

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

***ACINETOBACTER* FAJOK KÖRNYEZETBIZTONSÁGI VIZSGÁLATA**

Készítette: Radó Júlia
Környezetgazdálkodási agrármérnök MSc II. évfolyam

Belső konzulens: Dr. Szoboszlai Sándor, egyetemi docens
Dr. Kaszab Edit, egyetemi tanársegéd

Gödöllő
2013.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1. Környezetvédelem általánosságban	4
2.2. Patogén mikroorganizmusok.....	4
2.3. Patogén mikroorganizmusok a környezetben	5
2.4. Jellemzőes patogén mikrobák a szénhidrogénnel szennyezett területeken	6
2.5. <i>Acinetobacter</i> nemzetség.....	6
2.5.1. Az <i>Acinetobacter</i> nemzetség általános bemutatása	6
2.5.2. Az <i>Acinetobacter</i> fajok humánegészségügyi jelentősége.....	8
2.6. Antibiotikumok szerepe a humán gyógyászatban.....	9
2.7. Antibiotikum rezisztencia a klinikai viszonyok között	10
2.7.1. Multirezisztencia	11
2.8. Antibiotikum rezisztencia a környezetben	12
3. MÓDSZEREK	14
3.1. Mintavételezés	14
3.2. <i>Acinetobacter</i> fajok növekedésének vizsgálata általános és szelektív táptalajokon	15
3.3. <i>Acinetobacter</i> nemzetség tagjainak izolálására szolgáló módszeregyüttes fejlesztése	15
3.3.1. <i>Acinetobacter</i> dúsító tápoldat	15
3.3.2. Leeds <i>Acinetobacter</i> Medium (LAM)	16
3.4. Környezeti eredetű <i>Acinetobacter</i> fajok identifikálása	16
3.4.1. Oxidáz-, Kataláz-teszt, Gram-próba	17
3.4.2. Faj szintű identifikáció 16S rDNS teljes szekvencia analízissel	18
3.4.2.1. DNS izolálás.....	18
3.4.2.2. Polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction – PCR).....	18
3.4.2.3. Agaróz gélelektroforézis	19
3.4.2.4. PCR termék tisztítása	20
3.4.2.5. Szekvenáló PCR reakció	20
3.4.2.6. A jelölt DNS visszanyerése – etanol-precipitáció	20
3.4.2.7. Kapilláris gélelektroforézis	21
3.5. Antibiotikum rezisztencia vizsgálat	21
3.6. Gravimetria	23
3.7. Szénhidrogén bontásért felelős génszakaszok molekuláris genetikai vizsgálata	23
4. EREDMÉNYEK	25
4.1. Az <i>Acinetobacter</i> fajok növekedésének vizsgálata általános és szelektív táptalajokon.....	25
4.2. <i>Acinetobacter</i> fajok izolálásának és identifikálásának eredményei	26
4.2.1. <i>Acinetobacter</i> izolálás elődúsítást követően, szelektív LAM táptalajjal	26
4.2.2. <i>Acinetobacter</i> törzs jelöltek identifikációjára vonatkozó eredmények	28
4.3. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei	29
4.3.1. A Karbapenem antibiotikumokkal végzett vizsgálatok eredményei	30
4.3.2. Az Aminoglikozid antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei	31
4.3.3. A Fluorokinolon antibiotikumok vizsgálatának eredményei	31
4.3.4. A Cefalosporin antibiotikumok vizsgálatának eredményei	32
4.3.5. A Glicilciklin antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei.....	32
4.3.6. A Penicillin antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei	33
4.3.7. A Rifamycin antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei	33
4.3.8. Multirezisztenciára utaló eredmények.....	33
4.4. A szénhidrogén bontás megállapítását célzó gravimetriás mérés vizsgálatainak eredményei.....	34
4.5. A szénhidrogén bontás megállapítását célzó molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei	36
5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	38
6. ÖSSZEFOGLALÁS	42
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	44
MELLÉKLET	47
NYILATKOZAT	50

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 mikrobamemzetségek esetében többszörös rezisztenciához, multirezisztenciához vezethet.

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 munkám során a környezetegészségügyi és környezetbiztonsági szempontból jelentős témakör kutatását tűztem ki célul.

Célkitűzések:

- Környezeti eredetű *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 geneikai vizsgálatokkal.

Céljaim megvalósítása érdekében a tanszéken rendelkezésre álló környezeti törzsgyűjtemény *Acinetobacter* izolátumait, illetve a saját munkám keretében azonosított mikroszervezeteket egyaránt felhasználtam.

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.**

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. Patogén mikroorganizmusok

Patogén mikroszervezetnek az a fertőző ágens tekinthető, amely képes fogékony egyedben megbetegedést kiváltani (LOSONCZY, 2001). Megkülönböztetünk obligát patogén mikroorganizmusokat és fakultatív patogén, vagy másnéven opportunistá kórokozókat. Míg előbbiek az ép és egészséges immunrendszerrel rendelkező egyéneknél is képesek betegség kiváltására, addig az utóbbiak általában csak legyengült, immunológiai védekezésben gátolt

szervezetben képesek betegséget okozni (SZOBOSZLAY-KRISZT, 2008). Napjainkban azonban mind többször számolnak be olyan, opportunistákórokozóknak tulajdonítható megbetegedésekről, halálesetekről, 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 opportunistákórokozók egy részének evolúciója a betegség kialakítási képesség előtérbe kerülésének irányába tart (BUCKLEY, 2004). Így napjainkban az opportunisták mikroorganizmusokat megkülönböztetjük az ún. alkalmoszerűen patogén mikroorganizmusoktól, melyek esetében a betegség kialakítása egyedi és véletlenszerű.

2.3. Patogén mikroorganizmusok a környezetben

Ubikviter szervezatként számos patogén mikroorganizmus jelenléte mutatható ki egyes környezeti elemekben is, mint a felszíni-, illetve felszín alatti vizek, vagy a földtani közeg. Számos kutatás irányul a környezetben előforduló patogének kimutatására, illetve tulajdonságaik vizsgálatára.

Több alkalommal vizsgálták a környezeti eredetű *Pseudomonas aeruginosa* képviselőit, illetve azok tulajdonságait, mely faj estében - kiváló biodegradációs képességeinek köszönhetően - szénhidrogénnel szennyezett területeken, valamint komposztban történő térnyeréséről számoltak be (ATZÉL ET AL, 2008, KASZAB ET AL., 2010). További vizsgálatokat végeztek a környezeti törzsek antibiotikum rezisztenciájával kapcsolatosan, illetve virulencia markerek kimutatására (KASZAB ET AL., 2011), mely eredmények a környezeti patogén mikroorganizmusok fokozottabb jelentőségére hívják fel a figyelmet.

Több esetben került kutatási célkitűzés középpontjába felszíni vizek közül kisebb tavak mikrobiológiai diverzitásának kérdése. Különböző tavak kerültek vizsgálódás alá, többek közt hulladéklerakó csurgalékvíz bevezetéssel ellátott állóvizet elemeztek molekuláris technikákkal (FERNANDES ET AL., 2013), vagy például Ausztráliában, egy szivárványos pisztrángot (*Oncorhynchus mykiss*) tenyésztő farmon izoláltak különböző patogén szervezeteket (többségében *Pseudomonas* és *Aeromonas* fajokat), melyekkel a későbbiekben egyéb (antibiotikum rezisztencia, nehézfém rezisztencia) vizsgálatokat is végeztek (AKINBOWALE ET AL., 2007). Irányult kutatás továbbá halastóra, ahol az összes élő-sejtszámon kívül vizsgáltak fekál indikátorokat és *Salmonella* sp.-t, valamint kimutattak egyéb patogén mikroorganizmusokat, mint az *Aeromonas hydrophila*, melyek esetében antibiotikum rezisztencia vizsgálatok is elvégzésre kerültek. A halak bőrén gyakran kolonizálnak Gram-

negatív baktériumok, mint például a *Pseudomonas*, a *Vibrio*, az *Aeromonas*, a *Flavobacterium* és a *Moraxella-Acinetobacter* nemzetség tagjai (HARNISZ & TUCHOLSKI, 2010). Vietnámban kifejezetten környezeti eredetű antibiotikum rezisztens baktériumokat kerestek mely kutatás során a legnagyobb számban az *Acinetobacter* és az *Aeromonas* nemzetségbe tartozó fajokat mutatták ki vízi környezetből. Az izolált fajok többségénél rezisztencia géneket is sikerült detektálniuk (HOA ET AL., 2011).

2.4. Jellegzetes patogén mikrobák a szénhidrogénnel szennyezett területeken

A mikroszervezetek – így az opportunisták 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 opportunisták 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 a következő fejezetben foglalkozom.

2.5. *Acinetobacter* nemzetség

*2.5.1. Az *Acinetobacter* nemzetség általános bemutatása*

Az *Acinetobacter* nemzetség tagjai szabadon élő szaprofiták¹, ubikviter² szervezetekként bárhol fellelhetőek a környezetben. Jellemzően opportunisták

¹ szaprofiták: másnéven korhadéklakók, melyek képesek holt szervesanyag hasznosítására

mikroszervezetek (HTTP1), 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 taxonómai besorolása a következő (HTTP2):

Prokarióták

Domén: *Bacteria*

Törzs: *Proteobacteria*

Osztály: *Gammaproteobacteria*

Rend: *Pseudomonadales*

Család: *Moraxellaceae*



1. sz. ábra: *Acinetobacter baumannii* elektronmikroszkópos felvétele (http3)

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 előfordulhat fehéres krémszín. A telepek átmérője 1-2 mm, ép szélűek, felületük lehet sima, vagy fényes, nyálkás. Az *Acinetobacter* nemzetség képviselői széles hőmérsékleti tartományban

² ubikviter: mindenütt előforduló, megtalálható

³ nozokomiális: kórházi körülmények között kialakult fertőzés

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 bifenilek – 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).

2.5.2. 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

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

még a vérmérgezés, a szívbelhártya gyulladás, az agyhártyagyulladás, a bőr- és sebfertőzések, valamint a húgyúti fertőzés. A nemzetségen belül, kórházi környezetből leggyakrabban izolált kórokozócsoport az *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* komplex (GIAMARELLOU ET AL., 2008), mely magában foglalja az *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* és *A. nosocomialis* fajokat (NEMEC ET AL., 2011).

