

SZENT ISTVÁN EGYETEM



DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

***A *Pseudomonas aeruginosa* környezetbiztonsági jelentősége
antropogén hatás alatt álló közegekben***

Kaszab Edit

Gödöllő

2010

A doktori iskola

megnevezése: **Környezettudományi Doktori Iskola**

tudományága: **Környezettudomány**

vezetője: Dr. Heltai György D.Sc.
tanszékvezető, egyetemi tanár
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Környezettudományi Intézet
Kémia és Biokémia Tanszék

Témavezető: Dr. Szoboszlay Sándor Ph.D.
tanszékvezető-helyettes, egyetemi docens
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. Biotechnológiai eljárások a környezetvédelemben és az agráriumban	9
2.2. Környezeti biotechnológia	9
2.2.1. A szénhidrogén-szennyezések felszámolásának biotechnológiai módszerei	11
2.2.2. Biodegradációs eljárások	12
2.2.3. A komposztálás	14
2.3. A környezetbiztonság fogalma	16
2.3.1. A biotechnológiai folyamatok biológiai biztonsága	17
2.3.1.1. Patogenitás	18
2.3.1.2. Virulencia	19
2.3.2. A bioremediációs eljárások környezetbiztonsága	21
2.3.3. A komposztálás környezetbiztonsága	22
2.4. A patogén mikroorganizmusok megítélése a biotechnológiai eljárások alkalmazása során	23
2.5. Antibiotikum rezisztencia	24
2.5.1. Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok	25
2.5.2. Antibiotikum rezisztencia a környezetben	26
2.5.3. Az antibiotikum rezisztencia értékelésének lehetőségei	27
2.6. A <i>P. aeruginosa</i> baktériumfaj bemutatása	28
2.6.1. Általános jellemzés	28
2.6.1.1. Morfológia	29
2.6.1.2. Jellemző tulajdonságai	29
2.6.2. A <i>P. aeruginosa</i> a környezetben	30
2.6.3. A <i>P. aeruginosa</i> , mint kórokozó	32
2.6.3.1. A <i>P. aeruginosa</i> virulenciája	33
2.6.3.2. A <i>P. aeruginosa</i> antibiotikum rezisztenciája	35
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	39
3.1. Mintavétel	39
3.1.1. Mintavétel szénhidrogénnel szennyezett közegből	39
3.1.2. Mintavétel komposztból, komposztálási nyersanyagokból, illetve komposzttal kezelt talajból	40
3.2. A <i>P. aeruginosa</i> faj izolálása és identifikálása	41
3.2.1. A <i>P. aeruginosa</i> faj izolálása és azonosítása a vonatkozó Magyar Szabvány alapján	41
3.2.1.1. Aszparaginos dúsítás	41
3.2.1.2. Cetrimid-agar	41
3.2.1.3. Acetamid tápoldat	42
3.2.2. A <i>P. aeruginosa</i> törzsfenntartása	42
3.2.3. A <i>P. aeruginosa</i> faj szintű identifikációja molekuláris genetikai módszerrel	42
3.2.3.1. Teljes DNS izolálás tiszta tenyészetből	42
3.2.3.2. 16S rDNS fajspecifikus génszakaszának kimutatása PCR reakcióval	42
3.3. Fenotípusos vizsgálatok	43
3.4. Virulencia faktorok vizsgálata	44
3.4.1. Hemolitikus aktivitás vizsgálata	44
3.4.2. Exotoxinok és exoenzimek termeléséért felelős génszakaszok kimutatása	45

3.5. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok	46
3.5.1. Korongdiffúziós vizsgálatok.....	47
3.5.2. Minimális Gátló Koncentrációk meghatározása.....	47
3.5.3. Az antibiotikum rezisztencia hátterének felderítésére irányuló vizsgálatok.....	48
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	51
4.1. A <i>P. aeruginosa</i> környezeti gyakorisága, jellemző élősejt-száma	51
4.1.1. A <i>P. aeruginosa</i> kimutatási gyakorisága szénhidrogénnel szennyezett kárhelyeken.....	51
4.1.2. A <i>P. aeruginosa</i> kimutathatósági gyakorisága a komposztálás folyamata során.....	55
4.1.3. A szénhidrogénnel szennyezett területekről és komposztokból származó mért <i>P. aeruginosa</i> sejtszámok környezetegészségügyi értékelése.....	58
4.2. Törzsgyűjtemény kialakítása	59
4.3. Fenotípusos vizsgálatok	59
4.4. Virulencia faktorok vizsgálata szénhidrogénnel szennyezett területekről származó izolátumok esetében	60
4.4.1. Hemolízis vizsgálatok.....	60
4.4.2. Exotoxinokat és exoenzimeket kódoló génszakaszok vizsgálatának eredményei.....	63
4.4.2.1. A szénhidrogénnel szennyezett környezeti mintákból származó <i>P. aeruginosa</i> törzsek exoenzim/exotoxin kódoló gén-gyakorisága.....	64
4.4.2.2. A komposztból származó <i>P. aeruginosa</i> törzsek exoenzim/exotoxin kódoló gén gyakorisága.....	64
4.4.2.3. A környezeti törzsek exotoxin/exoenzim kódoló gén-gyakoriságának összevetése klinikai eredménnyel.....	64
4.5. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei	67
4.5.1. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok korongdiffúziós teszttel.....	67
4.5.2. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok E-teszttel.....	68
4.5.2.1. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei a szénhidrogénnel szennyezett területekről izolált törzsek esetében E-teszt módszerrel.....	69
4.5.2.2. Antibiotikum rezisztencia eredmények a komposzt eredetű törzsek esetében E-teszt módszerrel....	73
4.6. Az antibiotikum rezisztencia eredmények összevetése a klinikumban tapasztaltakkal	75
4.7. A környezeti antibiotikum rezisztencia háttere	76
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	77
6. ÖSSZEFOGLALÁS	81
7. ENGLISH SUMMARY	85
1. SZ. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK	89
2. SZ. MELLÉKLET	101
3. SZ. MELLÉKLET	103
4. SZ. MELLÉKLET	105
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	107

1. BEVEZETÉS

Napjainkban az élet szinte minden területén lendületet nyert a mikroorganizmusok biotechnológiai (ipari, mezőgazdasági, egészségügyi, környezetvédelmi) célokra történő felhasználása. A környezetipari biotechnológia terén kiemelt jelentőséggel bírnak a biológiai, másnéven **bioremediációs eljárások**, melyek segítségével többnyire hatékony, környezetbarát és költségtakarékos módon állíthatjuk helyre a szennyezett környezeti elem eredeti, vagy azt megközelítő állapotát. Az alkalmazható mikroszervezetek körének dinamikus bővülésével azonban egyre inkább megfogalmazódik az az igény, hogy a tudatos emberi beavatkozásokban felhasználandó mikroorganizmusok ne vessenek fel humán-egészségügyi, vagy környezetbiztonsági aggályokat. Ennek ellenére a nemzetközi gyakorlatban még mindig találunk példát faj szinten identifikálatlan, a kémiai, illetve a biológiai biztonságot veszélyeztető mikroszervezetek biotechnológiai célú felhasználására. A tudatos emberi beavatkozással, bioaugmentációs eljárások keretében alkalmazott mikroorganizmusok mellett további gondot jelentenek a szennyezett területen spontán módon megjelenő, gyakran humán-, állat-, illetve növény-patogén mikroszervezetek, melyek adott szennyezőanyaghoz adaptálódva akár a fertőzési, megbetegítési kockázat szintjét elérő sejtszámban is kimutathatóak.

A mikroorganizmusok jelentősége a potenciálisan környezetszennyező, ám megfelelő kezelést követően kiváló talajerő utánpótlásként alkalmazható szennyvíziszapok, állattartásból származó trágya, hígtrágya, számos növényi maradvány, ill. napjainkban a biogázüzemi és hőerőművi melléktermékek biotranszformációjában lehet kiemelkedő. E mezőgazdasági- környezeti interdiszciplina esetében a **komposztálás** tekinthető kulcsfolyamatnak, mely eljárás esetében - a bioremediációs módszerekhez hasonlóan - az alkalmazandó mikroorganizmusok határozzák meg a folyamat eredményességét, ill. környezetbiztonságát.

A biotechnológiai eljárások során felhasználásra kerülő mikroszervezetek lehetséges biológiai veszélyeiről jelenleg elsősorban az adott nemzetség, illetve faj közvetlen humán- és állategészségügyi megítélése alapján tájékozódunk. Számos mikrobiális faktor hordoz ugyanakkor jelentőséget a kolonizáció, illetve az infekció létrejöttében, kezelhetőségében, kimenetelében. E szempontok (antibiotikum rezisztencia, ill. virulencia) vizsgálatára a klinikai infektológia széles eszköztárral bír, melyek végrehajtására a környezeti mintákból izolált baktériumtörzsek esetében azonban alig találunk példát.

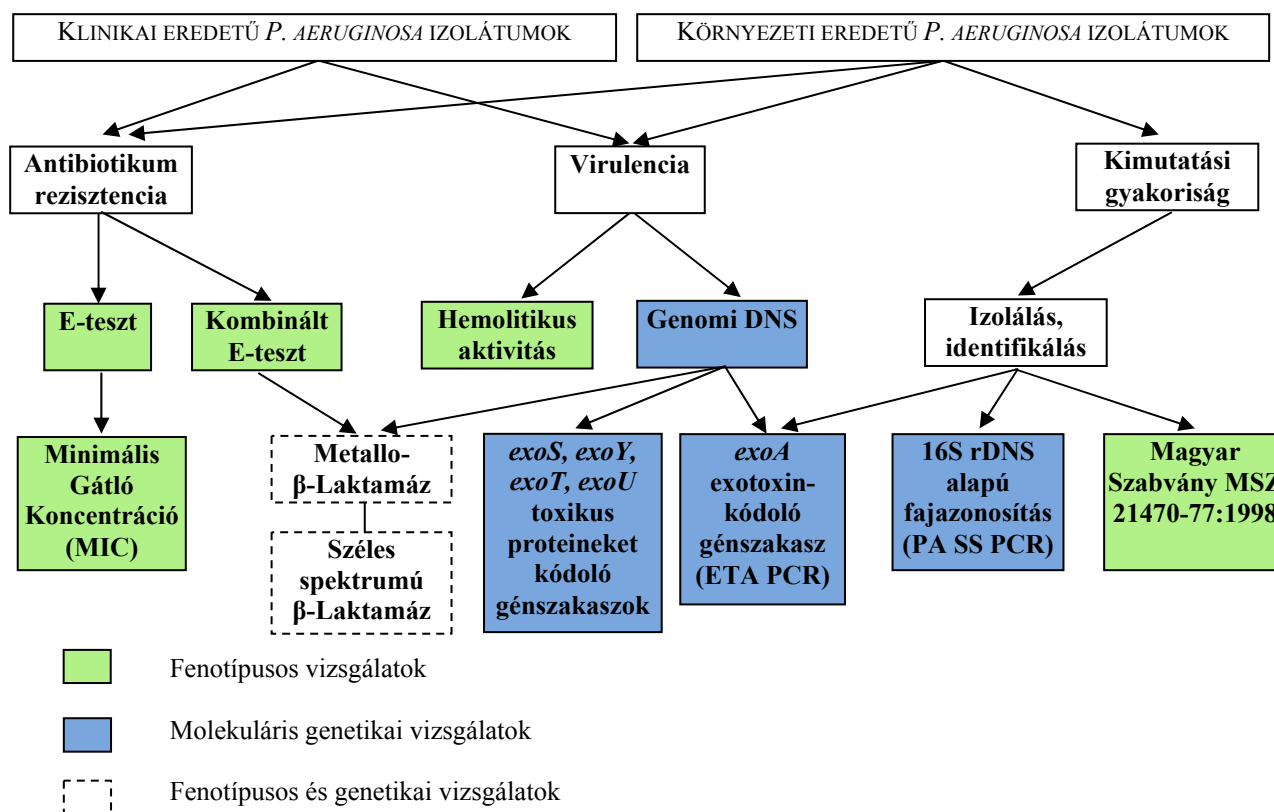
A *Pseudomonas aeruginosa* baktériumfaj a kettős megítélés tipikus példája: klinikai viszonylatban az egyik legjelentősebb fakultatív patogén kórokozó, mely a súlyos kimenetellel járó nozokomiális infekciók jelentős hányadáért felelős. Környezeti vonatkozásait tekintve azonban

humán-egészségügyi kockázatát jellemző módon alábecsülik, és számos esetben igyekeznek törzseit a környezetvédelmi beavatkozások szolgálatába állítani.

Doktori kutatási témámban e kérdéskör vizsgálatán belül **négy célkitűzést** fogalmaztunk meg:

- A *P. aeruginosa* kimutatási gyakoriságának, jellemző sejtszámának megállapítása környezeti, de közvetlen antropogén hatásnak kitett közegekben, mint:
 - szénhidrogénnel szennyezett kárhelyek,
 - hőerőművi és biogázüzemi melléktermékek és az ezekből készített komposztok.
- Virulencia vizsgálatok végrehajtása molekuláris genetikai és hagyományos mikrobiológiai módszerekkel a környezeti mintákból származó baktériumtörzsek megbetegítő képességére utaló tulajdonságok laboratóriumi igazolására,
- Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok végrehajtása a környezeti eredetű izolátumok rezisztencia profiljának megállapítására,
- A környezeti izolátumok antibiotikum rezisztenciájára és virulenciájára irányuló vizsgálatok eredményeinek összevetése a klinikai izolátumok esetében tapasztalt adatokkal.

Célkitűzéseim megvalósításának folyamatát és módszereit foglalja össze az 1.1. sz. ábra.



1.1. sz. ábra: A *P. aeruginosa* baktériumfaj környezeti izolátumainak esetében végrehajtott identifikációs, rezisztencia és virulencia vizsgálatok

Az első célkitűzésem megvalósítása érdekében, azaz a *P. aeruginosa* faj kimutatási gyakoriságának megállapításához szükséges volt olyan magyarországi kárhelyek kiválasztására, melyek

- az aktív környezetvédelem tevékenysége alá eső (azaz a kármentesítés valamelyik szakaszában lévő),
- elsősorban szénhidrogénnel szennyezett, területek.

E területek kiválasztása, a megfelelő mintavételi stratégia kialakítása, a mintavételi pontok kijelölése, illetve a minták feldolgozása volt első feladatomban. A munkaszakasz megvalósítására az ország 49 különböző, szénhidrogénnel szennyezett kárhelyén nyílt lehetőségünk.

A komposzt minták vizsgálata során célszerű volt a **komposztálás folyamatának követhetőségéhez** igazítani a vizsgálandó minták körét. Ennek keretében olyan komposztálási kísérleteket választottunk, melyek esetében

- a komposztálás nyersanyagai hőerőművi, vagy biogázüzemi melléktermékek,
- a nyersanyagok számunkra hozzáférhetőek, *P. aeruginosa* szám meghatározásra vizsgálhatóak,
- a komposztálás teljes folyamata, technológiája végigkövethető.

A további célkitűzéseink megvalósítása érdekében a vizsgálatba vont minták feldolgozásával feladatunk volt olyan **törzsgyűjtemény kialakítása**, mely fenotípusos, tenyésztéses (esetünkben a vonatkozó Magyar Szabvány alapján végzett) identifikáció mellett molekuláris biológiai módszerrel (16S rDNS alapú PA-SS PCR) is azonosított, ismert faji hovatartozású *P. aeruginosa* törzsekből áll. E törzsgyűjtemény kialakításával számos további lehetőség kínálkozott a tudomány valamint az egészségügyi, környezetvédelmi gyakorlat számára egyaránt jelentős eredmények eléréséhez.

A második célkitűzésben meghatározott **patogenitási vizsgálatok végrehajtását** indokolta, hogy a környezetvédelmi gyakorlat számos esetben elhanyagolható biológiai veszélyt tulajdonít a környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzseknek és ennek megfelelően kezeli azokat. Ezért munkánk során célul tűztük ki a **virulenciát meghatározó fenotípusos és genotípusos tulajdonságok** környezeti törzsek között tapasztalható gyakoriságának vizsgálatát. Ennek megvalósításához egyrészt a **hemolitikus aktivitás megállapítását** célzó tenyésztéses vizsgálatokat, mint közvetlen virulencia faktort, másrészt a patogenezisben kiemelten fontos, az infekció súlyosságát és lefolyását döntő mértékben meghatározó **virulencia gének kimutatását** választottuk munkamódszerül. A virulenciáért felelős legfontosabb exotoxinok és exoenzimek (ExoA, ExoU, ExoT, ExoY, ExoS) termeléséért felelős génszakaszok környezeti gyakoriságát klinikai vizsgálatok eredményeivel kívántuk összehasonlítani.

A harmadik célkitűzésünkben megfogalmazott **antibiotikum rezisztencia vizsgálatok** végrehajtását az indokolta, hogy nem klinikai eredetű *P. aeruginosa* izolátumok esetében csupán elenyésző adat állt rendelkezésre e témakörben. E hiány pótlása érdekében nemzetközileg elfogadott, szabványosított módszerek alapján antibiotikum rezisztencia vizsgálatok végrehajtását terveztük, melynek végrehajtását két fő szakaszra osztottuk:

- Előzetes rezisztencia vizsgálatok. 31 antibiotikum hatóanyagot felölelő, átfogó vizsgálatsorozat végrehajtása szemikvantitív korongdiffúziós teszttel.
- Kvantitatív vizsgálatok. Számszerű, Minimális Gátló Koncentráció (MIC) értékek megállapítása a korongdiffúziós tesztek alapján kiválasztott 10 legfontosabb, a klinikai gyakorlat számára is jelentős hatóanyagra vonatkozóan.

A folyamat eredményeképp olyan **kvantitatív eredményekre számíthatunk a klinikum által hatékonynak tekintett antibiotikumok esetében mutatkozó környezeti rezisztenciáról**, mely értékek így a klinikai környezetben tapasztalt antibiotikum-rezisztenciával összehasonlíthatóvá válhattak.

A kitűzött célok megvalósítása esetén azt feltételeztük, hogy minden korábbinál részletesebb és átfogóbb képet kaphatunk a *P. aeruginosa* baktériumfaj **humán-egészségügyi kockázatairól antropogén hatás alatt álló közegekben**, valamint a negyedik célkitűzésben tervezett módon a klinikai körülmények között tapasztalt értékekkel összehasonlítható eredményhalmazzal nyerhetünk.

A doktori értekezésben bemutatott eredmények és tézisek saját laboratóriumi vizsgálatokon és méréseken alapulnak, az eredmények összevetéséhez pedig az összegyűjtött és értékelt, hivatkozott klinikai szakirodalom szolgált alapul.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK A KÖRNYEZETVÉDELEMBEN ÉS AZ AGRÁRIUMBAN

Az EFB (= Európai Biotechnológiai Egyesület) definíciója szerint a **biotechnológia** a biokémia, mikrobiológia és mérnöki tudományok integrált alkalmazása azért, hogy a mikroorganizmusok, állati-, növényi sejtenyészetek, vagy részeik képességét használni tudjuk az iparban, mezőgazdaságban, egészségügyben, és a környezetvédelemben (EFB, 1981). Az OECD (Szervezet a Gazdasági Együttműködésért és Fejlesztésért) meghatározása alapján biotechnológiának nevezzük a tudományos és mérnöki alapelvek alkalmazását az élő és élettelen anyagok biológiai ágensekkel történő „megmunkálására” termék nyerése, tudás fejlesztése, illetve szolgáltatása nyújtása céljából (OECD, 2001).

A biotechnológiai eljárásoknak alapvetően négy ágát különböztetjük meg (RICHMOND, 2008):

„Kék” biotechnológia: tengeri és vízi szervezeteket felhasználó, ill. ott zajló folyamatok,

„Zöld” biotechnológia: mezőgazdasági és környezeti alkalmazások,

„Piros” biotechnológia: gyógyászati, ill. gyógyszerészeti eljárások,

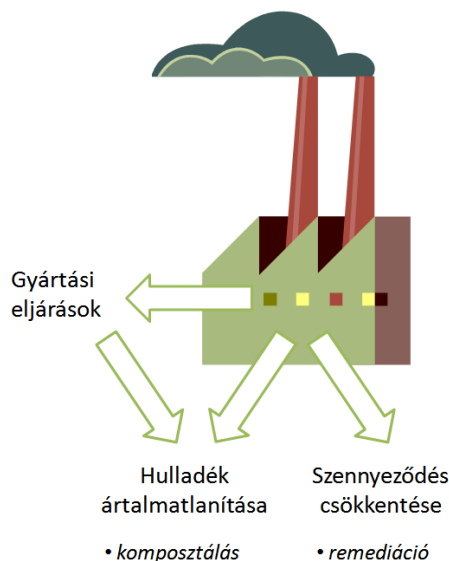
„Fehér”, vagy „szürke” biotechnológia: ipari folyamatok.

Intenzív fejlődés figyelhető meg az említett területek mindegyikén, mely az elmúlt időszakban számos alkalmazás és termék előállításához, fejlesztéséhez vezetett, így mind növekvő társadalmi hasznot hajt. E tudományterületen belül napjainkban egyre nagyobb figyelem övezi a **környezeti (zöld) biotechnológiát**, melytől a világ egyre növekvő népességének elegendő mennyiségű és biztonságos élelmiszerrel történő ellátását, továbbá a környezeti elemek jó állapotának fenntartását, helyreállítását remélik (WACKETT, 2000).

2.2. KÖRNYEZETI BIOTECHNOLÓGIA

A környezeti biotechnológiai eljárások a mezőgazdasági célok megvalósítása mellett alapvetően a **hulladékkezelést** hivatottak szolgálni, melybe a korábbi tevékenységek által okozott szennyezettség **remediációja**, a jelenlegi tevékenységek káros hatásainak mérséklése, illetve a szilárd, folyékony, gáz halmazállapotú veszélyes anyagok kibocsátásának minimalizálása is beleértendő. A zöld biotechnológia célja tehát az ipari és mezőgazdasági termékek környezetbarát előállításának megalapozása (EVANS AND FURLONG, 2003). A megvalósítás módszere alapvetően kettős: a környezeti biotechnológus feladata, hogy optimalizálja, hatékonyabbá és gyorsabbá tegye a már létező biológiai rendszerek működését, illetve hogy a kívánt eredmény elérése érdekében a biotechnológia eszköztárát igénybe véve beavatkozzon a folyamatokba. A jellemző beavatkozási

pontokat, illetve a disszertációm szempontjából kiemelkedő fontossággal bíró lehetséges eszközöket szemlélteti a 2.1. sz. ábra.



2.1. sz. ábra: A környezeti biotechnológia beavatkozási pontjai és lehetséges eszközei
(EVANS AND FURLONG, 2003 nyomán)

A **környezeti biotechnológia fejlesztése** tekintetében alapvetően négy nagy kutatási irányt különíthetünk el (KJELLEBERG, 2002):

1. Molekuláris alapon nyugvó eszközök fejlesztése és alkalmazása a mikrobiális közösségek szerkezetének és funkciójának felderítésére;
2. Mikroba-konzorciumok és biofilm – mely terület azon a felismerésen alapul, miszerint a mikroorganizmusok biofilmet képezve, illetve populációkba tömörülve működnek környezetünkben. E folyamatok megfigyelésével és megértésével a biotechnológiai eszközök körét bővíthetjük;
3. A mikrobiális sejtek közötti, illetve a mikrobák magasabb rendű szervezetek felé irányuló kommunikációs rendszerének vizsgálata (quorum sensing, ill. kémiai úton befolyásolt kapcsolatok);
4. A biotechnológiai megoldások, ill. azok **ökoszisztémára gyakorolt hatását** vizsgáló elméleti és gyakorlati területész.

A biotechnológiai eljárások a beavatkozási pontok ismeretében, a rendelkezésre álló molekuláris genetikai és hagyományos biológiai eszköztárak folyamatos fejlesztésével mind hatékonyabb, eredményesebb és biztonságosabb megoldást jelenthetnek napjaink környezetvédelmi problémáira. A továbbiakban a legnagyobb kihívást jelentő témakörök közül a szénhidrogénnel szennyezett területek problematikáját, illetve a változatos alapanyagok kezelésére szolgáló komposztálás módszereit ismertetném.

2.2.1. A szénhidrogén-szennyezések felszámolásának biotechnológiai módszerei

Magyarországon az Országos Környezeti Kármentesítési Program adatbázisa szerint a szennyező források, illetve a szennyezett területek száma több, mint 15.000 (OKKP-KÁRINFO, 2005). E szennyezések jelentős hányadát szénhidrogén-származékok okozzák. Az elmúlt évtizedben ugrásszerűen megnőtt a feltárt káresetek száma; a privatizációs folyamatok megindulásával egyre több területről derül ki, hogy szénhidrogénnel szennyezett. Ezek a kárhelyek sokszor élővizek, ivóvízbázisok közelében helyezkednek el, így közvetlenül veszélyeztetik az emberi egészséget. A 6/2009 (IV.14.) KvVM-EÜM-FVM EGYÜTTES RENDELET értelmezésében a környezeti kockázattal jellemezhető szénhidrogének közé az alábbi főbb vegyületcsoportok tartoznak:

- Alifás szénhidrogének C₅-C₄₀ (TPH)
- Benzol és alkilbenzolok (BTEX)
- Fenolok
- Policiklikus aromás szénhidrogének (PAH)
- Halogénezett aromás szénhidrogének
- Halogénezett alifás szénhidrogének
- Klórfenolok
- Poliklórozott-bifenilek (PCB)
- Poliklórozott-dibenzo-dioxinok és dibenzo-furánok (PCDD/F)
- Egyes növényvédő szerek

Illetve 2010. december 22-i hatállyal határérték lép életbe az alábbi vegyületekre vonatkozóan:

- Polibrómozott-bifenilek és polibrómozott bifenil-éterek
- C10-C13 klóralkánok
- Ftalátok
- Nonil- és Oktil-fenolok
- Szerves ón vegyületek
- Egyéb vegyületek

Mivel a kőolajat és származékait egyelőre nem zárhatjuk ki energiahordozóink köréből, elsősorban a kitermelés, szállítás, feldolgozás és a felhasználás biztonsági feltételeit kell javítani. Ennek elérésében már történtek kedvező lépések a kőolajipar és a feldolgozók részéről. Azonban a már bekövetkezett szennyezések felszámolása is létfontosságú, hiszen a talajba, talajvízbe került kőolajszármazékok toxikus, karcinogén, teratogén, mutagén, endokrin rendszert zavaró komponenseket tartalmaznak, hosszú évekre terhelve, szennyezve a természetet.

A szénhidrogén-szennyezések megszüntetésére számos technológiát dolgoztak ki és használnak napjainkban, amelyeket az alkalmazott eljárások alapján a következő csoportokba oszthatunk (ANTON ÉS SIMON, 1999; PUZDER ET AL., 2001):

- **Termikus eljárások**, amelyek hőkezeléseket alkalmaznak, elégetve, vagy vegyi elbontással (pirolízis) a szennyező szénhidrogéneket égetőműben, forgó csökemencében,
- **Fizikai eljárások**, mint például vákuum-extrakció, hideg- és meleglevegős-, illetve gőzsztrippelés,
- **Fizikai-kémiai eljárások**, mint például oldószeres extrakció, hideg vagy melegvízes mosás detergens alkalmazásával, vagy anélkül,
- **Biológiai (biodegradációs) eljárások**, amelyek bizonyos mikroszervezetek azon tulajdonságát használják fel, hogy képesek speciális enzimrendszerük segítségével a szénhidrogéneket sejtépítő folyamataikban szén- és energiaforrásként hasznosítani.

2.2.2. Biodegradációs eljárások

A szénhidrogének nem ismeretlenek a bioszféra tagjai számára, hiszen a mikroorganizmusok a kőolajra jellemző bonyolult vegyületek degradációjában már a prekambrium óta közreműködnek (SZABÓ, 1989). A talajok biológiai közösségei rendkívül rugalmas adaptációs rendszert képeznek a kémiai szerkezetek hatástalanítására, így a szennyező kemikáliák környezetbe kerülésekor új gének evolúciója indul meg, melyek lehetővé teszik az új szerkezetek megbontására képes enzimek termelését (SZABÓ, 2008). Elmondható ugyanakkor, hogy a kőolaj típusú szervesanyagok geológiai léptékű időszakok óta nem vesznek részt a természetes szén körforgalmában, így környezetbe kerülésük esetén természetes úton történő degradációjuk igen lassú és rossz hatásfokú lehet (FARKAS, 1998). A szénhidrogén-szennyezések mikrobiológiai megszüntetése, mint környezetkímélő, hatékony és költségtakarékos biotechnológiai módszer az utóbbi évtizedekben került előtérbe. Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (U. S. EPA – Environmental Protection Agency) például minden olyan esetben, amelyben csak lehetséges, a biológiai módszerek alkalmazását részesíti előnyben az egyéb, már említett technikákkal (termikus, kémiai stb.) szemben (U. S. EPA, 1994A, U. S. EPA, 1995).

A **biodegradáció** kifejezés tágabb értelemben magában foglalja a mikroszervezetek által végzett, biológiai-biokémiai folyamatok sorozatán keresztül megvalósuló lebontási (katabolitikus), illetve átalakítási (transzformációs) folyamatok összességét (SZOBOSZLAY, 2003).

Bioremediáció alatt azokat a gyakorlatban kivitelezett, felhasznált biodegradációs folyamatokat foglalják össze, amelyek segítségével a földtani közegbe, illetve a felszín alatti vizekbe, üledékekbe került, közegészségügyi szempontból veszélyt jelentő, környezetszennyező anyagokat eltávolítják, vagy méregtelenítik, detoxikálják (CRAWFORD AND CRAWFORD, 1998).

A biodegradációs eljárások a folyamat eredményessége alapján két alapvető típusba sorolhatóak, melyek a következők:

- **Teljes biodegradáció (mineralizáció):** a kiindulási szerves vegyületek enzimkatalizált reakciók sorozatán keresztül szén-dioxidra és vízre oxidálódnak biomassza keletkezése mellett.
- **Részleges biodegradáció,** melynek további három típusát különböztetjük meg:
 - A lebontást végző enzimek valamelyike hiányzik, így a folyamat megreked valamilyen közti terméknel; a képződött energiát a mikroszervezet hasznosítja.
 - A kiindulási vegyület részlegesen módosul, lebomlik, de a mikroszervezet a képződött energiát nem használja fel (kometabolizmus).
 - Polimerizáció, vagy más szintézis során a kiindulási anyagoknál összetettebb és/vagy stabilabb vegyületek keletkeznek.

Abban az esetben, ha a szénhidrogén lebontás feltételeit célzott emberi beavatkozással felgyorsítjuk, **stimulált (irányított) biodegradációról** beszélünk.

A biológiai módszereket, **a mikroszervezetek felhasználási módja szerint** is csoportosíthatjuk; e szempont alapján három alapvető kategóriát különböztetünk meg (SZOBOSZLAY ET AL., 2002A):

1. Támogatott spontán biodegradáció: A szennyezett talajban lévő szénhidrogénbontó mikroszervezetek képesek spontán biodegradációra, azaz a szennyezéshez adaptálódva annak lassú és általában rossz hatásfokú lebontására.

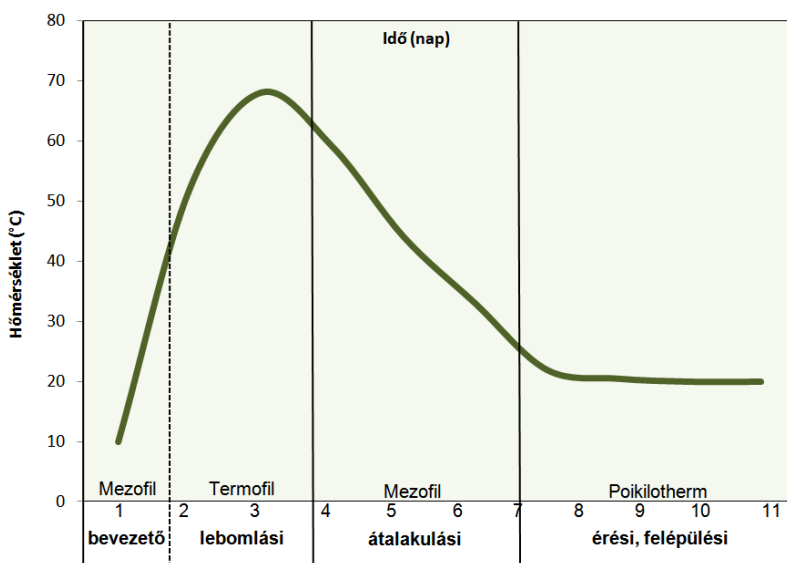
Ha a kárhelyen meglévő szénhidrogénbontó mikroorganizmusok számát tápanyag-kiegészítéssel és intenzív levegőztetéssel megnövelik, akkor támogatott spontán biodegradációról beszélünk. A módszer előnye viszonylagos olcsósága. Hátránya viszont, hogy nincs garancia arra, hogy ezek a mikrobák képesek a kőolajban található valamennyi vegyületcsoport lebontására, s így viszonylagosan megnőhet egyes nehezen degradálható (magasabb szénatomszámú) vagy toxikus (például poliaromás) komponensek koncentrációja. Emellett az is előfordulhat, hogy az emberi egészségre ártalmas, betegség kiváltására alkalmas (patogén) mikroszervezetek veszélyes mértékben felszaporodnak.

2. Ösztönös talajoltás: A talajból izolált ismeretlen faji összetételű, feltételezhetően szénhidrogénbontó mikroba populációt bioreaktorban felszaporítják és tápanyag-kiegészítés, valamint intenzív levegőztetés mellett visszajuttatják a talajba. Ezt a folyamatot talajoltásnak, más néven inokulálásnak nevezzük. A módszer előnye az igen gyors és nagymértékű olajlebomlás, hátránya viszont a kiszámíthatatlan közegészségügyi kockázat. Ennek oka az, hogy a talaj szénhidrogén bontó mikroszervezeteinek jelentős hányada, - egyes vizsgálatok szerint mintegy 20-70%-a - patogén illetve fakultatív patogén, így elszaporításuk és a talajba történő visszajuttatásuk környezetvédelmi és közegészségügyi szempontból elfogadhatatlan.

3. Tudatos talajoltás (bioaugmentáció): Faj szinten identifikált, közegészségügyi szempontból aggályt nem keltő, ismert szénhidrogén-bontási spektrummal rendelkező mikroorganizmusokat bioreaktorban felszaporítanak, majd a szennyezett talajba juttatják, tápanyag-kiegészítés és levegőztetés mellett. Az eljárás előnye egyrészt az, hogy a felhasznált mikrobák minimális kockázatot jelentenek az előállítókra, a felhasználókra és a környezetre nézve. Másrészt a szennyező szénhidrogén spektrumához és a kárhely talajtani adottságaihoz adaptálható oltóanyag állítható elő és használható fel, ami a legtöbb esetben garantálja a kívánt mértékű lebomlást. A módszer hátrányaként a magasabb fejlesztési és oltóanyag-előállítási költség említhető.

2.2.3. A komposztálás

A komposztálás olyan aerob eljárás, melynek során mikroszervezetek által végzett szervesanyag-lebontás révén termogenezis zajlik, szerves és szervetlen anyagok keletkezése mellett. A metabolikus úton fejlesztett hő a komposzt mátrixon belül csapdázódik, mely a komposzt halom jellegzetes hőmérséklet emelkedéséhez vezet (WILLIAMS ET AL., 1992). FOGARTY ÉS TUOVINEN (1991) a komposztálás folyamatában négy jellegzetes, hőmérséklethez kötött mikrobiológiai szakaszt különített el: a mezofil, termofil, lehülési és érési stádiumot. Más szerzők leírása alapján az alábbi fázisok különíthetők el (ALEXA ÉS DÉR, 2001): bevezető, lebomlási, átalakulási, érési/felépülési stádium (2.2. sz. ábra).



2.2. sz. ábra: A komposztálás szakaszai
(ALEXA ÉS DÉR, 2001 nyomán)

érési/felépülési stádium (2.2. sz. ábra).

Az egyes fázisok hőmérséklet-változása szoros összefüggésben van a mikrobiális közösség átalakulásával. A mezofil mikroorganizmusok kezdeti respirációs aktivitásának növekedése hőmérséklet-emelkedéshez vezet, mely később számuk csökkenését eredményezi.

Ezzel egyidejűleg a termofil mikroorganizmusok számában

intenzív növekedés veszi kezdetét. A 45-65°C közötti hőmérséklettel jellemezhető termofil szakasz során zajlik a lebomlás és a biomassza képződés; a hőmérsékleti maximum elérésekor úgynevezett plató alakul ki, amely több napig vagy akár néhány hétig is eltarthat és hozzájárul a közegészségügyileg kifogástalan, jó minőségű komposzt termék eléréséhez (BENEDEK, 1990, GERARDI AND ZIMMERMAN, 2005).

E szakaszban a könnyen hozzáférhető szerves szénforrások csökkenésével a mikrobiológiai aktivitás csökken. A mikroorganizmusok elkezdik a nehezen hozzáférhető lignin bontását, melyből később a humuszanyagok épülnek fel. Az utolsó, érési/felépülési szakasz során a komposzt hőmérsékletének további csökkenése észlelhető, illetve ekkor zajlik a mono-, di-, és triklór-fenol vegyületek kondenzációja, azaz a humuszképződés. Az érésben elsősorban pszichrofil baktériumok, ill. penészgombák játszanak szerepet (STROM, 1985).

Néhány évtizeddel ezelőtt a biotechnológia és ezen belül a komposztálási eljárások köre közel állt ahhoz, hogy elveszítse szerepét a szilárd halmazállapotú hulladékok kezelésében. Az aerob komposztálási folyamatok alkalmazása során szembesülni kellett a nem, vagy nehezen biodegradálható hulladékok egyre nagyobb arányú megjelenésével, mely rossz minőségű végterméket eredményezett. Az elmúlt években azonban a biotechnológiai eljárások új lendületet nyertek és eszköztáruk bővülésével mind nagyobb szerepet játszanak az ipari és mezőgazdasági melléktermékek kezelésében, melynek révén a komposztálás is reneszánszát éli (Grommen & Verstraete, 2002). A komposztálási technológiák szennyezőanyaghoz, hulladékokhoz történő szakszerű adaptációja révén ma már ismeretekkel bírunk a kőolaj-típusú szénhidrogének, monoaromás szénhidrogének, robbanóanyagok, úgymint a 2,4,6-trinitrotoluol (TNT), klórfenolok, peszticidek (pl. 2,4-diklór-fenoxiecetsav) és a policiklusos aromás szénhidrogének komposztálhatóságát illetően. **Nagy érdeklődésre tart továbbá számot a komposztálás, mint az energiatermelést célzó eljárások (hőerőművek, biogáz-termelő üzemek stb.) során keletkező melléktermékek kezelésének lehetséges alternatívája.**

A komposztálás, mint biodegradációs/bioremediációs eljárás számos technológiai úton megvalósítható. Az in situ - on site módszerek mellett a szerves hulladékok, szennyezett földtani közeg, szennyvíz/szennyvíziszap, ill. ipari melléktermék komposztálása alapvetően nyitott és zárt rendszerben képzelhető el, melyek kivitelezésüktől függően eltérő minőségű/higiénizációs fokú végterméket, ill. intenzitást garantálnak, valamint beruházási és üzemeltetési költségvonzatuk is más. Világszerte több, mint 50 különböző komposztálási technológia van alkalmazásban (EPSTEIN, 2001). Az európai országok (elsősorban Ausztria és Németország) által elfogadott osztályozási rendszer az alábbi főbb csoportokat különíti el (ALEXA ÉS DÉR, 2001):

Minimális beavatkozás – passzív rendszerek: passzív levegőztetésű komposzt halmok, melyekben általában körülbelül egy év alatt készül el a zömében növényi eredetű komposzt.

