikós	2011.02.08	<i>Pseudomonas veronii</i>	99%
Sk-V/1	Sikós	2011.02.08	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
M-14/2	Miskolc	2011.03.08	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%
ST-2/1.2	Sikós	2011.03.29	<i>Pseudomonas veronii</i>	100%
Sk-V/1.2	Sikós	2011.03.29	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100%

4.2. *Acinetobacter* fajok izolálásának és identifikálásának eredményei

4.2.1. *Acinetobacter* izolálás elődúsítást követően, szelektív LAM táptalajjal

Mivel a környezeti minta LAM-mal történő lemezöntése után igen diverz lemezeket tapasztaltunk, melyekről származó típusos, mályva színű telepek azonosítása után többségében *Pseudomonas*, de egy esetben sem *Acinetobacter* fajokat mutattunk ki, munkánk következő szakaszában az *Acinetobacter* fajok hatékony környezeti kimutatására egy olyan módszeregyüttest fejlesztettünk ki, melyben a lemezöntések előtt az *Acinetobacter* dúsító tápoldatot (BAUMANN, 1968) alkalmaztuk. Ennek következtében felszaporodtak a keresett nemzetség képviselői, majd a lemezöntés után, a mályvaszínű típusos telepekkel további vizsgálatokat végeztünk. Előző tapasztalataink alapján két nemzetség között kellett differenciálnunk alapvetően, így választásunk az oxidáz és kataláz tesztre esett, mivel a *Pseudomonas* és az *Acinetobacter* nemzetség tagjai így pontosabban azonosíthatóak (*Pseudomonas*: oxidáz pozitív, kataláz pozitív, *Acinetobacter*: oxidáz negatív, kataláz pozitív).

A szakirodalomban fellelhető különböző módszerek kombinálásával és plusz biokémiai reakciók ellenőrzésének beiktatásával létrehoztunk egy többlépcsős rendszert, melyet sikerrel alkalmaztunk. Összefoglalva tehát: első lépésében elődúsítást alkalmaztunk, majd Leeds *Acinetobacter* Medium táptalajjal lemezeket öntöttünk, végül pedig a típusos telepekkel oxidáz- és kataláz tesztet végeztünk.



7. sz. ábra: (1.) A szigetszentmiklósi környezeti mintából készített lemezöntés LAM táptalaj felhasználásával, elődúsítás nélkül (2011.02.05., saját felvétel).
(2-3.) Az SK-V (Siklós) környezeti mintából készített lemezöntés TGE-5 (2.) és LAM (3.) táptalaj felhasználásával, elődúsítást követően (2011.06.24., saját felvétel)

Az elődúsítás hatékonyságát igazolta, hogy míg nélküle a környezeti minták hígításaiból készített LAM lemezöntés esetében nagy számban jelentek meg egyéb Gram-negatív és Gram-pozitív fajok képviselői [lásd 7. ábra (1.), illetve 4. sz. táblázat], addig az elődúsítás alkalmazásakor mind a szelektív/differenciáló LAM közeg, mind az általános (TGE-5) táptalaj homogén, típusos *Acinetobacter* telepek megjelenését mutatta [lásd 8. ábra (2., 3.)]. Eredményeink alapján tehát a dúsítási folyamat hatékonyan felszaporította a nemzetségre jellemző, típusos teleppel rendelkező *Acinetobacter*-jelölteket, ugyanakkor visszaszorította a társult mikrobiótát.

A TGE-5 és LAM lemezekről így saját tapasztalataink alapján – elődúsítást követően – **a szakirodalomban szereplő módszerek különálló alkalmazásához képest lényegesen nagyobb biztonsággal tudtuk elkülöníteni a típusos telepeket.**

Kísérleteink során az optimalizált izolálási eljárás segítségével a 3. sz. táblázatban ismertetett, már rendelkezésünkre álló *Acinetobacter* izolátumok körének bővítése volt elsődleges célunk. Ennek érdekében a 3.1. alfejezetben ismertetett módon 16 kárhely 239 talajvízmintáját dolgoztunk fel. A minták többsége magas TPH (C_{5-40}) koncentrációval volt jellemezhető, mely számos esetben bizonyítottan meghaladta a 6/2009. együttes rendeletben meghatározott B szennyezettségi határértéket (100 $\mu\text{g/l}$). Fizikokémiai paramétereikre jellemző, hogy hőmérsékletük átlagban 10-15 °C körüli értéket mutatott, pH tartományuk 6,0-9,0 közötti értékkel volt jellemezhető, oxidáltsági állapotuk mérése során pedig igen változatos értékeket figyelhattunk meg (3,1-79,3%), azaz anaerob és aerob viszonyok egyaránt előfordultak.

Munkánk során az említett tulajdonságokkal jellemezhető minták feldolgozásával 16 új *Acinetobacter* jelöltet azonosítottunk a hagyományos mikrobiológiai és molekuláris genetikai alapokon nyugvó identifikáció végrehajtásához.

4.2.2. *Acinetobacter* törzs jelöltek identifikációjára vonatkozó eredmények

Az *Acinetobacter*-izolálást követően a molekuláris genetikai vizsgálatba vont törzsek körét a tisztító szélesztések után az oxidáz-, kataláz-tesztel és Gram-próbával tovább szűkítettük. A molekuláris genetikai vizsgálatokat az esetleges törzsegyezések elkerülése érdekében különböző mintákból származó izolátumokkal végeztük el.

A molekuláris genetikai kísérletek, azaz a 16S rDNS teljes szekvencia analízis eredményei alapján az oxidáz, kataláz és Gram-próbán átesett törzsek 100%-a bizonyult az *Acinetobacter* nemzetség képviselőjének, azaz **minden olyan törzset, amelyet a többlépcsős kísérletben a molekuláris genetikai vizsgálatokig juttattunk, az *Acinetobacter* nemzetség tagjaként sikerült azonosítanunk.**

A nemzetség tagjaként identifikált 16 izolátum 5 mintavételi helyszín 13 mintavételi pontján létesített monitoring kútjának talajvíz mintájából, 9 különböző mintavételi időpontból származott. A törzsek eredetére és identifikációjára vonatkozó részletes eredményeket az 5. sz. táblázat foglalja össze.

5. sz. táblázat: A munkánk keretében izolált *Acinetobacter* törzsek származására és 16S rDNS alapú identifikációjára vonatkozó adatok

	Faj	Törzs jelölés	Mintavétel helye	Mintázott közeg	Mintavétel időpontja	Identifikáció megbízhatósága
1.	<i>A. baumannii</i>	Sk-V/3	Siklós	talajvíz	2011.06.21	99,62%
2.	<i>A. calcoaceticus</i>	1/2	Vác	talajvíz	2011.06.23	99, 62%
3.	<i>A. calcoaceticus</i>	5/06/4	Vác	talajvíz	2011.06.23	99,55%
4.	<i>A. calcoaceticus</i>	PM5	Polgár	talajvíz	2011.07.05	99,92%
5.	<i>A. calcoaceticus</i>	PM7	Polgár	talajvíz	2011.07.05	99,77%
6.	<i>A. calcoaceticus</i>	PM13	Polgár	talajvíz	2011.07.05	99,62%
7.	<i>A. calcoaceticus</i>	PM7/3	Polgár	talajvíz	2011.08.09	99,93%
8.	<i>A. calcoaceticus</i>	PM15/3	Polgár	talajvíz	2011.08.09	99,85%
9.	<i>A. calcoaceticus</i>	DM-5/1	Dunavarsány	talajvíz	2011.09.20	99,71%
10.	<i>A. pittii</i>	BUT-8/1	Bugyi	talajvíz	2011.10.04	99,72%
11.	<i>A. johnsonii</i>	ST-2	Siklós	talajvíz	2012.02.20	99,83%
12.	<i>A. calcoaceticus</i>	Sk-V	Siklós	talajvíz	2012.05.29	99,83%
13.	<i>A. calcoaceticus</i>	5/06	Vác	talajvíz	2012.06.12	99,67%
14.	<i>A. calcoaceticus</i>	22	Vác	talajvíz	2012.06.12	99,83%
15.	<i>A. calcoaceticus</i>	24	Vác	talajvíz	2012.06.12	99,85%
16.	<i>A. calcoaceticus</i>	42	Vác	talajvíz	2012.06.12	99,67%

Munkánk során többségében *A. calcoaceticus* törzseket azonosítottunk, de a molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei alapján egy esetben környezeti eredetű *A. baumannii* törzzsel bővült a törzsgyűjteményünk. Az *A. baumannii*, mint probléma-baktérium a klinikai gyakorlatban ismert és egyre nagyobb kihívást jelentő mikroszervezet (GIAMARELLOU ET AL., 2008). Környezeti detektálása megerősíti, hogy a faj szakirodalomban jelzett módon (MISHRA ET AL., 2004) nem csupán klinikai környezetben izolálható, hanem eredményeink alapján egy hazai, szénhidrogénnel

szennyezett kárhelyen is kimutatható. Az *A. calcoaceticus* környezetegészségügyi jelentőségére vonatkozó információk nem ennyire egyértelműek: egyes források (PÁSZTI ET AL., 2011) nem tekintik a fajt klinikailag jelentősnek, más információk (HTTP9; BERGOGNE - BÉRÉZIN, 1995) szerint azonban az *A. calcoaceticus* opportunista kórokozó, mely igazoltan felelős lehet kórházi járványok kialakulásáért. A jelenleg aktuális taxonómiai besorolás alapján az *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* komplex tagjai egymástól nehezen elkülöníthetőek (GIAMARELLOU ET AL., 2008; PÁSZTI ET AL., 2011), így célszerű a két faj közegészségügyi jelentőségét is hasonlóan kezelni.

