



Széchenyi István Egyetem
Műszaki Tudományi Kar
Környezetmérnöki BSc Szak



Tudományos Diákköri Dolgozat

Antibiotikum rezisztens baktériumok és hepatitis A vírus vizsgálata szennyvízben és a Mosoni-Duna vízében

Készítette:	Farkas Alexandra
Intézmény:	Széchenyi István Egyetem
Szak-szakirány:	Környezetmérnöki BSc- Környezettechnika
Konzulensek:	Kiss Csaba Pestiné dr. Rácz Éva Veronika
Lezárás dátuma:	2014. 12. 20.

Győr, 2014.

TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	3
1. BEVEZETÉS.....	4
2. CÉLKITŰZÉS.....	6
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	6
3.1 MINTAVÉTELI HELYEK BEMUTATÁSA	6
3.1.1 Szennyvíztelepek bemutatása	7
3.1.2 Felszíni vízminta vevő helyek.....	12
3.2 MINTAVÉTELEZÉS.....	13
3.3 MIKROBA KIMUTATÁS.....	14
3.3.1 <i>Enterococcus faecalis</i> , és <i>Escherichia coli</i> baktériumok kimutatása.....	14
3.1.2 HAV kimutatása	19
4. EREDMÉNYEK	20
4.1 <i>Enterococcus faecalis</i> , és <i>Escherichia coli</i> baktériumvizsgálat eredménye	20
4.2 RT-PCR eredmények.....	24
4.3 Statisztikai eredmények	28
5. ÉRTÉKELÉS, ÉS ÖSSZEFOGLALÁS	35
6. IRODALOMJEGYZÉK	36
7. ÁBRAJEGYZÉK.....	37
8. TÁBLÁZATJEGYZÉK	37

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék Mindenkinek köszönetet mondani a munkámban nyújtott segítségükért:

- belső konzulensemnek **Pestiné Dr. Rác Évának** a Széchenyi István Egyetem Környezetmérnök Tanszék egyetemi docensének,
- külső konzulensemnek **Kiss Csabának**, a Győr-Moson-Sopron Megyei Kormányhivatal Népegészségügyi Szakigazgatási Szerv laboratóriumvezetőjének, hogy lehetőséget kaptam a laboratóriumban történő kutatómunkára, valamint szakmai tanácsaiért, és útmutatásaiért,
- a Győr-Moson-Sopron Megyei Kormányhivatal Népegészségügyi Szakigazgatási Szerv laboratórium dolgozóinak, a sok segítségért és hasznos tanácsért, amit a munkám során nyújtottak,
- a **Pannon-Víz Zrt.-nek**, hogy lehetővé tette a Győri, és az Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telepen történő mintavételezést,
- a Győri, és az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep dolgozóinak, hogy segítségükkel támogatták a telepen történő mintavételezést.

1. BEVEZETÉS

A körülöttünk létező különböző mikroorganizmusokkal már az ősidők óta szoros interakcióban élünk. Napjainkban is hasznosítjuk tevékenységük, illetve szenvedjük kár-, és kórokozásuk eredményeit (1). Ezek a mikroszervezetek előfordulhatnak a normál humán flórában (emberi testben), mesterséges, és a természetes környezetben egyaránt (2). Mivel a Földön élő mikrobák többsége nem humán kórokozó, így Magyarországon, hasonlóan a többi európai országhoz, úgynevezett indikátor kórokozókkal vizsgálják az emberi szempontból káros mikrobiális szennyeződések jelenlétét élelmiszerekben, vizekben. Ezek a kórokozók jelezhetnek fekáliás szennyeződést, technológiai hibákat a különböző eljárásokban, vagy egyszerűen csak az ember jelenlétét bizonyos helyeken. Ilyen, fekáliás indikátor baktérium például az *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), és az *Escherichia coli* (*E. coli*). A vizsgálatok során arra kerestük a választ, hogy ezek az indikátorok mennyire jelzik az egészségügyi alap- és szakellátásban egyre nagyobb gondot jelentő antibiotikum rezisztens baktériumok (ESBL és AmpC termelő *E.coli*, vancomycin rezistens *E. faecalis*) jelenlétét. Virulens *E. coli* törzsek felelősek a gastroenteritiszért (gyomor-bélhurut, gyomorinfluenza), húgyúti fertőzésekért, és a meningitiszért (agyhártyagyulladás) is. Az *E. faecalis* szintén gyakori kórokozója a humán megbetegedéseknek. A szervezetben húgyúti infekciókat, tüdőgyulladást, bőrfertőzést, és agyhártyagyulladást eredményezhet. Ezeket a megbetegedéseket antibiotikus kúrával kezelik, azonban mindkét mikroszervezet ellenállóvá válhat bizonyos antibiotikumokkal szemben (3). A rezisztencia kialakulására jellemző, hogy a mikroba olyan gént szerez, amely gátolja vagy teljesen megszünteti az antibiotikum antimikrobiális tulajdonságát (4). Ez végbemehet spontán módon, genetikai mutációval vagy genetikai elemek kapcsolódásával. Az *E. faecalis*-nak számos antibiotikummal szemben van szerzett rezisztenciája (makrolidek, tetracyclin, lincosamidok, chloramphenicol, glycopeptidek - vancomycin, teicoplanin) (4). Az enterococcusok közül a vancomycin-rezisztens törzsek a legveszélyesebbek, mert az általuk kiváltott infekció kezelésének lehetőségei szűkösek. A vancomycin rezisztens *E. faecalis* törzseknél a mureinben a D-alanin/D-alanin kapcsolat helyett D-alanin/D-laktám kötés alakul ki. Így a célmolekulák módosulása miatt az antibiotikum máshova kapcsolódik és elveszíti a hatását.

Az antibiotikum-rezisztens baktériumok kórokozók másik lényeges és veszélyes csoportja az ESBL enzimeket (extended-spectrum beta-lactamases, vagyis széles spektrumú béta-laktamázokat) és AmpC termelő Gram-negatív baktériumok (5). Ezek a mikrobák olyan

enzimeket termelnek, amelyek a 3. generációs cephalosporinokat is hatástalanná teszik, ez megnehezíti az ellenük való védekezést. Ilyen ESBL enzimet termelő baktérium például *E. coli*. „A leggyakrabban alkalmazott antibiotikumok ma is a β -laktámok, az ezeket bontó különböző, egyre változatosabb és szélesebb szubsztrát-spektrumú β -laktamázok kerülnek előtérbe és terjednek folyamatosan” (6).

A rezisztencia kialakulásának oka a nem megfelelő antibiotikum használat is lehet. Lényegében három esetet érdemes említeni, amely a rezisztenciához vezet. Az első, amikor enyhe megbetegedés esetén már antibiotikum kezelést alkalmaznak. A második, hogy egyes országokban nem vényköteles antibiotikum származékok kerülnek a forgalomba. A harmadik eset, hogy egyes helyeken az állati táplálékhoz is antibiotikumot adagolnak fertőzés megelőzése miatt.

A kommunális szennyvízben baktériumok mellett, patogén vírusok is előfordulhatnak, mint például az adenovírusok, az enterovírusok, a norovírusok és a hepatitis A vírus (HAV) (7). Jelen munkánkban a hepatitis A vírusra fektettük a hangsúlyt. A HAV lappangási ideje 10-50 nap is lehet. Gyerekek esetében a fertőzés tünetmentes, csak a májenzim-értékek jelzik (3). Felnőtteknél előforduló megbetegedés változatos klinikai tünetekkel (láz, hányinger, hányás, étvágytalanság, alhasi fájdalmak, sötét vizelet) jár. A gyógyulási idő több hónapot is felöllelhet. Kezelésként ajánlott a pihenés, kímélő étrend, és folyadékpótlás.

A víz az emberi szervezet számára is pótolhatatlan, ezért fontos az egészségre káros mikroorganizmusoktól való mentessége. Tehát kiemelt fontossággal bír a szennyvizek kezelése, tisztítása, hogy amikor a kezelést követően visszajuttatják a tisztított szennyvizet a természetes vízkörforgásba, akkor az ivóvízként felhasznált felszín alatti és felszíni vizek patogén mikroszervezetekkel ne szennyeződjenek. Munkánk során ezeknek, a Magyarországon felszíni- és szennyvizekben eddig kevésbé, vagy egyáltalán nem tanulmányozott kórokozók jelenlétét vizsgáltuk, hogy teljesebb képet kapjunk a szennyvíztisztítási technológiák hatékonyságáról, illetve a felszíni fürdők használata során ránk leselkedő veszélyekről.

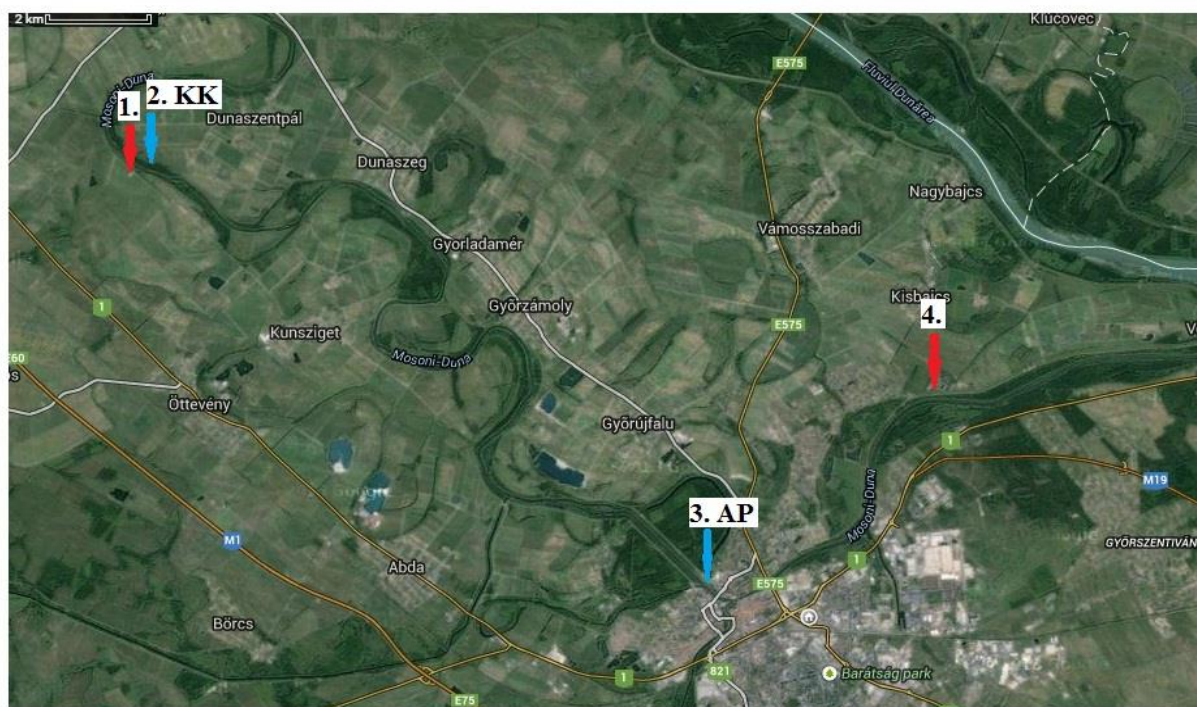
2. CÉLKITŰZÉS

Alapvetően a tanulmány céljául azt tűztük ki, hogy a több hónapos mintavételi periódus során a szennyvizekből, felszíni vizekből, természetes fürdővizekből, olyan mintavételi és tenyésztési vizsgálati módszerek alkalmazását mutassuk be, amelyek során antibiotikum rezisztens *Enterococcus faecalis*, és *Escherichia coli* baktériumok jelenlétét tudjuk kimutatni. Illetve olyan eljárásokat ismertessünk, melyekkel a hepatitis A vírust lehet koncentrálni és kimutatni felszíni- és szennyvizekből egyaránt. Továbbá fontosnak tartottuk a szennyvíztisztítás hatékonyságának ellenőrzését, amellyel megállapítható a befogadó víztest vírusterhelése, és a vizsgálatok során összefüggéseket kerestünk a fekáliás indikátorok mennyisége és az általunk vizsgált kórokozók jelenléte közt.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 MINTAVÉTELI HELYEK BEMUTATÁSA

A vizsgálatokhoz szükséges szennyvízmintát két szennyvíztelepről (Alsó-szigetközi-, Győri Szennyvíztisztító telep), a felszíni mintát pedig a Mosoni-Duna két pontjáról (Kunsziget, győri Aranypart I.) gyűjtöttük. A mintavételek 1 éven keresztül kb. 2-3 havi rendszerességgel (2013.10.24, 2013.11.28, 2014.01.24, 2014.02.27, 2014.04.10, 2014.06.05, 2014.10.20) zajlottak. Az 1. ábrán összefoglalóan feltüntettük a mintavételi pontokat.



1. Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telep
2. Kunsziget: Mosoni-Duna mintavevő pont [KK]
3. Aranypart I.: Mosoni-Duna mintavevő pont [AP]
4. Győri Szennyvíztisztító telep

felszíni víz ●
szennyvíz ●

1. ábra Az antibiotikum rezisztens baktériumok és a HAV vizsgálatához vett minták helyének meghatározása térképen (Google maps [1] alaptérkép felhasználásával)

3.1.1 Szennyvíztelepek bemutatása

A mikrobiológiai mérésekhez szükséges szennyvízmintákat a Győri és az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telepről gyűjtöttük. A Kunsziget melletti Alsó-szigetközi szennyvíz tisztító telepre azért esett a választás, mert a telep a folyásirányt tekintve felfelé helyezkedik el az Mosoni-Duna Aranyparti szakaszához képest, amely Győr egyik közkedvelt szabad fürdőzőhelye. A telep a Mosoni-Dunába vízébe vezeteti a kezelt szennyvizet, ahonnan a természetes vizeket károsító szennyeződések eljuthatnak a győri szabad strandokhoz, így ellenőrizhettük az alkalmazott szennyvíztisztítási technológia hatékonyságát, illetve a felszíni fürdők vizét befolyásolja-e a Mosoni-Dunába kibocsájtott szennyvíz. A Győri szennyvíztelepen pedig azért vettünk mintákat, hogy megismerjük egy nagy szennyvíztisztító telepen működését. Hogyan változnak az általunk vizsgálandó patogén mikrobák száma, és jelenléte, mivel itt minden lépés külön műtárgyban zajlik.

Győri Szennyvíztisztító telep

A Győri szennyvíztisztítóban 15 település szennyvizét kezelik (Győr, Győrújfalú, Kisbajcs, Nagybajcs, Vámoszabadi, Vének, Töltéstava, Győrújbarát, Koroncó, Börcs, Abda, Ikrény, Rábapatoná, Gönyű, Nagyszentjános) (11). A 2. ábrán a telep tekinthető meg madártávlatból.



2. ábra A Győri Szennyvíztisztító telep madártávlatból [2]

A 2006-ban befejeződött felújítás óta 95%-os tisztítási hatásfokkal működik a tisztítómű. Az ideérkező kommunális szennyvíz különböző méretű, jellegű szennyezőanyagokat tartalmaz, amelyeket a tisztítási technológia során különböző műtárgycsoportokban választanak szét.

A telepre érkező szennyvíz elsőként a 6 mm pálcaközü rácson folyik át (8). A következő lépés a szennyvízben lévő homok és a felúszó zsírok eltávolítása a három fedett, hosszanti homokfogó medencében, légbefúvás mellett. A keletkező bűzt okozó gázokat biofilteren keresztül tisztítják. Ezt követően a szennyvíz a közbenső ülepítőkbe kerül. A telepen két 40 méter átmérőjű Dorr medence üzemel. Az eleveniszapos medencékben többféle baktérium segítségével tisztítják a kezelendő vizet. A levegőztető medencében légbefúvással biztosítják a szükséges oxigént az aerob baktériumoknak. A biológiai medence két részből áll. Az egyik az oxikus, a másik az anoxikus tér (9). Majd az utóülepítés következik, ahol a cél a baktérium szaporulat fölöslegének, azaz a fölös iszap a kinyerése. A befogadóba eresztés előtt a szennyvizet a benne lévő fertőző (patogén) mikroorganizmusok miatt klór, vagy annak származékainak adagolásával lehet fertőtleníteni. A szennyvíz kezelés végén a tisztított

1. GYB
2. GYA
3. GYO
4. GYE

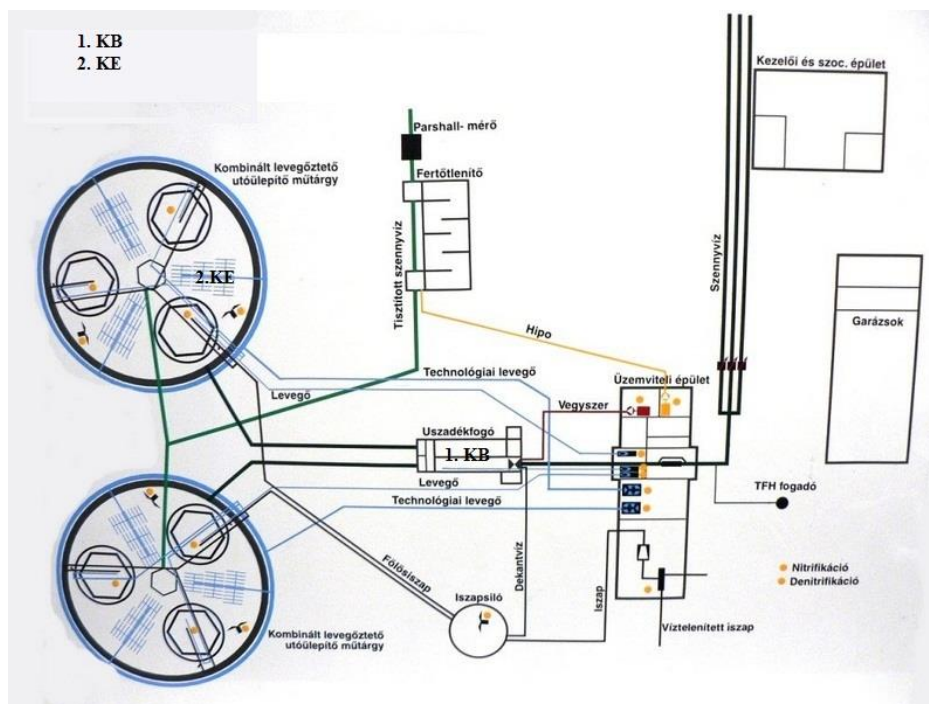
Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep

9



4 ábra Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep madártávlatból [4]

A szennyvíztelep első műtárgya a gépi tisztítású rács. A durva mechanikai szennyező anyagoktól való mentesítés után a szennyvíz a légbefúvásos homok- és zsírfogó műtárgyba kerül. A homok- és zsírfogó műtárgy végén egy osztó rendszer segítségével az egymással párhuzamosan üzemelő kombinált műtárgyba folyik a kezelendő víz, amelyben az aerob és anoxikus folyamatok, valamint a fázisszétválasztó utóülepítés is zajlik. A tisztított szennyvíz ezután a fertőtlenítő műtárgyba folyik. A telepen a fertőtlenítés klórgázzal történik, amely csak időszakos a telepen. Végül a kezelt vizet a Mosoni- Dunába vezetik. Az 5. ábrán az Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telep OMS típusú szennyvízkezelő rendszer kapcsolási sémája tekinthető meg.



5. ábra Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep OMS típusú szennyvízkezelő rendszer kapcsolási sémája [5]

Az 1. táblázat összefoglalja a két szennyvíztisztító telep limitáló tényezőit. Ilyen tényező például a tervezett és tényleges lakos egyenértéket, illetve a tervezett és tényleges terhelést.

1. táblázat: A Győri és az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep limitáló tényezői (2014, Pannon-Víz Zrt., 2014 nyomán)

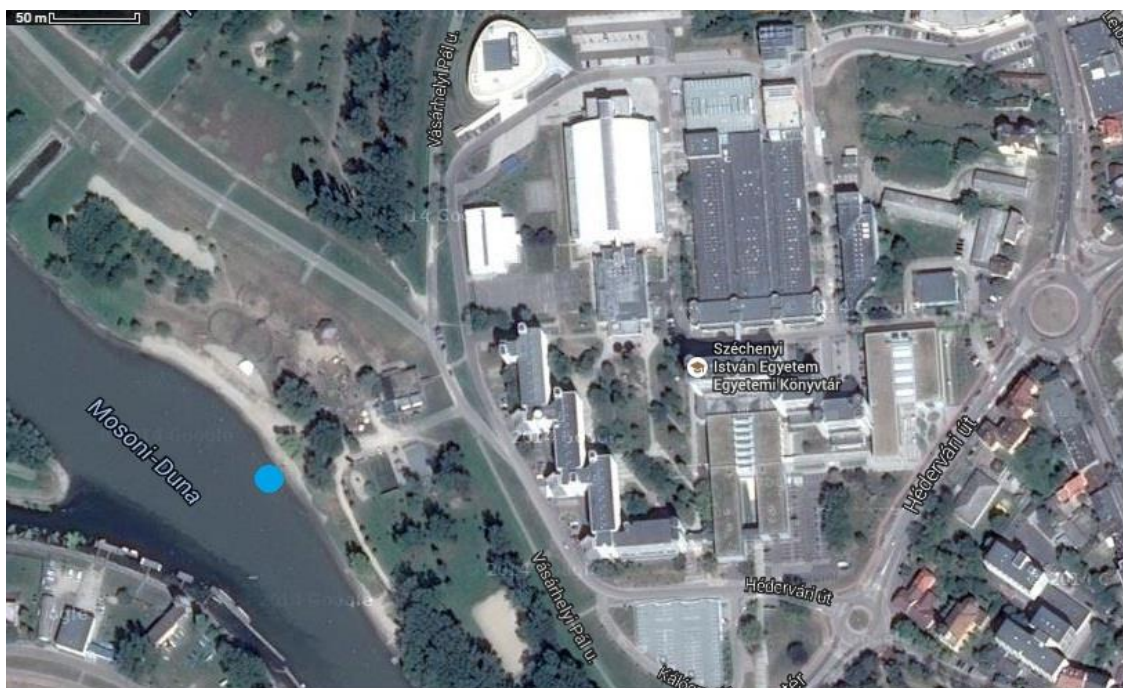
Szennyvíztisztító telephelye	Tervezett LE	Tervezett Terhelés m3/nap	Tényleges LE	Tényleges Terhelés m3/nap	Ellátott települések	Tisztítás technológia
Győr	375.000	60.000	175.724	25.891	Győr, Abda, Börcs, Ikrény, Rábapatonna, Győrújfalú, Vámoszabadi, Kisbajcs, Győrújbarát, Nagybajcs, Vének, Koroncó, Töltéstava, (Gönyű, Nagyszentjános).	Mechanikai előtisztítás, egylépcsős eleveniszapos biológiai tisztítás, anaerob iszapstabilizálás, gépi iszap víztelenítés.
Alsó-szigetköz	14.200	2.500	12.723	1.628	Kunsziget, Öttevény, Mecsér, Moson-szentmiklós, Lébény, Dunaszentpál, Dunaszeg, Győrladamér, Győrzámoly	OMS technológia, biológiai eleveniszapos rendszer, gépi iszap víztelenítés, mezőgazdasági iszaphasznosítás.

3.1.2 Felszíni vízminta vevő helyek

Az antibiotikum rezisztens baktériumok és a HAV vizsgálatához a Mosoni-Duna vízből is vételeztünk mintát. Két mintavételi pontot határoztunk meg. Az első pont az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep melletti szakasz, a másik pedig a Széchenyi István Egyetem mellett található Aranypart I. szabadstrand rész. Az 6-7. ábrán légi felvétel látható a Mosoni-Duna két mintavevő pontjáról.



6. ábra Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep melletti Mosoni-Duna szakasz [6]



7. ábra A Mosoni-Duna Aranypart I- szabadstrand szakasz [7]

A mintavételi pontok kiválasztásánál azt tartottuk szem előtt, hogy az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep elfolyó szennyvizének, és a Mosoni-Duna felszíni vizének mikroorganizmus tartalmának változásai között összefüggéseket tudjunk keresni. Illetve ellenőrizni tudjuk, hogy a győri fürdőzőket ezek a baktériumok, és vírus veszélyeztethetik-e. A 1. ábrán található térképen feltüntettük az összes mintavételi pont helyét. A szennyvíz mintavételi pontokat pirossal, míg a felszíni vizeket kékkel jelöltük.