Forgatásos prizmakomposztálás: a hőmérsékleti és egyéb paraméterek folyamatos ellenőrzése mellett a prizmak többszöri forgatáson esnek át, melynek következtében 7-9 hét leforgása alatt érett komposztot nyerhetünk.

Levegőztetéses komposztálás: a prizmakomposztáláshoz hasonló eljárás, mely 6-8 hét alatt eredményez végterméket.

Levegőtetéses-prizmakomposztálással kombinálva: levegőtetéssel és rendszeres átforgatással 4-6 hét alatt zajlik le a technológiai folyamat.

Zárt térben történő komposztálás: 2-4 hét alatt keletkezik friss komposzt, melyet ezután az utóérlelési szakaszba helyeznek.

Az áttekintett biotechnológiai és ezen belül a bioremediációs, ill. komposztálási eljárások alkalmazása során kutatási témám tükrében céloim elsősorban az említett eljárások lehetséges környezetbiztonsági veszélyforrásainak megismerése volt. A kockázatok áttekintéséhez azonban elengedhetetlen az alapvető környezetbiztonsági fogalmak definiálása, melyre a további alfejezetekben kerül sor.

2.3. A KÖRNYEZETBIZTONSÁG FOGALMA

Napjainkban egyre többször hangzik el a környezetbiztonság fogalma, mely az Európai Közösség által elfogadott definíció szerint *"az Európai Közösség azon képességét jelenti, hogy a környezeti erőforrások szűkössége és a környezeti károsodás elkerülésével képes fejlődését biztosítani."* (FÖLDI ÉS HALÁSZ, 2009).

Egy másik definíció szerint: *"A környezetbiztonság a mindenkori környezetvédelem adott állapota, annak egyes elemei vonatkozásában külön-külön és együttvéve. A Föld, a vizek, a levegő, a természetes és mesterséges környezetnek az emberekre, a társadalomra, az egész érintett élő- és élettelen világra, valamennyi értékre gyakorolt negatív hatással szembeni védettségnek a mértékében"* (NAGY, 2001).

A környezetbiztonság hazai jelentőségét jelzi, hogy a NEMZETI KÖRNYEZETVÉDELMI PROGRAM (2003-2009.) Környezetbiztonság Akcióprogramja, valamint a Nemzeti Fejlesztési Terv Helyzetértékelési Fázisához készülő Környezet- és Természetvédelmi Fejezet (Egyeztetési anyag Budapest, 2001. március 31.) külön foglalkozik a témával és az alábbi három részterületet határozza meg:

- Környezeti kockázatok figyelembe vételének kiterjesztése a gazdálkodás szintjeire
- A múltban bekövetkezett károk környezeti hatásainak elemzése és felszámolása
- Környezeti katasztrófa helyzetek és veszélyek azonosítása

Más szerző csoportosítása szerint a környezetbiztonság témakörén belül két nagy egység különíthető el (LÁNG, 2003):

- A természet saját törvényszerűségeiből következő események, mint például az árvizek, a földrengések, az erdőtüzek, a tájfunok, a szökőárak,
- Az úgynevezett civilizációs problémák, amelyeket az emberi tevékenység okoz. A civilizációs környezeti problémák eredetük szerint további három szektorra bonthatók: gazdasági, szállítási és társadalmi szektorokra.

A definíciók sokféleségéből látható, hogy e fogalom tartalmában még nem alakult ki egységes álláspont. Az eddig megjelent publikációk többsége szerint a környezetbiztonság a környezeti veszélyforrások, a katasztrófák, és az ezek ellen való védekezés lehetőségeivel foglalkozik, ami magában hordozza a környezetszennyezések, a környezeti károk csökkentését és megelőzését, vagyis a környezet védelmét is. **A környezetbiztonság megítélésének egyik fontos eleme tehát a jól működő környezetvédelem** (LÁNG, 2003).

A környezetbiztonság általános megfogalmazásként a következő definíciót fogadhatjuk el:

*„A környezetbiztonság a **környezeti elemek védettségi állapotának mértékét** fejezi ki az emberi tevékenységek, az ember által működtetett műszaki, technológiai folyamatokkal, rendszerekkel szemben, ugyanakkor azt az állapotot jeleníti meg, amikor a természet, a környezet sem közvetlenül, sem pedig az emberi tevékenységeken keresztül nem veszélyezteti az embert, természetes és mesterséges környezetét”* (SZOBOSZLAY, 2003).

2.3.1. A biotechnológiai folyamatok biológiai biztonsága

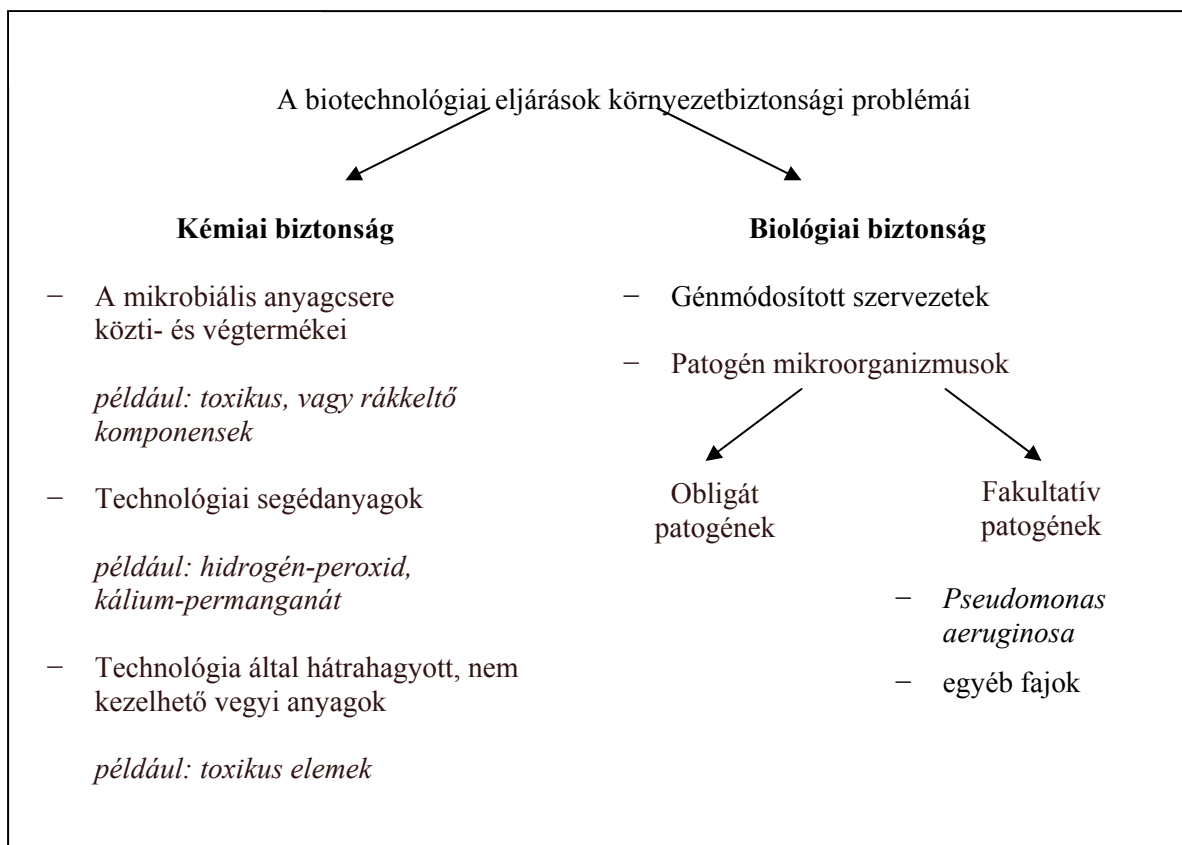
A biotechnológiai módszerek végrehajtásakor számos környezetbiztonsági kétely merülhet fel, melyek megnyugtató rendezése az adott eljárás alkalmazását megelőzően feltétlenül szükséges.

Mivel a biotechnológiai folyamatokat számos esetben élő mikroszervezetek segítségével hajtják végre, ezért **az ilyen technológiák biológiai és kémiai biztonságát elsősorban az alkalmazott mikroba tulajdonságai határozzák meg.**

Az adott tevékenység, ill. beavatkozás lehetséges **környezetbiztonsági veszélyeit** az emberi egészségkockázat meghatározását célzó szempontrendszer szerint értékelhetjük (NÉMETH, 2004):

- Veszélyazonosítás (veszélyforrás, ill. a kiváltott negatív hatás azonosítása)
- Expozíció értékelése (kitettség mértéke)
- Dózis-válasz összefüggés (a kitett populációban mérhető válasz)
- Kockázat azonosítása (a veszély mértékének megállapítása)

A biotechnológiai eljárások során felmerülő lehetséges környezetbiztonsági problémák rendszerét a 2.3. sz. ábra szemlélteti.



2.3. sz. ábra: A biotechnológiai eljárások környezetbiztonsági problémái

A biotechnológiai eljárások **kémiai biztonságának** vizsgálatánál a mikrobiális anyagcsere közti- és végtermékei, a nem degradálható toxikus anyagok, valamint az esetlegesen felhasznált technológiai segédanyagok okozhatnak problémát.

A **biológiai biztonságot** veszélyeztető tényezőnek számít a **patogenitás**, azaz a betegség kiváltásának képessége, mely tulajdonság részletes ismertetésére az alábbi alfejezetben kerül sor.

2.3.1.1. Patogenitás

A patogenitás mindig kórokozó és gazdaszervezet viszonyában értelmezhető; általában patogén mikrobáról nem beszélhetünk. Az American Academy of Microbiology (AAM) álláspontja szerint a humán patogén mikroorganizmusok – genomikai, túlélési, evolúciós szempontból – három nagy csoportba sorolhatóak (BUCKLEY, 2004):

- **Obligát**, vagy **nyilvánvalóan patogének** hagyományos megközelítésben (BÍRÓ ET AL., 2001) azok mikroorganizmusok, melyek nem csupán a legyengült immunrendszerű személyeket, hanem az egészséges szervezetet is képesek megtámadni. Csak a gazdaszervezetükben, vagy ezek sejt- és szövetnyezetében képesek életben maradni, táptalajon nem tenyészthetők. Az AAM véleménye szerint e kórokozók törzsfajlódása egyértelműen a betegség-kiváltó képességük fokozódásának irányába tart, hiszen terjedésük kizárólag gazdaszervezetek közötti átadással történhet.

- **Opportunista patogének**, melyek egészséges szervezetet nem képesek megtámadni, csak olyat, amelyet valamilyen hajlamosító tényező (**prediszpozíció**) különösen érzékennyé tesz. Ilyen prediszpozíció lehet például egy korábbi betegség miatt legyengült immunrendszer, vagy bármilyen gyengültségi állapot, kórelőzmény is (BÍRÓ ET AL., 2001). Táptalajon tenyészthetők és szaprofiton életciklusuk következtében számos esetben a környezetben is megtalálhatóak. Bár fennmaradásuk, túlélésük nem kötődik szorosan betegség-kiváltó képességükhöz, ám esetükben evolúciós szempontból ebbe az irányba mutató nyomás érvényesül. E csoportba tartozik az általunk is vizsgált *P. aeruginosa* faj.
- **Alkalomszerűen patogén** mikroszervezetek, melyek az opportunista kórokozókhoz hasonlóan táptalajon tenyészthetők, a természetben általában szaprofiton életciklusuk is van, de betegséget is okoznak arra alkalmas, legyengült immunrendszerű személyekben. Esetükben a betegség kialakítása véletlenszerű és egyedi, a gazdaszervezetről át nem terjednek, evolúciós szempontból patogén tulajdonságuk nem jelent számukra előnyt.

A patogén mikroorganizmusok – a szervezet válaszreakciójától függően – **kolonizációra**, ill. **infekcióra** lehetnek képesek. Kolonizáció esetében az elsősorban a bőrön, vagy nyálkahártyán megtelepedett mikroszervezetek jelenlétének és szaporodásának nincsenek klinikai jelei, tünetei, a válaszreakció hiányzik, vagy minimális. Az infekció azonban rendszerint klinikai tünetekkel jár; tünetek hiányában **aszimptomatikus infekcióról** beszélhetünk.

2.3.1.2. Virulencia

A **virulencia** a patogenitás mennyiségi kifejezésére szolgáló elnevezés, melyet az epidemiológiában a mikroba által keltett betegség morbiditási és letalitási arányaival, ill. a terjedőképesség fokával fejezünk ki (LOSONCZY, 2001). A virulencia adott baktériumfajon belül, egyes törzsek között is eltérő lehet. A törzsek között „vadvirulens”, azaz egy fajon belül a fajra jellemző támadóképesség birtokában levő törzstől az „avirulens”, azaz támadóképességüket teljesen elvesztett baktériumtörzsig minden változat előfordulhat. Szintén kórokozó-mikroba sajátosság az **invazivitás**, ami a mikrobák bizonyos szövetekbe való behatolási képessége. Jelentős tényező lehet, hogy adott mikroorganizmus milyen mennyiségben (sejtszámban) lehet képes betegséget kiváltani, melynek mértékét az **infektív dózis** fejezi ki. **Toxicitásról** akkor beszélünk, ha a mikroba által termelt (általában nagy molekulájú, sokszor fehérje természetű), mérgező hatású anyag (toxin) károsítja a gazdaszervezetet.

Az ismertett tulajdonságok sokféleségéből láthatjuk, hogy adott fajt képviselő törzs virulenciájának, azaz humán-egészségügyi kockázatának kijelentéséhez a faj besorolásának ismerete önmagában nem elegendő. Elengedhetetlen, hogy a patogenitás tényleges kifejeződésének képességét jelző tulajdonságokat, ún. **virulencia faktorokat** is vizsgálat alá vonjunk. Bakteriális

virulencia faktorok néven foglaljuk össze azokat a szerkezeti elemeket, illetve baktériumok által kiválasztott termékeket, melyek lehetővé teszik, hogy a mikroorganizmus valamilyen módon veszélyeztesse a gazdaszervezetet (WINN ET AL., 2006). Virulenciáért felelősek lehetnek felületi faktorok (sejtfalkomponensek, sejtfalban illetve a sejt felületén található egyes poliszacharid- és fehérjeantigének, burokanyagok, fimbriák), endotoxinok, ill. extracelluláris enzimek, exotoxinok (TUBOLY ET AL., 1998). Néhány virulencia faktor sejthez kötött, mások extracelluláris úton fejtik ki hatásukat.

A virulenciáért felelős molekulák extracelluláris térbe irányuló szelektív kiválasztását, transzportját a baktériumsejtek változatos útvonalakon hajthatják végre. A lehetséges szekréciónál utvonalak közötti választást a fehérjék egyedi jellege határozza meg attól függően, hogy milyen funkciót töltenek be a kiválasztás helyszínén (SANDKVIST, 2001). Jelenlegi ismereteink szerint az extracelluláris térbe való kiválasztásnak hat útvonala ismert, az I-VI. típusú szekréciónál rendszerek. Ezek közül a *P. aeruginosa* virulenciájáért felelős exotoxinok, illetve exoenzimek döntően két útvonalat használnak: a II., illetve III. típusú szekréciónál rendszert. A továbbiakban ezek részletesebb ismertetésére térünk ki.

A II. típusú szekréciónál rendszert (T2SS) első ízben a *Klebsiella oxytoca* esetében azonosították, de később számos baktériumfaj, így például a *P. aeruginosa* esetében is kimutatásra került. A kiválasztó apparátus funkciói jelenleg kevésbé ismertek. Toxinok esetében a kiválasztás módja az alábbiak szerint zajlik: egy általános szekréciónál utvonal segítségével (*Sec*-út) a toxin alegységek átjutnak a belső membránon, majd a periplazmatikus térben összeszerelődnek. Végül a több alegységes toxin a számos fehérjéből felépülő II-es típusú szekréciónál rendszer (*Eps-2*) segítségével átjut a külső membránon és megjelenik az extracelluláris térben. A II. típusú kiválasztási utvonal tipikusan olyan mikroorganizmusokra jellemző, amelyek képesek felületi kolonizációra és biofilm képzésre.

A III. típusú szekréciónál rendszer (TTSS) felépítésében homológ a bakteriális flagellummal. Molekuláris „fecskendő”, melynek segítségével egyes fajok (pl. *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas* nemzetség tagjai) képesek közvetlenül a gazdasejtbe juttatni az általuk kiválasztott anyagokat. A folyamat során a baktériumsejt a sejtközötti járatokban a gazdasejtbe tapad. A kórokozó patogenitásért felelős génei aktiválódnak, kiépítik a III. típusú gén-produktum szállítási rendszert. Ezen keresztül juttatja át a baktérium a kiválasztott sejtbe a kórokozásért felelős génterméket, fehérjéket. Az átjuttatott termékek hatására a sejtben fiziológiai változások indulnak meg, a baktériumsejt jelenléte tovább nem szükséges (BURNS ET AL, 2003).

Napjainkban a molekuláris genetikai módszerek térhódításával a kutatások a teljes mikroszervezet vizsgálatáról adott gén, ill. génszakasz elemzésére tértek át: egy virulencia gén egyszerű, PCR alapú

meghatározása elvezethet adott baktériumtörzs patogenitási potenciáljának megállapításához (DE REUSE AND BERESWILL, 2009).

2.3.2. A bioremediációs eljárások környezetbiztonsága

A bioremediációs eljárások **kémiai biztonságának** vizsgálatánál a mikrobiális anyagcsere közti- és végtermékei, valamint a felhasznált technológiai segédanyagok okozhatnak problémát. A **biológiai biztonságot** veszélyeztető tényezőnek számít a betegség kiváltására képes mikroorganizmusok megjelenése, felszaporodása. A szénhidrogén típusú környezetszennyezések által érintett kárhelyek speciális, extrém élőhelyet jelentenek a földtani közeg és a felszín alatti víz mikrobiotáját alkotó mikroszervezetek számára, hiszen a szennyezőanyagok jelenléte a közösség tagjaira szelekciós nyomást fejt ki. Ennek hatására szakirodalmi adatok alapján a kőolaj származékokkal szennyezett kárhelyeken a mikrobiális közösség diverzitása csökken, mellyel egyidejűleg a kimutatható és tenyészhető mikroorganizmusok sejttszáma magasabb, mint a kontrollként vizsgált, nem szennyezett közegben (SAUL et al. 2005). Az adaptációra képes mikroszervezetek tehát a mikrobiális ökoszisztémában képesek lehetnek a földtani közeg, illetve felszín alatti víz mikrobaközösségeinek domináns tagjaivá válni.

Az ökoszisztéma természetes egyensúlyának drasztikus eltolódását a spontán módon lezajló változások mellett a különböző kármentesítési eljárások is befolyásolják, melyek révén az adott terület mikrobiotája további átalakulásokon mehet keresztül (SZOBOSZLAY et al. 2002a). A patogén mikroorganizmusok jelen lehetnek és akár tömegesen felszaporodhatnak az autochton (eredeti) mikrobiota tagjaként, illetve a biotechnológiai beavatkozás keretében kijuttatott (allochton) populáció elemeként is megjelenhetnek. Ennek magyarázata abban a tényben kereshető, hogy egy korábbi összevetés szerint a szénhidrogénbontásban leggyakrabban résztvevő baktériumok, illetve aktinomicéták 11 nemzetségének (*Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* és *Vibrio*; LEAHY AND COLWELL, 1990) **301 faja közül 69 (23%) minősült a velük érintkezésbe kerülő emberek egészségre veszélyesnek, tehát patogénnek** (CLAUS, 1992; SZOBOSZLAY ET AL., 2002b).

A hazai jogi szabályozás [16/2002 (IV.10.) EÜM. rendelet] előírja, hogy mikrobiológiai készítmény nem tartalmazhat humán-, állat-, illetve növényegészségügyi szempontból káros, fertőző mikroszervezeteket, ám a nemzetközi jogszabályi háttér nem minden esetben követi ezt a példát. A jogszabályi előírások betartása és a legnagyobb elővigyázatosság mellett is előfordulhat továbbá, hogy a szénhidrogénbontásra képes mikroszervezetek között spontán módon felszaporodnak humán patogén mikroorganizmusok, mint például a vizsgálatunk szempontjából jelentős *P. aeruginosa* faj.

2.3.3. A komposztálás környezetbiztonsága

A komposztálás folyamatát és a végtermék minőségét számos kémiai és biológiai faktor veszélyezteti, mint például a **toxikus fémek** megjelenése (AMLINGER AND LUDWIG-BOLTZMANN, 1996), ill. a **patogén mikroorganizmusok** jelentette kockázat (PIETRONAVE ET AL., 2004). A komposzt minták számos humán-, állat-, és növénypatogén szervezetet tartalmazhatnak, beleértve baktériumokat, vírusokat, gombákat, véglényeket és bélférgeket. A betegség kiváltására képes organizmusok komposztálás esetében jellemző módon az alkalmazott nyersanyagokból származtathatóak, mint a települési szilárd hulladék és szennyvíziszap (DÉPORTES ET AL., 1998), trágya (SOBSEY ET AL., 2001), vagy a kerti nyesedék (PIETRONAVE ET AL., 2004). Az utóbbi néhány évben lendületet nyert biogáz alapú energiatermelésből származó, ill. hőerőművi melléktermékek, mint komposztálási nyersanyagok tulajdonságairól, kémiai, ill. biológiai paramétereiről (pl. patogén mikroorganizmusok jelenléte) jelenleg elenyésző ismeretekkel rendelkezünk.

Szaprotrof életciklusuknak köszönhetően a 2.3.1.1. alfejezetben definiált **opportunistá kórokozó mikroorganizmusok** képesek lehetnek a gazdaszervezeten kívüli fennmaradásra, ill. replikációra, így a komposztálás biológiai biztonságának megítélésében is nagyobb jelentőséggel bírhatnak, mint az obligát kórokozók. A komposztálás egyik fő feladata ezen patogén szervezetek számának csökkentése a biztonságos végtermék elérése érdekében. A patogén mikroorganizmusok jellemzően mezofil mikroszervezetek, így elsősorban a komposztálási technológia során előírt időtartammal és hőmérséklettel jellemezhető, 2.2.3. alfejezetben ismertetett termofil szakasz szolgál eliminálásukra (GERARDI AND ZIMMERMAN, 2005). Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala, specifikációja szerint a patogénektől mentes, biztonságos végtermék eléréséhez legalább három napon keresztül 55°C hőmérséklet biztosítása szükséges a komposztálás során (USEPA, 1994b). Tudományos kísérletekkel igazolt, hogy a helyesen kivitelezett komposztálási technológia eredményeként a humán-, állat-, és növénypatogén szervezetek visszaszorulnak (RUSS AND YANKO, 1981). Ugyanakkor a komposzt halom inhomogenitása a prizmán belüli hőmérséklet különbségekhez vezethet, melynek következtében a higiénizációhoz szükséges minimális hőmérséklet nem garantálható a teljes komposzt halomban (NEMEROW ET AL., 2008). A mezofil patogének túlélése ugyanakkor a komposztban lévő, alacsonyabb hőmérséklettel jellemezhető mikro-niche-ek hiányában, termofil (50-70°C közötti) környezetben is lehetséges. Laboratóriumi vizsgálatok alapján prominens mezofil kórokozók, mint az *Escherichia coli*, *Serratia marcesens*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus gallarium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Acinetobacter genospecies* és az *Alcaligenes fecalis* ssp. *fecalis* is igazoltan képesek lehetnek a 60°C feletti hőmérséklet túlélésére, termofil mutáns sejtvonalaik segítségével (DROFFNER ET AL., 1995). Az említett tényezők figyelembe vételével, továbbá annak ismeretében, hogy a mezofil

mikroszervezetek a komposztálás lehülési, ill. érési stádiumában érik el növekedési potenciáljuk maximumát megállapítható, hogy **a mezofil patogének, mint a kész komposzt termék minőségét veszélyeztető ágensek, jelen ismereteink szerint nem zárhatóak ki.**

Az esetlegesen kórokozókat tartalmazó komposzt talajjavításra történő alkalmazása egyben azt is jelenti, hogy a komposzt által közvetített patogén mikroorganizmusok a talaj homeosztatisz körülményeinek kitéve a bennszülött mikrobiotával is kompetícióra kényszerülnek (DE BERTOLDI ET AL., 1988), mely feltételek számuk csökkenéséhez vezethetnek. Azonban e körülmények figyelembe vételével sem jelenthetjük ki a környezetegészségügyi kockázat megszűnését, hiszen még mindig fennáll annak a lehetősége, hogy az adott területen szennyeződött földtani közeg, felszín alatti víz, ill. a termesztett növényzet révén e kórokozók érintkezésbe kerülhetnek a gazdaszervezetekkel (DE BERTOLDI ET AL., 1988).

2.4. A PATOGÉN MIKROORGANIZMUSOK MEGÍTÉLÉSE A BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK ALKALMAZÁSA SORÁN

RICHMOND (2008) okfejtését követve a biotechnológiai folyamatok keretében a patogén mikroorganizmusok alkalmazása „kétélű fegyver”: ezek a természetes környezetben is megtalálható mikroszervezetek számos esetben laboratóriumban könnyen tenyészthetőek, így változatos alkalmazási lehetőséget biztosítanak a környezeti biotechnológia számára. Biotechnológiai alkalmazásuk lehet például a kórokozók és kártevők elleni biológiai védekezés, illetve a környezetbe került xenobiotikumok, növényvédőszer, antibiotikumok stb. eliminálása, mellyel hozzájárulhatnak a tiszta, egészséges környezethez. A növények, a legtöbb állat, ill. az ember esetében azonban arra hajlamosító tényezők közreműködésével a kórokozók felbukkanása megbetegedéshez vezethet (JONES, 2006). Komoly figyelmet kell tehát fordítani a patogének véletlen, illetve szándékos biotechnológiai alkalmazására, hiszen mobilitásuk, nem célszervezetekre gyakorolt hatásuk, ill. perzisztenciájuk révén (HEIKKI, 2003) súlyos környezetegészségügyi problémákhoz vezethetnek, beleértve a humán egészségügyi, ökológiai stabilitásra, ill. biodiverzitásra gyakorolt hatásokat.

Az alábbi szempontrendszer a *Burkholderia cepacia* példáján keresztül tekinti át **a mikroorganizmusok biotechnológiai eljárások során kockázati tényezőnek számító tulajdonságait** (HOLMES ET AL., 1998 nyomán):

- ismert humán patogén kórokozó, mely járványok kitöréséért is igazoltan felelős,
- széles körben elterjedt, könnyen átvihető faj,
- számos antibiotikumra egyidejűen rezisztens (multirezisztens),
- garantáltan biztonságos, biotechnológiai célra kockázat nélkül alkalmazható törzs kiválasztása a jelenleg rendelkezésre álló fenotípusos és genotípusos módszerekkel nem lehetséges,

- epidemiológiai és filogenetikai kutatások alapján a könnyen átvihető törzsek véletlenszerűen bukkannak fel, mely a faj mutációra és adaptációra való hajlamát erősíti,
- nagyméretű, komplex genommal rendelkezik.

E feltételek mindegyike teljesül az általunk vizsgált *P. aeruginosa* faj esetében, ahogyan azt a faj részletes ismertetését célzó 2.6. alfejezetben ismertetjük.

A környezetünkben élő fertőzőképes mikroszervezetek jelentőségét jelzi, hogy az elmúlt években drasztikusan emelkedett azon esetek száma, melyekben ismert klinikai előzmény, vagy **prediszpozíció nélkül, a közösségben szerzett *P. aeruginosa* fertőzés útján alakult ki megbetegedés** (ARANCIBIA ET AL., 2002). E virulens törzsek **eredete azonban rendkívül ritkán tisztázható**. A rendelkezésre álló információk alapján bioremediációs alkalmazásban lévő mikroszervezetet nem, komposzt eredetű mikroorganizmust pedig csupán egy alkalommal (BOLLEN AND VOLKER, 1996) azonosítottak, mint konkrét megbetegedésért felelős kórokozót; utóbbi esetben növény-patogén kórokozó került kimutatásra.

2.5. ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA

A patogén és esetlegesen igazoltan virulens mikroszervezetek jelentette környezeti kockázat tovább fokozódik az **antibiotikum rezisztencia** problematikájával, mely számos mikroszervezetre jellemző tulajdonság. Az egyes baktérium-speciesek különböző mértékben érzékenyek az antibiotikumokra; akár azonos fajt képviselő törzsek között, akár egy baktériumpopuláció variánsainak az esetében tapasztalt antibiotikum-érzékenység is eltérő lehet.

Az az észlelés, hogy a baktériumok ellenállóképesebbek tudnak lenni az antibiotikumokkal szemben, gyakorlatilag egyidős az antimikrobiális terápiával. Már *Fleming* maga is észlelt penicillinre rezisztens *Staphylococcus aureus* törzseket. A versenyfutás a gyógyszerfejlesztés és a baktériumok között azóta is tart és feltehetően még sokáig folytatódik, miközben hol az antibiotikumok, hol a baktériumok jutnak előnyhöz (LUDWIG, 2001).

A **bakteriális rezisztencia** valójában nem más, mint a mikroorganizmusok populációiban bekövetkező olyan változás, amit a változó környezeti viszonyokhoz való "alkalmazkodás" kényszere indukál. Az antibiotikumok alkalmazása valójában csak szelektál: elpusztítva a gyengét, teret kínál a baktériumpopulációban jelenlevő rezisztens egyedek szaporodásához. Az antibiotikum-rezisztencia terjedése, fokozódása így az antimikrobiális szerek egyik mellékhatásának is tekinthető.

A rezisztencia kialakulása és az egyes antibiotikumok alkalmazása közti kapcsolat igen bonyolult, baktérium-fajonként és antibiotikumonként változik; az összefüggés többnyire komplex, nem egyszerűen lineáris. Az utóbbi évtizedek felismerése, hogy az antibiotikum multirezisztencia **globális és földrajzilag nem izolálható jelenség**, amely alig kezelhető orvosi problémát és emellett egyre növekvő gazdasági terhet is jelent (LUDWIG, 2001).

2.5.1. Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok

A baktériumok többféle módon képesek védekezni az antibiotikumok támadásával szemben, és egyre újabb mechanizmusokkal lepnek meg bennünket. A rezisztenssé válásnak azonban biológiai ára van: a rezisztens törzsek gyakran kevésbé életképesek (ANDERSON, 1999) néha kevésbé virulensek (ARRUDA ET AL., 1999).

Azokat a baktérium-izolátumokat, amelyek egyidejűleg legalább 2 vagy több különböző hatóanyagcsoportba tartozó antibiotikummal szemben rezisztensek **többszörösen rezisztens (multirezisztens, hiperrezisztens, pánrezisztens)** törzseknek tekintjük (DRAGHI ET AL., 2006). Ezek a törzsek, rendelkezhetnek olyan rezisztencia-mechanizmussal, mint például az efflux-mechanizmus, vagy a sejtfal szerkezetének megváltozása, amely több antibiotikum-csoportot is érint. Multirezisztens törzsek előfordulnak többek között a *Pseudomonas* genuson belül, az *Acinetobacter* fajok közt, valamint a *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* csoportban (BARCS, 2001).

A baktériumok legismertebb rezisztencia mechanizmusai (BORVENDÉG ÉS VÁRADI, 2002; GRABER ÉS LUDWIG, 2002) a következők:

- **Természetes rezisztenciáról** beszélünk akkor, ha egy baktérium genetikailag determinált módon nem érzékeny egy antibiotikumra (pl. a Gram-negatív baktériumok a vancomycin-re);
- **Primer rezisztencia**, ha adott speciesen belül egyes törzsek érzékenysége eltérő (pl. *E. coli* törzsek változó érzékenysége a tetracyclin-nel szemben);
- **Másodlagos rezisztencia** esetében az ellenállóképesség létrejöhet a baktériumok riboszómájában, valamint anyagcsere-folyamataikat irányító és végrehajtó fehérjeiben bekövetkező mutáció útján ($1:10^6$ és $1:10^{13}$ gyakorisággal rezisztens mutáns keletkezik);
- **Szerzett rezisztencia** esetén a baktériumtörzsek más egyedben már működő rezisztencia mechanizmust kódoló gén megszerzése következtében (horizontális génátvitel) válnak rezisztenssé az antibiotikumokkal szemben. Szerzett rezisztencia esetén többféle védekezési mechanizmusról beszélhetünk:

1. **Enzimtermelésen alapuló rezisztencia:** Egy baktériumpopuláció képessé válik olyan enzim termelésére, amely egy vagy több antibiotikum szerkezetét megváltoztatja, így hatástalanná teszi, inaktíválja (pl. béta-laktamázok). Lehet konstitutív, azaz permanensen termelődő enzimeknek köszönhető, és indukálható, amikor az enzim valamely szubsztrátja szabadítja fel az inaktíváló enzim termelését a gátlás alól (BARCS, 2001).
2. **Célstruktúra megváltozása:** Az antibiotikumok kötődésére alkalmas hely megváltoztatásával a gyógyszer affinitása, kötődésének erőssége jelentősen csökken, hatása gyengül, vagy akár teljesen el is veszhet. Ilyen szerkezeti változást okozhat akár egyetlen aminosav kicserélődése a célstruktúrában.

3. **Permeabilitás megváltoztatása:** A baktériumok az antibiotikumok támadáspontjában megváltoztatják sejtfa-szerkezetüket úgy, hogy eredeti feladatukat képesek ellátni, de az antibiotikumok nem tudnak kapcsolódni hozzájuk, hatóanyaguk nem képes a sejtbe jutni.
4. **Efflux-mechanizmus:** A baktériumsejt kipumpálja az antibakteriális szert, így a sejten belül nem jön létre a hatáshoz szükséges antibiotikum-koncentráció.

A rezisztencia típusok sok egyéb szempont alapján is osztályozhatóak, például a bontóenzimek szubsztrát-specifitása szerint, vagy, hogy hol van tárolva a baktériumsejtben a rezisztenciára vonatkozó információ.

2.5.2. Antibiotikum rezisztencia a környezetben

Az Európai Közösség által kiadott beszámoló szerint (OPINION OF THE SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 1999) az antimikrobiális rezisztencia a környezetben is széles körben elterjedt. A rezisztens baktériumok izolálhatóak szárazföldi és tengerparti vizekből, valamint a talajból és növényekből. Az 1980-90-es évben **a felszíni és felszín alatti vizekben és a talajokban élő, rezisztencia géneket hordozó baktériumtörzsek aránya 10-46%-ra** nőtt; ez az arány szennyvizek esetében 76% volt.

A környezeti antibiotikum rezisztencia jelenségének egyik lehetséges oka, hogy környezetünkben, felszíni és felszín alatti vizeinkben, illetve a földtani közegben az utóbbi években számos esetben azonosítottak kimutatható és olykor jelentős mennyiségű **antibiotikum maradékanyagot**, mely szelekciós nyomást fejthet ki a mikroszervezetekre nézve és számos rezisztencia-mechanizmus kifejlődéséhez vezethet. Az antibiotikumok lehetséges környezeti forrásai az alábbiak lehetnek:

- **Lakossági antibiotikum-használat:** Az antibiotikumok nagy része változatlanul ürül az emberi szervezetből (HIRSCH et al., 1999), így megjelenhet a szennyvízben (Venglovsky et al., 2009). Számos antibiotikum meglehetősen ellenálló a lebontási folyamatokkal szemben (AL-AHMAD et al., 1999); még a szennyvíztisztítók is csak 60-90%-os hatékonysággal képesek eliminálni ezeket a komponenseket. Az antibiotikum terhelés a biológiai szennyvíztisztítók mikrobiotáját is károsíthatja, így más anyagok tisztításának hatásfokát is csökkentheti (LOCK, 1999). Jelentős mennyiségben adszorbeálódnak a szennyvíziszap részecskéihez, így anaerob körülmények közt kevésbé bomlanak, mint a vízben, ahol napsugárzás hatására is degradálódnak (HAMSCHER et al., 2002).
- **Mezőgazdasági antibiotikum-használat:** A környezet antibiotikum-terheléshez az állattartásban felhasznált, nagy mennyiségű antibiotikum is hozzájárul (AL-AHMAD et al., 1999), mely jelentős arányban megjelenhet az állattartásból származó trágyában (TERNES, 1998). Tudományos kísérletek alapján a komposztálás alkalmas lehet egyes antibiotikum

hatóanyagok akár 90%-os degradációjára, ám ennek hatékonysága nagymértékben függ az adott készítmény kémiai szerkezetétől; több esetben nem tapasztaltak mérhető koncentrációcsökkenést (DOLLIVER ET AL., 2008).

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

A környezeti antibiotikum-rezisztencia jelentőségének felismerése 2006. január 1-től közösségi szintű döntéshez vezetett: az Európai Unió korlátozta az antibiotikum jellegű takarmánykiegészítők (kivéve kokcidiosztatikumok és hisztomonosztatikumok) alkalmazását és eltávolította azokat az engedélyezett készítmények Közösségi Nyilvántartásából (CASTANON, 2007).

Az antibiotikum hatóanyagok környezeti megjelenéséhez történő adaptáció jele, hogy egyes talajlakó mikroszervezetek (mint a *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*) olyan enzimek termeléséért felelős génszakaszokat hordoznak, melyek segítségével képesek lehetnek antibiotikum-hatóanyagokat szén- és nitrogénforrásként hasznosítani, így semlegesítve azokat (JOHNSEN, 1977; BECKMAN AND LESSIE, 1979).

Az antibiotikum hatóanyagok által kiváltott szelektív nyomás mellett a környezetben ugyanakkor számos egyéb tényező (sugárzás, szennyezés) indukálhatja az antibiotikum rezisztencia megjelenését, bár az ezt megalapozó keresztrezisztencia folyamata még feltáratlan (ALLEN ET AL., 2010). Figyelemre méltó továbbá, hogy az olyan univerzális rezisztencia mechanizmusok, mint az aktív efflux pumpa túlműködése egyes toxikus szennyezőanyagok jelenlétében is aktiválódhat maga után vonva ezzel az antibiotikum rezisztencia egyidejű fokozódását (POOLE, 2005). Azonban a lehetséges környezeti folyamatokat áttekintő publikáció sem tartalmaz adatot a *P. aeruginosa* környezeti törzseinek antibiotikum rezisztenciájára vonatkozóan (ALLEN ET AL., 2010).

