

Xenoösztrogén-bontó baktériumok izolálása és azonosítása

Készítette: Horváth Flóra Boglárka

Témavezető: Dr. Tóth Erika

Segítő PhD hallgató: Mireisz Tamás

ELTE TTK Mikrobiológiai tanszék

OTDK 2023

Tartalom

Összefoglaló.....	3
1. Bevezetés	4
2. Célkitűzés	5
3. Anyagok és módszer	5
3.1. Mintavétel	5
3.2. Baktériumtörzsek izolálása, tisztítása és fenntartása.....	6
3.3. DNS izolálása a baktériumtörzsekből és PCR reakció.....	7
3.4. Baktériumtörzsek 16S rRNS génjének szekvenálása, adatelemzés	8
3.5. Teljes genom elemzés	9
3.6. Antibiotikum rezisztencia vizsgálata	9
4. Eredmények és értékelésük	11
4.1. Csíraszám becslés eredménye.....	11
4.2. A baktériumtörzsek azonosításának eredményei	11
4.3. Az izolált baktériumok metabolikus útvonalai vizsgálatának eredménye a teljes genom elemzés során	13
4.4. Antibiotikum rezisztencia vizsgálat eredményei	16
4.4.1. Sejtfa szintézis gátló antibiotikumokra való rezisztencia vizsgálat eredménye.....	18
4.4.2. Fehérje szintézis gátló antibiotikumok hatása az izolált baktériumtörzsekre	19
4.4.3. Bakteriális replikációt gátló illetve sejtmembrán károsító antibiotikumok vizsgálatának eredményei	20
5. Összefoglalás, kitekintés	21
Köszönetnyilvánítás	22
Irodalomjegyzék	23

Összefoglaló

A természetben előforduló szerves mikroszennyezők (pl.: gyógyszerek és gyógyszer maradványok, tisztítószer adalékanyagok) vizsgálatát megnehezítik szorpció és akkumulációs tulajdonságaik, illetve a környezetben fellelhető alacsony koncentrációjuk, noha komoly gondokat okozhatnak.

Munkánk során budapesti tisztított szennyvíz mintából olyan baktériumokat izoláltunk, melyek biszfenol-A, nonilfenol és 17 β -ösztradiol bontására képesek lehetnek. Szennyvíz mintánkat a vizsgált vegyületeket egyedüli szénforrásként tartalmazó, szelektív tápagarra szélesztettük, baktériumokat izoláltunk és a törzseket 16S rRNS génjeik alapján azonosítottuk. Teszteltük az izolált törzsek antibiotikumokra való érzékenységet (13 antibiotikum), emellett irodalmi adatok alapján végeztük a baktériumok genomjának elemzését, olyan gének csoportjait keresve, melyek az aromás vegyületek bontásában részt vehetnek.

A baktériumok mindegyike a Proteobacteria törzs Gammaproteobacteria osztályába tartozik (22 különböző faj). Többségük az Enterobacteriaceae család tagja, pl.: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* nemzetségek, de megjelentek az *Acinetobacter* és *Pseudomonas* nemzetségek képviselői is. A törzsek a sejtfal bioszintézis gátló antibiotikumokra bizonyultak a legérzékenyebbek. Az aromás metabolikus gének vizsgálata során a bifenil lebontó útvonal tűnt legmeghatározóbbnak, melynek génjei a fajok 86 százalékában megtalálhatók.

1. Bevezetés

A környezetünkben számos szerves mikroszennyező található, melyek egy része minimális felhalmozódásuk esetén is komoly egészségügyi problémákhoz vezethet. Ilyen vegyületek az úgynevezett endokrin diszruptor anyagok, amik befolyásolhatják az endokrin rendszer normál működését. Beleavatkozhatnak a természetes hormonok szintézisébe, szekréciójába, szállításába, kötődésébe vagy eliminációjába (Kavlock et al., 1996). Az endokrin diszruptor vegyületek emberi szervezetre gyakorolt hatása élethosszig tartó lehet, ami a reprodukció zavarait, emlőrák kockázatának növekedését, idegrendszer működésének megváltozását és gyermekeknél fejlődési rendellenességet jelenthet (Monneret, 2017). Mindezek ellenére a mindennapi életünk részei, csomagolásokban, fogyasztói cikkekben, háztartási termékekben, iparban is használt vegyi anyagok (Kabir et al., 2015). Az endokrin diszruptió jelenségét régóta ismerjük és folyamatosan egyre jobban kutatott terület, mégis nehezen születnek hatékony szabályozások ezen anyagok kezelésére (Darbre, 2019; Kavlock et al., 1996; Krishnan et al., 1993; White et al., 1994). Komoly kockázatértékelési nehézséget okoz, hogy nagyon alacsony koncentrációban is képesek hatni, mivel a mechanizmusuk receptor közvetített, emellett a környezetből gyakran nem monoton dózisban történik az expozíció, hatásuk pedig sejt- és életmódspecifikus (Darbre, 2019).

A biszfenol-A az egyik legtöbbet vizsgált endokrin diszruptor vegyület (Krishnan et al., 1993). Több mint 50 éve fő monomere a polikarbonát műanyagoknak és köztiterméke az epoxigyantáknak, ennek köszönhetően a környezetünkben mindenütt jelen van. Megtalálható CD-kben, poharakban, palackokban, cumis üvegekben, konzervek belsejében, régebbi fogorvosi tömésekben, illetve háztartási készülékekben, orvosi berendezésekben, autó-, hajó- és egyéb közlekedésipari eszközökben. A régóta tartó széleskörű felhasználás miatt közel folyamatos az emberi expozíció (kitettség), foglalkozástól vagy életmódtól függetlenül (Beausoleil et al., 2018). Az élelmiszertartályok és vízvezetékek epoxigyanta bevonata okolható a szájon át történő expozícióért, kimutatták ivóvízben (Arnold et al., 2013), emberi vérérszékben és vizeletben, illetve magzatvízben és köldökzsinórvérben is, ami a magzatok kitettségét is bizonyítja (Vandenberg et al., 2007). A fejlődés korai szakaszára gyakorolt káros hatása miatt az Európai Unióban 2011 óta tilos cumisüvegek gyártása során használni, 2015 óta pedig minden étellel érintkező anyagban tiltott (Monneret, 2017).

