

DIPLOMADOLGOZAT

Dzsudzsák Emília Laura

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Genetika és Biotechnológiai Intézet
mezőgazdasági biotechnológus mesterképzési szak

**A HÉVÍZI TÖRPENÖVÉSŰ VADPONTY (*CYPRINUS CARPIO CARPIO*
MORPHA HUNGARICUS) MIKROBIOM ANALÍZISE**

Belső konzulens:	Dr. Kaszab Edit egyetemi docens
Belső konzulens intézete/tanszéke:	Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Környezetbiztonsági Tanszék
Készítette:	Dzsudzsák Emília Laura

Gödöllő
2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	2
2. Szakirodalmi áttekintés	4
2.1 Mikrobák szerepe az élő szervezetben	4
2.2 A mikrobiom tagjai	5
2.3 A mikrobiom vizsgálatok szerepe a konzervációbiológiában	6
2.4 A halak mikrobiomja	7
2.5 Speciális élőhelyek Magyarországon	10
2.6 A Hévízi-forrástó bemutatása	10
2.7 A hévízi törpenövésű vadponty bemutatása	13
2.8 Antibiotikum-rezisztencia a környezetben és vadvilágban	15
2.8.1 Antibiotikum-rezisztencia és rezisztencia gének	15
2.8.2 Antibiotikum-rezisztencia mechanizmusok	16
2.8.3 Rezisztencia a környezetben	17
3. Vizsgálati módszerek	19
3.2 Mikrobiológiai mintavételezés	19
3.3 Gyógyszeranalitikai vizsgálatok	21
3.4 Tenyésztéssel mikrobiológiai vizsgálatok	22
3.5 Közösségi mikrobiológiai vizsgálatok	25
3.6 <i>P. aeruginosa</i> kimutatása és antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok	27
3.7 Antibiotikum-rezisztencia gének kimutatása	29
3.8 Biofilmképzés vizsgálata	31
4. Eredmények és értékelések	33
4.1 A felszíni vízminta gyógyszeranalitikai vizsgálatainak eredménye	33
4.2 Tenyésztéssel mikrobiológiai vizsgálatok eredménye	35
4.3 Közösségi mikrobiológiai vizsgálatok eredményei	36
4.4 A <i>P. aeruginosa</i> kimutatása, az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok és a rezisztencia gének kimutatásának eredményei	38
4.5 Biofilmképzés vizsgálat eredményei	40
7. Következtetések, javaslatok	42
8. Összefoglalás	44
9. Köszönetnyilvánítás	46
Irodalomjegyzék	47
Nyilatkozatok	56

1. Bevezetés és célkitűzések

Ahogy bővül tudásunk a mikroorganizmusok szerteágazó ökológiai, élettani szerepéről és jelentőségéről, a mikrobiológiai vizsgálatok is világszerte mind nagyobb jelentőséggel bírnak. A magasabb rendű szervezetek mikrobióta vizsgálatának célja, hogy feltárja egy adott faj, változat vagy egyed mikrobaközösségét (beleértve a baktériumok, gombák, archeák stb. csoportjait). Ennél is tágabb fogalom a mikrobiom analízis, melynek során megismerjük egy adott mikrobaközösség génkészletét, illetve strukturális elemeit (pl. fehérjéit), mely alapján az élő szervezetben betöltött szerepük is megismerhetővé válik (Berg et al., 2020). A mikrobaközösség funkciójának és összetételének feltárása különösen jelentős védett, vagy veszélyeztetett állatfajok esetében, mivel a változó környezeti tényezők (környezetszennyezés, klímaváltozás) nem csupán közvetlenül, hanem a mikrobiológiai egyensúly felborulásával közvetett módon is veszélyeztethetik a faj populációinak túlélését. A mikrobiótában bekövetkező változások ugyanis hatással lehetnek a táplálék hasznosulására, a fertőző betegségek kialakulására, a szaporodásbiológiai paraméterekre, az immunrendszer állapotára és így végső soron hozzájárulhatnak egy faj sikerességéhez, vagy kudarcához (West et al., 2019).