2.5.3. Az antibiotikum rezisztencia értékelésének lehetőségei

Jelen dolgozat keretében az egyes baktérium törzsek antibiotikum-érzékenységét a CLSI (Clinical Standards Laboratory Institute USA), korábbi elnevezése szerint NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) nemzetközileg elfogadott ajánlásai alapján végeztük. A rezisztencia meghatározására azonban más standardok előírásait is lehet alkalmazni, például a DIN (Német Ipari Standardok), vagy ICS (Nemzetközi Standardizációs Bizottság) metodikáját. Németországban a mikrobiológiai vizsgálatok során végzett teszteljárásokra és az

érzékenység/rezisztencia határértékeinek megállapítására a DIN 58940 irányelvei (DIN 58940-1:2002; DIN 58940-31:2007) vonatkoznak.

Szükségesnek tartom megemlíteni az **antibiotikum-rezisztencia profil** fogalmát, mely azon vizsgált szerek felsorolása, melyekre az adott törzs rezisztens. Ennél több információt nyújt a rezisztencia számszerű értékelése, azaz a **Minimális Gátló Koncentráció (MIC – Minimal Inhibitory Concentration)** értékek megállapítása (KEMME et al., 1997). A MIC az a standard körülmények között, in vitro meghatározott minimális antibiotikum koncentráció, amivel a vizsgált baktérium törzs meghatározott mennyiségének szaporodását gátolni lehet. A hatékony antibiotikum terápia alapfeltétele, hogy a terápia során, az infekció helyén az adott antibiotikum koncentrációja meghaladja a baktérium MIC értékét. Ennek a folyamatnak, azaz a gyógyszerek szervezetben belüli felszívódásának, eloszlásának, kötődésének, metabolizmusának és kiürülésének teoretikus összefüggéseivel foglalkozik a farmakokinetika tudományterülete (MAGYAR, 2004).

A molekuláris genetikai eszközök fejlődésével napjainkban mind nagyobb hangsúlyt kap az antibiotikum rezisztenciáért felelős gének azonosítása, mely ismert rezisztencia gének PCR alapú kimutatása mellett a funkcionális metagenomika irányában nyit új lehetőségeket (ALLEN ET AL., 2010).

Mivel az alkalmazható értékelési módok mindegyikét más-más faktorok alapján alakították ki, érthető, hogy ugyanazon törzsre elvégzett vizsgálatok során a használt módszertől függően országonként és laboratóriumonként más-más eredmények születhetnek (BAQUERO, 1990). A nemzetközi egyetértés a mai napig nem született meg a standardok egyeztetését illetően. A hazai és nemzetközi ajánlások alapján az optimális az lenne, ha minden esetben MIC meghatározás történhetne (BARCS, 2001, BLOCK, 2001), így kutatómunkánk során mi is ezt a szempontot vettük alapul.

2.6. A *P. AERUGINOSA* BAKTÉRIUMFAJ BEMUTATÁSA

2.6.1. Általános jellemzés

A *Pseudomonas* nemzetség tagjai többnyire fakultatív aerobok, poláris flagellumokkal mozognak, egyenes, vagy enyhén görbült alakúak. Változatos anyagcsereútjaik és széles spektrumú katabolitikus potenciáljuk révén szinte valamennyi elem anyagforgalmában részt vesznek, mind aerob, mind anaerob körülmények között (STOVER ET AL., 2000). Többségük, mint a *P. aeruginosa* kemoorganotrófok, sokféle szerves anyag lebontására képesek, emiatt jelentősek a mineralizációban. A *P. aeruginosa* fajt a szakirodalomban először a francia Carle Gessard írta le (GESSARD, 1882). Első elnevezése (*Bacillus pyocyaneus*) két fő tulajdonságára utal: pálcika alakú formájára, valamint az úgynevezett „kék gennykeltő” tulajdonságára, amelyet a törzsek több mint fele által termelt piocianin nevű pigment okoz.

Jelenlegi, pontos taxonómiai besorolása a következő (HTTTP1; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, GARRITY ET AL., 2001):

Prokarióták

Domén: *Bacteria*

Törzs: *Proteobacteria*

Osztály: *Gammaproteobacteria*

Rend: *Pseudomonadales*

Család: *Pseudomonadaceae*

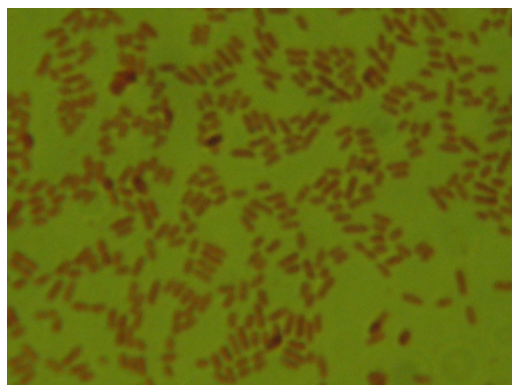
Genusz: *Pseudomonas*

Faj: *Pseudomonas aeruginosa*

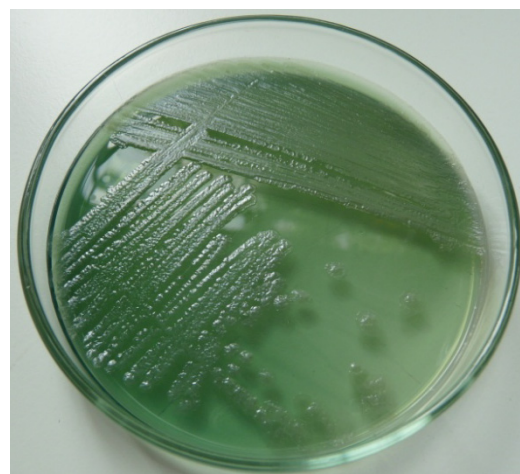
2.6.1.1. Morfológia

A *P. aeruginosa* Gram-negatív, nem fermentáló, fakultatív aerob baktérium. Sejtjei $0,5-0,6 \times 1,5$ μm méretűek, pálcá alakúak; egyesével, párosával, vagy rövid láncokká összekapcsolódva fordulnak elő (2.4. sz. ábra), 1-3 polárisan elhelyezkedő monotrich flagellumok segítségével önálló mozgásra képesek. Valódi tokja nincsen, ám mucoid jellegű törzsei esetében a sejtek β -1-4 kötődésű D-mannuronsav és L-glukuronsav monomerjeiből felépülő alginát tokkal rendelkeznek (LINKER AND JONES, 1966).

7,0-8,5 pH érték mellett széles hőmérsékleti tartományban (5-42°C) szaporodik, hőoptimuma 37°C (SZABÓ, 1989). Az összes szokványos táptalajon életképes, növekedését illetően igénytelen; tápanyagigénye annyira minimális, hogy akár a tiszta vízben is képes kolonizálódni. Agaron nagy, szabálytalan lapos, sima felszínű, lágy, kékesszürke telepeket képez sötétebb középpel, áttetsző szélekkel. A telepek nem pigmentáltak, de a baktériumokból a táptalajba bediffundáló pigmentek hatására a kolóniák környéke sárgászölden diffúzan elszíneződik (lásd: 2.5. sz. ábra), valamint jellegzetesen trimetil-amin szagú.



2.4. sz. ábra: A *Pseudomonas aeruginosa* fénymikroszkópos képe; karbol-fukszinios festés; 630x nagyítás (Szabó G. és a szerző felvétele, 2009)



2.5. sz. ábra: A *P. aeruginosa* telepképe BBL-TSA agaron (a szerző felvétele, 2010)

2.6.1.2. Jellemző tulajdonságai

Hővel dezinficiensekkel, gyógyszerekkel szemben meglehetősen ellenálló (MADIGAN, 2000). Termofil tulajdonsága révén a melegvérű állatokban és az emberben is jól szaporodik. Gyakran a normális emberi testflórába is beépül; a kolonizáltsági arány 2-24% is lehet, amely a kórházi populációban sokkal nagyobb, mint az átlagos lakosság körében: sokszor meghaladja az 50%-ot is (MORRISON AND WENZEL, 1984).

O- és H-antigénjei alapján 15 szerocsoportba sorolható; nozokomialis (kórházi) infekciókban az O:11, valamint kisebb mértékben az O:4 és O:6 szerocsoportú törzsek fordulnak elő; a többi szerocsoport fertőzést ritkán okoz (FARMER ET AL., 1982).

Metabolitjai közül különösen már említett pigmentjei jellegzetesek: a kék piocianin (amely vízben és kloroformban egyaránt oldódik), a sárgászöld, csak vízben oldódó fluoreszcein és a pirorubin. Ugyancsak fontos metabolitjai a proteínázok, a hemolizozim és az exotoxin (BÉLÁDI ET AL., 1983).

A *P. aeruginosa* mucoid (mucint termelő) törzsei képesek a bakteriális sejtfal körül egy ún. **mátrixot (biofilmet)** képezni, amely a baktériumsejt térben kiterjedt aggregátumait, bevonatait védő exopoliszacharid réteg. Ez a mechanizmus segíti a baktérium természetben és mesterséges környezetben (pl. katéterekben, ipari csővezetékekben stb.) való túlélését. A kialakult biofilm hatékony védelmet nyújt a kedvezőtlen körülmények, a környezeti változások, pl. kiszáradás, tápanyaghiány, UV sugárzás (ELASRI AND MILLER, 1999) ellen, valamint ellenállóvá teszi a sejteket az antibiotikumokkal (ELKINS ET AL., 1999) és a szervezet immunmechanizmusaival szemben.

2.6.2. A *P. aeruginosa* a környezetben

A *P. aeruginosa* **ubikviter mikroszervezet**; megtalálható a talajban, a vizekben, a növényekben, állatokban és az emberben is. A talajban élősejt-száma általában nem éri el a fertőzési kockázat szintjét; a környezetből való kitenyészhetőségi gyakorisága alacsony (GROBE ET AL., 1995). Az USA-ban (Dél-Karolina) végzett vizsgálatok szerint a természetes állapotú, nem szennyezett talajok kb. 16%-ában fordul elő *P. aeruginosa* (FERGUSON ET AL., 2001). Szennyvizekből gyakran kimutatható, emellett megtalálható mélyfúrású kutak vizében, desztillálóknban, székletben, növényekben és élelmiszerekben. Élősejt-számára jellemző hazai adatok: folyókban, patakokban 10^2 - 10^3 /cm³, víztározókban 10^1 - 10^2 /cm³, házi szennyvízben 10^3 /100 cm³, székletben 10^3 - 10^5 CFU/g (NÉMEDI ET AL., 1998). Tápanyagforrásként képes hasznosítani a galaktózt, glükózt, mannózt, xilózt, glicerolt, mannitolt, etanolt. A nitrátokat nitritté és nitrogénné redukálja, a glükózt pedig glükonsavra és 2-keto glükonsavra oxidálja (BÉLÁDI ET AL., 1983).

A *P. aeruginosa* biodegradációs jelentőséget az a képessége adja, hogy a környezetszennyező anyagok igen széles skáláját képes lebontani, így alifás, aromás és poliaromás szénhidrogéneket is. Például:

- n-alkánokat (CHAYABUTRA AND JU, 2000)
- összetett szénhidrogén-tartalmú anyagokat, pl. dízel olaj (ERIKSSON ET AL., 2001), olajos iszap (MISHRA ET AL., 2001), bitumen (WOLF AND BACHOFEN, 1991)
- policiklusos aromás vegyületeket (KANALY AND HARAYAMA, 2000)
- poliklórozott bifenileket (TSOI ET AL., 1999)
- klórozott alifás vegyületeket, pl. vinil-kloridot (VERCE ET AL., 2000)
- gázolaj-kőolaj keveréket (KASZAB ET AL., 2006).

A *P. aeruginosa* szénhidrogénnel szennyezett közegben jellemző kimutatási gyakoriságára, ill. mérhető élősejtszámára vonatkozóan a szakirodalomból nyerhető ismereteink korlátozottak; csupán egy adott kárhely esetében történt átfogó vizsgálat erre vonatkozóan (RIDGWAY ET AL., 1990), mely alapján azonban feltételezhető, hogy **szénhidrogénnel szennyezett talajokban és talajvizekben az egyik leggyakrabban detektálható baktériumfaj** (CHAYABUTRA AND JU, 2000).

Biotechnológiai jelentőségét jelzi, hogy az első, genetikailag módosított mikroszervezet volt, melyre szabadalmat nyújtottak be (Anada Chakrabarty & U.S. General Electric), ahogyan arról 1975-ben a Time magazin is beszámolt 'Oil eating bug' című cikkében (EVANS AND FURLONG, 2003, HTTP2). Napjainkban is számos publikáció számol be olyan bioremediációs célú beavatkozásokról, melyek esetében az alkalmazott *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó izolátum nem került faj szinten identifikálásra, ill. azonosítható módon a *P. aeruginosa* faj képviselője volt. Ezt bizonyítják az alábbi példák:

- Mikroba-konzorciumokban alkalmazott, faj szinten azonosítatlan *Pseudomonas sp.* felhasználása talaj szénhidrogén-szennyezésének megszüntetésére (GHAZALI ET AL., 2004),
- Nyersolaj biodegradációja szénhidrogénnel szennyezett közegből izolált *P. aeruginosa* törzs segítségével (DAS AND MUKHERJEE, 2007),
- TNT mikrobiológiai lebontására képes baktérium-konzorciumokban felhasznált identifikálatlan *Pseudomonas* fajok (ROBERTSON AND JEMBA, 2005),
- TNT biotranszformációja és detoxifikációja egy *P. aeruginosa* törzs felhasználásával (OH ET AL., 2003),
- Alga-mikroba közösségben faj szinten ismeretlen, *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó mikroszervezetek alkalmazhatóságának vizsgálata után tartalmú szennyvíz tisztítása során (KALIN ET AL., 2005),
- Urán bioszorpciója egy *P. aeruginosa* törzs felhasználásával (HU ET AL., 1996),
- Felületaktív anyagok (rhamnolipidek) termelésével elősegíti a vízzel nehezen elegyedő szerves anyagok vizes fázisba jutását és így a sejtbe történő felvételét (FU ET AL., 2007), képes lehet

továbbá szervesen szennyezőanyagok (mint pl. a kadmium) talajszemcsékről való leválasztására is (BONDARENKO ET AL., 2010).

A **felületaktív anyagok** egyúttal befolyásolhatják a *P. aeruginosa* talajszemcsékhez való kötődését is. **Rhamnolipidek** hiányában – egyes szerzők vizsgálatai szerint – a patogén *Pseudomonas* fajok még nagy egyedszámban is fenntartják kötődésüket a talajszemcsékhez és nem lépnek ki eredeti életterükből (ORSOVAI, 1999). A *P. aeruginosa* ATCC 9027 jelzésű törzse felületaktív anyag jelenlétében azonban már képes volt megszüntetni adszorpcióját a kőzetszemcsékhez és a talajvízáramlás, vagy önálló mozgás segítségével szétterjedt a közegben (DESAI ÉS BANAT, 1997).

A *P. aeruginosa* faj szénhidrogén származékokkal szennyezett kárhelyeken való tartós előfordulását elősegítheti továbbá, hogy képes nitrátlégzés segítségével mikroaerob, illetve anaerob körülmények között is lebontásra (CHAYABUTRA AND JU, 2000).

2.6.3. A *P. aeruginosa*, mint kórokozó

Opportunista (állat- és humánpatogén) baktérium, a **nozokomiális** (kórházi) fertőzések egyik leggyakoribb és legveszedelmesebb kórokozója.

Egészséges egyéneknél ritkán okoz betegséget; esetében többnyire valamilyen hajlamosító tényező (predispozíció) szükséges, amely általában a szervezet ellenállóképességének csökkenése révén jön létre. Ilyen hatás például a fiziológiás barrierék (bőr, nyálkahártya) sérülése, és/vagy megkerülése katéterek (intravénás, húgyúti, drainek stb.) révén, valamint a specifikus immunvédelem csökkent működése (FILETÓTH, 1995). A kórházakban a fő rezervoár a lélegeztetett betegek légutai, az égett betegek bőrfelülete, valamint az antibiotikumokkal kezelték béltraktusa (KONKOLY THEGE, 2003). Az immunhiányos állapot tehát a *P. aeruginosa* által okozott fertőzések egyik elősegítője lehet. Mivel a legyengült immunrendszerű betegek túlnyomórészt a kórházak intenzív osztályain koncentrálnak, ezért érthető, hogy a fertőzések itt nagyobb arányban fordulnak elő, mint más környezetben (FILETÓTH, 1995). Különösen veszélyeztetettek a kora- és újszülöttek, a transzplantáción átesett betegek, az időskorúak, stb. Kórházi környezetben való fennmaradását elősegíti, hogy párástól, lélegeztető berendezések, csaptelepek, elhasznált fertőtlenítő oldatok, fizioterápiás gyógymedencék stb. életteréül szolgálhatnak, így kellően koncentrált fertőtlenítőszer hiányában könnyen fennmaradhat (KONKOLY THEGE, 2003).

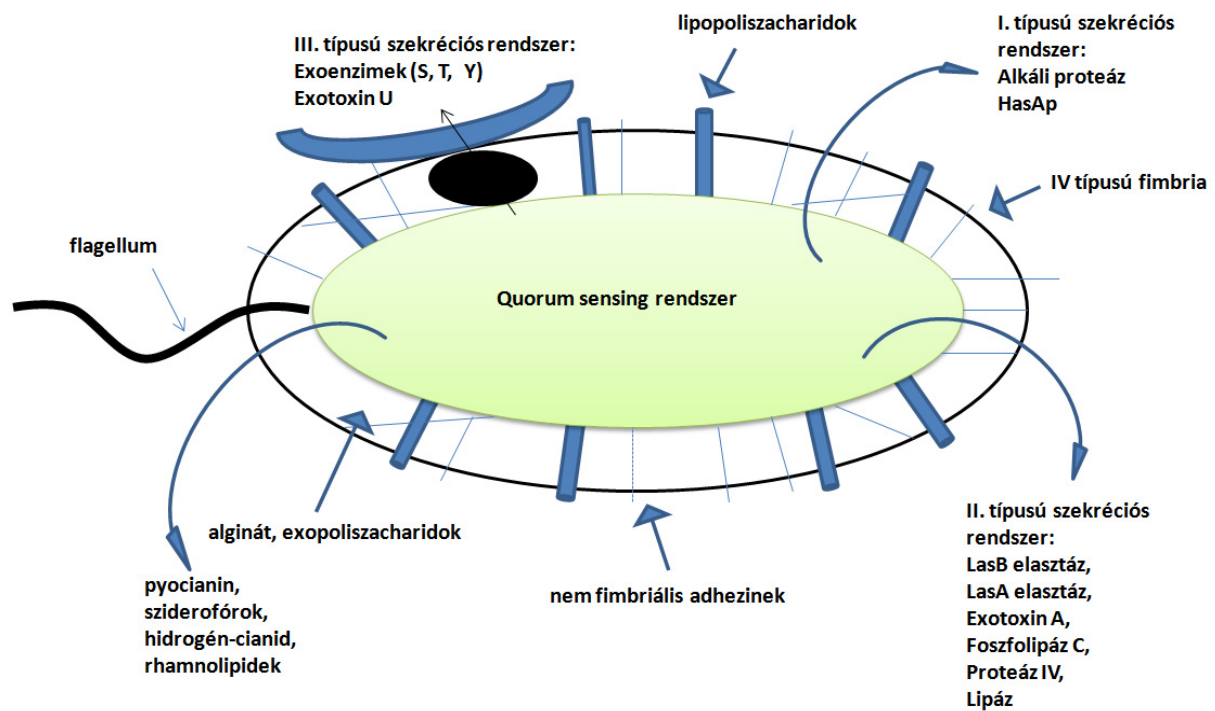
Egészséges egyéneknél szerepet játszhat a szem és a fül krónikus gyulladásaiban (*keratitis*, *otitis externa*), bőrbetegségek kialakításában (*folliculitis*) sebek gennyesedésében és *meningitis* kialakulásában is (MENA AND GERBA, 2009; BÉLÁDI ET AL., 1983). A CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) adatai szerint a *P. aeruginosa* a negyedik leggyakrabban izolálható

nozokomialis baktérium. Szinte vezető helyet foglal el az intenzív osztályokon előforduló fertőzések között: első helyen áll a légúti infekciókban (17,5%), a harmadik leggyakoribb baktérium a sebfertőzésekben (10,9%), a negyedik leggyakoribb kórokozó a húgyúti infekciókban és a hatodik helyen áll a szepszisekben (JARVIS AND MARTONE, 1992). Az USA-ban, Kanadában és Latin-Amerikában 1997-ben elvégzett SENTRY tanulmány szerint a harmadik leggyakoribb a vérből izolált kórokozók között (DIEKEMA ET AL., 1999). Fertőzés esetében a betegek gyakran hipertóniássá válnak, fehérvérsejt-számuk lecsökken, bélelzáródás, komoly tudatzavar és leküzdhetetlen szepszis következhet be (LOSONCZY, 2001). Magyarországi klinikai jelentőségéről az Országos Epidemiológiai Központ adatbázisából tájékozódhatunk. A 2006. év vonatkozásában elmondható, hogy **a *P. aeruginosa* hazai viszonylatban a legjelentősebb Gram-negatív nozokomiális kórokozó**: a véráram fertőzések 13%-áért és a légúti infekciók jelentős hányadáért továbbá a specifikus nozokomiális járványok 7,7%-áért felelős (EPINFO, 2008). A *P. aeruginosa* faj által kiváltott megbetegedés nagyarányú mortalitással jellemezhető: egy 150 fős, nozokomiális fertőzésben szenvedő minta esetében a tapasztalt 30 napos mortalitás elérte a 37%-ot (ZAVASCKI ET AL., 2006). Más szerző szerint a *P. aeruginosa* által okozott halálozási arány megközelíti a 70%-ot (FAGON et al., 1989), azokban az esetekben pedig, ahol a kórokozó a gépi lélegeztetéssel került be a szervezetbe, eléri a 90%-ot (PENNINGTON, 1995; MENA & GERBA, 2009).

A laboratóriumi kísérleti állatok (egér, patkány, tengerimalac, nyúl) fertőzése esetében az alkalmazott dózistól függően a helyi, spontán módon gyógyuló tályogoktól egészen a halálos kimenetelű szepsziséig változott a tapasztalt kórkép (SPANOGHE, 1984).

2.6.3.1. A *P. aeruginosa* virulenciája

A *P. aeruginosa* esetében a patogenezis (azaz a fertőzés, majd a betegség kialakulása) komplex folyamat, mivel a baktériumfaj számos invazív és toxintermelő mechanizmussal rendelkezik és azokat változatos módon képes az extracelluláris térbe szekretálni (lásd 2.3.1.2. alfejezet). A fajra jellemző legfontosabb virulencia faktorokat és kiválasztási útvonalakat foglalja össze a 2.6. sz. ábra, melyek közvetlen összefüggésben állnak a fertőző és invazív képességgel (WINSTANLEY ET AL., 2005). Kiválasztásukban a II. és III. típusú (T2SS, TTSS) szekrécións rendszereknek van döntő szerepe. A *P. aeruginosa* faj esetében különösen a III. típusú szekrécións rendszer adaptálódott speciálisan a toxikus fehérjék gazdasejt citoplazmájába történő átadására.



2.6. sz. ábra: A *P. aeruginosa* virulencia faktorai (VAN DELDEN, 2004 nyomán)

A *P. aeruginosa* II. és III. típusú szekréciós rendszere által kiválasztott legfontosabb exotoxinok és exoenzimek az alábbiak szerint jellemezhetőek:

Az **exotoxin A** (ExoA) egyike azon baktériumsejtek által kiválasztott toxinoknak, melyek képesek az emlősök sejtjeiben lévő specifikus célfehérjéket módosítani. Az A-B toxinok csoportjába tartozik, felépítésében két kovalens kötéssel összekapcsolódó fehérje alegység vesz részt. Az infekciók során az exotoxin „B” alegysége hozzákapcsolódik a megtámadott sejt felületi receptoraihoz, lehetővé téve ezzel az „A” alegység számára a célsejt membránján való átjutást, ezáltal a sejt elpusztítását. Az exotoxin A a célsejtbe jutva inaktíválja az „elongációs faktor 2” elnevezésű fehérjét annak ADP-riboszilázása révén, ezáltal akadályozza a fehérjék polipeptid láncának felépítését (SOMERVILLE ET AL., 1999).

Az **exoenzim S** (ExoS) és az **exoenzim T** (ExoT) ADP-ribosziltranszferázok, melyek a III típusú szekréciós rendszer segítségével választódnak ki. A két fehérjét kódoló génszakasz első ízben együttesen került kimutatásra, majd szétválasztásukkor a 49 kDa atomi tömegű az *exoS*, míg a kisebb ADP-ribosziltranszferáz aktivitással jellemezhető, 53 kDa tömegű az *exoT* elnevezést kapta. Az *exoS* akut és krónikus állatmodellek alapján nem elsősorban a kolonizációért, hanem a szövetkárosodásokért (NICAS ET AL., 1985a), illetve a szétterjedésért (NICAS ET AL., 1985b) felelős, míg az *exoT* feltehetően zavarja az excitózist, fagocitózist, ill. a sejtciklust (KRALL ET AL., 2000).

Az **exoenzim Y** (ExoY) egy adenilát-cikláz típusú effektor protein, melynek hatásmechanizmusa és kóroki következményei jelenleg kevésbé ismertek (VAN DELDEN, 2004).

Az **exotoxin U** (ExoU, másnéven PepA) egy akut citolitikus (a sejtfal feloldására képes, sejtkárosító) faktor, mely az ExoS és ExoT-hez hasonló promóter szerkezettel rendelkezik. A III. típusú szekréciós rendszer segítségével kerül kiválasztásra, elsősorban citotoxikus hatása ismert.

Az exoenzimek patogenitásban betöltött jelentőségét jelzi, hogy az ExoS, ExoT, vagy az ExoU szekréciója esetében egy esetleges fertőzés során a halálozás relatív esélye hatszorosára nő (AJAYI et al., 2003).

Bár a III. típusú szekréciós rendszer klinikai tanulmányok szerint majdnem minden klinikai és környezeti *P. aeruginosa* izolátumban jelen van, de a **virulenciáért felelős tulajdonságokat kódoló gének (*exoS*, *exoT*, *exoY*, *exoU*) gyakoriságában**, ill. a kiválasztásra kerülő virulencia faktorokban eltérések lehetnek (FAGON et al., 1989). **Környezeti eredetű (nem klinikai) izolátumok esetében az exotoxinok és exoenzimek gyakoriságáról nincs konkrét információnk.**

Egyes tanulmányok azt sugallják, hogy a megnyilvánuló exotoxinok és exoenzimek szerepet játszanak az invazív, ill. citotoxikus jelleg kialakulásában: míg az *exoS* és *exoT* az invazív sejtekben egyaránt megtalálható, addig a citotoxikus törzsek esetében az *exoS* hiányzik, ám az *exoT* kimutatható. A nem invazív törzsek citotoxicitásában feltehetően az *exoU* játsza a legnagyobb szerepet (VAN DELDEN, 2004).

Közvetlen virulencia faktornak tekinthető a **hemolitikus aktivitás**. A haemolysis (hemolízis) szó szerint vörösvértest feloldódást jelent, mely akkor jön létre, ha a fertőzést okozó baktérium által termelt hemolizin toxin hatására a vörösvértestek károsodnak és festékanyaguk, a hemoglobin kiszabadul a körülöttük levő térbe (BRENCsÁN, 2006). A vörösvértest károsító hatásért felelős hemolizintől függően a hemolízisnek két alapvető típusát különböztetjük meg: alfa-hemolízis esetén a hemoglobin kiszabadulása mellett a vörösvértestek maguk még épek, míg a *P. aeruginosa* faj patogén törzseire is jellemző béta-hemolízis során a vörösvértestek és a hemoglobin teljes feloldódása figyelhető meg (SZABÓ 1989; MILCH et al. 1996). Megjelenése változatos faktorok jelenlétének tulajdonítható: pórus-formáló toxinok, tiol-függő citolizinek, egyes enzimek (pl. phospholipáz), felületaktív anyagok, a III. típusú szekréciós rendszer által kiválasztott komponensek egyaránt indukálhatják fenotípusos megnyilvánulását (ROWE, 1994).

2.6.3.2. *A P. aeruginosa* antibiotikum rezisztenciája

A *P. aeruginosa* számos antibiotikummal szemben **természetes rezisztenciát** mutat, így a kezelés során felhasználható antibiotikumok köre eleve korlátozott. Indukálható AmpC béta-laktamáz termel, így eredendően rezisztens azokra a béta-laktámokra, amelyek indukálják ennek az enzimnek a termelését (KONKOLY THEGE, 2003).

A természetes rezisztencia mellett jelentős esély van a szerzett géneken kódolt, ún. **átvihető rezisztencia** kialakulására is, elsősorban sejtől sejtbe való R-faktoros plazmid átvitelével (Madigan,

2000), amely a *P. aeruginosa* esetében a béta-laktámok és az aminoglikozidok hatástalanságát eredményezheti.

Jellemző a **szerzett béta-laktamázok (széles spektrumú béta-laktamázok, metallo béta-laktamázok)** sokfélesége; leggyakoribbak a PSE-1 és a PSE-2 elnevezésű enzimek, amelyek segítségével rezisztencia alakul ki a piperacillin és a cefoperazon ellen, ugyanakkor megmarad a ceftazidim és a Carbapenemek iránti érzékenység. Az újabban megjelent, kiterjedt spektrumú béta-laktamázok, mint a PER-1 jelzésű enzim, már képesek cefepim és aztreonam elleni rezisztenciát is indukálni.

Szintén szerzett rezisztencia az **aminoglikozid modifikáló enzimek** termelése, melynek segítségével a *P. aeruginosa* rezisztenssé válik az aminoglikozid hatóanyagokkal szemben (KONKOLY THEGE, 2003).

Más mechanizmusú antibiotikumok hatástalanságát sokáig a sejtek impermeabilitásának tulajdonították, annak ellenére, hogy erre vonatkozó konkrét bizonyíték nem volt. Az **impermeabilitás** szerepét végül bebizonyították (LI ET AL., 2000), ám az elmélet nehezen volt összeegyeztethető azzal a ténnyel, hogy a *P. aeruginosa* olyan porint termel (OprF), amely a külső membránban elhelyezkedő, nagyméretű pórusok képződéséért felelős. A kutatások során végül fény derült arra, hogy a *P. aeruginosa* sokoldalú rezisztenciájának kialakulásában egy másik folyamatnak, az **aktív efflux** mechanizmusnak jelentősebb szerepe van (LIVERMORE, 2002). Mai tudásunk szerint tehát a *P. aeruginosa* fajra jellemző antibiotikum rezisztenciáért elsősorban ez utóbbi folyamat a felelős. A klinikailag jelentős efflux-rendszerek három részből állnak: maga a pumpa a citoplazma membránban helyezkedik el és egy nagyméretű lipoprotein molekula (Mex) tartja összeköttetésben a külső membránon található kimeneti portállal (Opr). Az efflux pumpa túlműködése lassítja az antibiotikum bejutását a baktériumsejtbe, így nehezebben érhető el hatékony koncentráció és hosszabb idő áll rendelkezésre egy újabb rezisztencia mechanizmus kialakulására (KONKOLY THEGE, 2003).

A **mutációs rezisztencia** szerepe is igazolt a *P. aeruginosa* esetében; valamennyi *Pseudomonas*-ellenes antibiotikummal szemben bekövetkezhet, így szerepet játszik például a harmadik generációs Cefalosporinok, a Carbapenemek, Aminoglikozidok, Fluorokinolonok hatástalanságának kialakulásában (KONKOLY THEGE, 2003). A mutációs rezisztenciát bizonyító számos eredmény közül csupán egyet említenék: a *P. aeruginosa* esetében Carbapenem-rezisztenciát eredményez az az impermeabilitást befolyásoló mutáció, melynek hatására a sejtek elveszítik azt a szűk porincsatornát (orpD), amely a Carbapenem számára korábban átjárható volt (LIVERMORE, 2002).

Az egyes rezisztencia mechanizmusok kombinálódásának, valamint a mutációk egymás utáni bekövetkezésének együttes hatása eredményezheti a **multirezisztens *P. aeruginosa* törzsek** kialakulását. Az orvosi gyakorlatban nem ritka, hogy a leggyakrabban használt 30 antibiotikum 90

%-ára rezisztens (multirezisztens) a betegséget kiváltó *P. aeruginosa* törzs (TÖRÖK ET AL., 1996). Ez a riasztó adat is bizonyítja, hogy miért szükséges a *P. aeruginosa*-t az ún. „probléma baktériumok” kategóriájába sorolni (BARCS, 2001).

A *P. aeruginosa* környezeti eredetű törzseinek antibiotikum rezisztenciájára vonatkozó ismereteink meglehetősen hiányosak; háztartási csapvízből (ivóvízből) 30 törzs vonatkozásában (DA SILVA ET AL., 2008), illetve tengeri halgazdaság üledékből (KERRY, 1994) izolált törzsek esetében rendelkezünk információval. Szénhidrogénnel szennyezett környezeti elemből kimutatott baktériumtörzsek esetében az egyetlen elérhető tanulmány esetében is csupán 7, törzsgyűjteményből származó *P. aeruginosa* izolátum rezisztencia profilja került megállapításra, melyeket 1958 és 1996 között izoláltak. Az esetükben tapasztalt antibiotikum rezisztencia kép alapján a vizsgálatukat végző kutatócsoport arra a következtetésre jutott, hogy a klinikai és környezeti eredetű baktériumtörzsek között az antibiotikum rezisztencia tekintetében nincs jelentős eltérés (ALONSO ET AL., 1999). A komposzt eredetű *P. aeruginosa* izolátumok antibiotikum rezisztenciájára vonatkozó ismereteink szintén korlátozottak. Edrington és munkatársai (2009) elemzése szerint a komposztból izolált *P. aeruginosa* törzsek (11 izolátum vizsgálata alapján) rezisztensek lehetnek ampicillin, florfenicol, sulphachloropiridazin, sulphadimethoxin, és trimethoprim/sulfamethoxazol készítményekre, ugyanakkor ellenállóak chlortetracyclin-re és spectinomycin-re nézve.

A környezeti eredetű törzsek antibiotikum rezisztenciájára vonatkozó információk esetében azonban több kétely is felmerül:

1. A fent említett vizsgálati eredmények adott antibiotikum hatóanyagcsoportra nézve egymásnak sokszor ellentmondó következtetésre jutottak (jellegzetes példa erre a Fluorokinolonok hatékonyságának megítélése, melynek vizsgálata során a CLSI ajánlásainak ellentmondó következtetésre jutottak).
2. A vizsgálatba vont izolátumok azonosítása nem minden esetben molekuláris genetikai alapon történt, így a faj szintű azonosítás kétséges lehet.
3. A *P. aeruginosa* klinikai terápiájában jelentős antibiotikum hatóanyagok (így például a negyedik generációs Cefalosporinok), melyek esetében az antibiotikum rezisztencia fokozódása számottevő következményekkel járhat, több esetben nem kerültek vizsgálatra.

A vonatkozó információk áttekintése alapján indokolt volt tehát egy, a korábbiaknál átfogóbb antibiotikum rezisztencia-vizsgálatsorozat végrehajtása az eddigieknél nagyobb számú környezeti izolátum és több antibiotikum hatóanyag bevonásával, szilárd molekuláris genetikai identifikációra alapozva.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. MINTAVÉTEL

Vizsgálataim során az első és legfontosabb lépés a *P. aeruginosa* baktériumfaj környezeti mintákból történő izolálása volt. A mintavételi helyszínek – alkalmazkodva vizsgálataink céljához – elsősorban **szénhidrogénnel szennyezett kárhelyek** (üzemanyagtöltő állomások, olajipari létesítmények, egykori katonai objektumok), illetve **komposztálási folyamatához kötődő félüzemi kísérleti telepek** voltak, melyekről felszín alatti víz, talaj, biofilter, illetve a komposztálás folyamatához kötődő minták vételezése történt. A vizsgálatba vont területek nem reprezentálják a természeti környezet eredeti állapotát, azonban kellő mértékben jellemzik napjaink agrár-ipari tevékenységeinek következtében átalakult, bolygatott mikrobiális ökoszisztémáját. A továbbiakban így a vizsgálatainkba vont mintákat **antropogén hatás alatt álló közegnek tekintettük**. A 2002-2009. közötti időintervallumban **49, szénhidrogénnel szennyezett kárhely** összesen 235 mintája (földtani közeg - 61, felszín alatti víz - 169, ill. a kármentesítési eljáráshoz kötődő biofilter 5), valamint 17, komposztálási alapanyagnak számító hőerőművi és biogázüzemi melléktermék, 78, érés alatt álló, ill. érett komposzt, továbbá 6, komposzttal kezelt talajminta került feldolgozásra.

3.1.1. Mintavétel szénhidrogénnel szennyezett közegből

A szénhidrogénnel szennyezett környezeti minták *P. aeruginosa* tartalmát talaj, felszín alatti, illetve felszíni víz, továbbá biofilter minták vételezésével és vizsgálatával mértük fel. A mintavételek 2002-2008. között történtek. E periódusban 49 különböző kárhely esetében 88 alkalommal történt mintavétel (1-6 minta alkalmanként); az egyes kármentesítés alatt álló helyszínek esetében a mintavételek száma 1-7 között változott. Összesen 235 szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti vízből, földtani közegből, ill. biofilterből származó minta került feldolgozásra (a mintavételi helyszínek és a vizsgált minták részletes áttekintését lásd az Eredmények fejezet 4.1. sz. táblázatában). A vizsgálatba vont kárhelyek mintázásához a vonatkozó Magyar Szabványokat vettük figyelembe (MSZ 21470-1: 1998, MSZ 21464: 1998). Talaj esetében a talajfúróval kiemelt henger közepéből steril késsel/kanállal, vízminták esetében pedig sterilizált acél golyós mintavevővel vettük a mintákat, melyeket aszeptikus körülmények között, steril mintatartó üvegekben szállítottuk a laboratóriumba.

A mintavételek során a vizsgált közeg tulajdonságait [származási hely, minta azonosítását lehetővé tevő egyedi jelzés, fizikokémiai paraméterek (mintavételi mélység, pH, oldott oxigén, redoxi-potenciál)] jegyzőkönyvben rögzítettük.

A vonatkozó szennyezőanyag koncentráció-értékek (elsősorban TPH) meghatározását a Dr. E. Weßling Kémiai Laboratórium Kft. Környezetanalitikai laboratóriuma (Budapest) végezte, MSZ

EN ISO 9377-2:2001 szabvány [összes alifás szénhidrogén (TPH C5-C40 részletesen) meghatározása a 10/2000. KöM-EüM-FVM-KHVM együttes rendelet 3. és 4. szerint], ill. DIN 38409 H18:1981 (összes alifás szénhidrogén meghatározása FT-IR módszerrel) alapján.