Összességében vizsgálataink során a 2011. február és 2012. július közötti időszakban 16, *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajt (lásd 5. sz. táblázat) sikerült identifikálnunk és velük további kísérleteket végeznünk. 8 olyan izolátum állt továbbá rendelkezésünkre, melyeket nem célzott vizsgálatok keretében azonosítottak a Tanszéken folyó kutatómunka során (2008-2010 között, lásd 3. sz. táblázat). Ezzel **megteremtettük egy olyan, egyre bővülő környezeti eredetű *Acinetobacter* gyűjtemény alapjait, mely a továbbiakban lehetővé teszi a nemzetségre vonatkozó alapinformációk gyűjtését**, és a nemzetség környezeti jelentőségének részletes feltárását. A továbbiakban az e 24 törzs esetében végrehajtott vizsgálatok eredményeit mutatom be.

4.3. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei

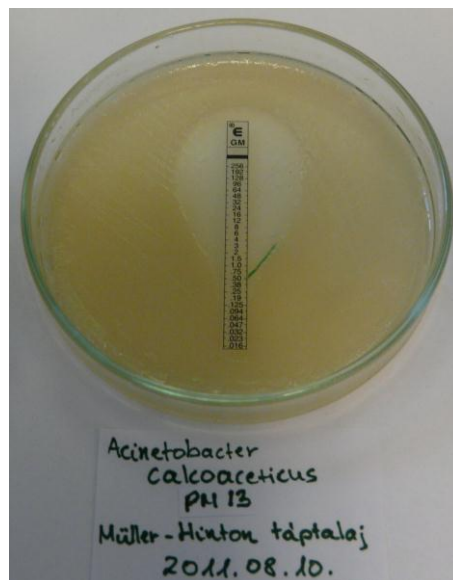
A 3.5. alfejezetben ismertetett módon végrehajtott antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményeinek értékeléséhez a nemzetközileg elfogadott, CLSI által hitelesített kategóriákat [S (sensitive) – érzékeny, I (intermediate) – átmeneti, R (resistant) – rezisztens] vettük figyelembe (CLSI, 2007). A rifampicin hatóanyaggal szembeni érzékenységi kategóriáit a CLSI szabvány Gram-negatív mikroszervezetekre nem szabályozza, így e készítmény esetében Henwood et al. (2002.) értékelési rendszerét vettük figyelembe. Az alkalmazott antibiotikumokra vonatkozóan a rezisztencia eredmények értékelésére szolgáló kategóriákat a 2. sz. melléklet foglalja össze.

A szénhidrogénnel szennyezett területekről származó *Acinetobacter* törzsek antibiotikum rezisztenciájára vonatkozó részletes eredményeket és a Minimális Gátló Koncentrációkat a 4. sz. melléklet mutatja.

A 24 izolátum vizsgálata során alkalmazott 12 féle antibiotikum készítmény eredményeink alapján igen eltérő hatékonyságot mutatott.

4.3.1. Az Aminoglikozid antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei

Az Aminoglikozidok közül a gentamicinnel szembeni érzékenységet vizsgáltuk. A 24 környezeti izolátum esetében sehol nem tapasztaltunk rezisztenciát a készítménnyel szemben. Az E-tesztek vizsgálata során minden esetben 4 µg alatt volt a leolvasható érték a koncentráció gradiens mentén (8. sz. ábra). A szakirodalomban leírtak alapján a környezeti törzsek több, mint 90%-a érzékeny az Aminoglikozidokkal szemben (FÜRST, 2004), melyet eddigi vizsgálataink igazoltak. A klinikai gyakorlatban az Aminoglikozidokkal szemben azonban nagyobb mértékben tapasztalnak rezisztenciát a klinikai eredetű *Acinetobacter* fajok körében, mint más Gram-negatív patogén fajok esetében (TOWNER, 2009). A klinikai törzseknél a legtöbb esetben a plazmidokon kódolt rezisztencia gének [acetil-transzferáz: AacC1/2, AadA, AadB; nukleotidil-transzferáz: Ant1; foszfo-transzferáz: AphA1, AphA6; metil-transzferáz: ArmA, RmtA, B, C, D (GORDON - WAREHAM, 2010)] tehetőek felelőssé az Aminoglikozidokkal szembeni ellenállásért, melyek az antibiotikumokat inaktiváló enzimek termeléséért felelősek (FÜRST, 2004). Az Aminoglikozid rezisztencia gének egy része valószínűleg együtt járhat a bla_{OXA-23} karbapenemáz jelenlétével, ami jelenleg a leggyakrabban leírt, szerzett karbapenemáz az *A. baumannii*-ban (PÁSZTI ET AL., 2011).



8. sz. ábra: A PM 13-as törzs gentamicin érzékenysége (saját felvétel)

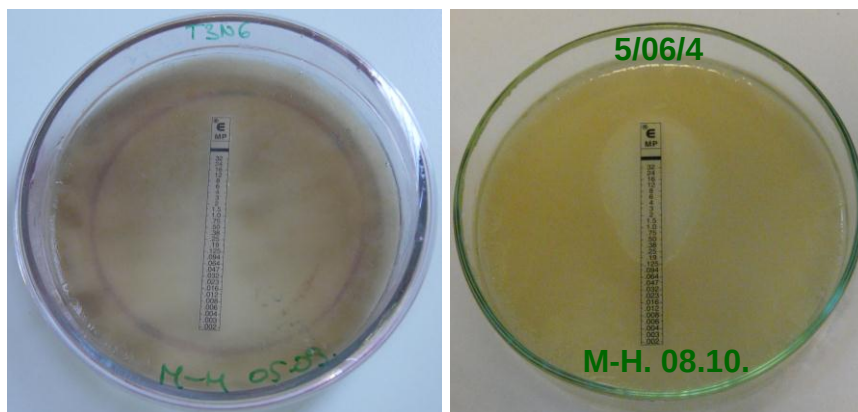
Az általunk vizsgált környezeti izolátumok valószínűleg nem rendelkeznek olyan mobilis genetikai elemmel (plazmid) melyen az Aminoglikozid rezisztenciáért felelős gének kódoltak, így jelen vizsgálataink alapján fennáll a szakirodalomban leírtaknak megfelelően a 90% feletti érzékenység a környezeti törzsek esetében.

4.3.2. A Béta-laktám antibiotikumok vizsgálatának eredményei

A Béta-laktám antibiotikumok közül a piperacillin vizsgálatakor igen eltérő eredményeket tapasztaltunk. A vizsgált 24 törzs közül 2 esetben tapasztaltunk rezisztenciát és további 17 törzs esetében átmeneti kategóriát állapítottunk meg. Így a vizsgált törzseknek csak 20,83 %-a volt érzékeny a hatóanyaggal szemben.

Nagy valószínűséggel a vizsgált törzsek jelentős hányada képes a penicillináz (laktamáz típusú) enzim termelésére, mely hasítja a laktám gyűrűt, és ezzel a Penicillinekkal szembeni rezisztenciához vezet (LUDWIG, 1999). Ennek igazolására azonban további vizsgálatok szükségesek.

A Karbapenemek közül az imipenem és a meropenem esetében egyetlen törzset (T3N6 – *A. venetianus*) kivéve minden vizsgált izolátum érzékenynek bizonyult (9. sz. ábra).



9. sz. ábra: A T3N6 (*A. venetianus*) meropenemmel szemben rezisztens és az 5/06/4 (*A. calcoaceticus*) érzékeny törzs (saját felvétel)

Az imipenem a klinikai gyakorlatban az elsődlegesen választandó szer az *Acinetobacter* fertőzések során (FÜRST, 2004), így különösen nagy jelentőséggel bír a hatóanyaggal szemben mutatott rezisztencia. Az utóbbi időben az *Acinetobacter* fertőzések kezelésében jelentős mennyiségű Karbapenem készítményt – főleg imipenemet és a meropenemet – alkalmaztak, melyek sok törzzsel szemben még mindig hatékonyak. Ennek ellenére világszerte emelkedik a Karbapenem rezisztens *A. baumannii* izolátumok száma (előfordul olyan centrum, ahol 90% felett; Angliában 15% körül, de a dél-európai országokban ennél is magasabb lehet arányuk) (TOWNER, 2009).