Magyarországon és a világon a védett állatok mikrobiológiájának megismerése jelenleg még csupán kezdeti szakaszban van és a kutatások középpontjában elsősorban a védett emlősök és madarak állnak. A felszíni vízi ökoszisztéma tagjainak vizsgálata kevésbé hangsúlyos, bár esetükben is van a mikrobióta-analízisnek szerepe, hiszen a vízi szervezetek egész életciklusuk és teljes élethosszuk során, teljes testfelületükön keresztül érintkezhetnek a vízben oldott szennyezőanyagokkal, így jóval kitettebbek a környezeti tényezőknek. Emellett számos esetben olyan különleges vagy extrém ökológiai adottságú (hőmérsékletű, kémiai összetételű) élőhelyeken is megtalálhatók, melyek egyedi mikrobióta kialakulását teszik lehetővé.

A speciális környezeti tényezőkhez történő alkalmazkodás példája a Magyarországon egyedülálló hévízi törpenövésű vadponty (*C. carpio carpio morpha hungaricus*) (Varga et al., 2013), mely az európai ponty (*C. carpio*) egy kizárólag a Kárpát-medencében, ezen belül is a Hévízi-tóban élő törpenövésű alfaja. A faj törpenövekedésének kialakulását a tóban jelenlevő extrém környezeti körülményekhez (magas víz hőmérséklet, alacsony oldott oxigéntartalom, radon és kénhidrogén tartalom) való alkalmazkodás idézhette elő. Az alfaj genetikai bázisának esetleges eltérése a különböző vad, vagy háziasított változatoktól egyelőre nem ismert, ahogyan a jelenleg stabil, elszigetelt, önfenntartó állomány feltehetően sajátos mikrobiomjának

feltárására sem irányultak eddigi kutatások. Maga a Hévízi-tó, mint élettér is egyedi környezetet jelent (Krett et al., 2013), mely jellegzetes tulajdonságai (egyenletesen magas vízhőmérséklet, intenzív turisztikai terhelés) alapján a tóban élő törpenövésű pontyváltozat kolonizációjában szerepet játszó mikroorganizmusok forrása lehet.

Mindezek alapján diplomadolgozatomban célul tűztem ki:

- a Hévízi tóban élő egyetlen önfenntartó endemikus halfaj, a hévízi törpenövésű vadpontyra jellemző mikrobaközösség meghatározását és leírását klasszikus mikrobiológiai és molekuláris biológiai módszerekkel, különös tekintettel az alfaj túlélésében vagy veszélyeztetésében feltehetőleg szerepet játszó mikroszervezetekre nézve,
- a rendkívül szélsőséges környezeti viszonyok pl. extrém magas vízhőmérséklet, alacsony oldott oxigéntartalom hatását a formálódó mikrobaközösségre a tóból származó üledék minták elemzésével,
- az intenzív rekreációs igénybevétel által a mikrobiológiai közösségre gyakorolt szelekciós nyomás értékelését antropogén hatás mérésére alkalmas, antibiotikum rezisztens mikroszervezetek célzott kimutatásával,
- a rezisztenciát mutató baktériumtörzseket jellemző rezisztencia mechanizmusok feltárását antibiotikum-rezisztencia gének kimutatásával.

A vállalt célok megvalósítását segítette, hogy a törpenövésű pontyváltozat esetében a tervezett kutatáshoz szükséges szakmai ismeretek, valamint a vizsgálatok elvégzéséhez szükséges partneri kapcsolatok, engedélyek és laboratóriumi háttér a befogadó Intézetben (MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet) rendelkezésre álltak.

