

KÖRNYEZETI EREDETŰ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* TÖRZSEK VIRULENCIÁJÁNAK VIZSGÁLATA

KASZAB Edit, PÉK Nikoletta, FARKAS Milán, KRISZT Balázs, SZOBOSZLAY Sándor

Szent István Egyetem, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
2103 Gödöllő, Páter K. u. 1., e-mail: szoboszlay.sandor@kti.szie.hu

Kulcsszavak: mikrobiális ökológia, *Pseudomonas aeruginosa*, környezetbiztonság, virulencia, hemolízis

Összefoglalás: Természeti környezetünkben számos opportunistá patogén mikroorganizmus él, mely fajok esetleges humán-egészségügyi kockázatainak csupán napjainkban szentelnek nagyobb figyelmet. Ilyen fakultatív patogén kórokozó a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium, mely széleskörű katabolitikus potenciálja révén számos szerves szennyezőanyag lebontására képes. Szénhidrogénnel szennyezett földtani közegben, illetve felszín alatti vízben a szennyeződéshez adaptálódva akár egy esetleges fertőzéshez elegendő sejtszámot is elérhet. Vizsgálataink rávilágítanak, hogy a környezeti mintákból (elsősorban talajból és talajvízből) származó *P. aeruginosa* baktériumtörzsek szennyezett területek esetében széles körben elterjedtek, sőt a talaj mikrobiótájának domináns tagjává is válhatnak. Képesek továbbá a klinikai izolátumokhoz hasonló, vagy azt meghaladó intenzitású hemolitikus aktivitás kifejtésére, azaz a vörösvértestek károsítására, mely tulajdonság közvetlen virulencia faktornak tekinthető. Megállapítottuk, hogy a környezeti és klinikai eredetű törzsek hemolízis szempontjából nem különíthetők el, azaz a környezeti izolátumok egészségügyi kockázata feltehetően nem marad el a klinikai környezetben tapasztaltaktól. Izolatunk Magyarországon változatos tájegységeiről, legtöbb esetben erősen bolygatott, emberi hatásnak kitett közegből származtak, így az opportunistá kórokozó mikroorganizmusok jelenléte és intenzív felszaporodása közvetve bár, de emberi tevékenységnek tulajdonítható. Ezen hatások kiküszöbölése, a patogén mikroszervezetek szénhidrogénnel szennyezett közegben való elterjedésének megakadályozása környezetvédelmi és mikrobiális ökológiai szempontból egyaránt a jövő fontos feladata.

Bevezetés

Napjainkban a kőolajipari energiafordozók széleskörű felhasználása során számos havária esemény történhet, melyek révén természeti környezetünk állapotában drasztikus változások következnek be. A szénhidrogének nem ismeretlenek a bioszféra tagjai számára, hiszen a mikroorganizmusok a kőolajra jellemző bonyolult vegyületek degradációjában már a prekambrium óta közreműködnek (SZABÓ 1989). 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 (FARKAS 1998). A szénhidrogén típusú környezetszennyezések által érintett kárhelyek speciális, extrém élőhelyet jelentenek a földtani közeg és a felszín alatti víz mikrobiótáját 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 tenyészthető mikroorganizmusok sejtszáma magasabb, mint a kontrollként vizsgált, nem szennyezett közegben (SAUL et al. 2005). Az adaptációra képes mikroszervezetek tehát a mikrobiális ökoszisztémában megüresedett niche kihasználásával 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 mikrobiótája további átalakulásokon mehet keresztül (SZOBOSZLAY et al. 2002). A fizikai és kémiai eljárások közvetett módon fejtik ki hatásukat a felszín alatti közegek mikrobaközösségére, ám a mind gyakrabban alkalmazott biológiai (más néven bioremediációs) módszerek esetében a mikrobaközösség szennyezéshez történő adaptációját közvetlen módon igyekeznek befolyásolni. A biológiai beavatkozások optimális esetben hatékony és környezetbarát megoldást jelenthetnek a szénhidrogén szennyezések megszüntetésére, alkalmazásuk során azonban kiemelt kockázati tényezőként kell kezelni a szénhidrogénbontásra képes, ugyanakkor patogén mikroszervezetek nem kívánt felszaporodását a szennyezett területen. 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 jogszabályi előírások betartása és a legnagyobb elővigyázatosság mellett is előfordulhat, hogy a szénhidrogénbontásra képes mikroszervezetek között spontán módon megjelennek humán patogén mikroorganizmusok, mint például a vizsgálatunk szempontjából jelentős *Pseudomonas aeruginosa* faj.