A nonilfenol széles körben elterjedt környezetszennyező anyag, endokrin diszruptor tulajdonságai is régóta ismertek (White et al., 1994). Elsődleges felhasználása a nonilfenol-etoxilátok gyártása. Ezek nem-ionos felületaktív anyagok, melyeket az iparban, mezőgazdaságban és a háztartásokban egyaránt használnak mint kenőanyag, habzágátló, emulgeáló szer, nedvesítőszer, tisztítószer, festékek és lakkok összetevője (Ying et al., 2002). A környezetben megtalálható nonilfenol domináns forrása nem a közvetlen kibocsátás, hanem a nonilfenol-etoxilátok részleges biológiai bomlása, mely során a nonilfenol felhalmozódhat. A technikai nonilfenol több mint 100 izomer keveréke, melyeknek endokrin diszruptor hatása és biológiai bomlása is eltérő (Giger et al., 2009).

A fent említett mindkét vegyület ösztrogén diszruptor, úgynevezett xenoösztrogén anyag, melyek élőlényekre gyakorolt hatása a fiziológiás 17β -ösztradioléhoz hasonló (Krishnan et al., 1993; White et al., 1994).

2. Célkitűzés

Célunk tisztított szennyvízmintából olyan baktériumtörzsek izolálása és azonosítása volt, amelyek a biszfenol-A-t, a nonilfenolt és a 17β -ösztradiolt egyedüli szénforrásként hasznosítani képesek, valamint irodalmi adatok alapján vizsgáltuk ezen baktériumtaxonok genomját aromás anyagok bontásának vonatkozásában. Mivel a tisztított szennyvíz természetes vízbázisokba kerül, célunk volt továbbá, hogy az izolált baktériumok antibiotikum rezisztenciáját is megvizsgáljuk, hiszen ismert, gondot jelentő tényező az antibiotikum rezisztencia terjedése természetes vizekben.

3. Anyagok és módszer

3.1. Mintavétel

Szennyvízmintát vettünk a budapesti központi szennyvíztisztító telep tisztított szennyvizéből. A mintát 1 L-es, steril csavarkupakos üvegbe, a klasszikus mikrobiológiai szabályok betartásával, merítéssel vettük. Ez látható az 1. Képen.



1.Kép: Szennyvíz mintavétel.

3.2. Baktériumtörzsek izolálása, tisztítása és fenntartása

A szennyvízmintából steril desztillált vízzel 10-es léptékű hígítási sort készítettünk, majd a hígítási tagokból 100 µl-eket szélesztettünk szelektív tápagart tartalmazó Petri-csészékre, majd szobahőmérsékleten (23°C) inkubáltuk két hétig. Csíraszámbecslést végeztünk, majd a Petri-csészékből izoláltuk a törzseket azonos összetételű ferde agarra, és egy hétig inkubáltuk 23 °C-on.

Az izolált baktériumok tisztítását 5 ml steril vizes szuszpenziókból, szelektív tápagart tartalmazó Petri-csészékben végeztük. Egy hetes inkubáció (23 °C -on) után izoláltuk vissza a törzseket a szelektív és nutrient ferde agarra is. A továbbiakban ezeken tartottuk fenn a törzseket.

Alkalmazott szelektív táptalaj összetétele:

- K_2HPO_4 – 0,6 g
- KH_2PO_4 – 0,3 g
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ – 0,5 g
- NaCl – 4 g
- $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ – 0,01 g
- NH_4NO_3 – 1 g
- $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ – 0,02 g

- agar – 20 g
- biszfenol A – 0,7 g
- 17 β -ösztradiol – 0,7 g
- nonil fenol – 0,7 g
- 1000 ml desztillált víz

A táptalaj kémhatását 7-re állítottuk be és autoklávban sterilizáltuk. A három endokrin diszruptort 3,3 ml metanolban oldottuk fel és adtuk a táptalajhoz, sterilizálás után. Erre azért volt szükség, mert ezek az anyagok nem/kevésbé oldódnak vízben, és mikor metanolos előoldás nélkül adtuk hozzá a táphoz, akkor oldhatatlan csapadék formájában a lombik aljára ülepedtek.

Nutrient táptalaj összetételét:

- húskivonat – 3 g
- húspepton – 5 g
- agar – 20 g
- desztillált víz – 1000 ml

A táptalaj kémhatását 7-re állítottuk be és autoklávban sterilizáltuk.

3.3. DNS izolálása a baktériumtörzsekből és PCR reakció

A törzsek DNS-ének kinyerését nátrium-hidroxidos feltárással végeztük.

Az eljárás menete:

1. 25 μ l 0,5M NaOH
2. egy oltókacsnyi baktérium felvétele a ferde táptalajról
3. 15 perc várakozási idő
4. 25 μ l 1M Tris puffer hozzáadása
5. 100 μ l DEPC víz (RNáz mentes víz)
6. vortex használatával összekeverés
7. centrifugálás: 6000 rpm, 4 perc

A kinyert genomi DNS-t PCR segítségével szaporítottuk fel.