3.2 MINTAVÉTELEZÉS

A mintavételezések során a szennyvíz esetén 0,5 l, felszíni víz esetén 10 l folyadékot gyűjtöttünk be. A mintákat az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telepen a befolyó, és elfolyó, a Győri Szennyvíztisztító telep esetében pedig a befolyó, az anoxikus, az oxikus, és az elfolyó medencéből vettük. Az egyik felszíni vízmintát az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep mellett, Kunszigethez közel a Mosoni-Duna vizéből, a másik a Mosoni-Duna Aranypart I. szabad strandi szakaszáról vételeztük. A 1. ábrán megtekinthetők a mintavételi pontok. Az adatokat a 2. számú táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat: A vizsgálatokhoz gyűjtött vízminták jelzései, specifikációi

A vizsgálatok mintavételi pontjai				
	Sorszám	Egyéni jel	Mintavétel helye	Minta térfogata [dm ³]
Győri Szennyvíztisztító telep	1.	GYB	befolyó medence	0,5 l
	2.	GYA	anoxikus medence	0,5 l
	3.	GYO	oxikus medence	0,5 l
	5.	GYE	elfolyó medence	0,5 l
Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep		KB	befolyó medence	0,5 l
		KE	elfolyó medence	0,5 l
Kunsziget Mosoni-Duna		KK	Mosoni-Duna	10 l
Aranypart I. Mosoni-Duna		AP	Mosoni-Duna	10 l

A 3. és 5. ábrán számokkal jelöltük a mintavételi helyeket, és a hozzájuk tartozó egyéni jelüket is.

3.3 MIKROBA KIMUTATÁS

3.3.1 *Enterococcus faecalis*, és *Escherichia coli* baktériumok kimutatása

A víz minőségének megítélésében fontos szerepe van a fekáliás szennyeződés mértékének. Ezért az alábbi vizsgálat célja *E. faecalis*, és *E. coli* baktériumok jelenlétének megállapítása. A fekáliás szennyeződést előidéző baktériumok az ember és a melegvérű állatok bélfájában megtalálhatók, ezért indikátorbaktériumoknak tekintjük ezeket a mikrobákat. Továbbá azért is esett ezekre a kórokozókra a választásunk, mert a 78/2008. (IV. 3.) Korm. rendelet (A természetes fürdővizek minőségi követelményeiről, valamint a természetes fürdőhelyek kijelöléséről és üzemeltetéséről) is e két baktérium alapján minősíti a szabadstrandok vízminőségét, illetve a szennyvizet pedig coliform számra (*E. coli* a coliform-csoport tagja) kell minősíteni a hatályos magyar jogszabályok szerint.

Microplates módszer

A microplates vizsgálat egy szabványosított módszer (MSZ EN ISO 7899-1:2000 és MSZ EN ISO 9308-3:2000). Az eljárás során előre gyártott microplate lemezeket alkalmaztunk, melyek *E. faecalis* [MUD/SF Microplates/Kit Enterococci (Bio-Rad, Franciaország)], és *E. coli* [MUG/EC Microplates/Kit E.coli (Bio-Rad, Franciaország)], baktériumok mennyiségi meghatározására szolgálnak. A mintákat homogenizálását követően különböző koncentrációban hígítási sorozatot készítettünk. A felszíni víz, és a szennyvíz esetében is más hígítási aránnyal dolgoztunk. A módszer folyamán a baktériumok az előre elkészített dehidratált táptalaj segítségével olyan enzimműködést mutat, amely hatására pozitív eredmény esetén a minták kéken fluoreszkálnak UV fény hatására (8. ábra). A 3. táblázat tartalmazza a microplates módszerhez szükséges hígítási sorozat összetételét az *E. faecalis*, és *E. coli* baktériumok kimutatásához.



8. ábra Microplates módszer során kapott eredmény UV fény alatt

3. táblázat: A microplates módszer hígítási sorozatai az *E. faecalis*, és *E. coli* baktériumok kimutatásához

Microplates módszer hígítási sorozatai az <i>E. faecalis</i> , és <i>E. coli</i> baktériumok kimutatásához				
Minta típusa	Hígítási arány	Minta összetétele	Minták száma a microplate lemezen	Inkubálási hőmérséklet
Felszíni víz	1:2	18 ml felszíni vízminta + 18 ml tengervíz	64	44 °C
	1:20	2 ml hígított minta + 18 ml tengervíz	32	
Szennyvíz	1:2	9 ml szennyvízminta + 9 ml tengervíz	16	
	1:20	1 ml hígított minta + 9 ml tengervíz	16	
	1:200	1 ml hígított minta + 9 ml tengervíz	16	
	1:2000	1 ml hígított minta + 9 ml tengervíz	16	
	1:20000	1 ml hígított minta + 9 ml tengervíz	16	
	1:200000	1 ml hígított minta + 9 ml tengervíz	16	

Antibiotikum tartalmú táptalajon történő baktériumtenyésztés

A mikroorganizmusok vizsgálata tenyésztés útján történik. A módszernél szelektív gátlóanyagot és antibiotikumot tartalmazó táptalajokat használtunk. Az *Enterococcus faecalis* kimutatására az MSZ EN ISO 7899-2:2000 szabvány szerinti Slanetz-Bartley-t, melyhez 8 mg/l Vancomycin, az *Escherichia coli* kimutatására pedig az MSZ ISO 16649-2:2005 szabvány szerinti TBX-et (Tryptone Bile X-Glucuronide), amelyhez pedig 5 mg/l Ceftazidime antibiotikumot adagoltunk. A vízmintákat membránszűrési módszerrel dolgoztuk fel, 0,45 µm pórusméretű cellulóz-észter membránfilter segítségével (Merck-Millipore, USA).

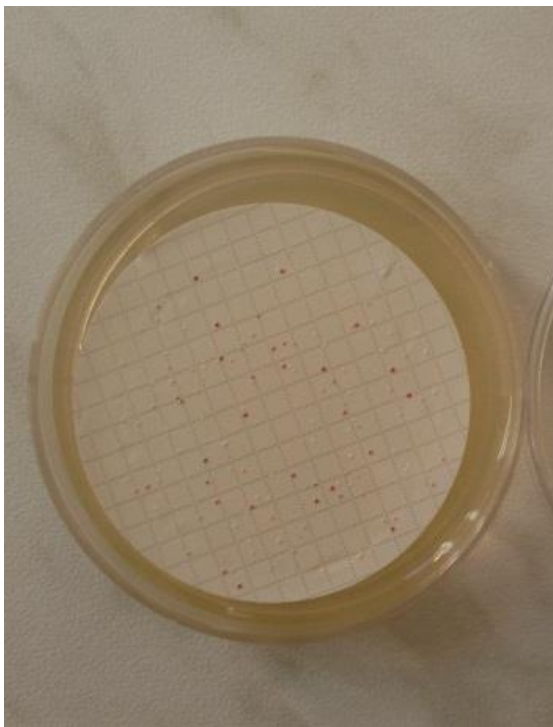
A laboratóriumba beszállított mintákat először homogenizáltuk, majd különböző koncentrációkban, illetve mennyiségekben szűrtük le őket. A felszíni víz, és a szennyvíz esetében is más hígítási aránnyal dolgoztunk. Ezeket az arányokat a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: A membránszűrési módszernél használt hígítási arányok

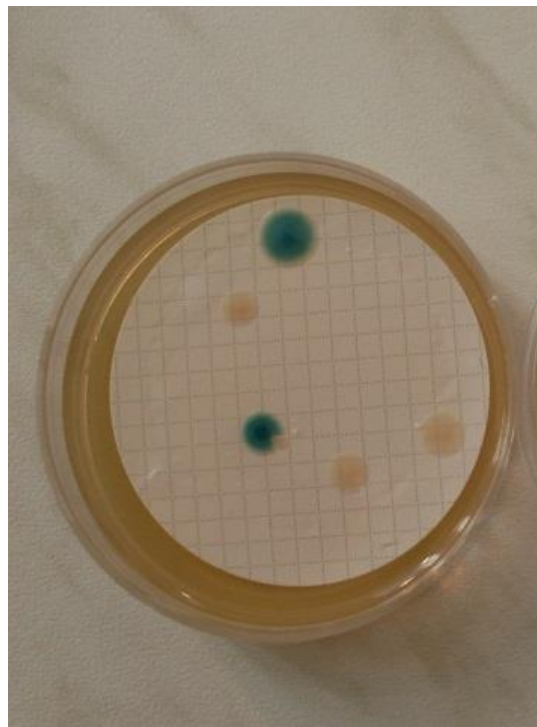
Szennyvíz	1.	1 ml szennyvíz minta + 9 ml fiziológiás sóoldat (fiz só)
	2.	1 ml a hígítási sorozat 1. tagjából + 9 ml fiz só
	3.	1 ml a hígítási sorozat 2. tagjából + 9 ml fiz só
Felszíni víz	1.	1 ml felszíni vízminta + 9 ml fiz só
	2.	10 ml felszíni vízminta
	3.	100 ml felszíni vízminta

A szűrés befejezése után a táptalajokat 48 órán át termosztátba helyeztük. A Slanetz-Bartley típusú táptalajt 37 °C-on, a TBX típusút pedig 44 °C-on inkubáltuk.

Ezt követően összeszámoltuk a kinőtt baktérium telepeket a 9. ábrán Slanetz-Bartley táptalajon az *E. faecalis*, (piros telep), míg a 10. ábrán TBX táptalajon az *E. coli* (kék telep) látható.



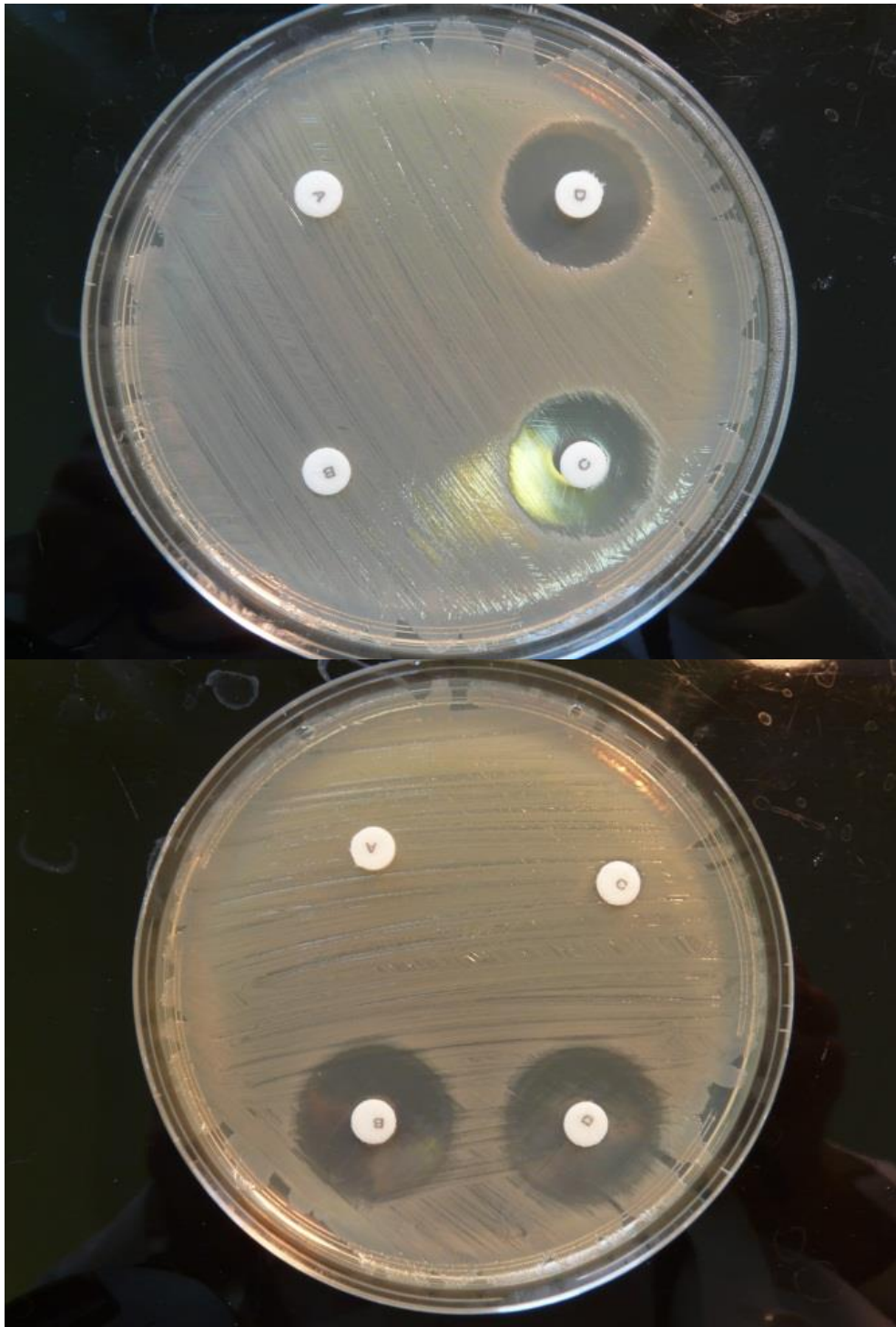
9. ábra Slanetz-Bartley táptalajon baktériumtenyészet



10. ábra TBX táptalajon baktériumtenyészet

A következő lépés a kinőtt telepek beazonosítása, mivel a Slanetz-Bartley táptalajon nem csak *Enterococcus* genus tagjai nőnek piros telepekben. A megerősítés során EEA (epe-eszkulin-azid agar) táptalajra helyezzük a szűrőpapírt, hogy vizsgálni tudjuk az eszkulinbontást. A TBX agar esetén nincs szükség megerősítésre, mert a kinőtt kék telepek *E. colinak* minősülnek.