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 kezelések 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) mikroszervezetek 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, nukleinsavsintézis gátlók, a DNS kettős spirál kialakulását akadályozó készítmények, folsavsintézis gátlók, fehérjessintézis 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 háttérében 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, felszíni víz) milyen élősejtszámban és gyakorisággal lelhetőek 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 végeztem. Munkám során az előírásoknak megfelelően steril körülmények között, lamináris bokszt igénybevételel dolgoztam, a szükséges védőfelszerelések (gumikesztyű, maszk, védőszemüveg) használatával. A felhasznált eszközöket és táptalajokat 20 percig, 121°C-on, 1 atm túlnyomáson autoklávban sterilizáltam.

Céljaim megvalósítása érdekében első lépésben szénhidrogénnel szennyezett kárhelyekről származó talajvíz, valamint halastóból származó felszíni víz mintákat vételeztünk és e mintákból izoláltam és identifikáltam *Acinetobacter* nemzetségbe tartozó törzseket, melyeket az 1. sz. melléklet ábráján összefoglalt, többlépcsős vizsgálati rendszeren vittem végig.

3.1. Mintavételezés

Az *Acinetobacter* fajok izolálása céljából az ország különböző pontjain elhelyezkedő, szénhidrogénnel szennyezett kárhelyekről (Bábolna, Baja, Balassagyarmat, Baracska, Békéscsaba, Bugyi, Debrecen, Dunavarsány, Füzesabony, Kunhegyes, Marcali, Miskolc, Orosháza, Polgár, Siklós, Százhalombatta, Szigetszentmiklós, Szolnok, 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 igénybevételel, steril acél bailer segítségével történt (2. sz. ábra), majd a minták megfelelő hőmérsékleten (~4°C) szállítva kerültek laboratóriumba mikrobiológiai és kémiai analitikai vizsgálatok céljából. A halastavi felszíni víz minták Högyész, Kölesd, Monor és Varsád településről kerültek beszállításra. A mintavételi helyszínek elhelyezkedése az országban a 2. sz. melléklet ábráján került bemutatásra.



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 rendelkezésre 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 (HTTP4)
 - LAM szelekciós ágensekkel (JAWAD ET AL., 1994)

Munkám során kísérletet tettem a vizsgálati lehetőségek egyesével történő tesztelésére és a javasolt tápközegek laboratóriumi optimalizálására, melynek eredményeit a 4.1. sz. alfejezetben ismertetem. Ennek megvalósításához a Tanszék környezeti eredetű mikrobatorzsgyűjteményben már rendelkezésünkre álló 8, szintén szénhidrogénnel szennyezett kárhelyről származó *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*, *A. venetianus*, *A. johnsonii*, *A. beijerinckii*) izolátumot használtam fel. E baktériumtorzseket bevontam továbbá a munkám keretében tervezett további vizsgálati irányok (antibiotikum rezisztencia, szénhidrogén bontó képesség) végrehajtásába is.

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

3.3. *Acinetobacter* nemzetség tagjainak izolálására szolgáló módszeregyüttes fejlesztése

A rendelkezésemre álló lehetőségek közül a tenyésztésre alkalmasnak ítélt tápközegek esetében kialakítottam 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 tápközeg felhasználásának részletes metodológiáját ismertetem.

3.3.1. *Acinetobacter* dúsító tápoldat

Első lépésben a beérkezett környezeti mintákban esetlegesen jelen lévő *Acinetobacter* törzsek



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

izolálásának céljából elődúsítást alkalmaztam. A mintákból 5 ml-t pipettáztam előzőleg sterilizett 20 ml *Acinetobacter* dúsító tápoldatot (BAUMANN, 1968) tartalmazó lombikba (lásd 3. sz. ábra, ill. 3. sz. melléklet).

A környezeti mintával beoltott rázó lombikokat ezt követően 48 órán át, 30°C-on inkubáltam 160 rpm fordulatszám mellett. A 48 órás inkubáció után a dúsított környezeti minta felhasználásával tízes alapú hígítási sorokat készítettem 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 pipettáztam, melyet követően lehetőségem 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 találtam, 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 tapasztalataim és szakirodalmi utalások (TOWNER, 2006) alapján 28 °C-os hőmérsékleten, 48-72 órán át inkubáltam, majd a típusos (mályva színű, kerek, ép szélű, kiemelkedő, fényes) telepeket tisztító szélesztés után, TGE-5 ferde agarra oltottam, 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,



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

szabványosított, nemzetközileg elfogadott eljárást pedig az irodalom áttekintése során nem találtam. Ezek alapján a környezeti izolátumok identifikálásához a 16S rDNS szekvencia analízisen alapuló molekuláris genetikai módszert választottam.

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

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 vittem fel, majd oxidáz reagenst (tetrametil-p-feniléndiamin-oxalát 1%-os vizes oldata) cseppentettem rá. Pozitív reakció esetén azonnali, vagy 60 másodpercen belüli liláskék elszíneződést tapasztaltam, 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 vittem fel, majd 1-2 csepp kataláz reagenst (3%-os hidrogén-peroxid) cseppentettem rá Pasteur-pipetta segítségével. Pozitív reakció esetén azonnali pezsgést, buborékképződést tapasztaltam.

Gram-próba: A baktériumok sejtfal 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-pozitívknál ez a folyamat nem megy végbe.

A vizsgálat során zsírtalanított és lelángolt tárgylemezre 3%-os KOH oldatot cseppentettem, majd oltókacs segítségével a baktérium „overnight” tenyészetéből kacsnyi mennyiséget a KOH-ba vittem. A kaccsal homogenizáltam a szuszpenziót, majd elvégeztem 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 tapasztaltam, további, genetikai vizsgálatokat végeztem 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 hoztam létre TGE-5 táptalajon, majd a MOBIO Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit segítségével DNS-t izoláltam belőlük, a gyártó ajánlásainak megfelelően, melyet agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem (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 végtérfigat beállításához

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

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 használtam (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 tároltam.

3.4.2.3. Agaróz gélelektroforézis

A PCR sikerességét és a megfelelő méretű fragmentek képződését agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztem. 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 oldottam fel, majd a kézmelegre hűtött oldatba 3,5 µl 1%-os ethidium-bromid festéket pipettáztam. A gél fésűsorokat tartalmazó, OWL-típusú futtatókádban szilárdítottam. 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 pipettáztam. Minden mintasor mellé standardként 3 µl DNS markert (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) vittem fel, így a PCR termék hozzávetőleges méretének ellenőrzésére is lehetőségem nyílt.

A DNS molekula foszfátcsoportjai miatt pH 7 értéken negatív össztöltéssel rendelkezik, így egyenáram hatására a DNS a pozitív pólus felé vándorol. A DNS-szállba 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 futtattam, majd UV fény alatt a célszekvenciák hosszát a markerhez viszonyítva ellenőriztem.

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 számomra szükségtelen alkotókat (maradék dNTP, primer dimerek) NucleoSpin Extract II DNA Clean-up szettel (Macherey-Nagel) a gyártó előírásainak megfelelően eltávolítottam. Az így létrejött, tisztított terméket a későbbiekben a szekvenáló PCR reakcióhoz templátként használtam.

3.4.2.5. Szekvenáló PCR reakció

Az amplifikált DNS szekvencia bázissorrendjének meghatározásához szekvenáló PCR reakciót hajtottam 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 felhasználtam, vagy -20°C-on tároltam. 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) vortexeltem, majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. Ezt követően az elegyet 4600 rpm fordulaton, 30 percig,

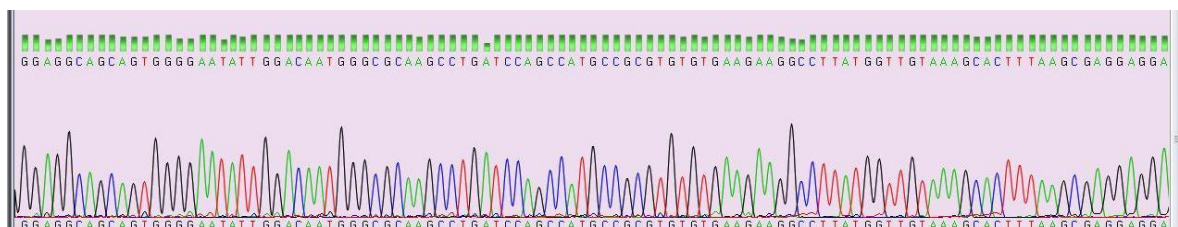
4°C-on centrifugáltam. A felülúszó fázis leöntése után 180 µl 70%-os etil-alkoholt pipettáztam a mintákra, majd 4600 rpm-en 20 percig, 4°C-on ismét centrifugáltam. A felülúszót maradéktalanul eltávolítottam, majd 20 µl Hi-Di formamidot mértem a kicsapott DNS-re. Az így előkészített mintákat legalább 1 napig 4°C-on inkubáltam.

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 értem el. A szekvenciák illesztését DNA Baser® v3 3.2.5.133 (Heracle BioSoft) program segítségével hajtottam végre, és a folyamat során egyben manuálisan kijavítottam a hibásan azonosított bázisokat (ún. mismatch-ek).

Az így kapott szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisával (HTTP5) a BLAST algoritmus alapján összehasonlítottam, és így faj szinten meghatározhattam 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) hajtottam végre, mely az antibiotikum rezisztencia számszerű (kvantitatív) értékelését teszi lehetővé. A vizsgálatokat a CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) által meghatározott módszer szerint végeztem (CLSI, 2006).

A vizsgálatba vont törzsekből friss, legfeljebb 24 órás tenyészetet hoztam 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 készítettem (MCFARLAND, 1907). Ezt követően

steril vattapálca segítségével 20 ml előre kiöntött és megszilárdult Müller-Hinton agart tartalmazó, 9 cm átmérőjű petri csészékbe szélesztettem a homogén baktérium szuszpenziót. A Müller-Hinton agar az egyik legalkalmasabb táptalaj az antibakteriális szerekkel szembeni érzékenység vizsgálatához. A szélesztést követően a baktériumgyepre helyeztem az adott antibiotikum hatóanyagot koncentráció-gradiens mentén tartalmazó E-teszt csíkokat (1 csík/petri csésze), majd a lemezeket 35°C-on, 24 óráig inkubáltam.

