

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
SZENT ISTVÁN CAMPUS
KÖRNYEZETTUDOMÁNYI INTÉZET

TDK-dolgozat

**GYÓGYSZERMARADVÁNYOK BONTÁSÁRA KÉPES
BAKTÉRIUMKONZORCIUM KIALAKÍTÁSA ÉS
TESZTELÉSE EGY TERMÉSZETES FELSZÍNI
VÍZMINTÁBAN**

Készítette: Jakab Krisztina, Környezetmérnöki mesterképzés

Témavezetők: Dr. Benedek Tibor, Molekuláris Ökológia Tanszék
Pápai Márton, Molekuláris Ökológia Tanszék

Kaposvár
2023.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. BEVEZETÉS	4
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
3.1. Gyógyszerhasználat világszinten.....	6
3.1.1. <i>Nem szteroid alapú gyulladáscsökkentők (NSAID).....</i>	<i>7</i>
3.1.1.1. <i>Ibuprofen (IBU).....</i>	<i>8</i>
3. 1. 1. 2. <i>Diklofenák (DIC)</i>	<i>9</i>
3.1.2. Antiepileptikumok (AED)	10
3. 1. 2. 1. <i>Karbamazepin (CBZ)</i>	<i>10</i>
3. 2. A gyógyszerhatóanyagok környezetbe való kijutása	12
3. 2. 1. <i>Az ibuprofen kijutása a környezetbe (IBU).....</i>	<i>13</i>
3. 2. 2. <i>A diklofenák kijutása a környezetbe (DIC).....</i>	<i>14</i>
3. 2. 3. <i>Karbamazepin kijutása a környezetbe (CBZ)</i>	<i>15</i>
3. 3. A gyógyszerhatóanyagok ökototoxicitása	16
3. 3. 1. <i>NSAID-ok ökototoxicitása</i>	<i>16</i>
3. 3. 1. 1. <i>Ibuprofen ökototoxicitása</i>	<i>17</i>
3. 3. 1. 2. <i>Diklofenák ökototoxicitása</i>	<i>18</i>
3. 3. 2. <i>Karbamazepin ökototoxicitása</i>	<i>19</i>
3. 4. A gyógyszerhatóanyagok eliminációja vízi ökoszisztémákból	20
3. 4. 1. <i>Fizikai-kémiai eljárások.....</i>	<i>20</i>
3. 4. 2. <i>Biológiai eljárások.....</i>	<i>21</i>
3. 4. 2. 1. <i>Az ibuprofen eltávolítása baktériumokkal</i>	<i>22</i>
3. 4. 2. 2. <i>A diklofenák eltávolítása baktériumokkal.....</i>	<i>23</i>
3. 4. 2. 3. <i>A karbamazepin eltávolítása baktériumokkal</i>	<i>24</i>
4. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN	26
4. 1. Előzmények	26
4. 2. A kiválasztott baktériumtörzsek jellemzése.....	26
4. 3. Együtt-tenyésztési vizsgálatok.....	27
4. 3. 1. <i>Keresztcsíkozásos módszer.....</i>	<i>27</i>
4. 3. 2. <i>Agardiffúziós lyuk-teszt</i>	<i>28</i>
4. 4. Terminális Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálat.....	29

4. 4. 1. DNS izolálás.....	30
4. 4. 2. Polimeráz láncreakció (PCR).....	30
4. 4. 3. Agaróz gélelektroforézis.....	31
4. 4. 4. Restrikciós emésztés.....	31
4. 4. 5. Etanolos precipitáció.....	31
4. 4. 6. T-RFLP vizsgálat.....	32
4. 5. A konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képességének vizsgálata ásványi tápoldatban.....	32
4. 6. A konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képességének vizsgálata természetes vízmintában.....	33
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK.....	34
5. 1. Együtt-tenyésztési vizsgálatok.....	34
5. 1. 1. Keresztsíkozás módszer.....	34
5. 1. 2. Agardiffúziós lyuk-teszt.....	34
5. 2. A konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képessége ásványi tápoldatban.....	35
5. 2. 1. A konzorcium T-RFLP vizsgálatok BHB ásványi tápoldatban.....	36
5. 3. A konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képessége természetes vízmintában.....	38
5. 3. 1. A természetes vízmintát tartalmazó baktériumközösség T-RFLP vizsgálatának eredményei.....	39
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	41
7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	42
IRODALOM.....	43

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre több természetes és mesterséges anyagról bizonyosodik be, hogy a pozitív hatása mellett a környezetbe kikerülve komoly szennyezést jelentenek az ökoszisztémára és az élőlényekre egyaránt. Nem meglepő tehát, hogy egyre inkább nagyobb figyelmet kap a gyógyszerek megjelenése a környezeti elemekben, amit a nagy mennyiségű használatuk, fogyasztásuk okoz. A gyógyszerekről általánosan elmondható, hogy perzisztens hatóanyagoknak minősülnek, ugyanakkor a biológiai aktivitásuk, bomlástermékeik károsabb hatást eredményezhetnek, mint maga a kiindulási anyag.

A gyógyászatban felhasznált gyógyszerek közül a nem-szteroid gyulladáscsökkentők (diklofenák, ibuprofen) és az antiepileptikumok (karbamazepin) a leggyakrabban alkalmazott hatóanyagok, amelyeket nap, mint nap alkalmazunk panaszaink, betegségeink kezelésére. Ezek a hatóanyagok különböző módokon juthatnak be a szennyvizekbe, akár átalakulás nélkül, aktív formában is. Azonban a jelenleg alkalmazott szennyvíztisztítási eljárások nem alkalmasak az ilyen típusú szennyezőanyagok eltávolítására, ezért azok tovább haladnak a felszíni vízbázisokba és a talajba. Ennek következtében a világ minden szegletében mérhetünk kisebb, nagyobb mennyiségben különféle gyógyszerhatóanyagot a felszíni vizekben, az óceánokban, tengerekben, valamint az ivóvíz bázisainkban. Ezért kiemelkedően fontos olyan eljárások kidolgozása, amelyek hatékonyan képesek lebontani, eltávolítani a vizekbe kikerülő gyógyszereket.

A gyógyszerhatóanyagok eltávolításához az eljárások lehetnek fizikai, kémiai és biológiai módszerek, amelyek közül leginkább a biológiai eljárások azok, amelyek környezetbarát, költséghatékony eljárások és a legkisebb beavatkozással képesek javítani a környezeti elem, esetünkben a víz minőségét. A baktériumok képesek számtalan szennyezőanyag lebontására az életfolyamataik révén, így potenciális megoldást jelenthetnek a gyógyszerhatóanyagok esetében is. Gyakran egy-egy gyógyszermaradvány lebontására más és más baktériumfaj lehet képes, baktériumkonzorciumok felhasználásával viszont, amelynek tagjai egymás metabolikus képességeit kiegészítik, komplex szennyeződések, gyógyszermaradvány keverékek is hatékonyan lebonthatók, eltávolíthatók a szennyezett közegekből.

2. CÉLKITÚZÉS

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE) Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetében több éve folynak kutatások a felszíni vizekbe kikerült gyógyszerhatóanyagok eltávolításával kapcsolatosan. A kutatások folyamán sikeresen izoláltak egy bakteriális biofilmből szelektív dúsító tenyészetek alkalmazásával, vízdoldható és perzisztens gyógyszerhatóanyagokat (ibuprofen, diklofenák, karbamazepin) bontó mikroorganizmusokat.

A jelen kutatás célja a már korábban izolált baktériumok alkalmazásával olyan bakteriális konzorcium kialakítása, amely potenciális oltóanyagként szolgálhat a természetbe gyakran kijutó gyógyszerhatóanyagok (ibuprofen, diklofenák, karbamazepin) lebontására. Ennek elérése érdekében szükséges a kiválasztott négy baktériumtörzs, a *Stenotrophomonas humi* DIC_5, *Rhizobium daejeonense* IBU_18, *Nocardioides carbamazepini* CBZ_1 és a *Brevundimonas mongoliensis* CBZ_3 együttes tesztelése gyógyszerhatóanyagbontó képesség tekintetében, abban az esetben, ha mind a három gyógyszerhatóanyag jelen van a tesztoldatban (diklofenák, ibuprofen és karbamazepin). További cél a kialakított konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képességének vizsgálata természetes felszíni vízmintában az autochton baktériumközösség jelenlétében, kiegészítő ko-metabolikus szubsztrátok hozzáadásával.

A kutatás magába foglalja a következő vizsgálatokat:

- a konzorciumot alkotó izolált baktériumtörzsek együtt-tenyésztési vizsgálatát két tenyésztéstől függő módszer a keresztcsíkozásos, illetve az agardiffúziós lyuk-teszt
- a konzorcium gyógyszerhatóanyag bontó képességének tesztelését ásványi tápoldatban és természetes vízmintában ko-metabolikus szubsztrátok hozzáadásával;
- a konzorciumot alkotó baktériumtörzsek közösségen belüli relatív abundanciáját és változásának vizsgálatát Terminális Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP) módszerrel, amelyhez előbb a baktériumtörzsek individuális T-RFLP profilját határozom meg;
- a gyógyszerhatóanyagok mennyiségi változásának nyomon követése nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC).

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Gyógyszerhasználat világszinten

A gyógyítás, a fájdalom csillapítása, legyőzése, a különböző gyógyhatású anyagok felkutatása együtt alakult ki az emberiséggel (Fehérvári 2008). A gyógyszerek segítségével meghosszabbíthatjuk az életet és megoldást jelentenek a helytelen életmód miatt kialakuló népbetegségekre is (Gerencsérné 2015). Az ember fejlődése során más és más helyen kutatta azokat az anyagokat, amelyek elősegítették a különböző betegségek megelőzését, kezelését. Először a természet jelentette a forrást, később a technológia fejlődésével a mesterséges anyagok kerültek a középpontba. Az első lépés a szintetikus gyógyszerek fele az aszpirin megjelenése volt, amelyet 1897-ben hoztak nyilvánosságra ([http 1](#)). A technológiai fejlődést követte az életszínvonal és a gyógyszerek iránti igény megnövekedése.

A gyógyszerek mennyiségi és minőségi gyarapodását maga után hozta az elérhetőbbé válása, ebből következtethetően megnőtt a fogyasztási rátájuk is. A 2007-2008-as kutatások alátámasztják a lakosság növekvő gyógyszerhasználatát, valamint, hogy igen jelentős összeget költenek az egészségügyi ellátásokra. A magyar háztartások 87%-a költött vényköteles gyógyszerekre, 68%-a vény nélkül kiadható gyógyszerekre a 2007-es adatok szerint, míg 2008-ban 97%-ra nőtt azon háztartások száma, ahol vényköteles gyógyszereket fogyasztanak (Varga 2012). A 2013-as adatok alapján az akkori gyógyszerfogyasztás 3,7%-kal nőtt az előző évhez képest ([http 2](#)). Az OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) által készített 2019-es statisztikai adatok is bizonyítják a nagy mennyiségű gyógyszerfogyasztás tényét. Magyarországon évente 7,3 millió ember vált ki gyógyszert, illetve közülük 3,3 millióan rendszeresen teszik, ebből arra következtethetünk, hogy minden harmadik ember rendszeres gyógyszerfogyasztó (Erdősi mtsai. 2021, OECD 2019).

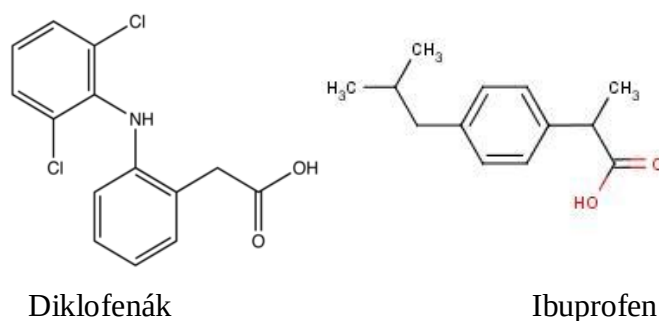
A nagy mértékű gyógyszerfogyasztás nem kizárólag Magyarországon jelent problémát, Európa és más kontinens országai ugyanúgy szembe kell nézzenek ezzel a nem elhanyagolható helyzettel. Becslések alapján az egy főre számított gyógyszerfogyasztás világszerte 15 g/év, viszont az ipari országokban ez elérheti a 50-150 grammot is (Alder mtsai. 2006). A Balti-tenger térségében végzett kutatások szerint 2014-ben a 20 leggyakrabban eladott gyógyszerekből 1600 tonnát értékesítettek, ami az itt élő lakosokkal leosztva 80 g/fő éves fogyasztást jelent (Lonappan mtsai. 2016a).

3.1.1. Nem szteroid alapú gyulladáscsökkentők (NSAID)

Leggyakoribb panasz, amivel az orvoshoz fordulnak a betegek a fájdalom jelenléte a szervezet különböző részein. Az egyik ilyen kellemetlen érzés a gyulladás, amely normál esetben egy hasznos és nélkülözhetetlen mechanizmusa a szervezetnek. A gyulladás felelős azért, hogy megakadályozza az esetleges szövetkárosodást, amit egy belső vagy külső környezeti hatás váltott ki. Tehát jelenléte egy válaszreakció a szervezetünkben történt negatív történésnek, elősegíti a gyógyulási folyamatokat, a kórokozók vagy károsodott szövetek eltávolítását (Márta 2019).

Mind a fájdalom, mind a kóros gyulladás csökkentésére leggyakrabban alkalmazott készítmények a nem szteroid gyulladáscsökkentők, más néven a NSAID-ok (non-steroidal anti-inflammatory drug). Az Amerikai Egyesült Államokban a 65 évnél idősebbek 70%-a használ hetente legalább egyszer NSAID-okat, 34%-a naponta egy tablettát (Inotai mtsai. 2010).

A NSAID-ok elsődleges alkalmazása a mozgásszervi fájdalmak enyhítése, viszont gyakran használják lázcsillapításra, menstruációs fájdalmakra, fogorvosi műtét utáni fájdalomra és fejfájásra egyaránt (Sütő 2019). Nem szteroid gyulladáscsökkentők a különböző ecetsav-származékok, oxikámok, propionsav-származékok, fenamátok, coxibok és egyéb hatóanyagok, köztük az a két hatóanyag is (ibuprofen és diklofenák), amelyekről ebben a dolgozatban is részletesen szó esik (1. ábra) (<http> 3).



1. Ábra. A diklofenák és az ibuprofen szerkezete (<http> 4)

A NSAID-ok lehetnek nem szelektívek és szelektívek. Előbbi jelentése, hogy COX-1-es és COX-2-es típusú enzimre gátló hatással rendelkeznek, míg a szelektívek csak a COX-2-re vannak hatással. A legtöbb NSAID nem szelektív, csökkentik a fájdalmat, de jelentős mellékhatással járnak együtt, mint a hematológiai hatások, gasztrointesztinális panaszok megjelenése (Kholood 2020, Vane 1971).

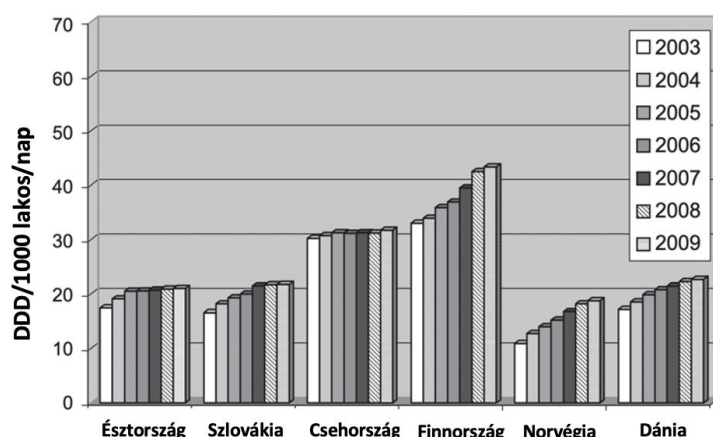
Az 1. Táblázatba bemutatásra kerül néhány olyan készítmény, amelyek az általam is vizsgált hatóanyagokat tartalmazzák a napi átlagdózisuk mellett, melynek megnövelésével jelentősen emelkedik a mellékhatások kockázata és erőssége.

1. Táblázat. Ismertebb NSAID-okat tartalmazó készítmények (Neal 2000, Tong 2010)

Hatóanyag	Készítmény	Napi dózis (mg)
Ibuprofen	HUMA-Ibuprofen	800-1200
	HUMA-Profen	
	Ibuprofen Polfa	600-1200
	Nurofen	400-1200
	Solpaflex	600-1200
Diklofenák	Cataflam	
	Diclofenac	50-150
	Voltaren	
	Zipsor	25

3.1.1.1. Ibuprofen (IBU)

Az ibuprofen az egyik legismertebb és legtöbbször alkalmazott, hazánkban recept nélkül kapható NSAID, egy propionsav-származék, amely rajta van a WHO által készített „esszenciális gyógyszerek listáján” (Kleemiss mtsai. 2020). A hatóanyag széleskörű használatát a fogyasztási trendek jól alátámasztják. Litvániában a 2005-ös évhez viszonyítva 2016-ban az ibuprofen fogyasztás 3,22-szeresére nőtt (Skaisté mtsai. 2018). Horvátországban szintén növekvő tendenciát mutatott az ibuprofen fogyasztása. A vizsgálatok kimutatták, hogy 2007-2013 között az ibuprofen használat 134%-kal növekedett (Krníc mtsai. 2015). Hazánkban is jelentős mértékű az ibuprofen fogyasztás, mely 2000-2007 között 9-szeresére emelkedett. Ebben az időszakban Hollandiában és Csehországban is növekedett a fogyasztása 145%-kal, valamint 19,62%-kal (Inotai mtsai. 2010). Hudec és társai 2011-ben megjelent tanulmányukban szintén kimutatták az ibuprofen fogyasztás mennyiségi növekedését (2. ábra) Szlovákiában, Finnországban, Norvégiában, Csehországban, Dániában és Észtországban (Hudec 2011).



2. Ábra. Az ibuprofen fogyasztás Európa egyes országaiban (Hudec 2011)

Az ibuprofent széleskörben használják az enyhe vagy mérsékelt fájdalom- és lázcsillapításra, reumás tünetekre, valamint antibakteriális hatása miatt. Az ibuprofen csak nagy mennyiségben mérgező a szervezetre és a környezetre. Vizsgálatokkal támasztották alá, hogy

napi 2400 mg feletti dózisban trombózis fokozó hatással bír (Stuhlmeier mtsai. 1999, OGYEI 2020). Hatásmechanizmusa alapján az ibuprofen nem szelektív NSAID, ebből adódóan mind a COX-1, mind a COX-2 enzim működését gátolja. A nem szelektív gátló hatás következtében 1200 mg feletti napi dózis esetén, ez az érték a meghatározott maximális napi mennyiség, jelentősek lehetnek a mellékhatásai, mint a gasztrointesztinális fekélyek, a vörösvérsejtszám esése, vesekárosodás, fehérjevesztés (Neal 2000, Kholood 2020).