3.1.2. Mintavétel komposztból, komposztálási nyersanyagokból, illetve komposzttal kezelt talajból

A komposztálási eljárásokhoz köthető közegek mintázása komposztálási tartamkísérlet részeként zajlott le, melynek célja ipari és biogáz-üzemi melléktermékek komposzt célú hasznosításának vizsgálata volt. Három mintatípust különböztettünk meg: nyers komposzt alapanyag, érés alatt álló, ill. kész komposzt termék, és komposzttal kezelt talaj. Összesen 101, a komposztálás és komposzt felhasználás valamely szakaszához kötődő minta került elemzésre.

Első lépésben a komposztálási kísérletben felhasználásra tervezett 17 komposzt alapanyag (1 sertés hígtrágya, 6 biogázüzemi maradékanyag, 2 vinasz, 1 gipsz, 1 pernye, 1 salak, 3 fahamu és 2 sűrű zagy) vizsgálatát hajtottuk végre, melyek Magyarország nyolc ipari, komposztáló, illetve energiatermelést célzó létesítményéből származtak (részleteket lásd: Eredmények fejezet, 4.2. sz. táblázatában). Az előzetes laboratóriumi szintű vizsgálatok alapján a fent említett nyersanyagok három különböző keverékével indult félüzemi komposztálási kísérlet, mely nyitott prizmás, ill. levegőztetett prizmás módszer alkalmazásával került beállításra az Eredmények fejezet 4.2. sz. táblázatában ismertetett paraméterek mellett.

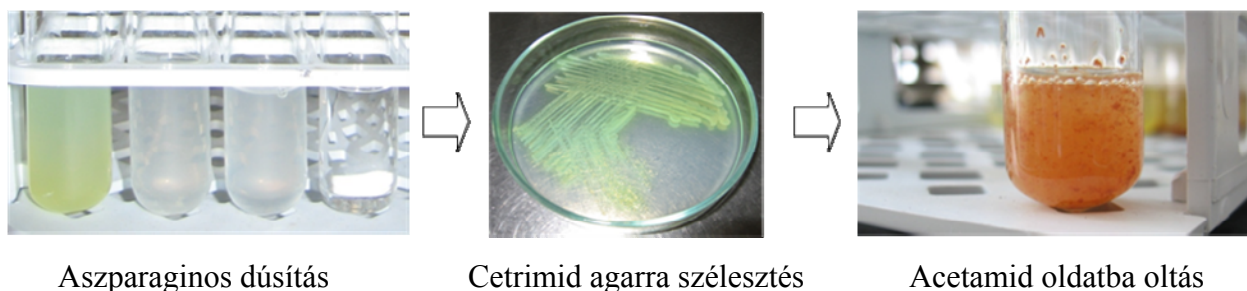
A komposzt prizmák a komposztálás folyamatának minden lényegi fázisában (1., 5., 12., 33., 61., 85. napon) mintázásra kerültek, beleértve a termofil szakaszt, melynek során a komposzt prizmák hőmérséklete elérte az 50,2°C - 68,0°C tartományt (lásd: Eredmények fejezet, 4.1. sz. ábra). 54 minta került begyűjtésre a nyitott prizmás komposztálás folyamatából, további 24 pedig a zárt levegőztetett prizmákból, így összességében 78 különböző, érés alatti, illetve érett komposztból származó minta feldolgozása zajlott le. A komposzttal kezelt talaj vizsgálatára 6, állati eredetű komposzttal kezelt kísérleti parcella mintázása révén volt lehetőségünk.

A szilárd fázisú komposzt és komposzttal kezelt talajminták vételezése a vonatkozó Magyar Szabvány (MSZ 21470-1: 1998) előírásai szerint, aszeptikus körülmények között zajlott.

3.2. A *P. AERUGINOSA* FAJ IZOLÁLÁSA ÉS IDENTIFIKÁLÁSA

3.2.1. A *P. aeruginosa* faj izolálása és azonosítása a vonatkozó Magyar Szabvány alapján

A *P. aeruginosa* faj kimutatását, valamint jellemző élősejtszámának megállapítását a vonatkozó Magyar Szabvány utasításai szerint hajtottuk végre (MSZ 21470-77: 1988) szelektív és differenciáló táptalajokon történő tenyésztés útján. A bakteriális sejtszám meghatározására MPN (Most Probable Number) módszert alkalmaztunk, melynek érdekében a vizsgálatokat három párhuzamos ismétlésben végeztük (HIGHSMITH AND ABSHIRE, 1975). A szabványosított eljárás a 3.1. sz. ábra szemléltetett módon, három lépésben zajlott.



3.1. sz. ábra: A *P. aeruginosa* izolálásának és azonosításának lépései az MSZ 21470-77:1988 alapján (a szerző felvételei, 2007.)

3.2.1.1. Aszparaginos dúsítás

A vizsgált környezeti mintákból készített hígításokat (talaj, ill. iszapszerű anyag esetében a desztillált vízzel készített szuszpenziót) első lépésben aszparaginos dúsító tápoldat (3,0 g L-aszparagin; 1,0 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 10 cm^3 glicerol; 1000 cm^3 desztillált víz; pH: 7,0) kémcsöveibe oltottuk be a *P. aeruginosa* baktériumfaj szelektív felszaporításához. A beoltott aszparaginos dúsítókat $42 \pm 2^\circ C$ hőmérsékleten 48 óráig inkubáltuk.

3.2.1.2. Cetrimid-agar

A szelektációs eljárás következő lépésében az aszparagin oldatban szelektíven felszaporodott mikroszervezeteket cetrimid-agar (MERCK 105284) táptalaj felszínére oltottuk. A cetrimid-agar szelektív jellege a *P. aeruginosa* törzsek ellenállásán alapul a kvaterner ammónia vegyületekkel szemben (QAC-k). Ez a közeg 0,3 g/L cetrimid koncentráció mellett már gátolja a társult Gram-pozitív és Gram-negatív flóra növekedését, míg a *P. aeruginosa* faj minden jelentősebb inhibíció nélkül fejlődik. Esetében a telepek körül először sárgászöld, majd egyre sötétedő (barnuló/feketedő) pigment (piocianin) képződik, mely nagy biztonsággal elkülöníti más mikroszervezetektől. 24 órán keresztül $37 \pm 1^\circ C$ -on történő inkubálás esetén elérhetjük a többi mikroorganizmus szelektív gátlását és a *P. aeruginosa* szelektív felszaporítását.

3.2.1.3. Acetamid tápoldat

Utolsó lépésben a kékeszöld elszíneződésű, diffúz pigmentet termelő telepeket továbboltjuk acetamid tápoldatba (1,0 g acetamid; 5,0 g NaCl; 2,0 g KH_2PO_4 ; 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1000 cm^3 desztillált víz; pH: 6,8). Az acetamid tápoldatot tartalmazó kémcsöveket újabb 24 órára, 37 ± 1 °C-on inkubáljuk. *P. aeruginosa* jelenléte esetén a kémcsövekben az acetamid hidrolízise során ammónia keletkezik. Az ammóniatermelést Nessler-reagens hozzáadásával ellenőrizhetjük; amennyiben sárga, barna elszíneződést, és/vagy csapadékképződést tapasztalunk, megerősíthetjük a *P. aeruginosa* faj jelenlétét a vizsgált környezeti mintában.

3.2.2. A *P. aeruginosa* törzsfenntartása

Az MSZ-szerinti identifikáció során lehetőségünk volt a vizsgált *P. aeruginosa* törzsek izolálására és további vizsgálatok céljából a törzsfenntartásra. A tiszta tenyészetek izolálásához a cetrimid-agar felszínén egymástól 8-10 mm távolságban lévő, különálló, egymás sejtállományával közvetlenül nem érintkező kolóniákat kiizzított oltókacs segítségével ferde TGE-5 agarra (tripton, 5,0 g; élesztőkivonat, 2,5 g; glükóz, 5,0 g; bakteriológiai agar, 15,0 g; desztillált víz, 1000 cm^3 ; pH: 7,0; sterilizálás: 121 °C, 1 atm, 15 min) szélesztettük. A tisztító szélesztést ezt követően még egyszer megismételtük, majd az így nyert tenyészeteket tekintettük önálló sejtvonalnak. A törzstenyészetet a továbbiakban 5-10°C-on, tároltuk. A kísérleti periódus lezárását követően az adott törzstenyészetet -80°C-on glicerolban, ill. liofilizált tenyészet formájában őriztük meg.

3.2.3. A *P. aeruginosa* faj szintű identifikációja molekuláris genetikai módszerrel

A fenotípusos vizsgálatok mellett a törzsgyűjteménybe vett izolátumok faj szintű azonosítását az úgynevezett PA-SS PCR reakció segítségével is végrehajtottuk, melynek során a 16S rDNS V2 és V8 fajspecifikus alegységeinek kimutatását végeztük el. E módszer segítségével a Magyar Szabvány által *P. aeruginosa* fajnak tekintett izolátumok faji hovatartozásáról nyerhettünk megerősítést.

3.2.3.1. Teljes DNS izolálás tiszta tenyészetből

A molekuláris genetikai alapon nyugvó fajazonosításhoz első lépésében FastDNA™ kit (Qbiogene 6540-400) felhasználásával DNS izolálást hajtottunk végre, melynek folyamatában a gyártó útmutatása szerint jártunk el.

3.2.3.2. 16S rDNS fajspecifikus génszakaszának kimutatása PCR reakcióval

A fajspecifikus DNS szakasz amplifikációjához az egyenként 19-bp hosszúságú PA-SS primerpárt használtuk a 3.1. sz. táblázatban részletezett paraméterek mellett (SPILKER ET AL., 2004).

3.1. sz. táblázat: A *P. aeruginosa* törzsek fajazonosítására irányuló PCR reakció paraméterei, ill. az alkalmazott primerek szekvenciái

Gén	Primer szekvenciák	Amplikon (bp)	Specifikáció	Reakcióparaméterek
16S rDNS	F: 5' GGGGGATCTTCGGACCTCA 3' V2 és V8 régió R: 5' TCCTTAGAGTGCCCCACCCG 3'	956	Faj szintű identifikáció	95°C 2' 25x (94°C 25" 58°C 40" 72°C 40") 72°C 1'

A reakcióelegy az alábbi összetevőket tartalmazta: 5,0 µl 10x PCR puffer (Finnzymes F-511), 1,0 µl 10 mM dNTP mix (Finnzymes F-560), 0,5 µl PA-SS-F (100 mM), 0,5 µl PA-SS-R (100 mM), 3 µl 1,5 mM MgCl₂, 2 µl templát DNS, 1,0 µl polimeráz enzim (Finnzymes F-501 DyNAzyme II) és 37 µl nukleázmentes víz.

A PCR termék vizuális vizsgálata agaróz-gél elektroforézissel történt 1x TBE puffer közegben (1x TBE puffer: 10,8 g Tris; 10,5 g bórsav; 0,93 g EDTA-Na; 1000 ml desztillált víz; pH: 8,3), 1%-os agaróz gélen (1 g agaróz, 100 ml 1xTBE puffer, 40 µl 1 mg/ml koncentrációjú ethidium-bromid oldat), OWL-típusú futtatókádban, 100 mV feszültség mellett. A futtatott minták 10 µl PCR terméket és 2 µl STOP kék oldatot (18,6 g EDTA; 20 g sarcosyl; 600 ml glicerin; 0,5 g brómfenolkék; 1000 ml desztillált víz) tartalmaztak.

A további (fenotípusos, ill. molekuláris genetikai) vizsgálatok csak olyan törzsek esetében kerültek végrehajtásra, melyek hagyományos tenyésztéses vizsgálatok mellett molekuláris genetikai módszerrel (PA-SS PCR) is igazoltan a *P. aeruginosa* faj képviselői voltak.

Vizsgálati eredményeinket a nemzetközi szakirodalomban fellelhető információk mellett klinikai eredetű referencia törzsek alkalmazásával is kiegészítettük a módszerek validálása, ill. az értékelési rendszer finomítása érdekében. A munkánk során alkalmazott összehasonlító klinikai izolátumok főbb tulajdonságait foglalja össze a 3.2. sz. táblázat.

3.2. sz. táblázat: A klinikai eredetű *P. aeruginosa* törzsek főbb tulajdonságai

Törzs jele	Izolálás időpontja	Származás
ATCC 27853 (NCAIM B 01876)	1971.	Emberi vér*
KPS-1	2004.	Emberi sebfertőzés**
KPS-2	2004.	Emberi sebfertőzés**
KPS-3	2004.	Emberi sebfertőzés**
KPS-4	2004.	Emberi sebfertőzés**

*American Type Culture Collection, USA (Medeiros, Boston, USA)

**Országos Közegészségügyi Központ - Országos Környezetegészségügyi Intézet, Budapest, Magyarország

3.3. FENOTÍPUSOS VIZSGÁLATOK

A környezeti izolátumok morfológiai sajátosságainak rögzítése érdekében hagyományos fenotípusos vizsgálatokat, így telepmorfológiai felvételezést, illetve tokképzés detektálására irányuló vizsgálatokat is végeztünk. A tokképzés megállapítását indokolta, hogy a β (1-4) kötődésű D-mannuronsav és L-glukuronsav monomerjeiből felépülő alginát tokkal rendelkező, ún. mucoid

jellegű izolátumok jellemzően nagyobb ellenállóképességgel rendelkeznek az antimikrobiális hatóanyagokkal, ill. a gazdaszervezet immunreakcióival szemben, mint a tokképzést nem mutató törzsek (RUSSEL AND GACESA, 1988, OWLIA ET AL., 2001). A morfológiai sajátosságok összehasonlító értékeléséhez öt, kórházi eredetű *P. aeruginosa* izolátum (ATCC 27853, KPS-1, KPS-2, KPS-3, KPS-4; részletes tulajdonságaikat lásd a 3.2. sz. táblázatban) szolgált alapul.

Az izolátumok telepmorfológiájának felvétele a tiszta sejt kultúrák nutrient agarra (MERCK 100075) történő szélesztésével, majd 18 h, 37 °C (overnight) inkubációt követően vizuális értékeléssel történt. A tokképzés ellenőrzésére irányuló vizsgálatokat Anthony-féle tokfestési eljárással hajtottuk végre (CAPPUCCINO AND SHERMAN, 2008). A folyamat első lépésében a vizsgálandó tiszta tenyészeteket 48 órás sovány tejport tartalmazó mediumban (MERCK 4311915) felszaporítottuk, majd vékony rétegben, hővel történő fixálás nélkül tárgylemezre szárítottuk. Az így nyert preparátumot Ziehl-Neelsen-féle karbols fukszin (2,5 g bázikus fukszin; 250,0 ml desztillált víz, 25,0 ml 100%-os alkohol, 12,5 ml oldott fenol kristály) oldattal kezeltük, majd 20 w/v% CuSO₄ (MERCK 102791) oldattal színtelenítettük. A vizuális értékelést fénymikroszkópos módszerrel, Zeiss Amplitval Apochromat 100 fénymikroszkóppal, olaj immerziós lencse alatt, 100x nagyításban végeztük.

3.4. VIRULENCIA FAKTOROK VIZSGÁLATA

A *P. aeruginosa* fajra jellemző számos virulencia faktor közül doktori témám keretében a patogenezis kialakításában legnagyobb jelentőséggel bíró exotoxinokat (ExoA és ExoU) és exoenzimeket (ExoS, ExoT és ExoY) kódoló génszakaszok (*exoA*, *exoU*, *exoS*, *exoT* és *exoY*) jelenlétét, ill. hiányát, továbbá a béta-hemolízis intenzitását vizsgáltam a szénhidrogénnel szennyezett területről származó, ill. komposzt eredetű környezeti törzsek között.

3.4.1. Hemolitikus aktivitás vizsgálata

A hemolízis vizsgálata során defibrinált birkavérrel kiegészített Columbia véragar lemezekkel (Heipha-Diagnostica) dolgoztunk (23,0 g speciális tápanyag szubsztrát; 1,0 g keményítő; 5,0 g NaCl; 13,0 g bakteriológiai agar; 1000 cm³ desztillált víz; 5 v/v% defibrinált birkavér, pH: 7,3±0,2).

A vizsgálatba vont *P. aeruginosa* törzseket fémkacsal, steril körülmények között szélesztettük a véragar lemez felszínére, majd 6, 22, illetve 48 órás, 37°C-on végzett inkubációt követően az átvilágított lemezekről leolvastuk az eredményeket. A vizsgálat során megfigyelhető volt a baktériumtörzsek növekedése, annak mértéke, illetve a hemolitikus aktivitás megjelenése, típusa és a béta-hemolízis mértéke. A hemolitikus aktivitás értékelése során figyelembe vettük, hogy adott baktériumtörzs hány óra inkubációs idő elteltével volt képes telepképzésre, illetve hemolitikus aktivitás kifejtésére az alkalmazott tápközegen, melynek megítélésakor a gyártó (Heipha-

Diagnostica) utasításai alapján a 22 órás leolvasást tekintettük mérvadónak. A hemolízis intenzitásának jellemzésére ötfokozatú skálát alkalmaztunk az alábbiak szerint:

- nincs hemolízis
- +/- kétséges hemolízis
- + gyenge hemolízis
- ++ hemolízis
- +++ intenzív hemolízis

A környezeti izolátumok esetében tapasztalt bakteriális növekedést és hemolitikus aktivitást 5, klinikai környezetből izolált (igazoltan humán patogén) *P. aeruginosa* törzs (ATCC 27853, KPS-1, KPS-2, KPS-3, KPS-4, részletes tulajdonságait lásd a 3.2. sz. táblázatban) azonos körülmények között megállapított eredményeivel vetettük össze a klinikai és környezeti törzsek közötti összefüggések feltárása érdekében.

3.4.2. Exotoxinok és exoenzimek termeléséért felelős génszakaszok kimutatása

A kiválasztott exotoxinok és exoenzimek termeléséért felelős génszakaszok vizsgálatához első lépésben a vizsgálandó baktériumtörzsekből teljes DNS-t izoláltunk a 3.2.2.1. alfejezetben ismertetett módszerrel megegyező módon. A kívánt DNS-szakaszok amplifikációjához PCR reakciót hajtottunk végre a 3.3. sz. táblázatban részletezett specifikációk figyelembe vételével.

3.3. sz. táblázat: A *P. aeruginosa* törzsek virulencia faktorainak vizsgálatára irányuló PCR reakcióiban használt primerek szekvenciái, ill. az alkalmazott reakcióparaméterek

Gén	Primer szekvenciák	Amplikon (bp)	Specifikáció	Reakcióparaméterek	
<i>exoA</i> *	F: 5' AAC CAG CTC AGC CAC ATG TC R: 5' CGC TGG CCC ATT CGC TCC AGC GCT	3'	396	Exotoxin A kódoló génszakasz azonosítása	95°C 2' 30x (94°C 1' 68°C 1' 72°C 1') 72°C 7'
<i>exoS</i> **	F: 5' GCG AGG TCA GCA GAG TAT CG R: 5' TTC GGC GTC ACT GTG GAT GC	3'	118	Exotoxin S kódoló génszakasz azonosítása	94°C 2' 36x (94°C 30" 58°C 30" 68°C 1') 68°C 7'
<i>exoT</i> **	F: 5' AAT CGC CGT CCA ACT GCA TGC G R: 5' TGT TCG CCG AGG TAC TGC TC	3'	152	Exotoxin T kódoló génszakasz azonosítása	94°C 2' 36x (94°C 30" 58°C 30" 68°C 1') 68°C 7'
<i>exoY</i> **	F: 5' CGG ATT CTA TGG CAG GGA GG R: 5' GCC CTT GAT GCA CTC GAC CA	3'	289	Exotoxin Y kódoló génszakasz azonosítása	94°C 2' 36x (94°C 30" 58°C 30" 68°C 1') 68°C 7'
<i>exoU</i> **	F: 5' CCG TTG TGG TGC CGT TGA AG R: 5' CCA GAT GTT CAC CGA CTC GC	3'	134	Exotoxin U kódoló génszakasz azonosítása	94°C 2' 36x (94°C 30" 58°C 30" 68°C 1') 68°C 7'

*ATZÉL ET AL., 2007;

**AJAYI ET AL., 2003

A reakcióelegy az alábbi összetevőket tartalmazta: 5,0 µl 10x PCR puffer (Finnzymes F-511); 10,0 µl 1 mM dNTP mix (Finnzymes F-560); 0,5 µl Forward (100 pM); 0,5 µl Reverz (100 pM) primer; 3 µl 1,5 mM MgCl₂; 2 µl templát DNS; 1,0 µl polimeráz enzim (Finnzymes F-501 DyNAzyme II) és 28 µl nukleázmentes víz.

Az eredmények vizuális értékelése a 3.2.2.3. alfejezetben ismertetett módon történt, pozitív kontrollként szolgált az *exoA*, *exoS*, *exoT* és *exoY* esetében a 3.2. sz. táblázatban ismertetett ATCC 27853 jelzésű típus törzs, *exoU* esetében pedig a KPS-3 jelzésű klinikai izolátum.

3.5. ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA VIZSGÁLATOK

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok végrehajtásakor a vonatkozó szakirodalom áttekintése alapján számos szabványosított módszert és lehetséges antibiotikum hatóanyagot választhattunk.

A vizsgálatsorozatot ezért két jól elkülöníthető szakaszra osztottuk: első lépésben 9 hatóanyagcsoport (Penicillinek, Carbapenemek, Cefalosporinok, Aminoglikozidok, Szulfonamidok, Kinolonok, Tetraciklinek, Amfenikolok, Nitrofurán-származékok) 31 készítményét (lásd: 3.4. táblázat) felölelő, áttekintő, szemikvantitatív vizsgálatot hajtottunk végre korongdiffúziós módszerrel.

3.4. sz. táblázat: A korongdiffúziós tesztben alkalmazott antibiotikum hatóanyagok, ill. terápiás megítélésük (MOSKOWITZ ET AL., 2005; SADER ET AL., 2001; WILSON AND DOWLING, 1998)

Antibiotikum hatóanyagok			Terápiás megítélése a <i>P. aeruginosa</i> kezelésében
Főcsoport	Alcsoport	Hatóanyag neve	
PENICILLINEK	széles spektrumú	ampicillin	Első választásba eső*
		mezlocillin	
	Pseudomonas-ellenes	azlocillin	
		carbenicillin	
laktamáz-gátlóval kombinált	piperacillin		
CARBAPENEMEK		augmentin	Alternatív**
		imipenem	
		meropenem	
CEFALOSPORINOK	első generáció	cephalexin	Első választásba eső*
	második generáció	cefachlor	Első választásba eső*
		cefuroxim	
		cefamandol	
	harmadik generáció	cefotaxim	Első választásba eső*
		ceftriaxon	
ceftazidim			
AMINOGLIKOZIDOK		cefoperazon	
		amikacin	Alternatív**
		gentamicin	
		netilmicin	
	tobramycin		
SZULFONAMIDOK		trimethoprim/sulfamethoxazole	Első választásba eső*
		polimyxin B	
KINOLONOK	"A" nem fluorozott:	nalidixinsav	Első választásba eső*
	"B" fluorozott:	norfloxacín	
	"C" fluorozott:	ciprofloxacín	
		ofloxacín	
	pefloxacín		
TETRACIKLINEK		tetraciklin	Első választásba eső*
AMFENIKOLOK		chloramphenicol	Nem javasolt***
NITROFURAN-SZÁRMAZÉKOK		nitrofurantoin	Nem javasolt***

*az orvosi gyakorlatban a *P. aeruginosa* terápiájában első választásba eső hatóanyagok

**az orvosi gyakorlatban a *P. aeruginosa* terápiájában második választásba eső hatóanyagok

*** az orvosi gyakorlatban a *P. aeruginosa* terápiájában nem alkalmazott hatóanyagok
szürke szín – Minimális Gátló Koncentráció meghatározására kijelölt antibiotikumok

A korongdiffúziós tesztekben vizsgálatba vontuk a szakirodalom által a *P. aeruginosa* kezelésében hatékonynak tekintett, ill. a klinikai gyakorlatban rutin eljárás keretében rendszeresen vizsgált antibiotikum hatóanyagcsoportokat.

Az elővizsgálatok eredményei alapján egyes hatóanyagok, ill. csoportok (így az I. és II. generációs Cefalosporinok, Tetraciklinek) teljeskörű hatástalanságuk, mások, mint a polimyxin B ismert humán toxikus hatásuk miatt a további vizsgálatokból kizárásra kerültek, így vizsgálatosorozatunk második lépésében kvantitatív, **MIC meghatározásra irányuló tesztjeinkbe az antibiotikum hatóanyagok egy szűkebb körét vontuk be** (3.4. táblázat, szürke színnel jelölt sorok). Ezek között szerepel egy korongdiffúziós tesztben nem vizsgált, újjól alkalmazott készítmény, a negyedik generációs Cefalosporinok közé tartozó cefepim.

3.5.1. Korongdiffúziós vizsgálatok

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok első lépéseként végrehajtott korongdiffúziós eljárásban felhasznált, antibiotikummal átitatott tesztkorongokat a Biolab Rt. (Budapest) cégtől szereztük be, táptalajként pedig Mueller-Hinton agart (MERCK 105435) használtunk. A módszer végrehajtása során a National Committee for Clinical Laboratory Standards (USA, Suite, Wayne, Pennsylvania, mai nevén Clinical Laboratory Standards Institute) nemzetközileg elfogadott metodikáját és értékelési rendszerét vettük alapul (NCCLS, 2000; NCCLS, 2001). A vizsgálatok során referencia törzsként az ATCC 27853 törzsgyűjteményi jellel ellátott klinikai izolátumot (lásd: 3.2. sz. táblázat) alkalmaztuk. A vizsgálat segítségével áttekintő információt nyertünk 34, környezeti mintákból izolált *P. aeruginosa* törzs rezisztenciájáról (részleteket lásd az Eredmények fejezet 4.1. sz. táblázatában).

3.5.2. Minimális Gátló Koncentrációk meghatározása

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok második lépésében a Minimális Gátló Koncentrációk (MIC értékek) in vitro megállapítása történt Etest® (E-teszt) (AB Biodisk, Solna, Svédország) módszerrel, a Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI nemzetközileg elfogadott metodikáját, ill. a gyártó utasításait követve (CLSI, 2006). A vizsgálatokban a 3.5. alfejezetben ismertetett módon kiválasztott, **öt hatóanyagcsoportba** (Penicillinek, Carbapenemek, Cefalosporinok, Aminoglikozidok, Kinolonok) **tartozó 10 készítmény** (piperacillin, imipenem, cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim, cefoperazon, cefepim, gentamicin, ciprofloxacín, ofloxacín) vett részt. E hatóanyagok reprezentatív módon képviselik a *P. aeruginosa* esetében jelenleg terápiás jelentőséggel bíró csoportokat, így szénhidrogénnel szennyezett területről származó, ill. komposzt eredetű törzsre vonatkoztatott megállapításainkat e készítmények MIC értékei alapján tettük.

A vizsgálatba vont törzseket overnight módon, szilárd nutrient tápközeg felszínére szélesztve felszaporítottuk, majd az izolált telepek segítségével standard sorhoz (bioMérieux) viszonyítva fiziológiás sóoldatban 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ CFU) zavarosságú baktérium-szuspenziót készítettünk (MCFARLAND, 1907). Az így nyert homogén baktérium-elegyet steril vattapálca segítségével 20 ml Mueller-Hinton agart (MERCK 105435) tartalmazó, 9 cm átmérőjű petri csészékbe szélesztettük, majd a baktérium-gyepre helyeztük az adott antibiotikum hatóanyagot koncentráció-grádiens mentén tartalmazó E-teszt csíkokat (1 tesztsík/petri-csésze). Ezt követően a lemezeket a gyártó ajánlása szerint a vizsgált fajra jellemző körülmények között (16-20 h, $37 \pm 2^\circ\text{C}$) inkubáltuk.

Az inkubációs idő leteltével a tesztsík körül kialakuló szimmetrikus gátlási ellipszis, illetve a tesztsík metszéspontjában (töréspont, breakpoint) a Minimális Gátló Koncentráció érték leolvasható. Kétes eseteknél a gyártó (AbBiodisk) utasításainak megfelelően végeztük a leolvasást (HTTP3).

A Minimális Gátló Koncentráció értékeket a CLSI által kiadott „Performance Standards” útmutató alapján értékeltük, miszerint adott törzs besorolása a tapasztalt MIC érték függvényében érzékeny, átmeneti, ill. rezisztens lehet (CLSI, 2007). Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok minőségellenőrzésére a nemzetközileg elfogadott, ATCC 27853 törzsgyűjteményi jellel ellátott *P. aeruginosa* referencia törzset alkalmaztuk. A klinikai törzsekkel való összevetés érdekében további négy klinikai *P. aeruginosa* izolátum (KPS-1, KPS-2, KPS-3, KPS-4) került vizsgálatra (lásd 3.2. sz. táblázat).

3.5.3. Az antibiotikum rezisztencia hátterének felderítésére irányuló vizsgálatok

A fenotípusos módszerrel (E-teszt) megnyilvánuló antibiotikum rezisztencia lehetséges hátterének feltárása érdekében munkánk során további kísérleteket végeztünk. Vizsgálataink a Béta-laktám antibiotikumokkal, ill. Carbapenemekkel szemben rezisztens izolátumokra, ezen belül is a béta-laktamáz típusú, rezisztenciáért felelős enzimek kimutatására fókuszáltak, mivel a szakirodalmi álláspont szerint ezen enzimek termelése a többszörös antibiotikum rezisztencia szempontjából kiemelkedő jelentőségű (SHAH ET AL., 2004).

Az **ESBL** (széles spektrumú béta-laktamáz), és **MBL** (metallo béta-laktamáz) termelés, mint a Béta-laktám, ill. Carbapenem típusú antibiotikumok hatástalanságáért felelős rezisztencia mechanizmusok, fenotípusos módszerrel kerültek elemzésre. Esetükben minden olyan környezeti izolátumot vizsgálatba vontunk, mely MIC értéke alapján valamely vizsgált Béta-laktám, ill. Carbapenem hatóanyag esetében rezisztenciát mutatott.

Az *in vitro* tesztek kivitelezéséhez az AbBiodisk (Solna, Svédország) által forgalmazott kombinált E-teszt csíkok kerültek felhasználásra, melyek az E-teszthez hasonló módon a tesztsík egyik oldalán koncentráció gradiens mentén tartalmazzák az adott antibiotikum hatóanyagot. A

tesztcsík ellentétes oldalán az adott készítmény széles spektrumú béta-laktamáz, ill. metallo béta-laktamáz inhibitorral kombinálva került impregnálásra, mely ESBL esetében klavulánsav, MBL esetében etiléndiamin-tetraecetsav volt. Béta-laktamáz termelése esetén tehát a tesztcsík két végén tapasztalható MIC értékek tekintetében eltérést kell, hogy tapasztaljunk. Az eredmények értékelésekor a gyártó utasításainak megfelelően jártunk el, így amennyiben a két koncentrációgrádiens mentén mért MIC értékek közötti eltérés nagyobb vagy egyenlő volt, mint 8, az ESBL, ill. MBL termelés a teszt alapján fenotípusosan igazoltnak tekintettük.

Az ESBL és MBL termelésre irányuló vizsgálatok során a kísérleti és inkubációs körülmények a 3.5.2. alfejezetben, az E-teszt módszernél ismertetett módon és azonos minőség-ellenőrzés mellett zajlottak.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A *P. AERUGINOSA* KÖRNYEZETI GYAKORISÁGA, JELLEMZŐ ÉLŐSEJT-SZÁMA

A *P. aeruginosa* faj környezeti kimutathatóságára vonatkozó információkat a vizsgált környezeti mintákra (szénhidrogénnel szennyezett közeg, komposzthoz kötődő közeg) nézve az alábbi alfejezetekben ismertetem. A kimutatási gyakoriságot a vonatkozó Magyar Szabvány alapján végzett fenotípusos izolálás és identifikáció eredményei alapján értékeltem, a további szöveges és számszerű, a *P. aeruginosa* kimutatási gyakoriságáról szóló eredmények tehát az MSZ 21470-77: 1988 alapján végzett identifikáción alapulnak.

Munkánk első fázisában a célkitűzésekben vázolt, antropogén hatás alatt álló közegek vizsgálata mellett lehetőségünk nyílt **nem szennyezett, természetközeli állapotban lévő** (elsősorban természetvédelmi oltalom alatt álló területekről származó) **talajminták** vizsgálatára is. A vizsgált 27, földtani közegből származó minta esetében (melyek részletes tulajdonságait a 2. Melléklet 5.1. sz. táblázata tartalmazza) azonban az általunk használt módszerekkel a *P. aeruginosa* faj nem volt detektálható.

4.1.1. A *P. aeruginosa* kimutatási gyakorisága szénhidrogénnel szennyezett kárhelyeken

A *P. aeruginosa* szénhidrogénnel szennyezett közegből történő kimutatására irányuló mintavételi, mintafeldolgozási vizsgálatok eredményeit foglalja össze a 4.1. sz. táblázat. A szénhidrogénnel szennyezett területeken végzett *P. aeruginosa* detektálás során a 2002-2008. közötti kísérleti időszakban vizsgálatba vont 49 kárhelyből a vonatkozó Magyar Szabvány előírásait követő izolálási eljárás alapján 34 helyszín esetében tapasztaltunk legalább egy mintavételi alkalommal mérhető *P. aeruginosa* számot, mely 69,3% kimutatási gyakoriságot jelent. A vizsgált mintaszámra (88 mintavétel, 235 minta) vonatkoztatott eredmények alapján elmondható, hogy a **szénhidrogénnel szennyezett földtani közeg, felszín alatti víz, ill. biofilter minták 33,6%-a tartalmazott** az általunk végrehajtott izolálási eljárással kimutatható mennyiségben *P. aeruginosa* fajt. A bakteriális sejtszám felső határa elérte a 10 000 MPN/g, ill. ml nagyságrendet (lásd: 4.1. sz. táblázat).

A *P. aeruginosa* szénhidrogénnel szennyezett területen való kimutathatósági gyakoriságára nézve csupán kevés információ állt rendelkezésre a szakirodalomban. Eredményeinket így csupán egy, szénhidrogénnel szennyezett kárhely (U.S. Naval Weapons Station, Kalifornia) 8 mintavételi pontjából gyűjtött izolátumai között mérhető *P. aeruginosa* gyakorisággal (RIDGWAY ET AL., 1990) vethettük össze. Az összevetés alapját képező kutatómunka esetében a vizsgált 8 monitoring kútból 6-ból volt sikeres az izolálás, mely 244 törzs azonosítását tette lehetővé. Tenyésztéses és biokémiai

fajazonosítás alapján ezen izolátumok 48,4%-a *P. aeruginosa* volt. A *P. aeruginosa* kimutathatóságára irányuló vizsgálataink alapján ez a szakirodalomban fellelhető, csupán kis mintaszámra vonatkozó kijelentés pontosítást nyert, így megállapítható, hogy **szénhidrogénnel szennyezett területeken a *P. aeruginosa* baktériumfaj** – 69,3%-ban kárhelyre, 33,6%-ban mintaszámra vonatkoztatva – **izolálható**. A vizsgálatba vont kárhelyek és környezeti minták körének bővítésével a jövőben ez az általunk megállapított kimutathatósági gyakoriság tovább pontosítható.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.1.1. fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(1. tézis) 49, szénhidrogénnel szennyezett kárhely 235 mintájának vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a szabványos izolálási és identifikálási módszerekkel a *P. aeruginosa* a vizsgált kárhelyek 69,3%-án volt legalább egy esetben detektálható, míg a vizsgált összes minta esetében 34,0%-os kimutatási gyakoriság volt jellemző. Az eredmény kisebb elemszámra vonatkoztatott megállapításait nemzetközi publikációban adtuk közre (KASZAB ET AL., 2010A).