A vizsgálatokban 7 hatóanyagcsoportba tartozó, 12 antibiotikum készítmény (Karbapenemek – imipenem, meropenem; Aminoglikozidok – gentamicin; Fluorokinolonok – ciprofloxacin, ofloxacin; Cephalosporinok – cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone; Glicilciklinek – tigecycline; Penicillinek – piperacillin; Rifamycinek – rifampicin) 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 µg/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 értékeltem, 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 alkalmaztam.

3.6. Gravimetria

A szénhidrogén bontó képesség szemikvantitatív meghatározására alkalmas gravimetriás eljárás első lépésében ferde agaron „overnight” tenyészetet hoztam létre a vizsgálandó törzsből, amit 50 ml TGE-5 táplevest tartalmazó 300 ml-es Erlenmeyer lombikba mostam. A lombikokat rázó termosztátba helyeztem, és 72 órán keresztül 28 °C-on inkubáltam, így nagy élősejtszámú folyékony tenyészetet hoztam létre. A baktériumtenyészetből ezt követően 5 ml-t 100 ml „OIR III” ásványi tápközegbe (lásd 3. sz. melléklet) oltottam, 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) rázattam.

A 120 órás ráztatás után a mintákból gravimetriás méréssel, extraháló szerek (3x50 ml petroléter és 1x50 ml kloroform) segítségével a megmaradt olajat rázótolcsérben leválasztottam. A rázótolcsérből a fázisok szétválása után a vizes fázist leengedtem, majd az olaj-oldószer keveréket Düren 619 G ¼ szűrőpapíron szűrtem át, melyre előzőleg Na₂SO₄-et helyeztem az esetlegesen megmaradt víz megkötésének céljából. Az átszűrt oldószeres olajat ismert tömegű gömblombikba öntöttem, majd az oldószereket és a szénhidrogéneket Heidolph típusú bepárlókészülékkel forráspont különbség alapján szétválasztottam. A lombik tartalmát 50-60°C-os vízfürdön desztilláltam, így a maradék oldószert is eltávolítottam.

Mérés előtt a maradék szénhidrogént 60°C-on, Memmert típusú szárítószekrényben súlyállandóságig szárítottam. Kontrollként gázolaj-kőolaj keveréket szintén tartalmazó, rázatott, de baktériumtenyészetrel be nem oltott tápoldatot használtam. A maradék olaj tömegét a kontrollban visszamaradt mennyiséghez viszonyítva megkaptam 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 vizsgáltam. Egy, alifás szénhidrogéneket bontó enzimet, az alkán-1-monooxygenázt kódoló génszakasz jelenlétét kutattam a bakteriális

genomban, melyhez PCR reakciót végeztem. A reakció során felhasznált – az *Acinetobacter* nemzetségre nézve specifikus – AcalkM forward és reverse primerpár szekvenciáit a 2. sz. táblázatban ismertetem.

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

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

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

A keresett génszakasz kimutatásának érdekében PCR reakciót futattam 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 ismételtén agaróz gélelektroforézissel (lásd 3.4.2.3. alfejezet) ellenőriztem.

4. EREDMÉNYEK

Eredményeimet három részre osztva mutatom 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 kaptam a nemzetség fajainak telepmorfológiájáról. A vizsgálatba vont *Acinetobacter* fajok képviselői a tanszéki környezeti eredetű gyűjtemény keretében rendelkezésre álló izolátumok voltak. A származásukra és identifikálásukra vonatkozó eredményeket foglalja össze a 3. sz. táblázat.

3. sz. táblázat: Az általános és szelektív táptalajok teszteléséhez rendelkezésre 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	98%
<i>A. beijerinckii</i>	T3N6	TIFO/ Tiszaújváros	talajvíz	2009.03.04	98%
<i>A. venetianus</i>	T3N9	TIFO/ Tiszaújváros	talajvíz	2009.03.04	98%
<i>A. beijerinckii</i>	Z4N3	ZAFI/ Zalaegerszeg	talajvíz	2009.05.28	98%
<i>A. johnsonii</i>	Z4SZ2	ZAFI/ Zalaegerszeg	talajvíz	2009.05.28	98%
<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 jutottam a MacConkey agar kapcsán. A

rendelkezésre álló szelektív/differenciáló táptalajok közül így eredményeim szerint **leghatékonyabban a LAM teszi lehetővé az *Acinetobacter* spp. Gram-pozitív fajoktól 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 hajtottam végre: a 4. sz. táblázatban összefoglalt eredményeim 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

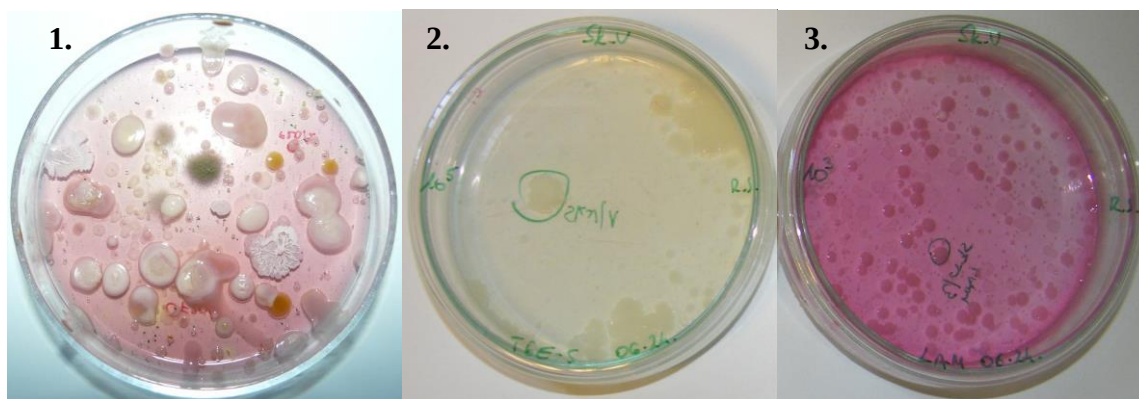
Izolátum jele	Mintavétel helye	Mintavétel ideje	Identifikáció eredménye	Identifikáció megbízhatósága
F-4/1	Szigetszentmiklós	2011.02.03	<i>Rahnella aquatilis</i>	99%
ST-2/1	Siklós	2011.02.08	<i>Pseudomonas veronii</i>	99%
ST-2/2	Siklós	2011.02.08	<i>Pseudomonas veronii</i>	99%
ST-2/3	Siklós	2011.02.08	<i>Pseudomonas veronii</i>	99%
Sk-V/1	Siklós	2011.02.08	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
M-14/2	Miskolc	2011.03.08	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%
ST-2/1.2	Siklós	2011.03.29	<i>Pseudomonas veronii</i>	100%
Sk-V/1.2	Siklós	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 tapasztaltam, melyekről származó típusos, mályva színű telepek azonosítása után többségében *Pseudomonas*, de egy esetben sem *Acinetobacter* fajokat mutattam ki, munkám következő szakaszában az *Acinetobacter* fajok hatékony környezeti kimutatására egy olyan módszeregyüttest fejlesztettem ki, melyben a lemezöntések előtt az *Acinetobacter* dúsító tápoldatot (BAUMANN, 1968) alkalmaztam. Ennek következtében felszaporodtak a keresett nemzetség képviselői, majd a lemezöntés után, a mályvaszínű típusos telepekkel további vizsgálatokat végeztem. Előző tapasztalataim alapján két nemzetség között kellett differenciálnom alapvetően, így választásom 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 létrehoztam egy többlépcsős rendszert, melyet sikerrel alkalmaztam. Összefoglalva tehát: első lépésében elődúsítást alkalmaztam, majd Leeds *Acinetobacter* Medium táptalajjal lemezeket öntöttem, végül pedig a típusos telepekkel oxidáz- és kataláz tesztet végeztem.



7. sz. ábra: (1.) A szigetszentmihályi 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.)]. Eredményeim 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 tapasztalataim alapján – elődúsítást követően – **a szakirodalomban szereplő módszerek különálló alkalmazásához képest lényegesen nagyobb biztonsággal tudtam elkülöníteni a típusos telepeket.**

Kísérleteim során az optimalizált izolálási eljárás segítségével a 3. sz. táblázatban ismertetett, már rendelkezésre álló *Acinetobacter* izolátumok körének bővítése volt elsődleges célom. Ennek érdekében a 3.1. alfejezetben ismertetett módon 20 kárhely 350 talajvíz-, valamint 4 helyszínről származó, 16 halastavi, felszíni víz mintát dolgoztam fel.

Munkám során 29 új *Acinetobacter* jelöltet különítettem el 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 szűkítettem. A molekuláris genetikai vizsgálatokat az esetleges törzsegyezések elkerülése érdekében különböző mintákból származó izolátumokkal végeztem 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 juttattam, az *Acinetobacter* nemzetség tagjaként sikerült azonosítanom.**

A nemzetség tagjaként identifikált 29 törzs eredetére és identifikációjára vonatkozó részletes eredményeket az 5. sz. táblázat foglalja össze.