A *P. aeruginosa* opportunista mikroszervezet, mely egészséges szervezetben ritkán okoz megbetegedést. Klinikai körülmények között régóta ismert és vizsgált baktériumfaj, a kórházi (nozokomiális) Gram-negatív, nem fermentáló baktériumok közül az egyik legjelentősebb kórokozó (LOSONCZY 2001). Humán egészségügyi jelentőségét jelzi, hogy a bizonyítottan a *P. aeruginosa* valamely törzsének tulajdonítható szepszisfertőzések esetében a halálozási arány meghaladja az 50%-ot (ZAVASCKI et al. 2008). Az Országos Epidemiológiai Központ adatbázisából tájékozódva elmondható, hogy a *P. aeruginosa* hazai viszonylatban is kiemelt jelentőséggel bír: a szepszisfertőzések 13%-áért és a légúti fertőzések jelentős hányadáért felelős (EPINFO 2008). Számos törzse esetében igazolt, hogy hajlamos multirezisztenciára, azaz kettő, vagy több antibiotikum hatóanyag csoporttal szembeni ellenálló képességre, mely egy esetleges fertőzés esetén a kezelést nagymértékben megnehezíti (BARCS 2001).

A *P. aeruginosa* faj kórházon kívüli környezetben is gyakori, ubikviter mikroszervezet, mely megtalálható folyókban, patakokban, víztározókban, házi szennyvízben (NÉMEDI et al. 1998), de jelen lehet talajban, felszín alatti vízben és élő szervezetekben is. A talajban élősejt-száma általában nem éri el a fertőzési kockázat szintjét; a környezetből való kitenyészhetőségi gyakorisága alacsony (GROBE et al. 1995). Kivételt képeznek ez alól a szénhidrogénnel szennyezett területek, melyek esetében a szerves szennyezőanyagok széles skálájának lebontására képes *P. aeruginosa* faj az egyik leggyakrabban kimutatható baktérium (RIDGWAY et al. 1990).

Témánk aktualitását az a tény adta, hogy a tudományos közvélemény egészen napjainkig külön kezeli a klinikai és környezeti eredetű *P. aeruginosa* izolátumokat és nem fordít figyelmet a környezeti eredetű baktériumtörzsek megbetegítő képességének vizsgálatára. Ezen izolátumok esetleges humán egészségügyi, valamint ökológiai kockázatára hívják fel a figyelmet ugyanakkor az alábbi tények:

1. A szénhidrogénnel szennyezett kárhelyeken tömegesen felszaporodó *P. aeruginosa* faj a talajvízáramlás segítségével élővizeket és ivóvízbázisokat veszélyeztethet.
2. A kórházon kívül szerzett, ép immunrendszer mellett és hajlamosító tényező nélkül leírt *P. aeruginosa* okozta megbetegedések száma egyre növekvő tendenciát mutat (ARANCIBIA et al. 2002).

3. A *P. aeruginosa* a mikrobiális közösség domináns tagjává válva képes lehet az esetlegesen virulenciáért (megbetegítő képességéért), valamint antibiotikum rezisztenciáért felelős génszakaszait átadni a mikrobióta egyéb tagjainak, így e tulajdonságok rezervoárjául szolgálhat (D'Costa et al. 2006).

A felsorolt szempontok alapján jelen munkánk célja szénhidrogénnel szennyezett környezeti mintákból izolált *P. aeruginosa* baktériumtörzsek izolálása és megbetegítő képességének megállapítása volt egy jellemző virulencia faktor, a hemolitikus aktivitás vizsgálata révén. 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: α -hemolízis esetén a hemoglobin kiszabadulása mellett a vörösvértestek maguk még épek, míg a *P. aeruginosa* faj patogén törzseire is jellemző β -hemolízis során a vörösvértestek és a hemoglobin teljes feloldódása figyelhető meg (SZABÓ 1989, MILCH et al. 1996). A környezeti eredetű baktériumtörzsek hemolitikus aktivitásának megállapítása segítségével részletesebb képet nyerhetünk azok betegségkialakító képességéről, melynek révén potenciális humán egészségügyi és mikrobiális ökológiai kockázataik részletesebben is értékelhetővé válnak.