A PCR mix összetétele egy mintára nézve:

- 15 µl DEPC víz
- 2,5 µl puffer
- 5 µl DNTTP
- 0,5 µl 27F primer
- 0,5 µl 1492R primer
- 0,5 µl polimeráz
- 1 µl DNS

A használt, 32 ciklusú PCR hőprofil:

- 98 °C – 5 perc
- 94 °C – 30 másodperc
- 52 °C – 30 másodperc
- 72 °C – 1 perc
- 72 °C – 10 perc

A PCR sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A gél összetétele:

- 0,8 g agar
 - 80 ml 1 x TBF puffer
 - 5 µl NAS festék
-
- 5 µl PCR terméket 3 µl töltő pufferrel keverve futtatunk, 80 V, 25 perc.

3.4. Baktériumtörzsek 16S rRNS génjének szekvenálása, adatelemzés

A törzseink DNS-ének bázissorrend elemzését az LGC Genomics (Németország) végezte. A nyers szekvenciákat a MEGA11 programmal (<https://www.megasoftware.net/>) ellenőriztük és javítottuk, majd EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) internetes adatbázis segítségével határoztuk meg filogenetikai helyzetüket.

3.5. Teljes genom elemzés

Az azonosított baktérium fajok teljes genomját RAST Annotation Online internetes felületről (<https://rast.nmpdr.org/>) töltöttük le.

Az adatbázisba a kapott szekvenciát töltöttük fel, megadtuk az általunk meghatározott taxonómiai besorolását, majd a programból letöltöttük az adott faj típustörzsének genomját, és azt elemeztük.

A program lehetőséget nyújt a meghatározott gének funkció szerinti csoportosítására, így a számunkra érdekes csoportokat megkerestük és Excel program segítségével szortíroztuk tovább. Azokat a géneket kerestük, melyek a három vizsgált mikroszennyező bontásában részt vehetnek: az aromás vegyületek metabolizmusának génjeire fókuszáltunk.

3.6. Antibiotikum rezisztencia vizsgálata

Az antibiotikumokra való érzékenység vizsgálatához Nutrient tápagart tartalmazó Petri-csészékre szélesztettük a törzseinket, és antibiotikumokkal átitatott korongokat helyeztünk rá. A használt antibiotikumokat a 1. Táblázat foglalja össze.

Antibiotikum	Koncentráció	Hatásmechanizmus
Meropenem	10µg	sejtfaj bioszintézis gátló, β-laktám típus
Tetracyclin	30µg	fehérje szintézis gátló, 30S és 50S riboszóma alegységhez köt
Imipenem	10µg	sejtfaj szintézis gátló, karbapenem típus
Polymixin	50µg	sejtmembrán károsító, nem-riboszómális peptid
Gentamicin	10µg	fehérje szintézis gátló, 30S riboszóma alegységhez kötődik
Ciproflexacin	5µg	DNS szintézis gátló (bakteriális topoizomeráz gátló)
Cefepime	30µg	sejtfaj szintézis gátló, β-laktám típus
Erythromycin	15µg	fehérje szintézis gátló, 50S riboszóma alegységhez kötődik
Amoxicillin + Clavulanic acid	20/10µg	sejtfaj szintézis gátló, β-laktám típus és β-laktamáz gátló
Trimethoprim + Sulfamethoxazole	1,25/23,25µg	folsav bioszintézis gátló
Clindamycin	2µg	fehérje szintézis gátló, 50S riboszóma alegységhez köt

1. Táblázat: A használt antibiotikumok megnevezése, koncentrációja és hatásmechanizmusa.

A leszélesztett, antibiotikum korongokat is tartalmazó Petri-csészéket 24 óráig inkubáltuk 23°C-on, majd megmértük az antibiotikum korongok körüli tisztulási zónák átmérőjét (mm).

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Csíraszám becslés eredménye

Az endogén diszruptorokat bontani képes baktériumok becsült csíraszama a tisztított szennyvízben $4,41 \times 10^5$ TKE/mL.

4.2. A baktériumtörzsek azonosításának eredményei

A meghatározott baktérium fajok mindegyike a Proteobacteria törzs Gammaproteobacteria osztályába tartozik, 16S rRNS gén alapú identifikációjuk eredményeit a 2. Táblázat tartalmazza. Legtöbb általunk izolált baktérium fakultatív kórokozó, ami eredetüket tekintve (tisztított szennyvíz) nem meglepő.

Törzs jelzése	Taxonómiai besorolás	Típustörzs	Százalékos hasonlóság (16S rRNS gén alapján) (%)
HF-4	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	CIP 64,6	99,36
HF-1	<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 838	100,00
HF-38	<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 838	100,00
HF-10	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	99,86
HF-31	<i>Citrobacter freundii</i>	L2	99,71
HF-46	<i>Citrobacter murlinae</i>	CDC 2970-59	100,00
HF-48	<i>Citrobacter portucalensis</i>	A60	100,00
HF-34	<i>Enterobacter chengduensis</i>	WCHECI-C4	99,38
HF-35	<i>Enterobacter huaxiensis</i>	090008	99,14
HF-36	<i>Enterobacter huaxiensis</i>	090008	99,14
HF-21	<i>Enterobacter sichuanensis</i>	WCHECI1597	99,71
HF-25	<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC 35469	99,60
HF-8	<i>Klebsiella grimontii</i>	06D021	100,00
HF-28	<i>Klebsiella grimontii</i>	06D021	99,90
HF-27	<i>Klebsiella michiganensis</i>	W14	99,60
HF-33	<i>Klebsiella michiganensis</i>	W14	98,64
HF-22	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae</i>	ATCC 11296	99,89
HF-23	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae</i>	ATCC 11296	99,80
HF-5	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	DSM 30104	99,44
HF-11	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	DSM 30104	99,58
HF-13	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis</i>	ATCC 13884	99,78
HF-44	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis</i>	ATCC 13884	99,90
HF-6	<i>Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae</i>	01A030	100,00
HF-37	<i>Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae</i>	01A030	99,90
HF-12	<i>Klebsiella quasivariicola</i>	KPN1705	100,00
HF-19	<i>Klebsiella quasivariicola</i>	KPN1705	99,60
HF-47	<i>Klebsiella quasivariicola</i>	KPN1705	99,81
HF-29	<i>Klebsiella variicola subsp. variicola</i>	DSM 15968	99,81
HF-30	<i>Klebsiella variicola subsp. variicola</i>	DSM 15968	99,90
HF-39	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	NBRC 102595	99,23
HF-17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JCM 5962	99,90
HF-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JCM 5962	99,90
HF-16	<i>Pseudomonas fulva</i>	NBRC 16637	100,00
HF-26	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	JCM 6096	100,00
HF-9	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 29903	99,90