4.1. sz. táblázat: A *P. aeruginosa* kimutatási gyakorisága és jellemző élősejt-száma szénhidrogénnel szennyezett kárhelyeken

Kárhely sorszáma	Település	Kárhely jellege	Mintavételi időszak	Mintavételek száma	Minták száma (db), jellege	Maximális TPH (C ₅₋₄₀) koncentráció (mg/kg, µg/dm ³)	<i>P. aeruginosa</i> detektálás (mintaszám/ eset)	<i>P. aeruginosa</i> MPN/g, ml	Izolált törzsek
1	Algyő	KÜL	2004., 2008.	2	1 CHT 2 CHV	569	3/1	10	P39
2	Barcs	KÜL	2007., 2008.	2	8 CHV	917	8/0	nem mérhető	-
3	Bátonyterenye	BEL	2003., 2005.	2	3 CHT 6 CHV	938	9/2	n.d.	P49, P50
4	Biharkeresztes	BEL	2007.	6	16 CHV	750	16/0	nem mérhető	-
5	Budapest I	BEL	2005.	1	3 CHV	27500	3/2	0,36-4,3	P45, P46
6	Budapest II	KÜL	2002.	1	1 CHV	17400	1/0	nem mérhető	-
7	Budapest III	KÜL	2002.	1	1 CHT	20042	1/1	142	-
8	Budapest IV	KÜL	2002.	1	2 CHV	2150	2/2	82,4-693	-
9	Budapest V	KÜL	2002.	1	1 CHV	1020	1/1	103	-
10	Csenger	KÜL	2003., 2007.	2	1 CHT 2 CHV	1270	3/0	nem mérhető	-
11	Csillaghegy	KÜL	2002.	1	1 CHT	4430	1/0	nem mérhető	-
12	Debrecen	BEL	2007.	1	2 CHV	4880	2/1	4,3	P71
13	Dévaványa	KÜL	2003.	1	3 CHT	3660	3/0	nem mérhető	-
14	Diósd	KÜL	2002.	2	4 CHV	630	4/4	10-100	P2, P9, P10, P11
15	Eger I	BEL	2008.	1	4 CHV	87	4/2	0,36	-
16	Eger II	BEL	2008.	1	2 CHV	299	2/0	nem mérhető	-
17	Galgaguta	KÜL	2003.	1	3 CHT	6190	3/3	1-1000	-
18	Garé	KÜL	2002.	1	1 CHT	1555	1/1	862	-
19	Hajdúböszörmény	BEL	2006.	2	3 CHT 2 CHV	6140	5/1	0,61	-
20	Hajdúdorog	KÜL	2003.	2	3 CHT	11700	3/2	1-100	-
21	Hosszúpályi	KÜL	2003	1	1 CHT	10800	1/1	100	-
22	Karcag	KÜL	2005.	1	2 CHV	6140	2/2	0,36	-
23	Kiskundorozsma	KÜL	2003.	1	3 CHT	218	3/0	nem mérhető	-
24	Kiskunlacháza	KÜL	2002.	1	1 CHT	2360	1/1	5940	-
25	Komádi	KÜL	2003-2006.	3	1CHT 4 CHV	362	5/4	10-100	P31, P32
26	Lovasberény	KÜL	2002.	1	1 CHT	2520	1/1	214	-
27	Mátészalka	KÜL	2002.	1	2 CHT	18190	2/1	11,2	-
28	Mesterszállás	BEL	2006.	1	2 CHV	146	2/0	nem mérhető	-
29	Mezőtúr	BEL	2005.	1	1 CHT	705	1/1	1000	P42
30	Nagyszénás	KÜL	2007.	2	1 CHT 2 CHV	3630	3/2	9,3-1100	P69, P70
31	Ópusztaszer	KÜL	2004-2006.	7	2 CHT 24 CHV	8500	26/3	29-100	P38, P43
32	Polgár	KÜL	2003.	1	4 CHT	13500	4/0	nem mérhető	-
33	Püspökladány	KÜL	2003.	1	3 CHT	7300	3/2	100-10000	P28

4.1. sz. táblázat, folytatás

Kárhely sorszáma	Település	Kárhely jellege	Mintavételi időszak	Mintavételek száma	Minták száma (db), jellege	Maximális TPH (C ₅₋₄₀) koncentráció (mg/kg, µg/dm ³)	<i>P. aeruginosa</i> detektálás (mintaszám/eset)	<i>P. aeruginosa</i> MPN/g, ml	Izolált törzsek
34	Siklós	BEL	2008.	2	4 CHV	9990	4/2	2-2,3	-
35	Szabadszállás	BEL	2004.	2	4 CHT	78500	4/4	10-1000	P30, P35, P36, P37
36	Szarvas I	BEL	2006.	1	2 CHV	18500	2/0	nem mérhető	-
37	Szarvas II	KÜL	2006-2007.	4	16 CHV	>100000	16/6	0,73-240	P62, P78, P79
38	Székesfehérvár I	KÜL	2007.	1	4 CHV	3620	4/0	nem mérhető	-
39	Székesfehérvár II	BEL	2008	1	4 CHV	7670	4/2	0,36	-
40	Szigetszentmiklós	KÜL	2002.	1	1 CHT	10200	1/1	789	-
41	Tata	KÜL	2002.	1	1 CHT	42472	1/1	22400	-
42	Tiszafüred	KÜL	2002.	1	1 CHT	4820	1/1	643	-
43	Tiszalök	KÜL	2003.	1	1 CHT	1800	1/0	nem mérhető	-
44	Tiszaújváros	KÜL	2005.	1	6 CHV	57800	6/0	nem mérhető	-
45	Tököl	KÜL	2003-2004.	6	10 CHT 5 BF	16800	15/11	1-4460	P14, P15, P16, P17, P18, P33
46	Túrkeve	KÜL	2003.	1	2 CHT	11300	2/2	10	P22
47	Zalaegerszeg I	KÜL	2006., 2008.	2	12 CHV	63500	12/2	15-43	P53
48	Zalaegerszeg II	BEL	2006-2007.	8	32 CHV	31400	32/6	0,36-4,3	P65, P66, P77
49	Zalaszentlászló	KÜL	2002.	1	1 CHT	14600	1/1	36,3	-
Összesen	49 kárhely	35 KÜL 14 BEL	2002-2008. időszak	88 mintavétel	235 minta: 61 CHT 169 CHV 5 BF	maximális TPH (C₅₋₄₀): 87 - >100000 mg/kg; µg/dm³	<i>P. aeruginosa</i> detektálás: 49/34 kárhelyen (69,3%) 235/40 mintában (34,0%)	<i>P. aeruginosa</i> szám: 10-10000 MPN/g, ml	36 izolátum

BEL- belterület, KÜL- külterület; CHT- szénhidrogénnel szennyezett talaj; CHV- szénhidrogénnel szennyezett talajvíz; BF-biofilter; n.d.- nincs adat

4.1.2. A *P. aeruginosa* kimutathatósági gyakorisága a komposztálás folyamata során

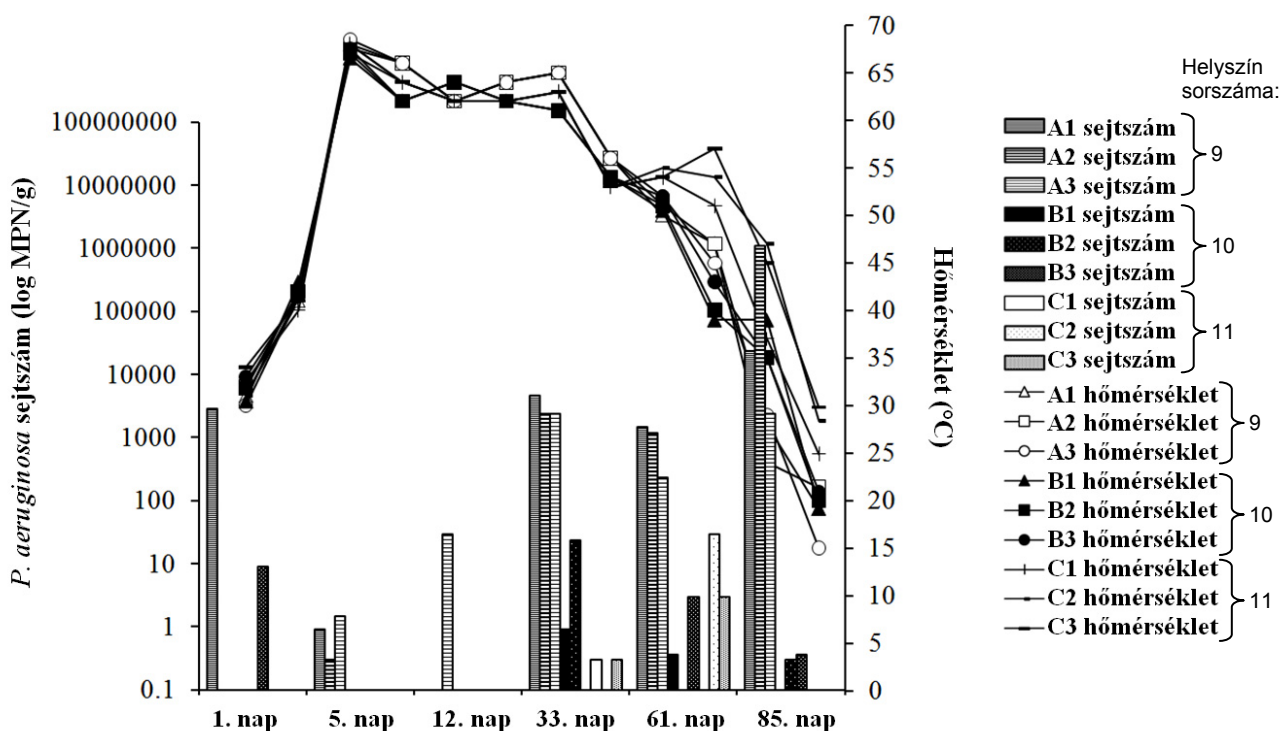
A *P. aeruginosa* komposzthoz kötődő mintákból való kimutatáshatóságára vonatkozó értékek megállapításánál - a szénhidrogénnel szennyezett területeknél alkalmazott módszert követve - az MSZ 21470-77: 1988 alapján végzett identifikáció eredményeire hagyatkoztunk. Ezeket az eredményeiket foglalja össze a 4.2. sz. táblázat.

Vizsgálataink alapján megállapítható volt, hogy a komposztálás nyersanyagául szolgáló 17 különböző, biogáz-üzemi, mezőgazdasági, illetve hőerőművi hulladék, melléktermék (1 sertés hígtrágya, 6 biogázüzemi maradékanyag, 2 vinasz, 1 gipsz, 1 pernye, 1 salak, 3 fahamu és 2 sűrű zagy) jellemzően nem tartalmazott kimutatható mennyiségben *P. aeruginosa*-t. Kivételt képezett ez alól egy minta, a 8. sorszámmal ellátott mintavételi helyszínről származó biogázüzemi melléktermék (hulladék szalma), melynek esetében a *P. aeruginosa* faj relatíve magas, 1000 MPN/g szilárd minta nagyságrendben volt kimutatható. Az ipari, mezőgazdasági és energiatermelési melléktermékek, mint komposztálási alapanyagok esetében így 5,8%-os kimutatási arányt állapítottunk meg.

A komposztálás folyamata során gyűjtött 78 érés alatt álló, ill. érett komposzt minta esetében megállapított **kimutatási gyakoriság 56,4% volt. Nyitott prizmás eljárás esetében (54 minta) 53,7%, míg zárt, levegőztetett rendszernél (24 minta) 29,1%-ban tartalmaztak a minták a *P. aeruginosa* fajt.** Vizsgálataink alapján a komposztálás folyamata során a jellemző sejtszám nyitott prizmás eljárás esetén 10-1 000 000 MPN/g, zárt, levegőztetett módszer mellett 10-10000 MPN/g szilárd minta értékek között változott. Megállapítható tehát, hogy a választott komposztálási módszer jelentősen befolyásolja a *P. aeruginosa* felszaporodását és a zárt technológia hatékonyabban eliminálja a faj képviselőit, mint a nyitott prizmás komposztálás.

A tapasztalt *P. aeruginosa* szám és a komposztálás során érvényesülő aktuális hőmérséklet közötti összefüggés áttekintésére az 4.2. sz. táblázatban 9-11. sorszámmal ellátott, három párhuzamos mérésben beállított nyitott prizmás komposztálási kísérletek alatt volt lehetőségünk (A1, A2, A3, B1, B2, B3 és C1, C2, C3 jelzésű prizmák). Ennek eredményeit szemlélteti a 4.1. sz. ábra. A 4.1. sz. ábra alapján megállapítható, hogy a komposztálási időszakban a ***P. aeruginosa* szám folyamatosan változott** és a tapasztalt értékeket jelentős mértékben – bár nem kizárólagosan – **befolyásolta a komposzt prizmák aktuális hőmérséklete.** Ezt támasztja alá, hogy a komposztálási kísérlet 5-12. napján, tehát az 55 °C feletti hőmérséklettel jellemezhető termofil szakaszban a tapasztalt *P. aeruginosa* szám nem haladta meg a 100 MPN/g szilárd minta nagyságrendet, ill. a 12. napon a vizsgált 9 prizma közül csupán egy esetében (B2) maradt detektálható a faj. A komposztálás 33-85. napja között a *P. aeruginosa* azonban ismét mindhárom kísérleti beállítás legalább egyik prizmájában kimutatható nagyságrendet ért el és jelentős (1000-

1 000 000 MPN/g szilárd minta nagyságrend) sejtszámot tapasztaltunk az A1, A2 és A3 jelölésű prizmákban (ld: 4.2. sz. táblázat, ill. 4.1. sz. ábra).



4.1. sz. ábra: A nyitott prizmás komposztálási folyamat (Kecskemét) során mérhető hőmérsékletek (°C) és a tapasztalt *P. aeruginosa* szám (log MPN/g) 3 párhuzamos prizma (A1-A2-A3; B1-B2-B3; C1-C2-C3) eredményei alapján

Eredményeink alapján megállapítható, hogy bár a termofil fázis jelentősen csökkent a *P. aeruginosa* sejtszámát, ám a megfelelő izolálási és dúsítási eljárás segítségével **a faj képviselői a komposztálás teljes folyamatában kimutathatóak maradnak.** Ez a tény ellentétben áll a VAN HEERDEN és munkatársai (2002) által kialakított feltételezéssel, miszerint a *P. aeruginosa* csak a végső komposzt termékben jelennek meg, az érés folyamatában nem. Azonban az említett publikáció nem alkalmazott dúsítási eljárást a *P. aeruginosa* komposzt mintákból történő detektálására. Saját, dúsításon alapuló vizsgálataink alapján a faj egyes törzsei tehát a DROFFNER és munkatársai (1995) által igazolt módon **nem csupán túlélhetik a termofil szakaszt, hanem szaporodhatnak is annak során** és a kész komposzt termékben is kimutathatóak (ld: 4.1. sz. ábra 85. napra vonatkozó eredményei).

Komposztal kezelte talaj esetében a *P. aeruginosa* kimutatási gyakorisága 83,3% volt, azaz a vizsgált 6 mintából 5 esetében a faj kimutathatónak bizonyult (lásd 4.2. sz. táblázat). A jellemző sejtszám 10^0 - 10^2 /g MPN talaj értékek között mozgott. A *P. aeruginosa* jelenléte ugyanakkor talajparcellák esetében nem csupán a komposzt alkalmazásának tulajdonítható, hanem a talaj természetes mikrobaközösségéből is eredeztethető, hiszen e közeg az ubikviter mikroorganizmusok rezervoárja lehet (GREEN ET AL., 1974), így messzemenő következtetéseket a komposztal kezelte talajminták elemzéséből nem vonhatunk le.

4.2. sz. táblázat: A *P. aeruginosa* kimutatási gyakorisága és jellemző élősejt-száma a komposztás folyamata során, ill. a vizsgált minták jellemző tulajdonságai

Sorszám	Helyszín	Mintavételi időszak	Minta jellege	Összetétel	Mikrobiális oltóanyag	Mintavételi stratégia	Minták száma	<i>P. aeruginosa</i> kimutatási esetszám MSZ 21470-77: 1988 (% minta)	<i>P. aeruginosa</i> MPN/g	Izolált törzsek
1	Pálhalma	2008.	KA	sertés hígrágya	-	átlagminta	1	0,0% (0)	-	-
2	Bánhalma	2008.	KA	biogáz-üzemi maradékanyag	-	átlagminta	3	0,0% (0)	-	-
3	Győr	2008.	KA	vinasz	-	átlagminta	2	0,0% (0)	-	-
4	Visonta	2008.	KA	sűrű zagy, gipsz, pernye, salak	-	átlagminta	4	0,0% (0)	-	-
5	Pornóapáti	2008.	KA	fahamu	-	átlagminta	2	0,0% (0)	-	-
6	Pécs	2008.	KA	fahamu, sűrű zagy	-	átlagminta	2	0,0% (0)	-	-
7	Nyírbátony	2008.	KA	biogáz-üzemi maradékanyag	-	átlagminta	1	0,0% (0)	-	-
8	Kecskemét	2008.	KA	biogáz-üzemi maradékanyag, hulladék szalma	-	átlagminta	2	50,0% (1)	1000	K13
9	Kecskemét	2008.	NYP*	55 v/v% hulladék szalma 15 v/v% biogáz-üzemi maradékanyag 30 v/v% trágya	<i>Thermobifida fusca</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Scytalidium thermophilum</i> <i>Paecilomyces variotii</i>	prizmánként (A1, A2, A3)	18	100,0% (18)	10-1 000 000	K15, K16, K19, K20, K21, K22, K23, K24, K25, K26, K29, K30, K31, K32, K35, K37
10	Kecskemét	2008.	NYP*	40 v/v% hulladék szalma 45 v/v% biogáz-üzemi maradékanyag 15 v/v% fahamu	<i>Thermobifida fusca</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Scytalidium thermophilum</i> <i>Paecilomyces variotii</i>	prizmánként (B1, B2, B3)	18	38,8% (7)	10	
11	Kecskemét	2008.	NYP*	55 v/v% hulladék szalma 15 v/v% trágya 15 v/v% vinasz 15 v/v% fahamu	Mikrocomp-Geocell® inokulum	prizmánként (C1, C2, C3)	18	22,2% (4)	10	
12	Balatonfüzfő	2009.	LZP*	oltatlan kontroll (E, F, G)	-	átlagminta (D)	3	0,0% (0)	-	-
13	Balatonfüzfő	2009.	LZP*	55 v/v% hulladék szalma 15 v/v% biogáz-üzemi maradékanyag 30 v/v% trágya	<i>Thermobifida fusca</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Scytalidium thermophilum</i> <i>Paecilomyces variotii</i>	átlagminta (E)	3	33,3% (1)	10	
14	Balatonfüzfő	2009.	LZP*	40 v/v% hulladék szalma 45 v/v% biogáz-üzemi maradékanyag 15 v/v% fahamu	<i>Thermobifida fusca</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Scytalidium thermophilum</i> <i>Paecilomyces variotii</i>	átlagminta (F)	3	0,0% (0)	-	-
15	Balatonfüzfő	2009.	LZP*	55 v/v% hulladék szalma 15 v/v% trágya 15 v/v% vinasz 15 v/v% fahamu	Mikrocomp-Geocell® inokulum	átlagminta (G)	3	0,0% (0)	-	-
16	Balatonfüzfő	2009.	LZP*	oltatlan kontroll (I, J, K)	-	átlagminta (H)	3	33,3% (1)	10	K38
17	Balatonfüzfő	2009.	LZP*	55 v/v% hulladék szalma 15 v/v% szennyvíziszap 30 v/v% trágya	<i>Thermobifida fusca</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Scytalidium thermophilum</i> <i>Paecilomyces variotii</i>	átlagminta (I)	3	33,3% (1)	10000	K39
18	Balatonfüzfő	2009.	LZP*	40 v/v% hulladék szalma 45 v/v% szennyvíziszap 15 v/v% fahamu	<i>Thermobifida fusca</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Scytalidium thermophilum</i> <i>Paecilomyces variotii</i>	átlagminta (J)	3	33,3% (1)	10	
19	Balatonfüzfő	2009.	LZP*	55 v/v% hulladék szalma 15 v/v% trágya 15 v/v% szennyvíziszap 15 v/v% fahamu	Mikrocomp-Geocell® inokulum	átlagminta (K)	3	100,0% (3)	10-100	K40
20	Órbottyán	2002.	KKT	-	-	pontminta	6	83,3% (5)	n.d.	K1, K2, K3, K4, K5
Összesen	10 helyszín	2002-2009. időszak	-	-	-	-	101 minta	42 mintában (41,5%) <i>P. aeruginosa</i> kimutatás	10-1000000 MPN/g, ml <i>P. aeruginosa</i> szám	25 izolátum

KA – komposzt alapanyag, NYP – nyitott prizma, LZP – levegőztetett zárt prizma, KKT – komposztal kezelt talaj; n.d. – nincs adat

*a prizmák C/N aránya 26-33 közötti értékre került beállításra, 50-70% nedvességtartalom mellett

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.1.2. fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(2. tézis) Eddig nem vizsgált komposzt-alapanyagok (ipari, biogázüzemi) nyitott prizmás, félüzemi komposztálási kísérlete alapján megállapítottuk, hogy a *P. aeruginosa* baktériumfaj a jogszabályi előírásoknak megfelelő technológia és hőmérséklet mellett is képes lehet a komposztálás termofil szakaszának túlélésére és magas sejtszámban megjelenhet a kész komposztban. Eredményünket nemzetközi tudományos folyóiratban publikáltuk (KASZAB ET AL., 2010B).

4.1.3. A szénhidrogénnel szennyezett területekről és komposztokból származó mért *P. aeruginosa* sejtszámok környezetegészségügyi értékelése

A *P. aeruginosa* faj lehetséges humán-egészségügyi hatásait áttekintő szakirodalom alapján elmondható, hogy a **fertőzött víznek való kitettség** esetén a kolonizációra (de nem az infekcióra) való esély jelen ismereteink szerint kisebb, mint 1:10000 (RUSIN ET AL., 1997). Szilárd halmazállapotú kontaminált anyaggal való érintkezés esetén, mely esetünkben a szénhidrogénnel szennyezett földtani közeg, komposztálási alapanyag, komposzt, vagy komposzttal kezelt talaj, az expozíciós útvonalak a lenyelés mellett a **belégzés**, illetve a **bőr sérülésein át** való behatolás lehetőségével bővülnek. Vizsgálataink során a szénhidrogénnel szennyezett közeg (1-10000 MPN), ill. a komposzt minták esetében **tapasztható** (1-1000000 MPN) **élősejt számok elérhetik** a FOK (2005); és LIZEWSKI ET AL. (2002) által meghatározott **infektív dózis alsó határát**, mely orális expozíció esetén (10^2 - 10^8 MPN/g). Szakirodalmi közlemények alapján a kolonizáció jelentősége sem hanyagolható el, hiszen a nozokomiális infekciók kezdeti, tünetmentes fázisának tekinthető, mely egy komplex kórkép kialakulásához vezethet (BOLDIN ET AL., 2007). Ezek a megállapítások kiegészítve a szakirodalom által leírt jelenséggel, miszerint a *P. aeruginosa* mind gyakrabban tehető felelőssé a közösségben szerzett, predispozíció nélkül kialakult tüdőinfekciókért (ARANCIBIA ET AL., 2002), **felvetik annak a lehetőségét, hogy a szennyezett földtani közeggel, felszín alatti vízzel, ill. komposzttal érintkezve kolonizáció, és/vagy infekció alakuljon ki.**

4.2. TÖRZSGYŰJTEMÉNY KIALAKÍTÁSA

A 2002-2009. közötti vizsgálati időszakban végzett izolálási eljárás keretében 36 db, szénhidrogénnel szennyezett területekről, valamint 25 db, komposztáláshoz, ill. komposzt felhasználáshoz kötődő mintából izolált, faj szinten identifikált *P. aeruginosa* törzs került a SZIE-Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszékén törzsgyűjteményi állományba további, fenotípusos és molekuláris genetikai vizsgálatok céljából. Az izolátumok a vonatkozó Magyar Szabvány szerinti identifikáció mellett a 16S rDNS fajspecifikus régióinak vizsgálata alapján is a *P. aeruginosa* faj képviselőinek bizonyultak, így megbízható alapot jelentettek a virulenciára és antibiotikum rezisztenciára vonatkozó következtetések kialakításához.

4.3. FENOTÍPUSOS VIZSGÁLATOK



4.2. sz. ábra: A *P. aeruginosa* környezeti izolátumainak jellemző telepképe (2009. 04.17., P17 törzs, nutrient agar; a szerző felvétele)

Telepmorfológiai vizsgálataink alapján a környezeti (szénhidrogénnel szennyezett, ill. komposzt eredetű törzsek), valamint az összehasonlító klinikai izolátumok (ATCC 27853, KPS-1, KPS-2, KPS-3, KPS-4) között fenotípusos különbség nem volt tapasztalható. Telepképük nutrient agar felszínén az alábbiak szerint jellemezhető: lapos, vagy enyhén domború, kerek formájú telep, enyhén, vagy teljesen hullámos szegély, közepes (1-4 mm) átmérő. A mucoid, fényes felszínű megjelenés, fakó szín, és a piocianin-termelésnek tulajdonítható, a telepek körül tapasztalható agar-elszíneződés a környezeti törzsek jellegzetes tulajdonsága (4.2. sz. ábra).

Tokfestésre irányuló mikroszkópos vizsgálataink eredménye alapján elmondható, hogy a 3.3. alfejezetben ismertetett módszer szerint végrehajtott eljárás alapján a tokképzés a környezeti törzsek jellemző sajátossága. A makro- és mikromorfológiai sajátosságok alapján tehát kijelenthetjük, hogy **a környezeti *P. aeruginosa* izolátumok a faj jellemző, klinikai törzsek körében is tapasztalt morfológiai bélyegeit tükrözik** (KASZAB ET AL., 2010A).

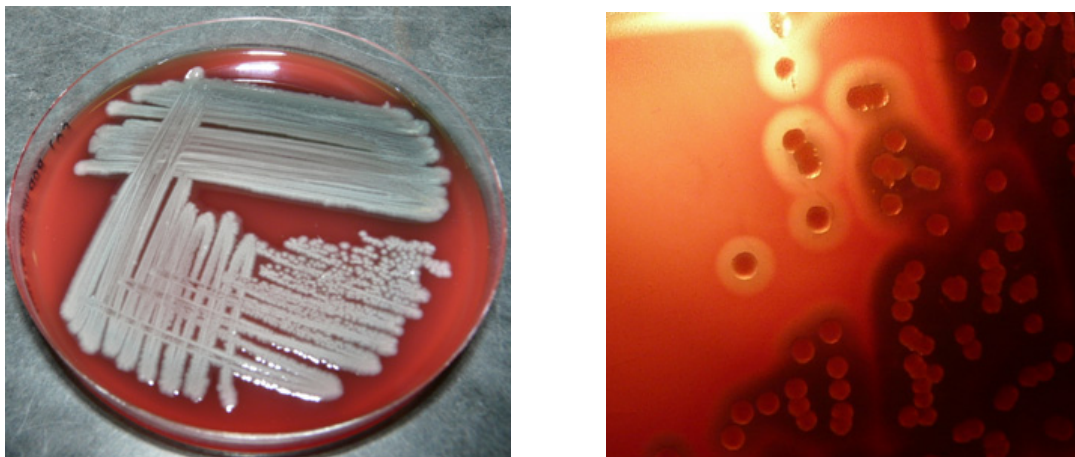
4.4. VIRULENCIA FAKTOROK VIZSGÁLATA SZÉNHYDROGÉNNEL SZENNYEZETT TERÜLETEKRŐL SZÁRMAZÓ IZOLÁTUMOK ESETÉBEN

A közvetlen és közvetett virulencia determinánsok megállapítására, azaz a hemolitikus aktivitás, valamint az exotoxinok és exoenzimek (ExoA, ExoU, ExoS, ExoT és ExoY) termeléséért felelős génszakaszok (*exoA*, *exoU*, *exoS*, *exoT* és *exoY*) jelenlétének, ill. hiányának detektálására irányuló vizsgálataink részletes eredményeit a 4.3., ill. 4.4. sz. táblázat tartalmazza.

4.4.1. Hemolízis vizsgálatok

A hemolitikus aktivitás, azaz a béta-hemolízis intenzitása vizsgálataink alapján az egyes környezeti törzseknél eltérő mértékű volt. A 22 órás inkubációs idő mellett tapasztalt hemolízis-intenzitást ötfokozatú skálán jellemeztük.

A *P. aeruginosa* Columbia véragaron való növekedésének észlelését, továbbá az átvilágított lemezekon detektálható béta-hemolízist szemlélteti a 4.3. sz. ábra.



4.3. sz. ábra: A *P. aeruginosa* P 43 jelzésű törzsének növekedése és hemolízise Columbia véragar lemezen (22 h, 37°C) (KASZAB ET AL., 2010C)

A környezeti törzsek hemolitikus aktivitásának összehasonlításához a szakirodalom nem tartalmazott áttekintő információkat, így a kiértékelés során a rendelkezésünkre álló klinikai törzsek által mutatott hemolízis zónával való összevetést vettük alapul. A környezeti és az összehasonlító klinikai izolátumok hemolitikus aktivitására vonatkozó eredményeket a 4.3., ill. 4.4. sz. táblázat tartalmazza.

4.3. sz. táblázat: A *P. aeruginosa* szénhidrogénnel szennyezett területről származó izolátumainak exotoxin és exoenzim kódoló génkészlete

Törzs jele	Származás (kárhely sorszáma)	Hemolitikus aktivitás	Exoenzim kódoló génszakaszok				
			<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	<i>exoU</i>	<i>exoA</i>
PCR vizsgálatok eredménye							
ATCC 27853	Ref. 1.*	+	+	+	+	-	+
KPS-1	Ref. 2.*	+	-	+	+	+	-
KPS-2	Ref. 3.*	++	+	-	+	-	-
KPS-3	Ref. 4.*	+	-	+	+	+	+
KPS-4	Ref. 5.*	++	-	+	+	+	+
P2	14	-	+	+	+	-	+
P9	14	-	-	+	+	+	+
P10	14	-	-	+	+	+	+
P11	14	-	+	+	+	-	+
P14	45	+/-	+	+	+	-	+
P15	45	++	+	+	+	-	+
P16	45	+/-	+	+	+	-	+
P17	45	+	+	+	+	-	+
P18	45	+/-	+	+	+	-	+
P22	46	+	+	+	+	-	+
P28	33	+	+	+	+	-	+
P30	35	-	+	+	+	-	+
P31	25	+++	+	+	+	-	+
P32	25	++	+	+	+	-	+
P33	45	+++	+	+	+	-	+
P35	35	+++	+	+	+	-	+
P36	35	+++	+	+	+	-	+
P37	35	+	+	+	+	-	+
P38	31	+	+	+	+	-	+
P39	1	+++	+	+	+	-	+
P42	29	+	+	+	+	-	+
P43	31	+++	-	+	+	+	+
P45	5	-	+	+	+	-	+
P46	5	+	+	+	+	-	+
P49	3	+++	+	+	+	-	+
P50	3	+++	+	+	+	-	+
P53	47	+	+	+	+	-	+
P62	37	-	+	+	+	-	+
P65	48	+	+	+	+	-	+
P66	48	++	+	+	+	-	+
P69	30	++	+	+	+	-	+
P70	30	+++	-	+	+	+	+
P71	12	+	-	+	+	+	+
P77	48	+	+	+	+	-	+
P78	37	++	+	+	+	-	+
P79	37	++	+	+	+	-	+

*Referencia törzsek

4.4. sz. táblázat: A *P. aeruginosa* komposzt eredetű izolátumainak exotoxin és exoenzim kódoló génkészlete

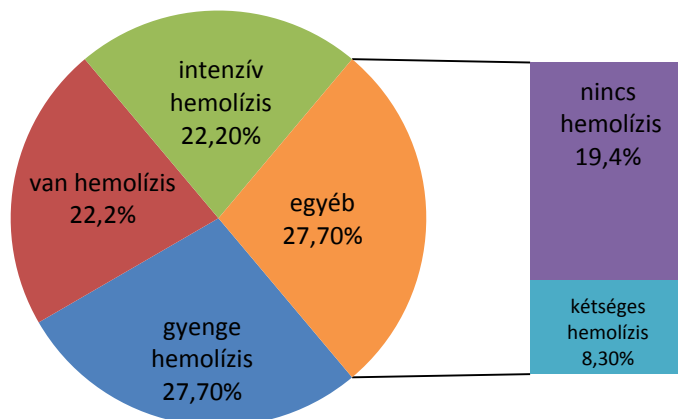
Törzs jele	Származás (helyszín sorszáma)	Hemolitikus aktivitás	Exoenzim kódoló génszakaszok				
			<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	<i>exoU</i>	<i>exoA</i>
PCR vizsgálatok eredménye							
ATCC 27853	Ref. 1.*	+	+	+	+	-	+
KPS-1	Ref. 2.*	+	-	+	+	+	-
KPS-2	Ref. 3.*	++	+	-	+	-	-
KPS-3	Ref. 4.*	+	-	+	+	+	+
KPS-4	Ref. 5.*	++	-	+	+	+	+
K1	20	+	+	+	+	-	+
K2	20	+++	+	+	+	-	+
K3	20	++	-	-	-	-	+
K4	20	++	-	+	+	-	+
K5	20	+	+	+	+	-	+
K13	8	+++	-	-	-	-	+
K15	8	+++	+	+	+	-	+
K16	9	-	+	+	+	-	+
K19	9	++	+	+	+	-	+
K20	9	-	+	+	+	-	+
K21	9	++	+	+	+	-	+
K22	9	+++	+	+	+	-	+
K23	9	+++	+	+	+	-	+
K24	9	+++	+	+	+	-	+
K25	9	++	-	-	+	-	+
K26	9	+++	+	+	+	-	+
K29	9	+++	-	-	+	-	+
K30	9	++	+	+	+	-	+
K31	9	++	+	+	+	-	+
K32	9	+	+	+	+	-	+
K35	9	++	+	+	+	-	+
K37	9	+++	-	-	+	-	+
K38	16	+	+	+	+	-	+
K39	17	+++	+	+	+	-	+
K40	19	++	+	+	+	-	+

*Referencia törzsek

Hemolitikus aktivitás:
 - nincs hemolízis
 +/- kétséges hemolízis
 + gyenge hemolízis
 ++ hemolízis
 +++ intenzív hemolízis

PCR vizsgálatok:
 + pozitív PCR reakció
 - negatív PCR reakció

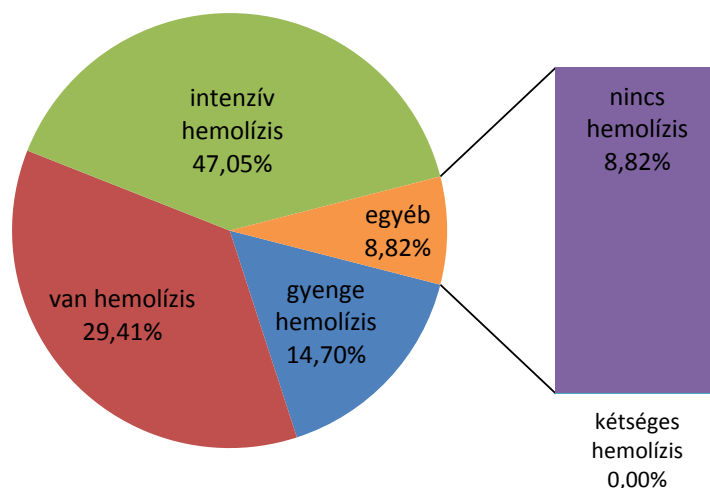
A szénhidrogénnel szennyezett területekről származó törzsek hemolitikus aktivitásának eltérő intenzitását tekinti át a 4.4. sz. ábra, míg a komposzt eredetű törzsek közötti eltéréseket foglalja össze a 4.5. sz. ábra.



4.4. sz. ábra: Hemolízis intenzitása a szénhidrogénnel szennyezett közegből származó *P. aeruginosa* törzsek esetében

A szénhidrogénnel szennyezett környezetből izolált törzsek 19,4%, ill. komposzt esetében 8,8%-ánál nem tapasztaltunk hemolízist, azaz a vizsgált összesen 61 törzs közül 9 izolátum vagy egyáltalán nem mutatott telepképződést, vagy bár történt telepnövekedés, de hemolízis folyamata nem volt megfigyelhető. További 3 izolátum esetében a hemolízis megítélése kétséges volt. 14 törzs gyenge, a klinikai összehasonlító izolátumok (KPS-1, KPS-3, ATCC 27853) szintjét el nem érő mértékű hemolitikus aktivitást mutatott. A fennmaradó törzsek közül 17 a klinikaiakéhoz (KPS-2, KPS-4) hasonló, további 18 - azaz a vizsgálatba vont törzsek közel 1/3-a - azt meghaladó hemolízis mutatott.

Összességében megállapítható tehát, hogy a **környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek 80,3%-ban mutattak valamilyen mértékű hemolitikus aktivitást**, azaz a vizsgált törzsek közel 4/5-e képes a vörösvértesteket károsító aktivitásra.



4.5. sz. ábra: Hemolízis intenzitása a komposzt közegből származó *P. aeruginosa* törzsek esetében

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.4.1. fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(3. tézis) A hemolitikus aktivitás vizsgálatok alapján a szénhidrogénnel szennyezett kárhelyekről származó 36 izolátum 72,1%-a, míg a 25 komposzt eredetű törzs 91,1%-a mutatott béta-hemolízist. Eredményeink szénhidrogénnel szennyezett területekről származó törzsekre vonatkoztatott adatait hazai tudományos folyóiratban közzétettük (KASZAB ET AL., 2010C).

4.4.2. Exotoxinokat és exoenzimeket kódoló génszakaszok vizsgálatának eredményei

A *P. aeruginosa* faj exotoxin és exoenzim kódoló génkészletének áttekintése során az általunk kiválasztott öt génszakasz (*exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU*, ill. *exoA*) jelenlétét vagy hiányát vizsgáltuk 36, szénhidrogénnel szennyezett területekről származó, ill. 25, komposzt eredetű törzs genetikai állományában. A vizsgálatba vont törzsek törzsgyűjteményi jelzéseit, ill. a szénhidrogénnel szennyezett területekről származó és komposzt eredetű izolátumok exotoxin és exoenzim készletére vonatkozó részletes eredményeket lásd a 4.3. és 4.4. sz. táblázatokban. Az exotoxinok és exoenzimek kimutatására szolgáló agaróz-gélelektroforézis vizsgálatok gëldokumentációjának részletét szemléltetik a 3. sz. Melléklet 5.1. - 5.4. sz. ábrái. A kórházi körülmények között izolált *P. aeruginosa* törzsek exotoxin/exoenzim készletének megismeréséhez elvégeztük a rendelkezésünkre álló, klinikai körülmények között izolált *P. aeruginosa* törzsek (lásd 3.2. sz. táblázat) vizsgálatát; ám mivel ezen törzsek száma a szakirodalomban fellelhető izolátumok mennyiségétől nagyságrendileg elmarad, ezért nem képezhettek releváns háttérrel a környezeti törzsek összehasonlító értelmezéséhez, csupán a PCR vizsgálatok validitásának ellenőrzésére szolgáltak. Eredményeink összevetéséhez szakirodalmi adatokat használtunk fel, így 63, klinikai környezetből származó izolátum alapján megállapított exoenzim géngyakoriság (WINSTANLEY et al., 2005), illetve a szintén nagy elemszámra vonatkoztatott exotoxin elterjedtség (BJORN et al., 1977) szolgált alapul.

4.4.2.1. A szénhidrogénnel szennyezett környezeti mintákból származó *P. aeruginosa* törzsek exoenzim/exotoxin kódoló gén-gyakorisága

A szénhidrogénnel szennyezett területekről izolált törzsek vizsgálatának eredményei alapján megállapítottuk, hogy az *exoT*, és az *exoY* szakaszok a vizsgált DNS-minták mindegyikében megtalálhatóak voltak. 100,0%-ban detektáltuk az *exoA* szakaszt és 86,2%-ban az *exoS* szekvenciáját. Az *exoU* génszakasz a minták 13,8%-ánál bizonyult kimutathatónak, megjelenésével egyidejűleg az adott törzs exoenzim génkészletében az *exoS* génszakasz hiánya volt tapasztalható.