Anyag és módszer

Mintavétel

A szénhidrogénnel szennyezett biotópok *P. aeruginosa* tartamát talaj, felszín alatti, illetve felszíni víz, továbbá olajipari szennyvíz minták vételezésével és vizsgálatával mértük fel. A mintavételek 2002-2009 között történtek, mely időszak során 21 különböző helyszínről 48 *P. aeruginosa* törzset izoláltunk. A vizsgálatba vont kárhelyek mintázásához a vonatkozó Magyar Szabványokat vettük figyelembe (MSZ 21470-1: 1998, MSZ 21464: 1998). Talaj esetében a talajfűrővel kiemelt henger közepéből steril késsel/kanállal, vízminták esetében pedig sterilizett acél golyós mintavevővel vettük a mintákat, melyeket aszeptikus körülmények között, steril mintatartó üvegekben szállítottuk a laboratóriumba.

A *P. aeruginosa* izolálásának és fajazonosításának módszerei

A *P. aeruginosa* faj kimutatását, valamint jellemző élősejtszámának megállapítását a vonatkozó Magyar Szabvány utasításai szerint hajtottuk végre (MSZ 21470-77:1988) szelektív és differenciálós táptalajokon történő tenyésztés útján. A bakteriális sejtszám meghatározására MPN (Most Probable Number) módszert alkalmaztunk (HIGHSMITH és ABSHIRE 1975).

A hemolízis vizsgálatok csak olyan törzsek esetében kerültek végrehajtásra, melyek hagyományos tenyésztéses vizsgálatok mellett molekuláris genetikai módszerekkel is igazoltan a *P. aeruginosa* faj képviselői voltak. A fajszerűtű azonosítást az úgynevezett PA-SS PCR reakció segítségével hajtottuk végre, melynek során a 16S rDNS V2 és V8 fajspecifikus alegységeinek kimutatását végeztük el PA-SS-F (5'-GGGGGATCTTCGGACCTCA-3') és PA-SS-R (5'-TCCTTAGAGTGCCACCCG-3') primerek felhasználásával, szakirodalmi forrás által meghatározott reakcióparaméterek mellett (ATZÉL et al. 2008).

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).

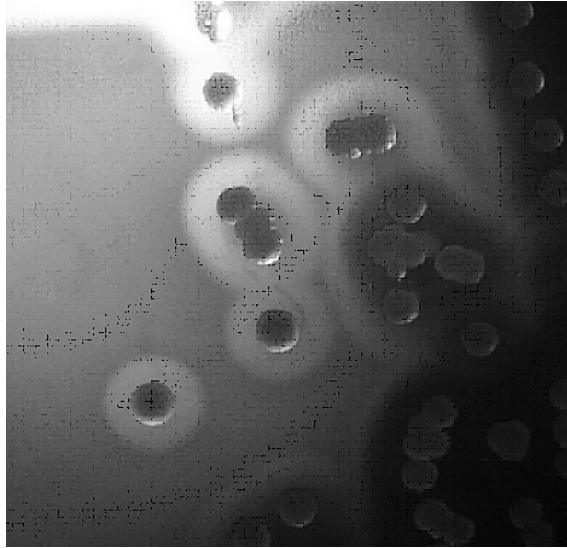
A véragar lemez felszínére fémkacsal, steril körülmények között rászélesztettük a vizsgálatba vont *P. aeruginosa* törzseket, majd 6, 22, illetve 48 órás, 37°C-on végzett inkubációt követően az átvilágított lemezekről leolvastuk az eredményeket. A vizsgálat során megfigyelhető volt a baktériumtörzsek növekedése, annak mértéke, illetve a hemolitikus aktivitás megjelenése, típusa és a hemolízis mértéke. A véragaron növekvő *P. aeruginosa* szintelen, fényes felszínű telepeket alkot (1. ábra). A patogén izolátumokra jellemző hemolízis azt jelenti, hogy a vörösvértestek felbomlanak, a baktériumtelepeket körülvevő térben megjelenik az áttetsző β-hemolízis zóna (2. ábra). A hemolitikus aktivitás értékelése során figyelembe vettük, hogy adott baktériumtörzs hány óra inkubációs idő elteltével volt képes növekedésre, illetve hemolitikus aktivitás kifejtésére az alkalmazott tápközegen, melynek megítélésekor a gyártó (Heipha-Diagnostica) utasításai alapján a 22 órás leolvasást tekintettük mérvadónak.