2. Táblázat: Az izolált baktériumtörzsek taxonómiai azonosításának eredményei

A baktériumok jelentős része az Enterobacteriaceae családba tartozik, azon belül a legtöbb faj *Klebsiella* nemzetséghez: pálcika alakú, poliszacharid tokkal rendelkező baktériumok, számos környezetben megtalálhatók, tagjai az ember normál mikrobiótájának is, gyakori fakultatív kórokozó baktériumok (Bagley, 1985). Emellett tenyésztésbe vontuk *Citrobacter*, *Enterobacter* és *Escherichia* nemzetségek képviselőit is. A *Citrobacter* nemzetség tagjai szintén széles körben elterjedtek, több fajuk bakterémiát is okozhat, és számos antibiotikum rezisztenciájuk ismert (Drelichman & Band, 1985; Gastra et al., 2014). Az *Enterobacter* nemzetséghez pálcika alakú, fakultatív anaerob baktériumok tartoznak, szintén humán kórokozók (Wenjing Wu et al., 2019). Az *Escherichia* nemzetség általunk izolált faja (*Escherichia fergusonii*) bélrendszer mikrobiótájának része (Farmer 3rd et al., 1985). A *Shigella* nemzetség (*Shigella flexneri*) mozgékony, nem spóráképző pálcika, melyet a patogenitás és metabolizmus különböztet meg az *Escherichia*-któl (Hale & Keusch, 1996). A *Leclercia* és *Raoultella* nemzetségek egy-egy fajjal képviseltetik magukat mintánkban (*Leclercia adecarboxylata*, *Raoultella ornithinolytica*), mindkettő növekedő jelentőségű humán patogén (Anuradha, 2014; Drancourt et al., 2001).

Az Aeromonadaceae családba tartozó *Aeromonas caviae* régóta ismert, fakultatív anaerob pálcika alakú baktérium, természetes vizekben széles körben elterjedt (Batra et al., 2016).

A Moraxellaceae családba tartozó *Acinetobacter johnsonii* betegséget csak ritkán okozó aerob baktérium (Montana 2016).

A Pseudomonadaceae család *Pseudomonas* nemzetségének azonosított két képviselője (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fulva*) a környezetben mindenhol megtalálható opportunistá patogén, számos virulencia faktorról és antibiotikum rezisztenciával (Weihui Wu et al., 2015).

A tisztított szennyvízben természetesen sok a fakultatív kórokozó. Eredményeink szerint azon baktériumok száma bizonyult magasnak, melyek az ember normál mikrobiótájának is részét képezik.

4.3. Az izolált baktériumok metabolikus útvonalai vizsgálatának eredménye a teljes genom elemzés során

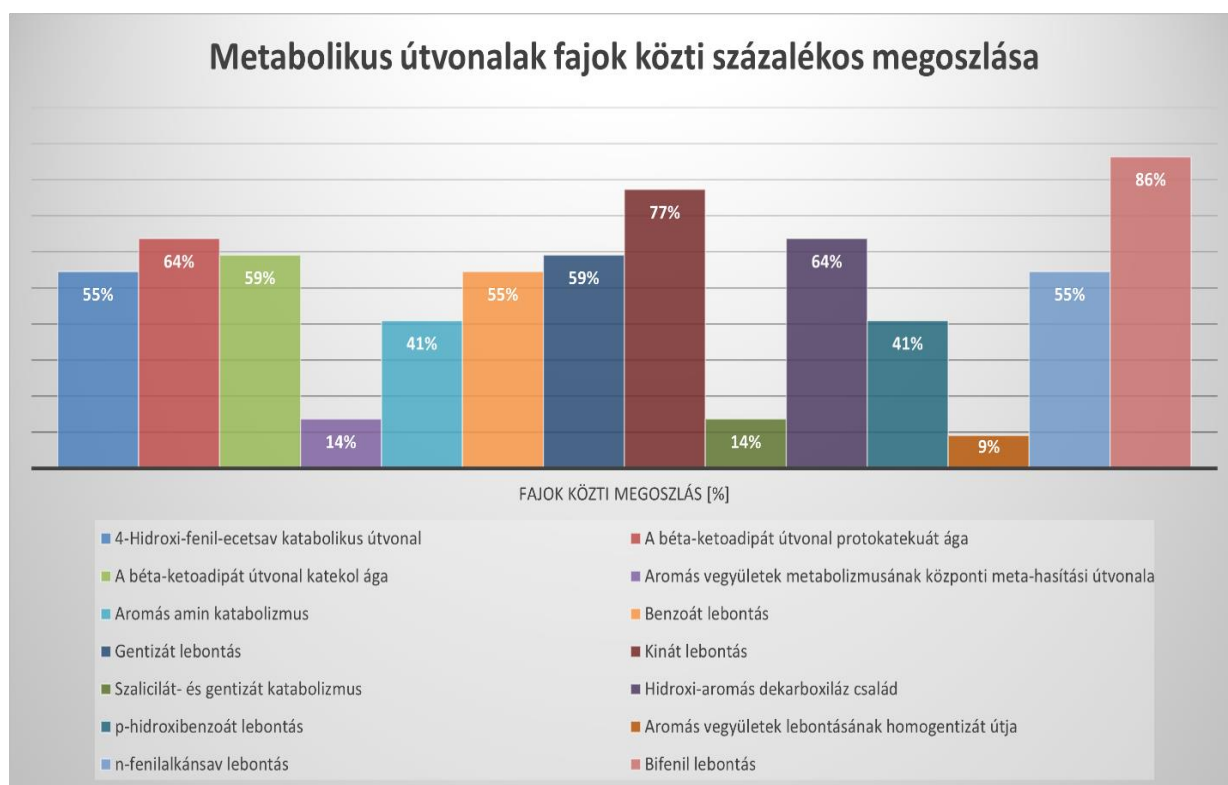
Az izolált és meghatározott baktériumok típusfajai genomjának vizsgálatakor 14, az aromás vegyületek metabolizmusában részt vevő útvonalat találtunk, ezekhez együttesen 692 gén kapcsolódik. A kapcsolódó gének kategóriák közti megoszlását a 3. Táblázat foglalja össze.