Az általunk végzett kísérletek során egy környezeti eredetű *A. baumannii* izolátum került bevonásra a vizsgálatokba. A klinikai gyakorlatban tapasztaltakkal szemben érzékenynek bizonyult mindkét Karbapenem antibiotikummal szemben.

A harmadik generációs Cefalosporinok esetében, a cefotaxim és a ceftriaxon vizsgálatokkor több esetben is átmeneti érzékenységi kategóriát állapítottunk meg. A 24 vizsgált izolátum közül 17 bizonyult átmeneti kategóriába tartozónak a cefotaxim, és szintén 17 törzs a ceftriaxon esetében. A harmadik antibiotikum készítmény a csoportból hatásosabbnak bizonyult: a ceftazidimmel szemben egyszer detektáltunk átmeneti kategóriába sorolandó izolátumot. Munkánk során egy *Acinetobacter* törzset (T3N6 – *A. venetianus*) találtunk, ahol mindhárom hatóanyaggal szemben rezisztencia volt kimutatható. A negyedik generációs Cefalosporinok közé tartozó cefepimmel szemben 5 törzsnél tapasztaltunk átmeneti érzékenységet, valamint a harmadik generációs készítményeknek ellenálló törzs (T3N6 – *A. venetianus*) itt is rezisztenciát mutatott.

A szakirodalom alapján Béta-laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciáért felelős lehet a béta-laktamáz enzimek termelődése, a kötőfehérje megváltozása és a sejtfal permeabilitásának módosulása, valamint az efflux pumpa aktivitásának növekedése (LUDWIG, 1999, HUGO - RUSSEL, 1998). A rezisztens, illetve átmeneti kategóriába sorolt *Acinetobacter* törzseknél

jelen lehet a fent említett lehetőségek valamelyike, melynek igazolása azonban további vizsgálatokat igényel.

4.3.3. A Fluorokinolon antibiotikumok vizsgálatának eredményei

A Fluorokinolon antibiotikumok csoportjába tartozó, második generációs szerek, a ciprofloxacin és az ofloxacin, vizsgálataink során kivétel nélkül minden esetben 100%-os hatékonyságot mutattak. Egyetlen törzs sem kapott rezisztens vagy átmeneti kategóriájú besorolást, így eredményeink alapján a széles spektrumú Fluorokinolonok hatásosnak tekinthetők a vizsgált környezeti eredetű *Acinetobacter* törzsekkel szemben.

4.3.4. A Glicilciklin antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei

A hatóanyagcsoporton belül a tigecycline készítménnyel szembeni rezisztenciát vizsgáltuk, mivel e készítmény a colistin és a sulbactam hatóanyagokkal együtt a terápiás kezelések során megfelelő hatékonyságot mutat a Karbapenem, Aminoglikozid és Fluorokinolon hatóanyagcsoportokkal szemben rezisztens kórokozókkal szemben is (GIAMARELLOU ET AL., 2008). A szer minden izolátum esetében hatásosnak bizonyult, a vizsgált törzsek között az érzékenység 100% volt.

A szerrel szemben rezisztencia kromoszómálisan kódolt gén által irányított efflux pumpa-túlműködés révén alakulhat ki (TOWNER, 2009). Azonban a vizsgált környezeti törzsek esetében sehol nem tapasztaltunk ellenállást, így valószínűsíthető, hogy vagy nincs meg a szükséges genetikai háttér, vagy nem fejeződik ki az adott tulajdonságot kódoló gén. Az *Acinetobacter* nemzetség esetében a tigecyclinnel szembeni rezisztenciáért is felelős lehet az *adeABC* multirezisztenciát kódoló gén, melyet azonban eddig környezeti eredetű törzsekkel nem hozták összefüggésbe, csak klinikai eredetű izolátumokban detektálták (COYNE ET AL., 2011). Munkánk jelen szakaszában a hasonló genetikai elemeket azonban még nem vizsgáltuk és eddigi fenotípusos eredményeink alapján a környezeti törzsek vonatkozásában feltehetően nem bírnak jelentőséggel.

4.3.5. A Rifamycin antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei

A rifampicin elsősorban nem Gram-negatív baktériumok ellen alkalmazott hatóanyag, azonban bizonyos kutatások szerint (HOGG ET AL., 1998) a colistinnel szinergista hatását kihasználva a klinikai eredetű multirezisztens *A. baumannii* izolátumokkal szembeni terápia eszköze lehet. Vizsgálataink során rezisztenciát egy környezeti törzsnél tapasztaltunk, és a 24 vizsgált izolátum közül 20 esetben állapítottunk meg átmeneti kategóriába eső, azaz a rezisztencia fokozódását jelző ellenálló képességet.

4.3.6. Multirezisztenciára utaló eredmények

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményeit áttekintve munkánk során **egy olyan törzset találtunk, amely legalább két különböző hatóanyagcsoporttal szemben mutatott rezisztenciát**, és így megfelelt a multirezisztencia definíciójának. A T3N6 jelzésű *A. venetianus* törzs a vizsgált 12 készítményből hattal szemben volt rezisztens, és egy hatóanyaggal szemben kapott átmeneti besorolást. A Karbapenemek közül mind a klinikai terápiában elsődlegesen választandó imipenem, mind a meropenem hatástalannak bizonyult esetében, valamint a harmadik, és negyedik generációs Cefalosporinok, így az alternatív terápia eszközeül szolgáló ceftazidim sem gátolták növekedését. Ezen felül a széles spektrumú Penicillinek csoportjába tartozó piperacillinnel szemben is átmeneti besorolást kapott. A klinikai gyakorlatban használt készítmények közül vizsgálataink során csak a gentamicin gátolta a T3N6 jelzésű törzset.

Figyelmeztető jelnek számít, hogy bár multirezisztenciát a vizsgált izolátumok között máshol nem tapasztaltunk, azonban több alkalommal figyeltünk meg két hatóanyagcsoporttal szemben is átmeneti érzékenységi állapotot, mely a rezisztencia fokozódására utal. A törzsek többsége a harmadik generációs Cefalosporinokkal és a piperacillinnel szemben mutatott köztes rezisztenciát.

Munkánk eredményeként elmondható, hogy az általunk vizsgált törzsek 100%-ban érzékenyek voltak az Aminoglikozidok csoportjába tartozó gentamicin, a Fluorokinolonok közül a ciprofloxacin és az ofloxacin, valamint a Glicilciklinek közé tartozó tigecycline-nel szemben, így kísérleteink alapján a felsorolt antibiotikumok hatásosnak tekinthetők a környezeti eredetű *Acinetobacter* törzsekkel szemben.

4.4. A szénhidrogén bontás megállapítását célzó gravimetriás mérés vizsgálatainak eredményei

A szénhidrogénnel szennyezett területekről származó *Acinetobacter* törzsek szénhidrogén-bontási képességének gravimetriás méréssel megállapított eredményeit a 6. sz. táblázatban foglaltuk össze.

A törzsek bontási képessége széles skálán mozgott, azonos fajba tartozó törzseknél is tapasztaltunk igen nagy eltérést a visszamaradt olaj tömegében. Többségében azonban a vizsgált *Acinetobacter* törzsek - a szakirodalomban olvasottaknak megfelelően (LEAHY - COLWELL, 1990; MARÍN ET AL., 1995; KOMA ET AL., 2001; MISHRA ET AL., 2004) - jó szénhidrogén-bontási képességet mutattak (> 35%).

A gravimetriás vizsgálatok értékeléséhez szakirodalmi adatokat nem találtunk, ám a környezetvédelmi gyakorlat szempontjából elfogadhatónak a 35%, illetve az a feletti szénhidrogén bontási érték tekinthető. A szénhidrogén bontás értékelésére javasolható, általunk is alkalmazott

értékelési rendszer kategóriái a következők voltak: 70% felett kiváló; 70-50% jó; 50-35% közepes; 35-15% gyenge; 15% alatt igen gyenge. Ennek megfelelően a 24 vizsgált izolátumból 12 törzs mutatott 70% feletti, kiváló szénhidrogén bontási képességet, további 4 törzset soroltunk a jól bontó kategóriába. 4 törzs bontotta közepes mértékben a szénhidrogéneket, 2 törzs bizonyult gyenge és 2 törzs igen gyenge biodegradációs képességgel rendelkezőnek.