3. 1. 1. 2. Diklofenák (DIC)

Az ibuprofen mellett szintén egy gyakran alkalmazott NSAID a diklofenák. Egy 2007-es tanulmány szerint a világ teljes diklofenák fogyasztása 940 tonna/év (Zhang mtsai. 2008). Már 2013-ban a gyógyszer világszintű fogyasztását 1443 tonnára becsülték, melynek közel 40%-át Ázsiában, 28,7%-át Európában használták fel. Valamint azt is meghatározták, hogy 2010-2013 között a diklofenák humán célú fogyasztása 2-60 tonna között mozgott, illetve az egy főre jutó átlagos fogyasztás $0,33 \pm 0,29$ g/fő/év volt (Acuna 2015).

Több országban, mint Horvátország, az Egyesült Királyság, az Amerikai Egyesült Államok, illetve hazánkban is a diklofenák hatóanyag volt az első számú NSAID a 2000-es évek elején (Inotai mtsai. 2010). Európa legnagyobb diklofenák fogyasztó országa Németország (86 tonna 2001-ben), ezt követi Anglia 26,13 tonnával, majd Franciaország 16 tonnával (Acuna 2015). Franciaországban 2016-ban az összes fájdalomcsillapító fogyasztás 30,04%-át, közel egyharmadát tette ki a diklofenák (Skaisté mtsai. 2018). A 2014-es adatok alapján a hatóanyag felhasználása Finnországban 1050, Észtországban 593, Oroszországban 700, Svédországban 8800 kg/év volt (UNESCO & HELCOM 2017).

Ahogy a NSAID-ok, a diklofenák hatékony az akut és krónikus fájdalom-, lázcsillapításban, reumatikus betegségeknél, valamint rendelkezik gyulladáscsökkentő jelleggel. A diklofenák hatást fejt ki a prosztaglandin-szintézis során a ciklooxygenáz enzimekre (COX-1, COX-2), viszont egyes vizsgálatok azt mutatják, hogy nagyobb hatással van a COX-2 enzimre (Tong 2010). Hosszantartó gyógyszeres alkalmazása során gyakran bántalmakat okoz a gyomorban, mint a nyálkahártya sérülés, fekély, rosszabb esetben vérzés is felléphet (Fenyves 2010). Széles skálán mozognak a diklofenák hatóanyaggal rendelkező készítmények, ismertebbek közülük a Voltaren, Cataflam, Zorvolex, Zipson (Tong 2010, Kholood 2020).

3.1.2. Antiepileptikumok (AED)

Az antiepileptikumok, más néven AED (antiepileptic drug), csoportjába tartoznak azok a gyógyszerek, amelyek az epilepszia kezelésére alkalmasak. Az ide tartozó hatóanyagokat öt csoportba sorolják kémiai szerkezetük alapján, viszont több alcsoportra bonthatók. Az AED-k lehetnek barbiturátok, benzodiazepin származékok, karboxamid származékok, zsírsav származékok, illetve más anyagok (oazolidin származékok, szukcinimid származékok), közös jelzésük az N03A a WHO gyógyszerkezelő rendszerében ([http 5](http://5)).

Az AED-k az epilepszia mellett számos más tünetre is alkalmazhatók, mint a migrén, neuropátiás fájdalom, bipoláris zavar, szorongás és még számos más rendellenesség kezelésére. Ellentétben a NSAID-okkal az AED-nek nincs minden ide tartozó hatóanyagra általánosan igaz hatásmechanizmusa. Az AED-k esetében a hatásmechanizmus megértése több akadály miatt nem valósult meg, az egyik ilyen akadály a sokfélesége ezeknek az anyagoknak, egy másik ok, hogy nem teljesen felfedettek a molekuláris szinten történő folyamataik. Ugyanakkor az sem teljes mértékben tisztázott, hogy ezek a típusú gyógyszerek a tünetek kezelésére irányuló folyamatokban játszanak szerepet vagy a megelőzést serkentik elő (Perucca 2005).

A többféle felhasználási terület maga után vonta az AED-k fogyasztásának növekedését. Az összesített AED fogyasztás 2003-tól 2007-ig 1000 lakosra nézve 12,6%-ról 13,8%-ra növekedett. Az újabb típusú AED-fogyasztás (1991 után bevezetett AED) ugyanebben a periódusban megháromszorozódott (Hsieh & Huang 2011).

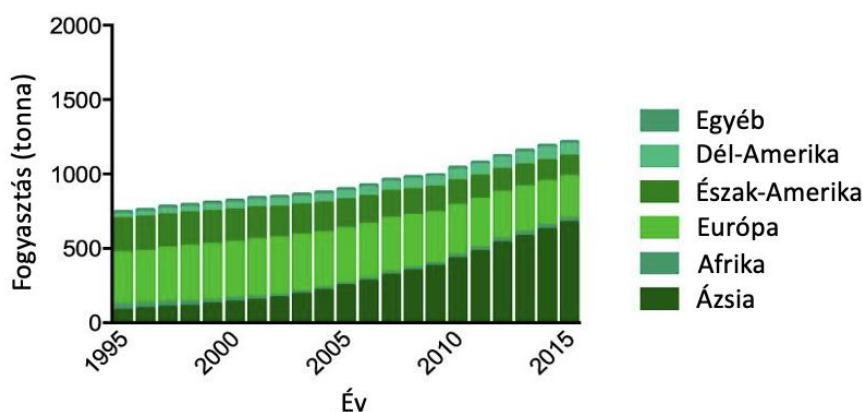
A kezelések folyamán fellépő mellékhatások különböző területeken jelenhetnek meg, negatív hatással lehet a hangulatra és érzelemre, a koordinációra, a bőr és nyálkahártya szintjére, valamint az alvásra és a testsúlyra is (Perucca & Gilliam 2012). A mellékhatások kedvezőbbé tétele érdekében különböző hatóanyagokkal együtt próbálták alkalmazni az AED gyógyszereket, de a valódi áttörést a karbamazepin megjelenése váltotta ki.

3. 1. 2. 1. Karbamazepin (CBZ)

A karbamazepin egy antiepileptikum, melyet világszerte használnak görcsoldásra, elsősorban epilepsziás rohamok kezelésére, valamint gyakori a használata neuropátiás fájdalom kezelése során is. Számos más betegség esetében is hatékonyak bizonyult egy-egy tünet, tünetcsoport kezelésében: figyelemhiányos hiperaktív zavarok, fantomvégtag szindróma, poszttraumás stressz bipoláris zavarok (Wayne 1973, Alrashood 2016). 2019-ben a WHO alapvető gyógyszereinek listájára is felkerült, ahol a legfontosabb és legköltséghatékonyabb gyógyszerek szerepelnek (Kholood 2020).

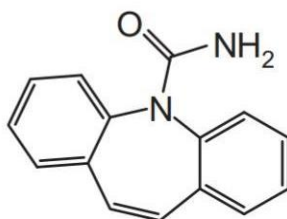
Az egyre szélesebb körű felhasználás a fogyasztás növekedését eredményezte, 1995-2015 között a karbamazepin fogyasztás 742 tonnáról 1214 tonnára emelkedett (Oldenkamp mtsai. 2019). Finnországban a karbamazepin felhasználás 2014-ben már 3530 kg/év, Svédországban pedig 5860 kg éves fogyasztást értek el 2014-ben (Zhang mtsai. 2008, UNESCO & HELCOM 2017). Egy Dániában 1993-2002 között végzett kutatás szerint a karbamazepin fogyasztás csökkent, viszont általánosságban az AED-k fogyasztási aránya folyamatosan növekedett (Tsiropoulos mtsai. 2006).

Oldenkamp és munkatársai (2019) nemzetközi kutatásuk révén szintén igazolták a karbamazepin fogyasztásának növekedését világszerte (3. ábra). Kutatómunkájuk során 69 országban vizsgálták a karbamazepin fogyasztást (32 európai, 19 ázsiai, 8 dél-amerikai, 4 közép-/észak-amerikai, 4 afrikai és 2 óceániai országban), 1995-ben kb. 750 tonnára becsülték a fogyasztást, míg 2015-ben ez 1250 tonna volt (Oldenkamp 2019).



3. Ábra. Karbamazepin fogyasztás a kontinenseken (Oldenkamp 2019)

A karbamazepin egy iminodibenzil-származék triciklusos szerkezettel (4. ábra), zsírban oldódó, könnyen átjut a szervezetben lévő membrán gátakon (Albani mtsai. 1995, Alrashood 2016).



4. Ábra. A karbamazepin szerkezete (Alrashood 2016)

A karbamazepin fő mechanizmusa a feszültségfüggő nátriumcsatornák blokkolása (Albani mtsai. 1995, Kholood 2020). Hatásmechanizmusa mellékhatásokat okozhat a személytől, dózistól, illetve más paraméterektől függően. Okozhat szédülést, kettős látást, vízretenciót, járhat allergiás tünetekkel, leginkább bőr irritációval (Gyires & Früst 2011).

3. 2. A gyógyszerhatóanyagok környezetbe való kijutása

Egyre inkább nagyobb figyelmet kap a gyógyszerek megjelenése a környezeti elemekben, amit a nagy mennyiségű használatuk, fogyasztásuk okoz. A legérzékenyebb, leginkább érintett környezeti elem a víz. Számos kutatás bizonyítja már a több mint 40 éve ismert tényt, hogy a talajvízben, folyókban, tavakban, tengerekben, ivóvízben mérhető koncentrációban vannak jelen a különféle gyógyszerek (Kosjek mtsai. 2005, Heberer 2002b, Collado mtsai. 2014, Gerencsérné mtsai. 2015).

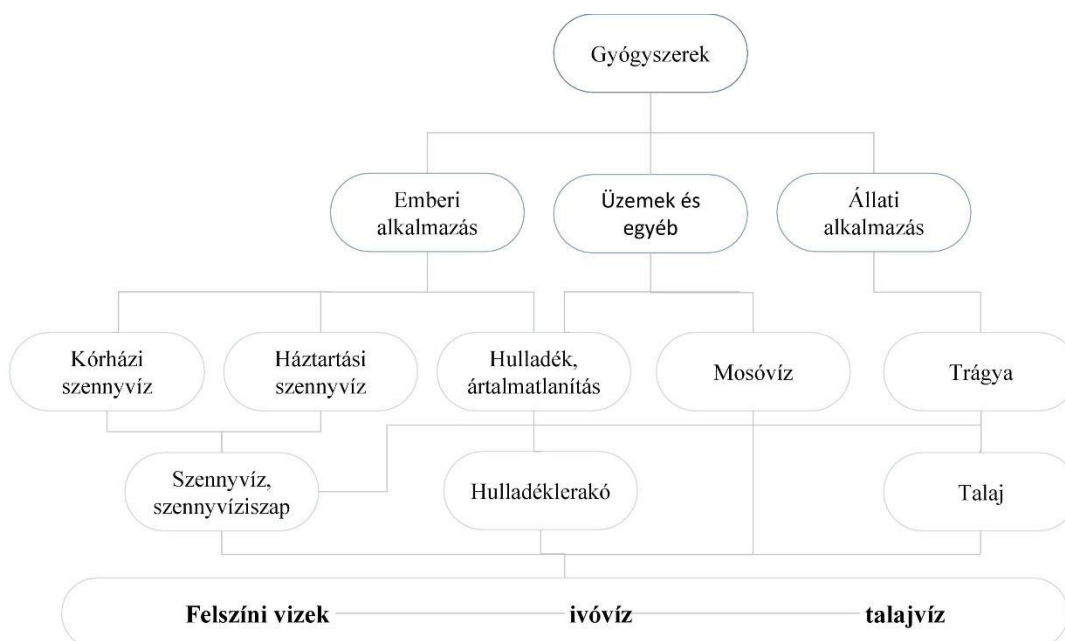
Mintegy 160 különféle aktív gyógyszer összetevő bizonyítottan jelen van más-más vízi környezetben, mint a kommunális szennyvízben, egészségügyi központok szennyvizében, hulladéklerakók csurgalékvizében, felszíni vizekben, tengervizekben, óceánokban, talajvízben és ivóvízben (Heberer 2002b, Daughton & Ternes 1999, Kümmerer 2001). Egyes kutatások szerint a gyógyszerek és metabolitjaik már a sarkvidékeken is kimutathatóak (Kallenborn mtsai. 2008). A gyógyszerek jelenlétét először 1976-ban mutatták ki a Kansas városi szennyvíztelepen (Garrison mtsai. 1976).

A gyógyszerek nagy bioaktivitása problémákat jelenthet a környezetünkben, leginkább az élővizekben, ami a hatóanyagok szerkezeti változásainak vagy ezek hiányának köszönhető. A gyógyszerek az élő szervezetekben és a környezetbe kikerülve az ott lévő tényezők (fény, mikroorganizmusok, oxigén stb.) hatására bizonyos százalékban, ritkán teljesen átalakulnak, új metabolitokat hozva létre (Kümmerer 2010). Alacsony biológiai bonthatóságuk mellé gyakran a felhalmozódás társul, melyek együttes hatásuk révén komoly problémákat okozhatnak az élővilágra nézve (Kosjek mtsai. 2005).

A gyógyszerhasználatból származó hatóanyagok, metabolitjaik, segédanyagok, adalékanyagok számos pontszerű, illetve nem pontszerű, diffúz forrásokon keresztül kerülnek ki a környezetbe (5. ábra). Az egyik kijutási út az emberi fogyasztás során a le nem bomlott anyagok és metabolitok kiürülése a kiválasztási folyamatok során. Ugyancsak hasonló az állati alkalmazás folyamán kiürült anyagok sorsa. Mindkét kiválasztási folyamat terméke a szennyvizekbe kerül, ahol a legtöbb esetben a gyógyszerek bontására nem alkalmasak a szennyvíztisztító technológiák (Gerencsérné mtsai. 2015).

Bizonyítottan magasabb koncentrációban juttatnak ki gyógyszereket a gyógyszergyártók, mint a kommunális szennyvizek, jelentős szennyezést okozva. Az indiai gyógyszergyártótelep szennyvize magas koncentrációban tartalmaz antibiotikumokat, például a ciprofloxacint

menyisége 28000-31000 µg/L koncentráció volt, ami jóval meghaladja a mérgező szintet a vízi szervezetekre és egyes baktériumokra (Larsson 2007).



5. Ábra. A gyógyszermaradványok forrásai és lehetséges bejutási útjaik a vízi környezetbe (saját készítésű ábra)

3. 2. 1. Az ibuprofen kijutása a környezetbe (IBU)

Az ibuprofen az egyike a legfontosabb gyógyszereknek a WHO Esszenciális Gyógyszerlistáján, ebből adódóan nem meglepő, hogy a környezetbe kikerülő gyógyszerhatóanyagok között előkelő helyen áll, a szennyvizekből leggyakrabban kimutatott 20 gyógyszer között szerepel (UNESCO & HELCOM 2017). A nagy mennyiségű fogyasztása mellett magas a kiválasztási aránya is, a terápiás adag 70-80%-a is kiválasztódhat a szervezetből. Ezek mellett nagy mobilitás jellemzi a vízi környezetbe, de a többi gyógyszerhez viszonyítva a perzisztenciája sokkal kisebb (Buser mtsai. 1999).

Mint már említettem az ibuprofent már kimutatták 47 ország felszíni- és felszín alatti vizeiből, szennyvizeiből, ugyanakkor számos országban már a csapvízből is kimutatható (Gerencsérné mtsai. 2015, Parolini 2020). Az Egyesült Nemzetek Szervezetének régiójában egy felmérés folyamán az ibuprofen jelenlétét nézték felszíni-, felszín alatti vizekben, szennyvízben, talajvízben, ivóvízben és csapvízben egyaránt. Eredményeik alapján az IBU egy szélesebb tartományban mozog a környezeti mátrixokban, 0,108 µg/L és 303 µg/L koncentrációk között volt mérhető (Beek mtsai. 2016). Az ibuprofen környezetben való

jelenléte leginkább a felszíni vizekben vizsgált, erről található a legtöbb kutatási eredmény. Ez nincs másképp Európában sem, ahol több ország felszíni vízmintáiból is kimutatták már a gyógyszert, főképp folyókban: Finnországban 10 (max. 65) ng/L, Franciaországban 23 (max. 120) ng/L, Németországban 70 (max. 530) ng/L, Magyarországon 4-110 ng/L átlagos koncentrációkat mértek a (Gerencsérné mtsai. 2015). A gyógyszer jelenlétét vizsgálták Berlinben a talajvízben, illetve a szennyvízben, előbbinél 200 ng/L és utóbbinál 0,1 µg/L koncentrációkat tapasztaltak a vizsgálat során (Heberer 2002b).

Az UNESCO egyik felmérése során a Balti-tenger vizében található gyógyszerek jelenlétét vizsgálta, ahol az ibuprofen maximális koncentrációja 159 ng/L, illetve az átlag koncentrációja 0,001 µg/L fölött volt (UNESCO & HELCOM 2017). Annak ellenére, hogy az említett koncentrációk viszonylag alacsonyak, és nem okoznak akut mérgezést, a biológiai aktivitásuk nem elhanyagolható, komoly kockázatot jelentenek a nem célszervezetekre nézve (Parolini 2020).

3. 2. 2. A diklofenák kijutása a környezetbe (DIC)

A diklofenákot tartalmazó készítmények többsége vénköteles, de néhány vén nélkül is megvásárolható. A diklofenák helyett kapott a környezetben mért 20 leggyakoribb gyógyszerek között (Kleemiss mtsai. 2020). A hatóanyag a legnagyobb mennyiségben a gyógyszeriparból, kórházi és háztartási szennyvizekből származik (Satishkumar mtsai. 2020). Az emberi szervezetből a diklofenák a vizelettel és a plazmával választódik ki metabolitjaival együtt, így nem meglepő, hogy nagy mennyiségeket juttatnak ki a kommunális és kórházi szennyvizek (Kholood 2020). A diklofenák elterjedtsége és gyakori alkalmazása okán már 50 országban mutatták ki jelenlétét felszíni vízből, szennyvízből, valamint ivóvízből (Beek mtsai. 2016). Természetesen ezek az országok között számos európai ország is szerepel. Gerencsérné és munkatársai 2015-ben publikált cikkükben összefoglaltak néhány európai ország felszíni vizében mért DIC koncentrációt, amelyet a 2. táblázat foglal össze.

