

SZENT ISTVÁN EGYETEM



DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Bioaugmentációs eljárások biológiai monitoringja

Atzél Béla

GÖDÖLLŐ

2008

A doktori iskola

megnevezése: **Környezettudományi Doktori Iskola**
tudományága: **Környezettudomány**
mb. vezetője: Dr. Barczy Attila Ph.D.
tanszékvezető, egyetemi docens
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
Természetvédelmi és Tájökológiai Tanszék

témavezető: Dr. Kriszt Balázs Ph.D.
tanszékvezető, 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. A TÉMA AKTUALITÁSA, JELENTŐSÉGE	4
2. CÉLKITŰZÉSEK	5
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	7
3.1. Bioaugmentációs célra használt baktérium törzsek 16S rRNS gén szekvencia vizsgálata	7
3.2. Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok	7
3.3. PCR alapú módszer fejlesztése a CHB-20p. törzs környezeti monitoringjához	8
3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> azonosítására használt módszerek	8
4. EREDMÉNYEK	9
4.1. Bioaugmentációs célra használt törzsek identifikálása	9
4.2. A CHB-20p., mint új baktériumfaj részletes identifikációs vizsgálata	10
4.3. A CHB-20p. törzs fajspecifikus kimutatása környezeti mintából, DNS amplifikációs módszerrel	17
4.4. Az exotoxin A gén kimutatását célzó (ETA-PCR) módszer kiértékelésének korrigálása	18
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	22
6. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA	25

1. A TÉMA AKTUALITÁSA, JELENTŐSÉGE

A hazai környezetvédelmi gyakorlat egyik leggyakoribb kihívása a földtani közeg szénhidrogén-szennyezettségek felderítése és megszüntetése. Magyarországon számos olyan káreset került feltárássra, ahol szennyezőforrásként üzemanyag-töltőállomások, régi fűtőolaj tárolók, valamint kőolaj, illetve földgáz termékvezetékek szerepeltek. Amennyiben műszakilag kivitelezhető, szénhidrogén szennyezettségek esetén a szakma gyakran választ megoldásként valamilyen biológiai kármentesítési módszert, hiszen ez „költségtakarékos, környezetbarát és biztonságos”. Ám ezeknek a kritériumoknak megfelelni, ráadásul jó hatékonysági szinten, csak jól megválasztott, egyedileg a kárhelyhez tervezett technológiával, valamint megfelelő kémiai- és biológiai monitoringgal lehet.

A bioremediációs technológiák tervezése több részből tevődik össze, mely részfeladatok különböző képzettségű szakemberek bevonását igénylik. Meg kell tervezni az oltóanyag összetételét, biztosítani kell a felhasznált biológiai ágens (oltóanyag) eljuttatását a kívánt helyre gondoskodni kell a szennyezett közegben a megfelelő biodegradációs körülmények folyamatos fenntartásáról.

Az ilyen fajta tudatos oltóanyag használatot bioaugmentációnak hívja a szaknyelv, mely fogalom több kritériumot is támaszt annál, mint a tudatos tervezés: megköveteli a felhasznált mikroorganizmusok részletes biodegradációs képességének ismeretét, faj szintű identifikációját, valamint nem patogén mivoltuk igazolását. Ezek a követelmények a lehető leghatékonyabb szennyezőanyag-lebontást, és az eljárás biológiai biztonságát szolgálják. A fenti elvárások teljesülését azonban nem elég a tervezés szintjén vizsgálni, annak megfelelő ellenőrzéséről is gondoskodni kell. Ezt a célt szolgálja a **bioaugmentációs eljárások biológiai monitoringja**, mely a felhasznált mikroorganizmusok megtelepedésének, populációjuk változásának vizsgálatát jelenti a szennyezett közegben, ezen kívül magába foglalja az esetlegesen a kárhelyen megjelenő fakultatív patogén fajok megfelelő kontrollját is.

A fakultatív patogén baktériumok megjelenésének kockázata különösen nagy a **szénhidrogénnel szennyezett területeken**, ugyanis nagy számban vannak köztük olyan, melyek hatékonyan tudják az ilyen szennyezőanyagokat kizárólagos szénforrásként hasznosítani. Ezáltal a kárhelyen felszaporodhatnak, mely környezetegészségügyi kockázatot jelenthet a kármentesítésben résztvevő dolgozók, valamint a környező lakosság számára.

2. CÉLKITŰZÉSEK, ELŐZMÉNYEK

Doktori kutatási témámban **három célkitűzést** fogalmaztam meg:

-Bioaugmentációs célra felhasznált baktérium törzsgyűjtemény fenotípusos identifikálási eredményeinek felülvizsgálata 16S rRNS gén szekvencia hasonlóság elemzés alapján.

-A bioaugmentációs célra felhasznált törzsgyűjtemény egyik tagjának (CHB-20p) biológiai monitoringjára alkalmas, fajspecifikus molekuláris genetikai módszer fejlesztése.

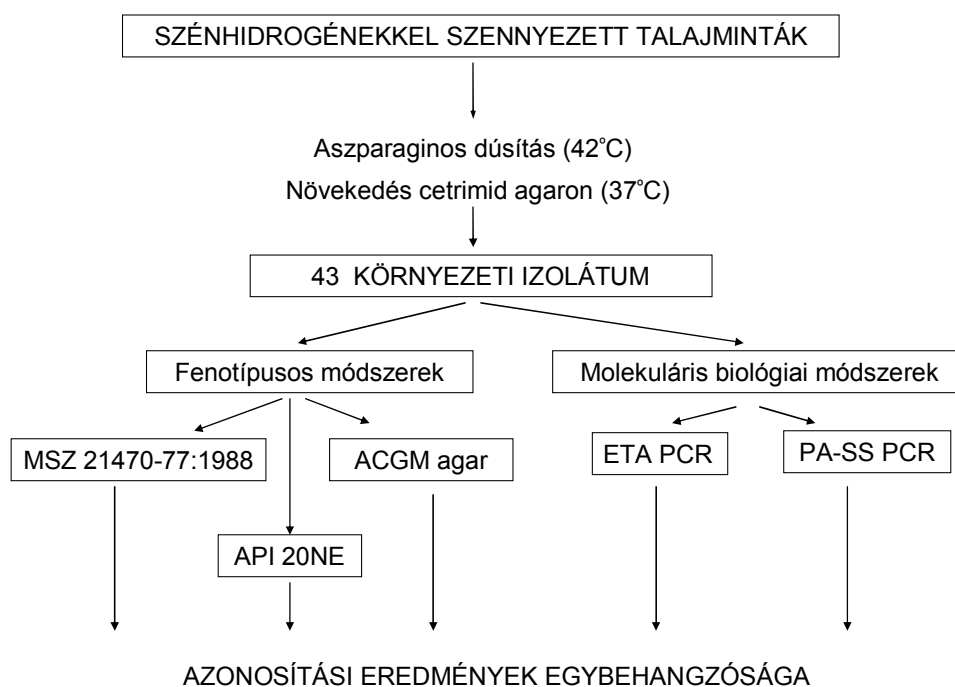
- A *Pseudomonas aeruginosa* biológiai monitoringjára alkalmas azonosítási módszerek összehasonlító kritikai elemzése, mely a bioaugmentációs eljárások biológiai biztonságának viszonylatában az egyik leggyakrabban felmerülő, fakultatív humán-patogén baktérium.

A magyarországi joggyakorlatban a környezetvédelmi célú biológiai készítmények felhasználását a 16/2002. (IV. 10.) EüM rendelet szabályozza. Ez vonatkozik a bioaugmentációs célra használt oltóanyagokra is. A rendelet előírja többek között a készítményben található mikroszervezetek legalább faj szintű megnevezését. Egy ilyen termék hatósági engedélyeztetéséhez tehát szükség van a felhasználandó baktériumok megbízható identifikációjára, a faj szerinti besorolás hitelességének felelőssége pedig az engedély kérelmezőjét terheli.