Aromás vegyületek metabolizmus útvonalai	Kapcsolódó gének száma
4-Hidroxi-fenil-ecetsav katabolikus útvonal	140
A béta-ketoadipát útvonal protokatekuát ága	95
A béta-ketoadipát útvonal katekol ága	81
Aromás vegyületek metabolizmusának központi meta-hasítási útvonala	72
Aromás amin katabolizmus	62
Benzoát lebontás	55
Gentizát lebontás	36
Kinát lebontás	33
Szalicilát- és gentizát katabolizmus	30
Hidroxi-aromás dekarboxiláz család	27
p-hidroxibenzoát lebontás	19
Aromás vegyületek lebontásának homogentizát útja	16
n-fenilalkánsav lebontás	14
Bifenil lebontás	12

3. Táblázat: Az aromás vegyületek metabolizmusában részt vevő útvonalakhoz kapcsolódó gének száma, útvonalanként.

A meghatározott anyagcsere utak fajok közt megjelenő gyakorisága jellemezheti, hogy melyek bírhatnak jelentős szereppel a vizsgált szerves mikroszennyező anyagok bontásában. Megnéztük, melyik metabolizmus kategória milyen százalékban fordul elő az általunk azonosított fajokban.

Ennek eredményét ábrázolja az 1. Ábra.



1. Ábra: Az aromás vegyületek metabolizmus kategóriáinak fajok közti százalékos megoszlása. A színek az egyes metabolikus kategóriákat jelentik, az y tengelyen pedig annak az értéke szerepel, hogy az általunk meghatározott 22 faj hány százalékában voltak ezen útvonalak génjei megtalálhatók.

Ezek alapján a bifenil degradáció útvonala és a kinát degradáció metabolizmusa tűnnek a legjelentősebbnek, mivel előbbi a fajok 86%-ban megtalálható, utóbbi pedig a fajok 77%-ban. Jelentős szereppel bírhat még a béta-ketoadipát útvonal catechol ága, illetve a hidroxi-aromás dekarboxiláz család metabolizmusa is, melyek génjei a fajok 64%-ban vannak jelen.

Azok a leírt *Sphingomonadaceae* törzsek (például *Sphingobium xenophagum* Bayran törzs), melyek endokrin diszruptor szerves mikroszennyezőket, például a nonilfenolt, bontani képesek, ezt egy ipso-szubsztitúciós mechanizmus segítségével teszik és csak a molekula aromás részét hasznosítják. A *Sphingomonas* sp. TTNP3 törzs nonilfenol bontásánál megfigyelték, hogy a disszociációs energia a kilépő széngyűrű rearomatizációját biztosítja (Giger et al., 2009).

A biszfenol-A bontására képes baktériumtörzsek közt is *Sphingomonas* sp. a legjelentősebb, melyeket többek között szennyvízből és szennyvíziszapból izoláltak (Zhang et al., 2013).

Az általunk izolált törzsek között nem jelenik meg ez a baktérium család, ám jelenlétük nem kizárható mintáinkból sem, így szintén részt vehetnek a mikroszennyezők bontásában, mely képességet a fent említett aromás metabolikus útvonalak tehetnek lehetővé.

4.4. Antibiotikum rezisztencia vizsgálat eredményei

Három csoportba soroltuk az eredményeket, az érzékenység mértékét figyelembe véve:

- 10 mm alatt: rezisztens
- 10 és 25 mm között: mérsékelten rezisztens
- 25 mm fölött: érzékeny

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálat eredményeit a 4. Táblázat foglalja össze.