2. Táblázat. A diklofenák koncentrációja európai országok felszíni vizeiben (Gerencsérné mtsai. 2015)

Ország	DIC koncentráció (ng/L)
Ausztria	20 - 64
Finnország	15 - 40
Franciaország	18 - 41
Németország	150 - 1200
Svájc	20 - 150
Magyarország	20 - 931

Az UNESCO & HELCOM 2017-es adatai alapján a diklofenák átlagos koncentrációja a szennyvizekben 1 µg/L fölött van, a kezeletlen szennyvíziszapban 0,1 µg/L alatt. Ezeken kívül bebizonyosodott, hogy a diklofenák jelen van a Balti-tenger vizében, ahol maximum 54 ng/L koncentrációban detektálták, valamint jelen volt az üledékben és a benne élő szervezetekben egyaránt. A Balti-tengerben is honos csapósügér (*European perch*) epéjében több mint 5 µg/kg mennyiségben volt jelen a diklofenák hatóanyaga (UNESCO & HELCOM 2017).

A szennyvízbe befolyó közegből vett minták diklofenák tartalmát vizsgálták meg Kanadában, ahol a befolyó vízben a DIC 64,89 µg/L koncentrációjú volt, az elsődleges iszapban 1,10 µg/g, a másodlagos iszapban 0,90 µg/g mennyiségben volt detektálható. A kutatás bizonyítja, hogy a diklofenák kis mértékben, de felhalmozódott az iszapban, ami nem elhanyagolható az eltávolítási folyamatok, valamint az üledékben élő szervezetek szempontjából (Lonappan et al. 2016b).

A diklofenák akár 90%-os hatékonysággal bontható fotodegradációs folyamatokkal, viszont gyakori, hogy a keletkező metabolitjai toxikusabbak, mint maga az alap hatóanyag, ami jelentős hatással lehet az élő szervezetekre (Buser mtsai., 1998, Schulze mtsai., 2010). Ugyanakkor alátámasztja azt a hipotézist, hogy szükség van új eliminációs módszerek kidolgozására.

3. 2. 3. Karbamazepin kijutása a környezetbe (CBZ)

A karbamazepin szintén megjelenik az UNESCO & HELCOM 2017-es kiadványában meghatározott 20 leggyakrabban jelenlévő gyógyszerek körében, mint gyakran alkalmazott epilepszia elleni gyógyszer. Az emberi szervezetből a máj segítségével választódik ki, ahol karbamazepin-10,11-epoxiddá és más származékokká metabolizálódik (Reith mtsai., 2000, Van Rooyen mtsai. 2002). A szájon át bevitt adag esetén a kiválasztódó mennyiség 72%-a vizelettel, 28%-a széklettel ürül ki a szervezetből és kerül a szennyvízbe és onnan tovább az élővizekbe (Zhang mtsai. 2008). Európa számos országában próbálták felmérni a karbamazepin jelenlétét. Egy összegző vizsgálat során számos európai ország felszíni vizéből vettek mintát a CBZ koncentrációjának meghatározása céljából. A kapott eredmények szerint: Ausztriában 75 (max. 294) ng/l, Finnországban 70 (max. 370) ng/l, Franciaországban 78 (max. 800) ng/l, Németországban 24 (max. 110) ng/l, Svájcban 30-150 ng/l átlagos koncentrációkat tapasztaltak a felszíni vizekben (Gerencsérné mtsai. 2015). Németországban egy kutatás folyamán azt tapasztalták, hogy a szennyvíz befolyásnál vett minták karbamazepin szintje eléri 3000 ng/L-t, amit a szennyvíztisztítás kis mértékben távolít el, így nem meglepő, hogy Berlinben a felszíni vízmintákban 1075 ng/L koncentrációkban van jelen a karbamazepin. Míg a növekvő

népességű Spanyolországban a szennyvízben mért CBZ mennyisége nem éri el az 500 ng/L koncentrációt (Heberer 2002a, Zhang mtsai. 2008). A karbamazepin Észak-Európában is gyakran alkalmazott gyógyszer, aminek hatását a Balti-tenger vizéből származó rengeteg mintában mért karbamazepin jelenléte is igazol. A tengerben tapasztalt átlag koncentráció 0,001 és 0,01 µg/L között detektálták, illetve a mért legnagyobb koncentráció 0,1 µg/L-t közelítette (UNESCO & HELCOM 2017).

3. 3. A gyógyszerhatóanyagok ökototoxicitása

A gyógyszerek hatása abban rejlik, hogy képesek befolyásolni az élő szervezetek meghatározott biológiai útjait, mechanizmusait. Ebből adódóan felelőtlenség lenne figyelmen kívül hagyni farmakológiai tulajdonságaikat a környezetbe kikerülve, hiszen lehetséges, hogy toxikus hatással vannak az ott élő organizmusokra vagy akár az emberre is. Annak ellenére, hogy a vízi környezetbe kikerülő gyógyszerhatóanyagok mennyisége jóval a letális dózis alatt van a legtöbb vízi élőlényre nézve (pl. vízibolha), a hosszútávú, kis mennyiségű terhelés okozhat krónikus, szubletális károsodást a vízben élő szervezetekben (Tkaczyk mtsai. 2021).

A gyógyszerek perzisztens hatóanyagoknak minősülnek, ugyanakkor a biológiai aktivitásuk, bomlástermékeik még nagyobb káros hatást eredményezhetnek, mint maga a kiindulási anyag (Damasceno de Oliveira mtsai. 2016, Oropesa mtsai. 2016). A gyógyszerhatóanyagok toxicitása a nem célzott vízi szervezetekre nagyon kis mértékben ismert a kutatók számára, főként az egyes orális fogamzásgátlók összetevőire korlátozódik. Ugyanakkor a vizsgálatokat az is nehezíti, hogy a szervezetekre gyakorolt hatás széles skálán mozoghat, így a tüneteket nem lehet mindig egyértelműen összekapcsolni a gyógyszerek jelenlétével. A toxikus hatás megjelenhet a fiziológiai funkciókban, a szaporodási rendellenességben, károsíthatja az endokrin rendszert vagy akár az embrionális fejlődés valamely szakaszát (Oropesa mtsai. 2016).

A tapasztalati eredmények azt mutatják, hogy a vízi élőlényekre káros hatással vannak többek között a NSAID-ok (ibuprofen, diklofenák), a szteroid hormonok (ösztrogén, androgén), antidepresszánsok, az epilepszia elleni szerek, az antibiotikumok (Xin mtsai. 2021, Brausch mtsai. 2012).

3. 3. 1. NSAID-ok ökototoxicitása

Mint már tárgyaltam korábban, a NSAID-ok a prosztaglandinok működésére vannak hatással, amik a szervezeteken belül számos fiziológiai funkcióban játszanak fontos szerepet, mint a szaporodás és a hormonok termelése (Kholood 2021). Ebből adódóan a letális hatásokon

túl szubletális hatással lehetnek a NSAID-ok még kis koncentrációban is a vízi szervezetekre. Kutatással bizonyították már, hogy a NSAID-ok szívelégtelenséget, glikogén kimerülést, csökkent pulzusszámot okoznak, illetve teratogén hatással járnak a hal embriókra (pl. zebradánió) (Gravel mtsai. 2009, David & Pancharatra 2009, Dietrich & Prietz 1999, Gravel & Vijayan 2007).

A NSAID-ok akut hatásai a tesztorganizmusok esetében leginkább magas koncentrációkban jelentkeznek, amelyek irreálisan magasak a környezeti koncentrációkhoz viszonyítva. Ugyanakkor a krónikus hatások mérhetőek olyan koncentrációk esetében is, amelyek megegyeznek az vízi környezetbe kijutó mennyiségekkel. Ezen túlmenően a környezetben a különféle gyógyszerek keverékben, együttesen vannak jelen, ami felerősítheti a kisebb koncentrációban lévő hatóanyagok toxicitását. Különféle NSAID-ok keverékének toxikus hatását vizsgálták *Daphnia magna* (nagy vízibolha), ahol azt tapasztalták, hogy a keverék toxicitása jelentős volt abban az esetben is mikor az egyes gyógyszerek koncentrációja külön-külön nem váltott ki toxikus hatást az állatokra (Parolini 2020). Hasonló teszteket végeztek el három NSAID keverékével (ibuprofen, diklofenák, paracetamol) a vándorkagyló (*Dreissena polymorpha*) tesztállatra. A kísérlet során bizonyították, hogy a keverék károsította a szervezetek DNS-ét a környezetbe kikerülő koncentrációk esetén, illetve megváltoztatta az oxidatív állapotukat, így oxidatív stresszt okoztak az egyedekben (Parolini & Binelli 2012).

3. 3. 1. 1. Ibuprofen ökototoxicitása

Az ibuprofen toxicitási vizsgálata során az alkalmazott koncentrációk mg/L mennyiségek, amelyek jóval magasabbak a valós környezetben mért koncentrációktól, ezért jelentősebbé válnak a krónikus és szubletális végpontokat elemző vizsgálatok, amelyek relevánsabb eredményt adnak a környezetben lezajló eseményekről (Zur mtsai. 2018). Egy *Daphnia magna* végzett mortalitást vizsgáló teszt szerint 3,97 mg/L feletti értékek esetében 50%-os pusztulás történt (Du mtsai. 2016). Hasonló eredményt ért el egy 14 napos krónikus teszt vízibolhán, ahol a reprodukció csökkenését az $EC_{50} = 13,4$ mg/L koncentrációnál tapasztalták (Hayashi mtsai. 2008).

Az ibuprofen vízi szervezeteknél már µg/L dózisban is befolyásolta az antioxidánsok és méregtelenítési enzimek aktivitását a környezetbe kikerülő koncentrációk esetében, ami oxidatív stresszre utal. Ugyanakkor enyhe citogenotoxicitást figyeltek meg 0,2 µg/L-nél a vándorkagylónál (*Dreissena polymorpha*), ami már közelebb áll a felszíni vizekbe kijutó koncentrációkhoz, ami már kézzel fogható bizonyíték arra, hogy a kis mennyiségben lévő gyógyszer is képes kárt tenni az élőlényekben (Parolini mtsai. 2011).

A 0,01–2317 ng/L közötti tengervízi koncentráció a parti sün (*Psammechinus miliaris*) megtermékenyítési képességeinek csökkenését okozta, míg a közönséges tengericsillag (*Asterias rubens*) fajt ilyen szempontból nem gátolta a gyógyszer jelenléte. *Allivibrio fischeri* baktériummal végzett Microtox teszttel vizsgálták az ibuprofen toxicitását, ahol a biolumineszcenciára képes baktériumra toxikusnak bizonyult az IBU 10-2000 ng/L koncentrációk között, ami már a környezetbe kikerülő mennyiségekkel megegyező koncentráció (Seigel mtsai. 2011, Zanuri mtsai. 2017). Egy másik kutatásban az afrikai harcsánál (*Clarias gariepinu*) az IBU szignifikánsan, a koncentráció- és az idő függvényében, növelte a vörösvértestek, a hemoglobin és a leukociták számát 0,28-0,48 mg/L koncentrációk között (Ogueji mtsai. 2018).

3. 3. 1. 2. Diklofenák ökototoxicitása

A diklofenák környezetbe kikerült koncentrációi általában nem okoznak akut toxicitást a vízben élő szervezeteknél, viszont a krónikus kitettség jelentős káros hatással jár. A toxicitás mérésének egyik leggyakrabban alkalmazott és szabványosított módszere az akut immobilizációs teszt, amellyel a DIC toxikus hatásait is vizsgálták különféle, főként vízi testállatokon (Lonappan mtsai. 2016a).

A diklofenák egy NSAID, amely súlyos májtoxicitást okoz az élő szervezetekben, amit *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombán is kimutattott Leeuwen és munkatársai (2011).

A diklofenák az első olyan gyógyszer, mely bizonyítottan felelős magasabb rendű, szárazföldi fajok nagymértékű kipusztulásáért. Három endemikus keselyű faj is veszélyeztetett helyzetbe került Dél-Ázsiában az állatgyógyászatban igen gyakran alkalmazott diklofenák miatt. A keselyűk vizsgálata során egyértelműen meghatározták, hogy a DIC veseelégtelenséget, illetve zsigeri köszvényt okozott az érzékeny madaraknál, akik diklofenákkal kezelt állatokat fogyasztottak (Swan mtsai. 2006).

A DIC toxicitását vízibolhával (*D. magna*) végzett mortalitás teszttel határozták meg, ahol a 21 napos 2,00 mg/L-es expozíció után következett be az 50%-os mortalitás, illetve 0,50 mg/L koncentrációnál a petetermelődés csökkenését tapasztalták (Du mtsai., 2016). Szintén 21 napos növekvő koncentrációjú (5-5000 µg/L) DIC kitettség után a vizsgálatok nem mutattak ki a vízibolhán negatív hatást a testhossz és növekedés ütemében, a peteszámban, valamint a vedlési számban. Ugyanebben a vizsgálatban a 96 órás 50 µg/L DIC-nak való kitettség a *D. magna* esetében jelentős változásokat okozott a méregtelenítéshez, növekedéshez, fejlődéshez és szaporodáshoz kapcsolódó gének expressziójában. Azt figyelték meg, hogy 24 óra elteltével

a diklofenák gátló hatással volt ezekre a génekre, majd 48 órás expozíció után pedig túlzottan expresszáldottak azok (Liu mtsai., 2017).

A vándorkagylón (*D. polymorpha*) végzett krónikus *in vitro* vizsgálatok szerint a növekvő DIC koncentráció (0,001, 0,01, 0,1, 1 és 10 mg/L) a hemociták, a kopolyú- és az emésztőmirigy-sejtek életképességét már a legalacsonyabb vizsgált koncentrációnál is jelentősen csökkentette (Parolini mtsai. 2009). A lizoszómális membránok destabilizálódását érintő citotoxikus hatást 250 µg/L DIC-nak való kitettség után figyelték meg, miközben a DNS károsodása megfigyelhető volt az összes koncentráció esetén (Parolini mtsai. 2011).

A nagy mocsáricsigán (*Lymnaea stagnalis*) végzett DIC szubletális toxicitását az immuntoxicitás tekintetében környezeti szempontból releváns mennyiségekkel vizsgálták (1-10 µg/L) Boisseaux és munkatársai (2017). Az eredményeik alapján a diklofenák befolyásolta a csigák hemocitáinak immunkapacitását és immunhatékonyosságát a gyógyszer jelenlétében.

Számos kutatás alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint a DIC halálos hatást fejt ki a vese-, gyomor- és bélrendszeri szövetek károsodásával számos gerincesben, például a halakban. A japán medakát a DIC kedvezőtlenül befolyásolta a növekedést az embriófázisban, és jelentősen csökkentette, valamint késleltette a kikelést (Lee mtsai. 2011). A szivárványos pisztráng esetében a diklofenák környezeti koncentrációknál is jelentős változásokat okozott a hal biokémiai folyamataiban, valamint szövetkárosodást is eredményezett (Mehinto mtsai. 2010). A zebradánióval végzett teszteknel a DIC 2000 µg/L koncentrációnál az embriók kikelését késleltette (Hallare mtsai. 2004).

3. 3. 2. Karbamazepin ökototoxicitása

A karbamazepin nagyjából 100 napos felezési idejével az egyik legtartósabb gyógyszer a környezetben, amelyet a hagyományos víztisztítási technológiák kevesebb mint 10%-ban képesek ártalmatlanítani, ezért gyakran nagyobb mennyiségben van jelen a felszíni vizekben (Yan mtsai. 2015, Songlin és Ning 2016).

A legtöbb CBZ toxicitási tesztet vízibolhán, vagy valamilyen halon végzik, mivel ezek a tesztállatok gyakran valósan kitettek a gyógyszer hatásainak. A vízibolha (*D. magna*) teszteknel az elsőszülések száma szignifikánsan csökkent a CBZ expozíció hatására, a termékenységek min. 30%-os csökkenését, valamint a testhossz csökkenését eredményezte egy 2019-es vizsgálat során (Tian mtsai. 2019). Alátámasztották, hogy a *Daphnia magna* anyák CBZ-kezelésnek való kitettsége elősegítette a fejlődési rendellenességek növekedését az embriókban és befolyásolta az ivarmeghatározódást (Oropesa mtsai. 2016).

Néhány kutatás szerint a CBZ negatívan befolyásolja a nátriumcsatornák feszültségét a mediterrán kagylóban (*Mytilus galloprovincialis*), illetve csökkenti az egészségi állapotát és oxidatív stresszt váltott ki (Martin-Diaz mtsai. 2009). Ugyanakkor a gyógyszerhatóanyag fokozza a hemociták pusztulását, növeli a szuperoxid-anion és a nitrogén-monoxid koncentrációját a mediterrán kagylóban (Tsiaka mtsai. 2013).

Egy 7 napos expozíció következtében a vízibolhára (*Ceriodaphnia dubia*) vonatkozó krónikus vizsgálatban a toxicitás 25 µg/L CBZ koncentrációnál jelentkezett, míg a fiatal zebradániók (*Danio rerio*) esetében a krónikus toxicitás 10 napos expozíció után 25 mg/L koncentrációnál következett be (Ferrari mtsai. 2003). Egy szintén zebradániókkal végzett kutatás eredményei azt mutatják, hogy 122 mg/L-től felfelé nincs kikelés, és a növekedés visszamarad 61,2 mg/L felett, illetve megfigyelhetővé vált a farok deformációja a CBZ hatására (Brandhof és Montforts 2010).

A környezetben előforduló CBZ koncentrációk (1-5 µg/L) vizsgálata során tapasztaltak alapján a karbamazepin megzavarta az embrionális fejlődését és a viselkedését a zebradánióknál (Qiang mtsai. 2016). A karbamazepin számos vízi egyednél okoz viselkedési, táplálkozási zavarokat, negatívan befolyásolja a szaporodást és a fejlődést (Brandaño mtsai. 2013, Quinn mtsai. 2008, Nentwig mtsai. 2004).

Az említett tudományos kísérletek mind azt mutatják, hogy az epilepszia elleni gyógyszer igen jelentősen képes befolyásolni a vízi élőlények fiziológiai működését, gyakran a közvetlenül nem kezelt generációkra is hatással van. Tehát a karbamazepin alacsony koncentrációban is jelentős toxicitást mutat a vízi élőlényekre nézve, ezért a megjelenése a környezetben fokozott figyelmet érdemel.

3. 4. A gyógyszerhatóanyagok eliminációja vízi ökoszisztémákból

3. 4. 1. Fizikai-kémiai eljárások

Jelen tudásunk szerint a különféle szennyvíztisztítókon (kommunális, ipari, korházi) keresztül kerül ki a környezetbe a legtöbb mennyiségű gyógyszer, illetve metabolitjai a felszíni vizeinkbe. Tehát a gyógyszerhatóanyagokkal való környezeti terhelést leginkább a szennyvíztisztítási technológiák segítségével csökkenthetjük (Santos mtsai. 2007). A szennyvíztisztítók működési fázisainak többsége három folyamatra osztható: elsődleges kezelés a szilárd és olajos szennyezőanyagok eltávolítására, másodlagos biológiai kezelés az oldott szervesanyagok eltávolítására, valamint a harmadlagos kezelések a tápanyag csökkentésére és fertőtlenítésre szolgál (Santos mtsai. 2007).