A vizsgálat során alkalmazott módszer, miszerint antibiotikumot adunk a táptalajhoz, nem szabványos, ezért fontosnak tartottuk, hogy EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) szerinti korongdiffúziós módszerrel megerősítsük a kapott eredményeket. A ceftazidime-el szembeni rezisztencia önmagában nem ad információt arról, hogy az adott izolátumok ESBL, illetve AmpC termelők-e, ezért az ESBL/AmpC termelés megerősítésére, illetve elkülönítésére a Mast Diagnostica (U.K.) által gyártott MAST 4-Disc Test-et használtuk Müller-Hinton agaron (Bio-Rad, Franciaország). A vancomycin rezisztenciát Mueller-Hinton agar + 5% defibrinált lóvér + 20 mg/L β -NAD-on végeztük 5 μ g/l hatóanyagtartalmú vancomycin koronggal. A 11. ábrán ESBL és AmpC termelés elkülönítésére szolgáló vizsgálat látható.



11. ábra Az ESBL és AmpC termelés kimutatása és elkülönítése korongdiffúziós módszerrel, ha a B és D korong körül van gátlási zóna, az ESBL-termelő, ha pedig C és D korong körül van gátlási zóna az pedig AmpC termelő *E. coli*.

3.1.2 HAV kimutatása

Minták előkészítése

A kommunális szennyvizekben HAV is előfordulhat, amely a nem megfelelő hatásfokú szennyvíz kezelési technológia hatására bekerülhet a természetes vizeinkbe. Ezért lényegesnek tartottuk ennek a vírusnak az ellenőrzését a szennyvizekben és a felszíni vizekben egyaránt.

Munkánk során a 10 l felszíni és 0,5 l szennyvíz mintát vettünk mintavételi pontonként, majd ezeket koncentráltuk direkt kicsapatással (7). Az alkalmazott módszer a felszíni, és a szennyvíz minták esetében is megegyezik, azonban a szennyvíz minták a szennyezettségük miatt előkezelésre szorultak. Az előkezelés során 50 ml szennyvíz mintát 100 ml 0,05 M glicerin oldattal vegyítettük, és ezt követően 30 percig jégen rázattuk. A minta lebegőanyag tartalmának elválasztását centrifugálással ($8000\times g$, 45 min, $4^{\circ}C$) oldottuk meg, ez követően a felülúszóval dolgoztunk tovább.

A módszer nagyobb hatásfokkal működik magas vezetőképességű vízmintáknál. Abban az esetben, ha a vízminta vezetőképessége $1600\ \mu S$ -nél kisebb, tengeri só adagolásával beállítható az optimális érték. Az ideális vezetőképesség elérése után a minta pH-ját 1 N HCl-oldattal 3,5-re állítottuk. Ez után a beállított vízmintához 1:100 térfogatarányban a már korábban elkészített 1 N HCl-oldattal 3,5 pH-n flokkulált fölözött tejoldatot adagoltunk. A 10 l felszíni vízmintához 100 ml, a 150 ml glicin pufferrel vegyített szennyvíz mintához pedig 1,5 ml-t mértünk be. Ezt követően a mintákat legalább 8 órán keresztül kevertettük, így a vízmintákban előforduló vírusrészecskék a tejfehérjéhez kötődtek, majd hagytuk minimum 8 órán át ülepedni. A továbbiakban a két féle típusú vízminta kezelése eltérést mutat a térfogatkülönbségből adódóan. Az ülepítést követően a szennyvízmintákat centrifugáltuk ($9600\times g$, 45 min, $4^{\circ}C$), azután a felülúszót elöntöttük és az üledéket foszfát pufferrel 2 ml-re oldjuk, így kapjuk meg a víruskoncentrátumot. A 10 literes felszíni víznél a felülúszó eltávolítása után, az 500 ml üledéket centrifugálással tovább tömörítettük ($8000\times g$, 45 min, $4^{\circ}C$). A felülúszó leöntése után a vírusrészecske-tejfehérje komplexet foszfát pufferrel 10 ml-re egészítettük ki (7).

A HAV nukleinsav kivonása

A víruskoncentrációt követően a HAV nukleinsav kivonására került sor. A hepatitis A vírus RNS-sel rendelkezik, ami gyorsabban bomlik a környezetben, mint a DNS. Emiatt gyorsabban és körültekintőbben kell végezni a nukleinsav kivonását. Az eljárást a Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research, USA) kittel végeztük a gyártó utasításai szerint.

HAV kimutatása RT-PCR (reverz transzkripció–polimeráz láncreakció) módszerrel

A vírus nukleinsav tartalmából adódóan első lépésben reverz transzkripció megy végbe, amely során a reverz transzkriptáz enzim az RNS-szárlól cDNS-t készít. Az amplifikált cDNS vizualizálására SYBR Green-t használtunk. A módszer során a SYBR festéke minden kétszálú DNS-hez kapcsolódik, de a festék betapadása nem specifikus, ezért szükség van megerősítésre. Mi ezt pozitív kontrollal, és olvadási görbe vizsgálatával valósítottuk meg.

A vizsgálathoz a SensiFast SYBR Lo-ROX One-Step (Bioline, USA) kitet használtuk a gyártó utasításai szerint. A primernek a már korábban közölt HAV-1Q (5'-AGGCTACGGGTGAAACCTCTTAG-3') és HAV-2Q (5'-GCCGCTGTTACCCTATCCAA-3') használtuk (10).

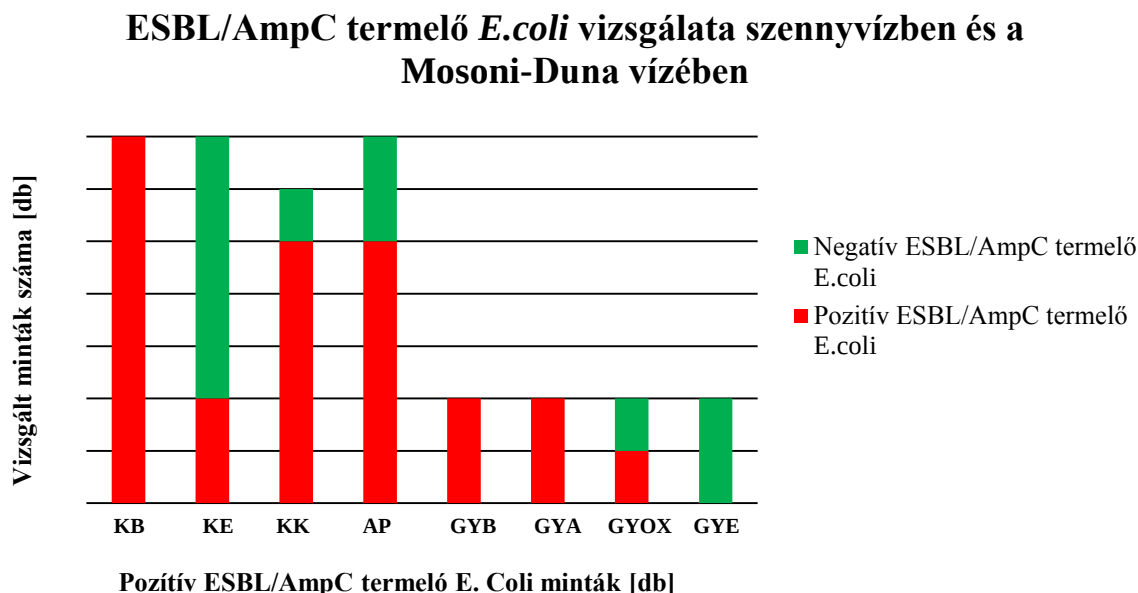
4. EREDMÉNYEK

4.1 *Enterococcus faecalis*, és *Escherichia coli* baktériumvizsgálat eredménye

Az ESBL és AmpC elkülönítésére tett vizsgálataink eredménye alapján, megállapítható, hogy szinte minden *E.coli* AmpC termelő volt, s csak egy-két törzs bizonyult ESBL termelőnek. A fekális indikátor szervezetek (*E. faecalis*, *E. coli*) microplates, és az antibiotikum rezisztens (ESBL/AmpC termelő *E.coli*, vancomycin rezistens *E. faecalis*) baktériumok antibiotikus táptalajon való tenyésztéses vizsgálat eredményeit az 5-6. táblázatban foglaljuk össze. Az 6. táblázatban külön vettük az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep szennyvíz-, és a Mosoni-Duna felszíni vízmintáit. A 5. táblázat a Győri Szennyvíztelepen vételezett minták értékeit

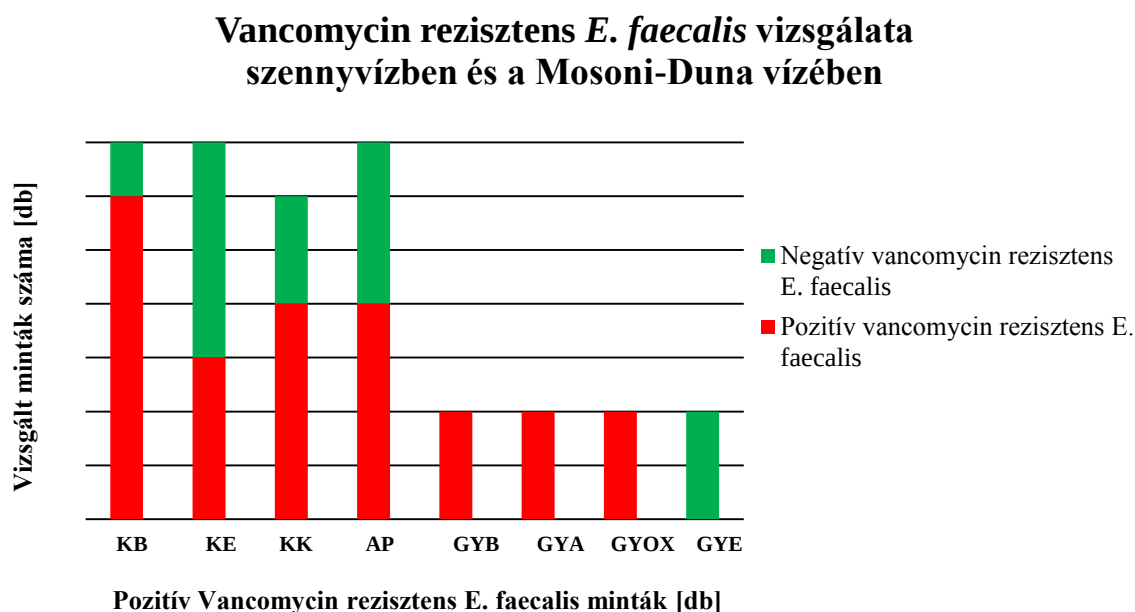
mutatja. A táblázatban feltüntettük a mintavétel helyét, a minta egyéni jelét, a vizsgált mikrobákat, és a mintavétel pontos dátumát a kapott eredményekkel.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy ESBL/AmpC termelő *E. coli* nézve a KB esetén 100%, KE esetén 29%, KK esetén 83%, AP esetén 71%, GYB és GYAOX esetén 100%, GYOX esetén 50%, GYE esetén pedig 0% pozitív eredményt kaptunk (12. ábra)



12. ábra ESBL/AmpC termelő *E.coli* vizsgálatának eredményei a szennyvízben és a Mosoni-Duna vízében, a mintavételi pontok rövidítéseit a 2. táblázat részletezi

Vancomycin rezisztens *E. faecalis* vizsgálatainkból a KB esetén 86%, KE esetén 43%, KK esetén 67%, AP esetén 57%, GYB-GYAOX-GYOX esetén 100%, GYE esetén pedig 0% pozitív eredmény született (13. ábra).