2. Szakirodalmi áttekintés

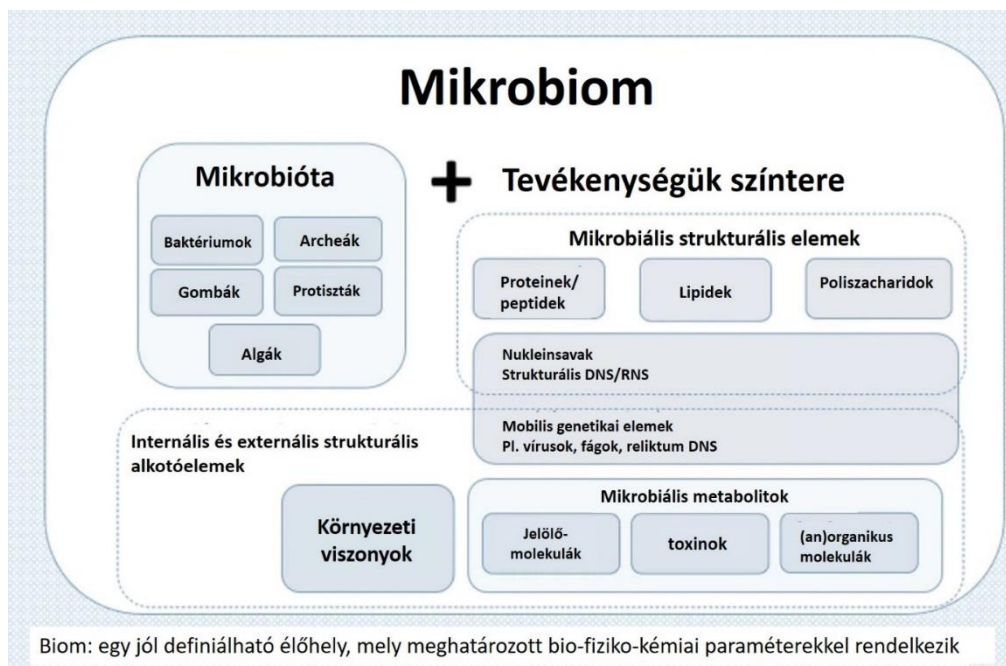
2.1 Mikrobák szerepe az élő szervezetben

Az emberi faj a kezdetektől együtt él a mikroorganizmusokkal, mely idő alatt öntudatlanul is alkalmazták azok hasznos tulajdonságait és szenvedtek az általuk okozott megbetegedésekben. Azonban a mikroorganizmusok létezése a XVII. századig ismeretlen volt az emberiség számára. Ekkor egy dán kereskedő és egyben amatőr tudós, Antonie van Leeuwenhoek (1632–1723) elsőként felfedezte az apró, sejtjes szerveződésű élőlényeket a saját maga által épített lencserendszere segítségével (Robertson, 2023), melyet a mai mikroszkópok elődjeként tartunk számon. Azóta számos kutatás irányult a mikroorganizmusok megismerésére, és bár a mai napig számos új faj vár leírásra, már jóval tágabb ismerettel rendelkezünk a mikrobák világban betöltött szerepéről. A mikroszervezetek a Föld szinte minden szegletében megtalálhatóak, leginkább egy- vagy több fajból álló közösséget alkotva (Davey és O'Toole, 2000). A talaj éltetői, jelen vannak vizeinkben és a levegőben, kolonizálják a földünket borító növényzetet és az itt élő állatokat egyaránt (Flemming és Stefan, 2019). A mikroorganizmusok többségét és legjelentősebb csoportját a prokarióták (baktériumok, archeák) és a vírusok alkotják, ebből adódóan a kutatások döntő hányada ezekre a szervezetekre irányul.

A száraz talajban élő baktériumok elérik az 1×10^8 sejt/g sejtszámot, a vírusok pedig az 5×10^9 részecske/g mennyiséget; az óceánokban a baktériumok sűrűsége megközelítőleg 5×10^5 sejt/ml, a vírusrészecskéké pedig 1×10^{11} vírus/ml (Bar-on et al., 2018). Az emberi testet kolonizáló mikroorganizmusok száma körülbelül tízszeresen meghaladja az emberi sejtek számát és a mikrobiom általában 100-szor több gént tartalmaz, mint maga a gazdaszervezet (Bahrndorff et al., 2016). A Humán Mikrobiom Projekt (HMP) 2007-ben indult és eredményei világossá tették, hogy az emberi (ebből következően az állati) mikrobiom egy rendkívül diverz és összetett rendszer (Turnbaugh et al., 2007). Az emberi sejtek kb. 90%-a kapcsolatban áll a mikrobiom tagjaival (Pflughoeft és Versalovic, 2012), melyből következik, hogy minden szerv rá jellemző, meghatározott mikrobaközösséggel rendelkezik (Palmer et al. 2007). Minden egyes élőlény a különböző testfelületein sokféle mikrobaközösségnek ad otthont, melyek összetételükben és funkcióikban nagymértékben különböznek egymástól.