Egy ilyen bioaugmentációs készítmény (törzsgyűjtemény) engedélyeztetésének előkészítésében vettem én is részt, mely korábban már rendelkezett az Országos Környezetegészségügyi Intézet által kiadott felhasználási engedéllyel, ám később a jogszabályok változása miatt szükség volt ennek megújítására. A törzseket korábban már faj szinten identifikálták hagyományos, tenyésztéses eljárásokon alapuló fenotípusos módszerekkel. Feltűnt, hogy a gyűjtemény egyik tagjának két lehetséges faji besorolása is volt, mely az alkalmazott identifikációs módszer bizonytalanságára utalt. Ezen kívül a korábbi felhasználási engedély kiadása óta a baktériumok rendszertana jelentősen átalakult, valamint a fajmeghatározás módszertana és eszköztára is jelentős fejlődésen ment keresztül. **A bemutatott előzmények együttesen indokolták a törzsek korábbi identifikációs eredményeinek felülvizsgálatát, melyet munkám első célkitűzésének állítottam.**

A baktériumok környezeti kimutatására használt fenotípusos, vagy DNS alapú módszerek alkalmazhatóságával szemben sok kérdés merül fel. **Második célkitűzésemnek állítottam egy olyan fajspecifikus molekuláris genetikai módszer kifejlesztését, mely alkalmas lehet az általam vizsgált törzsgyűjteményt egyik tagjának, a CHB-20p laboratóriumi jelzésű baktérium érzékeny környezeti kimutatására.** A célkitűzés megvalósulása esetén a CHB-20p törzsszel végzett bioaugmentáció biológiai monitoringja előtt új távlatok nyílhatnak.

A fakultatív patogén baktériumok megjelenésére fokozottan számítani kell szénhidrogénnel szennyezett területeken, mivel az ilyen közegben jól megtalálják életfeltételeiket. Bioaugmentációs eljárások esetén - különösen vízbázisok, ill. azok védőterületein - ezért szükséges ezeknek az egészségügyi kockázatot hordozó biológiai ágenseknek a monitoringja. Az ilyen fajok környezeti-, klinikai- ill. élelmiszeripari kimutatásánál is kiemelt fontosságú a vizsgálati módszer gyorsasága valamint megbízhatósága. Harmadik célkitűzésemnek megfelelően ezért elvégeztem néhány *P. aeruginosa* azonosítási módszer összehasonlító vizsgálatát. Öt vizsgálati módszer eredményeinek egybehangzóságát vizsgáltam 43 db környezeti mintából származó *P. aeruginosa* izolátumon (ld. 1. sz. ábra).



1. sz. ábra: *P. aeruginosa* környezeti kimutatására alkalmazott módszerek összehasonlítása

Teszteltem a vonatkozó Magyar Szabvány (MSZ 21470-77:1988) által előírt, az ACGM (acetamid-ceftrimid-glicerol-mannitol) agaros, valamint az API 20NE módszert, mint fenotípusos módszereket, valamint két PCR alapú, fajspecifikus molekuláris biológiai technikát (ETA PCR, PA-SS PCR). Kísérleteim célja volt a két módszercsoport (fenotípusos és molekuláris biológiai) alkalmazhatóságának összehasonlítása, az előnyök és korlátozó tényezők feltárása.

Doktori értekezésemben bemutatott eredményeimet, és ezekből fogalmazott téziseimet saját laboratóriumi kísérletek beállításával és értékelésével bizonyítottam, ill. támasztottam alá.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Bioaugmentációs célra használt baktérium törzsek 16S rRNS gén szekvencia vizsgálata

Az izolátumok faj szintű identifikációját 16S rDNS részleges szekvencia analízis alapján végeztük el. A törzsek tiszta tenyészeiből DNS izoláltunk, majd a BSF8/20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') és a BSR1541/20 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') univerzális primerek felhasználásával a 16S rRNS gén egy szakaszát PCR-rel amplifikáltuk. A PCR termék visszaizolálása után annak szekvencia meghatározását ABI Prism 310 genetic analyzer készülékkel elvégeztük

Az eredmény szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisához hasonlítottuk a BLAST algoritmus alapján. Ha az adatbázisban található hasonló szekvencia, mely egy már leírt baktériumfaj 16S rDNS bázissorrendjére jellemző, és a vizsgált törzsünkkel mutatott homológia mértéke meghaladja a 98%-ot, az esetben a vizsgált törzs ugyanahhoz a fajhoz tartozik.

3.2. Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok

A CHB-20p. törzset **filogenetikus vizsgálatok**nak vetettük alá, mely során a 16S rRNS gén szekvencia ismeretében filogenetikus törzsfát készítettünk a MEGA4 szoftver segítségével.

A **fenotípusos vizsgálatok** során Gram reakciót, telep- és sejt morfológiai vizsgálatokat, kataláz tesztet, és oxidáz tesztet végeztünk. Vizsgáltuk a törzs keményítő hidrolízisét, flexirubin típusú pigment-termelődést, szénhidrátokból történő savtermelését, a hőmérsékleti tartományát és optimumát, valamint a pH és NaCl hatását a növekedésre. Standard protokollokat alkalmaztunk ureáz jelenlétének, fenilalanin-deamináz- és β -galaktozidáz aktivitás, nitrát- és nitrit redukció, valamint keményítő, tirozin és Tween 80 hidrolízisének tesztelésére.

Elvégeztük a törzs teljes körű **kemotaxonómiai jellemzését**, mely során megtörtént a respiratórikus kinonok, poláris lipidek, a guanin-citozin arány, valamint a sejtmembrán-zsírsavak vizsgálata.

A CHB-20p. teljes **DNS-DNS hibribizáció**jához referencia törzsként, a filogenetikus törzsfán hozzá legközelebb álló, *Chryseobacterium caeni* (DSM 17710) típus törzsét használtuk.

3.3. PCR alapú módszer fejlesztése a CHB-20p. törzs környezeti monitoringjához

A 16S rRNS gén szekvencia ismeretében **fajspecifikus primereket tervezetünk** a gén V2 és V6 hipervariábilis régióira a Primer3 szoftver segítségével, majd meghatároztuk a primerpár optimális feltapadási hőmérsékletét (Ta).

A tervezett fajspecifikus primereket (KEV10 132/F és KEV10 1007/R) a BSF8/20 és BSR1541/20) univerzális primerekkel nested PCR reakcióban alkalmaztuk a CHB-20p törzs talajból történő kimutatására.

A módszer érzékenységét, valamint alkalmasságát környezeti monitoring céljára *in vitro* körülmények teszteltük. Mesterségesen, ismert élő-sejtszámban oltottunk be steril talajt a CHB-20p. baktériummal, majd az így nyert talajmintákon vizsgáltuk a nested PCR módszer érzékenységét.

3.4. *Pseudomonas aeruginosa* azonosítására használt módszerek

Hagyományos fenotípusos és biokémiai módszerek

- Magyar Szabvány által előírt módszer (MSZ 21470-77:1988)
- ACGM agaros módszerrel
- API 20NE teszt

Molekuláris biológiai módszerek

- **ETA PCR módszer:** A exotoxin A gén fajspecifikus szakaszának kimutatása PCR technikával, ETA1 (5'-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3') és ETA2-t (5'-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3') primerek felhasználásával.
- **PA-SS PCR módszer:** 16S rDNS fajspecifikus génszakaszának kimutatása PCR technikával, PA-SS-F (5'-GGGGGATCTTCGGACCTCA-3') és PA-SS-R (5'-TCCTTAGAGTGCCACCCG-3') primerek felhasználásával.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Bioaugmentációs célra használt törzsek identifikálása (első célkitűzésnek megfelelően)

Munkám során részt vettem egy bioaugmentációs baktérium-készítmény engedélyeztetésének előkészítésében. A felhasználási engedély kiadásának kritériuma többek között a készítményben felhasznált baktériumok legalább faj szintű identifikációja. Bár a törzsek identifikációját korábban már elvégezték hagyományos fenotípusos módszerekkel, az eredmények inkonzisztens jellege miatt indokoltnak látszott azok felülvizsgálata. 16S rRNS gén szekvencia-hasonlóság elemzéssel megtörtént a törzsgyűjtemény identifikációjának felülvizsgálata (ld. 1. sz. táblázat). A vizsgálatok eredményeként az öt baktériumból háromnak a taxonómiai besorolását megváltoztattuk. Kísérleteink nyomán a törzsgyűjtemény ismert tulajdonságai a felhasználási engedély minden feltételének megfelelnek.

1. sz. táblázat: Bioaugmentációs törzsgyűjtemény identifikációs felülvizsgálatának eredményei

Laborjelzés	Korábbi identifikáció	Új identifikáció
CHB-15	<i>Micrococcus nishinomiyaensis</i>	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
CHB-20p	<i>Brevundimonas vesicularis</i> /	<i>Chryseobacterium</i> sp.
	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	
AK-35	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
AK-37	<i>Nocardia rubra</i>	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
AK-40	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (A 4.1 fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(1. tézis) Bioaugmentációs célra használt törzsgyűjtemény tagjait korszerű, molekuláris genetikai módszerekkel (16S rRNS gén szekvencia alapján) faj szinten identifikáltuk, 3 törzs rendszertani besorolását megváltoztattuk.