A hagyományos szennyvízkezelési eljárások, mint a flokkuláció, üleptetés, csapadékképzés és eleveniszapos kezelés korlátozott kapacitással képes alacsony mennyiségben eltávolítani a mikroszennyező anyagokat (Wang mtsai. 2016). Ezért számos más hatékonyabb eljárást próbáltak kifejleszteni a kis mennyiségben (ng/L, µg/L) jelenlévő szennyeződések eltávolítására, mint az adszorpció, ioncsere, fotokatalízis, oxidációs eljárások, ultrahang sugárzás, reverz ozmózis, membrántechnológiák (World Health Organization 2012). A fejlettebb eltávolítási technológiák annak ellenére, hogy hatékonyabbak a hagyományos módszerekhez képest, nem minden esetben képesek eliminálni a szennyvizekbe, felszíni vizekbe kikerült gyógyszerhatóanyagokat. A gyógyszerek kémiai, fizikai, valamint ellenálló tulajdonságaiknak köszönhetően nagyon különböző hatékonysággal távolíthatók el a szennyvíztisztítás során (Gerencsérné mtsai. 2015).

3. 4. 2. Biológiai eljárások

A fizikai-kémiai módszerek gyakran nem elérhetőek, drágák és másodlagos szennyezést okozhatnak egyes anyagok esetében. Ugyanakkor számos paraméter van, ami negatívan befolyásolja az eljárás hatékonyságát, mint az érintkezési idő, szennyezőanyag szerkezete, pH, adalékanyagok. Az említett kémiai és fizikai eljárások mellett lehetőségünk van biológiai úton eltávolítani a gyógyszereket, amelyek a leginkább környezetbarát technológiák, valamint többnyire költséghatékonyabb eljárások, mint a már említett kettő.

A biológiai eltávolítási módszerek folyamán valamilyen élőlény segítségével vonjuk ki a szennyezett közegből a gyógyszerhatóanyagokat, esetünkben a vízből. A leggyakrabban a gyógyszerek biodegradációjához, mineralizációjához valamilyen mikroorganizmust alkalmazunk, ez lehet gomba, alga vagy baktérium. A mikroorganizmus sejtjein belül történik a gyógyszerek biodegradációja, ahol energia- és tápanyagforrásként hasznosulnak az enzimek és a sejten belüli reakciók révén (Fekete 2019).

A legtöbb szennyvíztisztító telepen eleveniszapos eljárást alkalmaznak, de a hagyományos megoldások kevésbé hatékonyak, illetve nehézkes a nyomnyi mennyiségben jelenlévő szennyezések eltávolítása, ezért új megközelítésekre van szükségünk. Wang és mtsai. (2021) összehasonlították a hagyományos eleveniszapos, anaerob-anoxikus-oxikus eljárást és a membrán bioreaktort kommunális szennyvíztisztítók és gyógyszergyártók víz kezelésénél. A vizsgálat során 37 antibiotikum eliminációs hatékonyságának eredményeit hasonlították össze, ahol azt tapasztalták, hogy mindkét esetben a membrán bioreaktor a legalkalmasabb az antibiotikumok eltávolítására.

Számos kutatás már nem csak az eliminációs hatékonyságot és annak befolyásoló paramétereit vizsgálják, hanem kutatásokat végeznek, hogy milyen közösségek vannak jelen. Tiwari és mtsai. (2017) tanulmányaik során megvizsgálták, hogy milyen mikroorganizmusok vesznek részt a szennyvíz membrán bioreaktorral való tisztításban. Vizsgálataik során kimutatták, hogy a domináns gyógyszerbontó baktériumok a proteobaktériumok és az aktinobaktériumok osztályába tartoznak. Jelen voltak *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Raoultella ornithinolytica*, *Streptomyces* fajok, illetve számos gombafaj is.

A különböző hatóanyagok bontására más és más mikroorganizmus képes, így jelentősen hatékonyabb eltávolításra lehet képes egy tudatosan összeállított konzorcium, ahol adott hatóanyagokat megcélzó baktériumokat együttesen alkalmaznánk a szennyezett vizek tisztításához.

3. 4. 2. 1. Az ibuprofen eltávolítása baktériumokkal

A legkorábbi adatokat az ibuprofen baktériummal való eltávolításáról Chen és Rosazza kutatóknak 1994-ben kiadott publikációjának köszönhetjük. Az általuk publikált cikkben bizonyították, hogy a *Nocardia* sp. (NRRL 5646) baktériumtörzs képes az ibuprofen bontására szójalisztet és glükózt tartalmazó tápoldatban, illetve meghatározták, hogy a biotranszformáció során alkohol és acetátszármazékok keletkeztek (Chen Y. & Rosazza 1994). Annak érdekében, hogy hatékonyabban működjön azon baktériumok felkutatása, amelyek képesek az IBU bontásra Žur és mtsai. (2018) tanulmányozták az IBU biológiai bontásának mechanizmusát.

Ma már számos baktériumtörzsről és konzorciumról tudjuk, hogy képesek bontani az ibuprofent. Ezekhez a baktériumokhoz tartozik a *Sphingomonas* sp. Ibu-2 törzs, amely képes egyedüli szén- és energiaforrásként felhasználni az ibuprofent ásványisós tápközegben (Murdoch & Hay 2013).

A szennyvíztisztító telepről izolált *Patulibacter* sp. I11 baktérium törzs élesztőkivonattal és triptonnal kiegészített M9 és OD-2 tápoldatban mutatott hajlandóságot az IBU eltávolítására $\mu\text{g/L}$ koncentráció esetén. A tanulmányban leírtak szerint az I11 törzs OD-2 tápoldatban 90 óra alatt 92%-ban bontotta az 50 $\mu\text{g/L}$ kiindulási koncentrációjú ibuprofent (Almeida mtsai. 2013). Szintén települési szennyvíztisztító telepről izolálták a *Variovorax* sp. Ibu-1 baktérium törzset, amely képes egyedüli szén- és energiaforrásként felhasználni a gyógyszert. Az IBU-1 izolátum ásványisót tartalmazó táptalajban 150 óra után képes az IBU közel 100%-os eliminációjára (Murdoch & Hay 2015).

Egyes kutatások során baktérium konzorciumot alkalmazó biológiai úton tisztító rendszert vizsgáltak ibuprofen, diklofenák és triklózán gyógyszerhatóanyagok eltávolítására.

Az eredményeik azt mutatták, hogy az ibuprofen eliminálódott a leggyorsabban a három hatóanyag közül, 45 nap után 90%-os csökkenést tapasztaltak. A konzorcium 38 baktériumtörzsből állt, ahol többek között a *Novosphingobium* és a *Sphingomonas* fajok bontották az ibuprofent (Aguilar-Romero mtsai 2020).

Hasonló indíttatásból végeztek vizsgálatokat ibuprofen hatóanyag eliminációjához használható bioreaktorban Navrozidou és mtsai. (2019). Az általuk alkalmazott baktérium közösség igen nagy részét az *Alphaproteobacteria* és *Gammaproteobacteria* fajok képezték. A közösség együttes bontási hatékonysága elérte a 98,4%-os ibuprofen eltávolítást (Navrozidou mtsai 2019).

Egy eleveniszapos szennyvíztisztítást alkalmazó telepről négy izolátum volt képes bontani az ibuprofent: *Sphingobium* sp. IbD51, *Sphingopyxis* sp. TrD1, *Bacillus* sp. GeD10, *Rhodococcus* sp. EsD20. Ezek közül az IbD51 izolátum képes volt az ibuprofent 0,2 ng/L koncentrációig bontani, ami jelentős lehet a környezetbe kikerülő valós gyógyszer mennyiségek esetén (Zhou mtsai. 2013).

3. 4. 2. 2. A diklofenák eltávolítása baktériumokkal

A diklofenák egyike azoknak a gyógyszerhatóanyagoknak, amelyek nagyfokú ellenállást mutatnak a biológiai lebontással szemben. Ennek ellenére napjainkig számos kutatás készült a diklofenák biológiai úton való eltávolításáról. Ezekben a tanulmányokban meghatározták a baktériumtörzseket, a köztes termékeket, illetve ezek perzisztenciáját, toxicitását egyaránt, hogy teljesebb képet kapjanak a diklofenák biotranszformációjáról.

Az *Enterobacter hormaechei* D15 baktérium izolátum egyike azoknak a törzseknek, amelyekről már tudjuk, hogy képesek bontani a diklofenákot egyedüli szénforrásként, illetve valamilyen külső szénforrás jelenlétében. A D15 izolátum 52,8%-os diklofenák eliminációs sebességgel rendelkezik külső szénforrás nélkül, illetve glükóz jelenlétében ez 82%-ra nőtt a kísérlet folyamán (Aissaoui mtsai 2017b).

Hagyományos eleveniszapos technológiát alkalmazó szennyvíztisztító telepről izoláltak egy baktériumtörzset, amely a *Brevibacterium epidermidis* fajjal mutatta a legnagyobb hasonlóságot (99,5%). A baktérium képes egyedüli szénforrásként hasznosítani a gyógyszert, viszont acetát jelenlétében a hatékonysága 35%-ról 65%-ra növekedett. A kutatás arra is rávilágít, hogy a bontási hatékonyságra a legkedvezőbb hatást a periodikus acetátos táplálás jelenti, így az 90%-ra növekedett (Bessa mtsai., 2017). A *Labrys portucalensis* F11 baktériumtörzs szintén acetát jelenlétében képes a teljes diklofenák bontására 1,7 μ M DCF esetén 6 nap, 34 μ M DCF esetén 25 nap alatt. Az acetát jelenléte nélkül, képes egyedüli

szénforrásként is felhasználni a gyógyszert, 1,7–34 μM közötti kiindulási koncentráció esetén 70%-os produktivitással képes eliminálni az oldatból (Moreira mtsai. 2018).

Ivshina és mtsai. (2019) a *Rhodococcus* baktériumok diklofenák hatóanyagot bontó képességüket vizsgálták. Sikeresen izolálták a *Rhodococcus ruber* IEGM 346 törzset, amely képes volt magas és alacsonyabb kiindulási koncentráció esetén is bontani a gyógyszerkészítményt. A vizsgálatok alapján glükóz jelenlétében a 50 $\mu\text{g/L}$ kiindulási koncentrációnál 6 nap alatt lezajlott a teljes bontás (Ivshina mtsai. 2019).

Egy vizsgálatban négy baktériumot izoláltak, amelyek mind képesek bontani a hatóanyagot. Az *Enterobacter cloacae* KB1 és a *Klebsiella huaxiensis* KB7 törzseket egy szennyvíztisztító eleveniszapjából nyerték ki, míg a *Klebsiella aerogenes* KB18 és a *Serratia proteamaculans* KB19 izolátumok egy vegyi gyár által szennyezett talajmintából származnak. Ez a vizsgálat is alátámasztotta, hogy a baktériumok többsége kiegészítő tápanyag jelenlétében hatékonyabban bontja a gyógyszeranyagot. A négy törzs közül a legjelentősebb bontást az *Enterobacter cloacae* KB1 törzs produkálta, 50 $\mu\text{g/L}$ DCF-et metabolizált 96 óra alatt glükóz mellett (Žur mtsai. 2021).

Hasonló baktériumokat (*Enterobacter hormaechei*, *Citrobacter youngae*, *Arthrobacter nicotianae* és *Pseudomonas* sp.) alkalmaztak konzorciumként diklofenák, ibuprofen, illetve szulfametoxazol eltávolítására Aissaoui és mtsai. (2017a). Eredményeik alapján a konzorcium képes volt a DIC és IBU eltávolítására glükóz jelenlétében. Az IBU teljes mértékben eliminációját rögzítették, míg a DCF 56%-a metabolizálódott 48 órás inkubáció után (Aissaoui mtsai. 2017a).

3. 4. 2. 3. A karbamazepin eltávolítása baktériumokkal

Annak ellenére, hogy a karbamazepin erős ellenállást tanúsít a biológiai lebontással szemben számos kutatás célul tűzte ki olyan baktériumok izolálását, amelyek képesek eliminálni a gyógyszerhatóanyagot. Az egyik ilyen célból települési szennyvíztisztító telep iszapjából izolált baktériumtörzs a *Pseudomonas* sp. CBZ-4. A CBZ-4 képes nagyjából 50%-os hatékonysággal eltávolítani a hatóanyagot 10-160 mg/L közötti kiindulási koncentráció esetén alacsony hőmérsékleten (10°C-on). Viszont a kis kiindulási koncentrációjú karbamazepint nem tudja bontani (Li mtsai. 2013).

A *Streptomyces* MIUG 4,89 izolátum alacsonyabb hatékonysággal bontja a karbamazepint, ugyanakkor a bontást alacsony kezdő koncentráció esetén is képes végrehajtani (Popa Ungureanu mtsai 2015). Popa Ungureanu és mtsai. (2015) vizsgálataik során azt

tapasztalták, hogy a *Streptomyces* MIUG 4.89 törzs képes 30%-os hatékonysággal eliminálni a CBZ-t 0,2 mg/L kiindulási koncentrációnál vízalatti aerob rendszerben.

A *Rhodococcus rhodochru* baktériummal végzett karbamazepin bontási kísérletek szerint a baktérium képes alacsony hatékonysággal (15%) eliminálni a 9,5 ppm kiindulási koncentrációjú gyógyszert 28 nap alatt kometabolikus közegben (Gauthier mtsai. 2010).

A kínai szennyvíz eleveniszapból izolált *Acinetobacter* sp. HY-7 baktériumtörzs 48%-os hatékonysággal képes felhasználni a karbamazepint, mint egyedüli energiaforrás 10 napos inkubáció után (CUI mtsai. 1992).

Igen hatékony karbamazepint bontást értek el *Labrys portucalensis* F11 baktériumtörzzsel alacsony koncentrációk esetében is Bessa és mtsai. (2019). A baktériumtörzs egyedüli szénforrásként és acetátos kiegészítéssel is képes volt teljesen bontani 2 nap alatt a 2 μ M CBZ-t. Magasabb koncentrációknál az acetát jelenléte gyorsította a bontási folyamatot. A bontás teljesen végbement 21,35 μ M CBZ koncentrációig, 23, illetve 20 nap alatt acetát nélkül és acetát jelenlétében. A törzs 42,69 μ M koncentrációnál is 95%-nál jobb hatékonysággal eliminálta a CBZ-t egyedüli szénforrásként, acetát jelenlétében a bontás 99%-ra növekedett. A tanulmányban a bontás mechanizmuson kívül tanulmányozták a keletkező metabolitokat és azok toxicitását, illetve a főbb biotranszformációs útvonalakat is meghatározták (Bessa mtsai. 2019).

4. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

4. 1. Előzmények

A kutatásom során felhasznált baktériumokat egy előző kutatás keretein belül egy bakteriális biofilmből izolálták szelektív dúsítási technika segítségével gyógyszerhatóanyagokat (diklofenák, ibuprofen és karbamazepin) használva, mint egyedüli szén és energiaforrás. A bakteriális biofilm minták 2019-ben lettek begyűjtve Magyarország központi régiójából egy kőolajszénhidrogénnel szennyezett talajvízből. Jelen kutatás során vizsgált három gyógyszerhatóanyag az ibuprofen, a diklofenák és a karbamazepin szerkezetileg hasonlóságot mutatnak az aromás szénhidrogénnel, mivel szintén tartalmaznak aromás gyűrűket. Ebből adódóan, valamint annak köszönhetően, hogy a biofilmben jelenlévő mikroorganizmusok változatos metabolikus képességet mutattak feltételezhető volt, hogy a biofilm tartalmazhat, olyan baktériumokat is, amelyek képesek az általunk kiválasztott gyógyszerhatóanyagok bontására vizes fázisokból.

A vizsgálatba vont izolátumok fajsztípusú azonosítása a 16S rRNS fajspecifikus génszekvenciák báziselemzése alapján történt. A törzsek gyógyszerbontó képességének meghatározása reszasurinos előteszteléssel, illetve nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) valósult meg. A korábban kapott eredmények alapján a legjobb bontóképességgel rendelkező izolátumokat vontuk be a jelen kutatásba úgy, mint a legjobb diklofenák bontó *Stenotrophomonas humi* DIC_5, az ibuprofen bontó *Rhizobium daejeonense* IBU_18, és a karbamazepin bontó *Nocardioideus carbamazepini* CBZ_1 és *Brevundimonas mongoliensis* CBZ_3.

4. 2. A kiválasztott baktériumtörzsek jellemzése

A korábban megvizsgált izolátumok közül a *Stenotrophomonas humi* DIC-5-ös törzs glükóz (3 g/L) jelenlétében ásványi tápoldatban 100%-os diklofenák lebontásra volt képes 1,5 mg/L kiinduló diklofenák koncentráció mellett. Általánosságban elmondható, hogy a *Stenotrophomonas* nemzetség tagjai fontos ökológiai szerepet játszanak a nitrogén- és a kén ciklusban, gyakran állnak szoros kapcsolatban a növényekkel, segítve a növekedésüket, valamint védelmet biztosít a növények számára egyes kórokozókkal szemben (Heylen és mtsai. 2007). Ezenkívül a nemzetségnek fontos szerepe van a különböző természetes és mesterséges eredetű szennyezőanyagok eltávolításában is, mint a policiklusos aromás szénhidrogének, vagy fenolos vegyületek (Ryan és mtsai. 2009).

A *Rhizobium daejeonense* IBU-18-as törzs 47%-os ibuprofen bontást mutatott két hét inkubáció után 1.5 mg/L kiinduló ibuprofen koncentráció mellett, élesztőkivonatot (0,05 g/L) is tartalmazó ásványi tesztoldatokban. Általánosságban elmondható, hogy a nemzetség képviselői szoros kapcsolatban állnak a hüvelyes növények gyökereivel, illetve hajlandóságot mutatnak a cianidok bontására (Quan és mtsai. 2005).

Az előzetes vizsgálatok alapján a karbamazepin bontására két törzs is hajlandóságot mutatott: a *Nocardioideus carbamazepini* CBZ_1 és a *Brevundimonas mongoliensis* CBZ_3-as baktériumtörzsek. A *N. carbamazepini* CBZ_1-es izolátum a vizsgálatok alatt 14%-os karbamazepin bontásra volt képes 0,05 g/L élesztőkivonatot tartalmazó tesztoldatban; a karbamazepin kiinduló koncentrációja szintén 1,5 mg/L volt. A *B. mongoliensis* CBZ_3 baktérium 33%-os karbamazepin (kiinduló koncentráció 1,5 mg/L) bontásra volt képes glükózt (0,5 g/L) is tartalmazó ásványi tesztoldatban egy hónap alatt.