2.2 A mikrobiom tagjai

A kifejezések használatakor a mikrobiom és a mikrobióta fogalmak egyértelmű megkülönböztetése segít elkerülni a mikrobaközösség leírásával kapcsolatos vitákat. A **mikrobióta** egy jól definiálható létezőben jelenlévő élő mikroorganizmusok összességéből áll, tagjai a baktériumok, archeák, gombák, algák és protiszták (Marchesi és Ravel, 2015, Berg et al., 2020). Halak esetében a mikrobiótát alkotó mikrobaközösségeket nagyfokú diverzitás és variancia jellemzi (Parata et al., 2021). A fágok, vírusok, plazmidok, prionok, viroidok stb. és az elhalt sejtekből származó extracelluláris DNS (az úgynevezett "reliktum DNS") nem tartoznak a mikrobiótához (Dupré és O'Malley, 2010). Annak ellenére, hogy a reliktum DNS nagy mennyiségben kimutatható a környezetben, minimális hatást gyakorol a taxonómiai és filogenetikai diverzitás meghatározására (Lennon et al., 2018). Ezzel szemben a **mikrobiom** már magában foglalja a mikroorganizmusok által termelt molekulák teljes spektrumát, beleértve szerkezeti elemeket (nukleinsavak, fehérjék, lipidek, poliszacharidok), metabolitokat (jelölőmolekulák, toxinok, szerves és szervetlen molekulák), minden mozgó genetikai elemet, valamint a reliktum DNS-t. A mikrobiom kifejezést időnként összetévesztik a metagenom kifejezéssel, metagenom alatt azonban kizárólag a mikrobióta tagjainak genom- és génkészletét értjük (Marchesi és Ravel, 2015). A mikrobiótával ellentétben, amelynek tagjait külön-külön is képesek vagyunk vizsgálni, a mikrobiom vizsgálatánál figyelembe kell venni az összes tagot, amelyek kölcsönhatásban állnak egymással, egy az életük és ezáltal közösen töltik ki az adott ökológiai niche-t (1. ábra).



1. ábra: A mikrobiom összetétele (saját ábra)

2.3 A mikrobiom vizsgálatok szerepe a konzervációbiológiában

A konzervációbiológia, avagy természetvédelmi biológia célja az emberi tevékenység fajok populációira, társulásokra és ökoszisztémákra gyakorolt hatásainak vizsgálata. Ezek mellett olyan gyakorlati módszerek kidolgozását tekinti feladatának, amelyekkel megakadályozható a biodiverzitás (további) csökkenése, illetve megőrizhetőek az élet-, és szaporodóképes, genetikailag változatos populációk ([http:1](http://1)). Sajnos az antropogén tevékenységek világszerte a biológiai sokféleség drámai csökkenéséhez vezettek, ami veszélyezteti az ökoszisztémák működését és a környezeti változásokkal szembeni ellenálló képességüket (Cardinale et al., 2012). Az elmúlt években megnövekedett a mikrobiommal kapcsolatos kutatások száma, melyekből kiderül, hogy a gazdaszervezethez kapcsolódó mikrobiális közösséget drasztikusan képesek megváltoztatni a környezetben fellelhető antropogén hatások. A természetvédelmi szakértők a földhasználatban bekövetkező változásokat, a környezetszennyezést, az éghajlatváltozást és a fertőző betegségek terjedését nevezték meg a bolygónk biológiai sokféleségét veszélyeztető problémaként (CBD, 2010). A földhasználat változása elsősorban a táplálkozási mechanizmusokon keresztül változtathatja meg az emésztőrendszer mikrobiomját a degradált élőhelyeken a táplálék elérhetőségének, minőségének vagy összetételének megváltozása révén. A szakirodalomban számos publikáció fellelhető, amely bizonyítja e veszélyek közvetlen hatását a vadon élő állatpopulációkra. A legújabb kutatások kimutatták, hogy ugyanezek az antropogén tényezők közvetve befolyásolhatják a gazdaszervezetek egészségét azáltal, hogy megváltoztatják a hozzájuk kapcsolódó mikrobiális közösségeket (Krynak et al., 2017; Xia et al. 2018; Fontaine et al., 2018). Konkrét példaként említhető, hogy az erdőirtások során nagy területek kerülnek monokultúrás növénytermesztés alá Mexikóban, ahol a fekete bögőmajmok (*Alouatta pigra*) emiatt kevésbé változatos és rosszabb minőségű táplálékhoz jutnak, mint a folytonosan erdővel borított területeken élő társaik (Amato et al., 2013). A mikrobiális emésztéshez rendelkezésre álló szubsztrátok változatosságának hiánya magyarázhatja a bél mikrobióta változatosságának egyidejű csökkenését, amit ezeknél az állatoknál megfigyeltek (Amato et al., 2013).