4.2 A CHB-20p., mint új baktériumfaj részletes identifikációs vizsgálata (első célkitűzésnek megfelelően)

Filogenetikai jellemzés

A bioaugmentációs célra használt törzsgyűjtemény tagjainak 16S rDNS szekvencia meghatározása után azt tapasztaltuk, hogy a **CHB-20p.** laboratóriumi jelzésű **baktériumtörzset a szekvencia alapján nem lehet egyetlen ma ismert baktériumfajhoz sem sorolni.**

Elvégeztem a fenti szekvencia összehasonlítását a GenBank-ban letétbe helyezett 16S rDNS szekvenciákkal. A összehasonlítás eredményeiből kitűnik, hogy az izolátum egyértelműen besorolható a *Chryseobacterium* nemzetségbe. Pontos rendszertani besorolása a következő:

Domén: *Bacteria*
Törzs: *Bacteroidetes*
Osztály: *Flavobacteria*;
Rend: *Flavobacteriales*
Család: *Flavobacteriaceae*
Nemzetség: *Chryseobacterium*

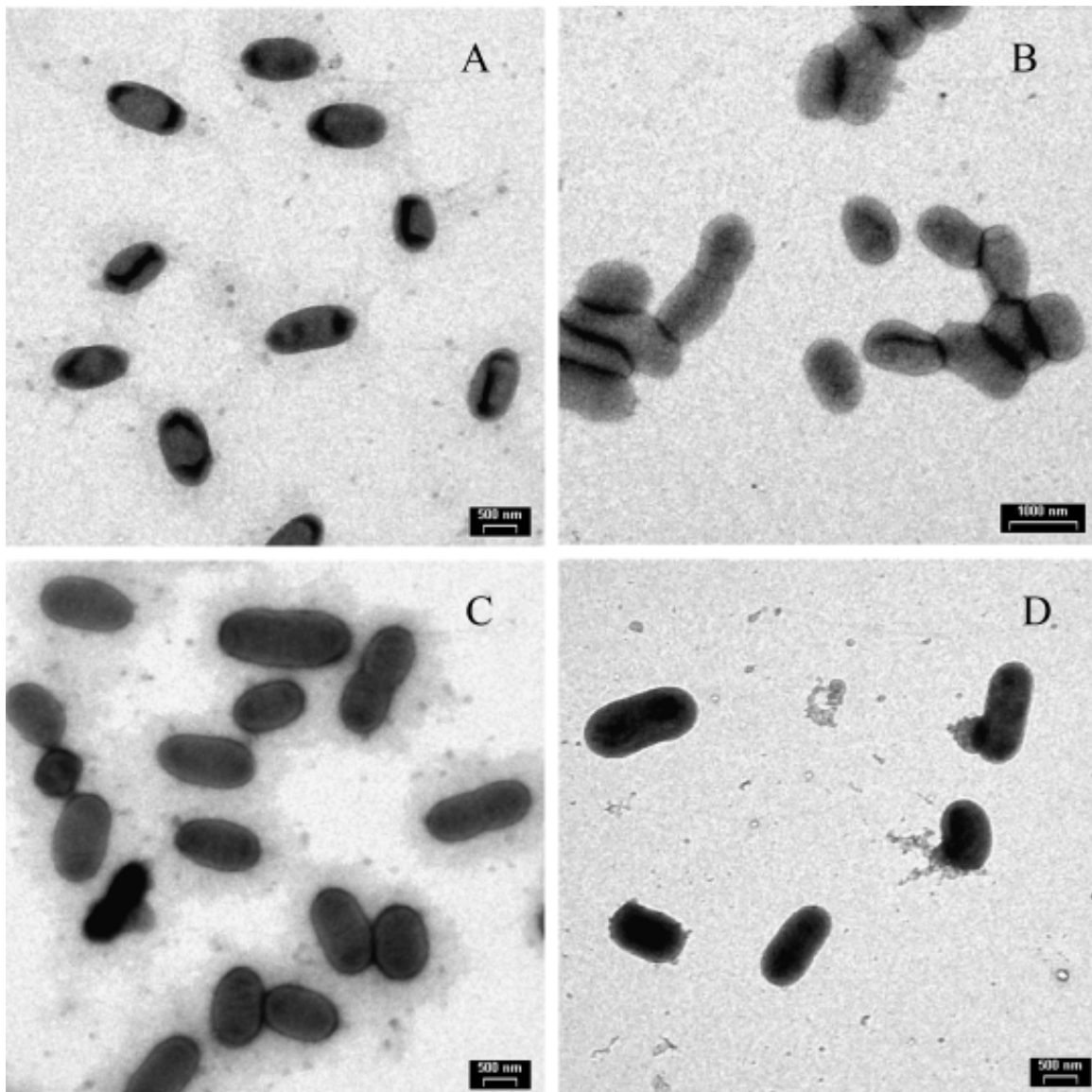
A nemzetségbe való tartozás taxonómiailag vitathatatlan. **A filogenetikai vizsgálatok eredményei felvetik annak a lehetőségét, hogy egy eddig még ismeretlen, le nem írt fajjal állunk szemben.** Ahhoz, hogy egyértelműen kijelenthető legyen, hogy a CHB-20p. esetében új fajról van-e szó, **részletes fiziológiai, fenotípusos, enzimatis, kemotaxonómiai valamint molekuláris genetikai jellemzést kellett adjunk a törzsről.** A vizsgálatok eredményeit irodalmi adatok alapján minden esetben összevetettük a nemzetségen belül már leírt és publikált fajok hasonló tulajdonságaival. Ezen vizsgálataink eredményeit a következőkben ismertetem.

Morfológiai jellemzés

A CHB-20p. telepmorfológiáját tekintve, 4-6 mm átmérőjű, kerek, ép szélű, nyálkás felszínű, telepeket képez 48 órás tenyészetben, TGE agaron. Világossárga, flexirubin típusú pigmentet termel.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a CHB-20p **törzs pálcika alakú, 1-1,5 µm hosszú, 0,5-0,9 µm széles, flagellum nélküli sejteket képez** mindkét vizsgált táptalajon (TGE, LB). Ezekben a jellegekben a fiatal és idős tenyészetek nem mutattak különbségeket. **Mivel egyik referenciaként használt *Chryseobacterium* típus törzs esetében sem találtunk flagellumra utaló jeleket (ld. 2. sz. ábra), azt a megállapítást tehetjük, hogy konvencionális táptalajokban (TGE,**

LB) a *Chryseobacterium* genusz reprezentánsai csupasz, flagellum nélküli sejteket képeznek, mely tulajdonság kutatásaink szerint a genusz fontos taxonómiai bélyege.



A: CHB-20p, B: *C. daecheongense* DSMZ15235^T, C: *C. defluvii* DSMZ14219^T and D: *C. indoltheticum* LMG13343^T

2. sz. ábra. A CHB-20p. és a *Chryseobacterium* referenciatörzsek sejtmorfológiájának összehasonlítása.

Fiziológiai és fenotípusos jellemzés

A kísérletek során megvizsgáltuk a CHB-20p. szaporodását MacConkey agaron és nutrient agaron 5 °C-on, 37 °C-on és 42 °C-on, továbbá nutrient táplevesben 5% NaCl jelenlétében, ureáz, β-galaktozidáz és fenilalanin-deamináz termelését, nitrát- és nitrit redukcióját, Tween 80 és keményítő hidrolízisét, indol és H₂S termelését, savképzését L-arabinózból, fruktózból, glicerolból,

laktózból, maltózból, mannitolból, trehalózból és D-Xilózból, valamint DNS-ének guanin + citozin tartalmát. A vizsgálatok eredményét a 2. sz. táblázatban mutatom be.

2. sz. táblázat: A CHB-20p. törzs fenotípusos karakterisztikája összevetve a *Chryseobacterium* nemzetség más tagjaival

Faj/törzs: 1, CHB-20p. (saját kísérleti eredmények); 2, *C. caeni*; 3, *C. gleum*; 4, *C. balustinum*; 5, *C. indologenes*; 6, *C. indoltheticum*; 7, *C. scophthalmum*; 8, *C. defluvii*; 9, *C. joostei*; 10, *C. daecheongense*; 11, *C. formosense*; 12, *C. taichungense*; 13, *C. shigense*; 14, *C. vrystaatense*; 15, *C. soldanellicola*; 16, *C. taeanaense*; 17, *C. piscium*; 18, *C. hispanicum*; 19, *C. wanjuense*.

+, Pozitív; W, gyenge pozitív; -, negatív; V, változó; D, késleltetett reakció; NA, nincs elérhető adat.