6. sz. táblázat: A szénhidrogén-bontó képesség számításának eredményei az *Acinetobacter* nemzetség vizsgált izolátumai esetében

Izolátumok adatai		Minták TPH* (mg/dm ³) szennyezett- sége	Gravimetriás mérés adatai
Törzs Jele	Faj		Szénhidrogén- bontási képesség a kontrollhoz viszonyítva
Sk-V	<i>A. calcoaceticus</i>	614	93,7%
22	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.	91%
42	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.	88,3%
DM-5/1	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.	87,4%
24	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.	87,4%
5/06	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.	85,6%
PT3/9	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.**	85,6%
1/2	<i>A. calcoaceticus</i>	9180	79%
PM 15/3	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.	76,8%
Sk -V/3	<i>A. baumannii</i>	<50	75,3%
TN6	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.	72%
PM7/3	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.	70,1%

Izolátumok adatai		Minták TPH* (mg/dm ³) szennyezett- sége	Gravimetriás mérés adatai
Törzs Jele	Faj		Szénhidrogén- bontási képesség a kontrollhoz viszonyítva
T3N9	<i>A. venetianus</i>	n.d.	64,1%
PM 7	<i>A. calcoaceticus</i>	216	60,8%
PM13	<i>A. calcoaceticus</i>	1390	57,3%
PT3/6	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.**	52%
BUT-8/1	<i>A. pittii</i>	n.d.	47,4%
PT2/2	<i>A. calcoaceticus</i>	n.d.**	47,1%
Z4N3	<i>A. beijerinckii</i>	n.d.	41,8%
T3N6	<i>A. venetianus</i>	n.d.	41,1%
5/06/4	<i>A. calcoaceticus</i>	<50	33%
Z4-SZ2	<i>A. johnsonii</i>	n.d.	25,9%
ST-2	<i>A. johnsonii</i>	n.d.	9%
PM 5	<i>A. calcoaceticus</i>	<50	8,1%

n.d. – nincs adat

* TPH – összes alifás szénhidrogén koncentráció

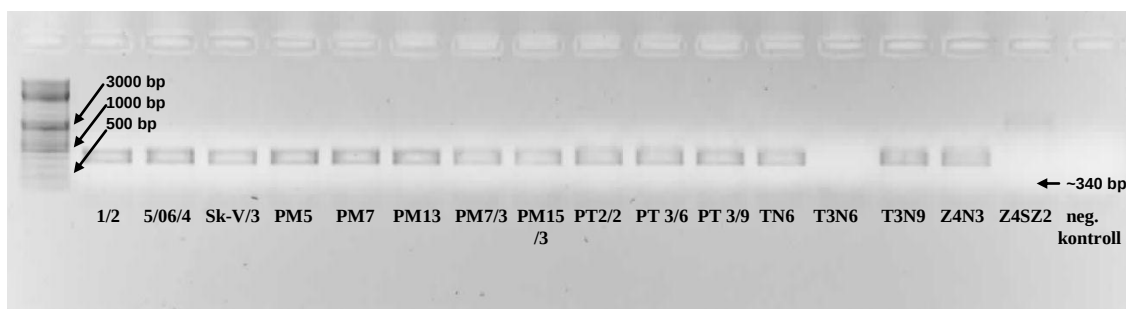
**PAH – policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett környezeti minták

A törzsek szénhidrogén-bontási képessége és a törzsek származási helye, illetve a vizsgált minta TPH tartalma közötti összefüggés tekintetében elmondható, hogy a hiányos adatsorok miatt a származási hely és a bontási képesség tekintetében nem állapíthattunk meg összefüggést. Azonban feltételezhetjük, hogy az adaptáció következtében, a szennyezettebb területekről származó izolátumok nagyobb mértékben bonthatják a szénhidrogéneket, melynek alátámasztásához azonban részletesebb adatok szükségesek.

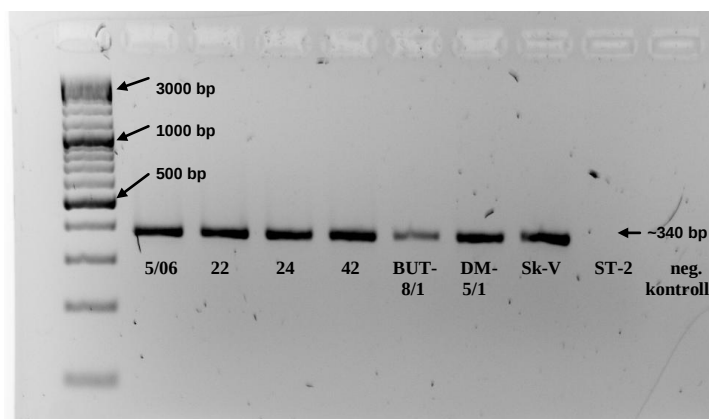
A szénhidrogénbontásra vonatkozó eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy az *Acinetobacter* nemzetség általunk vizsgált izolátumainak döntő többsége jó, vagy kiváló biodegradációs képességgel jellemezhető, mely alapján a hazai szénhidrogénnel szennyezett kárhelyek esetében is alátámasztható az a szakirodalmi vélemény, miszerint a nemzetség képviselői nem csupán megjelenhetnek, hanem anyagcserefolyamataik révén aktívan közreműködhetnek a szennyezett közeg biodegradációs folyamataiban.

4.5. A szénhidrogén bontás megállapítását célzó molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei

A nemzetség szénhidrogénbontását célzó molekuláris genetikai kísérletek során az alifás szénhidrogénekre vonatkozó bontási képességet meghatározó enzim termelődéséért felelős génszakaszok jelenlétét vizsgáltuk. A 24 környezeti eredetű izolátum közül 21 törzs esetében mutattuk ki a 340 bázispárból álló alkán-1-monooxygenáz enzimet kódoló génszakaszt, mely a 10-11. sz. ábrán a PCR termék hozzávetőleges méretének ellenőrzésére szolgáló standardhoz viszonyítva jól látható. A T3N6, a Z4SZ2 és az ST-2 törzs esetében negatív eredményt kaptunk, ami a gravimetriás mérések során tapasztaltakkal nem egyezik teljes mértékben. A Z4SZ2 és az ST-2 törzsek ugyan a gyengén bontó izolátumoknak bizonyultak (25,9%, ill. 9%), azonban a T3N6 izolátum 41,1%-os bontási képességet mutatott. Ezzel ellentétben a PM5 törzs – melynek esetében a vizsgált génszakasz jelenléte egyértelműen detektálható – a gravimetriás mérések során csupán 8,1%-os szénhidrogén bontási képességet jelzett (lásd 10-11. sz. ábra).



10. sz. ábra: Az alkán-1-monooxygenáz enzim termelését kódoló génszakaszok vizsgálatának eredménye a környezeti eredetű *Acinetobacter* izolátumok esetében I. (saját ábra)



11.sz. ábra: Az alkán-1-monooxygenáz enzim termelését kódoló génszakaszok vizsgálatának eredménye a környezeti eredetű *Acinetobacter* izolátumok esetében II. (saját ábra)

5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálati eredményeink alapján megállapítható, hogy az *Acinetobacter* nemzetség tagjai jelen lehetnek a kármentesítés alatt álló szénhidrogénnel szennyezett hazai területeken. Munkánk eddig lezárt szakasza alapján kijelenthető, hogy a vizsgált kárhelyek 31,25%-án, illetve a vizsgálatba vont minták 6,69%-ának esetében volt kimutatható az *Acinetobacter* nemzetség valamely fajának képviselője. Leginkább elterjedtnek az *A. calcoaceticus* bizonyult, mely a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) besorolása és az Európai Unió 2000/54/EK irányelv szerint – az *A. baumannii*-hoz hasonlóan – 'Risk Group 2' kockázati csoportba sorolandó, azaz „okozhat emberi megbetegedést és veszélyt jelenthet a munkavállalók számára; valószínűleg nem terjed el a közösségben; általában eredményesen megelőzhető és kezelhető” (HTTP15). A hasonló besorolású mikroszervezetek által kiváltott megbetegedés eredményes kezelését jellemző módon nehezítheti az antibiotikum rezisztencia kialakulása, melynek feltárására a környezeti törzsek esetében mi is kísérletet tettünk, így ismereteket szerezhettünk a nemzetség esetében a környezeti antibiotikum rezisztencia kiterjedtségéről. Ezek az információk alapját képezhetik minden olyan további kutatásnak, melyek az *Acinetobacter* nemzetség környezeti, környezetbiztonsági jelentőségének megállapítását célozzák.

Mivel a vizsgált nemzetség tagjai általánosan elterjedt mikroszervezetek, és a szénhidrogénnel szennyezett kárhelyeken eredményeink alapján az átlagosnál feltehetően nagyobb jelentőséggel bírhatnak, eredményeink tudatában környezetegészségügyi kockázataik a jövőben nagyobb figyelmet érdemelnek. Célunk a jövőben a folyamatos monitoring tevékenység alá eső kárhelyek esetében az *Acinetobacter* vizsgálati irány minél nagyobb számú kárhelyre, mintára történő kiterjesztése, törzsgyűjteményünk bővítése, és velük a meglévő, valamint új vizsgálati irányok végrehajtása. Azokon a kárhelyeken, ahol valamilyen okból (pl.: sikertelen PCR reakció) sikertelen volt az *Acinetobacter* nemzetség kimutatása, a vizsgálatok megismétlése és folytatása javasolt. Ennek megvalósításához végrehajtottunk egy olyan módszerfejlesztést, mely a szakirodalomban elérhető izolációs és identifikációs metodikánál lényegesen pontosabb és hatékonyabb kimutatást tesz lehetővé és sikeresen alkalmaztuk is környezeti mintáinkon.