13. ábra Vancomycin rezisztens *E. faecalis* vizsgálatának eredményei a szennyvízben és a Mosoni-Duna vízében

Továbbá megnéztük a szennyvíz tisztítók hatékonyságát. Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep befolyó, elfolyó vízmintájában is kimutatható volt ESBL/AmpC termelő *E. coli*, és vancomycin rezisztens *E. faecalis* is, azonban az elfolyóban jelentősen kisebb mennyiségben. A Győri Szennyvíztisztító telep befolyó, anoxikus, oxikus mintáiban is meghatározhatóak voltak a vizsgált mikroszervezetek, de a tisztítási lépések előrehaladásával csökkent a mennyiségük, az elfolyó minta pedig teljesen mentesnek minősültek.

5. számú táblázat: *E. faecalis*, és *E. coli* baktérium vizsgálatának eredménye a Győri Szennyvíztisztító telepen

<i>E. faecalis</i>, és <i>E. coli</i> baktérium vizsgálatának eredménye a Győri Szennyvíztisztító telepen				
Szennyvíz				
Mintavétel helye	Minta egyéni jele	Vizsgált mikroba	Mintavétel időpontja	
			2014.06.26	2014.10.20
Győri Szennyvíztisztító telep	GYB- befolyó medence	ESBL/AmpC termelő- <i>E.coli</i>	2700 /ml	250 /ml
		Vancomycin reziszten- <i>E.faecalis</i>	10000 /ml	90 /ml
		<i>E.coli</i> /100ml	5477000	>82994000
		<i>E.faecalis</i> /100ml	1724000	13095000
	GYA- anoxikus medence	ESBL/ApmC termelő- <i>E.coli</i>	100 /ml	40 /ml
		Vancomycin reziszten- <i>E.faecalis</i>	2200 /ml	160 /ml
		<i>E.coli</i> /100ml	2153000	56543000
		<i>E.faecalis</i> /100ml	6473000	82994000
	GYO- oxikus medence	ESBL/AmpC termelő- <i>E.coli</i>	0 /ml	30 /ml
		Vancomycin reziszten- <i>E.faecalis</i>	27000 /ml	280 /ml
		<i>E.coli</i> /100ml	1095000	13095000
		<i>E.faecalis</i> /100ml	5173000	77626000
	GYE- elfolyó medence	ESBL/AmpC termelő- <i>E.coli</i>	0 /ml	0 /ml
		Vancomycin reziszten- <i>E.faecalis</i>	0 /ml	0 /ml
		<i>E.coli</i> /100ml	12320	4460
		<i>E.faecalis</i> /100ml	11260	923

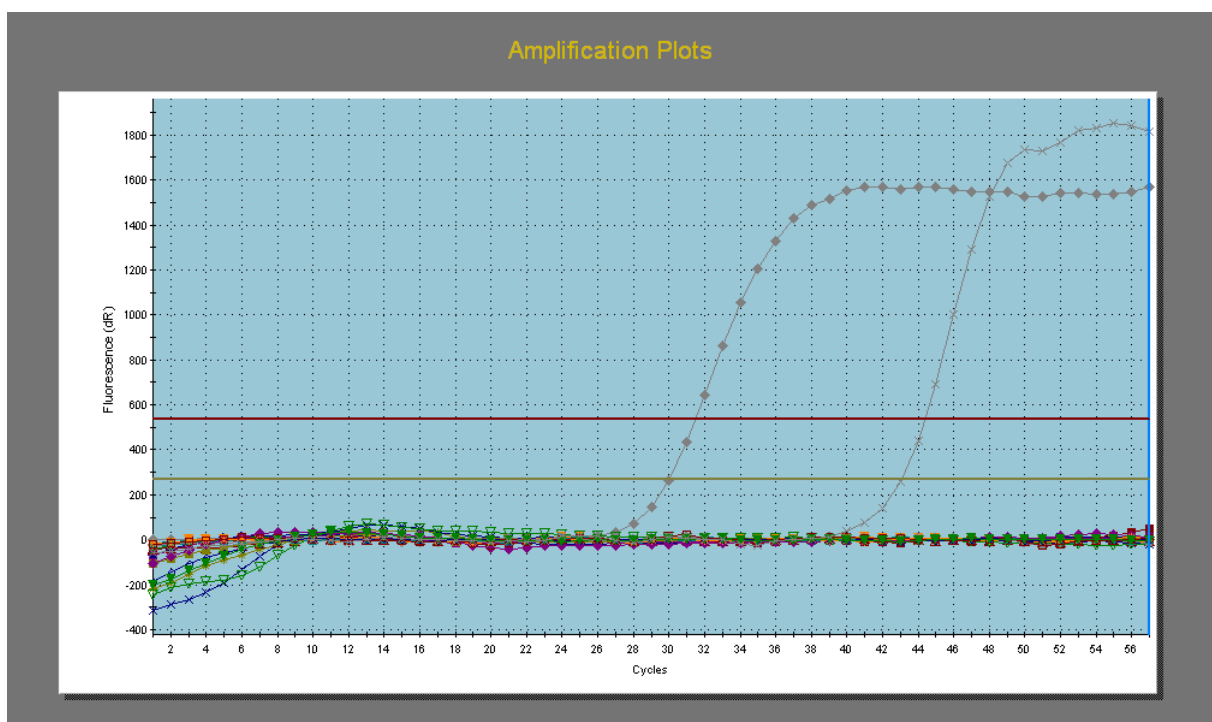
6. táblázat: *E. faecalis*, és *E. coli* baktériumvizsgálat eredménye az Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telepen, és a Mosoni-Dunában

E. faecalis, és E. coli baktériumvizsgálat eredménye az Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telepen, és a Mosoni-Dunában									
Szennyvíz									
Mintavétel helye	Minta egyéni jele	Vizsgált mikroba	Mintavétel időpontja						
			2013.10.24	2013.11.28 árhullám	2014.01.24	2014.02.27	2014.04.10	2014.06.05	2014.10.20
Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep	KB- befolyó medence	ESBL/AmpC termelő-E.coli	6900/ml	320/ml	2200/ml	700/ml	50/ml	4600/ml	360/ml
		Vancomycin reziszten-E.faecalis	0/ml	3700/ml	8900/ml	1200/ml	13100/ml	2000/ml	1000/ml
		E.coli/100ml	n.m	56543000	>82994000	82994000	53680000	>82994000	77626000
		E.faecalis/100ml	n.m	51002000	21840000	24603000	56543000	82994000	20365000
	KE- elfolyó medence	ESBL/AmpC termelő-E.coli	0/ml	30/ml	1800/ml	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
		Vancomycin reziszten-E.faecalis	0/ml	130/ml	1800/ml	0/ml	410/ml	0/ml	0/ml
		E.coli/100ml	n.m	31415000	517300	75700	536800	51002	11679000
		E.faecalis/100ml	n.m	1770200	507500	17417	2460	11454	58
Felszíni víz									
Mintavétel helye	Minta egyéni jele	Vizsgált mikroba	Mintavétel időpontja						
			2013.10.24	2013.11.28 árhullám	2014.01.24	2014.02.27	2014.04.10	2014.06.05	2014.10.20
Kunsziget Mosoni-Duna	KK	ESBL/AmpC termelő-E.coli	1 /100 ml	26 /100 ml	11 /100 ml	0 /100 ml	2 /100 ml	4 /100 ml	n.m
		Vancomycin reziszten-E.faecalis	0 /100 ml	150 /100 ml	34 /100 ml	0 /100 ml	430 /100 ml	6 /100 ml	n.m
		E.coli/100ml	580,909	13864	4573	304	1305	697	n.m
		E.faecalis/100ml	61	1295	1440	110	350	94	n.m
Aranypart I. Mosoni-Duna	AP	ESBL/AmpC termelő-E.coli	0 /100 ml	11 /100 ml	3 /100 ml	0 /100 ml	1 /100 ml	2 /100 ml	1 /100 ml
		Vancomycin reziszten-E.faecalis	0 /100 ml	170 /100 ml	0 /100 ml	6 /100 ml	0 /100 ml	34 /100 ml	20 /100 ml
		E.coli/100ml	591,955	6581	509	371	2779	2249	554
		E.faecalis/100ml	368	1034	126	251	76	109	46

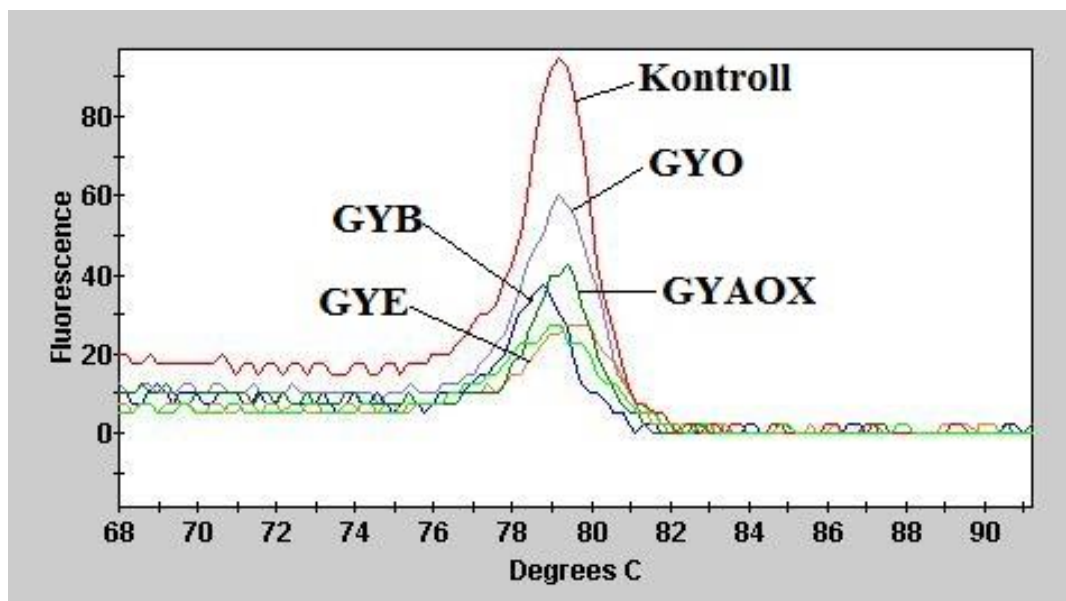
n.m= nincs minta

4.2 RT-PCR eredmények

A RT-PCR futtatás után a készülék által készített futtatási diagram alapján pozitívnak jelzett mintákat (14. ábra), az aspecifikus PCR termékek kiszűrésére, olvadási görbe analízisnek vetettük alá. Ennek lényege, hogy azonos, vagy közel azonos (2-3 bázispár különbségnyi) nukleinsav összetétel esetén a kettősszál felbontásához mindig azonos energia kell, így a kettős szálak felbomlása mind a pozitív kontroll, mind a minták esetén azonos, vagy közel azonos hőmérsékleten fog bekövetkezni (15. ábra).



14. ábra A PCR vizsgálat futtatási diagram azt ábrázolja, hogy a vizsgált minták hányadik ciklustól mutatnak növekvő fluoreszcencia értéket, amely pozitív mintának való minősítése még további megerősítésre szorul (olvadási görbe(15. ábra)). A futtatási diagram pontokkal jelölt görbéje a pozitív kontroll, a másik kiugró görbe (x-kel jelölt) a kunsziget melletti felszíni vízminta 2013.10.24-én



15. ábra PCR vizsgálat olvadási görbéje, amely megmutatja, hogy pozitív kontroll esetén milyen hőmérsékleten történik kiugró változás a fluoreszcenciában. Ha a vizsgált minták hasonló kiugrást produkálnak azonos hőmérsékleten, akkor a vizsgált minta pozitívnek minősíthető.