Tulajdonság	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Pigment termelés	+	+																	
Növekedés:																			
MacConkey agar	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W
5 °C	W	+	-	D	-	+	D	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	D	+
37 °C	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
42 °C	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Növekedés nutrient agaron 5%	-																		
NaCl jelenlétében																			
Enzim aktivitás																			
Ureáz	-	+	-	-	-	-	+	-	V	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
β-Galaktozidáz	+	NA																	
Nitrát redukció	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Nitrit redukció	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	NA	NA	-	+	-	-	-	+	NA
Fenilalanin-deamináz	-	NA	-	-	-	+	-	-	-	NA	NA	NA	NA	-	NA	NA	+	NA	NA
Tween 80 hidrolízis	W	-	+	+	+	+	+	NA	+	NA	-	NA	NA	+	-	+	V	-	NA
Keményítő hidrolízis	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	NA	NA	+	-	NA	NA	-	+	+
Indol termelés	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	W	+	+	-	-	+	W	-
H ₂ S termelés	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-	NA
Savtermelés:																			
L-arabinóz	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	NA	+	-
Fruktóz	-	-	+	+	D	-	-	+	+	+	NA	NA	+	NA	-	-	NA	+	-
Glicerol	-	-	+	-	D	-	-	+	V	+	NA	NA	-	NA	-	-	NA	+	-
Laktóz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-
Maltóz	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	NA	-	-	NA	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	NA	-	-	NA	-	-
Trehalóz	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	NA	-	-	NA	-	+
D-Xilóz	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	W	+	-	NA	-	-	NA	+	-
DNS G+C tartalom (mol%)*	37.5	38.2	38.0	33.1	38.5	33.8	34.2	38.8	36.8	36.6	NA	NA	36.6	37.1	28.8	32.1	33.6	34.3	37.8

*DNS G + C tartalmak a típusörzsekre vonatkoznak.

Az eredményekből kitűnik, hogy a **CHB-20p. több lényeges diagnosztikus fenotípusos tulajdonság tekintetében eltér a *C. caeni*-től.** Ezek a tulajdonságok: **indol termelés, savképzés laktózból, trehalózból és D-xilózból, valamint keményítő és Tween 80 hidrolízis.**

Enzimatiszus jellemzés

A CHB-20p. törzs enzimatiszus jellemzését API ZYM teszt (BioMérieux) segítségével végeztük el. A vizsgálatok eredményeit a 3. sz. táblázatban mutatom be.

A vizsgálatok eredményiből jól látszik, hogy a CHB-20p. törzs enzimekészlete 2-Naftil- α D-glukopiranozid termelést tekintve egyértelműen különbözik a hozzá filogenetikusan legközelebb álló *C. caeni* faj típustörzsétől (DSM 17710).

3. sz. táblázat: A CHB-20p. törzs API ZYM profilja összevetve a *Chryseobacterium* nemzetség más tagjaival

Faj/törzs: 1, CHB-20p. (saját kísérleti eredmények); 2, *C. caeni*; 3, *C. gleum*; 4, *C. balustinum*; 5, *C. indologenes*; 6, *C. indoltheticum*; 7, *C. scopthalmum*; 8, *C. defluvii*; 9, *C. joostei*; 10, *C. daecheongense*; 11, *C. formosense*; 12, *C. taichungense*; 13, *C. vrystaatense*; 14, *C. soldanellicola*; 15, *C. taeanense*; 16, *C. hispanicum*; 17, *C. wanjuense*.

Minden minta pozitív eredményt adott a következő enzimek termelését tekintve: 2-naftilfoszfát (pH 8.5), 2-naftilcaprilát, L-leucil-2-naftilamid, L-valil-2 naftilamid, 2-naftilfoszfát (pH 5.4) és naftol-AS-BI-foszfát. Minden minta negatív eredményt adott a következő enzimek termelését tekintve: 6-Br-2-naftil- α D-mannopiranozid és 6-Br-2-naftil- α -D-galaktopiranozid.

+, Pozitív; W, gyenge pozitív; -, negatív; NA, nincs elérhető adat

Szubsztrát	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
2-Naftil butirát	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	W	+	+	W	W
2-Naftil mirisztát	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-Cisztin-2-naftilamid	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	W
N-Benzoil-DL-arginin-2-naftilamid	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	W	-	-	W	-
N-Glutaryl-fenilalanin-2-naftilamid	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	W
6-Br-2-naftil- α -D-galaktopiranozid	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
2-Naftil- β -D-galaktopiranozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-
Naftol-AS-BI- β D-glukoronid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2-Naftil- α D-glukopiranozid	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W
6-Br-2-naftil- β D-glukopiranozid	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
1-Naftil-N-acetil- β D-glukózaminid	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
2-Naftil- α L-fukopiranozidáz	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NA	NA

Kemotaxonómiai jellemzés

A kemotaxonómiai vizsgálatok sejtmembrán zsírsav analízisre, a respiratórikus kinonok és respiratórikus lipokinonok, valamint a poláris lipidek analízisre terjedtek ki.

A **menakinonok** közül az **MK6** jelent meg többségben, az **MK5** komponenst csak nyomokban sikerült kimutatnunk. A *Chryseobacterium* fajok mindegyikénél az MK6 egyedüli, vagy domináns menakinonként szerepel. Egyedi tulajdonság azonban az MK5 jelenléte, melyet eddig egyetlen fajnál sem mutattak ki.

Poláris lipidek közül **foszfatidil-etanolamin (PE)**, **foszfatidil-glycerol (PG)**, **difoszfatidil-glycerol (DPG)** és **foszfatidil-szerin (PS)** került kimutatásra, melyek jelenléte több Gram-negatív taxonban is jellemző tulajdonság.

Más *Chryseobacterium* fajokhoz hasonlóan, a domináns zsírsav-metilészterek a CHB-20p esetében is az iso-C_{15:0} (32%) és az iso-C_{17:0} 3-OH (10.4%) voltak, megerősítve ezzel a nemzetséghez való tartozást. Unikális tulajdonsága azonban, hogy a többi fajhoz képest kiugróan magas arányban tartalmazta a 3. számú főkomponenst (C_{16:1}ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH), mintegy 31,1% arányban. A 3. számú főkomponens 30% körüli jelenléte a CHB-20p törzsön kívül csak a *C. caeni* és a *C. hispanicum* esetében tapasztalható. Az összes többi fajból mindössze 10% körüli értékben mutatható ki. A CHB-20p. és a rokon fajok zsírsav-összetételének összehasonlítását a 4. sz. táblázatban mutatom be részletesen.

4. sz. táblázat: A CHB-20p törzs zsírsav összetétele összevetve a *Chryseobacterium* nemzetség más tagjaival

Faj/törzs: 1, CHB-20p.; 2, *C. caeni*; 3, *C. taichungense*; 4, *C. formosense*; 5, *C. defluvii*; 6, *C. joostei*; 7, *C. gleum*; 8, *C. indologenes*; 9, *C. balustinum*; 10, *C. indoltheticum*; 11, *C. scophthalmum*; 12, *C. vrystaatense*; 13, *C. daecheongense*; 14, *C. shigense*; 15, *C. soldanellicola*; 16, *C. taeanense*; 17, *C. piscium*; 18, *C. hispanicum*; 19, *C. wanjuense*.

Az értékek átlag ± szórás formában vannak megadva. Tr, nyomokban (kevesebb, mint 1,0 %); ND, nincs adat.