Azonban a nemzetség konkrét környezetegészségügyi kockázatának megállapítására a jövőben pontosabb, sejtszám meghatározást is lehetővé tevő kimutatásra lenne szükség. Javasolt tehát egy olyan módszer kidolgozása, melynek eredményeképpen detektálni tudjuk az *Acinetobacter*-ek, elsősorban az *A. baumannii* konkrét sejtszámát a környezeti mintákból. E feladat megvalósítására elsősorban olyan, fenotípusos, vagy molekuláris genetikai alapon nyugvó módszer alkalmazása javasolható, mely megfelelő specifitással és érzékenységgel jellemezhető. Ezért javasolt a jövőben többek között LaCroix - Cabelli (1982) módszerét alapul véve a

membránszűrőses módszer adaptálása és alkalmazhatóságának vizsgálata, mely eredetileg az *A. calcoaceticus* környezeti kimutatására került kifejlesztésre. A metodika felhasználásánál célszerű figyelembe venni a vizsgálni tervezett közeg (talajvíz) szennyezettségének mértékét és annak esetleges hatását a vizsgálat sikerességére. Hasonlóan ígéretes lehet az ún. nested PCR⁵ módszer alkalmazása és fejlesztése környezeti mintákon, mely optimális esetben megfelelő érzékenységű lehet adott mikroszervezet kis sejtszámban (akár 10⁰ CFU/ml; g nagyságrendben) történő detektálására (ATZÉL, 2008).

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok során tapasztaltunk multirezisztenciát az *Acinetobacter* nemzetség képviselői között, valamint több esetben mutattunk ki a környezeti antibiotikum rezisztencia fokozódására utaló jeleket. Az antibiotikum rezisztencia genetikai hátterére vonatkozó vizsgálatokat nem végeztünk, ám a vonatkozó szakirodalmat áttekintettük és feldolgoztuk. Így a továbbiakban lehetőségünk nyílik a klinikumban ismert, *Acinetobacter* fajok által hordozott és leírt rezisztencia gének (MERKIER - CENTRÓN, 2006; COYNE ET AL., 2011; LIN ET AL., 2011; PÁSZTI ET AL., 2011) környezeti elterjedtségének felderítésére. Hasonló jelentőséggel bírhatnak egyes mobilis genetikai elemek (pl. plazmidok), melyek segítségével az átadható rezisztencia mechanizmusok környezeti terjedése is jelentős lehet. Ennek a lehetőségnek a feltárására a jövőben célszerű a rendelkezésünkre álló törzsek esetében plazmid izolálás végrehajtása, melyet munkánk jelen stádiumában a környezeti eredetű *Acinetobacter* izolátumok esetében még nem végeztünk.

Általános javaslatként a környezeti antibiotikum rezisztencia vonatkozásában megfogalmazható, hogy a környezeti törzsek közt eredményeink alapján kimutatható rezisztencia (pl. egyes esetekben a harmadik generációs Cefalosporinok, illetve a Karbapenemek ellen) tudatában fokozottabban kell figyelniük mind a klinikumban felhasznált és onnan különböző anyagáramok (pl. hulladékok, szennyvíz) révén kikerülő szerek mennyiségére és minőségére, mind a mezőgazdaságban használatos szerek alkalmazására.

A gravimetriás mérések alapján a szakirodalmi adatoknak megfelelően a vizsgált törzsek többségénél igen jó (50, illetve 70% feletti) biodegradációs képességet tapasztaltunk. A vizsgált izolátumok jelentős része laboratóriumi körülmények között jól szaporodott a gázolaj-kőolaj keveréket (mint egyetlen szénforrást) tartalmazó közegben, így a kimutatási gyakoriságra irányuló vizsgálatok eredményeivel kiegészítve megállapítható, hogy az *Acinetobacter* nemzetség környezetegészségügyi jelentősége szénhidrogénnel szennyezett kárhelyeken feltehetően nem elhanyagolható. A szénhidrogén-bontási tulajdonságok pontosabb ismeretének érdekében egy, az alifás szénhidrogének bontását meghatározó génszakasz jelenlétét vizsgáltuk genetikai

⁵ nested PCR: két sorozat (első lépésben univerzális, második lépésben fajspecifikus) primer alkalmazása két egymást követő PCR reakcióban.

módszerekkel, melynek eredményei azonban nem hozhatóak minden esetben egyértelmű összefüggésbe a gravimetriás módszerrel meghatározott szénhidrogénbontási képességgel (lásd: T3N6 törzs eredményei). Javasolt további, célzott genetikai vizsgálatok elvégzése a szénhidrogén biodegradációban közreműködő további funkciógének azonosítása érdekében, hiszen az olyan komplex szennyezőanyagok esetében, mint a szénhidrogének, feltehetően több biodegradációért felelős enzim egyidejű közreműködése szükséges a szennyeződések hatékony lebontásához.

A jövőre nézve fontos szempont, hogy a szénhidrogén-bontásra képes opportunisták mikroszervezetek minél kisebb számban jelenjenek meg a kármentesítés alatt álló területeken, hiszen mindamellett, hogy patogén besorolásukkal és tulajdonságaikkal kockázati tényezőként jelentenek a szennyezett kárhely közelében élők és az ott dolgozók egészségére nézve, antibiotikum rezisztenciájuk révén a kárhelyeken jelenlevő természetes mikrobapopuláció körében a rezisztencia mechanizmusok terjesztését segíthetik elő.

Az antibiotikum rezisztenciára vonatkozó eredményekkel összevetve megállapítható, hogy a kiváló szénhidrogén-bontó képesség és az antibiotikumokkal szemben mutatott érzékenység nem zárja ki egymást: így például a többszörösen rezisztens T3N6 jelzésű környezeti izolátum is jó szénhidrogén-degradáló aktivitással jellemezhető. Azonban az egyre jobban fokozódó és terjedő rezisztencia tudatában, az *Acinetobacter* nemzetség tagjainak célzott bioremediációs alkalmazása nem javasolt. Szükséges továbbá minden olyan intézkedés, óvintézkedés végrehajtása, mellyel az opportunisták kórokozók a szennyezett területen a közegészségügyi aggályokat nem keltő nagyságrendre szoríthatóak vissza.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikroszervezetek között széles körben elterjedt a szénhidrogén-bontási képesség, amit a környezetvédelmi gyakorlat a bioremediációs eljárások során gyakran alkalmaz. A legjelentősebb szénhidrogén-bontó mikroszervezetek között azonban előfordulnak opportunista kórokozók is, melyek jelenléte környezetegészségügyi aggályokat kelthet. Jelentőségüket fokozza az egyes nemzetségek körében mind gyakrabban tapasztalható antibiotikum rezisztencia kialakulása és terjedése, mely multirezisztenciához vezethet. Az utóbbi időben klinikai tényerésüknek köszönhetően az *Acinetobacter* nemzetség képviselőit egyre jelentősebb kórokozó csoportnak tekintik. A klinikai törzsek széleskörű kutatási adataival ellentétben azonban a nemzetség környezeti képviselőiről kevés adat áll rendelkezésünkre.

Munkánk során célunk volt egy szénhidrogénnel szennyezett területekről származó *Acinetobacter* törzsgyűjtemény létrehozása a környezeti kimutatás eszköztárának fejlesztése és adaptálása révén, majd az izolátumok antibiotikum rezisztencia profiljának, és szénhidrogén-bontó képességének meghatározása.

Vizsgálataink során 16 kárhelyről származó, 239, szénhidrogénnel szennyezett környezeti minta vizsgálata alapján, egy többlépcsős izolálási módszeregyüttes kialakításával és alkalmazásával sikeresen gyarapítottuk törzsgyűjteményünket, így összesen 24, környezeti eredetű *Acinetobacter* faj állt rendelkezésünkre a további vizsgálati irányok végrehajtásához. Kísérleteink eredményeképpen megállapítottuk, hogy a környezeti eredetű izolátumoknál is detektálható többszörös antibiotikum rezisztencia, valamint több esetben tapasztaltunk a rezisztencia fokozódására utaló jeleket. A szénhidrogén-bontási képesség meghatározása során a vizsgált izolátumok esetenként kiváló bontási képességet mutattak, valamint detektáltunk esetükben egy szénhidrogénbontó enzimeket kódoló génszakaszt is. Eredményeink tudatában megállapítottuk, hogy az *Acinetobacter* nemzetség képviselői – elsősorban az *A. calcoaceticus* – szénhidrogénnel szennyezett területeken megjelenhetnek, így a jövőben gyakoriságuk és jellemző tulajdonságaik nyomon követése figyelmet érdemel. A kiváló szénhidrogén bontó képesség ellenére a nemzetség tagjainak célzott bioremediációs eljárásokban való alkalmazása – elsősorban a patogén besorolás és az antibiotikum rezisztencia kialakulásának lehetősége miatt – veszélyeztetheti az emberi egészséget, így az nem javasolt. Célszerű minden olyan intézkedés végrehajtása, melynek segítségével a hasonló tulajdonságokkal jellemezhető patogén mikroszervezetek visszaszoríthatóak.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném kifejezni hálámat konzulenseimnek, Dr. Szoboszlai Sándornak és Dr. Kaszab Editnek, akik minden helyzetben biztattak, értékes tanácsaikkal irányt mutattak.