A hemolitikus aktivitás mértékének értékelésére ötfokozatú skálát alkalmaztunk az alábbi módon (lásd: 1. ábra, 2. ábra):

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



1. ábra A *P. aeruginosa* növekedése Columbia véragar lemezen (22 h, 37°C)
Figure 1. Growth of *P. aeruginosa* on the surface of Columbia blood agar plates (22 h, 37°C)



2. ábra A *P. aeruginosa* β -hemolizise Columbia véragar lemezen (22 h, 37°C)
 Figure 2. β -haemolysis of *P. aeruginosa* on the surface of Columbia blutagar plates (22 h, 37°C)

Eredmények és megvitatásuk

A környezeti izolátumok esetében tapasztalt bakteriális növekedést és hemolitikus aktivitást 5, klinikai környezetből izolált, zömében sebfertőzésekben származó (tehát igazoltan humán patogén) *P. aeruginosa* törzs azonos körülmények között megállapított eredményeivel vetettük össze a klinikai és környezeti törzsek közötti összefüggések feltárása érdekében. Az összehasonlító klinikai izolátumok adatait, illetve a hemolitikus aktivitásukra vonatkozó eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat A klinikai eredetű *P. aeruginosa* törzsek származása, illetve növekedése, hemolitikus aktivitása Columbia véragaron

Table 1. The origin of clinical *P. aeruginosa* strains and their growth and haemolytic activity on Columbia blutagar

Törzs jele	Izolálás időpontja	Származási helye	Növekedés véragaron (22 h, 37°C)	Hemolízis véragaron (22 h, 37°C)
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**	+	++

*Medeiros, Boston, USA

**Országos Közegészségügyi Központ – Országos Környezetegészségügyi Intézet, Budapest

A vizsgálatba vont *P. aeruginosa* törzsek származását, a környezeti mintákban tapasztalt jellemző élősejtszámát, valamint a patogenitás vizsgálatok során tapasztalt bakteriális növekedés és hemolitikus aktivitás mértékét a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat A környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek származása, jellemző élősejtszáma, illetve növekedése, hemolitikus aktivitása Columbia véragaron
Table 2. The origin and representative cell counts of environmental originated *P. aeruginosa* strains and their growth and haemolytic activity on Columbia blutagar

Törzs jele	Minta jellege	Minta-vétel idő-pontja	Minta származási helye	A minták összes alifás szénhidrogén tartalma (mg/kg; $\mu\text{g}/\text{dm}^3$)	<i>P. aeruginosa</i> szám/ml, g minta	Növekedés véragaron (22 h, 37°C)	Hemolízis véragaron (22 h, 37°C)
P2	Talajvíz	2002.	Diósd	n.d.	n.d.	-	-
P9	Talajvíz	2003.	Diósd	n.d.	n.d.	-	-
P10	Talajvíz	2003.	Diósd	n.d.	n.d.	+	-
P11	Talajvíz	2003.	Diósd	n.d.	n.d.	+	-
P14	Talaj	2003.	Tököl	n.d.	10	+	+/-
P15	Talaj	2003.	Tököl	n.d.	1000	+	++
P16	Talaj	2003.	Tököl	n.d.	100	+	+/-
P17	Talaj	2003.	Tököl	n.d.	1	+	+
P18	Talaj.	2003.	Tököl	n.d.	100	+	+/-
P22	Talaj	2003.	Túrkeve	11300	10	+	+
P28	Talaj	2003.	Polgár	6630	10000	+	+
P29	Talaj	2003.	Polgár	2310	100	+	+
P30	Talaj	2004.	Szabadszállás	n.d.	1000	+	-
P31	Talajvíz	2004.	Komádi	n.d.	10	+	+++
P32	Talajvíz	2004.	Komádi	n.d.	10	+	++
P33	Talaj	2004.	Tököl	n.d.	10	+	+++
P35	Talajvíz	2004.	Szabadszállás	78500	100	+	++
P36	Talajvíz	2004.	Szabadszállás	7220	1000	+	+++
P37	Talajvíz	2004.	Szabadszállás	3440	10	+	+
P38	Talaj	2004.	Ópusztaszer	n.d.	100	+	+
P39	Talaj	2004.	Algyő	n.d.	10	+	+++
P42	Talaj	2005.	Mezőtúr	705	1000	+	+
P43	Talajvíz	2005.	Ópusztaszer	n.d.	29	+	+++
P45	Talajvíz	2005.	Budapest	-	4,3	+	-
P46	Talajvíz	2005.	Budapest	-	0,36	+	+
P49	Talajvíz	2005.	Bátonyterenye	n.d.	n.d.	+	+++
P50	Talajvíz	2005.	Bátonyterenye	n.d.	n.d.	+	+++