Zsírsav	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
13 : 0 iso	3,47	1,0	Tr	3,6	2,8	Tr	Tr	Tr	Tr	ND	Tr	1,1±0,4	1,6	2,6	Tr	Tr	0,9±0,6	2,5	Tr
Unknown, ECL 13.566	Tr	2,6	6,7	Tr	Tr	1,1±0,2	1,2±0,4	2,1±0,7	1,6	1,7	2,9±0,2	1,4±0,3	1,5	2,4	2,3	3,1	Tr	1,0	2,9
15 : 0 iso	31,96	26,4	35,4	52,2	58,5	34,6±2,0	35,4±2,9	34,3±4,9	32,3	29,4	35,0±0,7	41,8±1,4	51,2	39,7	41,8	36,1	38,3±5,0	26,1	40,0
15 : 0 iso 3OH	4,91	3,2	4,3	1,8	2,6	2,9±0,3	2,5±0,1	2,6±0,2	2,7	2,3	2,7±0,1	2,7±0,3	2,0	4,1	2,7	3,1	2,4±5,0	4,0	3,7
15 : 0 anteiso	3,61	4,3	Tr	2,1	3,2	Tr	Tr	Tr	Tr	5,9	Tr	1,7±0,7	1,0	Tr	1,9	1,1	2,7±1,9	3,6	Tr
16 : 0	3,75	13,5	1,3	1,5	1,3	Tr	1,3±0,4	Tr	1,6	1,0	1,2±0,2	1,1±0,4	1,8	Tr	1,4	1,8	1,1±0,2	2,4	Tr
16 : 0 3OH	3,64	6,7	2,6	Tr	Tr	1,2±0,2	1,1±0,1	1,0±0,2	1,4	Tr	1,0±0,1	1,3±0,4	Tr	1,3	1,3	Tr	1,3±0,3	4,4	ND
16 : 0 iso 3OH	ND	ND	1,4	1,1	Tr	ND	ND	ND	Tr	1,3	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	ND
Unknown, ECL 16.580	Tr	ND	1,7	1,0	ND	1,6±0,1	1,7±0,1	1,7±0,2	1,3	1,3	1,5±0,1	1,2±0,2	1,0	1,0	1,5	1,4	1,2±0,2	1,9	ND
17 : 0 2OH	Tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	3,0	Tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17 : 0 iso	ND	ND	0,8	2,3	2,0	Tr	1,6±0,6	Tr	1,0	Tr	Tr	Tr	3,0	Tr	Tr	1,1	1,2±0,2	ND	2,9
17 : 0 iso 3OH	10,41	9,8	22,4	10,9	14,1	20,1±1,2	21,8±0,3	19,2±1,8	16,8	14,0	16,3±0,1	15,4±1,8	15,7	19,6	17,7	18,8	16,2±3,1	17,6	21,9
17 : 1 iso 9c	1,69	ND	8,9	4,3	4,8	22,9±1,9	20,2±3,9	24,2±3,1	27,1	25,6	24,8±0,4	19,7±2,3	7,6	11,9	14,6	15,8	18,7±2,8	1,3	11,7
3. számú főkomponens	31,07	32,4	13,8	6,5	8,4	12,1±1,3	11,8±0,8	11,1±1,3	9,2	11,2	11,5±0,3	9,1±0,9	8,5	12,4	9,7	11,2	10,8±1,3	26,7	11,0

*Ismeretlen zsírsav; a számok egyenlő lánchosszúságot jelölnek

*Főkomponensnek tekintettük azokat a zsírsavakat, melyeket a gázkromatográf már nem tudott elválasztani a Microbial Identification System (Microbial ID) szoftver segítségével. A 3. számú főkomponens C_{16:1}ω7c és / vagy iso-C_{15:0} 2OH komponenseket tartalmaz.

DNS-DNS hibridizáció

Ahhoz, hogy minden kétséget kizáróan kijelenthessük, hogy a CHB-20p. törzs esetében egy új baktériumfajról van szó, el kellett végezni a **CHB-20p.** teljes DNS készletének és a legközelebbi „rokona”, a *C. caeni* (DSM 17710) teljes DNS készletének **hibridizációját**. Ha a két DNS homológiája 70% alatti értéket mutat, akkor egyértelműen két külön fajról beszélhetünk. A

vizsgálat eredménye **47,2 %-os homológiát** mutatott, **ami alapján beigazolódott, hogy a CHB-20p. egy eddig még leíratlan, új baktériumfaj, melynek a *Chryseobacterium hungaricum* nevet adtuk.**

***Chryseobacterium hungaricum* sp. nov. faj leírása**

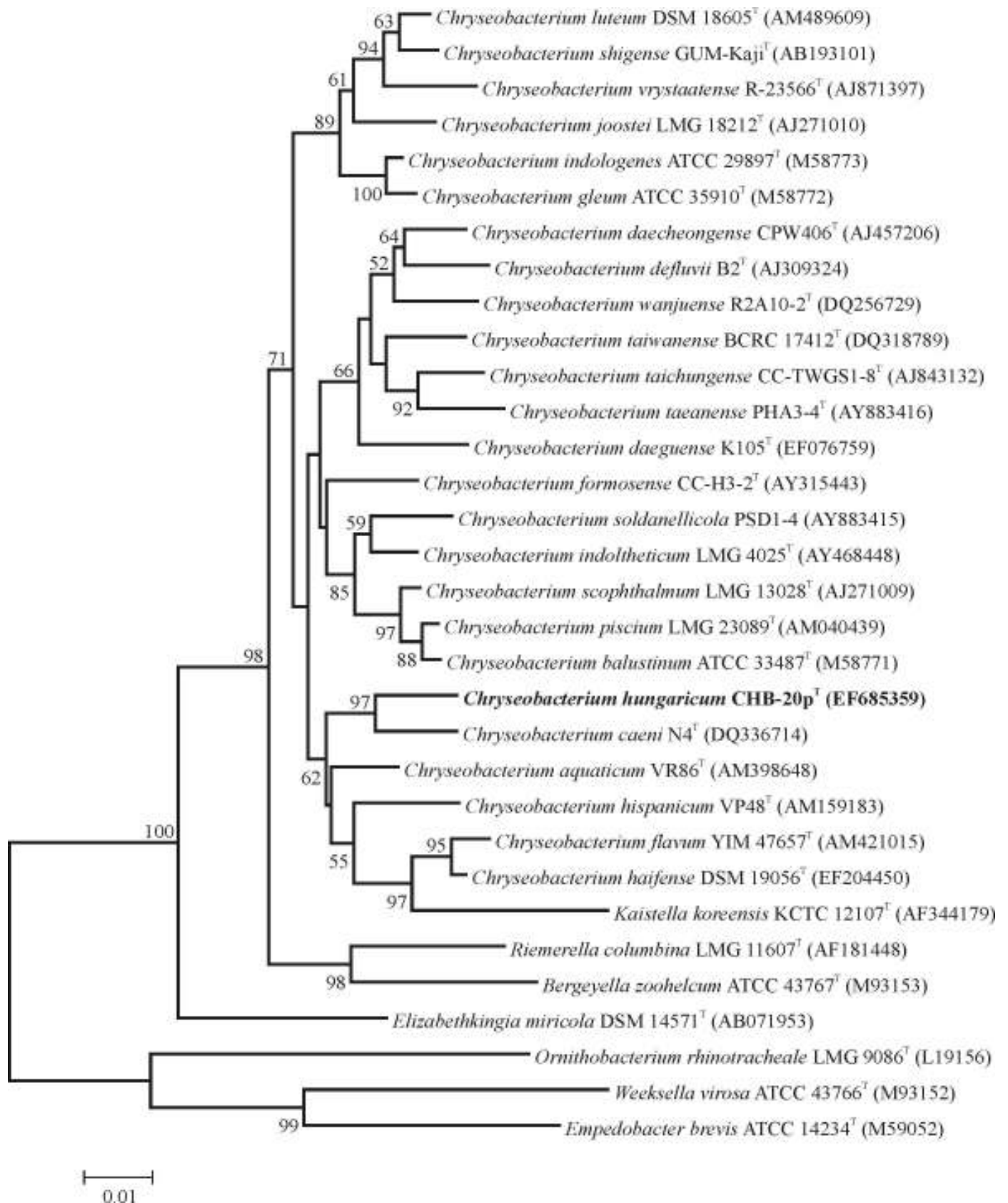
A sejtek aerob, lekerekített végű, nem motilis pálcák, melyek spórát nem termelnek, tápanyagban gazdag táptalajon (TGE, LB) flagellumot nem fejlesztenek. 48 órás tenyészetben a sejtek 1-1,5 x 0,5-0,9 µm méretűek. Gram-negatív baktérium, oxidáz- és kataláz pozitív. TGE és nutrient agaron jól szaporodik, de nem mutat növekedést MacConkey agaron.

Kerek, ép szélű telepeket képez, melyek 48 órás inkubáció után nyálkás felszínűvé válnak. Világossárga, flexirubin típusú pigmentet termel. Hőmérséklet igényét tekintve mezofil baktérium, 5-37 °C között képes szaporodni, hőmérséklet optimuma 28 és 30 °C között van. Szaporodásra 6,0-10,0 pH tartományban képes, pH optimuma 6,5 és 7,5 érték között van. 5% NaCl koncentráció mellett a sejtek nem szaporodnak. Sejtfalában az iso-C_{15:0} és a C_{16:1ω7c}/iso-C_{15:0} 2OH zsírsavak vannak jelen legnagyobb arányban. Respiratórikus menakinonok tekintetében az MK-6 dominál, MK-5-öt csak kisebb mennyiségben tartalmaz. A genomiális DNS guanin+citozin tartalma 37,5 mol%. L-arabinózból, fruktózból, glicerolból, maltózból és mannitolból savat nem képez, míg laktóz, trehalóz és D-xilóz hidrolízise esetén savtermelést mutat. Szénforrásként hasznosítani a következő szubsztrátokat képes: glükóz, mannóz és maltóz. Nem képes szénforrásként hasznosítani: arabinóz, mannitol, N-acetil-glukózamin, glukonát, kaprát, adipát, almasav, citrát és fenil-acetát. Indol-termelése és β-glukozidáz aktivitása pozitív, ureáz aktivitása negatív. Nitrátot és nitritet nem redukálja.