Köszönöm Dr. Kriszt Balázsnak, hogy lehetőséget kaptam a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszéken folyó munkában való részvételre, továbbá köszönettel tartozom a Tanszék minden munkatársának, hogy befogadtak, kollégának tekintettek és támogatták munkámat minden tekintetben.

Nem utolsó sorban szeretném megköszönni Szüleimnek, Családomnak és Barátaimnak, hogy munkám megvalósulása során nem hagyták, hogy lelkesedésem lankadjon, biztattak és támogattak az élet minden területén.

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

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. ACUNA-ASKAR, K., ENGLANDE, A.J., HU, C., JIN, G. (2000): Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) biodegradation in batch and continuous upflow fixed biofilm reactors. *Water Science and Technology*, 42(5-6): 153-161.
2. ARANCIBIA, F., BAUER, T.T., EWIG, S., MENSA, J., GONZALEZ, J., NIEDERMAN, M.S. & TORRES, A. (2002): Community-acquired pneumonia due to Gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: incidence, risk, and prognosis. *Archives of Internal Medicine*, 162(16): 1849–1858.
3. ATZÉL B. (2008): Bioaugmentációs eljárások biológiai monitoringja. PhD értekezés, Szent István Egyetem. Gödöllő
4. BACOSA, H., SUTO, K., INOUE, C. (2010): Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64: 702-710.
5. BARCS I. (2006): Az antibiotikum-érzékenység és -rezisztencia. A Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének kiadványa, Budapest, 20 p.
6. BARÓTFI I. (2000): Környezettechnika. Mezőgazda kiadó, Budapest, 981 p.
7. BAUMANN, P. (1968): Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *Journal of Bacteriology*, 96(1): 39-42.
8. BÉLÁDI I., KÉTYI I., NÁSZ I., VÁCZI L. (1978): Orvosi mikrobiológia – immunitástan – parazitológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 508 p.
9. BERGOGNE-BÉRÉZIN, E. (1995): The increasing significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp.: the need for control and new agents. *Journal of Hospital Infection*, 30: 441-452.
10. BOROSS L., SAJGÓ M. (1993): A biokémia alapjai. Mezőgazda kiadó, Budapest, 512 p.
11. BUCKLEY, M. (2004): The genomics of disease-causing organisms: mapping a strategy for discovery and defense. American Academy of Microbiology, Washington DC, USA. 26 p.
12. CASTANON, J.I.R., (2007): History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86: 2466-2471.
13. COMI, G., CANTON, C. (2011): Psychrotropic bacteria. *Arthrobacter* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 372-378.
14. COYNE, S., COURVALIN, P., PÉRICHON, B. (2011): Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3): 947–953.
15. DAS, K. AND MUKHERJEE, A. K. (2007): Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7): 1339-1345.
16. 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.
17. FÜRST ZS. (2004): Farmakológia. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1248 p.
18. GIAMARELLOU, H., ANTONIADOU, A., KANELAKOPOULOU, K. (2008): *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32: 106–119.
19. GORDON, N.C., WAREHAM, D.W. (2010) : Multidrug-resistant *A. baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35: 219–226.
20. HEDLUND, B.P., STALEY, J.T. (2001): *Vibrio cycloclitrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1): 61-66.
21. HENWOOD, C. J., GATWARD, T., WARNER, M., JAMES, D., STOCKDALE, M.W., SPENCE, R.P., TOWNER, K.J., LIVERMORE, D.M., WOODFORD, N. (2002): Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK, and in vitro evaluation of tygecycline (GAR-936). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 479-487.
22. HOGG, G.M., BARR, J.G., WEBB, C.H. (1998): In vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 494-495.
23. HORVÁTH J. (1964): Mikrobiológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 247.
24. HUGO, W.B., RUSSEL, A.D. (1998): *Pharmaceutical Microbiology*, Blackwell Science Ltd., Oxford, 510 p.
25. HUHULESCU, S., SIMON, M., LUBNOW, M., KAASE, M., WEWALKA, G., PIETZKA, A.T., STÖGER, A., RUPPITSCH, W., ALLERBERGER, F. (2011): Fatal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in a previously healthy woman was most likely associated with a contaminated hot tub. *Infection*, 39: 265-269.
26. IGRA-SIEGMAN, Y., CHMEL, H., COBBS, C. (1980): Clinical and Laboratory Characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(2): 141-145.
27. JAWAD, A., HAWKEY, P. M., HERITAGE, J., SNELLING, A.M. (1994): Description of eeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with herellea agar and Holton's agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(10): 2353-2358.
28. KALIN, M., WHEELER, W. N., MEINRATH, G. (2005): The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *Journal of Environmental Radioactivity*, 78: 151-177.
29. KASZAB E. (2010): A *Pseudomonas aeruginosa* környezetbiztonsági jelentősége antropogén hatás alatt álló közegekben. PhD értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő, 100 p.
30. KOMA, D., HASUMI, F., YAMAMOTO, E., OHTA, T., CHUNG, S., KUBO, M. (2001): Biodegradation of Long-Chain n-Paraffins from Waste Oil of Car Engine by *A cinetobacter* sp.. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1): 94-96.
31. KÜMMERER, K., AL-AHMAD, A., MERSCH-SUNDERMANN, V. (2000): Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and action of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, 40: 701-710.