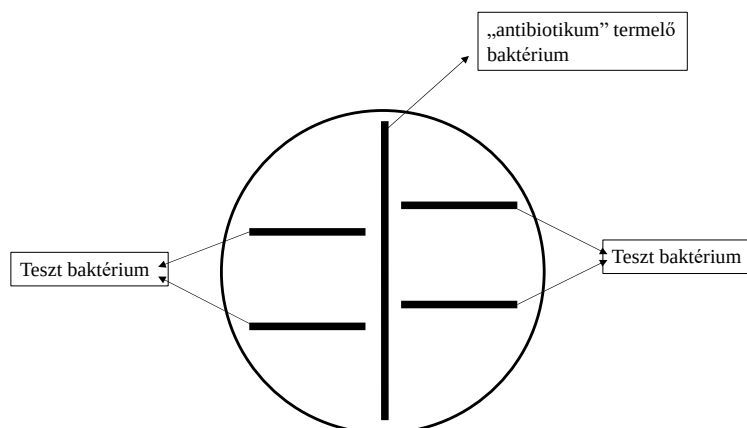
4. 3. Együtt-tenyésztési vizsgálatok

Az együtt-tenyésztési vizsgálatok elvégzésének a célja az általunk kiválasztott baktériumokból egy konzorcium létrehozása, amelyben az egyes tagok metabolikus képességei összeadódnak, kiegészítik egymást, miközben a konzorcium tagjai nem akadályozzák egymás szaporodását. A vizsgálatok során optimális növekedési körülményeket biztosítva tanulmányoztuk a négy izolátum egymáshoz való viszonyulását, a szaporodás esetleges gátlását. Az együtt-tenyésztési vizsgálatokat két tenyésztéstől függő módszer alkalmazásával végeztük el, a keresztcsíkozásos, illetve az agardiffúziós lyuk-teszt segítségével.

4. 3. 1. Keresztcsíkozásos módszer

A módszer segítségével tanulmányozható a mikrobák antagonizmusa, vagyis, hogy termelnek vagy sem specifikus gátló anyagokat az együtt szaporodás során. Ezek a gátló anyagok egy másik fajhoz vagy törzshöz tartozó mikrobákat megölhetik vagy reverzibilisen gátolhatják szaporodásukban. A módszer folyamán aktív, szaporodásban lévő baktériumtenyészetet oltottunk a szilárd agar felületére (R2A). Ezt követően a többi vizsgálandó baktériumból erre a tenyészcsíkra merőleges csíkokat oltottunk, amilyen közel csak lehetett anélkül, hogy a különböző baktériumokból húzott csíkok összeérjenek (6. ábra). A vizsgálandó baktériumok leoltását követően a Petri csészéket egy hétig inkubáltuk. Az inkubáció után a lemezeket a leoltott izolátumok tenyészcsíkjai között kialakult gátlási zóna hiánya vagy megléte alapján értékeltük ki. Amennyiben a tesztelendő izolátum antibiotikumot

termel, az bediffundál az agarba, így meggátolja a mellé oltott baktérium szaporodását. A vizsgálatot mind a négy izolátumra külön-külön elvégeztük.



6. Ábra. A mikroorganizmusok leoltása keresztcsíkozásos tesztben (saját ábra)

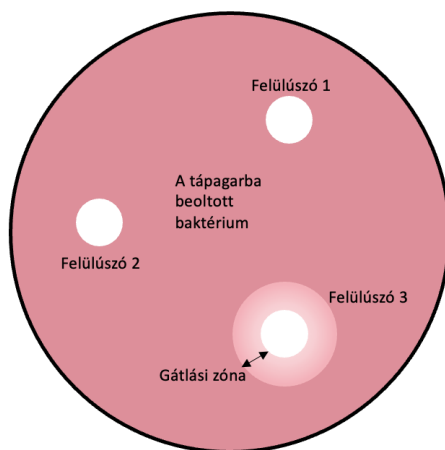
4. 3. 2. Agardiffúziós lyuk-teszt

Az agardiffúziós lyuk-teszt lényege szintén annak megállapítása, hogy valamely vizsgálandó izolátum szaporodása során termel-e olyan anyagokat, anyagcsere termékeket, amelyek egy másik izolátum növekedésére gátló hatással vannak.

A vizsgálat során első lépésként a teszthez szükséges 24 órás aktív baktériumtenyészeteket folyékony „Rich” tápoldatba (10 g proteóz pepton, 2 g húskivonat, 5 g kazaminósav, 5 g élesztőkivonat, 2 g glicerin, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g Tween 80, 10 g glükóz, 1000 ml desztillált víz, pH 7.2, sterilizálás 121°C 20 min) oltottuk (1 kacsnyi baktérium) és 28°C -on, 130 rpm rázatás mellett egy héten keresztül szaporítottuk.

Az együtt-tenyésztési vizsgálat napján, a vizsgált baktériumokból fiziológiás sóoldatban $\text{OD}_{600\text{nm}}=1$ optikai denzitású szuszpenziókat készítettünk 24 órás tenyészetekből. Az egy hetes „Rich” tápoldatban felszaporított baktériumszuszpénziókból 50 ml-t lecentrifugáltunk és a kapott felülúszót használtuk az együtt-tenyésztési vizsgálatokhoz. A 35°C -ra visszahűtött, sterilre szűrt ($0,2\ \mu\text{m}$), 2,3,5-trifenil-tetrazolium klorid oldatot tartalmazó (1%-os TTC oldatból 500 μL -t adunk 50 ml Nutrient agarhoz) Nutrient tápagart 200 μL $\text{OD}_{600\text{nm}}=1$ baktériumszuszpénzióval oltottuk be és steril fülke alatt Petri-csészékbe öntöttük ki (20 ml). A baktériumot tartalmazó tápagar megszilárdulása után steril pipettahegy segítségével 7 mm-es lyukakat fúrtunk az agarba. Annak érdekében, hogy baktériummentes felülúszót kapjunk az inkubált „Rich” tenyészetekből 50 ml-t lecentrifugáltunk 2360 g 20 percig és a felülúszót $0,2\ \mu\text{m}$ membránszűrőn is átszűrtük. A baktérium mentes felülúszóból a már létrehozott lyukakba pipettáztunk (7. ábra). A felülúszó tartalmazhat adott baktérium által termelt antimikrobiális anyagokat, így a lyuk szélétől koncentrikus körökben belediffundált gátló anyag feltisztulási

zónát alakít ki, ami „fehér” marad. Viszont a TTC jelenlétének köszönhetően az agar azon részei, ahol az agarba beoltott baktériumok képesek növekedni, rózsaszínűvé válnak. A kialakult feltisztulási zónák méreteinek elemzésével következtetni tudunk a gátlás meglétéről, mértékéről. Amennyiben az együtt-tenyésztési vizsgálatok eredményei azt tükrözik, hogy a baktériumok nem hátráltatják egymás szaporodását és nincs gátlási zóna, feltételezhetően alkalmasak lesznek egy baktérium konzorcium kialakítására.



7. **Ábra.** Agardiffúziós lyuk-teszt sematikus ábrája (saját ábra)

4. 4. Terminális Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálat

Annak érdekében, hogy a vizsgálatok során a kialakított konzorciumot alkotó baktériumtörzsek közösségen belüli relatív abundanciáját és abundancia változását nyomon tudjuk követni Terminális Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálatot végeztünk. A T-RFLP olyan molekuláris biológiai módszer, amely segítségével képesek vagyunk több baktériumból álló közösségek diverzitásának, struktúrájának, szerkezetbeli változásának nyomon követésére. A módszer alkalmazása során a baktériumok *16S rRNS* génjének nukleotid szekvenciája egyfajta „ujjlenyomatként” funkcionál. A *16S rRNS* gének filogenetikai markerként való felhasználása lehetőséget teremt arra, hogy viszonylag gyorsan és a hagyományos tenyésztési mikrobiológiai módszerekkel ellentétben, függetlenül a tenyésztés módjától, meghatározzuk a bakteriális közösség tagjainak egymáshoz viszonyított relatív gyakoriságát (Révész 2016).

Az elemzéshez első lépésként szükség van a genomi vagy a közösségi DNS izolálására. Ezt követően, az izolált DNS-ek *16S rRNS* génszakaszait fluoreszcensen jelölt forward primer segítségével szaporítjuk fel PCR útján. A fluoreszcenssel jelölt PCR amplikonokat restrikciós emésztésnek vetjük alá. Az így kapott restrikciósan emésztett, egyik végükön fluoreszcenssel jelölt, különböző hosszúságú DNS szakaszokat kapilláris gélelektroforézis útján választjuk

szét. Az elválasztott DNS fragmenteket egy fluoreszcens detektor detektálja és a fragmentek hosszának meghatározása szoftveresen történik egy belső molekulasúlymarker felhasználásával. A T-RFLP vizsgálat során egy elektroferogramot kapunk. A T-RFLP elektroferogramok (T-RF-ek) elemzésével meghatározható a közösségalkotó taxonómiai egységek abundanciája (csúcs alatti terület), a csúcsok számából következtethetünk a közösség diverzitására. A kutatásomhoz először a tiszta baktériumtenyészetekre (DIC_5, IBU_18, CBZ_1 és CBZ_3-as izolátumok) jellemző T-RFLP profilokat határoztuk meg, majd a későbbiekben a különböző időpontokban vett minták T-RFLP mintázatát is megállapítottuk. A folyamat lépéseit a következő fejezetekben részletesebben bemutatom.

4. 4. 1. DNS izolálás

A genomi és közösségi DNS izolálást a DNeasy® UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével végeztük, a gyártó által megadott utasítások alapján. Az izolálási módszer gyors és megbízható eljárás, mivel a DNS a sókoncentrációknak köszönhetően képes megkötődni a szilika membránon, míg a feltárt sejt többi alkotóeleme nem. A munka során a sejtek feltárása lízis pufferek, hő, valamint mechanikai roncsolás alkalmazásával történt. A sejt feltárását követően centrifugálással átfolyatjuk a szűrőn a sejtalkotókat tartalmazó oldatot miközben a DNS a membránon megkötődve izolálódik. Ezt követően szükséges a DNS mosása, illetve elúciója a megfelelő szeparálás érdekében. A DNS izolálás sikerességét, megfelelő minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

4. 4. 2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction) molekuláris biológiai eljárás segítségével lehetőségünk van arra, hogy egy mintában a kis mennyiségben jelenlévő DNS általunk kiválasztott szekvenciáját *in vitro* módon amplifikáljuk. Az eljárás lényege, hogy a DNS adott szakaszát DNS-szintézisen alapuló ciklikusan ismétlődő folyamattal fel lehet szaporítani. A három szakasz 32 cikluson keresztüli ismétlésének következtében a DNS termék exponenciális ütemben amplifikálódik (10^6 - 10^9 kópia). A módszer rendkívül érzékeny ebből adódóan rengeteg alkalmazási lehetőség rejlik benne (Nyitray és Pál 2013).

Az általam elvégzett PCR vizsgálatok alkalmával, amely során amplifikáltuk a genomi vagy közösségi DNS minták 16S *rRNS* génszakaszait, 1 mintához 25 µL térfogatú kiindulási elegyet készítettünk, amelyhez szükség volt 0,25 µL Dream Taq pufferre, 5 µL dNTP-re (0,2 mM), 0,25 µL (0,1 µM) fluoreszcensen jelölt Forward primerre (27f VIC), 0,25 µL (0,1 µM) Reverse primerre (1492r), 0,125 µL (1 U) Dream Taq polimerázra, 13,875 µL desztillált vízre

(dH₂O), 2 µL BSA-ra és 1 µL DNS templátra. A vizsgálat teljessége érdekében negatív kontrollt is készítettünk, amelybe minden más került a DNS-en kívül. A PCR reakció a ProFlex PCR System (Applied Biosystems Life Technologies) készülékben zajlott. A PCR-termékeket itt is agaróz gélelektroforézis alkalmazásával ellenőriztük le.

4. 4. 3. Agaróz gélelektroforézis

Az elektroforézis vizsgálatokhoz az 1%-os agaróz gél készítettünk TBE pufferben (10,8 g Tris; 10,5 g bórsav; 0,93 g EDTA-Na; 1000 cm³ desztillált víz), amihez 1%-os etídium-bromidot adtam a DNS vizualizálhatósága érdekében. A homogenizált elegyet gélkádba öntöttük megszilárdulásig. A futtatókádba helyezést követően a gélbe kialakított első zsebbe 2 µL DNS létrát pipettáztunk (viszonyítási alapként szolgál a DNS méretének a megállapításához), illetve a többi zsebbe a megvizsgálni kívánt PCR termékeket pipettáztunk. A futtatókádban 120 V-on 20 percig végeztük a gélelektroforézist, majd ezt követően UV fényben detektáltuk a mintákat.

4. 4. 4. Restrikciós emésztés

A T-RFLP során alkalmazott restrikciós endonukleázok képesek adott ponton hasítani a *16S rRNS* génszakaszok mindkét szálát, mivel felismernek bizonyos nukleotid szekvenciákat. Így különböző hosszúságú jelölt (terminális restrikciós fragment) és jelöletlen DNS szakaszok (fragmentumok) keletkeznek (Nyitray és Pál 2013). A kutatás során először a baktériumtörzsek genomi, majd a mintákból származó közösségi DNS minták *16S rRNS* ampikonjait vetettük alá restrikciós emésztésnek. Az általunk alkalmazott restrikciós enzim az *AluI* (AG↑CT; Thermo Scientific™). Az ampikonok restrikciós emésztése 37°C-on 60 percen keresztül történt. Az elegybe 10 µL DNS templát, 2 µL Tango Buffer, 0,3 µL *AluI* enzim és 7,7 µL MQ víz került.

4. 4. 5. Etanolos precipitáció

A további vizsgálatok elvégzéséhez a minták etanolos precipitálására volt szükség a megfelelő tisztaságú minta eléréséhez. A folyamat során az etanol mellett nátrium-acetátot is hozzáadtunk az elegyhez, hogy az emésztésből visszamaradt puffert, illetve a PCR során fel nem használt dNTP maradványok ne zavarják a vizsgálatokat (Nyitray és Pál 2013). A kiválasztási folyamatban 1 mintára nézve 62,5 µL 96%-os etanolt, 3 µL 3M-os nátrium-acetátot, illetve 14,5 µL desztillált vizet használtunk. Ezt követte a homogenizálás, majd szobahőmérsékleten való inkubálás 10 percig. A mintákat 4°C-on 25 percig 2360 g

centrifugáltam, majd a felülúszót eltávolítottuk. A visszamaradt pelletre 180 µL 70%-os etanolt pipettáztunk, majd ismételten centrifugáltuk (4°C-on 20 min 2360 g) és a felülúszót ezt követően ugyanúgy eltávolítottuk. A visszamaradt templátot 1 percig 500 g-n szárítottuk, majd miután hagytuk elpárologni a maradék alkoholt 25 µL desztillált vizet adtunk mindegyik mintához és a DNS mintát reszuszpendáltuk.

4. 4. 6. T-RFLP vizsgálat

A T-RFLP analízishez a fluoreszcensen (VIC) jelölt, *AluI* restrikciós enzimmel emésztett és tisztított amplikonokat használtuk fel. A reakció végbemeneteléséhez minden tisztított mintából 1 µL DNS templátot használtunk fel, amelyhez 18 µL Hi-Di formamidot és 0,4 µl meghatározott hosszúságú belső LIZ 1200 standardet adtunk hozzá. A terminálisan jelölt fragmenteket ABI 3130 Genetic Analyzer segítségével választottuk szét és detektáltuk. Az eredményként kapott elektroferogramokat szoftveres elemzés alá vetettük és a GeneMapper szoftver segítségével értékeltük ki.

4. 5. A konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képességének vizsgálata ásványi tápoldatban

A vizsgálat folyamán 100 ml Bushnell-Haas ásványi tápoldatot (0,2 g MgSO₄, 0,02 g CaCl₂, 1 g KH₂PO₄, 1 g K₂HPO₄, 1 g NH₄NO₃, 0,05 g FeCl₃·6H₂O, 1 L desztillált víz) 1,5-1,5 mg/L gyógyszerhatóanyag keverékkel (1:1:1, diklofenák, ibuprofen, karbamazepin) egészítettünk ki, valamint élesztőkivonatot (0,3 g/L) és glükózt (3 g/L) adtunk a tesztoldatokhoz, mint ko-metabolikus szubsztrátok. A tesztoldatokat 100 µL (OD_{600nm} =1) mind a négy baktériumtörzset tartalmazó baktériumszuszpenzióval oltottuk be. Az így kapott elegyet 27°C-on folyamatos rázatás mellett inkubáltuk, megfelelő körülményeket teremtve a baktériumok szaporodásához. A vizsgálatokat 3 párhuzamosban végeztük abiotikus kontroll minták kíséretében. A tesztoldatokból steril körülmények között, elszívófülke alatt vettük mintát heti rendszerességgel (4 hét). Az alkalmazott három gyógyszerhatóanyag (diklofenák, ibuprofen, és karbamazepin) koncentrációcsökkenését HPLC (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, Chromaster Hitachi) segítségével határoztuk meg különböző időpontokban.

A vizsgálat végén a tesztoldatokból közösségi DNS-t izoláltunk és elvégeztük a minták *16S rRNS* gén alapú T-RFLP vizsgálatát.

4. 6. A konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képességének vizsgálata természetes vízmintában

A BHB ásványi tápoldatban vizsgált gyógyszerbontás laboratóriumi körülmények között zajlott, tehát az itt kapott eredmények nem feltétlenül tükrözik egy esetleges gyakorlati alkalmazás során fellépő körülményeket, paramétereket. A BHB ásványi tápoldat az általunk beoltott baktériumokon kívül nem tartalmazott más mikroorganizmust, míg egy természetes vízminta tartalmazza az autochton baktériumközösséget, amely akár negatív hatást is kifejtethet a konzorcium aktivitására vonatkozóan. Az előzőekből kiindulva vizsgáltuk meg az általunk létrehozott konzorcium gyógyszerhatóanyag bontó képességét természetes vízmintában is. A vízmintákat a gödöllői Rákos-patakból vettük. A kísérlet során 100 mL vízmintát 250 µL $OD_{600nm}=1$ konzorciumot tartalmazó baktériumszuszpenzióval oltottunk be és szobahőmérsékleten inkubáltuk 145 rpm mellett. A korábban tapasztaltak szerint a konzorciumnak szüksége van ko-metabolikus szubsztrátokra is a hatékony bontáshoz ezért egyes vízmintákba glükózt (3 mg/L), élesztőkivonatot (0,3 mg/L) és ammónium-nitrátot (1 mg/L) adtunk, hogy elősegítsük a konzorcium tagjainak fejlődését, ezáltal pedig a lebontást. Minden esetben a konzorcium mellett jelen volt a patakvíz minták autochton baktériumközössége is. A természetes vízmintát tartalmazó tesztoldatok mindhárom gyógyszerhatóanyagot (ibuprofen, diklofenák, karbamazepin) 1,5-1,5 mg/L koncentrációban tartalmazták. A vizsgálatokat három párhuzamosban végeztük, a gyógyszerhatóanyagok koncentrációját HPLC-vel követtük nyomon abiotikus (sterilre szűrt) patakvízminták felhasználásával. A kutatás ezen szakaszában különböző beállításokban, 3-3 párhuzamosban vizsgáltuk meg a konzorcium bontóképességét, amelyet a 3.táblázat foglal össze. A vizsgálat végén T-RFLP-vel határoztuk meg a baktériumközösség szerkezetét, illetve mutattuk ki a konzorcium tagjainak jelenlétét a mintákból.