Az új fajt már saját nevének szerepeltethetjük a *Chryseobacterium* nemzetség megújult törzsfáján (ld. 3. sz. ábra).

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (A 4.2 fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(2. tézis) A vizsgált törzsgyűjtemény egyik tagja (CHB-20p) filogenetikailag a *Chryseobacterium* nemzetséghez tartozik, de a nemzetség eddig leírt tagjaitól több lényeges tulajdonságban is elkülönül. Elvégeztük az eddig még ismeretlen, új faj leírását, melynek a *Chryseobacterium hungaricum* nevet adtuk. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (SZOBOSZLAY et al., 2008).



3. sz. ábra: A *Chryseobacterium* nemzetség megújult filogenetikus törzsfája

4.3. A CHB-20p. törzs fajspecifikus kimutatása környezeti mintából, DNS amplifikációs módszerrel (második célkitűzésnek megfelelően)

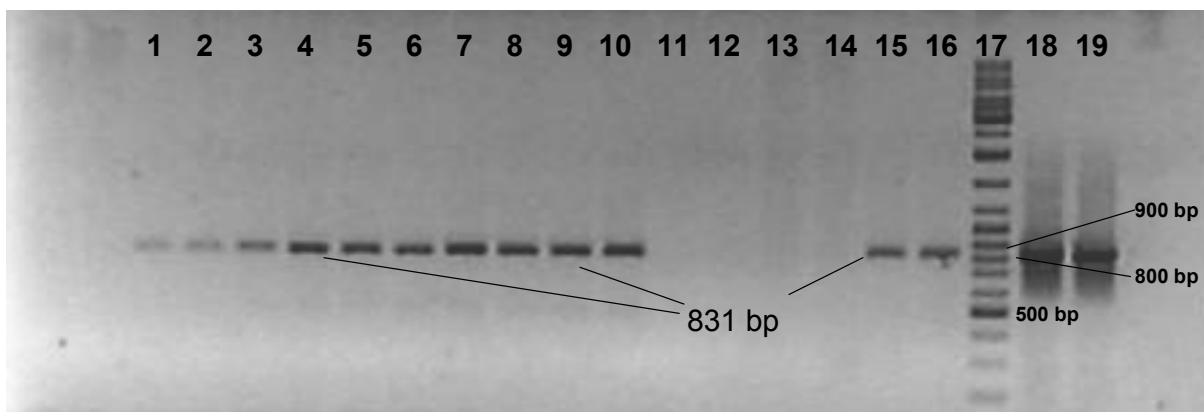
A *Chryseobacterium hungaricum* CHB-20p. 16S RNS génjének V2 és V6 hipervariábilis régiójára a következő fajspecifikus primerpárt terveztük:

-KEV10 132/F 5'-CAGATGGCATCATTGATATTGAA-3' (24 bp)

-KEV10 1007/R 5'-GACAGGTCTGGAAACAGACCCTTC-3' (24 bp)

C. hungaricum genomiális DNS-t alkalmazva templátként, valamint a fent leírt primerek használatával, 54 °C primer-feltapadási hőmérséklet (T_a) mellett egy 831-bp hosszúságú amplikont kaptunk 30 ciklusos, standard PCR reakció esetén.

A baktérium nagy érzékenységu környezeti kimutatására a nested-PCR módszert találtuk a legalkalmasabbnak. A fajspecifikus PCR reakciót a BSF8/20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') és a BSR1541/20 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') univerzális primerek használatával kombinálva, „*in vitro*” körülmények között lehetővé vált a *C. hungaricum* érzékeny detektálása talajból. A módszer érzékenységét szemlélteti, hogy a CHB-20p. törzset legalacsonyabb élő sejtszámban ($\sim 10^0$ CFU/g) tartalmazó talajmintából is sikeres PCR amplifikációt kaptunk az általunk tervezett primerekkel (ld. 4. sz. ábra).



1: 10^0 CFU/g; 2: 10^1 CFU/g; 3: 10^2 CFU/g; 4: 10^3 CFU/g; 5: 10^4 CFU/g; 6: 10^5 CFU/g; 7: 10^6 CFU/g; 8: 10^7 CFU/g; 9: 10^8 CFU/g; 10: 10^9 CFU/g. 11, 12, 13, 14: oltatlan talaj (negatív kontroll); 15, 16: pozitív kontroll; GeneRuler Ladder Mix (Fermentas); 18, 19: pozitív kontroll.

4. sz. ábra. CHB-20p^T, *Chryseobacterium hungaricum* kimutatása talajból nested PCR módszerrel

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (A 4.3 fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(3. tézis) A *Chryseobacterium hungaricum* faj „in vitro” fajspecifikus kimutatására alkalmas PCR alapú, gyors, megbízható és érzékeny módszert fejlesztettük, fajspecifikus primerek tervezésével, és azok nested-PCR reakcióban való alkalmazásával. A módszer „in vivo” biológiai monitoring célokra való felhasználása további teszteléseket igényel.

4.4. *Pseudomonas aeruginosa* környezeti mintából való kimutatására alkalmas módszerek kritikai összehasonlítása (harmadik célkitűzésnek megfelelően)

Bioaugmentációs eljárások biztonságos kivitelezéséhez szintén elengedhetetlen a fakultatív patogén baktériumok, köztük a *Pseudomonas aeruginosa* biológiai monitoringja. Harmadik célkitűzésnek megfelelően **öt, általánosan alkalmazott kimutatási módszer által adott eredmények egybehangzóságát vizsgáltuk 43 környezeti izolátumon** (ld. 5. sz. táblázat). A módszerek között három fenotípusos (MSZ 21470-77:1988, ACGM agaros tenyésztés és API 20NE biokémiai fingerprint), és két molekuláris biológiai módszer (ETA PCR és PA-SS PCR) szerepelt.

5. sz. táblázat: A vizsgált *P. aeruginosa* azonosítási módszerek eredményeinek összehasonlítása

Törzs	MSZ 21470-77:1988	ACGM agar	API 20NE	ETA PCR	PA-SS PCR	Törzs	MSZ 21470-77:1988	ACGM agar	API 20NE	ETA PCR	PA-SS PCR
ATCC 27853	+	+	+	+	+	P24	-	-	-	-	-
P2	+	+	+	+	+	P25	-	-	-	-	-
P3	+	+	+	+	+	P26	-	-	-	-	-
P4	+	+	+	+	+	P28	+	+	+	+	+
P5	+	+	+	+	+	P29	+	+	+	+	+
P6	+	+	+	+	+	P30	+	+	+	+	+
P7	+	+	+	+	+	P31	+	+	+	+	+
P8	-	-	-	-	-	P32	+	+	-	+	+
P9	+	+	+	+	+	P33	+	+	+	+	+
P10	+	+	+	+	+	P34	-	-	-	-	-
P11	+	+	+	+	+	P35	+	+	+	+	+
P12	-	-	-	-	-	P36	+	+	+	+	+
P14	+	+	+	+	+	P37	+	-	+	+	+
P15	-	+	+	+	+	P38	+	+	+	+	+
P16	-	+	+	+	+	P39	+	+	+	+	+
P17	+	+	+	+	+	P40	-	-	-	-	-
P18	+	+	+	+	+	P41	-	-	-	-	-
P19	-	-	-	-	-	P42	+	-	+	+	+
P20	-	-	-	-	-	P43	+	+	+	+	+
P21	-	-	-	-	-	P44	-	-	-	-	-
P22	+	+	+	+	+	P45	+	+	+	+	+
P23	-	-	-	-	-	P46	+	+	+	+	+

Az egyes módszerek által adott fals negatív eredményekből számoltuk a helyes azonosítási eredmények százalékos arányát (ld. 6. sz. táblázat), mely érték utal az egyes módszerek tévedhetőségére. Kísérleteinkben a fenotípusos módszerek mindegyike hozott fals negatív eredményt, míg a molekuláris biológiai módszerek minden esetben korrekt identifikációt adtak.