A degradált élőhelyek és a folyamatos antropogén jelenlét fokozott stresszhatást válthat ki az állatokból, ami szintén befolyásolja a gazdaszervezethez kötődő mikrobiális közösség összetételét. A környezetben megjelenő szennyező anyagok szintén hatással lehetnek a gazdaszervezethez kapcsolódó mikrobaközösségre azáltal, hogy az eredetileg ott élő baktériumfajokat kiszorítják azok, melyek képesek ellenállni a toxikus anyagoknak való kitettségnek. Savas bányavízzel szennyezett élőhelyeken élő békák bőréről nyert baktériumok

például szignifikánsan nagyobb toleranciát mutattak, amikor laboratóriumban mérgező szennyvízzel stresszelték őket, mint a több, nem szennyezett referenciahelyen élő békák bőréről izolált baktériumok (Costa et al., 2016).

A környezeti szennyezések közvetlen képesek befolyásolni a gazdaszervezet egészségét azáltal, hogy káros hatásuk révén eltűnhetnek a funkcionálisan hasznos mikroszervezetek a mikrobiomból. Az éghajlatváltozás (hőmérséklet-növekedés, savasodás stb.) hatással van a környezetben megtalálható mikrobiális közösségekre, ami közvetlenül befolyásolhatja a gazdaszervezetek kolonizációjához rendelkezésre álló mikrobiális rezervoárokat (Zogg et al., 1997; Fields et al., 2005). Emellett ezek a hatások közvetve is megváltoztathatják a gazdaszervezethez kapcsolódó mikrobiális közösségeket a gazdaszervezet fiziológiájára gyakorolt hatásukon keresztül. Ahogy a korallokat a felmelegedő és a savasodó tengerek miatt stresszhatás éri, úgy antibakteriális vegyületeket szabadíthatnak fel, melyek hatással lehetnek a hozzájuk kapcsolódó mikrobiális közösség összetételére (Geffen és Rosnberg, 2005). A szalamandra bél-mikrobiomjában Fontaine és munkatársai (Fontaine et al., 2018) a védőbaktériumok mennyiségének egyidejű csökkenéséről és a potenciálisan kórokozó patogének mennyiségének növekedéséről számoltak be a hőmérséklet-emelkedés hatására.

A környezetben bekövetkező változások nem feltétlen járnak a jótékony hatású baktériumok elvesztésével, de előidézhetnek azoknál funkcióbeli változásokat. Többek között igazolt, hogy a kétéltűek bőrén lévő védelmi szerepet betöltő mikrobák magas hőmérsékleten elveszítik a *Batrachochytrium dendrobatidis* patogén gombával szembeni növekedésgátló képességüket (Muletz-Wolz et al., 2017). Emellett a hőmérséklet nem csupán a mikroba sejtek enzimatisz aktivitásának gyorsító-lassító modulációjáért felelős, hanem hatással van a membránhoz kötődő funkciókra, továbbá indukálhatja a bakteriális génexpresszió megváltozását (Schumann, 2012).