P53	Talajvíz	2006.	Zalaegerszeg I.	n.d.	n.d.	+	+
P62	Talajvíz	2006.	Szarvas	n.d.	2,3	+	-
P65	Talajvíz	2006.	Zalaegerszeg I.	6720	46	+	+
P66	Talajvíz	2006.	Zalaegerszeg I.	<50	2,3	+	++
P69	Talajvíz	2007.	Nagyszénás	n.d.	1100	+	++
P70	Talajvíz	2007.	Nagyszénás	<50	9,3	+	+++
P71	Talajvíz	2007.	Debrecen	n.d.	4,3	+	++
P76	Talajvíz	2007.	n.d.	n.d.	n.d.	+	+
P77	Talajvíz	2007.	Zalaegerszeg I.	n.d.	1,1	+	+
P78	Talajvíz	2007.	Szarvas	n.d.	240	+	++
P79	Talajvíz	2007.	Szarvas	n.d.	2,3	+	++
P83	Szennyvíz	2008.	Tiszaújváros	304	0,91	-	-
P84	Talajvíz	2008.	Zalaegerszeg II.	n.d.	n.d.	+	+
P109	Talajvíz	2008.	Siklós	n.d.	2,3	+	++
P110	Talajvíz	2008.	Siklós	n.d.	200	+	+++
P112	Szennyvíz	2009.	Zalaegerszeg II.	n.d.	0,91	+	++
P118	Felszíni víz	2009.	Tiszaújváros	n.d.	0,39	+	++
P119	Szennyvíz	2009.	Tiszaújváros	n.d.	24	+	+
P120	Szennyvíz	2009.	Tiszaújváros	n.d.	4,3	+	+
P124	Szennyvíz	2009.	Zalaegerszeg II.	n.d.	2,3	+	+
P125	Szennyvíz	2009.	Dunaújváros	n.d.	46	+	+

n.d. – nincs adat

A *P. aeruginosa* dominanciája szénhidrogénnel szennyezett mikrobiótában

A vizsgálatba vont környezeti minták eredményei alapján megállapítható, hogy a szénhidrogénnel szennyezett ökotópok jelentős hányadánál (66,6%) a tapasztalt *P. aeruginosa* sejtszám igen alacsony (10^0 MPN) volt és nem érte el a szakirodalom által meghatározott fertőzési kockázat szintjét, mely expozíciós útvonaltól függően 10^2 - 10^8 élősejtszám lehet (LIZEWSKI et al. 2002, FOK 2005). A további mintavételi pontok (33,3%) esetében azonban a vizsgálatba vont patogén mikroszervezet sejtszáma 10^2 - 10^4 MPN közé esett, mely nagyságrend jelzi, hogy a *P. aeruginosa* faj a szennyezéshez adaptálódva a mikrobiális ökoszisztéma jelentős tagjává vált. Adaptációs képességét jelzi, hogy igen magas összes alifás szénhidrogén (TPH) koncentrációval jellemezhető környezeti minták esetében is képes volt akár 10^4 sejtszámot elérni (lásd 2. táblázat). Az általunk vizsgált környezeti minták tapasztalt élősejtszáma és az ismertetett fertőzési kockázat összevetéséről elmondható, hogy a Human Exposure to Soil Pollutants humánegészségügyi kockázatelemző modell (DURA et al. 2001) által talajra megállapított lehetséges napi bevitel (142 mg) szerint egy esetleges fertőzés az általunk vizsgált területeken 10^3 - 10^4 MPN sejtszám mellett már megvalósulhat.

A környezeti eredetű *P. aeruginosa* izolátumok hemolitikus aktivitása

Eredményeink szerint az összehasonlító klinikai törzsek már 6 óra inkubáció elteltével növekedést és hemolitikus aktivitást mutattak Columbia véragar lemezen, mely 22 órát követően jól megfigyelhetővé és intenzívvé vált a KPS-2 és KPS-4 jelzésű izolátumok esetében. A további három kórházi eredetű törzs (KPS-1, KPS-3, ATCC27853) a 22 órás inkubáció végére gyenge hemolízist mutatott.