3. Táblázat. Vizsgálati kombinációk

Rákos-patak víz + gyógyszerhatóanyagok
Rákos-patak víz + gyógyszerhatóanyagok + konzorcium
Rákos-patak víz + gyógyszerhatóanyagok + glükóz és élesztőkivonat
Rákos-patak víz + gyógyszerhatóanyagok + glükóz és élesztőkivonat + konzorcium
Rákos-patak víz + gyógyszerhatóanyagok + NH_4NO_3
Rákos-patak víz + gyógyszerhatóanyagok + NH_4NO_3 + konzorcium
Rákos-patak víz + gyógyszerhatóanyagok + glükóz és élesztőkivonat + NH_4NO_3
Rákos-patak víz + gyógyszerhatóanyagok + glükóz és élesztőkivonat + NH_4NO_3 + konzorcium

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5. 1. Együtt-tenyésztési vizsgálatok

5. 1. 1. Keresztcsíkozás módszer

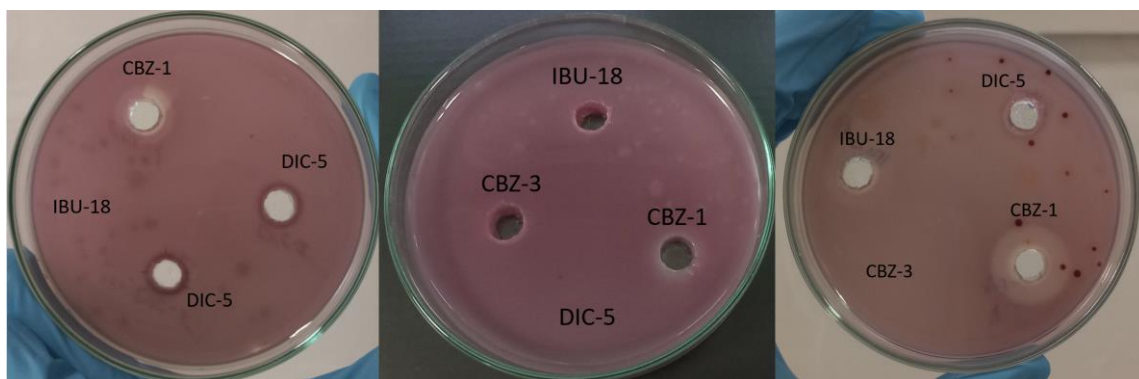
A vizsgálat során egyik összeállítás esetében sem tapasztaltunk gátlóhatást a vizsgált baktériumok tesztcsíkjai között. Amint a 8. ábrán is jól látható, a vizsgálat szerint a négy izolátum alkalmazható konzorcium formájában, hiszen egyik sem befolyásolja negatívan a másik szaporodását saját szaporodása révén, a tesztcsíkok között nincs feltisztulási zóna.



8. Ábra. A tesztelt izolátumok együtt-tenyésztési vizsgálata keresztcsíkozással (saját kép)

5. 1. 2. Agardiffúziós lyuk-teszt

A módszer alkalmazása során azt tapasztaltuk, hogy a CBZ-1-es izolátum vizsgálatára nem volt alkalmas ez a módszer, mivel a CBZ-1 baktérium agarba oltva nem volt képes az inkubációs idő alatt növekedni. Ebből fakadóan a CBZ-1 izolátummal nem végeztük el a tesztet. A módszer alkalmazható volt viszont a másik három izolátum esetében. A kapott eredményekből megfigyelhető, hogy a „Rich” tápoldatban tenyésztett CBZ-1-es izolátumból származó felülúszó gátlási zóna kialakulását eredményezte a tápagarba fúrt lyukak körül (9. ábra). Az izolátum felülúszója enyhe gátlást fejtett ki az IBU-18 és a DIC-5 izolátumokra nézve, viszont erősebb növekedésgátlást gyakorolt a CBZ-3-as baktériumtörzsre.

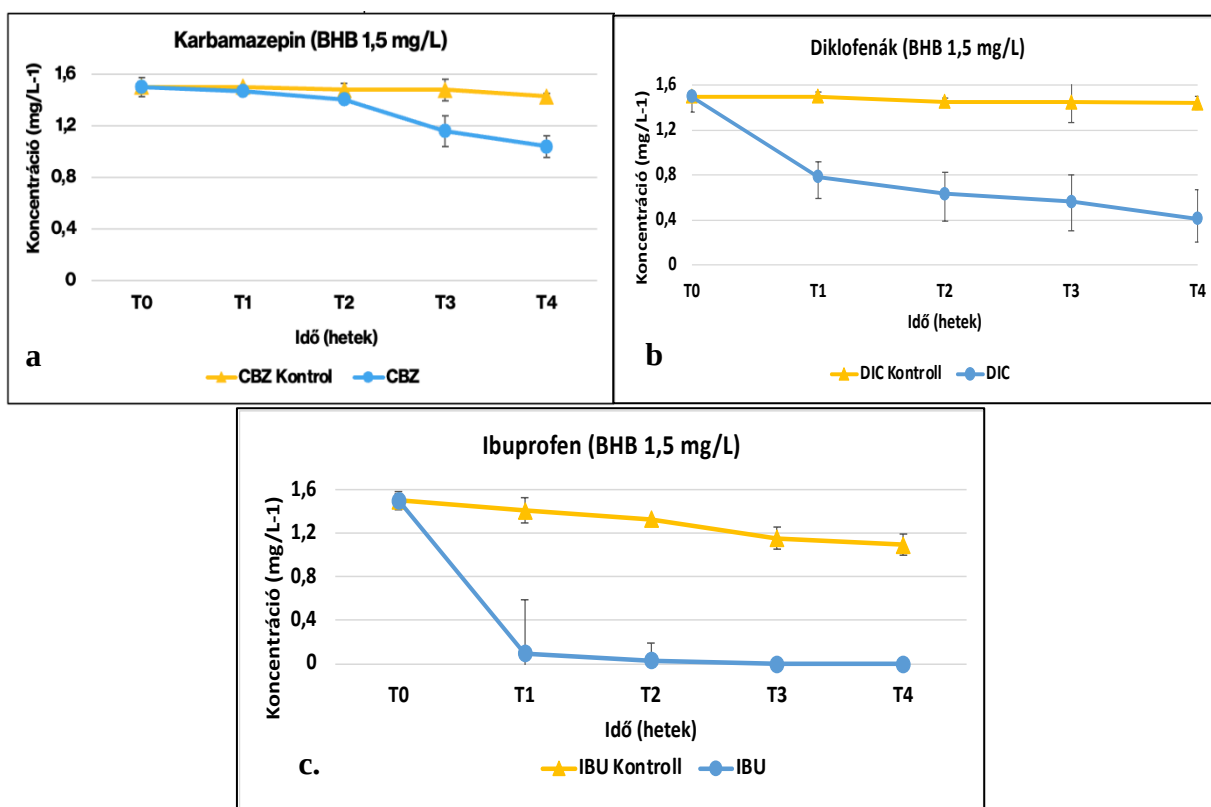


9. Ábra. Együtt-tenyésztési vizsgálatok agardiffúziós lyuk-teszttel (saját kép)

Összességében a két együtt-tenyésztési vizsgálatból az látható, hogy az általunk kiválasztott négy baktériumtörzs alkalmazható konzorcium kialakításához. Megemlítendő, hogy a CBZ-1-es izolátum enyhe gátlást fejt ki a többi baktériumtörzs növekedésére az agardiffúziós lyukteszt alapján, viszont megítélésünk szerint ez az enyhe gátlás nem zárja ki a törzsek együttes használatát.

5. 2. A konzorcium gyógyszerhatóanyag bontó képessége ásványi tápoldatban

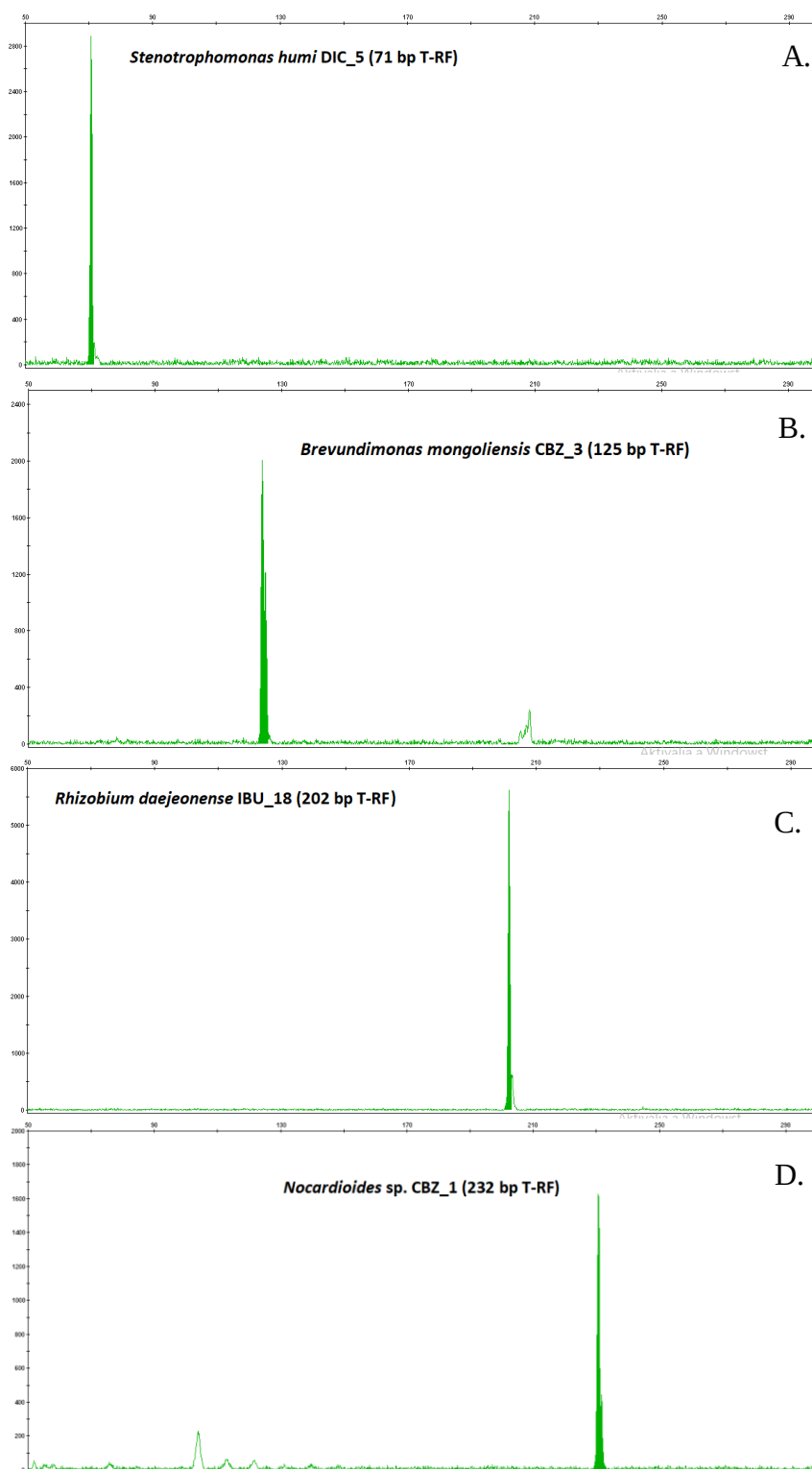
A kialakított konzorcium gyógyszerhatóanyag bontó képességét ásványi tápoldatban a 10. ábra szemlélteti. A négy hetes vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a konzorciumban jelen lévő baktériumok lebontották a karbamazepin 30,6%-át, a diklofenák 72,6%-át; már egy hét alatt a konzorcium 100%-ban lebontotta az ibuprofent. A kutatás folyamán a gyógyszerhatóanyagok lebontási sebessége változó volt. Míg az ibuprofen már egy hét alatt szinte teljesen és a diklofenák közel fele lebomlott, addig a karbamazepinnél a harmadik és a negyedik héten volt tapasztalható nagyobb intenzitású koncentráció csökkenés (10 a, b, c ábra). Az abiotikus kontroll minták esetén csekély koncentráció csökkenést tapasztaltunk.



10. Ábra. A konzorcium a.) karbamazepin bontása, b.) diklofenák bontása, c.) ibuprofen bontása ásványi tápoldatban

5. 2. 1. A konzorcium T-RFLP vizsgálata BHB ásványi tápoldatban

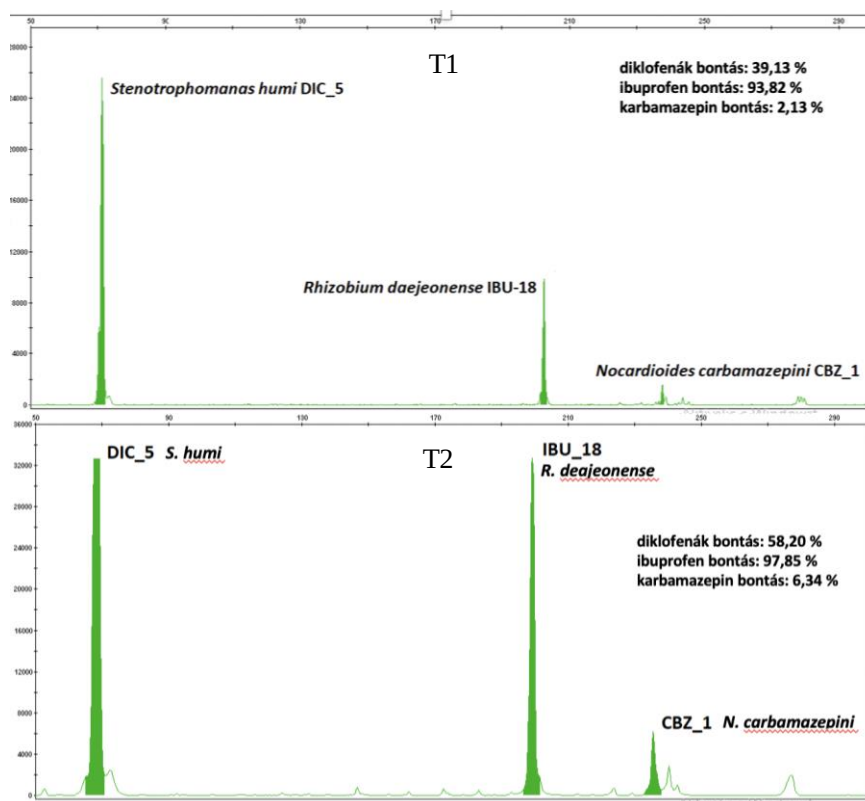
A T-RFLP profilok alapján meghatároztuk, hogy az egyes izolátumokra, milyen hosszúságú (bp) T-RF-ek jellemzőek (11. ábrán).

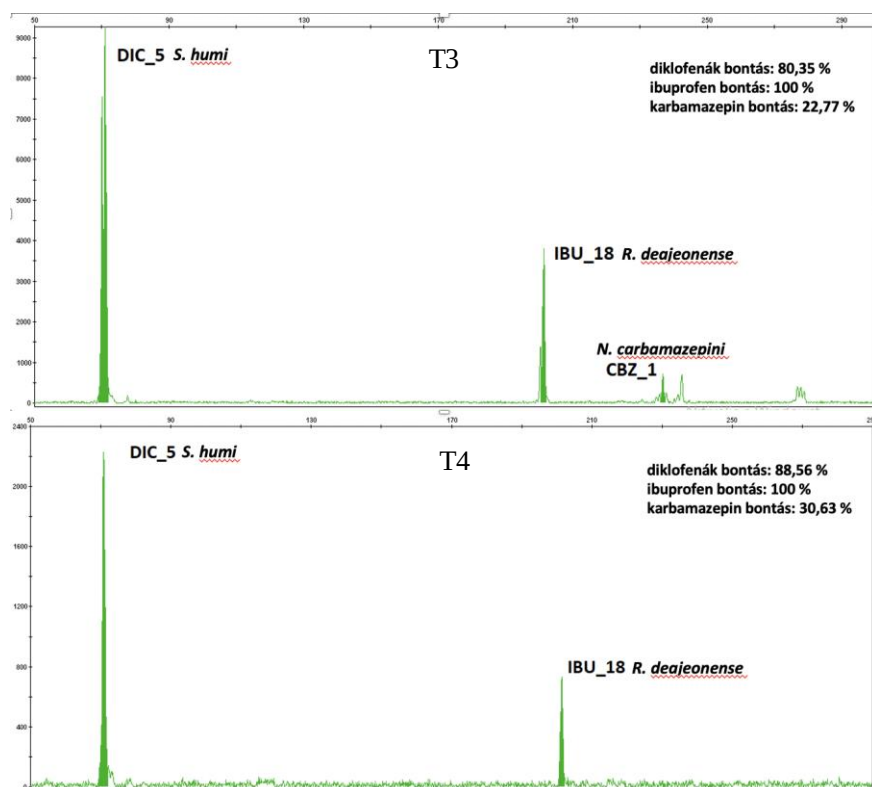


11. Ábra. A baktériumok genomi 16S rRNS génjei alapján kapott T-RFLP elektroferogramok: A. DIC-5 izolátum, B. IBU-18 izolátum, C. CBZ-3 izolátum, D. CBZ-1 izolátum

A *Stenotrophomonas humi* DIC-5-ös izolátumra a ~71 bp, a *Rhizobium daejeonense* IBU-18-as baktériumtörzsrre 202 ~bp, a *Brevundimonas mongoliensis* CBZ-3-as baktériumtörzsrre a 125 bp, míg a *Nocardioideus carbamazepini* CBZ-1-es izolátumra a 232 bp hosszúságú T-RF a jellemző. A kapott baktériumtörzsekre jellemző T-RF-ek ismeretében lehetőségünk nyílt beazonosítani a bontási kísérletből származó T-RFLP elektroferogramokon a baktériumkonzorcium tagjait.