6. sz. táblázat: A vizsgált *P. aeruginosa* azonosítási módszerek által adott helyes eredmények összehasonlítása

Vizsgálati módszer	Σ tesztelt izolátum	Fals negatív eredmények	Helyes azonosítások aránya
Magyar Szabvány MSZ 21470-77:1988	43	2	95,34%
ACGM agaros módszer	43	2	95,34%
API 20NE	43	1	97,67%
Exotoxin A gén kimutatás (ETA PCR)	43	0	100%
16S rDNS V2 & V8 alegység kimutatás (PA-SS PCR)	43	0	100%

Saját kísérleti eredményeink és a szakirodalmi adatok fényében elvégeztem a vizsgált módszercsoportok kritikai összehasonlítását. Megállapítottam a fenotípusos és a molekuláris biológiai módszerek előnyeit és hátrányait, alkalmazásukat alátámasztó és korlátozó tényezőket. Az előnyök és hátrányok feltárása után, javaslatom szerint a *P. aeruginosa* leghatékonyabb környezeti kimutatása a két módszercsoport kombinált alkalmazásával érhető el. A módszertan azonban RNS alapú módszerek fejlesztésével tovább pontosítható.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY(A 4.4 fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(4. tézis) Öt különböző, *Pseudomonas aeruginosa* kimutatására és azonosítására általánosan használt módszert, 43 környezeti izolátumon összehasonlítva megállapítottuk a fenotípusos és a molekuláris biológiai módszerek előnyeit és hátrányait, alkalmazásukat alátámasztó és korlátozó tényezőket. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (ATZÉL et al., 2008).

4.5. Az exotoxin A gén kimutatását célzó (ETA-PCR) módszer kiértékelésének korrigálása (harmadik célkitűzésemnek megfelelően)

Kísérleteink során ellentmondásokat fedeztünk fel a *P. aeruginosa* exotoxin A génjét célzó PCR alapú módszer (ETA PCR) korábbi leírásaiban is (ld 7. sz. táblázat). Ezek az ellentmondások késztettek a módszer kiértékelésének részletes felülvizsgálatára.

7. sz. táblázat: Az ETA gén kimutatását célzó módszer különböző leírásai

Szerzők	Primer	Amplikon mérete a szerzők szerint	Amplikon emésztése PvuI restrikciós endonukleázzal
ATZÉL et al., 2008	ETA-1 (24-bp) ETA-2 (24-bp)	397-bp	134 + 263-bp
KHAN & CERNIGLIA, 1994	ETA-1 (24-bp) ETA-2 (24-bp)	396-bp	150 + 246-bp
SONG et al., 2000	ETA-1 (24-bp) ETA-2 (24-bp)	367-bp	Nem vizsgálták

Megfelelő szoftveres elemzéssel és szekvencia analízissel is alátámasztva **megállapítottuk, hogy ellentétben a korábbi leírásokkal, az ETA1 és az ETA2 primerekkel megsokszorozott, *Pseudomonas aeruginosa*-ra nézve fajspecifikus génszakasz 397-bp hosszú, ezt a génszakaszt pedig a *PvuI* restrikciós endonukleáz enzim egy 134 és 263-bp hosszú fragmentre osztja** (ld. 4. és 5. ábra).

ETA1

```

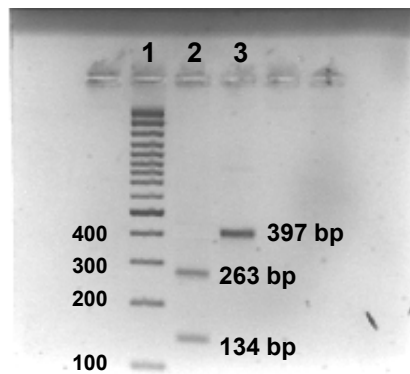
1  gacaacgccc tcagcatcac cagcgacggc ctgaccatcc gcctcgaagg
51  cggcgtcgag ccgaacaagc cgggtgcgcta cagctacacg cgccagggcgc
101 gcggcagttg gtcgctgaac tggctggtac cgat'cgcca cgagaagccc
151 tcgaacatca aggtgttcat ccacgaactg aacgccggca accagctcag
201 ccacatgtcg ccgatctaca ccatcgagat gggcgacgag ttgctggcga
251 agctggcgcg cgatgccacc ttcttcgtca gggcgcacga gagcaacgag
301 atgcagccga cgctcgccat cagccatgcc ggggtcagcg tggatcatggc
351 ccagacccag ccgcgccggg aaaagcgctg gagcgaatgg gccagcgc

```

ETA2

„CGAT'CG”: PvuI felismerési hely; aláhúzott szakasz: primer feltapadási hely

4. sz. ábra: A 397-bp hosszú PCR termék általam meghatározott bázissorrendje



1: Gene Ruler 3-kb marker, 2: emésztett fragmentek (263+134-bp), 3: Eredeti PCR termék (397-bp)

5. sz. ábra: A 397-bp méretű PCR termék emésztése PvuI restrikciós endonukleázzal

(5. tézis) Az eredetileg leírt, *Pseudomonas aeruginosa*-ra nézve fajspecifikus exotoxin A gén kimutatását célzó módszer kiértékelését módosítottuk. Megállapítottuk, hogy az ETA1 és az ETA2 primerekkel megsokszorozott génszakasz 397-bp hosszú. Ezt a génszakaszt a *PvuI* restrikciós endonukleáz enzim egy 134 és 263-bp hosszú fragmentre osztja. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (ATZÉL et al., 2008).

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Az általunk vizsgált **bioaugmentációs törzsgyűjtemény identifikációjának felülvizsgálata megtörtént**, ezáltal **a készítmény engedélyezetésének minden feltétele teljesült**. Az eredmények azonban több érdekes következtetés levonását is lehetővé tették. 16S rRNS gén szekvenciájuk alapján az **öt baktériumtörzsből háromnak más volt a faji besorolása, mint azt korábban fenotípusos jegyek alapján meghatározták**. A baktériumok bizonyos fiziológiai, fenotípusos, enzimatis és morfológiai bélyegei egyes esetekben elegendőek a pontos faj szerinti besoroláshoz, korábban ezek a tulajdonságok képezték a mikroszervezetek klasszikus rendszertanának alapjait. Azonban - **amint azt vizsgálataink is bebizonyították – bizonyos esetekben a fajok közötti különbségek csak nukleotid szinten mutatkoznak meg egyértelműen, ennek következtében kizárólag hagyományos módszerek alkalmazásával nem mutathatók ki**. Ma már több olyan **molekuláris biológiai módszer** is ismert, melyek **kombinált alkalmazása a hagyományos identifikációs eljárásokkal, a legnagyobb biztonsággal alkalmas egy ismeretlen izolátum pontos, faj szintű meghatározására**. Kiemelten javaslom a dolgozatban felhasznált módszerek kombinált alkalmazását olyan esetekben, amikor az identifikáció eredményén (mint a mi esetünkben is) egy biológiai készítmény engedélyezése, vagy esetleg egy helyes klinikai diagnózis múlik.

Ezen kívül, **a fenotípusos módszerek kizárólagos alkalmazásával**, mint az a CHB-20p törzs esetében is egyértelműen látszik, **eddig még ismeretlen, új fajok maradhatnak felfedezetlenül**, hiszen fenotípusos bélyegei alapján a hagyományos identifikációs rendszerek nagy eséllyel azonosítják – tévesen – egy már ismert, az adatbázisban szereplő baktériumfajjal.

Doktori értekezésem egyik fő eredménye egy új baktériumfaj felfedezése volt. Az általunk leírt *Chryseobacterium hungaricum* CHB-20p^T minden kétséget kizáróan új faj, melynek létezésével mostantól mindenképpen számolni kell a baktériumok összehasonlító rendszertanában. Ezen túl a már említett törzsgyűjtemény tagjaként alkalmas bioaugmentációs eljárások kivitelezésére. Kiegészíti a korábbi szakirodalmi adatokat a faj szénhidrogén-bontó képessége, mivel hasonló tulajdonságról a *Chryseobacterium* nemzetségen belül egyik fajleíró publikáció sem számol be. Javaslom a nemzetség más tagjainak, bioaugmentációs célra való értékmérését, tesztelését.

Vizsgálatainkból adódóan a nemzetségen belül körvonalazódik egy olyan fajcsoport (*C. hungaricum*, *C. caeni* és *C. hispanicum*), mely a 3. számú zsírsav-főkomponens (C_{16:1}ω7c/iso-C_{15:0} 2OH és/vagy iso-C_{17:0} 3OH) tekintetében eltér az eddig leírt *Chryseobacterium* fajoktól.

Bár egyes *Chryseobacterium* fajok tápanyagban szegény táptalajon flagellumot fejlesztenek, saját vizsgálataink alapján arra következtetésre jutottunk, hogy a sejtfüggelékek hiánya gazdag táptalajon a nemzetség fontos taxonómiai bélyege.