Baktériumtörzs	Meropenem 10µg	Tetracyclin 30µg	Imipenem 10µg	Polymixin 50µg	Gentamicin 10µg	Ciproflexacin 5µg	Cefepime 30µg	Erythromycin 15µg	Amoxicillin + clavulanic acid 20/10µg	Trimethoprim + sulfamethoxazole 1,25/23,25µg	Clindamycin 2µg
<i>Acinetobacter johnsonii</i> 4	30	20	39	0	19	32	16	14	23	0	0
<i>Aeromonas caviae</i> 1	35,5	20	31	0	0	28,5	34	0	13,5	0	0
<i>Aeromonas caviae</i> 38	35,5	24	30	0	0	26	29	24	13	15	0
<i>Citrobacter freundii</i> 10	36	0	33	0	0	15	10	0	13	0	0
<i>Citrobacter freundii</i> 31	30	23	30	11	13	20	29	13	27	0	0
<i>Citrobacter murlinae</i> 46	25	19	24	0	11	25	24	0	11	0	0
<i>Citrobacter portucalensis</i> 48	25	19	26	0	11	25	30	0	12	0	0
<i>Enterobacter chengduensis</i> 34	31	20	30	0	12	25	30	0	10	0	0
<i>Enterobacter huaxiensis</i> 35	28	23	33	0	10	30	26	0	21	18	0
<i>Enterobacter huaxiensis</i> 36	18	12	28	0	0	0	22	0	19	0	0
<i>Enterobacter sichuanensis</i> 21	30	17	28	11	14	34	32	0	12	0	0
<i>Escherichia fergusonii</i> 25	35	18	28	0	19	36	40	15	24	16	0
<i>Klebsiella grimontii</i> 28	30	21	28	10	10	27	20	0	27	28	0
<i>Klebsiella grimontii</i> 8	33	21	42	10	15	40	39	0	21	19	0
<i>Klebsiella michiganensis</i> 27	33	22	36	10	13	27	30	12	26	15	0

<i>Klebsiella michiganensis</i> 33	32	22	31	11	12	29	34	0	24	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp, ozaenae</i> 22	33	28	36	10	13	25	34	20	30	25	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp, ozaenae</i> 23	35	28	34	10	19	40	37	20	24	31	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp, pneumoniae</i> 11	30	23	32	11	10	22	11	12	20	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp, pneumoniae</i> 5	29	15,5	37,5	10,5	12	23,5	27	14,6	16	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp, rhinoscleromatis</i> 13	34	20	39	12	15	26	12	0	21	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp, rhinoscleromatis</i> 44	27	20	33	0	15	0	29	0	19	0	0
<i>Klebsiella quasipneumoniae ssp, quasipneumoniae</i> 37	23	26	29	10	12	27	30	13	22	0	0
<i>Klebsiella quasipneumoniae ssp, quasipneumoniae</i> 6	35	24,5	38	11,5	12	21,5	19	13,5	15,5	0	0
<i>Klebsiella quasivariicola</i> 12	32	25	36	10	15	34	36	17	24	30	0
<i>Klebsiella quasivariicola</i> 19	35	14	29	10	15	40	34	14	19	23	0
<i>Klebsiella quasivariicola</i> 47	33,5	23	35	10	12	27	31	15	24	21	0
<i>Klebsiella variicola ssp variicola</i> 29	36	22	30	11	12	28	34	10	24	0	0
<i>Klebsiella variicola ssp, variicola</i> 30	30	21	32	11	13	28	27	0	24	17	0
<i>Leclercia adecarboxylata</i> 39	35	20	33	10	13	35	35	17	29	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 17	33	0	33	0	12	0	28	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18	34	0	31	10	13	0	30	0	0	0	0
<i>Pseudomonas fulva</i> 16	40	10	45	10	13	23	25	0	11	0	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i> 26	35	18	32	10	19	21	28	0	20	0	0
<i>Shigella flexneri</i> 9	25	22	29	10	14	25	34	20	28	26	0

4. Táblázat: A gátlási zóna átmérője (mm). Rezisztens (piros), mérsékelten rezisztens (sárga), érzékeny (zöld).

A 2. Kép a *Pseudomonas fulva* 16 törzsről készült, melyen jól látszanak a különböző gátlási zónák. Ez a törzs érzékenynek bizonyult a Cefepime, mérsékelten rezisztensnek az Erythromycin és rezisztensnek az Amoxicillin+Clavulanic acid antibiotikumokra.

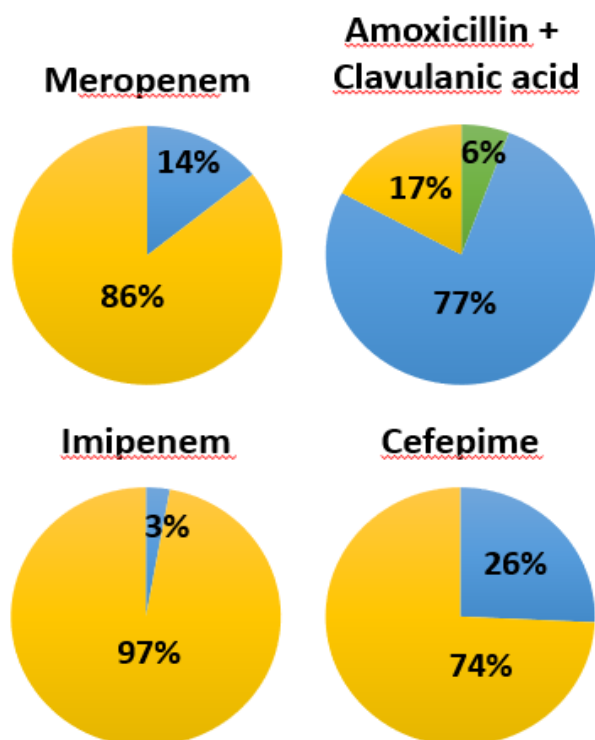


2. Kép: *Pseudomonas fulva* 16 törzs érzékenysége Cefepime, Erythromycin és Amoxicillin+Clavulanic acid antibiotikumokra

4.4.1. Sejtfal szintézis gátló antibiotikumokra való rezisztencia vizsgálat eredménye

A β -laktám típusú antibiotikumok (Meropenem, Imipenem, Cefepime, Amoxicillin+Clavulanic acid) a bakteriális sejtfal bioszintézisének gátlásával okozzák a baktériumok pusztulását, de a β -laktamáz termelő baktériumok erre vonatkozóan rezisztenciát alakíthatnak ki.