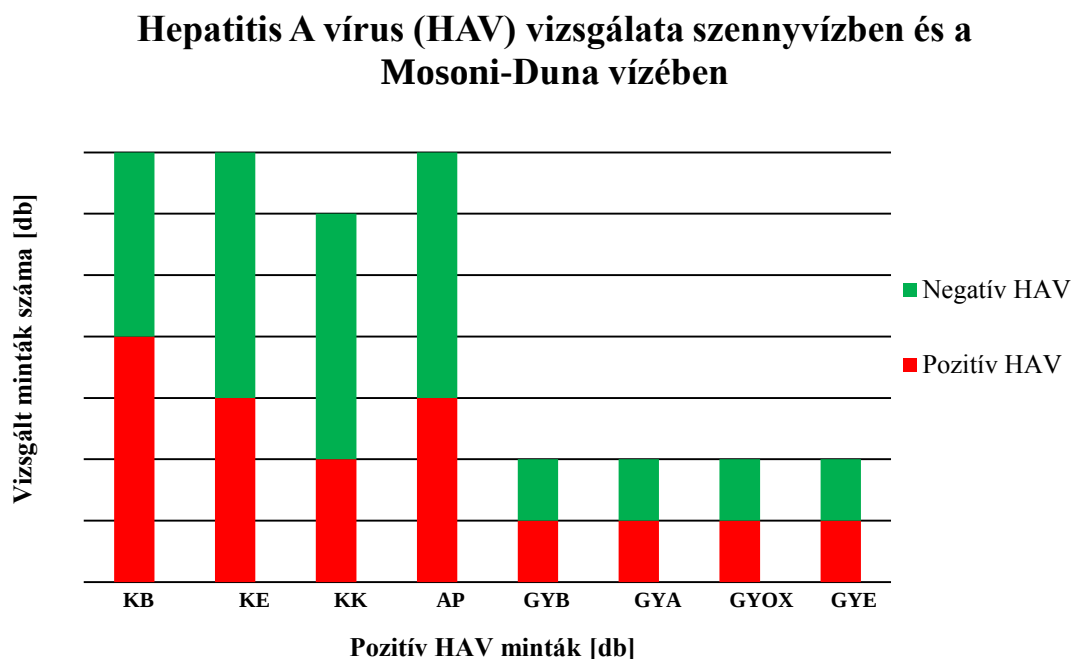
Az RT-PCR módszerrel kapott eredményeket a 7. táblázat tartalmazza, melyben kiemeltük a pozitív eredményül kapott mintákat.

7. táblázat: *Hepatitis A vírus* RT-PCR-es vizsgálatának eredményei

Hepatitis A vírus RT-PCR-es vizsgálatának eredményei										
Szennyvíz										
Mintavétel helye	Minta egyéni jele	Vizsgált mikroba	Mintavétel időpontja							
		2013.10.24	2013.11.28 árhullám	2014.01.24	2014.02.27	2014.04.10	2014.06.05	2014.06.26	2014.10.20	
Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep	KB	HAV	negatív	negatív	pozitív	pozitív	negatív	pozitív	n.m	pozitív
	KE		negatív	negatív	negatív	negatív	pozitív	pozitív	n.m	pozitív
Győri Szennyvíztisztító telep	GYB		n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	pozitív	negatív
	GYA		n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	pozitív	negatív
	GYO		n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	pozitív	negatív
	GYE		n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	pozitív	negatív
Felszíni víz										
Kunsziget Mosoni-Duna	KK	HAV	pozitív	negatív	negatív	negatív	negatív	pozitív	n.m	n.m
Aranypart I. Mosoni-Duna	AP		negatív	negatív	pozitív	negatív	negatív	pozitív	n.m	pozitív

n.m= nincs minta

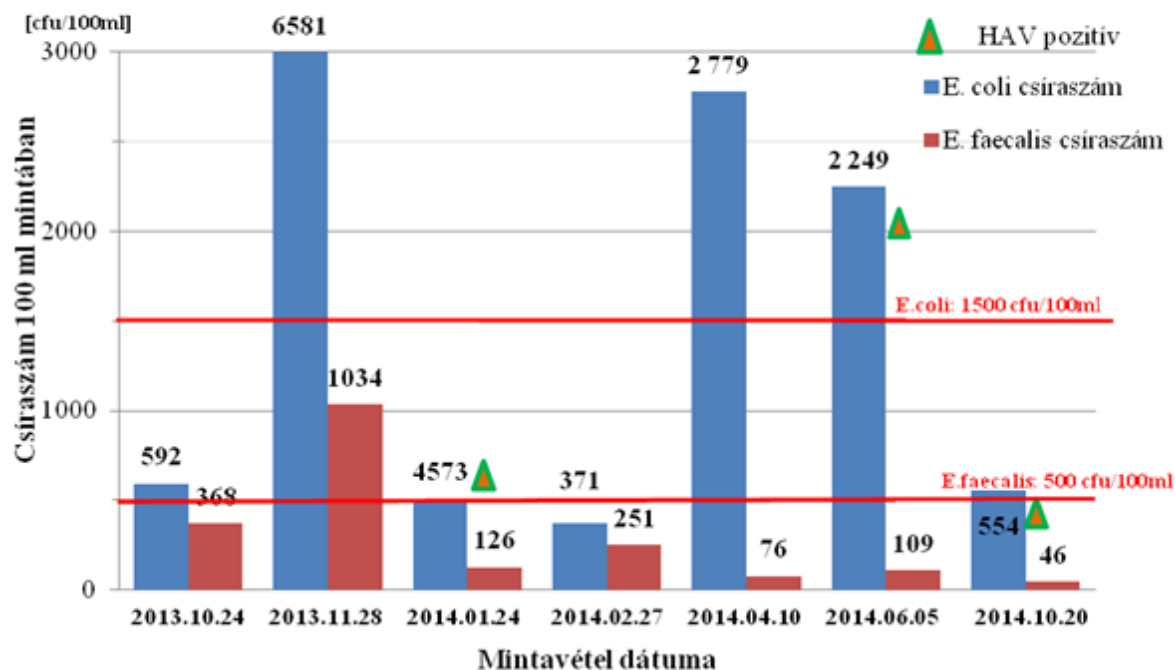
A kapott eredményekből megállítható, hogy a KB esetén 57%, KE esetén 43%, KK esetén 33%, AP esetén 43%, GYB-GYAOX-GYOX esetén 50%, GYE esetén pedig 0% pozitív eredmény lett. (16. ábra)



16. ábra Hepatitis A vírus (HAV) vizsgálata szennyvízben és a Mosoni-Duna vízében

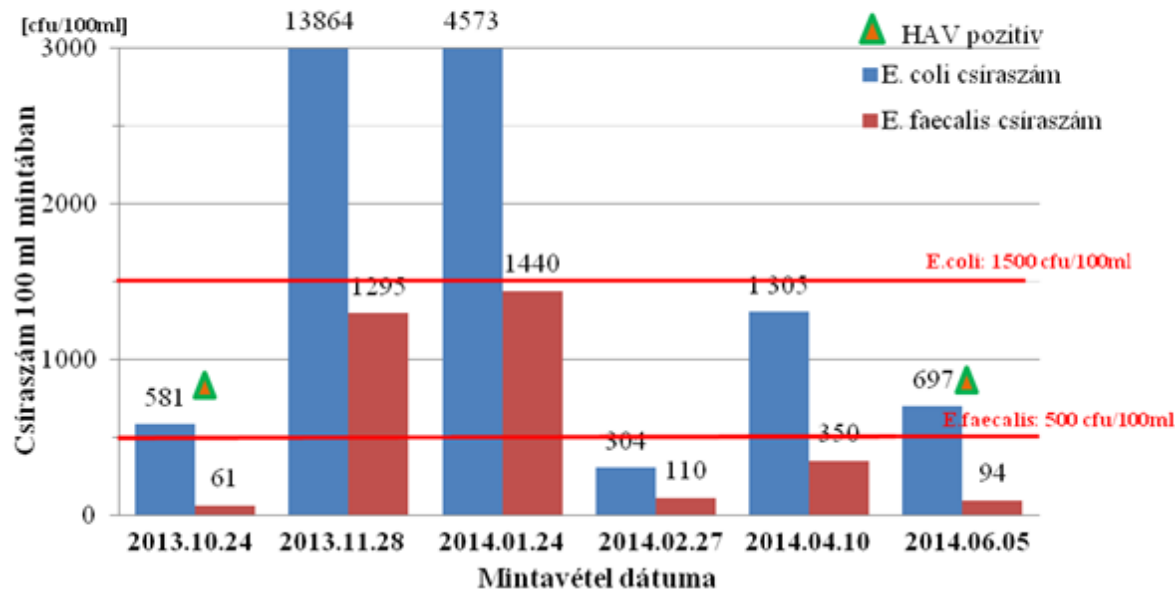
A felszíni fürdővizekben az *E. coli*-nál 1500 cfu/100 ml, az *E. faecalis*-nál pedig 500 cfu/100 ml a bevezetett határérték. A 17-18. ábrák a Mosoni-Duna kunszigeti és Aranypart I. pontjairól gyűjtött minták vizsgálata során kapott fekáliás indikátorkórokozók csíraszámát mutatja. A vízszintes tengelyen a mintavételezés dátumát, a függőleges tengelyen pedig a csíraszámot tüntettük fel. Háromszöggel jelöltük azokat a mintákat, amelyek pozitívak lettek HAV vizsgálatra. Már ezekből az ábrákból is kitűnhet, amit a későbbi statisztikai elemzések meg is erősítenek, hogy a felszín víz minősítésére használt *E. coli* és *E. faecalis* csíraszám és HAV jelenléte közt nem lehet összefüggést találni.

Győri Aranypart I. felszíni víz vizsgálata során mért *E. coli* és *E. faecalis* csíraszám



17. ábra A kunszigeti felszíni víz vizsgálata során mért *E. coli* és *E. faecalis* csíraszám

Kunszigeti felszíni víz vizsgálata során mért *E. coli* és *E. faecalis* csíraszám



18. ábra A győri Aranypart I. felszíni víz vizsgálata során mért *E. coli* és *E. faecalis* csíraszám

4.3 Statisztikai eredmények

A kutató munka során arra is kíváncsiak voltunk, hogy van-e összefüggés a pozitív és negatív eredmények közt rezisztens baktériumok és HAV tekintetében. A lehetséges kapcsolati variációkat, és a kapott eredményeinket 2x2-es kontingencia táblába (19-21. ábra) rendeztük. Az értékekből chi-négyzet, és Fisher-féle exact tesztet számoltunk a www.vassarstats.net honlapon található program segítségével.

	HAV pozitív	HAV negatív
ESBL/AmpC termelő <i>E.coli</i> pozitív	11	12
ESBL/AmpC termelő <i>E.coli</i> negatív	5	6
	χ^2 alkalmazható p=0,8	
	Fisher exact teszt p=0,59	

19. ábra Negatív és pozitív HAV, negatív és pozitív ESBL/AmpC termelő *E. coli* baktérium egymáshoz való kapcsolatának megállapítása chi-négyzet, és Fisher-féle exact teszt segítségével

	HAV pozitív	HAV negatív
Vancomycin rezisztens- <i>E.faecalis</i> pozitív	11	12
Vancomycin rezisztens- <i>E.faecalis</i> negatív	5	6
	χ^2 alkalmazható p=0,8	
	Fisher exact teszt p=0,59	

20. ábra Negatív és pozitív HAV, negatív és pozitív vancomycin rezisztens *E. faecalis* baktérium egymáshoz való kapcsolatának megállapítása chi-négyzet, és Fisher-féle exact teszt segítségével

	Vancomycin rezisztens <i>E.faecalis</i> pozitív	Vancomycin rezisztens <i>E.faecalis</i> negatív
ESBL/AmpC termelő <i>E.coli</i> pozitív	20	3
ESBL/AmpC termelő <i>E.coli</i> negatív	3	8
	χ^2 nem alkalmazható	
	Fisher exact teszt p=0,001	

21. ábra Negatív és pozitív vancomycin rezisztens *E. faecalis*, negatív és pozitív ESBL/AmpC termelő *E. coli* baktérium egymáshoz való kapcsolatának megállapítása chi-négyzet, és Fisher-féle exact teszt segítségével

A chi-négyzet, és Fisher-féle egzakt teszt eredményei alapján elmondható, hogy rezisztens baktériumok, és a HAV jelenléte között összefüggés nem állapítható meg. Míg a két baktérium rezisztenciái között összefüggés valószínű. Itt, bár az alacsony mintaszám miatt chi-négyzet teszt nem alkalmazható, de Fisher-féle exakt tesztel megállapítható volt, hogy ESBL/AmpC termelő *E.coli*, szignifikánsan gyakrabban fordul elő a rezisztens *E. faecalis*-al együtt. Ez magyarázható azzal, hogy a nagyon szennyezett minták (általában befolyó szennyvizek) igen magas számban tartalmaznak indikátor baktériumokat (is) és köztük gyakori a rezisztens mindkét vizsgált faj esetén, a tisztább mintákban (kifolyó szennyvíz, természetes vizek) viszont kevés a baktérium és így jóval ritkább a rezisztens törzsek jelenléte. Továbbá növeli az együttes jelenlét esélyét, hogy a humán és állatgyógyászatban egyre nagyobb mértékű az antibiotikum használat, ami növeli a rezisztens egyedek szelekcióját, s a horizontális géntranszfernek köszönhetően a rezisztenciáért felelős gének egyenletesen, mind szélesebb körben terjednek az adott populációban.