A heti rendszerességgel vizsgált minták T-RFLP eredményeit a 12. ábra mutatja be. A T-RFLP vizsgálat értelmében a bontási vizsgálatok ideje alatt a konzorcium tagjai közül a DIC_5-ös és az IBU_18-as izolátumok végig kimutathatóak voltak. Ez alól kivételt képeznek a CBZ-1-es és a CBZ-3-as izolátumok. Várakozásunkkal ellentétben, amíg a CBZ-1-es izolátumot a negyedik héten már nem sikerült kimutatni, a CBZ-3-as izolátum a kezdetektől fogva nem volt kimutatható. Megállapítható, hogy a T-RFLP eredményei összhangban vannak a kémiai analitikai eredményekkel. A diklofenák és az ibuprofenbontók mutatták a legnagyobb relatív abundanciát, míg a karbamazepin bontó baktériumtörzsek relatív abundanciája nagyon alacsony volt mindvégig.



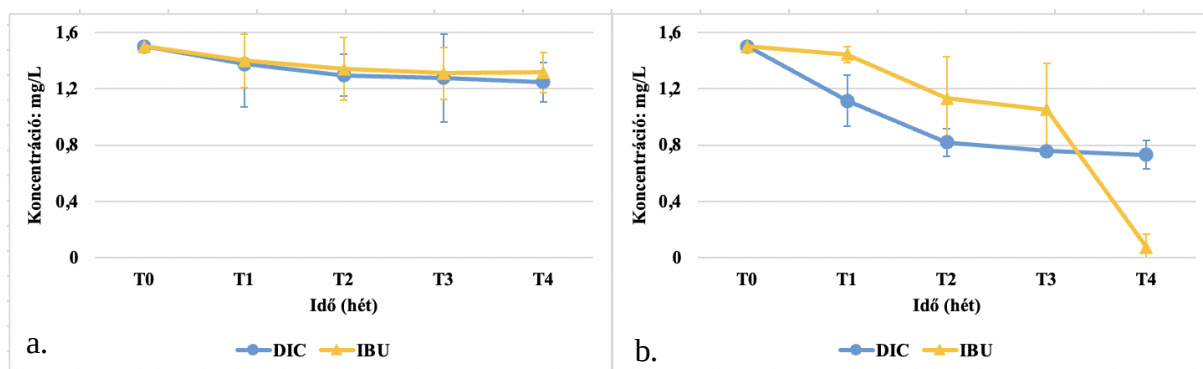


12. Ábra. A konzorciummal beoltott ásványi tápoldatok T-RFLP profilja T1, T2, T3 és T4 hetes időpontokban. Az ábrán feltüntetésre került a gyógyszerhatóanyagok adott időpontban mért bontása is

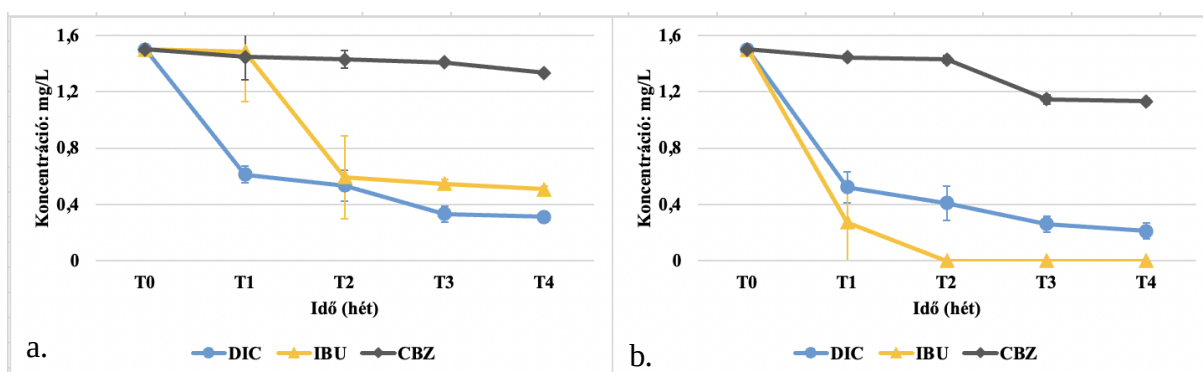
5. 3. A konzorcium gyógyszerhatóanyag bontó képessége természetes vízmintában

A természetes vízminta felhasználásával történő vizsgálat alatt több beállítást is végeztünk, amelyek közül azokat a beállításokat tárgyalom a továbbiakban, amelyekben gyógyszerhatóanyag bontást tapasztaltunk. Az egyik ilyen kombináció a Rákospatak+ glükóz+ élesztőkivonat, ahol a vízmintában jelenlévő autochton baktériumközösség habár kis mennyiségben, de bontotta a célvegyületeket: a diklofenák 16,86%-a és az ibuprofen 12,25%-a bomlott le a tesztoldatokban. Ellenben ugyanez a beállítás a konzorciummal beoltott mintákban 51,31%-os diklofenák és 91,5%-os ibuprofen bontást eredményezett a négy hetes vizsgálat alatt (13. ábra). Kijelenthető, hogy ebben a beállításban a konzorcium hozzáadása a vízmintához megnövekedett diklofenák és ibuprofen bontást eredményezett. A Rákospatak autochton baktériumközössége glükóz, élesztőkivonat és ammónium-nitrát hozzáadása mellett szintén bontotta a gyógyszerhatóanyag mixet: karbamazepin esetén 10,96%-os, diklofenák esetén 79,23%-os és az ibuprofen esetén 66,14%-os koncentráció csökkenést tapasztaltunk. Ugyanennek a mintának a konzorciummal beoltott megfelelője nagyobb mértékű hatóanyag lebontást mutatott, legfőképpen ibuprofen esetén: 24,46%-os karbamazepin, 86,02%-os

diklofenák és 100%-os ibuprofen bontást mértünk ki (14. ábra). Ezen két kísérleti beállítás esetén is megfigyelhető, hogy a konzorcium jelenlétében a gyógyszerhatóanyagok lebontása jobb ütemben zajlik, illetve kijelenthető, hogy az autochton baktériumközösség jelenléte nem akadályozta a konzorcium tagjait a lebontásban.



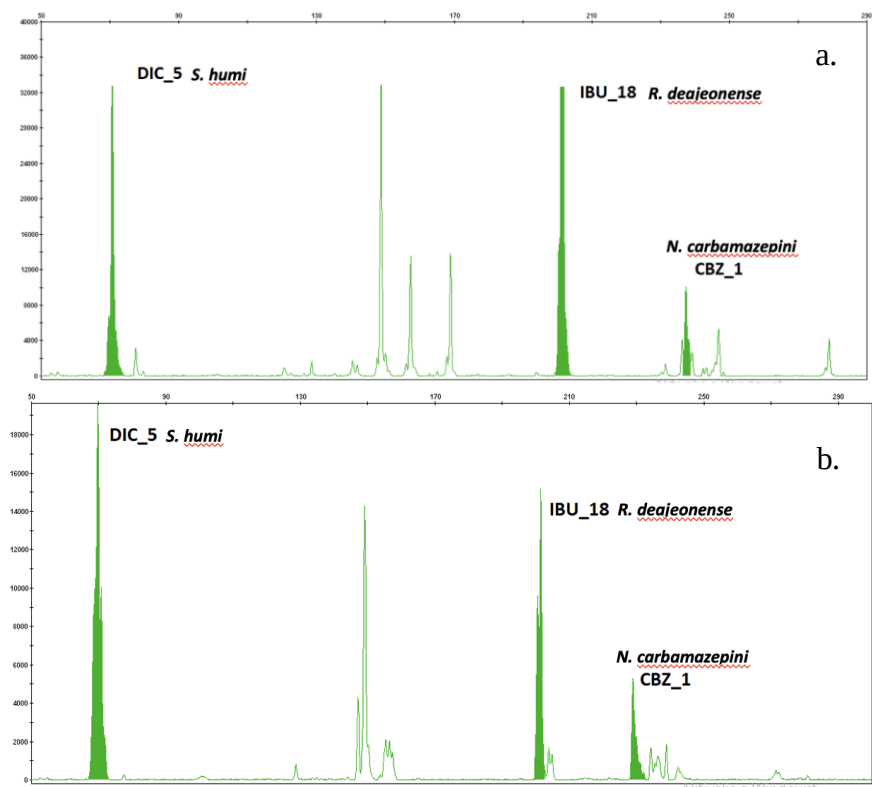
13. Ábra. Rákospatak vízmintában mért diklofenák és ibuprofen csökkenés konzorcium nélkül (a) és konzorciummal beoltva (b) glükóz és élesztőkivonat jelenlétében



14. Ábra. A vizsgált gyógyszerhatóanyagok koncentráció csökkenése a Rákospatakban lévő autochton baktérium közösség jelenlétében konzorcium nélkül (a) és konzorciummal (b) glükóz, élesztőkivonat és ammónium-nitrát hozzáadása mellett

5. 3. 1. A természetes vízmintát tartalmazó tesztoldatok T-RFLP vizsgálatának eredményei

A kísérlet során a kiinduló és utolsó (4.) heti mintákból végeztünk T-RFLP vizsgálatokat (15. a, b ábra). A konzorciumot tartalmazó Rákospatak mintákban a bontási vizsgálatok végén kimutathatóak voltak a konzorciumot alkotó baktériumok, kivétel a CBZ-3-as izolátum, amely fennmaradásának vélhetően nem kedveztek a feltételek. Az is jól látható az elektroferogramokon, hogy a konzorcium tagjait nem nyomta el, szaporodta túl a Rákospatak baktériumközössége és így képesek voltak kifejezni biodegradációs képességüket.



15. Ábra. A Rákospatak+ konzorcium+ glükóz+ élesztőkivonat összetételű minta (a), Rákospatak+ konzorcium+ glükóz+ élesztőkivonat+ ammónium-nitrát összetételű minta (b) utolsó heti T-RFLP elektroferogramjai

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az agardiffúziós lyuk-teszt és a keresztcsíkozásos együtt-tenyésztési vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy az izolátumok kompatibilisek. Az eredményeink alátámasztják, hogy a négy izolátumból, úgy, mint *Stenotrophomonas humi* DIC_5, *Rhizobium daejeonense* IBU_18, *Nocardioideus carbamazepini* CBZ_1 és *Brevundimonas mongoliensis* CBZ_3 lehetséges egy a gyógyszerhatóanyag mix lebontására alkalmas konzorcium létrehozása.

A kitűzött céloknak megfelelően sikerült kialakítani egy olyan konzorciumot, amely egyidejűleg képes lebontani a diklofenákot, az ibuprofent és a karbamazepint tartalmazó gyógyszerkeveréket, jóllehet a karbamazepint kisebb mértékben. A HPLC műszeres analitikai mérésekkel igazoltuk, hogy a baktériumtörzsek hatékonyan képesek lebontani a gyógyszerhatóanyagokat laboratóriumi környezetben BHB ásványi tápoldatban, és természetes vízmintában (Rákos-patak) is az autochton baktériumközösség jelenlétében is. A különféle beállítások eredményei alapján, a konzorcium biodegradációs képességének hatékonyságát fokozza a plusz ko-metabolikus szubsztrátok hozzáadása, úgy, mint az élesztőkivonat és a glükóz. Eredményeink azt mutatják, hogy az ammónium-nitrát jelenléte serkenti a természetes víz mikrobióta gyógyszerhatóanyagbontó képességét.

A konzorcium ásványi tápoldatban való vizsgálata során 4 hét után a legjobb bontási eredményeket glükóz és élesztőkivonat jelenléte mellett mutatta, ahol 30,6%-os karbamazepin, 72,6%-os diklofenák, és 100%-os ibuprofen bontást tapasztaltunk. A Rákos-patak vízmintákban a konzorcium leginkább a glükózt, élesztőkivonatot és ammónium-nitrátot együttesen tartalmazó mintákban bontotta a legnagyobb százalékban a gyógyszerhatóanyag keveréket. A négyhetes teszt folyamán 24,46%-os karbamazepin, 86,02%-os diklofenák és 100%-os ibuprofen bontást detektáltunk.

A T-RFLP módszer alkalmazásával sikeresen kimutattuk a kísérlet teljes ideje alatt a konzorciumot alkotó baktériumtörzsek jelenlétét, igazolva, hogy valóban a konzorcium tevékenysége következtében bomlottak le a hatóanyagok. Kivételt ez alól a CBZ-3-as törzs jelentett, amelynek jelenlétét a bontási kísérletek során nem sikerült kimutatni T-RFLP-vel. A jövőben megfontolandó a CBZ_3-as izolátum kihagyása a konzorciumból, mivel a tesztek során nem sikerült T-RFLP-vel kimutatni a törzs jelenlétét. Továbbá, a konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képességét javasolt szennyvíz effluensben is megvizsgálni az autochton baktériumközösség jelenlétében.

7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, Dr. Benedek Tibornak, hogy lehetőséget adott részt venni egy ilyen jelentős problémával foglalkozó kutatásban, hogy végig támogatott, biztatott és nagy mértékben hozzájárult a szakmai fejlődésemhez, tudásom gyarapításához. Ugyanakkor hálával tartozom Pápai Mártonnak a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem doktorandusz hallgatójának, hogy segítséget nyújtott a kísérletek megtervezésében, kivitelezésében és kiértékelésében, illetve, hogy készségesen segített bármilyen kérdéssel, kéréssel fordultam hozzá.

A kutatás egy Magyar-Izraeli Tét (2018-2.1.16-TÉT-IL-2018-00002) pályázat keretei között valósult meg, amely gyógyszerhatóanyagok koncentrációjának csökkentését tűzte ki célul egy innovatív biotechnológiai módszer kifejlesztésével.

A dolgozat a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-22-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL



Új Nemzeti
Kiválóság Program

IRODALOM

- Acuna V., Ginebredab A., Mor J. R., Petrovicac M., Sabaterad S., Sumptere J., Barcelóab D. (2015): Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International*, 85, 327-333 p.
- Aguilar-Romero I., Romero E., Wittich R.-M., van Dillewijn P. (2020): Bacterial ecotoxicity and shifts in bacterial communities associated with the removal of ibuprofen, diclofenac and triclosan in biopurification systems. *Science of The Total Environment.*, 741, p. 140461.
- Aissaoui S., Ouled-Haddar H., Sifour M., Beggah C., Benhamada F. (2017a): Biological Removal of the Mixed Pharmaceuticals: Diclofenac, Ibuprofen, and Sulfamethoxazole Using a Bacterial Consortium. *Iran J Biotechnol*, 15(2): 135–142.
- Aissaoui S., Ouled-Haddar H., Sifour M., Harrouche K., Sghaier H. (2017b): Metabolic and Co-Metabolic Transformation of Diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 Isolated from Activated Sludge. *Current Microbiology*, Volume 74, pages 381–388.
- Albani F., Riva R., Baruzzi A. (1995): Carbamazepine Clinical Pharmacology: A Review. *Pharmacopsychiar*. 28, 235- 244 p.
- Alder A., Bruchet A., Carball M., Clara M., Joss A., Löffler D., McArdell CS, Miksch K., Omil F., Tuhkanen T., Ternes TA (2006): Consumption and occurrence. In: Ternes T. A. & A. Joss (Eds.), *Human pharmaceuticals, hormones, and fragrances: the challenge of micropollutants in urban water management*. IWA Publishing, 17-54 p.
- Almeida B., Kjeldal H., Lolas I., Knudsen A. D., Carvalho G., Nielsen K.L., Barreto-Crespo M. T., Stensballe A., Nielsen J. L. (2013): Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain I1 1. *Biodegradation* 24:615–630.
- Alrashood S. T. (2016): Carbamazepine, Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Volume 41, 133-321 p.
- Beek T., Weber F.A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Hein A., Küster A. (2016): Pharmaceuticals in the environment—global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology Chemistry*, 35 (4), pp. 823-835.
- Benedek, T., Táncsics, A., Szabó, I., Farkas, M., Szoboszlay, S., Fábíán, K., Maróti, G., Kriszt, B. (2016): Polyphasic analysis of an *Azoarcus leptothrix*-dominated bacterial biofilm developed on stainless steel surface in a gasoline-contaminated hypoxic groundwater. *Environ Sci Poll Res* 23:9019–9035
- Benedek, T., Máthé, I., Salamin, R., Rákos, S., Pásztóhy, Z., Márialigeti, K., Lányi, S. (2012): Potential bacterial soil inoculant made up by *Rhodococcus* sp. and *Pseudomonas* sp. for remediation in situ of hydrocarbon- and heavy metal polluted soils. *Studia UBB Chemia* 57:199–211
- Bessa V. S., Moreira I. S., Murgolo S., Mascolo G., Castro P. M. L. (2019): Carbamazepine is degraded by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Science of The Total Environment*, Volume 690, Pages 739-747.
- Bessa V. S., Moreira I. S., Tiritan M. E., Castro P. M. L. (2017): Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 120, pp. 135-142.

- Boisseaux P., Noury P., Thomas H., Garric J. (2017): Immune responses in the aquatic gastropod *Lymnaea stagnalis* under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 139, pp. 358-366
- Brandaõ F. P., Rodrigues S., Castro B. B., Gonçalves F., Antunes S. C., Nunes, B. (2013): Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: biochemical and behavioral effects. *Aquat Toxicol* 144–145:218–229
- Brausch M. J., Connors K. A., Brooks B. W., Rand G. M. (2012): Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review of Recent Toxicological Studies and Considerations for Toxicity Testing. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Volume 218, pp 1-99.
- Buser, H.-R., Poiger, T., Müller, M.D. (1998): Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a Lake. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3449–3456.
- Buser H.R., Poiger T., Müller M.D. (1999): Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environmental Science & Technology*, 33 (15), pp. 2529-2535.
- Environ. Res., 188, Article 109825.
- Chen Y. & Rosazza J. P. N. (1994): Microbial transformation of ibuprofen by a *Nocardia* species. *Appl Environ Microbiol*, 60:1292–1296.
- Collado N., Rodriguez-Mozaz S., Grosb M., Rubirola A., Barceló D., Comas J., Rodriguez-Roda I., Buttiglieri G. (2014): Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. *Environmental Pollution*, Volume 185, Pages 202-212.
- Cui C. Z., Hu H. Y., Yu Y. Q., Yu Y. (1992): Isolation of a bacterial strain capable of and biodegradation characteristics. *Microbiology*, 36(4): 557–562.
- Damasceno de Oliveira L. L., Antunes S. C., Gonçalves F., Rocha O., Nunes B. (2016): Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, Volume 39, Issue 1, 13-21 p.
- David, A. & Pancharatra K. (2009): Developmental anomalies induced by a nonselective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Pharmacol* 27:390–395.
- Daughton C. G., Ternes T. A. (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107:907–38.
- Dietrich, DR, and Prietz, A (1999): Fish embryotoxicity and teratogenicity of pharmaceuticals detergents and pesticides regularly detected in sewage treatment plant effluents and surface waters. *Toxicologist* 48(1–s):151
- Du J., Mei C.F., Ying G.G., Xu M.Y. (2016): Toxicity thresholds for diclofenac, acetaminophen, and ibuprofen in the water flea *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 97 (1), pp. 84-90
- Erdösi E., Joó G., Tólkínálát I., Szűcs M., Boros E. (2021): Gyógyszerfogyasztási szokások időskorban. *Nővér*, 34(2): 1-44 p.
- Fehérvári A. (2008): A magyar gyógyszeripar kezdetei. *Iparjogvédelmi és Szerzői Jogi Szemle*, 3. (113.) évfolyam 2. szám: 63-77 p.
- Fekete Dzs. (2019): Sennyező szénhidrogének bontására és biofilmképzésre képes baktériumok együttenészthetőségének vizsgálata. *Diplomadolgozat, Szent István Egyetem, Gödöllő*, 53 p.