Az általunk tervezett fajspecifikus primerek nested-PCR reakcióban alkalmasnak bizonyultak a *Chryseobacterium hungaricum* faj talajból történő „*in vitro*” kimutatására. Javasolom a módszer „*in vivo*” biológiai monitoring célokra való felhasználásának további tesztelését. Érdeemes lenne továbbá, hasonló módon a CHB-20p-hez, a bioaugmentációs törzsgyűjtemény minden egyes tagjához fajspecifikus nested PCR módszert tervezni, és azokat „*in vivo*” tesztelni. Ezáltal a törzsgyűjtemény minden tagjának biológiai monitoringja elérhetővé válna.

Kutatásaim során, saját kísérleteken alapuló, a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium környezeti kimutatására alkalmas módszerek megbízhatóságára és alkalmazhatóságára irányuló összehasonlító elemzést végeztünk. Vizsgálati eredményeink fényében megállapítottuk a fenotípusos és a molekuláris biológiai módszerek előnyeit és hátrányait, alkalmazásukat alátámasztó és korlátozó tényezőket.

A PCR alapú technikáknak több előnye is van a hagyományos, tenyésztéses módszerekkel szemben. Nagyobb érzékenységgel alkalmasak mikroorganizmusok kimutatására, függetlenül azok élettani fázisától, fiziológiai állapotától. A PCR körülményeinek laboratóriumi optimalizálása után egy környezeti mintából könnyen és gyorsan lehet diagnosztikai eredményhez jutni akár 24 órán belül is, szemben a tenyésztéses módszerekkel, melyek több napot, vagy akár egy hetet is igénybe vehetnek. A DNS alapú technikáknak azonban hátrányai is vannak. A módszer nem tud különbséget tenni a tekintetben, hogy a minta DNS tartalma életképes, vagy már elpusztult sejtekből származik. Az elpusztult baktériumsejtből kikerült DNS ugyanis még hosszú ideig megmaradhat a talajban, talajvízben. Ilyen módon fennáll a lehetősége, hogy a PCR pozitív eredménye ellenére a minta valójában már nem tartalmazza a keresett baktérium egyetlen élő sejtjét sem. Fals pozitív reakciót könnyen okozhat ezen felül még a reakcióközeg DNS kontaminációja is. További hátránya ezeknek a módszereknek, hogy a környezeti mintában jelenlévő humuszanyagok, ill. fémek hatására a reakció gátlást szenvedhet. A DNS izolálás ezért környezeti mintából különös körültekintést, és jól megválasztott protokollt igényel. Mindezen hátrányok ellenére a PCR olyan lehetőségeket nyitott a környezeti mikrobiológia előtt, melyek korábban elképzelhetetlenek voltak. Ha sikerül a jövőben elérni a PCR és a hagyományos technikák együttes alkalmazásának széleskörű elfogadottságát, akkor ezek kombinált használata a környezeti mikrobiológia fontos kérdéseinek gyors megoldásához vezet majd.

A vizsgált módszercsoportok alkalmazhatóságára vonatkozó következtetéseimet a 8. táblázatban foglaltam össze:

8. sz. táblázat: Az általunk vizsgált *P. aeruginosa* azonosítási módszerek előnyei és hátrányai

	Előnyök	Hátrányok
Fenotípusos (és biokémiai) módszerek	-egyszerű kivitelezés -szokványos, egyszerű laboratóriumi háttérrel igényel	-fals negatív eredmény kockázata -időigényes
Molekuláris biológiai módszerek	-gyors -érzékeny	-fals pozitív eredmény kockázata -műszerezett, költségesebb laboratóriumi háttérrel igényel

A kérdéskörben megfogalmazott javaslatom: a jövőben a környezeti baktérium kimutatási módszereknek érdemes lenne az RNS alapú technikák felé fordulnia. Az RNS molekula felezési ideje ugyanis lényegesen rövidebb, mint a DNS-é, tehát a sejtből kikerülve az élettartama órákban mérhető.

Annak ellenére, hogy a molekuláris biológiai technikák előnyeit régóta vizsgálják baktériumok kimutatása esetén, **a világ legtöbb országban az állami szabályozás hagyományos fenotípusos módszereket standardizál *P. aeruginosa* környezeti izolálására és azonosítására.** Többek között az USA-ban az APHA Standard Method 9213F, ugyanúgy az Európai Unióban a Német Vízminőségi Szabvány DIN EN 12780:2002, és hazánkban is a már említett Magyar Szabvány (MSZ 21470-77:1988). Figyelembe véve eredményeimet és más korábbi hasonló témájú publikációkat **kétségtelen, hogy ezek a szabványok felülvizsgálatra szorulnak.**

Legvégül pedig, a *P. aeruginosa* azonosítására használt, korábban hibásan leírt **exotoxin A gén kimutatási módszerének kiértékelésén végzett korrekcióinkat ajánlanám olyan szakmai műhelyek figyelmébe,** melyek ma is rutinszerűen alkalmazzák ezt az eljárást a nevezett faj kimutatására.

6. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Folyóiratcikk:

- S. Szoboszlay, **B. Atzél**, J. Kukolya, Erika M. Tóth, K. Márialigeti, P. Schumann, B. Kriszt (2008): *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov. isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. In press. (IF: 2,662)
- B. Atzél**, S. Szoboszlay, Zs. Mikuska, B. Kriszt (2008): Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211: p. 143-155. p. (IF:1,733)
- M. Cserhádi, B. Kriszt, S. Szoboszlay, **B. Atzél**, J. Kiss, B. Morvai (2006): Impact of composts produced from waste of animal origin on the biological activity of soils. *Acta Agronomica Hungarica*, 54 (4) 507-516 p.
- E. Kaszab, R. J. Bedros, S. Szoboszlay, **B. Atzél**, I. Szabó, M. Cserhádi, B. Kriszt (2006): Problems with environmental safety on bioremediated sites – investigation on the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hydrocarbon contaminated sites. *Applied and Academic Research in Military Sciences*, 5 (3) 383-397p.
- Szoboszlay S., **Atzél B.**, Cserhádi M., Szabó I. (2004): Szénhidrogénnel szennyezett talajok bioremediációja. *Biokémia*, 28. (2) 37-40p.

Teljes közlemény konferencia kiadványban:

- Szoboszlay S., J. Solymosi, J. Lauer, **B. Atzél**, I. Szabó, B. Kriszt:(2002): Environmental safety and biodegradation of hydrocarbons. Foreign Substances in the Environment, 4th International Scientific Conference, September 12, 2002 Nitra, Slovakia
- Szoboszlay S., **B. Atzél**, B. Kriszt: Comparative biodegradation examinations of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and other oil degraders on hydrocarbon contaminated soil. Proceeding Part 1, 207-210p. 17th Forum for Applied Biotechnology, September 18-19, 2003 Gent, Belgium
- S. Szoboszlay, **B. Atzél**, M. Cserhádi, I. Szabó, B. Kriszt (2004): Biological safety of anaerobic technologies for environmental treatments. Anaerobic Digestion, Proceedings Volume 3, 1530-1534p. 10th World Congress, August 29 –September 2, 2004 Montreal, Canada

Rövid közlemény konferencia kiadványban:

- E. Kaszab, S. Szoboszlay, **B. Atzél**, M. Cserhádi, I. Szabó, B. Kriszt (2007): Hazard of opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* on biosafety during bioremediation processes. BiomicroWorld – 2007. II. International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Seville (Spain), 28 November-1 December 2007. Book of Abstracts, 628. p.
- E. Kaszab, S. Szoboszlay, **B. Atzél**, M. Cserhádi, I. Szabó, B. Kriszt (2007): The importance of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* on bioremediated sites. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, Vol 54 supplement (abstarcts): 58-59p.

- I. Szabó, S. Szoboszlay, **B. Atzél**, M. Cserhádi, S. Rúzs-Molnár, B. Kriszt (2007): Tests of microbial hydrocarbon degradation on contaminated groundwater samples. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, Vol 54 supplement (abstarcts): 121p.
- S. Szoboszlay, **B. Atzél**, S. Rúzs-Molnár, E. M. Tóth, J. Kukolya, B. Kriszt (2007): *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov. Isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, Vol 54 supplement (abstarcts): 130-131p.
- Kaszab E., Szoboszlay S., **Atzél B.**, Cserhádi M., Szabó I., Kriszt B. (2005): Remediációs tevékenységek környezetbiztonsági problémái. „Termékpálya, élelmiszer- és környezetbiztonság az agráriumban” Konferencia. Gödöllő, Magyarország, 2005. október 7. Előadás. Előadás összefoglalók, p.10.