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

	Faj	Törzs jele	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. baumannii</i>	HT-4/1	Högyész	halastó	2011.08.01	100%
10.	<i>A. baumannii</i>	HT-4/3	Högyész	halastó	2011.08.01	100%
11.	<i>A. baumannii</i>	II HT-3/1	Varsád	halastó	2011.08.05	100%
12.	<i>A. soli</i>	II HT-4/2	Högyész	halastó	2011.08.05	100%
13.	<i>A. calcoaceticus</i>	DM-5/1	Dunavarsány	talajvíz	2011.09.20	99,71%
14.	<i>A. pittii</i>	BUT-8/1	Bugyi	talajvíz	2011.10.04	99,72%
15.	<i>A. johnsonii</i>	ST-2	Siklós	talajvíz	2012.02.20	99,83%
16.	<i>A. calcoaceticus</i>	Sk-V	Siklós	talajvíz	2012.05.29	99,83%
17.	<i>A. calcoaceticus</i>	5/06	Vác	talajvíz	2012.06.12	99,67%
18.	<i>A. calcoaceticus</i>	22	Vác	talajvíz	2012.06.12	99,83%
19.	<i>A. calcoaceticus</i>	24	Vác	talajvíz	2012.06.12	99,85%
20.	<i>A. calcoaceticus</i>	42	Vác	talajvíz	2012.06.12	99,67%
21.	<i>A. radioresistens</i>	J3	Siklós	talajvíz	2012.09.18	99,74%
22.	<i>A. johnsonii</i>	J6	Siklós	talajvíz	2012.09.18	99,74%
23.	<i>A. calcoaceticus</i>	J5	Siklós	talajvíz	2012.11.06	100%
24.	<i>A. calcoaceticus</i>	J7	Siklós	talajvíz	2012.11.06	100%
25.	<i>A. calcoaceticus</i>	TV-11	Füzesabony	talajvíz	2012.11.13	99,18%
26.	<i>A. pittii</i>	FK-3	Marcali	talajvíz	2013.05.15	99,74%
27.	<i>A. johnsonii</i>	6/1	Varsád	halastó	2013.06.27	99,05%
28.	<i>A. gyllenbergii</i>	6/2	Varsád	halastó	2013.06.27	99,30%
29.	<i>A. calcoaceticus</i>	SV/1	Kölesd	halastó	2013.06.27	100%

Munkám során többségében *A. calcoaceticus* törzseket azonosítottam, de a molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei alapján több esetben környezeti eredetű *A. calcoaceticus* - *baumannii* komplexbe tartozó egyéb törzsszel is bővült a törzsgyűjtemény (*A. baumannii*, *A. pittii*). Az *A. baumannii* és közeli rokonai, 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 eredményeim alapján hazai, szénhidrogénnel szennyezett kárhelyeken, valamint halastavakban is kimutathatóak. Az *A. calcoaceticus* környezetegészségügyi jelentőségére vonatkozó információk nem ennyire egyértelműek: egyes források (PÁSZTI ET AL., 2011) nem tekintik a fajt klinikailag jelentősnek, más információk (HTTP1; 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 elkülöníthetők (GIAMARELLOU ET AL., 2008; PÁSZTI ET AL., 2011), így célszerű a két faj közegészségügyi jelentőségét is hasonlóan kezelni.

Összességében vizsgálataim során a 2011. február és 2013. július közötti időszakban 29, *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajt (lásd 5. sz. táblázat) sikerült identifikálnom és velük további kísérleteket végeztem. 8 olyan izolátum állt továbbá rendelkezésemre, 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 37 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] vettem figyelembe (CLSI, 2007). A rifampicin hatóanyaggal szembeni érzékenység kategóriáit a CLSI szabvány Gram-negatív mikroszervezetekre nem szabályozza, így e készítmény esetében Henwood et al. (2002.) értékelési rendszerét vettem figyelembe. Az

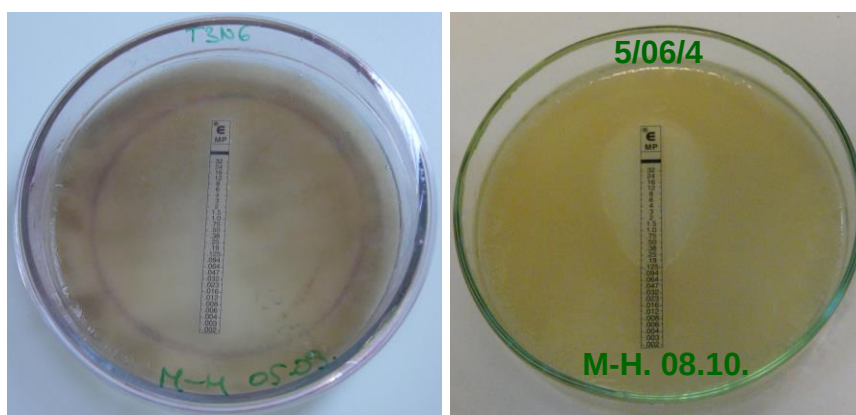
alkalmazott antibiotikumokra vonatkozóan a rezisztencia eredmények értékelésére szolgáló kategóriákat a 4. sz melléklet foglalja össze.

A szénhidrogénnel szennyezett területekről származó *Acinetobacter* törzsek antibiotikum rezisztenciájára vonatkozó részletes eredményeket és a Minimális Gátló Koncentrációkat az 5. sz. melléklet mutatja.

A 37 izolátum vizsgálata során alkalmazott 12 féle antibiotikum készítmény eredményeink alapján igen eltérő hatékonyságot mutatott.

4.3.1. A Karbapenem antibiotikumokkal végzett vizsgálatok eredményei

A Karbapenemek közül az imipenem és a meropenem esetében egyetlen törzset (T3N6 – *A. beijerinckii*) kivéve minden vizsgált izolátum érzékenynek bizonyult (8. sz. ábra).



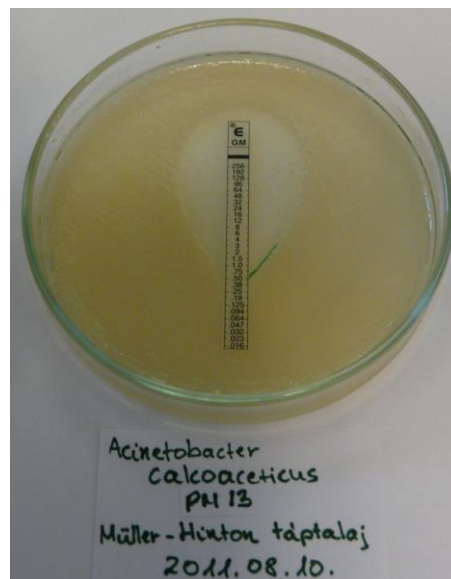
8. sz. ábra: A T3N6 (*A. beijerinckii*) meropenemmel szemben rezisztens és az 5/06/4 (*A. calcoaceticus*) érzékeny törzs (saját felvétel)

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 általam végzett kísérletek során négy környezeti eredetű *A. baumannii* izolátum került bevonásra a vizsgálatokba. A klinikai gyakorlatban tapasztaltakkal szemben érzékenynek bizonyultak mindkét Karbapenem antibiotikummal szemben.

4.3.2. Az Aminoglikozid antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei

Az Aminoglikozidok közül a gentamicinnel szembeni érzékenységet vizsgáltam. A 37 környezeti izolátum esetében sehol nem tapasztaltam rezisztenciát a készítménnyel szemben. Az E-tesztek vizsgálata során majdnem minden esetben 4 µg alatt volt a leolvasható érték a koncentráció gradiens mentén (9. sz. ábra). A szakirodalomban leírtak alapján a



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

környezeti törzsek több, mint 90%-a érzékeny az Aminoglikozidokkal szemben (FÜRST, 2004), melyet eddigi vizsgálataim 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)] tehetők 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).

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

4.3.3. A Fluorokinolon antibiotikumok vizsgálatának eredményei

A Fluorokinolon antibiotikumok csoportjába tartozó, második generációs szerek, a ciprofloxacin és az ofloxacin, vizsgálataim során többnyire hatásosnak bizonyultak. Egyetlen törzs mutatott rezisztenciát a ciprofloxacinnal szemben, valamint 1-1 törzset soroltam átmenteni kategóriába mindkét hatóanyag vizsgálata során.

4.3.4. A Cefalosporin antibiotikumok vizsgálatának eredményei

A harmadik generációs Cefalosporinok esetében, a cefotaxim és a ceftriaxon vizsgálatakor több esetben is átmeneti érzékenységi kategóriát állapítottam meg. A 37 vizsgált izolátum közül 22 bizonyult átmeneti kategóriába tartozónak a cefotaxim, és 23 törzs a ceftriaxon esetében. Rezisztenciát előbbi készítménynél 3, utóbbinál 2 esetben állapítottam meg. A csoportból a harmadik antibiotikum készítmény a ceftazidim, háromszor bizonyult hatástalannak, és egyszer detektálam átmeneti kategóriába sorolandó izolátumot. Ezen felül, munkám során egy *Acinetobacter* törzset (T3N6 – *A. beijerinckii*) találtam, ahol mindhárom hatóanyaggal szemben rezisztencia volt kimutatható. A negyedik generációs Cefalosporinok közé tartozó cefepimmel szemben 9 törzsnél tapasztaltam átmeneti érzékenységet, 2 esetben rezisztenciát, valamint a harmadik generációs készítményeknek ellenálló törzs (T3N6 – *A. beijerinckii*) 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.

4.3.5. A Glicilciklin antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei

A hatóanyagcsoporton belül a tigecycline készítménnyel szembeni rezisztenciát vizsgáltam, 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 tapasztaltam 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). Munkám jelen szakaszában a hasonló genetikai elemeket azonban még nem vizsgáltam és eddigi fenotípusos eredményeim alapján a környezeti törzsek vonatkozásában feltehetően nem bírnak jelentőséggel.

4.3.6. A Penicillin antibiotikummal végzett vizsgálatok eredményei

A Béta-laktám antibiotikumok közül a piperacillin vizsgálatokor igen eltérő eredményeket tapasztaltam. A vizsgált 37 törzs közül 6 esetben tapasztaltam rezisztenciát és további 23 törzs esetében átmeneti kategóriát állapítottam meg. Így a vizsgált törzseknek csak 24,32 %-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.

4.3.7. 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. Vizsgálataim során rezisztenciát 3 környezeti törzsnél tapasztaltam, és a 37 vizsgált izolátum közül 28 esetben állapítottam meg átmeneti kategóriába eső, azaz a rezisztencia fokozódását jelző ellenálló képességet.