4.4.2.2. A komposztból származó *P. aeruginosa* törzsek exoenzim/exotoxin kódoló gén gyakorisága

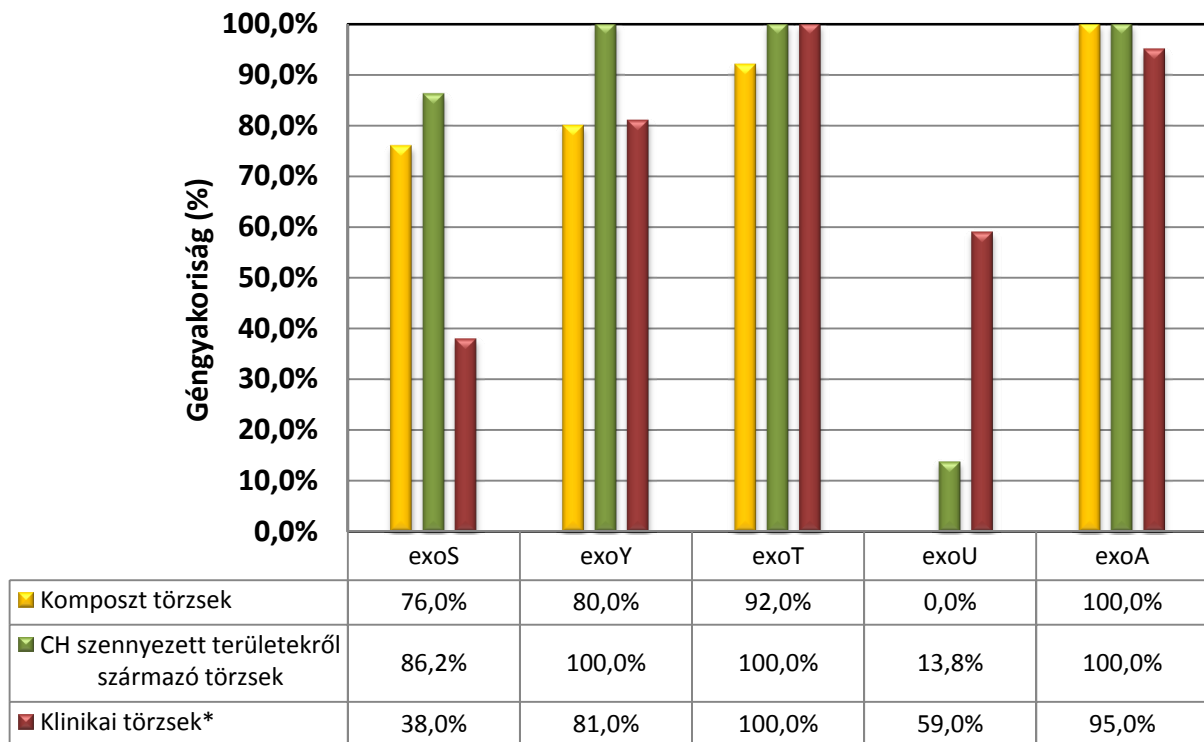
Eredményeink alapján a komposztból izolált környezeti törzsek esetében - a szénhidrogénnel szennyezett területekről származó mintákhoz hasonló módon - a vizsgált, patogenezisben kiemelkedő jelentőségű virulencia gének jelentős arányban és gyakran egyidejűleg is detektálhatóak voltak. Csupán két komposzt eredetű izolátum esetében nem volt detektálható a vizsgálatba vont *exoS*, *exoT*, *exoY*, vagy *exoU*. Az Exotoxin A termelődését kódoló *exoA* génszakasz, mely ismert virulencia markernek tekinthető minden komposzt eredetű törzs esetében detektálható volt, míg az *exoS* (76,0%), *exoT* (92,0%), *exoY* (80,0%) gének gyakorisága változatosnak tekinthető. A *P. aeruginosa* okozta betegség kialakulásában szakirodalmi adatok alapján kiemelkedő jelentőséggel bíró *exoU* (LIN ET AL., 2006), komposzt eredetű törzsek esetében nem volt detektálható.

4.4.2.3. A környezeti törzsek exotoxin/exoenzim kódoló gén-gyakoriságának összevetése klinikai eredményekkel

A szakirodalomban fellelhető exotoxin/exoenzim kódoló génszakaszok gyakoriságára vonatkozó klinikai adatokkal (BJORN ET AL., 1977; WINSTANLEY ET AL., 2005) való összevetést a 4.6. sz. ábra szemlélteti. Megállapítható, hogy a vizsgált virulencia faktorok közül **az *exoS* génszakasz gyakorisága szénhidrogénnel szennyezett, ill. komposzt környezetben nagyobb, mint klinikai viszonylatban.** Szénhidrogénnel szennyezett területekről származó izolátumok esetében kimagasló arányban volt detektálható az *exoY* (100,0%). Az *exoT* és *exoA* közel hasonló arányban jelentkezett a klinikai és környezeti törzsek között, míg az *exoU* környezetben mérhető kimutathatósága elmaradt a klinikai eredményektől. Az *exoU* jelenléte és egyidejűleg az *exoS* hiánya feltehetőleg annak tulajdonítható, hogy a két génszakasz csupán kivételes esetben detektálható egyszerre a bakteriális genomban (SHAVER AND HAUSER, 2004), melyre a környezeti törzsek vonatkozásában sem találtunk példát. Az *exoU* alulreprezentáltsága tehát az *exoS* dominanciájának tulajdonítható.

Szakirodalmi források alapján megállapítható, hogy az *exoS* és *exoT* gének jellemzően az invazív típusú *P. aeruginosa* törzsekben lelhetőek fel, míg a citotoxikus hatással bíró izolátumok elvesztik *exoS* génszakaszukat, ugyanakkor megőrzik az *exoT*-t (FLEISZIG ET AL., 1997). A nem-invazív

tulajdonsággal jellemezhető törzsek citotoxicitása pedig HAUSER ÉS MUNKATÁRSAI (2002) szerint elsősorban az *exoU* génszakasz jelenlétének és aktivitásának tulajdonítható. Következtetésként megállapíthatjuk, hogy **a környezeti eredetű izolátumok** genetikai sajátosságai alapján az **invazív törzsek** csoportjába sorolhatóak és csupán **kisebb hányaduk esetében** (a szénhidrogénnel szennyezett területekről származó törzsek 13,8%-ánál) **feltételezhető citotoxikus jelleg**.



4.6. sz. ábra: Exotoxinok és exoenzimek termeléséért felelős génszakaszok gyakorisága környezeti és klinikai viszonylatban
*BJORN ET AL., 1977; WINSTANLEY ET AL., 2005

Figyelembe véve, hogy az általunk vizsgált *P. aeruginosa* izolátumok döntő hányada (96,7%-a) legalább két különböző virulencia faktor egyidejű hordozásával toxikus proteinek termelésére lehet képes feltehető, hogy a környezeti-eredetű baktériumtörzsek humán egészségügyi kockázatot jelenthetnek arra hajlamos egyénekkel történő érintkezés esetén.

Fontos azonban hangsúlyozni, hogy munkám során csupán a virulenciát kiváltó exotoxinok és exoenzimek termeléséért felelős génszakaszok kimutatása történt, a patogenitást közvetlenül kiváltó, ténylegesen kiválasztásra kerülő toxinok és enzimek termelésének ellenőrzése nem zajlott le. Az említett génszakaszok jelenléte önmagában nem jelenti azt, hogy az adott gén képes a baktériumsejtben expresszálni, azaz az általa kódolt toxin, vagy enzim termelését megvalósítani, ám arra utaló tulajdonságnak tekinthető. Egyes vizsgálatok alapján a kódoló génszakaszt hordozó törzsek esetében a toxikus proteinek termelésének aránya 77% (HAUSER ET AL., 2002); ennek környezeti izolátumok vonatkozásában történő megállapítása azonban a jövő feladata.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.5.5. fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(4. tézis) A környezeti eredetű *P. aeruginosa* izolátumok döntő hányada (96,7%-a) legalább két különböző virulencia faktor egyidejű hordozásával toxikus proteinek termelésére lehet képes. Eredményeink komposzt-eredetű törzsekre vonatkozó adatait nemzetközi publikációban adtuk közre (KASZAB ET AL., 2010B).

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.5.5. fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(5. tézis) Az *exoA*, *exoY* és *exoT* előfordulási gyakoriságában klinikai és környezeti viszonylatban nincs érdemi különbség. Az *exoU* génszakasz környezeti törzsek esetében alulreprezentált, helyette az *exoS* dominanciája jellemző. A komposzt eredetű törzsek 100,0%-ban az invazív törzsek csoportjába sorolhatóak, míg a szénhidrogénnel szennyezett területekről izolált törzsek 13,8%-ban citotoxikus, 86,2%-ban invazív jelleget mutatnak. Eredményeink komposzt-eredetű törzsekre vonatkozó adatait nemzetközi publikációban adtuk közre (KASZAB ET AL., 2010B).

4.5. ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálata során elért eredményeink közül első lépésben a korongdiffúziós teszttel vizsgált, átfogó rezisztencia képet nyújtó adatokat, majd az E-teszt eljárás keretében megállapított, kvantitatív, származás (szénhidrogénnel szennyezett közeg, ill. komposzt) szerint részletezett eredményeket ismertetem.

4.5.1. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok korongdiffúziós teszttel

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok első lépésében végrehajtott szemikvantitatív korongdiffúziós tesztek 34 környezeti izolátumra vonatkoztatott eredményeit foglalja össze a 4.5. sz. táblázat (részletes eredményeket lásd a 4. Melléklet 5.2. sz. táblázatában). A korongdiffúziós antibiotikum rezisztencia vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a környezeti eredetű izolátumok esetében a klinikum által rutin eljárás keretében vizsgált antibiotikum hatóanyagcsoportok közül nem, vagy mérsékelten hatékonyak (0-76,5%) a Penicillinek, Cefalosporinok, Szulfonamidok, Tetraciklinek és Amfenikolok. E készítmények közül a környezeti törzsek további, kvantitatív vizsgálatárara így csupán a Pseudomonas-ellenes penicillinek közé tartozó piperacillin, ill. a harmadik generációs Cefalosproink csoportja bizonyult alkalmasnak. A Carbapenemek, Aminoglikozidok és Kinolonok a nalidixinsav kivételével kiválóan (73,6-100%-ban) eradikálták a vizsgált *P. aeruginosa* izolátumokat, így esetükben hatóanyagcsoportonként legalább egy készítményt jelöltünk ki további vizsgálatokhoz (4.5. sz. táblázat, sötét színnel kiemelt sorok). Vizsgálati eredményeink fényében így átfogó képet nyertünk a környezeti eredetű izolátumok esetében 9 hatóanyagcsoport esetében mutatkozó rezisztenciáról, valamint **javaslatot tettünk a klinikai gyakorlatban standard módon vizsgált hatóanyagok körének szűkítésére e törzsek esetében, mely így a rutin rezisztencia-vizsgálatok hatékonyságát növeli, költségeit ugyanakkor csökkenti.**

4.5. sz. táblázat: Az antibiotikum rezisztens törzsek aránya 34, környezeti eredetű izolátum vizsgálata alapján, korongdiffúziós teszttel (NCCLS, 2000)

Antibiotikum hatóanyagok			Rezisztens törzsek aránya (%)
Főcsoport	Alcsoport	Hatóanyag neve	
PENICILLINEK	széles spektrumú	ampicillin	97,1%
		mezlocillin	88,2%
	Pseudomonas-ellenes	azlocillin	79,4%
		carbenicillin	85,2%
	laktamáz-gátlóval kombinált	piperacillin	55,8%
	augmentin	100,0%	
CARBAPENEMEK		imipenem	2,9%
		meropenem	2,9%
CEFALOSPORINOK	első generáció	cephalexin	100,0%
	második generáció	cefachlor	100,0%
		cefuroxim	100,0%
		cefamandol	100,0%
		cefoxitin	100,0%
	harmadik generáció	cefotaxim	67,6%
		ceftriaxon	76,4%
ceftazidim		23,5%	
cefoperazon		58,8%	
AMINOGLIKOZIDOK		amikacin	0,0%
		gentamicin	2,9%
		netilmicin	0,0%
		tobramycin	2,9%
SZULFONAMIDOK		trimethoprim/sulfamethoxazole	100,0%
		polimyxin B	0,0%
KINOLONOK	"A" nem fluorozott:	nalidixinsav	97,0%
	"B" fluorozott:	norfloxacin	0,0%
	"C" fluorozott:	ciprofloxacin	0,0%
		ofloxacin	0,0%
		pefloxacin	26,4%
TETRACIKLINEK		tetraciklin	97,0%
AMFENIKOLOK		chloramphenicol	91,1%
NITROFURAN-SZÁRMAZÉKOK		nitrofurantoin	100,0%

szürke színnel kiemelt sorok: E-teszt vizsgálatokra kijelölt antibiotikum hatóanyagok

4.5.2. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok E-teszttel

Az E-teszt eljárás keretében vizsgált, 10féle antibiotikum hatóanyaggal elért rezisztencia eredmények értékelésére szolgáló érzékenységi kategóriákat foglalja össze a 4.6. sz. táblázat. A továbbiakban ismertetett antibiotikum rezisztenciára vonatkozó eredményeket e csoportosítás alapján értékeltük.

4.6. sz. táblázat: Az antibiotikum rezisztencia során vizsgált hatóanyagok érzékenységi kategóriái MIC ($\mu\text{g/ml}$) töréspontok alapján (CLSI, 2006)

Antibiotikum csoportok	S (érzékeny)	I (átmeneti)	R (rezisztens)
Béta-laktámok (széles spektrumú penicillinek)			
piperacillin	≤ 64	-	≥ 128
harmadik generációs Cefalosporinok			
cefoperazon	≤ 16	32	≥ 64
cefotaxim	≤ 8	16-32	≥ 64
ceftazidim	≤ 8	16	≥ 32
ceftriaxon	≤ 8	16-32	≥ 64
negyedik generációs Cefalosporinok			
cefepime	≤ 8	16	≥ 32
Carbapenemek			
imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Kinolonok (második generációs fluorokinolonok)			
ciprofloxacín	≤ 1	2	≥ 4
ofloxacin	≤ 2	4	≥ 8
Aminoglikozidok			
gentamicin	≤ 4	8	≥ 16

4.5.2.1. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei a szénhidrogénnel szennyezett területekről izolált törzsek esetében E-teszt módszerrel

A környezeti törzsek antibiotikum rezisztenciájára vonatkozó részletes eredményeket és Minimális Gátló Koncentrációkat a 4.7. sz. táblázat tartalmazza.

A szénhidrogénnel szennyezett területekről származó 36 izolátum vizsgálata alapján az alkalmazott 10 féle antibiotikum készítmény rendkívül eltérő hatékonyságot mutatott.

A harmadik generációs Cefalosporinok közül a cefoperazon/sulbactam kombináció, illetve a ceftazidim kiválóan eradikálta a vizsgált *P. aeruginosa* törzseket in vitro; rezisztencia, ill. a rezisztencia fokozódására utaló átmeneti (intermediate) állapot alig volt tapasztalható. Cefotaxim esetében a rezisztens törzsek aránya 33,3% volt, míg a törzsek további 25,0%-a tartozott az átmeneti rezisztencia állapot kategóriájába. A ceftriaxon hatóanyag a környezeti izolátumok 50,0%-ával szemben maradt hatástalan. A vizsgált negyedik generációs Cefalosporin, a cefepim esetében a környezeti és az összehasonlító klinikai törzsek között rezisztencia nem jelentkezett, „átmeneti” státuszt egyetlen izolátum, a P43 jelzésű környezeti törzs ért el. A széles spektrumú Penicillinek csoportjába tartozó piperacillin a vizsgált törzsek 11,1%-ával, míg a Carbapenem készítmény (imipenem) 33,0%-ával szemben volt hatástalan. A szintetikus antibiotikumok, mint az általunk is vizsgált Fluoroquinolon hatóanyagok (ciprofloxacín, ofloxacin) egy kivétellel (P69 jelzésű ofloxacin rezisztens törzs) hatékonyak bizonyultak a vizsgált baktérium izolátumokkal szemben. A gentamicin elnevezésű Aminoglikozid készítményre nézve az izolátumok 94,4%-a volt érzékeny; csupán egy törzs (P14) mutatott átmeneti, további egy (P43) rezisztens kategóriába eső eredményeket.

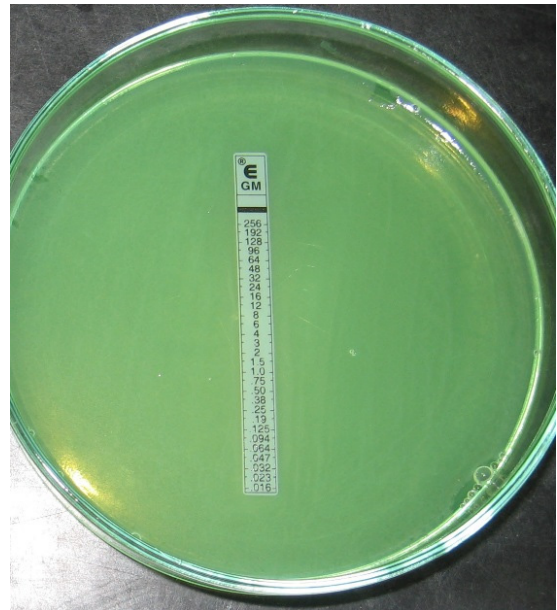
Eredményeink alapján 11 *P. aeruginosa* fajhoz tartozó izolátum (P16, P28, P30, P32, P36, P39, P43, P45, P46, P53, P69), azaz a vizsgált törzsek 30,5%-a mutatott rezisztenciát legalább két különböző hatóanyag-csoportba tartozó antibiotikummal szemben és felelt meg ezzel a **multirezisztencia (DRAGHI ET AL., 2006) definíciójának**. A multirezisztens környezeti izolátumok nyolc különböző magyarországi kórhely szénhidrogénnel szennyezett mintáiból kerültek kimutatásra, azaz a vizsgálatba vont szénhidrogénnel szennyezett területek 16,3%-án jelentkeztek többszörösen rezisztens törzsek. A P43 és P69 jelzésű környezeti izolátumok – melyek külterületen elhelyezkedő vezetékcsatlakozás helyszínéről származó talajvízmintákból kerültek kimutatásra – kiemelkedő mértékű és arányú antibiotikum rezisztenciával rendelkeztek. Esetükben rezisztencia volt tapasztalható a harmadik generációs Cefalosporinok, a széles spektrumú Penicillinek (piperacillin) és a vizsgált Carbapenem (imipenem) hatóanyaggal szemben. Ezen felül a P43 jelölésű baktériumtörzs az alkalmazott Aminoglikozid készítmény (gentamicin), a P69 izolátum pedig egy Fluoroquinolon hatóanyag (ofloxacin) esetében bizonyult ellenállónak.

Antibiotikum-rezisztencia vizsgálataink alapján összességében megállapítható, hogy míg a harmadik generációs Cefalosporinok változatos hatékonyságot produkáltak, az alkalmazott negyedik generációs Cefalosporin (cefepim) a vonatkozó kutatási eredményeknek megfelelően [melyeket DA SILVA ÉS MUNKATÁRSAI (2008) értek el 30 ivóvízből izolált *P. aeruginosa* törzs, továbbá GAD ÉS MUNKATÁRSAI (2007) 81 klinikai és 39 környezeti izolátum esetében] kiválóan eradikálta a vizsgált környezeti és összehasonlító klinikai törzseket. A Fluoroquinolon hatóanyagok esetében tapasztalt kiemelkedő hatékonyság azonban részben ellentétes volt egy korábbi tudományos közlemény (ALONSO ET AL., 1999) megállapításaival, miszerint a környezeti eredetű *P. aeruginosa* izolátumok esetében a ciprofloxacin és ofloxacin rezisztencia elterjedt. Az ellentmondás feloldása érdekében összevetettük az említett kutatási beszámoló által detektált, számszerű MIC értékeket az általunk is használt, nemzetközileg elfogadott értékelési rendszer (CLSI, 2007) kategóriáival. Megállapítottuk, hogy a fenn említett közlemény által ciprofloxacin, ofloxacin-rezisztensként megjelölt környezeti törzsek a CLSI által felállított osztályozás szerint a vizsgált Fluoroquinolon antibiotikumokra nézve érzékenyek, következésképp a fokozódó antibiotikum rezisztencia e hatóanyagokkal szemben a környezetben nem került igazolásra. Ugyanakkor saját vizsgálataink szerint e szintetikus készítményekkel szemben a rezisztencia megjelenése prognosztizálható, hiszen egy ofloxacin rezisztens izolátum (P69), illetve további három környezeti törzs átmeneti státusza a rezisztencia fokozódására utal.

Az Aminoglikozidok hatékonyságára irányuló vizsgálataink szerint a szakirodalom által leírtaknak megfelelően (KERRY ET AL., 1994, TRYPATHY ET AL., 2007) a környezeti törzsek döntő része érzékenynek bizonyult. Rezisztens környezeti törzs kimutatására a szakirodalom alapján eddig csupán a közelmúltban volt példa, mely esetben Brazíliában, ivóvíz mintában került azonosításra

gentamicinnel szemben ellenálló *P. aeruginosa* izolátum (DA SILVA ET AL., 2008). **Saját kutatásaink alapján egy gentamicin rezisztens baktériumtörzs (P43) került kimutatásra (4.7. sz. ábra), mely jellegzetességei alapján azonban teljes mértékben eltért az említett forrás által leírt rezisztencia profiloktól: esetében imipenem, ceftazidim és piperacillin rezisztencia is tapasztalható volt. Így saját vizsgálataink tekinthetők a harmadik generációs Cefalosporinok, széles spektrumú Penicillinek, Aminoglikozidok és Carbapenemek csoportjával szembeni, egyidejű rezisztencia első megerősítésének a környezetben (KASZAB ET AL., 2010A).**

Az összességében 8 különböző kárhelyről származó 11 izolátum esetében tapasztalt multirezisztencia azonban nem csupán a többszörös antibiotikum rezisztencia talaj-talajvíz rendszerben történő első észlelése, hanem széleskörű elterjedtségének igazolása is egyben. A *P. aeruginosa* baktériumfaj környezeti törzsei tehát **az antibiotikum rezisztenciáért felelős gének potenciális rezervoárjai**, így eredményeink alapján környezetegészségügyi jelentőségük újabb vonatkozásban nyert alátámasztást. Vizsgálataink alapján a környezeti törzsek antibiotikum rezisztencia profilja a referenciaként alkalmazott klinikai összehasonlító izolátum (ATCC 27853) eredményeitől gyökeresen eltért, így esetünkben az releváns alapot az azonos időszakban izolálásra került klinikai törzsek (KPS-1, KPS-2, KPS-3, KPS-4) jelentettek. Az eredmények részletes összevetése alapján a klinikai és környezeti izolátumok rezisztencia tulajdonságai között nem tapasztalható jelentős eltérés (lásd 4.7. sz. táblázat).



4.7. sz. ábra: A gentamicin rezisztens P43 izolátum felvétele (2008.07.10, Mueller-Hinton agar, Szabó G. és Kaszab E.)

4.7. sz. táblázat: Minimális Gátó Koncentráció értékek a *P. aeruginosa* szénhidrogénnel szennyezett területekről származó törzseire vonatkozóan

Hatóanyag-csoport			harmadik generációs Cefalosporinok				negyedik generációs Cefalosporinok	széles spektrumú Penicillinek	Carbapenemek	Fluoroquinolonok		Aminoglikozidok
Antibiotikum			cefoperazon/sulbactam	cefotaxim	ceftazidim	ceftriaxon	cefepim	piperacillin	imipenem	ciprofloxacim	ofloxacin	gentamicin
Tartomány (µg/ml)			0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.002-32	0.002-32	0.002-32	0.016-256
Törzsgyűjteményi jel	Eredet	Kórhely sorszáma	Minimális Gátó Koncentráció (MIC) értékek									
ATCC 27853	KLIN	-	6	24	1.5	>256	3	4	6	0.75	6	1.5
KPS-1	KLIN	-	12	16	0.38	24	1.5	6	>32	0.19	1.5	1.5
KPS-2	KLIN	-	4	>256	12	>256	2	16	4	0.125	1.5	1.5
KPS-3	KLIN	-	2	8	4	24	1	3	1	0.94	1	4
KPS-4	KLIN	-	12	>256	24	>256	8	>256	1.5	0.94	0.5	>256
P2	KÖRNY	14	1.5	8	1	6	0.75	6	4	0.032	0.5	1.5
P9	KÖRNY	14	2	8	0.75	6	2	4	>32	0.047	0.38	2
P10	KÖRNY	14	1.5	8	1	3	1.5	2	1	0.032	0.16	2
P11	KÖRNY	14	3	>256	32	>256	1.5	64	3	0.047	0.5	3
P14	KÖRNY	45	8	>256	>256	>256	4	4	0.38	0.125	2	8
P15	KÖRNY	45	1.5	12	1	32	2	3	1.5	0.094	0.5	3
P16	KÖRNY	45	3	>256	1.5	48	2	4	>32	0.125	1	2
P17	KÖRNY	45	2	>256	1.5	24	2	4	3	0.125	0.75	3
P18	KÖRNY	45	2	3	0.75	4	0.75	1.5	0.25	0.047	0.25	1
P22	KÖRNY	46	2	12	1	48	4	4	0.5	0.125	1.5	2
P28	KÖRNY	33	6	12	1	>256	6	4	>32	0.38	2	2
P30	KÖRNY	35	3	16	1.5	>256	4	6	>32	0.125	0.75	3
P31	KÖRNY	25	4	24	1	>256	3	16	2	0.094	2	2
P32	KÖRNY	25	8	>256	8	>256	3	48	>32	0.064	4	1.5
P33	KÖRNY	45	2	32	8	>256	4	6	3	0.16	2	3
P35	KÖRNY	35	12	12	2	>256	4	8	6	0.094	0.75	3
P36	KÖRNY	35	2	12	1.5	>256	3	4	>32	0.94	3	1.5
P37	KÖRNY	35	3	16	3	>256	3	6	6	0.094	1	2
P38	KÖRNY	31	3	12	1.5	12	6	8	3	0.38	4	1.5
P39	KÖRNY	1	3	16	1	>256	6	16	>32	0.25	6	2
P42	KÖRNY	29	1	12	1.5	8	0.5	8	1	0.032	2	1.5
P43	KÖRNY	31	16	>256	64	>256	24	>256	>32	0.125	2	>256
P45	KÖRNY	5	6	>256	24	>256	4	16	>32	0.045	0.75	1
P46	KÖRNY	5	6	>256	8	>256	3	>256	>32	0.064	3	2
P49	KÖRNY	3	3	>256	2	32	3	16	1	0.25	1.5	2
P50	KÖRNY	3	3	24	1.5	>256	2	8	3	0.16	2	3
P53	KÖRNY	47	2	>256	1	>256	4	6	>32	0.125	3	2
P62	KÖRNY	37	2	16	2	16	0.75	8	2	0.047	1	2
P65	KÖRNY	48	2	12	1.5	16	6	1.5	3	0.094	1	1.5
P66	KÖRNY	48	1.5	8	6	48	1.5	8	3	0.125	0.75	3
P69	KÖRNY	30	24	>256	24	>256	4	>256	>32	0.19	>32	2
P70	KÖRNY	30	2	>256	1.5	>256	3	8	1.5	0.094	3	2
P71	KÖRNY	12	2	16	2	48	3	>256	3	0.064	1.5	2
P77	KÖRNY	48	4	12	1.5	16	3	4	3	0.094	0.75	1.5
P78	KÖRNY	37	2	16	1.5	12	2	4	2	0.047	0.75	3
P79	KÖRNY	37	4	12	2	16	1.5	4	2	0.125	1	1.5

KLIN – klinikai, KÖRNY – környezeti eredetű baktériumtörzsek, szürke mezők – rezisztencia (CLSI)

4.5.2.2. Antibiotikum rezisztencia eredmények a komposzt eredetű törzsek esetében E-teszt módszerrel

A 25, komposzt eredetű izolátum esetében végrehajtott antibiotikum rezisztencia vizsgálatok részletes eredményeit, ill. a Minimális Gátló Koncentráció értékeket a 4.8. sz. táblázat foglalja össze. Eredményeink alapján elmondható, hogy több, a klinikai gyakorlat által használt hatóanyagcsoport (mint például a szintetikus Fluorokinolonok) kiválóan gátolta a vizsgált környezeti izolátumokat. Ugyanakkor a harmadik generációs Cefalosporinok csupán mérsékelt hatékonyságot értek el a komposzt eredetű mikroszervezetekkel szemben: a ceftriaxon rezisztencia széles körben elterjedt a komposztból izolált *P. aeruginosa* törzsek között (48,8%), továbbá cefotaxim, ceftriaxon rezisztencia is tapasztalható volt. Ugyanakkor a cefoperazon-sulbactam kombináció, ill. a vizsgált negyedik generációs Cefalosporin (cefepim) a szakirodalmi adatokkal ellentétben (DA SILVA ET AL., 2008) nem bizonyult minden esetben hatásosnak. A Carbapenemek csoportjába tartozó, klinikai terápiában alkalmazott és hatékony imipenem készítmény a komposzt eredetű törzsek 24,0%-ával szemben maradt hatástalan. A gentamicin nevű Aminoglikozid készítmény, mely klinikai viszonylatban és azon kívül (TRYPATHY ET AL., 2007) egyaránt effektívnek tekinthető két komposztból származó izolátummal szemben maradt hatástalan.

A többszörös antibiotikum rezisztencia tekintetében elmondható, hogy a klinikai körülmények között mind nagyobb esetszámban megjelenő **multirezisztencia hat komposzttal kezelt talaj-, ill. komposzt-eredetű törzs (K2, K4, K5, valamint K13, K24 és K39) esetében is igazolódott**, mely izolátumok így egyidejű rezisztenciát mutattak kettő, vagy több antibiotikum hatóanyagcsoporttal szemben. A hatásukat veszített hatóanyagcsoportok jellemzően a harmadik generációs Cefalosporinok, a Carbapenemek, a széles spektrumú Penicillinek, ill. az Aminoglikozidok voltak.

Eredményeink jelentik a multirezisztencia első megerősítését komposzthoz köthető *P. aeruginosa* izolátumok esetében.

4.8. sz. táblázat: Minimális Gátló Koncentráció értékek a *P. aeruginosa* komposzt eredetű törzseire vonatkozóan

Hatóanyag-csoport			harmadik generációs Cefalosporinok				negyedik generációs Cefalosporinok	széles spektrumú Penicillinek	Carbapenemek	Fluoroquinolonok		Aminoglikozidok
Antibiotikum			cefoperazon/sulbactam	cefotaxime	ceftazidime	ceftriaxone	cefepime	piperacillin	imipenem	ciprofloxacin	ofloxacin	gentamicin
Tartomány (µg/ml)			0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256	0.016-256
Törzsgyűjteményi jel	Eredet	Minta sorszáma	Minimális Gátló Koncentráció (MIC) értékek									
ATCC 27853	KLIN	-	6	24	1.5	>256	3	4	6	0.75	6	1.5
K1	KKT	20	8	16	1.5	256	3	6	4	0.19	1.5	1.5
K2	KKT	20	3	8	1.5	64	2	3	32	0.094	0.75	1.5
K3	KKT	20	0,5	8	1.5	48	1.5	6	32	0.047	1.0	1.5
K4	KKT	20	1.5	256	24	256	2	256	1.5	0.094	1.5	3
K5	KKT	20	4	16	1.0	192	1.5	32	32	0.064	0.5	0.19
K13	KA	8	3	48	2	128	6	12	2	1.0	1.5	16
K15	NYP	9	4	12	3	64	1.5	4	3	0.064	0.75	2
K16	NYP	9	3	16	1.5	256	1.5	4	1.5	0.125	0.5	2
K19	NYP	9	2	24	3	24	3	12	1.5	0.064	1.5	8
K20	NYP	9	3	32	1.0	256	1.5	3	1.0	1.5	1.0	4
K21	NYP	9	2	8	3	32	1.0	3	1.5	0.125	1.0	8
K22	NYP	9	3	16	2	24	3	4	3	1.19	0.75	4
K23	NYP	9	2	8	1.5	64	1.0	4	1.5	0.5	1.5	4
K24	NYP	9	1.5	12	1.0	256	1.5	4	2	0.125	1.0	95
K25	NYP	9	1.5	12	0.75	16	0.75	3	3	0.064	1.0	1.0
K26	NYP	9	6	24	2	24	2	4	4	0.094	0.75	3
K29	NYP	9	4	24	1.5	48	1.0	6	32	0.25	2	2
K30	NYP	9	3	24	1.0	48	1.0	6	1.5	0.125	1.0	4
K31	NYP	9	3	8	1.5	16	1.0	4	32	0.19	1.0	2
K32	NYP	9	2	48	1.5	32	1.5	4	32	0.125	2	0.75
K35	NYP	9	3	12	1.0	8	1.0	3	1.0	0.064	0.75	2
K37	NYP	9	2	256	1.0	256	1.5	4	1.5	0.064	0.5	3
K38	LZP	16	3	24	1.5	8	1.0	6	2	0.125	1.0	2
K39	LZP	17	4	256	64	256	12	256	2	0.125	0.75	4
K40	LZP	19	6	16	4	24	1.5	12	2	0.064	0.5	4

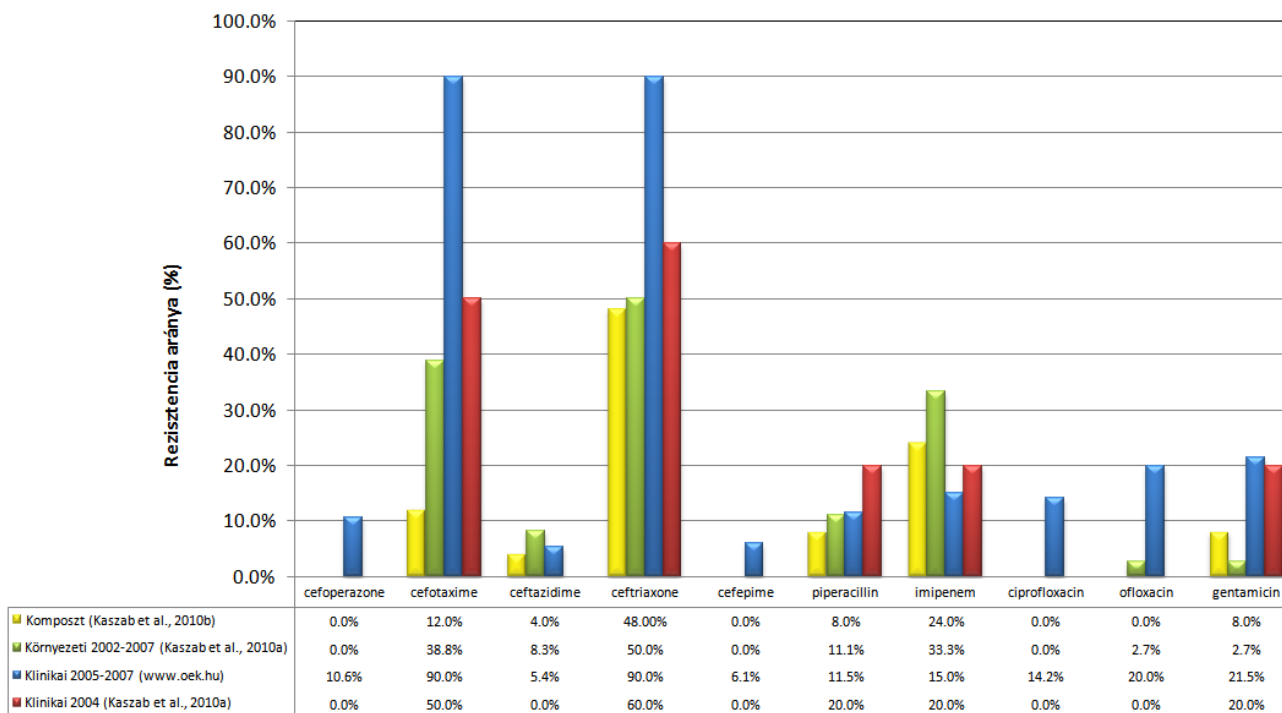
KA – komposzt alapanyag, NYP – nyitott prizma, LZP – levegőztetett zárt prizma, KKT – komposzttal kezelt talaj; szürke mezők – rezisztencia (CLSI)

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.2. és 4.3. fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(6. tézis) Igazolást nyert az orvosi gyakorlatban első választásban alkalmazott hatóanyagokkal szembeni multirezisztencia 11, szénhidrogénnel szennyezett közegből származó, valamint 6, komposzt eredetű *P. aeruginosa* izolátum esetében. Eredményeink alapján első ízben kerültek izolálásra az Aminoglikozidok (P43), illetve a Fluorokinolonok (P69) csoportjába tartozó antibiotikum-hatóanyaggal szemben rezisztens, kórházi környezetben kívül izolált *P. aeruginosa* törzsek. Eredményeinket tudományos folyóiratokban publikáltunk (KASZAB ET AL., 2010A, KASZAB ET AL., 2010B).

4.6. AZ ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA EREDMÉNYEK ÖSSZEVETÉSE A KLINIKUMBAN TAPASZTALTAKKAL

A magyarországi viszonylatok között tapasztalható antibiotikum rezisztencia helyzet komplex értékeléséhez eredményeinket összevetettük az Országos Epidemiológiai Központ 'Nemzeti Bakteriológiai Surveillance Adatfeldolgozó Csoportjának' adataival (HTT4), mely összehasonlítás eredményét tartalmazza a 4.8. sz. ábra.



4.8. sz. ábra: Rezisztens *P. aeruginosa* törzsek aránya klinikai (2004; 2005-2007) és környezeti (2002-2007) viszonyok között (HTT4, KASZAB ET AL., 2010a, KASZAB ET AL., 2010b)

Az összevetés eredményeképp megállapítható, hogy a harmadik generációs Cefalosporinok jellemzően hatásosabbnak bizonyultak a környezeti törzsekkel szemben, mint klinikai viszonyok között. Kivételt képez ez alól a ceftazidime hatóanyag, melynek esetében a rezisztens törzsek aránya a klinikai és környezeti törzsek között azonosnak tekinthető. Hasonló képet tapasztaltunk az alkalmazott széles spektrumú Penicillin (piperacillin), esetében, ugyanakkor a vizsgált Carbapenem készítmény az imipenem esetében a környezeti izolátumok jelentősen nagyobb arányú rezisztenciát produkáltak, mint a klinikai eredetű törzsek. Említést érdemel ugyanakkor, hogy a saját vizsgálataink alapján értékelt izolátumok száma nagyságrendileg elmarad az OEK adatbázisban szereplő törzsek mennyiségétől, így esetünkben az összevetést fenntartásokkal kell kezelnünk. **A direkt szelektációs nyomás (pl. antibiotikum terápia) nélkül kialakuló környezeti multirezisztencia ténye azonban megerősítést nyert.**

4.7. A KÖRNYEZETI ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA HÁTTERE

Saját vizsgálataink alapján az antibiotikum rezisztencia hátterét illetően elmondható, hogy a Béta-laktám antibiotikumok hatástalanságáért felelőssé tehető **ESBL és MBL termelés két-két környezeti izolátum esetében nyert fenotípusos igazolást** (lásd: 4.9. sz. ábra). A széles spektrumú béta-laktamázok megállapítását célzó kombinált cefotaxime tesztcsík (CT/CTL) esetében a P14 és P16, míg a metallo béta-laktamáz termelését vizsgáló imipenem teszt (IP/IPI) során a P4, ill. P7 jelzésű, szénhidrogénnel szennyezett közegből származó izolátum mutatott béta-laktamáz termelést. Megállapítható tehát, hogy feltehetően egy ismert és a klinikum számára komoly kihívást jelentő rezisztencia mechanizmus, a béta-laktamáz enzimek termelődése tehető legalább részben felelőssé a környezeti eredetű *P. aeruginosa* izolátumok körében tapasztalt antibiotikum rezisztenciáért.