Baktériumtörzseink a Meropenem és Imipenem antibiotikumra bizonyultak a legérzékenyebbnek, előbbire a törzsek 86%-a volt érzékeny, utóbbira a törzsek 97%. A Cefepime-re az előző kettővel egyetemben egyetlen törzs sem volt rezisztens. Az Amoxicillint klavulánsavval szokták együtt alkalmazni, ami β -laktamáz gátló, ezzel segítve az antibiotikum hatását és a rezisztencia kiküszöbölését, ennek ellenére a törzsek 6%-a rezisztenciát mutatott (2. Ábra).

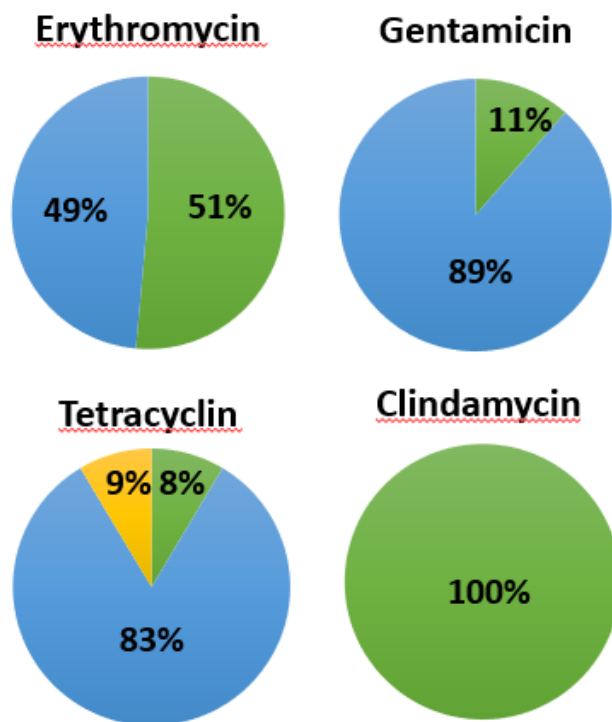


2. Ábra: A baktérium törzsek sejtfal szintézis gátló antibiotikumokra mutatott rezisztenciájának százalékos megoszlása; érzékeny (sárga) mérsékelten rezisztens (kék), rezisztens (zöld).

4.4.2. Fehérje szintézis gátló antibiotikumok hatása az izolált baktériumtörzsekre

Ezek az antibiotikumok (Tetracycline, Gentamicin, Erythromycin, Clindamycin) mind a bakteriális riboszóma alegységeihez kötődve zavarják meg a fehérjék normál szintézisét és okozzák ezáltal a sejt pusztulását.

A Tetracycline a törzsek 9%-a érzékenynek bizonyult, de 8% mutatott rá rezisztenciát és 83% mérsékelt rezisztenciát. A Gentamicinre a törzsek 89%-a volt mérsékelten rezisztens és 11%-a rezisztens, érzékenynek egyik se mutatkozott. Az Erythromycin egy makrolid típusú antibiotikum, a Gram-negatív baktériumok többségére nem hat. Ez jól látszik az eredményeken is, a törzsek 51%-a mutatott rezisztenciát és 49% mérsékelt rezisztenciát. A Clindamycin egy alapvetően Gram-pozitív baktériumok elleni antibiotikum, az összes törzs rezisztens volt rá (3. Ábra).



3. Ábra: A baktérium törzsek fehérje szintézis gátló antibiotikumokra mutatott rezisztenciájának százalékos megoszlása; érzékeny (sárga), mérsékelten rezisztens (kék), rezisztens (zöld).

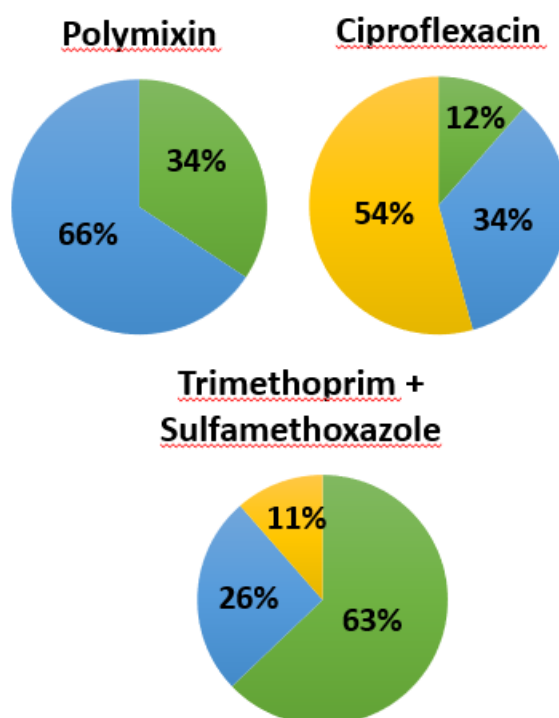
4.4.3. Bakteriális replikációt gátló illetve sejtmembrán károsító antibiotikumok vizsgálatának eredményei

A Ciprofloxacin egy szintetikus fluorokinolon típusú antibiotikum, mely a baktérium topoizomeráz enzimét gátolva akadályozza a DNS szintézist, ezzel pedig a bakteriális replikációt. Erre a törzsek 54%-a érzékeny volt, viszont 12% rezisztens.