A környezeti izolátumok vonatkozásában elmondható, hogy a vizsgált 48, környezeti mintából izolált törzs 93,7%-a mutatott növekedést Columbia véragaron és a törzsek 83,3%-a mutatott valamilyen mértékű hemolitikus aktivitást 22 óra elteltével. A növekedés és hemolízis az egyes környezeti törzseknél eltérő mértékű volt. 10,4%-uknál nem tapasztaltunk hemolízist, 35,4% esetében pedig a KPS-1, KPS-3, ATCC 27853 jelölésű klinikai törzsekhez hasonló szintű, gyenge hemolízis volt megfigyelhető. A környezeti izolátumok 22,9%-a az intenzíven hemolizáló kórházi törzsekhez (KPS-2, KPS-4) hasonló képet mutatott. Jelentős tény, hogy környezeti eredetű izolátumok 18,8%-ának hemolitikus aktivitása intenzitásában meghaladta az általunk vizsgált kórházi törzsek esetében tapasztalt értéket, azaz vörösvértest-károsító hemolizin termelésük mértéke feltehetően nagyobb, mint a bizonyítottan betegség kialakítására képes klinikai izolátumok esetében tapasztalt szint.

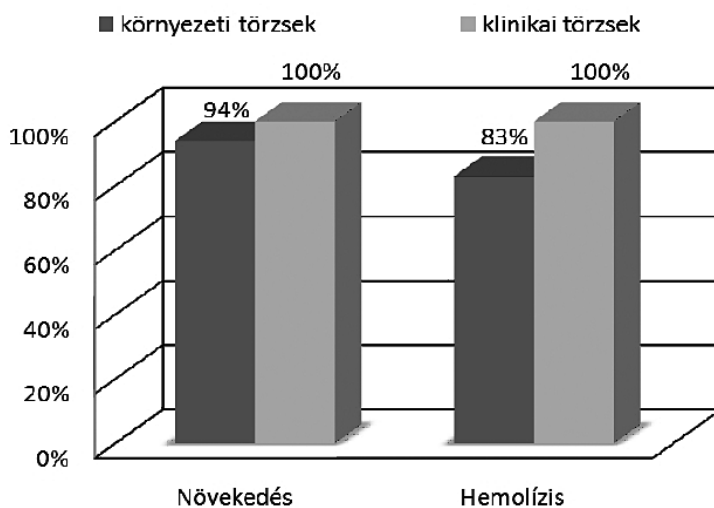
A klinikai és környezeti izolátumok véragaron tapasztalt növekedésében és hemolitikus aktivitásában mutatkozó különbségeket szemlélteti az 3. ábra, míg a környezeti törzsek hemolitikus intenzitásának eredményeit szemlélteti a 4. ábra.

Összességében megállapítható tehát, hogy a környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek a vártnál jóval nagyobb arányban, 83,3%-ban mutattak hemolitikus aktivitást, vagyis eredményeink alapján a vizsgált törzsek közel 4/5-e képes a vörösvértesteket károsító aktivitásra, azaz kiválthat betegséget emberi és/vagy állati szervezetben.

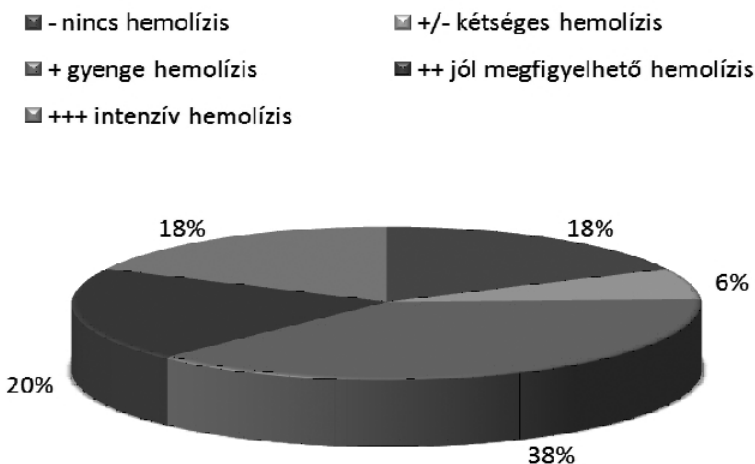
A vizsgálati eredmények alapján elmondható, hogy egy ismert virulencia faktor, a hemolitikus aktivitás vizsgálata alapján a patogenitásra utaló képességek szempontjából jelentős különbség nem figyelhető meg a hazai, szénhidrogénnel szennyezett területekről származó *P. aeruginosa* törzsek és a kórházi körülmények között izolált törzsek között. Ez a megállapítás összhangban van a szakirodalomban fellelhető, környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsekre vonatkozó kutatások megállapításaival (VIVES-FLÓREZ ÉS GARNICA 2006, ALONSO et al. 1999), melyek szerint a *P. aeruginosa* klinikai és környezeti mintákból gyűjtött izolátumai nem mutatnak jelentős különbséget patogenitás tekintetében. 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 48 db, 21 különböző helyszínről származó, hétéves intervallumban izolált törzsek eredményeit mutatjuk be, mely már reprezentatív számnak tekinthető. Eredményeink így átfogóbb képet adnak a patogenitásra utaló tulajdonságok környezeti elterjedtségéről.