4.9. sz. ábra: A *P. aeruginosa* MBL termelésének vizsgálatára szolgáló kombinált Etest (2008.07.10., P1 törzs; a szerző felvétele)

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Vizsgálati eredményeink alapján megállapítható, hogy a *P. aeruginosa* baktériumfaj jellemző tagja az általunk vizsgált, antropogén hatás alatt álló közegeknek, így a **szénhidrogénekkal szennyezett, speciális életterek mikrobiotájának, a komposztálás folyamatában pedig képes lehet a mezofil patogének eliminálását szolgáló hőfázist túlélni**. A tapasztalt sejtszámok ismeretében kijelenthetjük, hogy e baktériumfaj speciális környezeti feltételek (úgy mint szénhidrogénnel szennyezett közeg, ill. komposzt) mellett tömeges szaporodásra hajlamos és tapasztalt **élősejtszáma elérheti, vagy meghaladhatja az infektív dózis alsó határát**. Közvetlen humán-egészségügyi kockázata mellett ez a tény egyben azt is jelzi, hogy e kórokozó adott közeg mikrobiotájában a **közösség jelentős tagjává válhat**.

Jelen munka keretében megállapítottuk, hogy a környezeti törzsek jelentős hányada (több, mint 90%-a) **rendelkezik olyan közvetlen, vagy közvetett virulencia faktorral, mely egy esetleges betegség kialakításában kóroki szerepet játszhat**. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a *P. aeruginosa* faj környezeti eredetű törzsei képesek lehetnek a klinikai izolátumokhoz hasonlóan kiterjedt, többszörös antibiotikum rezisztenciára, azaz multirezisztenciára (KASZAB ET AL. 2010A), valamint korábbi munkánk során kísérletes úton bizonyítottuk a faj környezeti és klinikai eredetű izolátumainak széleskörű szénhidrogénbontó képességét (KASZAB ET AL. 2006). E tulajdonságok együttes ismeretében **megdőlni látszik az a feltételezés, miszerint az extrém környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodás következtében a speciális élőhelyek viszonyaihoz idomulva olyan mértékű specializáció menne végbe, mely egyes életképességgel, virulenciával, degradációs aktivitással, illetve antibiotikum rezisztenciával összefüggő tulajdonságok elvesztéséhez vezethetne**. Megállapítható, hogy a szakirodalomban vázolt felvetések, melyek szerint az antibiotikum rezisztenciával rendelkező törzsek gyakran kevésbé életképesek (ANDERSON, 1999), illetve néha kevésbé virulensek (ARRUDA ET AL., 1999) az általunk vizsgálatba vont környezeti és klinikai izolátumok esetében további felülvizsgálatra szoruló feltételezés.

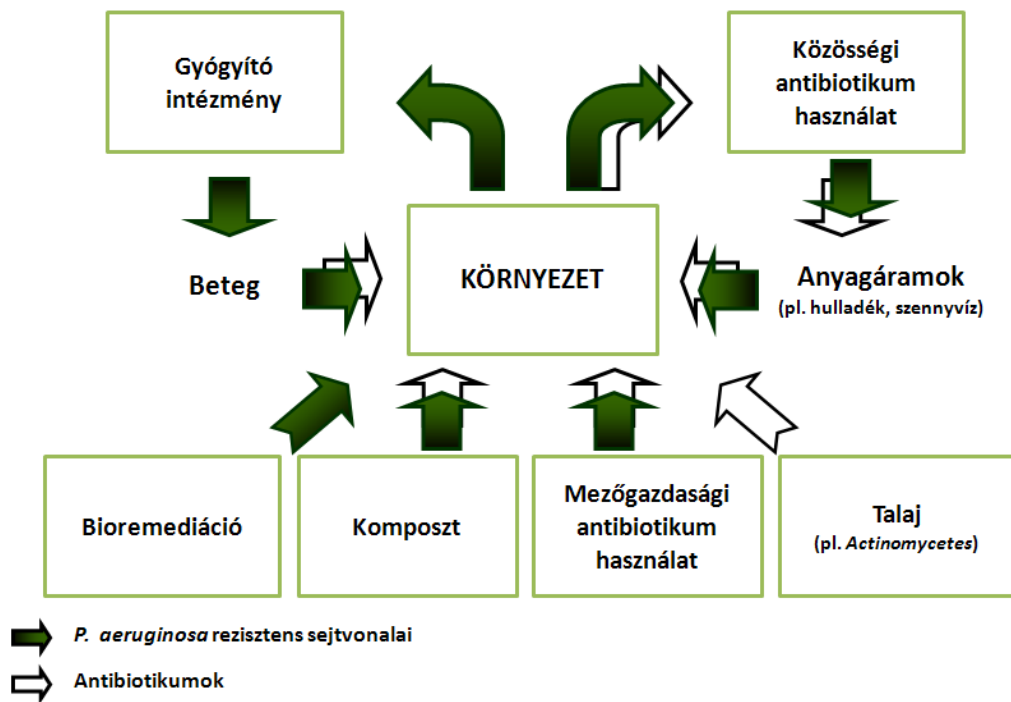
A vizsgálati eredmények közvetlen humán-egészségügyi vonatkozása lehet, hogy kármentesítési helyszínen bekövetkezett, *P. aeruginosa*-nak, vagy egyéb fakultatív patogéneknek tulajdonítható fertőzés esetén a helyszínről kitenyészett kórokozók patogenitásának, ill. antibiotikum rezisztenciájának ismerete a megfelelő készítmény, ill. terápia kiválasztását nagymértékben megkönnyítheti.

A multirezisztens törzsek kezelése azonban szinte megoldhatatlan feladat elé állítja az orvosokat, így mindennél fontosabb a rezisztencia kialakulásának megelőzése, késleltetése. Eredményeim alátámasztják, hogy hiperrezisztens környezeti törzsek megjelenése nem csupán a távoli jövőben lehetséges; bizonyítást nyert, hogy már **létezik multirezisztencia a gyógyító intézményeken kívül is**, úgy szénhidrogénnel szennyezett területeken, mint komposztban.

Az antibiotikum-rezisztens környezeti izolátumok eredete még tisztázatlan és számos okra vezethető vissza. Ilyen az emberi szervezetből kiürült antibiotikumok jelentette szelekciós nyomás, melyek a szennyvízen keresztül környezetünkbe kerülve indukálhatják az ott élő baktériumtörzsek esetében a rezisztencia fokozódását. A kommunális szennyvizek ugyanis - a csatornázás és szennyvízkezelés hiányosságai miatt - számos esetben tisztítás nélkül kerülnek a felszíni és felszín alatti vizekbe, valamint a földtani közegbe. Hasonló eredménnyel járhatnak a mezőgazdasági használatban lévő antibiotikum készítmények is, melyek a mezőgazdasági hulladékkal, állati eredetű trágyával, komposztal juthatnak környezetünkbe. Feltételezhető továbbá, hogy a kórházi környezetben jelentősebb antibiotikum nyomásnak kitett, így átlagosnál nagyobb rezisztenciát mutató, vagy multirezisztens törzsek a gyógyult betegek, kórházi dolgozók, vagy a kórházi látogatók közvetítésével kikerülhetnek a környezetbe.

A megfigyelhető rezisztencia okai között minden valószínűség szerint **nagy jelentősége van a spontán mutációknak**, valamint a szerzett géneken kódolt, ún. átvihető rezisztenciának. Ez utóbbit igazolja például az Azlocillin és a Piperacillin esetében jelentkező fokozott antibiotikum-rezisztencia, amely szakirodalmi adatok alapján feltehetően szerzett béta-laktamázok megjelenésének tulajdonítható. A horizontális (mobilis genetikai elemek, pl. plazmidok, transzpozonok, integronok által közvetített) rezisztencia-átvitel lehetősége ugyanakkor a klinikai és a környezeti *P. aeruginosa* törzsek között nem tisztázott, saját eredményeink alapján is további vizsgálatokat igényel. A multirezisztencia kialakulásának és terjedésének lehetséges módjait foglalja össze az 5.1. sz. ábra.

Mivel hazánkban a klinikai gyakorlatban is csak az utóbbi néhány évben tapasztalták a multirezisztens törzsek felbukkanását (KONKOLY THEGE, 2003; LIBISCH ET AL., 2007) ezért várható, hogy **a rezisztencia helyzet** mind a kórházi, mind a környezetből izolált *P. aeruginosa* törzsek esetében **romlani fog**. A jövőre nézve fontos feladat tehát **az antibiotikum-rezisztencia változások folyamatos nyomon követése** a környezetből izolált baktériumtörzsek esetében is; további környezeti eredetű mintákból izolált *P. aeruginosa* törzsek vizsgálatával pedig pontosabb képet nyerhetünk a rezisztencia-mechanismusok terjedéséről.



5.1. sz. ábra: A multirezisztencia mechanizmusok kialakulásának és terjedésének elméleti folyamatábrája (D' COSTA ET AL., 2006; KÜMMERER, 2003; MONSEN ET AL., 1999; QUINN AND RODVOLD, 2000 nyomán KASZAB ET AL., 2010A)

Az eredmények tükrében **felülbírálandó a biodegradációs eljárásoknak az a módja, melynek során a szénhidrogén-szennyezések helyszínén a talajban élő természetes mikrobapopulációt szaporítják fel, illetve faj szinten azonosítatlan oltóanyagot juttatnak ki.** Az említett módszerekkel a *P. aeruginosa* és egyéb patogének - gyakran antibiotikumokkal szemben ellenálló - törzsei elszaporodhatnak és elérhetnek egy esetleges fertőzés kialakulásához elegendő élősejt-számot is.

A biodegradációs eljárásokra **hazánkban alkalmazott, szigorú jogi szabályozást [16/2002 (IV.10.) EÜM. RENDELET] az ismertett eredmények alapján mindenképp szükséges fenntartani.** A patogén mikroszervezetek környezetbiztonsági jelentőségének felismerése és további megerősítése reményeink szerint elősegíti a nemzetközi jogszabályi háttér kidolgozását is. A kármentesítésekben dolgozók egészségének védelme érdekében mindenképpen szükséges a betegséget okozó mikroszervezetek minél hatékonyabb kizárása a munkafolyamatokból; különösen a nagy élősejt-számot elérő oltóanyagok esetében. Lényeges feladat tehát minden olyan biztonsági előírás betartása, amelyek segítségével kivédhető egy kármentesítés helyszínén szerzett fertőzés.

A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy virulenciára és antibiotikum rezisztenciára vonatkozó megállapításaink összhangban vannak a szakirodalomban fellelhető, környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsekre vonatkozó egyes kutatások megállapításaival (VIVES-FLÓREZ AND GARNICA 2006, ALONSO ET AL. 1999), melyek szerint a *P. aeruginosa* klinikai és környezeti (szénhidrogénnel szennyezett) mintákból gyűjtött izolátumai főbb tulajdonságaik

(rezisztencia, szénhidrogénbontó képesség) tekintetében nem mutatnak jelentős különbséget. Míg azonban a fent említett szakirodalmi források csupán öt, illetve hét, környezeti eredetű izolátum bemutatása alapján vonták le ezt a következtetést, addig jelen munka keretében 36 db, szénhidrogénnel szennyezett mintából, ill. 25 db, komposztból izolált törzs eredményeit mutatjuk be, mely az adott faj ismert módon alacsony környezeti kimutathatóságának (GROBE ET AL., 1995) ismeretében már **reprezentatív számnak tekinthető**. Eredményeink így az eddigieknél átfogóbb képet adnak a patogenitásra, rezisztenciára utaló tulajdonságok környezeti elterjedtségéről.

A természetes mikrobaközösségre gyakorolt hatások tekintetében elmondható, hogy a *P. aeruginosa* faj esetében előforduló **virulencia determinánsok (hemolitikus aktivitás, exoenzimek és exotoxinok termeléséért felelős génszakaszok jelenléte), illetve az antibiotikum rezisztencia kódolásáért felelős génszakaszok gyakran a bakteriális genom olyan részein helyezkednek el, melyek G+C összetétele eltér a bakteriális genom többi részén tapasztaltaktól**. Ebből arra következtethetünk, hogy **ezek a génszakaszok horizontális géntranszfer útján kerülhettek adott baktériumtörzs genetikai állományába** (ALONSO ET AL., 1999). Joggal felmerül tehát annak a lehetősége, hogy a betegség kialakítására képes, esetlegesen többszörös antibiotikum rezisztenciával jellemezhető *P. aeruginosa* baktériumtörzsek a környezetben e tulajdonságok rezervoárjául szolgálhatnak, azaz **átadhatják a kódolásukért felelős génszakaszokat a természetes mikrobiota tagjainak** (D’COSTA ET AL., 2006). Amennyiben ez a feltételezés helytálló, a virulens és rezisztens környezeti izolátumok közvetlen és közvetett módon egyaránt veszélyeztethetik a humán egészséget, valamint a természetes mikrobiális ökoszisztéma összetételét és genetikai állományát is kedvezőtlen irányba befolyásolhatják.

E kedvezőtlen hatások kiküszöbölésére javasolt a **szénhidrogénnel szennyezett kárhelyekfolyamatos monitoringja**, valamint a **patogén mikroszervezetek kontrollja**, illetve a **jogszabályi előírások maradéktalan betartása**. A komposztálás folyamatát tekintve javasolható a **technológiai előírások maradéktalan betartása**, ill. adott szituációban a **magasabb higiénizáltsági fokú végterméket garantáló eljárás választása**. A komposzt termékek minősítésére vonatkozó 23/2003. (XII.29.) KvVM rendelet *P. aeruginosa* esetében **nem állapít meg higiénés határértéket a kész komposztra vonatkozóan**, mely jelen eredmények és a nemzetközi szakvélemény tükrében a jövőben átgondolandó lehetőség. **A javasolható megengedett, ill. a forgalomba hozatalt megelőzően elérendő *P. aeruginosa* szám** – mely a hazai és nemzetközi szakirodalom alapján még nem jár súlyos egészségkockázattal – **kész komposzt termék esetében 10 CFU/gramm**.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A biotechnológiai eljárások térhódításával napjainkban új kihívásokkal szembesülünk: a környezetvédelem, agrárium és az ipar szolgálatába állított mikroszervezetek tulajdonságainak elégtelen ismerete mellett kémiai, biológiai és ökológiai veszélynek tehetjük ki a társadalmat és az ökoszisztémát. A **biológiai biztonságot** veszélyeztető tényezőnek számít a **patogenitás**, azaz a betegség kiváltásának képessége, mely számos biotechnológiai alkalmazásban lévő mikroszervezetre jellemző. A biotechnológiai folyamatok keretében a patogén mikroorganizmusok alkalmazása „kétélű fegyver” (RICHMOND, 2008): ezek a természetes környezetben is megtalálható mikroszervezetek számos esetben laboratóriumban könnyen tenyészthetők, így változatos alkalmazási lehetőséget biztosítanak a környezeti biotechnológia számára. Mobilitásuk, nem célszervezetekre gyakorolt hatásuk, ill. perzisztenciájuk révén (HEIKKI, 2003) azonban súlyos környezetegészségügyi problémákhoz vezethetnek.

A *P. aeruginosa* baktériumfaj e kettős megítélés jellemző példája: klinikai viszonylatban az egyik legjelentősebb opportunista kórokozó, mely a súlyos kimenetellel járó nozokomiális (kórházi) infekciók kimagasló hányadéért felelős. Környezetvédelmi felhasználását tekintve azonban humánegészségügyi kockázatát a szakma nem ismerte fel, és számos esetben igyekeznek törzseit a (környezetvédelmi) beavatkozások szolgálatába állítani.

Doktori kutatási témámban a *P. aeruginosa* faj esetében fellelhető szakirodalom részletes áttekintését követően kutatási tervet állítottunk össze, mely alapvetően **négy célkitűzés** megvalósítása köré csoportosult:

1. A *P. aeruginosa* kimutatási gyakoriságának, jellemző sejtszámának megállapítását célzó vizsgálatok, melyek szénhidrogénnel szennyezett minták esetében, valamint a komposztálás folyamata során zajlottak, így információt nyerhettünk e faj jelentőségéről a biotechnológia szempontjából kiemelkedően fontos két közegben. Megállapítottuk, hogy a *P. aeruginosa* szénhidrogénnel szennyezett területeken **49-ből legalább 34 kárhely esetében volt kimutatható, mely 69,3% gyakoriságot jelent. A begyűjtött 235 környezeti mintára vonatkoztatott kimutatható aránya 33,6% volt.** A komposztálás folyamatára vonatkozó vizsgálataink során végigkövettük a vizsgált faj detektálhatóságát a komposztálás nyersanyagaitól a kész komposzt termékig, ill. komposzttal kezelt földtani közeg esetében is születtek eredmények. Megállapítottuk, hogy e jellemzően mezofil mikroszervezet a jogszabályban előírt technológia és hőmérséklet mellett is **képes lehet a komposztálás termofil szakaszának túlélésére és megjelenhet a kész komposzt termékben.** Ez az eredmény a komposztálással foglalkozó, ill. környezetvédelmi szakemberek számára egyaránt jelentős, hiszen e mikroszervezet és jellemzően a mezofil fajok a szakma megítélése szerint nem bírnak jelentőséggel helyesen kivitelezett komposztálási eljárás esetében. E feltevés azonban eredményeink alapján megdőlni látszik.

A jellemző élősejtszámok megállapítására irányuló vizsgálataink szerint a *P. aeruginosa* faj esetében a **tapasztható élősejt számok elérhetik a FOK (2005); és LIZEWSKI ET AL. (2002) által meghatározott infekzív dózist**, mely orális expozíció esetén 10^2 - 10^8 MPN/g. Ez az eredmény **felveti annak a lehetőségét, hogy a szennyezett felszín alatti vízzel, földtani közeggel, ill. komposzttal érintkezve arra hajlamos, vagy egészséges személyben kolonizáció, és/vagy infekció alakuljon ki.**

2. A *P. aeruginosa* faj környezeti törzseinek megbetegítő képességére utaló tulajdonságok laboratóriumi igazolására közvetlen, ill. közvetett virulencia faktorok vizsgálatát hajtottuk végre molekuláris genetikai és hagyományos mikrobiológiai módszerekkel. E munka keretében igazolást nyert, hogy **a környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek 80,3%-ban mutattak valamilyen mértékű hemolitikus aktivitást, azaz a vizsgált törzsek közel 4/5-e képes a vörösvértesteket károsító aktivitásra, mely közvetlen virulenciára utaló faktornak tekinthető.** A közvetett virulencia determinánsok közül a **II. és III. típusú szekréciós rendszer által kiválasztott toxinokat, ill. toxikus proteinek kódoló génszakaszok (*exoA*, *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY*) detektálását tűztük ki célul.** Munkánk megvalósítása során megállapítottuk, hogy a környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek tagjainak genetikai állományában **mind az ötféle, exotoxinok, vagy exoenzimek termeléséért felelős vizsgált génszakasz kimutatható, illetve az esetek döntő részében egyidejűleg legalább két vizsgált génszekvencia van jelen a bakteriális genomban.** A vizsgálatba vont génszakaszok a szénhidrogénnel szennyezett területekről izolált törzsek genetikai állományában az alábbi arányban voltak jelen: *exoA*: 100,0%; *exoS*: 86,2%; *exoY*: 100,0%; *exoT*: 100,0%; *exoU*: 13,8%. A komposzttal kezelt területekről izolált törzsek genomjában az alábbi kimutatási arányokat detektáltuk: *exoA*: 100,0%; *exoS*: 76,0%; *exoY*: 80,0%; *exoT*: 92,0%; *exoU*: 0,0%.

3. Az antibiotikum rezisztencia - mint a *P. aeruginosa* fajra klinikai vonatkozásban jellemző, egyre súlyosbodó probléma – környezeti törzsek vonatkozásában mérhető állapota szintén kutatási témánk volt. E témakör tekintetében összesen 61 db, (36 db szénhidrogénnel szennyezett területről származó, ill. 25 db komposzt eredetű) izolátum rezisztencia profilja került megállapításra.

Eredményeink alapján az antibiotikum rezisztencia jelentősége környezeti törzsek esetében nem marad el a klinikai területen tapasztaltaktól, ahogyan azt az Országos Epidemiológiai Központ 'Nemzeti Bakteriológiai Surveillance Adatfeldolgozó Csoportjának' adataival történő összevetés is igazolja: **a direkt szelekciós nyomás (antibiotikum terápia) nélkül kialakuló környezeti rezisztencia ténye munkánk során megerősítést nyert.**

A többszörös antibiotikum rezisztencia tekintetében elmondható, hogy **legalább két különböző antibiotikum hatóanyagcsoporttal szembeni rezisztenciát detektáltunk 11, szénhidrogénnel szennyezett közegből származó, valamint 6, komposzt eredetű *P. aeruginosa* izolátum**

esetében. Igazolást nyert tehát a multirezisztencia ténye a földtani közeg, a felszín alatti víz, valamint a komposzt mikrobaközösségeiben. Eredményeink alapján **első ízben kerültek izolálásra az Aminoglikozidok (P43 jelű törzs), illetve a Fluorokinolonok (P69 jelű törzs) csoportjába tartozó antibiotikum-hatóanyaggal szemben rezisztens, kórházi környezetben kívül izolált *P. aeruginosa* törzsek.**

4. A virulencia és antibiotikum rezisztencia tulajdonságok eredményeinek összevetése a klinikai viszonylatban tapasztalt adatokkal további, a tudomány számára újdonságértékkel bíró eredményhez vezetett. Megállapítottuk, hogy az *exoA*, *exoY* és *exoT* toxikus proteinek kódoló génszakaszok környezeti kimutathatósági arányában a szakirodalomból ismert, klinikai viszonylatban tapasztalt értékekkel összevetve nincs érdemi különbség. Az *exoU* génszakasz környezeti (szénhidrogénnel szennyezett területről izolált, illetve komposzt eredetű) törzsek esetében alulreprezentált, helyette az *exoS* dominanciája jellemző. **A környezeti eredetű izolátumok zöme – genetikai sajátosságaik és a szakirodalmi források alapján (FLEISZIG ET AL., 1997; HAUSER ET AL., 2002) – az invazív törzsek csoportjába sorolható.**

Eredményeink alapján minden eddiginél **átfogóbb képet nyerhettünk a *P. aeruginosa* faj környezeti mintákból izolált törzseinek jellemző tulajdonságairól**, valamint esetleges biológiai kockázatairól, mely ismereteket a környezetvédelmi és humán-egészségügyi területen dolgozó szakemberek egyaránt hasznosíthatják. A korszerű elméleti alapokon nyugvó és modern módszertani megvalósítás révén elért új tudományos eredményeket hat tézis formájában összegeztük. A tézisekből leszűrhető információk elméleti vonatkozásaik mellett a gyakorlat és a jogalkotás számára is hasznosak lehetnek.

7. ENGLISH SUMMARY

Nowadays, the widespread application of biotechnological processes means new challenges for scientists: our slight knowledge about microorganisms applied in environmental protection, agriculture and industry possibly means chemical, biological or ecological hazard for the community or ecosystem. **Pathogenicity** – i.e. the ability to cause disease – is a characteristic feature of many organisms that are used in biotechnology and is a factor that endangers the **biological safety of these processes**. The application of pathogens for biotechnological purposes is a „double-edged sword” (RICHMOND, 2008): on the one hand, these microorganisms are naturally occurring and are easily cultivatable in laboratory for a variety of uses. On the other hand, the mobility, the effects on non-target microorganisms and the persistence (HEIKKI, 2003) of these microbes can lead to serious consequences in environmental health.

P. aeruginosa is a typical example: in clinical environment, it is one of the most significant opportunistic pathogen bacterium that is responsible for the considerable part of nosocomial infections. However, in the field of environmental protection the human health concerns of this organism are not realized, and the strains of this species are commonly used for bioremediation purposes.

In my Ph.D. studies, after the accurate review of relevant scientific literature, a plan of research was compiled for the examination of the above mentioned issue with the following four objectives:

1. The detection of *P. aeruginosa* and the determination of its cell count in environmental (hydrocarbon contaminated and compost related) samples. In our work we determined that *P. aeruginosa* was detectable in 34 of the examined 49 hydrocarbon contaminated sites that means 69.3% frequency. The rate of detection referred to the collected 235 samples was 33.6%. In composting, the number of the examined species was followed during the whole process including raw materials, immature and mature compost and compost treated soil environments. Based on our results it was established that mesophilic *P. aeruginosa*, under the determined time and temperature criteria of the relevant Hungarian law, was able to survive thermophilic phase of composting and was detectable in final compost product as well. This result can be significant not only for experts of composting but for environmental engineers because they typically not attach importance to mesophilic microorganisms under properly managed composting technology. Our results suggest that this approach needs to be considered.

During our research work the detected cell counts of *P. aeruginosa* have reached or exceeded the lower threshold of infectious dose (10^2 - 10^8 MPN/g for oral exposition) determined by **FOK (2005) and LIZEWSKI ET AL. (2002)**. **This result raises the issue of the chance for colonization and/or infection of immunocompromised or healthy individuals that are in connection with contaminated groundwater, soil or compost.**

2. To determine the virulence of environmental originating strains of *P. aeruginosa* i.e. the ability to cause disease, several direct and indirect virulence markers were examined via molecular genetic and traditional microbiological methods. Our results verified that 80.3% of *P. aeruginosa* strains isolated from environmental samples show hemolytic activity, i.e. four fifths of the examined isolates are able to damage red blood cells that is a direct virulence factor. Indirect virulence markers such as the presence of gene sequences encoding the secretion of toxins and toxic proteins by II. and III. Type Secretion Systems (namely *exoA*, *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY*) were the target objects of our examination, too. During our work we determined that environmental originating strains of *P. aeruginosa* are commonly carrying the examined five gene sequences, and the majority of the isolates have at least two gene sequences in their bacterial genom. Among *P. aeruginosa* strains, isolated from hydrocarbon contaminated sites, the examined gene sequences were detectable with the following rates: *exoA*: 100.0%; *exoS*: 86.2%; *exoY*: 100.0%; *exoT*: 100.0%; *exoU*: 13.8%, respectively. Compost originated strains had the following rates of detection: *exoA*: 100.0%; *exoS*: 76.0%; *exoY*: 80.0%; *exoT*: 92.0%; *exoU*: 0.0%.

3. The examination of **antibiotic resistance**, that is a characteristic and increasing problem of *P. aeruginosa* in clinical environments, was another important aim of our work. Within the scope of this field, resistance profiles were determined in the case of 61 isolates (36 from hydrocarbon contaminated environments and 25 compost originating, respectively).

Based on our results the importance of antibiotic resistance among environmental originating strains is not behind the clinically experienced level as it was suggested by the comparison with the available database of the National Bacteriological Surveillance Management Team of the National Center for Epidemiology: **antibiotic resistance in the environment, even without the direct selection pressure of antibiotic therapy can be confirmed.**

With respect to multiple antibiotic resistance it was established that **simultaneous resistance** (against two, or more antibiotic groups) **was detectable in the case of 11 strains, isolated from hydrocarbon contaminated sites and 6, compost originating isolates of *P. aeruginosa*, respectively.** It was verified that multidrug resistance is detectable among members of soil, groundwater and compost microbiota. **Our work is the first detection of environmental (non-clinical) originating strains that are resistant against Aminoglycosides (strain P43), or Fluoroquinolones (strain P69).**

4. **The comparison of virulence and antibiotic resistance features with clinically determined data led to additional results with scientific novelty.** It was verified that the detection rates of *exoA*, *exoY* and *exoT* gene sequences among environmental and clinical originating strains are not considerably different. *ExoU* gene sequence is under-represented among environmental strains (isolated from hydrocarbon contaminated or compost related samples), while,

instead of *exoU*, *exoS* is dominant. Therefore **we could conclude that, based on their genetic features and scientific literature (FLEISZIG ET AL., 1997; HAUSER ET AL., 2002), the majority of environmental strains of *P. aeruginosa* can be classified into the invasive group.**

Based on our results **we could get a comprehensive overview about the characteristic features and biohazard of *P. aeruginosa* strains isolated from environmental samples** that can be useful for experts of environmental and human-health sciences. Our new scientific results are based on modern theoretical basis and methodology and are summarized in six theses. The information of these theses, besides their theoretical aspects, can be useful for practice and legislation as well.

1. SZ. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK

- AJAYI, T., ALLMOND, L.R., SAWA, T. & WIENER-KRONISH, J.P. (2003): Single-Nucleotid-Polymorphism Mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion Toxins for Development of a Diagnostic Multiplex PCR System. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (8) 3526-3531. p.
- AL-AHMAD, A., DASCHNER, F. D. & KÜMMERER, K. (1999): Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Environmental Contamination and Toxicology*, 37 (2) 158-163. p.
- ALEXA L. ÉS DÉR S. (2001): Szakszerű komposztálás. Elmélet és gyakorlat. Profikomp Kft., Gödöllő, 264 p.
- ALLEN, H.K., DONATO, J., WANG, H.H., CLOUD-HANSEN, K.A., DAVIES, J., HANDELSMAN, J. (2010): Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8 251-259. doi: 10.1038/nrmicro2312
- ALONSO, A., ROJO, F. & MARTÍNEZ, J.L. (1999): Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environmental Microbiology*, 1 (5) 421-430. p.
- AMLINGER, F. & LUDWIG-BOLTZMANN, K.J. (1996): Biowaste compost and heavy metals: a danger for soil and environment. 314-328. p. In: DE BERTOLDI, M., SEQUI, P., LEMMES, P., PAPI, T. (Eds.): The science of composting. Glasgow, UK: Blackie Academic & Professional, 1520 p.
- ANDERSON, D. (1999): Fitness costs of resistance and genetic compensation. *Clinical Microbiology and Infection*, 5 22. p.
- ANTON, A., SIMON, L. (1999): A talaj szennyeződése szerves anyagokkal. 33-55. p. In: ANTON A., DURA GY., GRUIZ K., HORVÁTH A., KÁDÁR I., KISS E., NAGY G., SIMON L., SZABÓ P.: Talajszennyeződés, talajtisztítás, 2. (bővített) kiadás, Környezetgazdálkodási Intézet, Budapest,
- ARANCIBIA, F., BAUER, T.T., EWIG, S., MENSA, J., GONZALEZ, J., NIEDERMAN, M.S. & TORRES, A. (2002): Community-acquired pneumonia due to Gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: incidence, risk, and prognosis. *Archives of Internal Medicine* 162 (16) 1849-1858. p.
- ARRUDA, E.A.G., MARINHO, I.S., BOULOS, M., SINTO, S.I., CAIAFFA, F.H.H., MENDES, C.M., OPLUSTIL, C.P., SADER, H., LEVY, C.E. & LEVIN, A.S. (1999): Nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 20 (9) 620-623. p.
- ATZÉL, B., SZOBOSZLAY, S., MIKUSKA, ZS. & KRISZT, B. (2007): Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211 (1-2) 143-155. p.
- BABAY, H.A.H. (2007): Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients in a teaching hospital, Riyadh, Saudi Arabia, 2001-2005. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60 (2-3) 123-125. p.
- BAQUERO, F. (1990): European standards for antibiotic susceptibility testing: towards a theoretical consensus. In: BARCS I. (2001): Rezisztencia problémák – probléma baktériumok. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia*, 8 (2) 68-74. p.
- BARCS I. (2001): Rezisztencia problémák – probléma baktériumok. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia*, 8 (2) 68-74. p.
- BECKMAN, W. & LESSIE, T.G. (1979): Response of *Pseudomonas cepacia* to β -lactam antibiotics: utilization of penicillin G as the carbon source. *Journal of Bacteriology*, 140 1126-1128.

- BÉLÁDI, I., KÉTYI, I., NÁSZ, I. ÉS VÁCZI, L. (1983): Orvosi mikrobiológia – immunitástan – parazitológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 542 p.
- BENEDEK P. (1990): Biotechnológia a környezetvédelemben. Műszaki Könyvkiadó, Budapest
- BÍRÓ S., HORNOK L., KEVEI F., KUCSERA J., MARÁZ A., PESTI M., SZŰCS GY. ÉS VÁGVÖLGYI CS. (2001): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 308 p.
- BJORN, M.J., VASIL, M.L., SADOFF, J.C. & IGLEWSKI, B.H. (1977): Incidence of exotoxin production by *Pseudomonas aeruginosa* species. *Infection and Immunity*, 16 (1) 362-366. p.
- BLOCK, S.S. (Ed.) (2001): Disinfection, sterilization, and preservation. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 1481 p.
- BOLDIN, B., BONTEN, M.J.M. & DIEKMANN, O. (2007): Relative effects of barrier precautions and topical antibiotics on nosocomial bacterial transmission: results of multi-compartment models. *Bulletin of Mathematical Biology*, 69 2227-2248. p.
- BOLLEN, G.J. & VOLKER, D. (1996): Phytohygienic aspects of composting. 233-246. p. In: DE BERTOLDI, M., SEQUI, P., LEMMES, P., PAPI, T. (Eds.): The science of composting. Glasgow, UK: Blackie Academic & Professional, 1520 p.
- BONDARENKO, O., RAHMAN, P.K., RAHMAN, T.J., KAHRU, A. & IVASK, A. (2010): Effects of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 on luminescent bacteria: toxicity and modulation of cadmium bioavailability. *Microbial Ecology* 59 (3) 588-600. p.
- BORVENDÉG J. ÉS VÁRADI A. (2002): Hatóanyagok, készítmények, terápia. Melinda Kiadó és Reklámügynökség, Budapest, 648 p.
- BRENCsÁN J. (2006) : Új orvosi szótár, Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 271 p.
- BUCKLEY, M. (2004): The genomics of disease-causing organisms: mapping a strategy for discovery and defense. *American Academy of Microbiology*, Washington DC, USA. 26 p.
- BURNS, D.L., BARBIERI, J.T., IGLEWSKI, B.H. & RAPPUOLI, R. (EDS.) (2003): Bacterial protein toxins. ASM Press, Washington DC, USA. 335 p.
- CAPPUCCINO, J.G. & SHERMAN, N. (2008): Bacterial Staining. 87-89. p. In: CAPPUCCINO, J.G. & SHERMAN, N.: Microbiology. A laboratory manual. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco
- CASTANHEIRA, M., MENDES, R.E. & WALSH, T.R. (2004): Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48 2344-2345. p.
- CASTANON, J.I.R., (2007): History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86 2466-2471. p.
- CHAYABUTRA, C.& JU, L.K. (2000): Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2) 493-498. p.
- CLAUS, F. (1992): Sichere Biotechnologie. Eingruppierung biologischer Agenzien: Bakterien. Heidelberg, Jederman-Verlag, 177 p.
- CRAWFORD, R.L. & CRAWFORD, D.L. (1998): Bioremediation: principles and applications. Cambridge University Press, Moscow, Idaho, 1-12. p.

- DA SILVA, M.E.Z., FILHO, I.C., ENDO, E.H., NAKAMURA, A.C., UEDA-NAKAMURA, T. & FILHO, B.D.P. (2008): Characterisation of potential virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93 (4) 323–334. p.
- DAS, K. & MUKHERJEE, A.K. (2007): Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98 (7) 1339-1345. p.
- D’COSTA, V.M., MCGRANN, K.M., HUGHES, D.W. & WRIGHT, G.D. (2006): Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311 (5759) 374-377. p.
- DE BERTOLDI, M., ZUCCONI, F. & CIVILINI, M. (1988): An analysis of the effectiveness of various systems to reduce the pathogen content of the compost product. *Biocycle*, 29 43-47. p.
- DE REUSE, H. AND BERESWILL, S. (2009): Microbial pathogenomics. *Genome Dynamics*, vol. 6. p. 214. S. Karger AG, Basel, Switzerland
- DÉPORTES, I., BENOIT-GUYOD, J.L., ZMIROU, D. & BOUVIER, M.C. (1998): Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting. *Journal of Applied Microbiology*, 85 (2) 238-246. p.
- DESAI, J.D. & BANAT, I.M. (1997): Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1) 47-64. p.
- DIEKEMA, D.J., PFALLER, M.A., JONES, R.N., AND THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (AMERICAS) (1999): Survey of blood-stream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clinical Infectious Diseases*, 29 595-607. p.
- DOLLIVER, H., GUPTA, S., NOLL, S., 2008. Antibiotic degradation during manure composting. *Journal of Environmental Quality*, 37 1245-1253. p.
- DRAGHI, D.C., JONES, M.E., SAHM, D.F. & TILLOTSON, G.S. (2006): Geographically-based evaluation of multidrug resistance trends among *Streptococcus pneumoniae* in the USA: findings of the FAST surveillance initiative (2003–2004). *International Journal of Antimicrobial Agents* 28 (6) 525–531. p.
- DROFFNER, M.L., BRINTON, W.F. & EVANS, E. (1995): Evidence for the prominence of well characterized mesophilic bacteria in thermophilic (50-70°C) composting environments. *Biomass and Bioenergy*, 8 191-195. p.
- EDRINGTON, T.S., FOX, W.E., CALLAWAY, T.R., ANDERSON, R.C., HOFFMAN, D.W. & NISBET, D.J. (2009): Pathogen prevalence and influence of composted dairy manure application on antimicrobial resistance profiles of commensal soil bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 217-224. p.
- EFB (1980): EFB Newsletter (European Federation of Biotechnology), Dec. 1981, No. 4, p. 2.
- ELASRI, M.O. & MILLER, R.V. (1999): Study of response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (5) 2025-2031. p.
- ELKINS, J. G., HASSETT, D. J., STEWART, P. S., SCHWEIZER H. P. & MCDERMOTT T. R. (1999): Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10) 4594-4600. p.
- EPINFO: (2008): Magyarország 2006. évi járványügyi helyzete. 15 (3) 116 p. Országos Tisztifőorvosi Hivatal, Budapest
- EPSTEIN, E. (2001): Worldwide composting technologies with special reference to biodegradable plastics. In:

- ERIKSSON, M., KA, J.O. & MOHN, W.W. (2001): Effects of low temperature and freeze-thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in arctic tundra soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1) 5107-5112. p.
- EVANS, G.M. & FURLONG, J.C. (2003): Environmental biotechnology: theory and application. John Wiley & Sons, West Sussex, England, 285 p.
- FAGON, J.Y., CHASTRE, J., DOMART, Y., TROUILLET, J.L., PIERRE, J., CARNE, C. & GILBERT, C. (1989): Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. *The American Review of Respiratory Disease*, 139 (4) 877-884. p.
- FARKAS J. szerk. 1998: A mikrobiális ökológia alapjai. Ökológiai Intézet a Fenntartható Fejlődésért Alapítvány, Miskolc, 58 p.
- FARMER, J.J., WEINSTEIN, R.A., ZIERDT, C.H. & BROKOPP, C.D. (1982): Hospital outbreaks caused by *Pseudomonas aeruginosa*: importance of serogroup O11. *Journal of Clinical Microbiology*, 16 (2) 266-270. p.
- FERGUSON, M.W., MAXWELL, J.A., VINCENT, T.S., SILVA, J., OLSON, J.C. (2001): Comparison of the *exoS* gene and protein expression in soil and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 69 (4) 2198-2210. p.
- FILETÓTH ZS. (1995): A *Pseudomonas aeruginosa* okozta infekciók jelentősége az intenzív osztályokon. – *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* 2 (4) 146-149. p.
- FLEISZIG, S.M.J., WIENER-KRONISH, J.P., MIYAZAKI, H., VALLAS, V., MOSTOV, K.E., KANADA, D., SAWA, T., YEN, T.S.B. & FRANK, D.W. (1997): *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infection and Immunity*, 65 579-586. p.
- FOGARTY, A.M., TOUVINEN, O.H. (1991): Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiological Reviews*, 55 225-233. p.
- FOK, N. (2005): *Pseudomonas aeruginosa* as a waterborne gastroenteritis pathogen. *Environmental Health Reviews*, Winter 121-130. p.
- FÖLDI L. ÉS HALÁSZ L. (2009): Környezetbiztonság. Complex kiadó, Budapest, 419 p.
- FU, H., ZENG, G., ZHONG, H., YUAN, X., WANG, W., HUANG, G. & LI, J. (2007): Effects of rhamnolipid on degradation of granular organic substrate from kitchen waste by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Colloids and Surfaces B*, 58 (2) 91-97. p.
- FÜRST ZS. szerk. (2004): Farmakológia. Medicina könyvkiadó, Budapest, 920-982. p.
- GAD, G.F., EL-DOMANY, R.A., ZAKI, S. & ASHOUR, H.M. (2007): Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: prevalence, antibiogram and resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60 (5) 1010-1017. p.
- GALES, A.C., JONES, R.N., TURNIDGE, J., RENNIE, R., RAMPHAL, R. (2001): Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rate, antimicrobial susceptibility pattern and molecular typing in Global SENTRY antimicrobial surveillance program 1997-1999. *Clinical Infectious Diseases*, 32: S146-S155. p.
- GARRITY, G.M., BOONE, D.R., CASTENHOLZ, R. W. (2001): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria with contributions by numerous experts, 1: 721 p.