4.3.8. Multirezisztenciára utaló eredmények

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményeit áttekintve munkám során **három olyan törzset találtam, amely legalább két különböző hatóanyagcsoporttal szemben mutatott rezisztenciát**, és így megfelelt a multirezisztencia definíciójának. A T3N6 jelzésű, szénhidrogén vegyületekkel szennyezett területről izolált *A. beijerinckii* 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 eszközeként 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 vizsgálataim során csak a gentamicin gátolta a T3N6 jelzésű törzset. A halastavi eredetű 6/1 jelzésű *A. johnsonii* izolátum a 12 készítményből öttel szemben bizonyult ellenállónak, valamint szintén egy esetben kapott átmeneti besorolást. A terápiában elsődlegesen választandó szerekkel szemben ugyan érzékenynek bizonyult, azonban az alternatív szerként használt Cefalosporinok közül egyik hatóanyag sem gátolta növekedését. A ciprofloxacinnal és a piperacillin estében szintén rezisztencia volt kimutatható. A 6/2 jelzésű *A. gyllenbergii*, mely szintén halastóból származott, a piperacillinnel és a Cefalosporinokkal szemben bizonyult ellenállónak. A Fluorokinolonok közül az ofloxaccinnal szemben átmeneti rezisztenciát figyelhettünk meg.

Figyelmeztető jelnek számít, hogy bár multirezisztenciát a vizsgált izolátumok között máshol nem tapasztaltam, azonban több alkalommal figyeltem 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.

Munkám eredményeként elmondható, hogy az általam vizsgált törzsek 100%-ban csak a Glicilciklinek közé tartozó tigeccycline-nel szemben voltak érzékenyek, így kísérleteim alapján teljes mértékben hatásosnak ez a hatóanyag tekinthető a környezeti eredetű *Acinetobacter* törzsekkel szemben.

4.4. A szénhidrogén bontás megállapítását célzó gravimetriás mérés vizsgálatainak eredményei

A környezeti eredetű *Acinetobacter* törzsek szénhidrogén-bontási képességének gravimetriás méréssel megállapított eredményeit a 6. sz. táblázatban foglaltam össze.

A törzsek bontási képessége széles skálán mozgott, azonos fajba tartozó törzseknél is tapasztaltam 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 találtam, ám a környezetvédelmi gyakorlat szempontjából elfogadhatónak a 35%, illetve az a feletti szénhidrogén bontási érték tekinthető. A szénhidrogén bontás értékelésére javasolható, általam 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 37 vizsgált izolátumból 20 törzs mutatott 70% feletti, kiváló szénhidrogén bontási képességet, további 7 törzset soroltam a jól bontó kategóriába. 4 törzs bontotta közepes mértékben a szénhidrogéneket, 2 törzs bizonyult gyenge és 4 törzs igen gyenge biodegradációs képességgel rendelkezőnek.

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

Törzs jele	Faj	Gravimetria	Törzs jele	Faj	Gravimetria
		bontási %			bontási %
II HT- 3/1	<i>A. baumannii</i>	97,39	FK-3 (J2)	<i>A. pittii</i>	65,21
SV/1	<i>A. calcoaceticus</i>	94,63	T3N9	<i>A. venetianus</i>	64,12
Sk-V	<i>A. calcoaceticus</i>	93,69	PM 7	<i>A. calcoaceticus</i>	60,76
22	<i>A. calcoaceticus</i>	90,99	PM 13	<i>A. calcoaceticus</i>	57,25
II HT-4/2	<i>A. soli</i>	89,06	HT-4/1	<i>A. baumannii</i>	56,47
42	<i>A. calcoaceticus</i>	88,29	PT 3/6	<i>A. calcoaceticus</i>	52,02
Sk-V (J7)	<i>A. calcoaceticus</i>	88,27	Sk-V (J3)	<i>A. radioresistens</i>	51,46
24	<i>A. calcoaceticus</i>	87,39	BUT-8/1	<i>A. pittii</i>	47,4
DM-5/1	<i>A. calcoaceticus</i>	87,39	PT 2/2	<i>A. calcoaceticus</i>	47,07
5/06	<i>A. calcoaceticus</i>	85,59	Z4N3	<i>A. beijerinckii</i>	41,79
PT 3/9	<i>A. calcoaceticus</i>	85,58	T3N6	<i>A. beijerinckii</i>	41,1
TV-11 (J4)	<i>A. calcoaceticus</i>	81,84	5/06/4	<i>A. calcoaceticus</i>	33,04
1/2	<i>A. calcoaceticus</i>	79,01	Z4SZ2	<i>A. johnsonii</i>	25,87
Sk-V (J5)	<i>A. calcoaceticus</i>	78,6	Sk-V (J6)	<i>A. johnsonii</i>	11,71
PM 15/3	<i>A. pittii</i>	76,8	ST-2	<i>A. johnsonii</i>	9,01
Sk-V/3	<i>A. baumannii</i>	75,31	PM 5	<i>A. calcoaceticus</i>	8,1
HT-4/3	<i>A. baumannii</i>	73,34	6/1	<i>A. johnsonii</i>	4,2
6/2	<i>A. gyllenbergii</i>	72,33			
TN6	<i>A. calcoaceticus</i>	72,03			
PM 7/3	<i>A. calcoaceticus</i>	70,05			

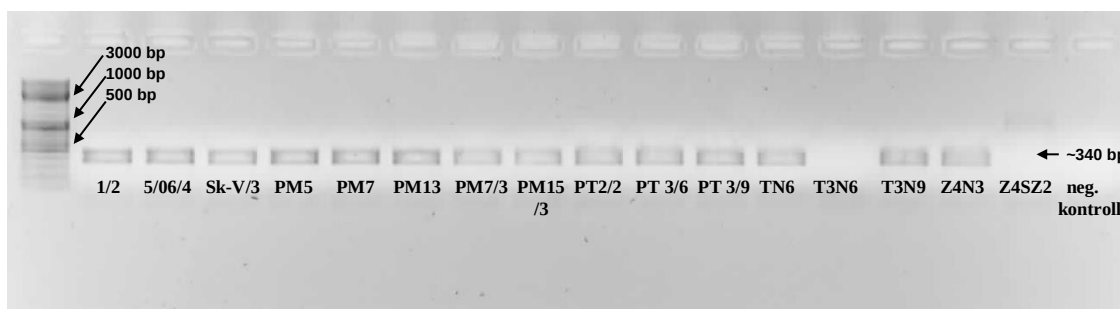
A törzsek szénhidrogén-bontási képessége és a törzsek származási helye közötti összefüggés tekintetében elmondható, hogy nem állapíthattam meg összefüggést. A fajokat tekintve az *A. johnsonii* izolátumok minden esetben gyengébb bontási képességet mutattak, míg szinte az összes többi törzs elérte a 35%-os bontást.

A szénhidrogénbontásra vonatkozó eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy az *Acinetobacter* nemzetség általam 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.

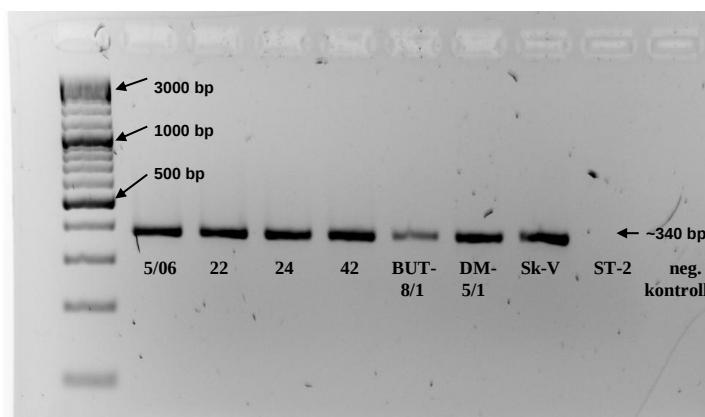
4.5. A szénhidrogén bontás megállapítását célzó molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei

A nemzetség szénhidrogénbontását célzó molekuláris genetikai kísérletek során az alifás szénhidrogénekre vonatkozó bontási képességet meghatározó enzim termelődéséért felelős génszakaszok jelenlétét vizsgáltam. A 37 környezeti eredetű izolátum közül 29 törzs esetében mutattam ki a 340 bázispárból álló alkán-1-monooxygenáz enzimet kódoló génszakaszt, mely a 10-12. sz. ábrán a PCR termék hozzávetőleges méretének ellenőrzésére szolgáló standardhoz viszonyítva jól látható. A T3N6, a Z4SZ2, a II HT-4/2, az ST-2, az Sk-v (J3), Sk-V (J6), 6/1 és 6/2-es törzsek esetében negatív eredményt kaptam, ami a gravimetriás mérések során tapasztaltakkal nem egyezik teljes mértékben. A Z4SZ2, Sk-V (J6), ST-2 és 6/1 törzsek ugyan gyengébben bontó izolátumoknak bizonyultak (25,9%, 11,71%, 9%, ill. 4,2%), azonban a többi izolátum között kiváló bontási képességgel rendelkező törzsek is előfordultak. 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 10-12. sz. ábra).