A Trimethoprim+Sulfamethoxazole antibiotikum kombináció a folsav bioszintézis egymást követő lépéseit gátolja, ami létfontosságú lenne a purinok, timidin és metionin szintézisében, ezzel gátolva a bakteriális replikációt. A törzsek 63%-a rezisztensnek, 26%-a mérsékelten rezisztensnek és csak 11% bizonyult érzékenynek.

A Polymyxin egy sejtmembrán károsító antibiotikum, kifejezetten Gram-negatív baktériumok ellen, a természetben is megtalálható, Gram-pozitív baktériumok termelik. Ennek ellenére a törzsek 34%-a rezisztenciát mutatott és 66% is mérsékelten rezisztens volt.

Ezen eredmények jelennek meg a 4. Ábrán.



4. Ábra: A baktérium törzsek Ciprofloxacin, Polymixin és Trimethoprim+Sulfamethoxazole antibiotikumokra mutatott érzékenységeinek százalékos megoszlása; érzékeny (sárga), mérsékelt rezisztens (kék), rezisztens (zöld).

Az antibiotikum rezisztencia főként emberi környezetből származik, és a szennyvízzel távozva tovább terjedhet természetes vizekben, amely manapság egyre növekvő problémát jelent – ezért gondoltuk fontosnak ezen rezisztenciák vizsgálatát a dolgozat keretein belül.

5. Összefoglalás, kitekintés

Munkánk során megállapítottuk, hogy a tisztított szennyvízben a tesztelt endokrin diszruptorokat egyedüli szénforrásként hasznosítani képes baktériumok száma magas. Sajnos izolált baktériumaink jelentős hányada fakultatív kórokozó szervezet, így későbbi bioremediációs alkalmazásra nem használhatóak, ezért a későbbiekben endokrin diszruptorokat bontó szervezeteket természetes környezetekből (Dunavíz mint tisztított szennyvíz befogadó forrása) próbálunk meg izolálni. Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a tisztított

szennyvízzel a Dunába számos, antibiotikumrezisztenciát hordozó szervezet kerül. Ez utóbbi az antibiotikumrezisztencia terjedése miatt komoly gondot jelenthet.

Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Tóth Erikának és Mireisz Tamás doktorandusznak a rengeteg segítséget, oktatást és végtelen türelmet, amivel nap mint nap támogatnak. Nélkük nem születhetett volna meg a dolgozatom.

Irodalomjegyzék

- Anuradha, M. (2014). Leclercia adecarboxylata isolation: case reports and review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(12), DD03.
- Arnold, S. M., Clark, K. E., Staples, C. A., Klecka, G. M., Dimond, S. S., Caspers, N., & Hentges, S. G. (2013). Relevance of drinking water as a source of human exposure to bisphenol A. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 23(2), 137–144.
- Bagley, S. T. (1985). Habitat Association of Klebsiella Species. *Infection Control*, 6(2), 52–58. <https://doi.org/10.1017/S0195941700062603>
- Batra, P., Mathur, P., & Misra, M. C. (2016). Aeromonas spp.: an emerging nosocomial pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*, 8(01), 1–4.
- Beausoleil, C., Emond, C., Cravedi, J.-P., Antignac, J.-P., Applanat, M., Appenzeller, B. R., Beaudouin, R., Belzunces, L. P., Canivenc-Lavier, M.-C., Chevalier, N., & others. (2018). Regulatory identification of BPA as an endocrine disruptor: Context and methodology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 475, 4–9.
- Darbre, P. D. (2019). The history of endocrine-disrupting chemicals. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 7, 26–33.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of Klebsiella species delineate Klebsiella and Raoultella gen. nov., with description of Raoultella ornithinolytica comb. nov., Raoultella terrigena comb. nov. and Raoultella planticola comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 925–932.
- Drelichman, V., & Band, J. D. (1985). Bacteremias due to Citrobacter diversus and Citrobacter freundii: incidence, risk factors, and clinical outcome. *Archives of Internal Medicine*, 145(10), 1808–1810.
- Farmer 3rd, J. J., Fanning, G. R., Davis, B. R., O'hara, C. M., Riddle, C., Hickman-Brenner, F. W., Asbury, M. A., Lowery 3rd, V. A., & Brenner, D. J. (1985). Escherichia fergusonii and Enterobacter taylorae, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(1), 77–81.
- Gaastra, W., Kusters, J. G., Van Duijkeren, E., & Lipman, L. J. A. (2014). Escherichia fergusonii. *Veterinary Microbiology*, 172(1–2), 7–12.
- Giger, W., Gabriel, F. L. P., Jonkers, N., Wettstein, F. E., & Kohler, H.-P. E. (2009). Environmental fate of phenolic endocrine disruptors: field and laboratory studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1904), 3941–3963.
- Hale, T. L., & Keusch, G. T. (1996). Shigella. *Medical Microbiology. 4th Edition*.
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 241–258.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., & others. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US

- EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104(suppl 4), 715–740.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L., & Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132(6), 2279–2286.
- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies*, 340(9–10), 403–405.
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24(2), 139–177.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., & Parker, M. G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135(1), 175–182.
- Wu, Weihui, Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular medical microbiology* (pp. 753–767). Elsevier.
- Wu, Wenjing, Feng, Y., & Zong, Z. (2019). Characterization of a strain representing a new *Enterobacter* species, *Enterobacter chengduensis* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112(4), 491–500.
- Ying, G.-G., Williams, B., & Kookana, R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment International*, 28(3), 215–226.
- Zhang, W., Yin, K., & Chen, L. (2013). Bacteria-mediated bisphenol A degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(13), 5681–5689.