- GERARDI, M.H. & ZIMMERMAN, M.C. (2005): Wastewater pathogens. John Wiley & Sons INC., New Jersey.
- GESSARD, C. (1882): Sur les colorations bleue et verte des linges à pansements. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De l'Academie des Sciences*, 94 636-638. p.
- GHAZALI, F.M., RAHMAN, N.Z.A., SALLEH, A.B. & BASRI, M. (2004): Biodegradation of hydrocarbons in soil microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54 61-67. p.
- GRABER H. ÉS LUDWIG E. (2004): Antimikróbás kemoterápia. In: FÜRST ZS. szerk. (2004): Farmakológia. Medicina könyvkiadó, Budapest, 920-982. p.
- GREEN, S.K., SCHROTH, M.N., CHO, J.J., KOMINOS, S.D., VITANZA-JACK, V.B. (1974): Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology*, 28 (6) 987-991. p.
- GROBE, S., WINGENDER, J. & TRUPER, H.G. (1995): Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *Journal of Applied Bacteriology*, 79 94-102. p.
- GROMMEN, R. & VERSTRAETE, W. (2002): Environmental biotechnology: the ongoing quest. *Journal of Biotechnology*, 98: 113-123.
- GROSS, R.A. & SCHOLZ, C. (2001): Biopolymers from Polysaccharides and Agroproteins. 786 (23) 387-398. p.
- HAMSCHER, G., SCZESNY, S., HÖPER, H., NAU, H. (2002): Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74 (7) 1509-1518. p.
- HAUSER, A.R., COBB, E., BODI, M., MARISCAL, D., VALLES, J., ENGEL, J.N. & RELLO, J. (2002): Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Care Medicine*, 30 521-528. p.
- HEIKKI, M.T. (2003): Environmental Impacts of Microbial Insecticides: Need and Methods for Risk Assessment.
- HIGHSMITH, A.K. & ABSHIRE, R.L. (1975): Evaluation of a Most-Probable-Number technique for the enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology*, 30 (4) 596-601. p.
- HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K. & KRATZ, K.L. (1999): Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 225 (1-2) 109-118. p.
- HOLMES, A., GOVAN, J. & GOLDSTEIN, R. (1998): Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? *Emerging Infectious Diseases*, 4 (2) 221-227. p.
- HU, M.Z., NORMAN, J.M., FAISON, B.D. & REEVES, M.E. (1996): Biosorption of uranium by *Pseudomonas aeruginosa* strain CSU: characterisation and comparison studies. *Biotechnology and Bioengineering*, 51 (2) 237-247. p.
- JARVIS, W.R. & MARTONE, W.J. (1992): Predominant pathogens in hospital infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29 (suppl A) 19-24. p.
- JOHNSON, J. (1977): Utilization of benzylpenicillin as carbon, nitrogen and energy source by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Archives of Microbiology*, 115 271-275.
- JONES, J.D.G. & DANGL, J.L. (2006): The plant immune system. *Nature*, 444 323-329. p.
- KALIN, M., WHEELER, W. N. & MEINRATH, G. (2005): The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *Journal of Environmental Radioactivity*, 78 151-177. p.

- KANALY, R. A. & HARAYAMA, S. (2000): Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182 (8) 2059-2067. p.
- KASZAB E., BEDROS J. R., SZOBOSZLAY S., ATZÉL B., SZABÓ I., CSERHÁTI M. & KRISZT, B. (2006): Problems with environmental safety on bioremediated sites. *Academic and Applied Research in Military Science - AARMS*, 5 383-397. p.
- KASZAB, E. KRISZT, B., ATZÉL, B., SZABÓ, G., SZABÓ, I., HARKAI, P. & SZOBOSZLAY, S. (2010A): The occurrence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* on hydrocarbon contaminated sites. *Microbial Ecology*, 59 (1): 37-45.
- KASZAB, E., SZOBOSZLAY, S., DOBOLYI, CS., HÁHN, J., PÉK, N. & KRISZT, B. (2010B): Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. *Bioresource Technology*, accepted for publication (doi:10.1016/j.biortech.2010.08.027)
- KASZAB E., PÉK N., FARKAS M., KRISZT B. & SZOBOSZLAY S. (2010C): Környezeti eredetű *Pseudomonas aeruginosa* törzsek virulenciájának vizsgálata. *Tájökológiai Lapok*, 8 (1) 135-146.
- KEMME, J.A., SLOOS, J.H., VAN BOVEN, C.P.A. & DIJKSHOORN, L. (1997): Rapid screening of strain identity by the use of automated antibiogram reading combined with cluster analysis. In: Fourth International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers (IMBEM IV), Elsinore, Denmark, 10-13 September 1997, Proceedings 61 p.
- KERRY, J., HINEY, M., COYNE, R., CAZABON, D., NICGABHAINN, S. & SMITH, P. (1994): Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in micro-organisms isolated from marine fish farm sediments following therapeutic use of oxytetracycline. *Aquaculture*, 123 (1-2) 43-44. p.
- KJELLEBERG, S. (2002): Environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 199-203. p.
- KONKOLY THEGE M. (2003): Hiperrezisztens *Pseudomonas aeruginosa*: a postantibiotikum éra előhírnöke. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia*, 10 (3) 89-91. p.
- KRALL, R., SCHMIDT, G., AKTORIES, K. & BARBIERI, J.T. (2000): *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infection and Immunity*, 68 6066-6068. p.
- KÜMMERER, K. (2003): Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 (1) 5-7. p.
- LÁNG I. (2003): Környezetbiztonság és katasztrófavédelem. *Ma & Holnap*, 3 (1) 3-6. p.
- LEAHY, J.G., COLWELL, R.R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology Reviews*, 54 305-315. p.
- LI, X.Z., ZHANG, L., POOLE, K. (2000): Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45 (4) 433-436. p.
- LIBISCH, B., BALOGH, B. & FÜZI, M. (2008): Identification of Two Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clonal Lineages with a Countrywide Distribution in Hungary. *Current Microbiology*, 2008 Oct 23. (E-publication)
- LIN, H.-H., HUANG, S.-P., TENG, H.-C., JI, D.-D., CHEN, Y.-S. & CHEN, Y.-L. (2006): Presence of the *exoU* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is correlated with cytotoxicity in MDCK cells but not with colonization in BALB/c mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 4596-4597. p.
- LINKER, A. & JONES, R.S. (1966): A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, 241 3845-3851.

- LIVERMORE, D.M. (2002): Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34 (5) 634–640. p.
- LIZEWSKI, S., LUNDBERG, D.S. & SCHURR, M.J. (2002): The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 70 6083-6093. p.
- LOCK, C.M., CHEN, L. & VOLMER, A. (1999): Rapid analysis of tetracycline antibiotics by combined solid phase microextraction/high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 13 (17) 1744-1754. p.
- LOSONCZY GY. (2001): A klinikai epidemiológia alapjai – a nosocomialis fertőzések járványtana, Medicina könyvkiadó Rt. Budapest, 106-107, 481-487, 845-852. p.
- LUDWIG E. (2001): Fokozódó bakteriális rezisztencia (Súlyos, valódi probléma vagy az újabb és újabb antibiotikumok előállítását indokoló "slogen"). *Gyógyszereink*, 51 (2) 60-68. p.
- MADIGAN, M.T. (2000): Prokaryotic Diversity: Bacteria. 453-544. p. In: MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (Eds): Brock Biology of Microorganisms, Prentice-Hall International, London
- MAGYAR K. (2004): Gyógyszerek sorsa a szervezetben, farmakokinetika. 920-982. p. In: FÜRST ZS. (Szerk.): Farmakológia. Medicina könyvkiadó, Budapest,
- MAVROIDI, A., TZELEPI, E. & TSAKRIS, A. (2001): An integron-associated b-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum b-lactamase IBC-1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 627–630. p.
- McFARLAND, J. (1907): Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14 1176-1178. p.
- MENA, K.D. & GERBA, C.P. (2009): Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 201 71-115. p.
- MILCH H., CZIRÓK É. ÉS HERPAY M. (1996): Hogyan támadnak a baktériumok? SubRosa Kiadó, Budapest, 71 p.
- MISHRA, S., JYOT, J., KUHAD, R. C. & LAL, B. (2001): Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (4) 1675-1681. p.
- MONSEN, T., RONNMARK, M., OLOFSSON, C., WISTROM, J. (1999): Antibiotic susceptibility of staphylococci isolated in blood cultures in relation to antibiotic consumption in hospital wards. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 31 (4) 399-404. p.
- MOSKOWITZ, S.M., FOSTER, J.M., EMERSON, J.C., GIBSON, R.L. & BURNS, J.L. (2005): Use of *Pseudomonas* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (5) 879-886. p.
- MORRISON, A.J. & WENZEL, R.P. (1984): Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases*, 6 (3) 627-642. p.
- NAGY T. (2001): Biztonság és biztonságstudomány. Magyar Biztonságstudományi Társaság, Budapest, 115 p.
- NEMEROW, N.L., AGARDY, F.J., SULLIVAN, P. & SALVATO, J.A. (2008): Environmental Engineering. Environmental Health and Safety for Municipal Infrastructure, Land Use and Planning, and Industry. John Wiley and Sons, Inc., New Jersey.

- NÉMEDI L., JÁNOSSY L., ANDRIK P. ÉS KÁDÁR M. (1998): Közegészségügyi környezetbakteriológia. 149-247. p. In: Némedi L (Szerk): Környezetbakteriológia. 2. (bővített) kiadás, Budapest
- NÉMETH T. SZERK. (2004): Kármentesítési útmutató 7. A mennyiségi kockázatfelmérés módszertana. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Budapest, 2004.
- NEMZETI FEJLESZTÉSI TERV HELYZETÉRTÉKELÉSI FÁZISÁHOZ KÉSZÜLŐ KÖRNYEZET- ÉS TERMÉSZETVÉDELMI FEJEZET. Egyeztetési anyag, Budapest, 2001. március 31.
- NICAS, T.I., FRANK, D.W., STENZEL, P., LILE, J.D. & IGLEWSKI, B.H. (1985a): Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *European Journal of Clinical Microbiology*, 4 175-179. p.
- NICAS, T.I., BRADLEY, J., LOCHNER, J.E. & IGLEWSKI, B.H. (1985b): The role of exoenzyme S in infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*, 152 716-721. p.
- OECD (2001): Second OECD Ad Hoc Meeting on Biotechnology Statistics, OECD, May, 2001. http://www.oecd.org/document/42/0,3343,fr_2649_34537_1933994_1_1_1_37437,00.html
- OH, B.T., SHEA, P.J., DRIJBER, R.A., VASILYEVA, G.K. & SARATH, G. (2003): TNT biotransformation and detoxification by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Biodegradation*, 14 (5) 309-319. p.
- OPINION OF THE SCIENTIFIC PANEL ON GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS ON THE USE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES AS MARKER GENES IN GENETICALLY MODIFIED PLANTS (2004): EFSA (European Food Safety Authority) – *The EFSA Journal*, 48 1-18. p.
- OPINION OF THE SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE (1999): European Commission; Directorate-General XXIV. Consumer Policy and Consumer Health Protection Directorate B - Scientific Health Opinions Unit B3 - Management of scientific committees II; 28 May 1999; 121 p.
- ORSOVAI I. (1999): A bányászat és a hulladékelhelyezés földtani összefüggései. 205-240. p. In: Nánási I.: Humánökológia. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest
- ORSZÁGOS KÖRNYEZETI KÁRMENTESÍTÉSI PROGRAM - Kármentesítési Információs Rendszer (KÁRINFO) Összesítés a KÁRINFO programrendszerben található adatokról, 2005. november 30. <http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/karinfo/karinfo.htm#k01>
- OWLIA, P., BEHZADIYAN-NEJAD, Q., SOURI, E. & SADERI, H. (2001): Microscopic study of the effects of sub-inhibitory concentrations of gentamicin on capsule production of *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Irania Medicine*, 4 (1) 18–20. p.
- PENNINGTON, J.E. (1995): Nosocomial respiratory infections. 2599–2607. p. In: MANDELL, G., BENNETT, J., DOLIN R. (Eds.): Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York, N.Y.
- PIETRONAVE, S., FRACCHIA, L., RINALDI, M. & MARTINOTTI, M.G. (2004): Influence of biotic and abiotic factors on human pathogens in a finished compost. *Water Research*, 38 (8) 1963-1970. p.
- POIREL, L., BRINAS, L. & FORTINEAU, N. (2005): Integron-encoded GES-type extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49 3593–3597. p. In: WANG, C., CAI, P., CHANG, D. & MI, Z. (2006): A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1261-1262. p.
- POIREL, L., WELDHAGEN, G.F. & NAAS, T. (2001): GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45 2598-2603. p.

- POOLE, K. (2005): Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (1) 20-51.
- PUZDER T., CSÁKI F., GRUIZ K., HORVÁTH ZS., MÁRTON T. ÉS SAJGÓ ZS. (2001): Kármentesítési kézikönyv 4. Kármentesítési technológiák. Környezetvédelmi Minisztérium, Budapest, 170 p.
- QUINN, J.P. & RODVOLD, K.A. (2000): Antibiotic policies in neonatal intensive-care units. *The Lancet*, 355 (9208) 946-947. p.
- RICE, L.B. (2006): Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 43 (suppl 2) S100-S105. p.
- RICHMOND, R.H. (2008): Environmental protection: applying the precautionary principle and proactive regulation to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26 (8) 460-467. p.
- RIDGWAY, H.F., SAFARIK, J., PHIPPS, D., CARL, P. & CLARK, D. (1990): Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (11) 3565-3575. p.
- ROBERTSON, B.K. & JEMBA, P.K. (2005): Enhanced bioavailability of sorbed 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a bacterial consortium. *Chemosphere*, 58 263-270. p.
- ROWE, G.E. & WELCH, R.A. (1994): Assays of hemolytic toxins. *Methods in Enzymology*, 235 657-667. p.
- RUSIN, P.A., ROSE, J.B., HAAS, C.N. & GERBA, C.P. (1997): Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 152 57-83. p.
- RUSS, C.F. & YANKO, W.A. (1981): Factors affecting *Salmonellae* repopulation in composted sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, 41 597-602. p.
- RUSSELL, N.J. & GACESA, P. (1988): Chemistry and biology of the alginate of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 10 (1) 1-91. p.
- SADER, H.S., GALES, A.C., PFALLER, M.A., MENDES, R.E., ZOCCOLI, C., BARTH, A. & JONES, R.N. (2001): Pathogen Frequency and Resistance Patterns in Brazilian Hospitals: Summary of Results from Three Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 5 (4) 200-214. p.
- SANDKVIST, M. (2001): Type II Secretion and Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 69 (6) 3523-3535. p.
- SAUL, D.J., AISLABIE, J.M., BROWN, C.E., HARRIS, L. & FOGHT, J.M. (2005): Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 53 (1) 141-155. p.
- SHAH, A.A., HASAN, F., AHMED, S. & HAMEED, A. (2004): Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Research in Microbiology*, 155 409-421. p.
- SHAVER, C.M. & HAUSER, A.R. (2004): Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS and ExoT to virulence in the lung. *Infection and Immunity*, 72 (12) 6969-6977. p.
- SOBSEY, M.D., KHATIB, L.A., HILL, V.R., ALOCILJA, E. & PILLAI, S. (2001): Pathogens in animal wastes and the impacts of waste management practices on their survival, transport and fate. In: White Papers on Animal Agriculture and the Environment. MidWest Plan Service (MWPS), Iowa State University, Ames, IA (Chapter 17).

- SOMERVILLE, G., MIKORYAK, C. A. & REITZER, L. (1999): Physiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* during exotoxinA synthesis: glutamate, iron, limitation, and aconitase activity. *Journal of Bacteriology*, 181 (4) 1072-1078. p.
- SPANOGHE, L. (1984): The significance of *Pseudomonas aeruginosa* infections in animals. *Antonie van Leeuwenhoek*, 50 (3) 290. p.
- SPILKER, T., COENYE, T., VANDAMME, P. & LIPUMA, J.J. (2004): PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (5) 2074-2079. p.
- STOVER, C.K., PHAM, X.Q., ERWIN, A.L., MIZOGUCHI, S.D., WARRENER, P., HICKEY, M.J., BRINKMAN, F.S.L., HUFNAGLE, W.O., KOWALIK, D.J., LAGROU, M., GARBER, R.L., GOLTRY, L., TOLENTINO, E., WESBROCK-WADMAN, S., YUAN, Y., BRODY, L.L., COULTER, S.N., FOLGER, K.R., KAS, A., LARBIG, K., LIM, R., SMITH, K., SPENCER, D., WONG, G.K.-S., WU, Z., PAULSEN, I.T., REIZER, J., SAIER, M.H., HANCOCK, R.E.W., LORY, S & OLSON, R.M.V. (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.
- STROM, P.E. (1985): Identification of thermophilic bacteria in solidwaste composting. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (4) 906-913. p.
- SZABÓ I.M. (1989): A bioszféra mikrobiológiája. Akadémia Kiadó, Budapest, 1555 p.
- SZABÓ I. M. (2008): Az általános talajtan biológiai alapjai. Mundus Magyar Egyetemi Kiadó, Budapest, 405 p.
- SZOBOSZLAY S., SOLYMOSI J., LAUER J., ATZÉL B., SZABÓ I. & KRISZT B. (2002a): Environmental safety and biodegradation of hydrocarbons. 4th International Scientific Conference „Foreign Substances in the Environment”, Nitra, Slovakia, Proceedings, 200-204. p.
- SZOBOSZLAY S., SOLYMOSI J. & KRISZT B. (2002b): The biodegradation of hydrocarbon compounds concerning to environmental safety. *Academic and Applied Research in Military Science - AARMS*, 1 (1) 103-116. p.
- SZOBOSZLAY S. (2003): Katonai tevékenységek során a talajba és talajvízbe kerülő szénhidrogén szennyezések kármentesítésének környezetbiztonsági következményei. PhD értekezés, Zrínyi Miklós Nemzetvédelmi Egyetem, 122 p.
- TERNES, T.A. (1998): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32 3245-3260. p.
- TÖRÖK G., SZOBOSZLAY S., KRISZT B. ÉS RÚZS-MOLNÁR S. (1996): Szénhidrogének stimulált biodegradációja. MTA Általános Mikrobiológiai Bizottsága Előadótalálkozó, Budapest, Magyar Tudományos Akadémia Székháza, 1996. 02. 21.
- TRYPATHY, S., KUMAR, N., MONATHY, S., SAMANTA, M., MANDAL, R.N. & MAITI, N.K. (2007): Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from freshwater culture systems. *Microbiological Research*, 162 (4) 391–396. p.
- TSOI, T.V., PLOTNIKOVA, E.G., COLE, J.R., GUERIN, W.F., BAGDASARIAN, M. & TIEDJE, J.M. (1999): Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* 142 ohb genes coding for oxygenolytic ortho dehalogenation of halobenzoates. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (5) 2151-2162. p.
- TUBOLY S. (Szerk.) (1998): Állatorvosi járványtan, Mezőgazda kiadó, Budapest, 19-220. p.
- U. S. EPA (1994a): EPA Remediation technologies screening matrix and reference guide. United States Environmental Agency, U. S. Government Printing Office, Washington, 143 p.

- U. S. EPA (1994b): Composting yard trimmings and municipal solid waste. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, EPA530-R-94-003.
- U. S. EPA (1995): Remediation case studies: bioremediation. In: Federal publications on alternative and innovative treatment technologies for corrective action and site remediation. Fourth Edition. U. S. Environmental Protection Agency, Technology Innovation Office, Washington, 51 p.
- VAN DELDEN, C. (2004): Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. 3-47. p. In: Ramos, J.L. (2004): *Pseudomonas*. Virulence and gene regulation. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- VAN HEERDEN, I., CRONJÉ, C., SWART, S.H. & KOTZÉ, J.M. (2002): Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresource Technology*, 81 71-76. p.
- VENGLOVSKY, J., SASAKOVA, N. & PLACHA, I. (2009): Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technology*, 100 5386-5391. p.
- VERCE, M. F., ULRICH, R.L. & FREEDMAN, D.L. (2000): Characterization of an isolate that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (8) 3535-3542. p.
- VIVES-FLÓREZ, M. & GARNICA, D. (2006): Comparison of virulence between clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *International Microbiology*, 9 247-252. p.
- WACKETT, L.P (2000): Environmental biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18 (1) 19-21. p.
- WANG, C., CAI, P., CHANG, D. & MI, Z. (2006): A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57 1261-1262. p.
- WELDHAGEN, G. F., POIREL, L. & NORDMANN, P. (2003): Ambler class A extended spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47 2385-2392. p.
- WILLIAMS, R.T., ZIEGENFUSS, P.S., SISK, W.E. (1992): Composting of explosives and propellant contaminated soils under thermophilic and mesophilic conditions. *Journal of Industrial Microbiology*, 9: 137-144. p.
- WILSON, R. & DOWLING, R.B. (1998): *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax*, 53 (3) 213-219. p.
- WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, E., SCHRECKENBERGER, P. & WOODS, G. (2006): Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1531 p.
- WINSTANLEY, C., KAYE, S.B., NEAL, T.J., CHILTON, H.J., MIKSCH, S., HART, C.A. AND THE MICROBIOLOGY OPHTHALMIC GROUP (2005): Genotypic and phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with ulcerative keratitis. *Journal of Medical Microbiology*, 54 (6) 519-526. p.
- WOLF, M. & BACHOFEN, R. (1991): Microbial degradation for bitumen matrix used in nuclear waste depositories. *Naturwissenschaften*, 78 414-417. p.
- WRÓBLEWSKA, M. (2006): Novel therapies of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. infections: the state of the art. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 54 (2) 113-120. p.

ZAVASCKI, A.P., BARTH, A.L., FERNANDES, J.F., MORO, A.L., GONÇALVES, A.L., GOLDANI, L.Z. (2006): Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Critical Care*, 10 (4) R1

Egyéb hivatkozások:

HTTP1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=208964>

HTTP2 <http://www.time.com/time/magazine/article/0,9171,917877,00.html>

HTTP3 http://www.abbioidisk.com/pdf/etest_charts/M0000188.pdf

HTTP4 <http://www.oek.hu>

Hivatkozott jogszabályok:

16/2002. (IV.10.) EÜM RENDELET A települési szilárd és folyékony hulladékkal kapcsolatos közegészségügyi követelményekről .

23/2003. (XII. 29.) KvVM RENDELET a biohulladék kezeléséről és a komposztálás műszaki követelményeiről.

6/2009. (IV.14.) KvVM-EÜM-FVM EGYÜTTES RENDELET a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről.

Hivatkozott szabványok:

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

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

DIN 38409-H18:1981. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung von Kohlenwasserstoffen (H18). Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, Germany.

DIN 58940 Medical microbiology - Susceptibility testing of pathogens to antimicrobial agents - Part 1: Terminology. Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, Germany.

DIN 58940-31:2007 Medical microbiology - Susceptibility testing of pathogens to antimicrobial agents - Part 4: Evaluation classes of the minimum inhibitory concentration. Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, Germany.

MSZ 21464: 1998. Mintavétel felszín alatti vizekből.

MSZ 21470-1: 1998. Környezetvédelmi talajvizsgálatok. Mintavétel.

MSZ 21470-77-1988: Környezetvédelmi talajvizsgálatok. Mikrobiológiai vizsgálatok.

MSZ EN ISO 9377-2:2001 Vizminőség. A szénhidrogén-olajindex meghatározása. 2. rész: Oldószeres extrakció és gázkromatográfiás módszer (ISO 9377-2:2000)

NCCLS (2000): Disk diffusion. Supplemental tables. M100-S10 (M2). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Suite, Wayne, Pennsylvania, USA, 42 p.

NCCLS (2001): Zone diameter interpretive standards. NCCLS global information supplement, 21 (1): 40-71. p.

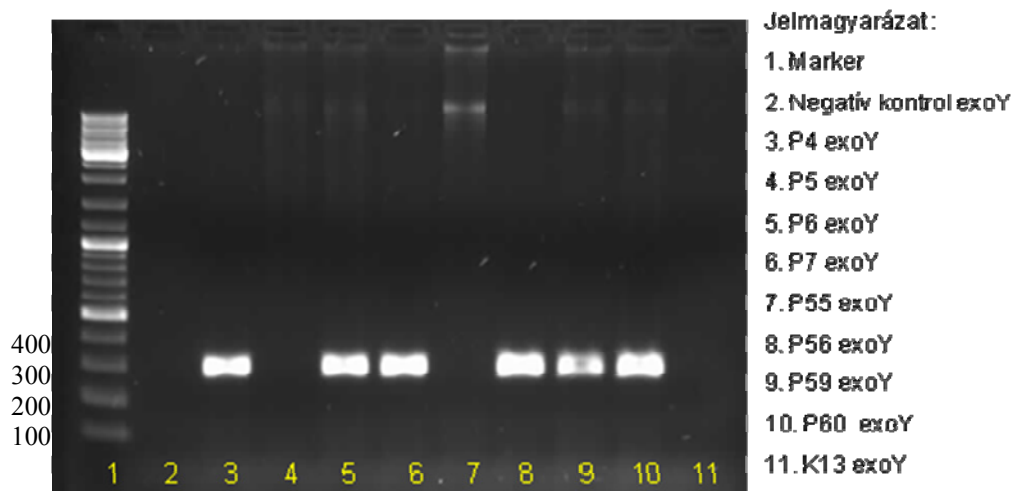
2. SZ. MELLÉKLET

5.1. sz. táblázat: A *P. aeruginosa* faj nem szennyezett közegből történő izolálására irányuló vizsgálatok során vételezett környezeti mintái, főbb tulajdonságai

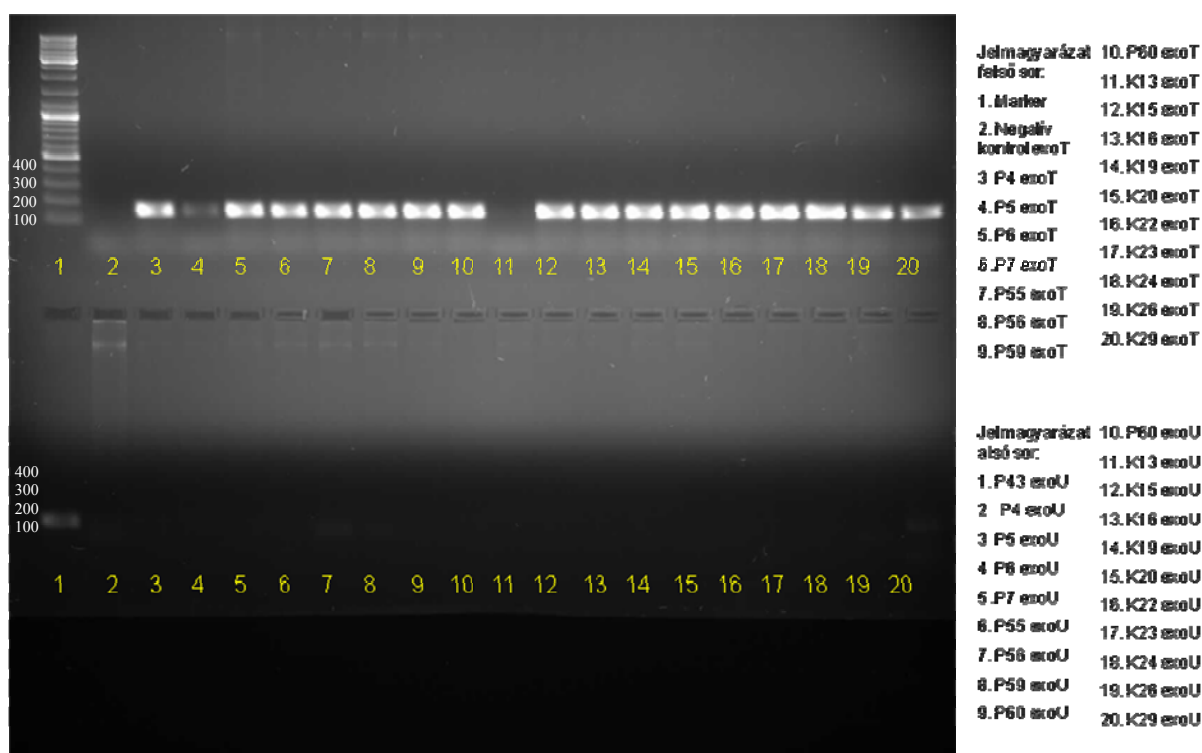
	Minta származási helye	Ország	Talajtípus	<i>P. aeruginosa</i> kimutathatósága (+/-)
1	Gömörszőlős	Magyarország	Réti csernozjom talaj	-
2	Gömörszőlős	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
3	Ócsai tájvédelmi körzet	Magyarország	Humuszos homoktalaj	-
4	Kozárd	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
5	Pécsvárad	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
6	Jákotpuszta	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
7	Bugac	Magyarország	Humuszos homoktalaj	-
8	Nagygombos	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
9	Bükk	Magyarország	Meszes barna erdőtalaj	-
10	Zemplén	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
11	Óbánya	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
12	Letenye	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
13	Vétyem	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
14	Órség	Magyarország	Barna erdőtalaj	-
15	Szent Anna Tó (Tusnádfürdő)	Románia	Rétláp talaj	-
16	Rétyi nyír (Erdély)	Románia	Humuszos homoktalaj	-
17	Giant's Causeway	Észak-Írország	Rétláp talaj	-
18	Rope Bridge	Észak-Írország	Rétláp talaj	-
19	Glengarriff	Észak-Írország	Barna erdőtalaj	-
20	Glengarriff	Észak-Írország	Barna erdőtalaj	-
21	Slieve League	Észak-Írország	Rétláp talaj	-
22	Aghinver	Észak-Írország	Rétláp talaj	-
23	Cairngorms National Park	Skócia	Köves vázta talaj	-
24	Eilat	Izrael	Homokföveny	-
25	Sahara City	Egyiptom	Futóhomok talaj	-
26	Uppsala	Svédország	Rétláp talaj	-
27	Tenerife	Spanyolország	Homoktalaj	-

3. SZ. MELLÉKLET: MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK GÉLDOKUMENTÁCIÓJA

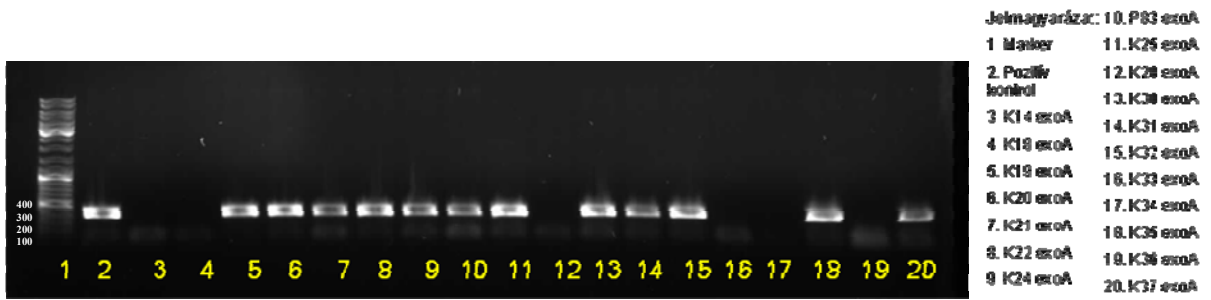
(Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas)



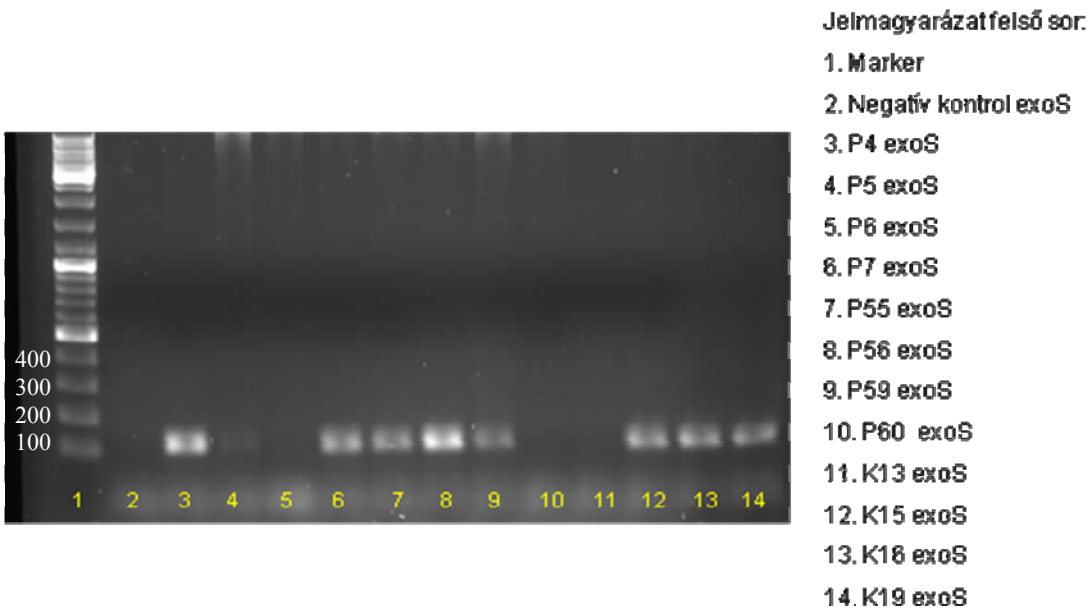
5.1. sz. ábra: Az exoY (289 bp) génszakasz kimutatása környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek esetében (a szerző felvétele, 2009)



5.2. sz. ábra: Az exoT (152 bp) és exoU (134 bp) génszakaszok kimutatása környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek esetében (a szerző felvétele, 2009)



5.3. sz. ábra: Az exoA génszakasz (396 bp) kimutatása környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek esetében (a szerző felvétele, 2009)



5.4. sz. ábra: Az exoS génszakasz (118 bp) kimutatása környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek esetében (a szerző felvétele, 2009)

4. SZ. MELLÉKLET

5.2. sz. táblázat: A korongdiffúziós antibiotikum rezisztencia vizsgálatok részletes eredményei a *P. aeruginosa* környezetből izolált izolátumai esetében

Antibiotikum hatóanyag	Izolátumok törzsgyűjteményi jelzése																												Rezisztens törzsek aránya (%)										
	P2	P9	P10	P11	P14	P15	P16	P17	P18	P22	P28	P30	P31	P32	P33	P35	P36	P37	P38	P39	P42	P43	P45	P46	P49	P50	P53	P60		P65	P66	K1	K2	K3	K4				
AMPICILLIN	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	97,1%		
MEZLOCILLIN	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	88,2%		
AZLOCILLIN	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	79,4%		
CARBENCILLIN	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	85,2%		
PIPERACILLIN	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	55,8%		
AUGMENTIN	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100,0%		
IMIPENEM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	I	S	I	S	S	I	S	2,9%			
MEROPENEM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2,9%		
CEPHALEXIN	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100,0%		
CEFACLOR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100,0%		
CEFUROXIME	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100,0%		
CEFAMANDOLE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100,0%		
CEFOXITIN	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100,0%		
CEFOTAXIME	I	I	I	R	R	I	R	R	I	I	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	67,6%	
CEFTRIAXONE	R	I	S	R	R	I	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	76,4%		
CEFTAZIDIM	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	23,5%		
CEFOPERAZON	I	S	I	I	S	I	I	R	S	S	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	S	I	S	58,8%		
AMIKACIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	0,0%	
GENTAMICIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2,9%	
NETILMICIN	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,0%	
TOBRAMICIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2,9%	
TRIMET-SULFAM.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100,0%	
POLIMYXIN B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,0%	
NALIDIXINSAV	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	97,0%	
NORFLOXACIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,0%	
CIPROFLOXACIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,0%	
OFLOXACIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	0,0%		
PEFLOXACIN	I	I	I	I	I	I	I	R	I	R	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	R	I	I	I	I	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	26,4%	
TETRACYCLINE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	97,0%
CHLORAMPHENICOL	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	91,1%
NITROFURANTOIN	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100,0%

R- rezisztens (szürke színnel kiemelve); I- átmeneti, S – érzékeny (NCCLS, 2001)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálával tartozom témavezetőmnek, *Dr. Szoboszlai Sándornak*, aki minden helyzetben és pillanatban támogatott, tanácsaival segített, véleményével irányt mutatott.

Köszönetem szeretném kifejezni *Dr. Kriszt Baláznak*, amiért lehetőséget adott a Környezeti Elemek Védelme Tanszéken folyó kutatásokban való részvételre.

Köszönöm a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék, valamint a Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont minden munkatársának, a régieknek és újaknak egyaránt, amiért segítettek, támogatták munkámat, befogadtak és elfogadtak, mint kollégát.

Hálás vagyok hallgatóimnak, így *Szabó Gabriellának* és *Pék Nikolettának* segítségükért és együttműködésükért.

Teljes szívből köszönöm továbbá *családomnak* és szeretteimnek, hogy támogattak tanulmányaimban és az élet minden területén.

Továbbá köszönetem fejezem ki a doktori kutatásaimat támogató projekteknek:

- Szent István Egyetem, Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpontja, Pázmány Péter (PÁZMÁNY RET-12/2005) program, Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal
- BIODKOMP4, Jedlik Ányos Pályázat (2007), Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal (OM 00120/2007)
- KMOP-2007-1.1.1.