32. KvVM - KÖRNYEZETVÉDELMI ÉS VÍZÜGYI MINISZTERIUM (2010): Kármentesítési kézikönyv 5. Bioremediáció: Mikrobiológiai kármentesítési eljárások. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Budapest, 85 p.
33. LACROIX, S.J., CABELLI, V.J. (1982): Membrane filter method for enumeration of *Acinetobacter calcoaceticus* from environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(1): 90-96.
34. LANE, D.J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. in *Nucleic Acid Techniques* In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds.): *Bacterial Systematics*. Wiley, New York, 115-175 p.
35. LEAHY, J.G., COLWELL, R.R. (1990): Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 54(3): 305-315.
36. LEE, S.Y., KIM, B.-N., HAN, J.-H., CHANG, S.-T., CHOI, Y.-W., KIM, Y.-H., MIN, J. (2010): Treatment of phenol-contaminated soil by *Corynebacterium glutamicum* and toxicity removal evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, 182: 937-940.
37. LIN, M.-F., CHANG, K.-C., LAN, C.-Y., CHOU, J., KUO, J.-W., CHANG, C.-K., LIOU, M.-L. (2011): Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Determinants of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Five Proximal Hospitals in Taiwan, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64: 222-227.
38. LOSONCZY GY. (2001): A klinikai epidemiológia alapjai, A nosocomialis fertőzések járványtana. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1027 p.
39. LUDWIG E. (1999): Amit érdemes tudni az antibiotikumokról. Hippocrates családorvosi és foglalkozás-egészségügyi folyóirat, 1(2): 116.
40. MARÍN, M., PEDREGOSA, A., RIOS, S., ORTIZ, M. L., LABORDA, F. (1995): Biodegradation of diesel and heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its possible applications on bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35(1-3): 269-285.
41. MCFARLAND, J. (1907): Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14: 1176-1178.
42. MERKIER, A. K., CENTRÓN, D. (2006): blaOXA-51-type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28: 110-113.
43. MISHRA, S., SARMA, P. M., LAL, B. (2004): Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosm. *FEMS Microbiology Letters*, 235: 323-331.
44. MOSER M., PÁLMAI GY. (1992): A környezetvédelem alapjai. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 494 p.
45. NÁSZ I. (1982): Mikrobiológia és immunitás, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 400 p.
46. NÉMETH T. (szerk.) (2001): Kármentesítési kézikönyv 4., Kármentesítési technológiák. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Budapest. <http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/kiadvanyok/karmkezikk4/index.htm>
47. NÉMETH T. (szerk.) (2003): Kármentesítési útmutató 6. Tényfeltárás és monitoring. A szennyezett területek tényfeltárása és a kármentesítési monitoring-rendszerek. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Budapest. <http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/kiadvanyok/karmutmutato6/index.htm>
48. OBAYORI, O.S., ADEBUSOYE, S.A., ADEWALE, A.O., OYETIBO, G.O., OLUYEMI, O.O., AMOKUN, R.A., ILORI, M.O. (2008): Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains. *Journal of Environmental Sciences*, 21: 243-248.
49. OKPOKWASILI, G.C., SOMERVILLE, C.C., SULLIVAN, M., GRIMES, D.J., COLWELL, R.R. (1986): Plasmid mediated degradation of hydrocarbons in estuarine bacteria. *Oil and Chemical Pollution*, 3(2): 117-129.
50. OPINION OF THE SCIENTIFIC PANEL ON GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS ON THE USE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES AS MARKER GENES IN GENETICALLY MODIFIED PLANTS (2004): EFSA (European Food Safety Authority) – The EFSA Journal, 48: 1-18.
51. OPINION OF THE SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE (1999): European Commission; Directorate-General XXIV. Consumer Policy and Consumer Health Protection Directorate B – Scientific Health Opinions Unit B3 – Management of scientific committees II; 28 May 1999; 121 p.
52. PÁSZTI J., JÁNVÁRI L., TÓTH Á. (2011): Multirezisztens *Acinetobacter baumannii* klinikai izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata. *Mikrobiológiai Közlevél*, 11(1): 3-12.
53. SEO, J.-S., KEUM, J.-S., CHO, I. K., LI, Q. X. (2006): Degradation of dibenzothiophene and carbazole by *Arthrobacter* sp. P1-1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58: 36-43.
54. SIMON T. (1991): Baktérium-, alga-, gomba- és mohahatározó, Tankönyvkiadó, Budapest, 793 p.
55. SZABÓ I. (2011): Szénhidrogénnel szennyezett területek mikroba populációjának jellemzése. PhD értekezés, Szent István Egyetem, 101 p.
56. SZABÓ I. M. (2008): Az általános talajtan biológiai alapjai, Mundus Magyar Egyetemi Kiadó, Budapest, 405 p.
57. SZALKA A. (2003): A korszerű antibiotikum-terápia. Az antibiotikum-választás szempontjai a klinikai gyakorlatban. *LAM (Lege Artis Medicinae)*, 13(4): 298-302.
58. SZEBERÉNYI J. (2004): Molekuláris sejtbiológia, Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 553 p.
59. SZOBOSZLAY S. (2003): Katonai tevékenységek során a talajba és talajvízbe kerülő szénhidrogén szennyezések kármentesítésének környezetbiztonsági következményei. PhD értekezés, Zrínyi Miklós Nemzetvédelmi Egyetem, 122 p.
60. SZOBOSZLAY S., KRISZT B. (2006): Környezeti Elemek Védelme II. Jegyzet, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 10-16 p.
61. SZOBOSZLAY S., KRISZT B. (2008a): Környezeti elemek védelme, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő. 107 p.

62. SZOBOSZLAY S., KRISZT B. (2008b): Környezethigiéna, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 60 p.
63. SZOBOSZLAY S., KRISZT B. (2010): Környezeti elemek védelme, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 130 p.
64. SZOBOSZLAY S., SOLYMOSI J., LAUER J., ATZÉL B., SZABÓ I., KRISZT B. (2002): Environmental safety and biodegradation of hydrocarbons. 4th International Scientific Conference „Foreign Substances in the Environment”, Nitra, Slovakia, Proceedings 200-204.
65. TOWNER, K. (2006): The Genus *Acinetobacter*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. (2006): Prokaryotes. Springer Science + Business Media, LLC, New York, USA, 1188 p.
66. TOWNER, K.J. (2009): *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. Journal of Hospital Infection, 73: 355-363.
67. US EPA (1995): Remediation case studies: bioremediation. In: Federal publications on alternative and innovative treatment technologies for corrective action and site remediation. Fourth Edition. US Environmental Protection Agency, Technology Innovation Office, Washington, 51 p.
68. WANG, X-B., CHI, C-Q., NIE, Y., TANG, Y-Q., TAN, Y., WU, G., WU, X-L. (2011): Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. Bioresource Technology, 102(17): 7755-7761.,
69. ZEINALI, M., VOSSOUGH, M., ARDESTANI, S. K. (2008): Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. Chemosphere, 72: 905–909.

Jogszabályok, szabványok

1995. évi LIII. Törvény a környezet védelmének általános szabályairól

219/2004. (VII.21.) Korm. rendelet a felszín alatti vizek védelméről

6/2009. (IV. 14.) KvVM–EüM–FVM együttes rendelet a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről

Az Európai Parlament és a Tanács 2000/54/EK irányelve (2000. szeptember 18.) a munkájuk során biológiai anyagokkal kapcsolatos kockázatoknak kitett munkavállalók védelméről (hetedik egyedi irányelv a 89/391/EGK irányelv 16. cikkének (1) bekezdése értelmében)

CLSI - Clinical And Laboratory Standards Institute (2006): Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seven Edition. M7-A7 26, (2) 1-64. p.

CLSI - Clinical And Laboratory Standards Institute (2007): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17 27:1, p. 182

MSZ 21464: 1998. Mintavétel felszín alatti vizekből.

Internetes hivatkozások

http1: <https://kereses.magyarorszag.hu/jogszabalykereso>

http2: <http://kockazatos.hu/anyag/benzol>

http3: <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=25>

http4: <http://www.epa.gov/bpspill/pahs.html>

http5: <http://kockazatos.hu/anyag/policiklusos-arom%C3%A1s-sz%C3%A9nhidrog%C3%A9nek>

http6: <http://www.epa.gov/superfund/remedytech/remed.htm#tech>

http7: <http://www.mokkka.hu/publications/kislexikon.pdf> , Gruiz K.: Bioremediációs kislexikon. 62 p.

http8: <http://www.epa.gov/oust/pubs/tums.htm>

http9: <http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/acinetobacter.html>

http10: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

http11: <http://acinetobacter.org/>

http12: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/AcinetobacterMedia.html

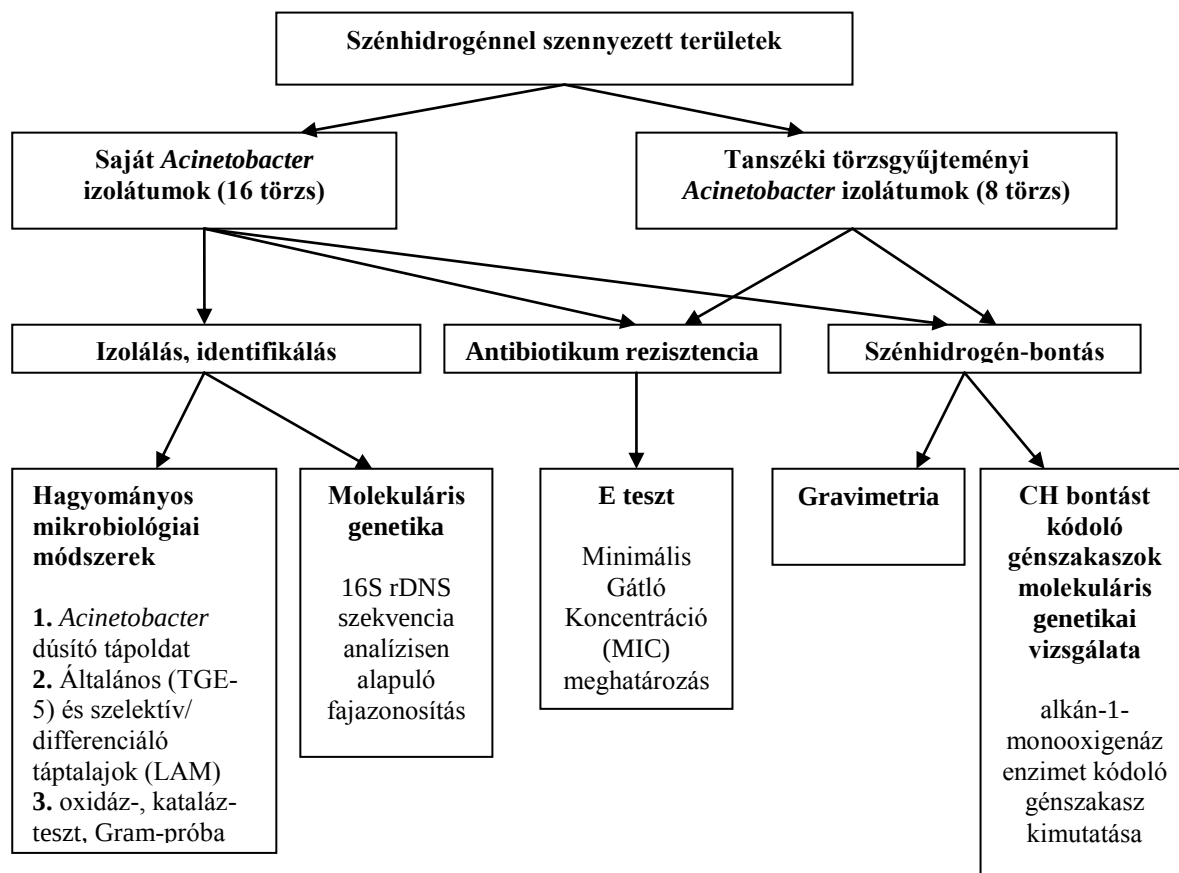
http13: <http://www.bioscience.org/1996/v1/e/reischl1/htmls/3.htm>

http14: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

http15: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=DD:05:04:32000L0054:HU:PDF>