A *P. aeruginosa*, mint a mikrobiális ökoszisztéma emberre veszélyt jelentő tagja

Vizsgálati eredményeink alapján megállapítható, hogy a *P. aeruginosa* baktériumfaj képes lehet a szénhidrogénnel szennyezett, speciális életterek mikrobiótájának domináns tagjává válni, és magas élősejtszámot elérni. Jelen munka keretében megállapítottuk, hogy a környezeti törzsek jelentős hányada (83,3%) rendelkezik olyan közvetlen virulencia faktorral, mely egy esetleges betegség kialakításában komoly kóroki szerepet játszik. Korábbi vizsgálataink során igazoltuk, hogy a *P. aeruginosa* faj környezeti



3. ábra A *P. aeruginosa* törzsek növekedése és hemolízise Columbia véragaron (22h, 37°C)
 Figure 3. Growth and haemolysis of *P. aeruginosa* strains on Columbia blutagar (22h, 37°C)



4. ábra A hemolitikus aktivitás mértékének megoszlása a környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzseknél
 Figure 4. The scale of haemolytic activity of environmental originated *P. aeruginosa* strains

eredetű törzsei képesek lehetnek a klinikai izolátumokhoz hasonlóan kiterjedt, többszörös antibiotikum rezisztenciára, azaz multirezisztenciára (KASZAB et al. 2009), valamint kísérletes úton bizonyítottuk a faj környezeti és klinikai eredetű izolátumainak széleskörű szénhidrogénbontó képességét (KASZAB et al. 2006). E tulajdonságok együttes ismeretében megdölni 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 hipotézisek, 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 nem helytálló feltételezés.

A természetes mikrobaközösségre gyakorolt hatások tekintetében elmondható, hogy a *P. aeruginosa* faj esetében előforduló virulencia determinánsok, illetve az antibiotikum rezisztencia kódolásáért felelős génszakaszok gyakran a bakteriális genom olyan szakaszain 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 mikrobióta 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 kárhelyek, mint az intenzív mikrobiális növekedés gócpontjainak folyamatos monitoringja, valamint a patogén mikroszervezetek kontrollja, illetve a jogszabályi előírások maradéktalan betartása. Az eredmények tükrében felülértékelendő a bioremediációs eljárásoknak az a módja, melynek során a szénhidrogén-szennyezések helyszínén a talajban élő természetes mikrobapopulációt szaporítják fel, illetve azonosítatlan oltóanyagot juttatnak ki.

Köszönetnyilvánítás

Kutatásunkat a Jedlik Ányos Program (OM 00120/2007), valamint a KMOP-2007-1.1.1 projekt támogatásával végeztük.

Irodalom

- 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: 421–430.
- ANDERSON, D. 1999: Fitness costs of resistance and genetic compensation. *Clinical Microbiology and Infection*, 5: 22.
- ARANCIBIA F., BAUER T. T., EWIG S., MENSA J., GONZALEZ J., NIEDERMAN M. S., et al. 2002: Community-acquired pneumonia due to Gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: incidence, risk, and prognosis. *Archives of International Medicine*, 162: 1849–1858.
- ARRUDA, E. A., MARINHO, I. S., BOULOS, M., SINTO, S. I., CAIAFFA, 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: 620–623.
- ATZÉL B., SZOBOSZLAY S., MIKUSKA ZS., KRISZT B. 2008: Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211: 143–155.
- BARCS I. 2001: Rezisztencia problémák – probléma baktériumok. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia*, 8: 68–74.