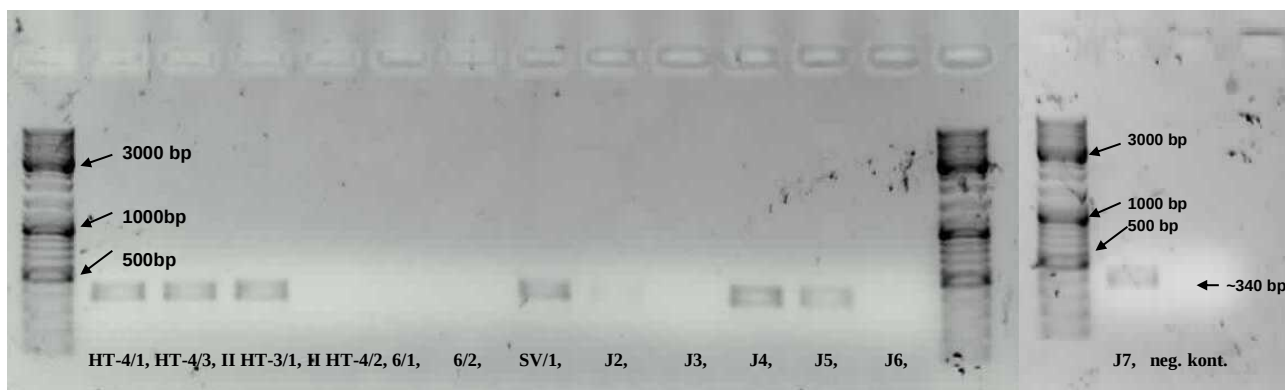
10. sz. ábra: Az alkán-1-monooxygenáz enzim termelését kódoló génszakaszok vizsgálatának eredménye a környezeti eredetű *Acinetobacter* izolátumok esetében I. (saját ábra)



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



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



5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálati eredményeim alapján megállapítható, hogy az *Acinetobacter* nemzetség tagjai jelen lehetnek a kármentesítés alatt álló szénhidrogénnel szennyezett hazai területeken, valamint megjelenhetnek felszíni vizekben, halastavakban. Munkám eddig lezárt szakasza alapján kijelenthető, hogy a vizsgált minták 7,9%-ának esetében volt kimutatható az *Acinetobacter* nemzetség valamely fajának képviselője. Leginkább elterjedtek 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” (HTTP6). 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 tettem, így ismereteket szerezhettem 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 eredményeim alapján az átlagosnál feltehetően nagyobb jelentőséggel bírhatnak, eredményeim tudatában környezetegészségügyi kockázataik a jövőben nagyobb figyelmet érdemelnek. Céлом a jövőben a folyamatos monitoring tevékenység alá eső kárhelyek esetében az *Acinetobacter* vizsgálati irány minél nagyobb számú kárhelyre, mintára történő kiterjesztése, illetve további más helyszínek vizsgálata, valamint törzsgyűjteményünk bővítése, és velük a meglévő, valamint új vizsgálati irányok végrehajtása. Ennek megvalósításához végrehajtottam egy olyan módszerfejlesztést, mely a szakirodalomban elérhető izolációs és identifikációs metodikánál lényegesen pontosabb és hatékonyabb kimutatást tesz lehetővé és ezt a módszert sikeresen alkalmaztam 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 membránszűrési módszer adaptálása és alkalmazhatóságának vizsgálata, mely eredetileg az *A. calcoaceticus* környezeti kimutatására került kifejlesztésre. A metodika felhasználásánál célszerű figyelembe venni a vizsgálni tervezett közeg 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 érzékenységgel lehet adott mikroszervezet kis sejtszámban (akár 10⁰ CFU/ml; g nagyságrendben) történő detektálására (ATZÉL, 2008).

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok során három esetben tapasztaltam multirezisztenciát az *Acinetobacter* nemzetség képviselői között, valamint több alkalommal mutattam ki a környezeti antibiotikum rezisztencia fokozódására utaló jeleket. Az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) jelentései szerint (Nemzeti Bakteriológiai Surveillance Adatfeldolgozó Csoport, 2010., 2011., 2012.) a Karbapenemekkel szembeni rezisztencia a klinikai eredetű *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* komplex (ACB) törzsek körében 45,1% és 49,8 %-ról 49,4% és 53%-ra emelkedett. Az egyéb *Acinetobacter* fajok körében ez az érték 20,9% volt. Vizsgálataim alapján a 38 környezeti eredetű törzs közül egy mutatott rezisztenciát a Karbapenem antibiotikumokkal szemben. Az OEK adatai szerint az ACB-komplex tagjai 63,4-69%-ban voltak rezisztensek a gentamicinnel szemben, amit alternatív szerként használnak az *Acinetobacter* elleni terápiában. A gentamicin rezisztencia más *Acinetobacter* fajok körében 25-34% volt. A rezisztencia aránya az Aminoglikozidokkal szemben magasabb az *Acinetobacter* nemzetség körében, mint más patogén kórokozók esetében (Towner, 2009). Eredményeim szerint egy környezeti törzs sem volt rezisztens az Aminoglikozid hatóanyaggal szemben. A ciprofloxacin esetében körülbelül 80%-os rezisztenciáról számolt be az OEK a klinikai ACB izolátumok körében, más *Acinetobacter* fajok vizsgálatánál pedig 41,3%-os ellenállást tapasztaltak. A környezeti törzseknél egy izolátum bizonyult rezisztensnek. A Cefalosporin antibiotikumokkal (ceftazidime, cefepime) szembeni rezisztencia 80% körülinek bizonyult a klinikai ACB törzseknél, míg más vizsgált *Acinetobacter* fajoknál ez az érték 21% és 36% volt. Kutatásom során a nemzetség környezeti képviselőinél négy Cefalosporin antibiotikumot (cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) vizsgáltam, 4 törzs mutatott rezisztenciát, illetve a törzsek

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

60,5%-a kapott átmeneti kategóriájú besorolást. Az OEK jelentéseiben a tigecline, a piperacillin és a rifampicin hatóanyaggal kapcsolatban nem találtam információt, vizsgálataim alapján az előbbi szer 100%-ban bizonyult hatékonynak a környezeti eredetű törzsek esetében, míg az utóbbi kettő, csak 23,68 és 18,42%-os hatékonyságot mutatott.

Az antibiotikum rezisztencia genetikai hátterére vonatkozó vizsgálatokat nem végeztem, ám a vonatkozó szakirodalmat áttekintettem és feldolgoztam. Így a továbbiakban lehetőségem 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 rendelkezésre álló törzsek esetében plazmid izolálás végrehajtása, melyet munkám jelen stádiumában a környezeti eredetű *Acinetobacter* izolátumok esetében még nem végeztem.

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 tapasztaltam. 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 vizsgáltam genetikai módszerekkel, melynek eredményei azonban nem hozhatóak minden esetben egyértelmű összefüggésbe a gravimetriás módszerrel meghatározott szénhidrogénbontási képességgel (pl. T3N6 törzs). 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, illetve halastavakban, melyekből közvetlen kapcsolatba kerülhetnek emberi tevékenységgel. Hiszen mindamellett, hogy patogén besorolásukkal és tulajdonságaikkal kockázati tényezőt jelentenek előfordulási helyük közelében élők és az ott dolgozók egészségére nézve, antibiotikum rezisztenciájuk révén a 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.

Szükséges tehát minden olyan intézkedés, óvintézkedés végrehajtása, mellyel az opportunisták kórokozók a közegészségügyi aggályokat nem keltő nagyságrendre szoríthatóak vissza.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikroorganizmusok között széles körben elterjedt a szénhidrogén-bontási képesség, amit a környezetvédelmi gyakorlat a bioremediációs eljárások során gyakran alkalmaz. A legjelentősebb szénhidrogén-bontó mikrobák között azonban előfordulnak opportunista kórokozók is, melyek jelenléte környezetegészségügyi aggályokat kelthet. Ezen ubikviter mikroorganizmusok ugyanúgy jelen lehetnek az egyéb környezeti elemekben is, mint felszíni vizek, halastavak. Jelentőségüket fokozza az egyes nemzetségek körében mind gyakrabban tapasztalható antibiotikum rezisztencia kialakulása és terjedése, mely multirezisztenciához vezethet. Az utóbbi időben klinikai térnyerésüknek 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.

Munkám során célom volt egy környezeti eredetű *Acinetobacter* törzsgyűjtemény létrehozása a környezeti kimutatás eszköztárának fejlesztése és adaptálása révén, majd az izolátumok antibiotikum rezisztencia profiljának, és szénhidrogén-bontó képességének meghatározása.

Vizsgálataim során 24 helyszínről származó, 366 környezeti minta vizsgálata alapján, egy többlépcsős izolálási módszeregyüttes kialakításával és alkalmazásával sikeresen gyarapítottam törzsgyűjteményünket, így összesen 37, környezeti eredetű *Acinetobacter* faj állt rendelkezésemre a további vizsgálati irányok végrehajtásához. Kísérleteim eredményeképpen megállapítottam, hogy a környezeti eredetű izolátumoknál is detektálható többszörös antibiotikum rezisztencia, valamint több esetben tapasztaltam a rezisztencia fokozódására utaló jeleket. A szénhidrogén-bontási képesség meghatározása során a vizsgált izolátumok esetenként kiváló bontási képességet mutattak, valamint detektáltam esetükben egy szénhidrogénbontó enzimeket kódoló génszakaszt is. Eredményeim tudatában megállapítottam, hogy az *Acinetobacter* nemzetség képviselői – elsősorban az *A. calcoaceticus* – környezeti mintákban megjelenhetnek, így a jövőben gyakoriságuk és jellemző tulajdonságaik nyomon követése figyelmet érdemel. Célszerű minden olyan intézkedés végrehajtása, melynek segítségével a hasonló tulajdonságokkal jellemezhető patogén mikroszervezetek visszaszoríthatóak.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném kifejezni hálámat konzulenseimnek, Dr. Szoboszlay 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.

Kutatómunkámat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás – Research Centre of Excellence – 17586-4/2013/TUDPOL és a TÁMOP-4.2.1B-11/2/KMR-2011-0003 pályázat támogatásával végeztem el.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- 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.
- Akinbowale, O. L., Peng, H., Grant, P., Barton, M. D. (2007): Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30, 177–182.
- 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.
- Atzél B. (2008): Bioaugmentációs eljárások biológiai monitoringja. PhD értekezés, Szent István Egyetem. Gödöllő
- Atzél, B., Szoboszlai, S., Mikuska, ZS., Kriszt, B. (2008): Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* - *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 211 143–155.
- Bacosa, H., Suto, K., Inoue, C. (2010): Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64: 702-710.
- Barcs I. (2006): Az antibiotikum-érzékenység és -rezisztencia. A Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének kiadványa, Budapest, 20 p.
- Baumann, P. (1968): Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *Journal of Bacteriology*, 96(1): 39-42.
- Béládi I., Kétyi I., Nász I., Váczi L. (1978): Orvosi mikrobiológia – immunitástan – parazitológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 508 p.
- 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.
- 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.
- Castanon, J.I.R., (2007): History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86: 2466-2471.
- Comi, G., Canton, C. (2011): Psychotropic bacteria. *Arthrobacter* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 372-378.
- Coyne, S., Courvalin, P., Périchon, B. (2011): Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3): 947–953.
- 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.
- 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.
- Fernandes, H., Viancelli, A., Martins, C. L., Antonio, R. V., Costa R. H. R. (2013): Microbial and chemical profile of a ponds system for the treatment of landfill leachate. *Waste Management* 33 2123–2128
- Fürst Zs. (2004): Farmakológia. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1248 p.
- Giamarellou, H., Antoniadou, A., Kanellakopoulou, K. (2008): *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32: 106–119.
- Gordon, N.C., Wareham, D.W. (2010) : Multidrug-resistant *A. baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35: 219–226.
- Harnisz, M., Tucholski S. (2010): Microbial quality of common carp and pikeperch fingerlings cultured in a pond fed with treated wastewater. *Ecological Engineering* 36 466–470
- Hedlund, B.P., Staley, J.T. (2001): *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1): 61-66.
- 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.
- Hoa, P. T. P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D. H., Viet, P. H., Suzuki, S. (2011): Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of the Total Environment* 409 2894–2901.
- 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.