MELLÉKLET

1. sz. melléklet: A szénhidrogénnel szennyezett területekről származó *Acinetobacter* izolátumok laboratóriumi vizsgálatának főbb irányai, lépései, módszerei



2. sz. melléklet: Az alkalmazott antibiotikumok értékelésére szolgáló kategóriák (CLSI, 2007; Henwood et al., 2002)

Érzékenységi kategóriák a MIC (µg/ml) töréspontok alapján			
Antibiotikum csoportok	S (érzékeny)	I (átmeneti)	R (rezisztens)
Aminoglikozidok			
gentamicin	<4	8	>16
széles spektrumú Penicillinek			
piperacillin	<16	32-64	>128
Carbapenemek			
imipenem	<4	8	>16
meropenem	<4	8	>16
Cefalosporinok III-IV. generációja			
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
Glicilciklinek			
tigecycline	<2	4	>8
Rifamycinek			
rifampicin	<1	-	>4

3. sz. melléklet: A kísérletek során alkalmazott táptalajok

<i>Acinetobacter</i> dúsitó tápoldat (Baumann, 1968): összetétel: 4,21 g KH₂PO₄, 0,749 g Na₂HPO₄, 2 g 0,2%-os Na-acetát, 2 g 0,2%-os KNO₃, 0,2 g 0,02%-os MgSO₄ 7 H₂O, 20 ml Hutner féle ásványi kiegészítő, 1000 cm³ desztillált víz
TGE-5 tápagar: összetétel: 10g Tripton, 5g Glükóz, 10g Élesztőkivonat, 18g Bakteriológiai agar, 1000 cm³ desztillált víz
Leeds <i>Acinetobacter</i> Medium (Jawad et al., 1994): 15 g Kazein sav hidrolizát, 5 g Szójapepton, 5 g Natrium-klorid, 5 g Fruktóz, 5 g Szacharóz, 5g Mannitol, 1g Fenilalanin, 0,4 g Vas-ammónium-citrát, 0,02 g Fenolvörös, 12 g Bakteriológiai agar, 1000 cm³ desztillált víz, valamint szelektív ágesként 10 mg vancomycin, 15 mg cefsulodin, 50 mg cephradine
OIR III : 5,0 g (NH₄)₂SO₄; 0,5 g KH₂PO₄; 1,0 g K₂HPO₄; 0,5 g MgSO₄×7H₂O; 0,2 g CaCl₂×6H₂O; 0,01 g FeSO₄×7H₂O; 0,5 g pepton, 0,5g élesztőkivonat, 1000 cm³ desztillált víz

4. sz. melléklet: Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei

hatóanyag konc. (µg)	Antibiotikum rezisztencia (R/I/S)											
	0,016-256	0,016-256	0,002-32	0,002-32	0,016-256	0,016-256	0,016-256	0,016-256	0,002-32	0,002-32	0,016-256	0,002-32
	GM	PP	IP	MP	CT	TZ	TX	PM	CI	OF	TGC	RD
Törzs jele/Faj												
TN6 / A. calcoaceticus	S 1	I 24	S 0,19	S 0,25	I 24	S 6	I 48	I 16	S 0,38	S 0,38	S 0,023	I 2
T3N6 / A. venetianus	S 0,38	I 24	R >32	R >32	R >256	R >256	R >256	R 48	S 0,75	S 0,38	S 0,023	S 0,75
T3N9 / A. venetianus	S 0,75	S 8	S 0,125	S 0,75	S 3	S 6	S 8	S 4	S 0,094	S 0,19	S 0,047	I 1,5
Z4N3 / A. beijerinckii	S 0,19	S 12	S 0,094	S 0,75	S 1,5	S 3	S 4	S 1,5	S 0,125	S 0,25	S 0,094	S 0,75
Z4SZ2 / A. johnsonii	S 0,5	S 8	S 0,125	S 0,19	S 6	I 12	S 3	S 8	S 0,047	S 0,19	S <0,016	S 0,5
PT 2/2 / A. calcoaceticus	S 1	I 24	S 0,125	S 0,38	I 16	S 4	I 32	S 3	S 0,25	S 0,38	S 0,032	I 1,5
PT 3/6 / A. calcoaceticus	S 1,5	I 32	S 0,125	S 0,25	I 12	S 4	I 24	S 4	S 0,19	S 0,25	S 0,047	I 1,5
PT 3/9 / A. calcoaceticus	S 0,38	I 32	S 0,125	S 0,25	S 8	S 3	I 16	S 2	S 0,19	S 0,25	S 0,047	I 2
Sk-V/3 / A. baumannii	S 1,5	S 16	S 0,19	S 0,25	S 8	S 3	I 12	S 2	S 0,19	S 0,75	S 0,094	I 3
1/2 / A. calcoaceticus	S 0,75	I 32	S 0,19	S 0,25	I 16	S 8	I 48	S 4	S 0,094	S 0,38	S 0,032	I 1,5
5/06/4 / A. calcoaceticus	S 3	I 48	S 0,125	S 0,25	I 24	S 6	I 24	S 6	S 0,19	S 0,25	S 0,032	I 1,5
PM 5 / A. calcoaceticus	S 1	R >256	S 0,19	S 0,19	I 24	S 6	I 48	S 6	S 0,19	S 0,38	S 0,047	I 1,5
PM 7 / A. calcoaceticus	S 2	I 64	S 0,25	S 0,25	I 16	S 8	I 16	S 4	S 0,19	S 0,5	S 0,047	I 3
PM 13 / A. calcoaceticus	S 0,75	R >256	S 0,19	S 0,38	I 24	S 6	I 32	S 4	S 0,19	S 0,25	S 0,032	I 2
PM 7/3 / A. calcoaceticus	S 1	S 16	S 0,125	S 0,25	I 12	S 4	I 24	S 2	S 0,125	S 0,38	S 0,047	I 1,5
PM 15/3 / A. pittii	S 1	I 32	S 0,19	S 0,25	I 12	S 2	I 12	S 2	S 0,19	S 0,25	S 0,064	I 2
DM-5/1 / A. calcoaceticus	S 2	I 24	S 0,5	S 0,25	I 24	S 4	I 16	I 12	S 0,5	S 0,25	S 0,094	I 1,5
BUT-8/1 / A. pittii	S 0,75	I 24	S 1	S 0,38	I 12	S 3	S 8	S 4	S 0,25	S 0,25	S 0,125	I 2
ST-2 / A. johnsonii	S 0,75	I 24	S 0,75	S 0,38	S 8	S 8	S 1,5	I 16	S 0,125	S 0,094	S 0,047	I 1,5
Sk-V / A. calcoaceticus	S 1	I 32	S 0,5	S 0,38	I 16	S 6	S 12	S 8	S 0,38	S 0,19	S 0,094	I 3
5/06 / A. calcoaceticus	S 1	I 32	S 0,75	S 0,38	I 48	S 8	I 32	I 16	S 0,38	S 0,25	S 0,094	I 3
22 / A. calcoaceticus	S 0,5	I 32	S 0,5	S 0,19	I 12	S 4	I 16	S 8	S 0,38	S 0,19	S 0,125	I 2
24 / A. calcoaceticus	S 1,5	I 32	S 0,5	S 0,25	I 24	S 4	I 24	S 8	S 0,38	S 0,19	S 0,094	I 3
42 / A. calcoaceticus	S 0,75	I 32	S 0,75	S 0,38	I 32	S 8	I 16	I 12	S 0,5	S 0,25	S 0,125	R 4

GM- genatmicin, PP – piperacillin, IP- imipenem, MP – meropenem, CT – cefotaxime, TZ – ceftazidime, TX – ceftriaxone, PM – cefepime, CI - ciprofloxacin, OF – ofloxacin, TGC – tigecycline, RD – rifampicin

R-resistant/rezisztens, I-intermediate/átmeneti, S-sensitive/érzékeny

NYILATKOZAT

Alulírott Radó Júlia, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Környezetgazdálkodási agrármérnök MSc szak nappali tagozatos hallgatója nyilatkozom, hogy a Tudományos Diákköri dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem.

Gödöllő, 2013.hó.....nap

.....
hallgató aláírása

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

Gödöllő, 2013.hó.....nap

.....
konzulens aláírása