- BRENCsÁN J. 2006: Új orvosi szótár. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, p. 271.
- D'cOSTA V. M., McGRANN K. M., HUGHES D. W., WRIGHT G. D. 2006: Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311: 374–377.
- DURA Gy., GRUIZ K., László E., VADÁSZ Zs. 2001: Kármentesítési kézikönyv 3. Szennyezett területek részletes mennyiségi felmérése. Környezetvédelmi Minisztérium, Hungexpo Reklámügynökség, p. 128.
- EPINFO 2008: Magyarország 2006. évi járványügyi helyzete. Országos Tisztifőorvosi Hivatal, Budapest, 15: 31–108.
- FARKAS J. szerk. 1998: A mikrobiális ökológia alapjai. Ökológiai Intézet a Fenntartható Fejlődésért Alapítvány, Miskolc, p. 58.
- FOK N. 2005: *Pseudomonas aeruginosa* as a waterborne gastroenteritis pathogen. *Environmental Health Review*, Winter: 121-130.
- 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.
- HIGHSMITH A. K., ABshire R. L. 1975: Evaluation of a Most-Probable-Number technique for the enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology*, 30: 596–601.
- 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.
- KASZAB E., KRISZT B., ATZÉL B., SZABÓ G., SZABÓ I., HARKAI P., SZOBOSZLAY S. 2009: The occurrence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* on hydrocarbon contaminated sites. *Microbial Ecology*, online publication (DOI 10.1007/s00248-009-9551-7)
- LIZEWSKI S. E., LUNDBERG D. S., SCHURR M. J. 2002: The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 70: 6083–6093.
- LOSONCZY Gy. 2001: A klinikai epidemiológia alapjai – a nosocomialis fertőzések járványtana. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, pp. 845–852.
- MILCH H., CZIRÓK É., HERPAY M. 1996: Hogyan támadnak a baktériumok? SubRosa Kiadó, Budapest, p. 71.
- NÉMEDI L., JÁNOSY L., ANDRIK P., KÁDÁR M. 1998: Közegészségügyi környezetbakteriológia. In: NÉMEDI L. szerk. 1998: Környezetbakteriológia. 2. (bővített) kiadás, Környezetgazdálkodási Intézet, Budapest, pp. 149–247.
- 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: 3565–3575.
- 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: 141–155.
- SZABÓ I. M. 1989: A bioszféra mikrobiológiája. Akadémia Kiadó, Budapest, p. 1555.
- SZOBOSZLAY S., SOLYMOSI J., LAUER J., ATZÉL B., SZABÓ I., KRISZT B. 2002: Environmental safety and biodegradation of hydrocarbons. 4th International Scientific Conference „Foreign Substances in the Environment”, Nitra, Slovakia, Proceedings, pp. 200–204.
- VIVES-FLÓREZ M., GARNICA D. 2006: Comparison of virulence between clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates, *International Microbiology*, 9: 247–252.
- ZAVASCKI A. P., BARTH, A. L., GOLDANI, L. Z. 2008: Nosocomial bloodstream infections due to metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, online publication (DOI 10.1093/jac/dkn082)
- 16/2002 (IV.10.) EÜM rendelet a települési szilárd és folyékony hulladékkal kapcsolatos közegészségügyi követelményekről
- MSZ 21464: 1998. Mintavétel felszín alatti vizekből.
- MSZ 21470-1: 1998. Környezetvédelmi talajvizsgálatok. Mintavétel.
- MSZ 21470-77:1988 Környezetvédelmi talajvizsgálatok. Mikrobiológiai vizsgálatok.

VIRULENCE ASSAY ON ENVIRONMENTAL ORIGINATED STRAINS
OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

E. KASZAB, N. PÉK, M. FARKAS, B. KRISZT, S. SZOBOSZLAY

Szent István University, Institute of Environmental and Landscape Management
2100 Gödöllő, Páter K. u. 1., e-mail: szoboszlay.sandor@kti.szie.hu

Keywords: microbial ecology, *Pseudomonas aeruginosa*, environmental safety, virulence, haemolysis

Opportunistic pathogen microorganisms are widespread in our natural environment however, their presence as a risk factor to human health only recently has been reported. One of these pathogen bacteria is the species *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* due to a wide-range of catabolic activities has the ability to degrade various organic contaminants. With its adaptability to contaminations *P. aeruginosa* is able to reach an infective dose in hydrocarbon polluted soil or groundwater. Our investigations show that *P. aeruginosa* is widespread in hydrocarbon contaminated samples (primarily in soil and groundwater) and is able to become the dominant species among soil communities. Moreover, environmental originated strains can reach or exceed the clinically experienced level of haemolytic activity, namely have the ability to damage erythrocytes that is a direct virulence factor. It was established that environmental and clinical originated strains of *P. aeruginosa* cannot be distinguished with regard to their haemolytic activity, therefore the possible health risk of environmental originated strains is not less than the clinically detected level. These strains were isolated from various regions of Hungary, mainly from fields that are under strong antropogenic effects. Therefore, the presence and intensive growth of these pathogenic microorganisms can be attributed to human activities indirectly. To eliminate of these harmful effects and to prevent of the spread of pathogenic microbes are important tasks for environmental protection and for microbial ecological purposes as well.