- Fenyves Zs. (2010): Módosított hatóanyag-leadású diklofenák-nátrium tartalmú gyógyszerkészítmények formulálása és vizsgálata. Doktori értekezés, Semmelweis Egyetem, Budapest, 119 p.
- Ferrari B., Paxéus N., Giudicec R. L., Pollioc A., Garrica J. (2003): Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 55, Issue 3, 2003. július, 359-370 p.
- Gauthier H., Yargeau V., Cooper D. G. (2010): Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. *Science of The Total Environment*, Volume 408, Issue 7, Pages 1701-1706
- Gerencsérné B. R. (2015): Gyógyszermaradványok eltávolítása különböző típusú vizekből. In: Simon L., Vincze Gy. (szerk.): Szennyvizek és szennyvíziszapok hasznosítása a régió fenntartható mezőgazdaságáért. Nyíregyházi Főiskola, Nyíregyháza, 122 p., 21-33 p.
- Gravel, A. and Vijayan, M. M. (2007): Salicylate impacts the physiological responses to an acute handling disturbance in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 85:87–95
- Gravel A., Wilson J. M., Pedro D. F. N., Vijayan M. M. (2009): Non-steroidal antiinflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol C* 149:481–490.
- Gyires K. & Früst Zs. (2011): A farmakológia alapjai. Medicina Könyvkiadó Zrt., 1463.
- Hallare A.V., Kohler H.R., Triebkorn R. (2004): Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*, 56, pp. 659-666
- Han S., Choi K., Kim J., Ji K., Kim S., Aho B., Yun J., Choi K., Khim J. S., Zhang X., Giesy J. P. (2010) Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in *Japanese medaka*, *Oryzias latipes* and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat Toxicol* 98:256–264.
- Hayashi Y., Heckmann L.H., Callaghan A., Sibly R.M. (2008): Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology*, 17 (4), pp. 246-251
- Heberer T. (2002a): Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett*, 131 (1–2) (2002), pp. 5-17.
- Heberer T. (2002b): Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, Volume 266, Issues 3–4, 15, Pages 175-189.
- Heylen K., Vanparys B., Peirsegeale F., Lebbe L., De Vos P. (2007): *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, Volume 57, Issue 9, 2056-2061. doi: 10.1099/ijs.0.65044-0.
- Hsieh L. P. & Huang C. Y (2011): Trends in the use of antiepileptic drugs in Taiwan from 2003 to 2007: A Population-Based National Health Insurance study. *Epilepsy Research*, Volume 96, Issues 1–2, September 2011, 81-88 p.
- Hudec R., Božeková L., Tisoňová J. (2011): Consumption of three most widely used analgesics in six European countries. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 37, 1, 78-80 p.
- Inotai A., Hankó B., Mészáros Á. (2010): Trends in the non-steroidal anti-inflammatory drug market in six Central–Eastern European countries based on retail information. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 19: 183–190

- Ivshina I. B., Tyumina E. A., Kuzmina M. V., Vikhareva E. V. (2019): Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. Scientific Reports volume 9, Article number: 9159.
- Kallenborn R, Fick R, Lindberg R, Moe M, Nielsen KM, Tysklind M., Vasskog T. (2008): Pharmaceutical residues in northern European environments: consequences and perspectives. In: Kümmerer K. (eds) Pharmaceuticals in the Environment. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 61–74.
- Kholood E. (2020): ENRICHMENT AND ISOLATION OF PHARMACEUTICALS DEGRADING BACTERIA FROM BIOFILM. Thesis, SzIE, Gödöllő, 164 p.
- Kleemiss F., Justies A., Duvinage D., Watermann P., Ehrke E., Sugimoto K., Fugel M., Malaspina L. A., Dittmer A., Kleemiss T., Puylaert P., King R. N., Staubitz A., Tzschentke T. M., Dringen R., Grabowsky S., Beckmann J (2020): Sila-Ibuprofen. Journal of Medicinal Chemistry, 63, 21, 12614–12622 p.
- Kosjek T., Heath E., Krbavčič A. (2005): Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. Environment International, Volume 31, Issue 5, July 2005, Pages 679-685.
- Krnic D., Anic-Matic A., Dosenovic S., Draganic P., Zezelic S., Puljak L. (2015): National consumption of opioid and nonopioid analgesics in Croatia: 2007–2013. Ther Clin Risk Manag, 11: 1305-1314 p.
- Kümmerer K. (2001): Drugs, diagnostic agents and disinfectants in wastewater and water—a review. Chemosphere 45:957–69.
- Kümmerer K. (2010): Pharmaceuticals in the Environment. Annual Review of Environment and Resources, Vol. 35:57-75.
- Larsson D. G., de Pedro C., Paxeus N. (2007): Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. Journal of Hazardous Materials, 148:751–55.
- Lee J., Ji K., Lim Kho Y., Kim P., Choi K. (2011): Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and *Japanese medaka*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 74, pp. 1216-1225.
- Leeuwen J. S., Vredenburg G., Dragovic S., Tjong J. T. F., Vos C. J., Vermeulen N. P. E. (2011): Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system. Toxicology Letters, Volume 200, Issue 3, Pages 162-168.
- Li A., Cai R., Cui D., Qiu T., Pang C., Yang J., Ma F., Ren N. (2013): Characterization and biodegradation kinetics of a new cold-adapted carbamazepine-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. CBZ-4. Journal of Environmental Sciences, Volume 25, Issue 11, Pages 2281-2290.
- Liu Y., Wang L., Pan B., Wang C., Bao S., Nie X. (2017): Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol., 183, pp. 104-113
- Lonappan L., Brar D. K., Das R. K., Vermab M., Surampallic R. Y (2016a): Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. Environment International, Volume 96, 127-138 p.
- Lonappan, L., Pulicharla, R., Rouissi, T., Brar, S.K., Verma, M., Surampalli, R.Y., Valero, J.R. (2016b): Diclofenac in municipal wastewater treatment plant: quantification using laser diode thermal desorption—atmospheric pressure chemical ionization—tandem mass spectrometry approach in comparison with an established liquid chromatography-electrospray ionization—tandem mass spectrometry method. J. Chromatogr. A 1433, 106–113.

- Martin-Diaz L., Franzellitti S., Buratti S., Valbonesi P., Capuzzo A., Fabbri E. (2009) Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 94:177–185.
- Márta Z. (2019): HPLC-MS/MS módszerek kidolgozása biológiailag aktív anyagok mennyiségi meghatározására. Doktori értekezés, BME, Budapest, 105 p.
- Mehinto A. C., Hill E. M., Tyler C. R. (2010): Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.*, v. 44, 2176–2182.
- Moreira I. S., Bessa V. S., Murgolo S., Piccirillo C., Mascolo G., Castro P. M. L. (2018): Biodegradation of diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 152, Pages 104–113.
- Murdoch R. W. & Hay A.G. (2013): Genetic and chemical characterization of ibuprofen degradation by *Sphingomonas* Ibu-2. *Microbiology* 159:621–632.
- Murdoch R. W. & Hay A. G. (2015): The biotransformation of ibuprofen to trihydroxyibuprofen in activated sludge and by *Variovorax* Ibu-1. *Biodegradation* 26:105–113.
- Navrozidou E., Melidis P., Ntougias S. (2019): Biodegradation aspects of ibuprofen and identification of ibuprofen-degrading microbiota in an immobilized cell bioreactor. *Environmental Science and Pollution Research* volume 26, pages14238–14249.
- Neal M. J. (2000): Rövid farmakológia. B+V (medical&technical) Lap- és Könyvkiadó Kft., Budapest, 150 p.
- Nentwig, G., Oetken, M., Oehlmann, J. (2004): Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates- the example of carbamazepine and clofibric acid. In: Ku"mmerer K (ed) *Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate effects and risks*, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 195–208.
- Nyitrai L. és Pál G. (2013): A biokémia és molekuláris biológia alapjai. Budapest, 563 p.
- OECD (2019): State of Health in the EU Magyarország Egészségügyi országprofil. Katalógus, Magyarország, 24
- Ogueji E. O., Nwani C. D., Iheanacho S. C., Mbah C. E., Okeke C. O., Yaji A. (2018): Acute toxicity effects of ibuprofen on behaviour and haematological parameters of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *African Journal of Aquatic Science*, Volume 43, Issue 3, Pages 293–303.
- Oldenkamp R., Beusen A., Huijbregts M. (2019): Aquatic risks from human pharmaceuticals—modelling temporal trends of carbamazepine and ciprofloxacin at the global scale. *Environmental Research Letters*, 14 (3), 034003.
- Oropesa A. L., Floro A. M., Palma P. (2016): Assessment of the effects of the carbamazepine on the endogenous endocrine system of *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research* volume 23, pages 17311–17321.
- Országos Gyógyszerészeti és élelmezés- egészségügyi Intézet (2020): 2018-19 Évkönyv. Évkönyv, 121 p.
- Qiang L., Cheng J., Yi J., Rotchell J. M., Zhu X., Zhou J. (2016): Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology*, 25(7), 1426–1437. doi:10.1007/s10646-016-1694-.
- Quan Z. X., Bae H. S., Baek J. H., Chen W. F., Im W. T., Lee S. T. (2005): *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Volume 55, Issue 6, 2543–2549 <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63667-0>.

- Quinn B., Gagne' F., Blaise C. (2008): An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuate*. *Sci Total Environ* 389:306–314.
- Parolini M. (2020): Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Science of The Total Environment*, Volume 740, 140043.
- Parolini M. & Binelli A. (2012): Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology*, 21 (2), pp. 379-392
- Parolini M., Binelli A., Cogni D., Riva C., Provini A. (2009): An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicol. in Vitro*, 23 (5), pp. 935-942.
- Parolini M., Binelli A., Provini A. (2011): Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74 (6), pp. 1586-1594.
- Perucca E. (2005): An Introduction to Antiepileptic Drugs. *Epilepsia*, 46(Suppl. 4):31–37 p.
- Perucca P. & Gilliam F. G. (2012): Adverse effects of antiepileptic drugs. *The Lancet Neurology*, Volume 11, Issue 9, 792-802 p.
- Popa Ungureanu C., Favier L., Bahrim G., Amrane A. (2015): Response surface optimization of experimental conditions for carbamazepine biodegradation by *Streptomyces* MIUG 4.89. *New Biotechnology*, Volume 32, Issue 3, Pages 347-357.
- Reith, D. M., Appleton, D. B., Hooper, W., Eadie, M.J. (2000): The effect of body size on the metabolic clearance of carbamazepine. *Biopharm. Drug Dispos.* 21 (3), 103–111.
- Révész F. (2016): Vasredukáló mikroszervezetek dúsítása BTEX vegyületekkel szennyezett talajvízből. Msc szakdolgozat, Szent István Egyetem, Gödöllő, 5-11p.-18-20p.
- Ryan R. P., Monchy, S. Cardinale M., Taghavi S., Crossman L., Avison M. B., Berg G., Lelie D., Dow J. M. (2009): The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7, pages 514–525.
- Santos J. L., Aparicio I., Alonso E. (2007): Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environ International* 33(4):596–60.
- Sathishkumar P., Meena R. A. A., Palanisami T., Ashokkumar V., Palvannan T., Gua F. L. (2020): Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Science of The Total Environment*, Volume 698, 134057.
- Seigel A., Schröck A., Hauser R., Spangenberg B. (2011): SENSITIVE QUANTIFICATION OF DICLOFENAC AND IBUPROFEN USING THIN LAYER CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH AVIBRIO FISHERIBIOLUMINESCENCE ASSAY. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34(10-11), 817–828.
- Skaistė K., Gintautas G., Aušra V., Arūnas S., Kęstutis P., Edmundas K. (2018): Impact of the World Health Organization Pain Treatment Guidelines and the European Medicines Agency Safety Recommendations on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use in Lithuania: An Observational Study. *Medicina*, 54(2), 30p.
- Songlin W., Ning Z. (2016): Removal of carbamazepine from aqueous solution using sono-activated persulfate process. *Ultrason Sonochem* 29:156–162.

- Sütő G., (2019): Nemszteroid gyulladáscsökkentő szerek a mozgásszervi fájdalom csillapításában. Orvosi Hetilap, 160(22): 855–8860.
- Stuhlmeier M. K., Hui L., Kao J. J. (1999): Ibuprofen: New Explanation for an Old Phenomenon. Biochemical Pharmacology, Vol. 57, 313–320 pp.
- Swan G. E., Cuthbert R., Quevedo M., Green R. E., Pain D. J., Bartels P., Cunningham A. A., Duncan N., Meharg A. A., Oaks J. L., Parry-Jones J., Shultz S., Taggart M. A., Verdoorn G., Wolter K. (2006): Toxicity of diclofenac to *Gyps vultures*. Biology letters (2), 279–282, doi:10.1098/rsbl.2005.0425.
- Szamosi Sz. (2018): A nemszteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek kiválasztásának szempontjai a biztonságosság tükrében. Orvosi Hetilap, 159(44): 1783–1788.
- Ternes T. A., Meisenheimer M., McDowell D., Sacher F., Brauch H. J., Haiste-Gulde B., Preuss G., Wilme U., Zulei-Seibert N. (2002): Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. Environ. Sci. Technol., 36, pp. 3855–3863
- Tian Y., Xia X., Wang J., Zhu L., Wang J., Zhang F., Ahmad F. (2019): Chronic Toxicological Effects of Carbamazepine on *Daphnia magna Straus*: Effects on Reproduction Traits, Body Length, and Intrinsic Growth. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology volume 103, pages723–728.
- Tiwari B., Sellamuthu B., Ouarda Y., Drogui P., Tyagi R. D., Buelna G. (2017): Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. Bioresource Technology, Volume 224, Pages 1-12.
- Tkaczyk A., Bownik A., Dudka J., Kowal K., Ślaska B. (2021): *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. Science of The Total Environment, Volume 763, 143038.
- Tong J. G. (2010): Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. Current Medical Research & Opinion Vol. 26, No. 7, 1715–1731 p.
- Tsiaka P., Tsarpali V., Ntaikou I., Kostopoulou M. N., Lyberatos G., Dailianis S., (2013): Carbamazepine-mediated pro-oxidant effects on the unicellular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. Ecotoxicology 22, 1208–1220.
- Tsiropoulos I., Gichangi A., Andersen M., Bjerrum L., Gaist D., Hallas J. (2006): Trends in utilization of antiepileptic drugs in Denmark. Acta Neurologica Scandinavica, Volume 114 Issue 1, 70-70 p.
- UNESCO & HELCOM (2017): Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region – A status report. UNESCO Emerging Pollutants in Water Series – No. 1, UNESCO Publishing, Paris, 121 p.
- Vane J. R. (1971): Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. Nature New Biology, 231, 232-235 p.
- Van Rooyen G.F., Badenhorst D., Swart K.J., Hundt H.K.L., Scanes T., Hundt A.F. (2002): Determination of Carbamazepine and Carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionisation. Journal of Chromatography B: Anal Technol Biomedical and Life Sciences, 769 (1), pp. 1-7
- Varga R. (2012): Hazánkban nagy mennyiségben fogyasztott gyógyszerek maradványainak követése felszíni vizeinkben: gyomorsav-túltengést csökkentő, illetve szívgyógyszerek kimutatása SPE-LC-MS/MS módszerrel. Doktori (Phd) értekezés, ELTE, Budapest, 140 p.

- Wang K., Zhuang T., Su Z., Chi M., Wang H. (2021): Antibiotic residues in wastewaters from sewage treatment plants and pharmaceutical industries: Occurrence, removal and environmental impacts. *Science of The Total Environment*, Volume 788, 147811.
- Wang X.-C., Shen J.-M., Chen Z.-L., Zhao X., Xu H. (2016): Removal of pharmaceuticals from synthetic wastewater in an aerobic granular sludge membrane bioreactor and determination of the bioreactor microbial diversity. *Appl Microbiol Biotechnol* 100 (18):8213–8223
- Wayne E. C. (1973): Carbamazepine. *Annals of Internal Medicine*, 79(6), 844–
- World Health Organization (2012): Pharmaceuticals in drinking-water. *Pharmaceuticals in drinking-water*, ISBN 978 92 4 150208 5, 52 p
- Xin X., Huang G., Zhanga B. (2021): Review of aquatic toxicity of pharmaceuticals and personal care products to algae. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 410, p 124619.
- Yan Q., Zhang Y. X., Jia K., Gan X. M., Peng X. Y., Guo J. S. (2015): A preliminary study on the occurrence of pharmaceutically active compounds in the river basins and their removal in two conventional drinking water treatment plants in Chongqing, China. *Clean Soil Air Water* 43:794–803.
- Zanuri N. B. M., Bentley M. G., Caldwell G. S. (2017) Assessing the impact of diclofenac, ibuprofen and sildenafil citrate on the fertilization biology of broadcast spawning marine invertebrates. *Mar Environ Res* 127:126–136.
- Zhang Y., Geißen S. U., Gal C. (2008): Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161 p.
- Zhou N. A., Lutovsky A. C., Andaker G. L., Gough H. L., Ferguson J. F. (2013): Cultivation and characterization of bacterial isolates capable of degrading pharmaceutical and personal care products for improved removal in activated sludge wastewater treatment. *Biodegradation* volume 24, pages 813–827.
- Żur J., Marchlewicz A., Piński A., Guzik U., Wojcieszńska D. (2021): Degradation of diclofenac by new bacterial strains and its influence on the physiological status of cells. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 403, 124000.
- Żur J., Piński A., Marchlewicz A., Hupert-Kocurek K., Wojcieszńska D., Guzik U. (2018): Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, volume 25, pages 21498–21524
- <https://njt.hu/m/jogszabaly/2003-15-20-0N> (2021, december)
- http 1: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/medicines> (2021, október)
- http 2: <https://www.magyos.org/hu/oldal/a-magyar-gyogyszeriparrol> (2021, október)
- http 3: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/ (2021, október)
- http 4: <http://enfo.agt.bme.hu> (2021, október)
- http 5: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=N03A&showdescription=yes (2021, október)
- http 6: Gélelektroforézis (2013), Labtutorials in Biology, <https://labtutorials.org/2013/10/27/gelelektroforezis/> (2022. június)