További statisztikai analíziseket (pl.: Mann-Whitney próba) is végeztünk a Wolfram Mathematica 10 program segítségével. Az analízisek során két összetartozó csoport közötti eltéréseket, összefüggéseket néztük. Az elemzések során kapott p-értékeket a 8. táblázat tartalmazza. A táblázatban + -el jelölt vizsgálatok, ugyan nem érik el a $p < 0,05$ szignifikancia küszöböt, ám az alacsony mintaszám miatt valószínűsíthető, hogy a vizsgálatok bővítésével találhatunk összefüggést a vizsgált értékek között.

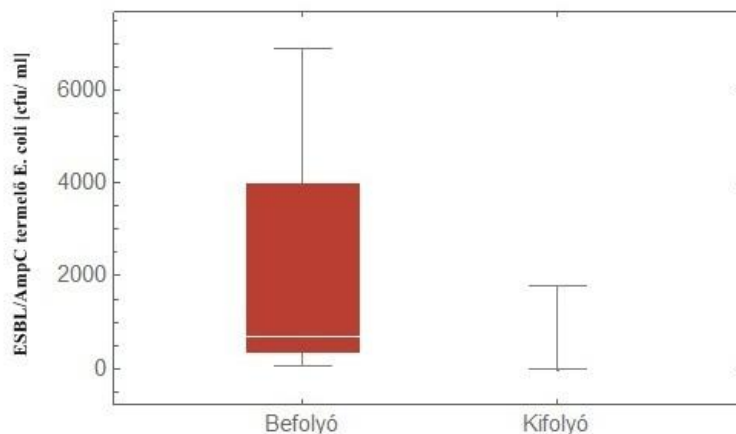
8. táblázat a statisztikai vizsgálatok során kapott p értékek

Ábra	Összevetés	p-értéke	Szignifikáns különbség
22.	Rez. <i>E. faecalis</i> befolyó ↔ elfolyó szennyvízben	0.02224943	++
23.	ESBL + <i>E. coli</i> befolyó ↔ elfolyó szennyvízben	0.0360317	++
24.	Befolyó <i>E. coli</i> összcsíraszám HAV+↔HAV –	1.	--
25.	Befolyó <i>E. coli</i> összcsíraszám HAV+↔HAV –	0.846451	–
26.	Elfolyó <i>E. faecalis</i> összcsíraszám HAV+↔HAV –	0.885234	–
27.	Elfolyó <i>E. faecalis</i> összcsíraszám HAV+↔HAV –	0.112351	+
28.	Felszíni <i>E. coli</i> összcsíraszám HAV+↔HAV –	0.105193	+
29.	Felszíni <i>E. faecalis</i> összcsíraszám HAV+↔HAV –	0.120913	+

Megvizsgáltuk, hogy Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep befolyó, és kifolyó minták antibiotikum rezisztens mikroba csíraszámára mennyire eltérő (22-23. ábra), hogy következtethessünk a szennyvíztisztítás hatékonyságára említett kórokozó csoporttal szemben. Azt alapíthattuk meg, hogy nagy különbség van a befolyó és elfolyó szennyvízminták mikroba

összetételében, tehát a jelenleg alkalmazott szennyvíztisztítási eljárások hatékonyak az általunk vizsgálat rezisztens baktériumokkal szemben.

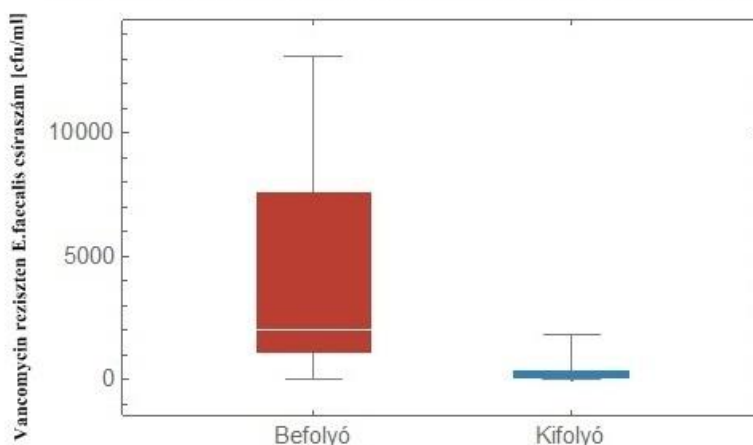
Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep befolyó, és elfolyó szennyvízmintáinak ESBL/AmpC termelő *E. coli* csíraszám



Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep befolyó-, és elfolyó minta

22. ábra Az 5. táblázatban szereplő Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telep befolyó (KB), és elfolyó (KE) mintáinak vancomycin rezisztens *E. faecalis* tartalma. A diagram (box-and-whiskers plot) a mediánt, az interkvartilis tartomány értékeit mutatja).

Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep befolyó, és elfolyó szennyvízmintáinak vancomycin rezisztens *E. faecalis* csíraszám

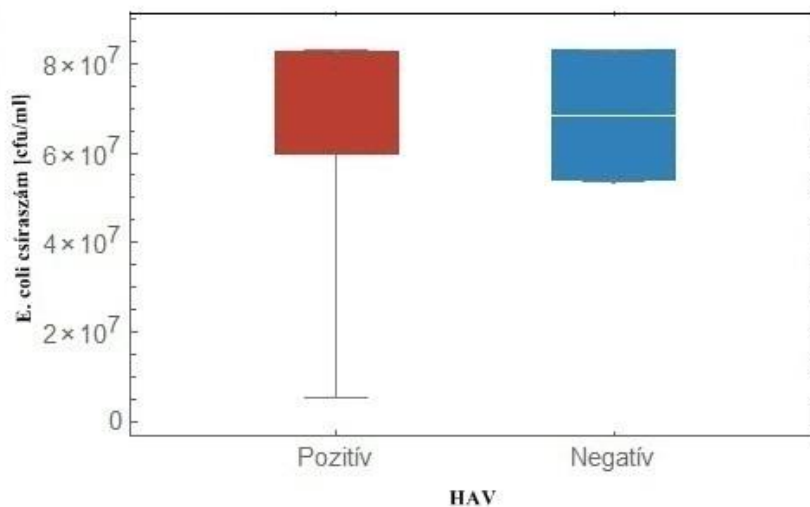


Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep befolyó, és elfolyó minta

23. ábra Az 5. táblázatban szereplő Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telep befolyó (KB), és elfolyó (KE) mintáinak ESBL/AmpC termelő *E. coli* tartalma. A diagram a mediánt, az interkvartilis tartomány (box) értékeit mutatja.

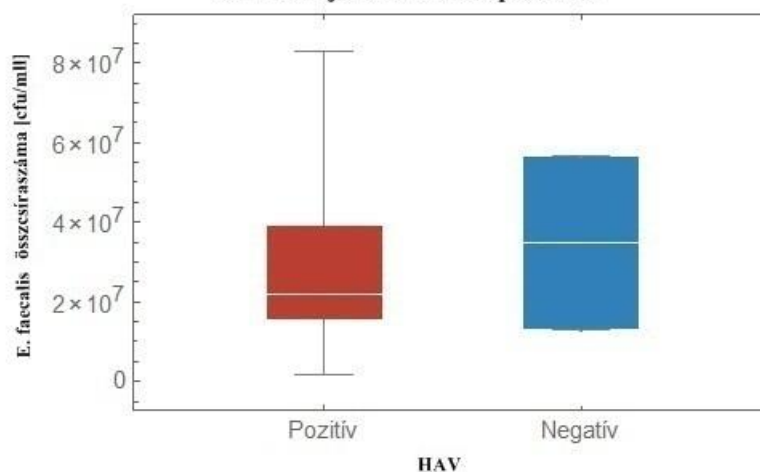
Vizsgáltuk továbbá az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep befolyó, és elfolyó szennyvízmintákban a rezisztens baktériumok csíraszámát és HAV jelenlétének kapcsolatokat (24-29. ábra). Ezekből az analízisekből megállapíthattuk, hogy sem a befolyó, sem az elfolyó szennyvízben mért *E. coli* és *E. faecalis* értékek nem mutatnak szignifikáns összefüggést HAV jelenléte/hiánya közt, tehát a két fekális indikátor baktérium nem képes (előre) jelezni HAV jelenlétét a szennyvízben.

Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep befolyó szennyvízminták
E. coli összesírászámának, és a HAV jelenlétének kapcsolata.



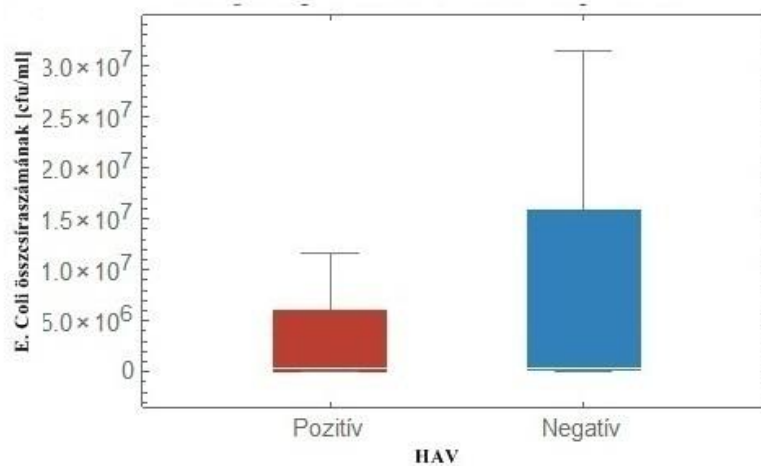
24. ábra A 6. táblázatban szereplő Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telep befolyó (KB) minták rezisztens *E. coli* tartalmának, és a HAV jelenlétének kapcsolata. A diagram a mediánt, az interkvartilis tartomány (box) értékeit mutatja.

Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep befolyó szennyvízminták
E. faecalis összesírászámának,
 és a HAV jelenlétének kapcsolata.



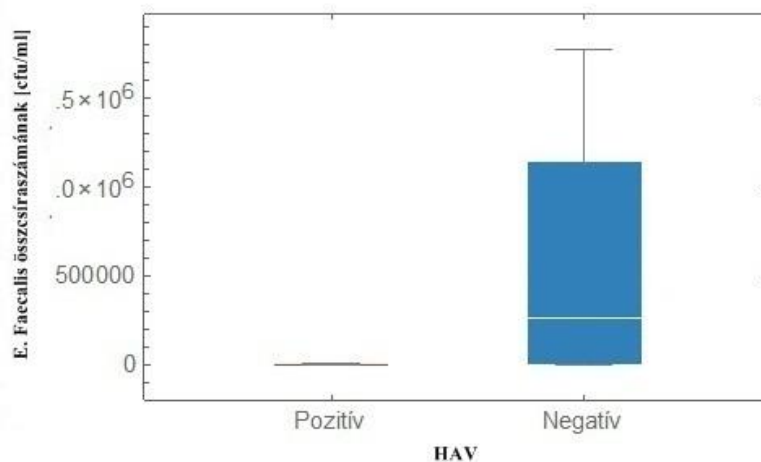
25. ábra A 6. táblázatban szereplő Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telep befolyó (KB) minták rezisztens *E. faecalis* tartalmának, és HAV jelenlétének kapcsolata. A diagram a mediánt, az interkvartilis tartomány (box) értékeit mutatja.

**Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep elfolyó szennyvízminták
E. coli összcisírszámának, és a HAV jelenlétének kapcsolata.**



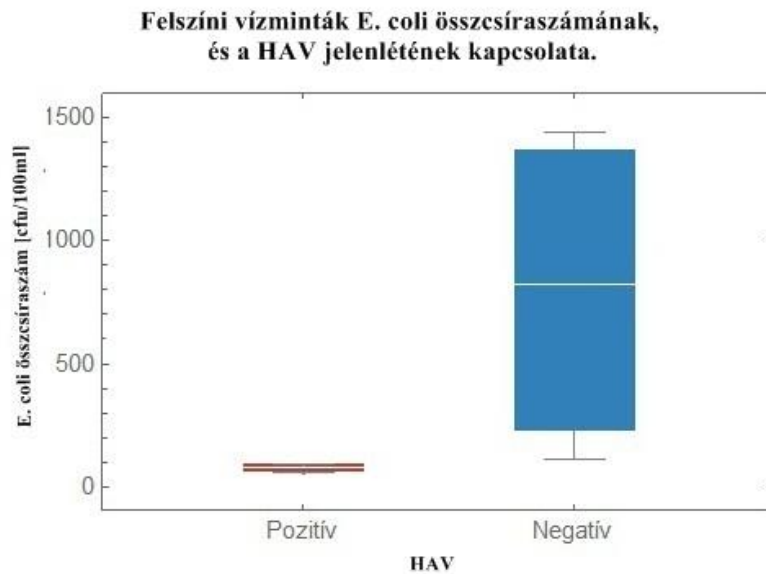
26. ábra A 6. táblázatban szereplő Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telep elfolyó (KB) minták rezisztens *E. coli* tartalmának, és a HAV jelenlétének kapcsolata. A diagram a mediánt, az interkvartilis tartomány (box) értékeit mutatja.

**Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep elfolyó szennyvízminták
E. faecalis összcisírszámának, és a HAV jelenlétének kapcsolata.**

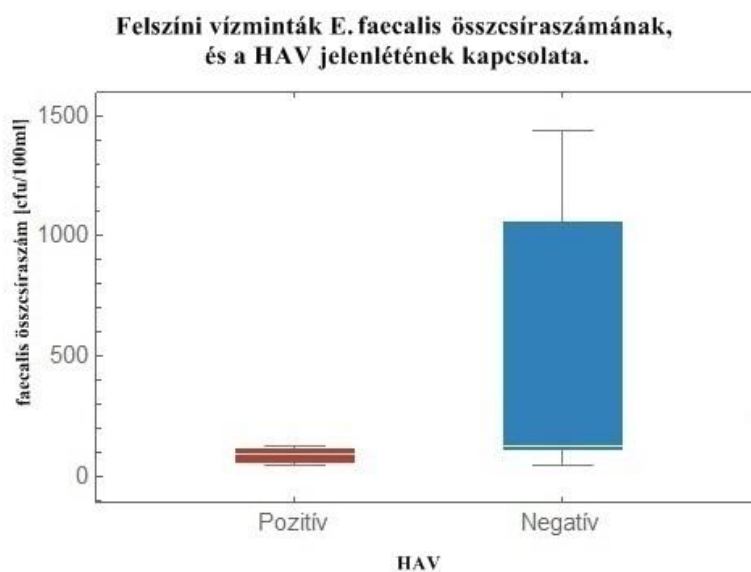


27. ábra A 6. táblázatban szereplő Alsó-szigetközi szennyvíztisztító telep elfolyó (KB) minták rezisztens *E. faecalis* tartalmának, és a HAV jelenlétének kapcsolata. A diagram a mediánt, az interkvartilis tartomány (box) értékeit mutatja.

Felszíni víz vizsgálati eredményeink statisztikai elemzése során is hasonló eredményre jutottunk. *E. coli* és *E. faecalis* nem jelzi előre HAV jelenlétét az adott víztestben, így a felszíni fürdők minősítése során megfelelőnek minősített strandok sem biztos, hogy mentesek HAV-tól.



28. ábra Az 6. táblázatban szereplő felszíni vízminták rezisztens *E. coli* tartalmának, és a HAV jelenlétének kapcsolata. A diagram a mediánt, az interkvartilis tartomány (box) értékeit mutatja.



29. ábra A 6. táblázatban szereplő felszíni vízminták rezisztens *E. faecalis* tartalmának, és HAV jelenléte. A diagram a mediánt, az interkvartilis tartomány (box) értékeit mutatja

Megvizsgáltuk az indikátor baktériumokra az összes csíraszám és a rezisztens csíraszám közötti összefüggést. A két mennyiség között pozitív összefüggést vártunk. Az adatokat kettős logaritmikus koordináta-rendszerben ábrázoltuk és egyenest illesztettünk rájuk (30. ábra). A kapott egyenes egyenlete

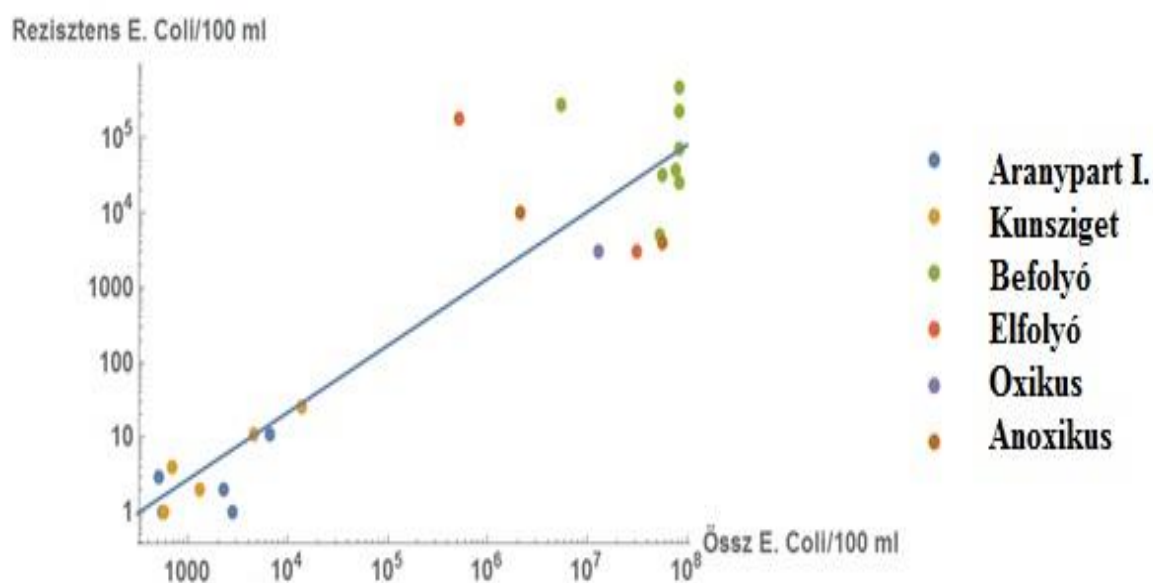
$$Y = -2.23153 + 0.89103 X,$$

ami az eredeti koordináta rendszerben az

$$y = 10^{-2.23153} x^{0.89103}$$

egyenletnek felel meg. Az adatokra való illeszkedés t-próbával ellenőrizve is megfelelőnek bizonyult ($p=0.00017$). Tehát kijelenthető, hogy a különböző víz típusokban az általunk vizsgált fekális indikátor kórokozók jól jelzik az antibiotikum rezisztens *E. coli* és *E. faecalis* jelenlétét és csíraszámát.

A 30. ábrán a különböző eredetű mintákat színekkel elkülönítve az is jól látszik, hogy a felszíni vizekből származó minták nagyságrendekkel alacsonyabb csíraszámokat mutatnak, mint a szennyvíztisztítóból származók.



30. ábra A 6. táblázatban szereplő vízminták alapján az összes *E. coli* szám és a rezisztens *E. coli* szám közötti összefüggés (log-log skálán ábrázolva).

5. ÉRTÉKELÉS, ÉS ÖSSZEFOGLALÁS

A több hónapos minta vételi periódus során sikeresen adaptáltunk és alkalmaztunk hazánkban eddig kevésbé, vagy egyáltalán nem használt mintavételi, tenyésztési, és RT-PCR vizsgálati módszereket a baktérium és a vírus kimutatásra egyaránt. A vizsgált mintákból sikerült vancomycin rezisztens *Enterococcus faecalis*, ESBL/AmpC termelő *Escherichia coli* baktériumok, és HAV jelenlétét kimutatni. A eredmények egyértelműen kimutatják az antibiotikum rezisztens indikátor baktériumok számának csökkenését a szennyvíztisztítás során. Ez utal, hogy a jelenleg alkalmazott szennyvíztisztítási eljárások megfelelő hatékonyságára említett kórokozókkal szemben. Ugyanakkor az eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy a rutinszerűen alkalmazott indikátorok bár nem tükrözik HAV jelenlétét, de az általunk vizsgált rezisztens baktériumok esetén mind jelenlétük, mind csíraszámuk közt pozitív korrelációt lehet kimutatni. A szennyvizek, és a befogadó víztest vírusterhelése változatosságot mutat, azonban párhuzamot nem lehet vonni a pozitív minták és a szennyvíztisztító technológiák között.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- (1) Pesti Miklós, Bíró Sándor, Hornok László, Kevei Ferenc, Kucsera Judit, Maráz Anna, 2001, *Általános mikrobiológia*, Dialóg Campus, Budapest – Pécs
- (2) Kevei Ferenc, Kucsera Judit; Manczinger László; Vágvölgyi Csaba, (2010), *Mikrobiológia 2: Jegyzet az alapkurzus előadásaihoz*, JATEPress, Szeged
- (3) Rozgonyi Ferenc, Kónya József, 2007, *Orális mikrobiológia, immunitástan, diagnosztika és infekciókontroll*, Medicina, Budapest MSZ EN ISO 7899-1:2000 Vízhminőség. Az enterococcus bélbaktériumok kimutatása és megszámlálása felszíni és szennyvizekben
- (4) Dr. Böröcz Karolina, 2004, Vancomycin-rezisztens enterococcus (VRE) fertőzések megelőzése az egészségügyi intézményekben, *EPINFO*, 2004, 42:522-526
- (5) Dr. Princz Gyula, Dr. Kende Éva, Dr. Gacs Mária, (2002), A széles spektrumú béta-laktamázokat termelő gram-negatív baktériumok jelentősége és az általuk okozott nosocomialis járványok leküzdése, *EPINFO*, 30:349-352
- (6) Gacs Mária, Tóth Ákos, (2010), AmpC β -laktamázok sajátosságai, a kimutatás lehetőségei Enterobacteriaceae család tagjaiban; plazmidon-kódolt változat magyarországi megjelenése és terjedése *Klebsiella pneumoniae*-ban, *Mikrobiológiai Közlevél*, X., 3. szám, p. 7-17
- (7) Kern A, Kádár M, Szomor K, Berencsi Gy, Kapusinszky B, Vargha M. *Detection of enteric viruses in Hungarian surface waters: first steps towards environmental surveillance*. J Water Health.; 11 (4): 772-782.
- (8) Pannon-Víz Zrt., (2014), *Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító*, Győr
- (9) Némethné Deák Irén, 2013, *Kommunális szennyvizek tisztítása*, Egyetemi diasor, Győr
- (10) Casas N, Amarita F, de Maraón IM. (2007), Evaluation of an extracting method for the detection of Hepatitis A virus in shellfish by SYBR-Green real-time RT-PCR, *Int J Food Microbiol* 120 (1-2):179-85.
- (11) Pannon-Víz Zrt., Győri Szennyvíztisztító honlapja http://www.pannon-viz.hu/cikk/gyori_szennyvitztisztito.html 2014.09.20
- Ábrahám Ferenc, Bardóczyné Székely Emőke, Kárpáti Árpád, László Zsuzsanna, Szilágyi Ferenc, Thury Péter, Vermes László, (2007), *A szennyvíztisztítás alapjai*, Miskolc
- Ian L. Pepper, Charles P. Gerba, Terry J. Gentry, 2009, *Environmental Microbiology*, Elseiver, London
- MSZ EN ISO 7899-2:2000 . Az enterococcus bélbaktériumok kimutatása és megszámlálása
- MSZ EN ISO 9308-3:2000 Vízhminőség. Az Escherichia coli és coliform baktériumok kimutatása és megszámlálása felszíni és szennyvizekben
- MSZ ISO 16649-2:2005 Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a béta-glükuronidáz-pozitív Escherichia coli megszámlálására
- Prohászka Zoltán, Füst György, Dinya Elek, 2009, *Biostatistika a klinikumban*, Semmelweis, Budapest

7. ÁBRAJEGYZÉK

- [1] 1. ábra Az antibiotikum rezisztens baktériumok és a HAV vizsgálatához vett minták helyének meghatározása térképen Forrás: GoogleMaps 2014.10.10 15:03
- [2] 2. ábra A Győri Szennyvíztisztító telep madártávlatból Forrás: Mészáros Mátyás (Kisalföld)
- [3] 3. ábra. A Győri Szennyvíztisztító telep helyszínrajza a mintavételi pontok (1-5) jelölésével Forrás: Némethné Deák Irén (Egyetemi diáor)
- [4] 4 ábra Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep madártávlatból Forrás: Mészáros Mátyás (Kisalföld)
- [5] 5. ábra Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep OMS típusú szennyvízkezelő rendszer kapcsolási sémája Forrás: http://www.pannon-viz.hu/cikk/alsoszigetkozi_szennyviztisztito.html#!prettyPhoto/2/ 2014.10.07. 10:20)
- [6] 6. ábra Az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep melletti Mosoni-Duna szakasz Forrás: GoogleMaps 2014.10.10
- [7] 7. ábra A Mosoni-Duna Aranypart I- szabadstrandi szakasz Forrás: GoogleMaps 2014.10.10

8. TÁBLÁZATJEGYZÉK

- 1. táblázat: A Győri és az Alsó-szigetközi Szennyvíztisztító telep limitáló tényezői
Forrás: <http://www.pannon-viz.hu/cikk/szennyvizkezeles.html> 2014.10.07. 11:26