- Horváth J. (1964): Mikrobiológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 247.
- Hugo, W.B., Russel, A.D. (1998): Pharmaceutical Microbiology, Blackwell Science Ltd., Oxford, 510 p.
- 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.
- Igra-Siegmán, Y., Chmel, H., Cobbs, C. (1980): Clinical and Laboratory Characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(2): 141-145.
- Jawad, A., Hawkey, P. M., Heritage, J., Snelling, A.M. (1994): Description of Leeds *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.
- 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.
- Kaszab E. (2010): A *Pseudomonas aeruginosa* környezetbiztonsági jelentősége antropogén hatás alatt álló közegekben. PhD értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő, 100 p.
- Kaszab, E., Kriszt, B., Atzél, B., Szabó, G., Szabó, I., Harkai, P., Szoboszlay, S. (2010): The Occurrence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* on Hydrocarbon-Contaminated Sites - *Environmental Microbiology* 59:37-45.
- Kaszab, E., Szoboszlay, S., Dobolyi, Cs., Háhn, J., Pék, N., Kriszt, B. (2011): Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts - *Bioresource Technology* 102 1543-1548.
- 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 *Acinetobacter* sp.. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1): 94-96.
- 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.
- 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.
- 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.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R. (1990): Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 54(3): 305-315.
- 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.
- 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.
- Losonczy Gy. (2001): A klinikai epidemiológia alapjai, A nosocomialis fertőzések járványtana. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1027 p.
- Ludwig E. (1999): Amit érdemes tudni az antibiotikumokról. *Hippocrates családorvosi és foglalkozás-egészségügyi folyóirat*, 1(2): 116.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Moser M., Pálmai Gy. (1992): A környezetvédelem alapjai. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 494 p.
- Nász I. (1982): Mikrobiológia és immunitás, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 400 p.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J. K., Deschaght, P., Passet, V., Vanechoutte, M., Brisse, S., Dijkshoorn, L. (2011): Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic species 3*) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic species 13 TU*) - *Research in Microbiology*; 162 393-404.

- Nemzeti Bakteriológiai Surveillance Adatfeldolgozó Csoport. A magyarországi mikrobiológiai surveillance antibiotikum rezisztencia eredményei. Országos Epidemiológiai Központ, <2010., 2011., 2012.>; Online www.oek.hu
- Obayori, O.S., Adebuseye, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Pászti J., Jánvári L., Tóth Á. (2011): Multirezisztens *Acinetobacter baumannii* klinikai izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata. *Mikrobiológiai Körlevél*, 11(1): 3–12.
- 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.
- Simon T. (1991): Baktérium-, alga-, gomba-, zuzmó- és mohahatározó, Tankönyvkiadó, Budapest, 793 p.
- Szabó I. M. (2008): Az általános talajtan biológiai alapjai, Mundus Magyar Egyetemi Kiadó, Budapest, 405 p.
- Szalka A. (2003): A korszerű antibiotikum-terápia. Az antibiotikum-választás szempontjai a klinikai gyakorlatban. *LAM (Lege Artis Medicinae)*, 13(4): 298–302.
- Szoboszlai S., Kriszt B. (2008): Környezethigiénia, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 60 p.
- 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.
- Towner, K.J. (2009): *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*, 73: 355–363.
- 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.
- Zeinali, M., Vossoughi, M., Ardestani, S. K. (2008): Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. *Chemosphere*, 72: 905–909.

Jogszabályok, szabványok

- 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- Seventh 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

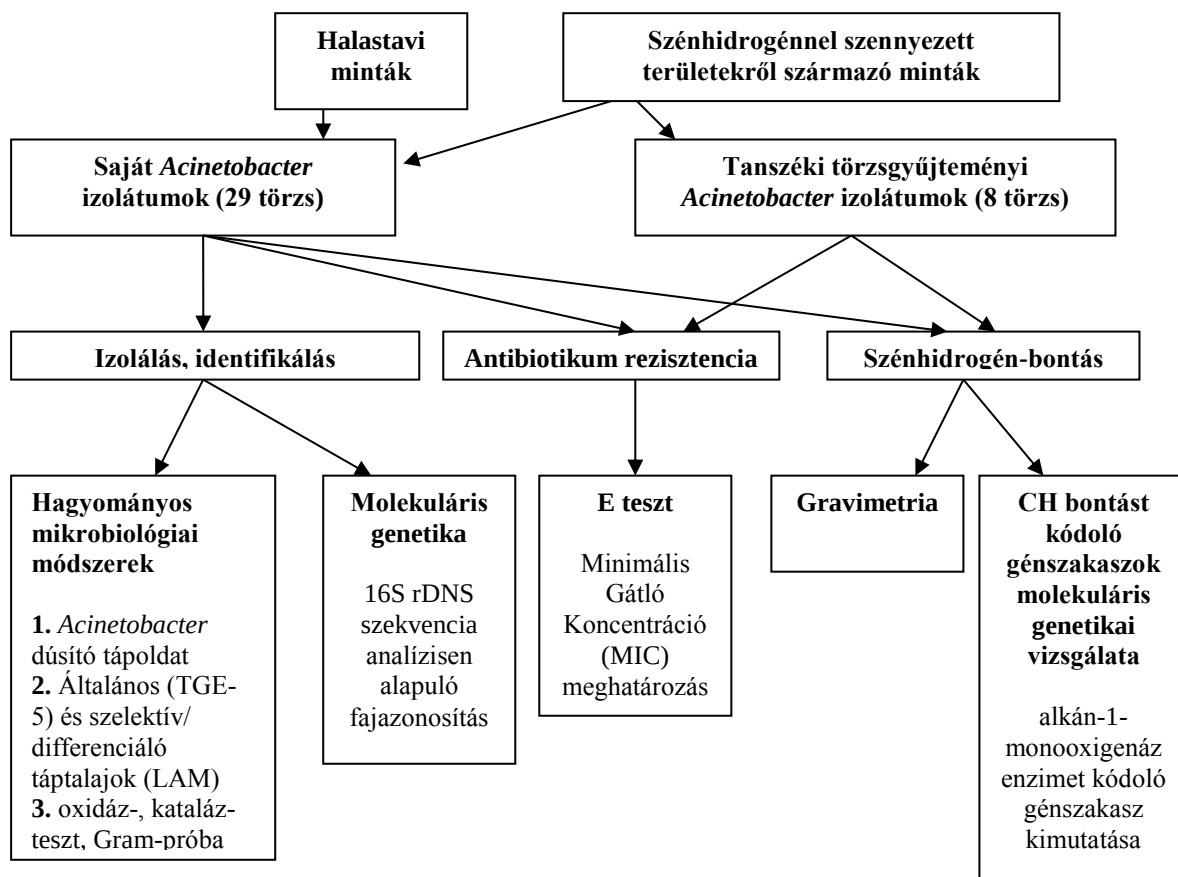
MSZ 21464: 1998. Mintavétel felszín alatti vizekből.

Internetes hivatkozások

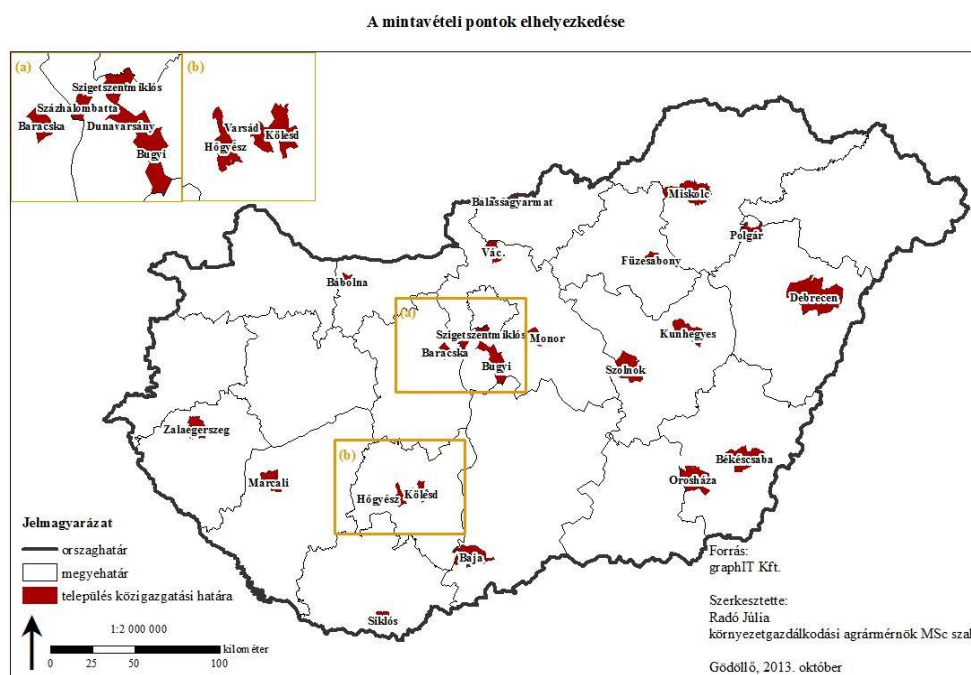
- http1: <http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/acinetobacter.html>
- http2: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- http3: <http://acinetobacter.org/>
- http4: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/AcinetobacterMedia.html
- http5: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- http6: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=DD:05:04:32000L0054:HU:PDF>

MELLÉKLET

1. sz. melléklet: A környezeti eredetű *Acinetobacter* izolátumok laboratóriumi vizsgálatának főbb irányai, lépései, módszerei



2. számú melléklet: A felszíni- és felszín alatti víz mintavételi pontok elhelyezkedése az országban, melyeket *Acinetobacter* izolálás céljából vételeztünk



3. sz. melléklet: A kísérletek során alkalmazott táptalajok

Acinetobacter dúsító tápoldat (Baumann, 1968): összetétel: 4,21 g KH ₂ PO ₄ , 0,749 g Na ₂ HPO ₄ , 2 g 0,2%-os Na-acetát, 2 g 0,2%-os KNO ₃ , 0,2 g 0,02%-os MgSO ₄ 7 H ₂ O, 20 ml Hutner féle ásványi kiegészítő, 1000 cm ³ desztillált víz
TGE-5 tápagar: összetétel: 10g Tripton, 5g Glükóz, 10g Élesztőkivonat, 18g Bakteriológiai agar, 1000 cm ³ desztillált víz
Leeds Acinetobacter 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 cm ³ desztillált víz, valamint szelektív ágesként 10 mg vancomycin, 15 mg cefsulodin, 50 mg cephradine
OIR III : 5,0 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,5 g KH ₂ PO ₄ ; 1,0 g K ₂ HPO ₄ ; 0,5 g MgSO ₄ ×7H ₂ O; 0,2 g CaCl ₂ ×6H ₂ O; 0,01 g FeSO ₄ ×7H ₂ O; 0,5 g pepton, 0,5g élesztőkivonat, 1000 cm ³ desztillált víz

4. 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

5. sz. melléklet: Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei

Antibiotikum rezisztencia (R/I/S)																									
	hatóanyag csoport	Karbapenemek		Aminogli- kozidok	Fluorokinolonok		Cefalosporinok				Glicilcikli- nek	Penicilli- nek	Rifamycinek												
	hatóanyag	IP/IMI	MP/MRP	GM/CN	CI/CIP	OF/OFX	CT/CTX	TZ/CAZ	TX/CRO	PM/FEP	TGC	PP/PIP	RD												
	hatóanyag konc. (µg)	0,002-32	0,002-32	0,016-256	0,002-32	0,002-32	0,016-256	0,016-256	0,016-256	0,016-256	0,016-256	0,016-256	0,002-32												
	Törzs jele/Faj																								
ACB komplex	Sk-V/3 / A. baumannii	S	0,19	S	0,25	S	1,5	S	0,19	S	0,75	S	8	S	3	I	12	S	2	S	0,094	S	16	I	3
	HT-4/1 / A. baumannii	S	0,125	S	0,125	S	0,5	S	0,012	S	0,125	S	4	S	3	S	8	S	1,5	S	<0,016	S	0,094	S	0,5
	HT-4/3 / A. baumannii	S	<0,002	S	0,19	S	<0,016	S	0,094	S	0,25	S	0,75	S	2	S	0,75	S	2	S	0,047	S	16	S	<0,016
	II HT-3/1 / A. baumannii	S	0,19	S	0,125	S	0,5	S	0,064	S	0,19	S	8	S	6	S	3	S	8	S	0,047	I	24	I	3
	TN6 / A. calcoaceticus	S	0,19	S	0,25	S	1	S	0,38	S	0,38	I	24	S	6	I	48	I	16	S	0,023	I	24	I	2
	PT 2/2 / A. calcoaceticus	S	0,125	S	0,38	S	1	S	0,25	S	0,38	I	16	S	4	I	32	S	3	S	0,032	I	24	I	1,5
	PT 3/6 / A. calcoaceticus	S	0,125	S	0,25	S	1,5	S	0,19	S	0,25	I	12	S	4	I	24	S	4	S	0,047	I	32	I	1,5
	PT 3/9 / A. calcoaceticus	S	0,125	S	0,25	S	0,38	S	0,19	S	0,25	S	8	S	3	I	16	S	2	S	0,047	I	32	I	2
	1/2 / A. calcoaceticus	S	0,19	S	0,25	S	0,75	S	0,094	S	0,38	I	16	S	8	I	48	S	4	S	0,032	I	32	I	1,5
	5/06/4 / A. calcoaceticus	S	0,125	S	0,25	S	3	S	0,19	S	0,25	I	24	S	6	I	24	S	6	S	0,032	I	48	I	1,5
	PM 5 / A. calcoaceticus	S	0,19	S	0,19	S	1	S	0,19	S	0,38	I	24	S	6	I	48	S	6	S	0,047	R	>256	I	1,5
	PM 7 / A. calcoaceticus	S	0,25	S	0,25	S	2	S	0,19	S	0,5	I	16	S	8	I	16	S	4	S	0,047	I	64	I	3
	PM 13 / A. calcoaceticus	S	0,19	S	0,38	S	0,75	S	0,19	S	0,25	I	24	S	6	I	32	S	4	S	0,032	R	>256	I	2
	PM 7/3 / A. calcoaceticus	S	0,125	S	0,25	S	1	S	0,125	S	0,38	I	12	S	4	I	24	S	2	S	0,047	S	16	I	1,5
	DM-5/1 / A. calcoaceticus	S	0,5	S	0,25	S	2	S	0,5	S	0,25	I	24	S	4	I	16	I	12	S	0,094	I	24	I	1,5
	Sk-V / A. calcoaceticus	S	0,5	S	0,38	S	1	S	0,38	S	0,19	I	16	S	6	S	12	S	8	S	0,094	I	32	I	3
	5/06 / A. calcoaceticus	S	0,75	S	0,38	S	1	S	0,38	S	0,25	I	48	S	8	I	32	I	16	S	0,094	I	32	I	3
	22 / A. calcoaceticus	S	0,5	S	0,19	S	0,5	S	0,38	S	0,19	I	12	S	4	I	16	S	8	S	0,125	I	32	I	2
	24 / A. calcoaceticus	S	0,5	S	0,25	S	1,5	S	0,38	S	0,19	I	24	S	4	I	24	S	8	S	0,094	I	32	I	3
	42 / A. calcoaceticus	S	0,75	S	0,38	S	0,75	S	0,5	S	0,25	I	32	S	8	I	16	I	12	S	0,125	I	32	R	4
	J5 / A. calcoaceticus	S	0,75	S	0,5	S	0,75	S	0,5	S	0,25	I	24	S	6	I	16	I	16		n.d.	I	32	I	3
	J7 / A. calcoaceticus	S	1	S	0,25	S	0,5	S	0,75	S	1	I	32	S	4	I	24	I	12		n.d.	I	32	I	3
	TV-11/J4 / A. calcoaceticus	S	0,75	S	0,38	S	1	S	0,38	S	0,125	I	32	S	8	I	16	I	16		n.d.	I	24	R	4
	SV/1 / A. calcoaceticus	S	1	S	0,19	I	8	S	0,5	S	0,25	I	32	S	4	I	16	S	8	S	0,064	I	24	I	3
	PM 15/3 / A. pittii	S	0,19	S	0,25	S	1	S	0,19	S	0,25	I	12	S	2	I	12	S	2	S	0,064	I	32	I	2
	II HT-1/1 / A. pittii	S	0,5	I	48	S	0,125	S	0,125	S	8	S	4	S	6	S	4	S	0,047	S	0,38	S	0,125	I	3
	BUT-8/1 / A. pittii	S	1	S	0,38	S	0,75	S	0,25	S	0,25	I	12	S	3	S	8	S	4	S	0,125	I	24	I	2
	FK-3/J2/ A. pittii	S	1	S	0,25	S	1,5	S	0,25	S	0,25	I	16	S	4	I	12	S	6	S	0,064	I	24	R	4
	T3N6 / A. beijerinckii	R	>32	R	>32	S	0,38	S	0,75	S	0,38	R	>256	R	>256	R	>256	R	48	S	0,023	I	24	S	0,75
	Z4N3 / A. beijerinckii	S	0,094	S	0,75	S	0,19	S	0,125	S	0,25	S	1,5	S	3	S	4	S	1,5	S	0,094	S	12	S	0,75
	Z4SZ2 / A. johnsonii	S	0,125	S	0,19	S	0,5	S	0,047	S	0,19	S	6	I	12	S	3	S	8	S	<0,016	S	8	S	0,5
	ST-2 / A. johnsonii	S	0,75	S	0,38	S	0,75	S	0,125	S	0,094	S	8	S	8	S	1,5	I	16	S	0,047	I	24	I	1,5
	J6 / A. johnsonii	S	0,5	S	0,19	S	0,19	I	2	S	2	R	>256	R	>256	R	128	R	>256		n.d.	S	6	I	1,5
	6/1 / A. johnsonii	S	0,5	S	0,38	S	0,75	R	6	S	0,25	R	>256	R	>256	R	>256	I	24	S	0,023	R	>256	S	0,5
	6/2 / A. gyllenbergii	S	0,75	S	0,064	S	0,125	S	0,38	I	4	R	128	R	128	I	24	R	32	S	0,023	R	>256	S	1
	J3 / A. radioresistens	S	3	S	0,094	S	1	S	0,094	S	0,19	S	1	S	0,5	S	1,5	S	0,5		n.d.	R	>256	I	3
	II HT-4/2 / A. soli	S	0,064	S	0,125	S	0,25	S	0,032	S	0,38	S	3	S	1,5	S	2	S	4	S	<0,016	R	>256	I	1,5
	T3N9 / A. venetianus	S	0,125	S	0,75	S	0,75	S	0,094	S	0,19	S	3	S	6	S	8	S	4	S	0,047	S	8	I	1,5

GM/CN- genatmicin, PP/PIP – piperacillin, IP/IMI- imipenem, MP/MRP – meropenem, CT/CTX – cefotaxime, TZ/CAZ – ceftazidime, TX/CRO – ceftriaxone,

PM/FEP – cefepime, CI/CIP - ciprofloxacin, OF/OFX – ofloxacin, TGC – tigecycline, RD – rifampicin

R-resistant/rezisztens, I-intermediate/átmeneti, S-sensitive/érzékeny ; n.d.-no data/nincs adat

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, 2015. ÁPRILIS 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, 2015. ÁPRILIS hó.....nap

.....
konzulens aláírása