2.4 A halak mikrobiomja

A halak esetében más élőlényekhez hasonlóan a mikrobiom jelentős hatást gyakorol az emésztésre, a tápanyaghasznosulásra, az anyagcseretermékek képződésére, illetve az egyedek normál fejlődésére, immunrendszerére és általános egészségügyi állapotára (Dawood, 2021; Parata et al., 2021). Összességében elmondható, hogy egy egészséges hal mikrobiótája jellemzően magasabb diverzitást mutat, mint a fertőzött egyedké (Li et al., 2017). A halakat a szárazföldi élőlényektől eltérően folyamatosan, teljes életciklusuk során körülveszi az a vízi közeg, amiben élnek, emiatt esetükben nagyobb a környezetből érkező veszélyeknek való kitettség (kórokozók, szennyező anyagok). A mikrobiomot alkotó mikrobaközösségek

összetételét, komplexitását és dinamikáját nagymértékben befolyásolja tehát a vízminőség és a gazdaszervezet táplálkozásformája.

A **halak kültakarója** (nyálkaréteg), kopoltyúja és emésztőrendszere közvetlen kapcsolatban áll az egyed környezetével, így a vízi élettér mikrobiális közössége és a bőrt, illetve kopoltyút fedő nyálkarétegben megtalálható mikrobák között sok hasonlóságot tapasztalhatunk (Austin, 2006). A patogén mikroorganizmusok elleni küzdelem érdekében a halak testét fedő, összefüggő nyálkaréteg fizikai, kémiai és biológiai „barrier”-ként szolgál a hal és környezete között. A nyálkarétegben megjelennek különböző glikoproteinek, fehérjék, ionok, zsírok és fehérjék, a védekezésben pedig szerepet játszanak különböző antimikrobiális faktorok pl. immunglobulinok, agglitininek, lektinek, lizozimek és további enzimek is (Uribe et al., 2011; Brinchmann, 2016). A kültakaró nyálkarétege emellett szénben gazdag, melyet a patogének elleni küzdelemben résztvevő kommenzalista mikroorganizmusok képesek tápanyagként hasznosítani (Hansen és Olafsen, 1999; Merrifield és Rodiles, 2015). A bőr nyálkahártyája ugyanakkor nem csupán barrier, hanem a kórokozók egyik expozíciós kapuja, mivel könnyen kialakulnak a felületén biofilmek, melyek kedvező mikrokörnyezetet biztosítanak a különböző baktériumok számára (Benhamed et al., 2014). Ennek köszönhetően kommenzalista és kórokozó mikroszervezetek általában együttesen alkotják a halak bőrének mikrobiótáját, a patogén mikrobák azonban nem minden esetben váltanak ki megbetegedést. A kommenzalista közösség egyensúlyának eltolódása azonban hatással lehet a patogenitás kialakulására (Stecher et al., 2013; Montalban-Arques et al., 2015; Moya és Ferrer, 2016). Az egyensúly eltolódását előidézhetik a környezeti változások (pl. váltakozó évszakok) vagy a már említett antropogén hatások (vízkémiai paraméterek, klímaváltozás, gyógyszermaradványok, antibiotikum szennyezettség). Emellett egy elsődleges patogén által okozott fertőzés is hozzájárulhat további (másodlagos) kórokozók elszaporodásához a gazdaszervezeten, mivel fertőzési kaput nyit számukra (Llewellyn et al., 2017).

A **halak kopoltyúja** többfunkciós szerv, amely fontos szerepet játszik a táplálkozásban (planktonevők esetében), a gázcserében, az ionegyensúly fenntartásában, a sav-bázis egyensúly szabályozásában és a nitrogén kiválasztásában (Elif-Kaval et al., 2018). A kültakaró nyálkarétegét és a kopoltyút kolonizáló mikrobák esetében is egyöntetűen az aerob mikroszervezetek dominanciája jellemző (Merrifield és Rodiles, 2015). A két szerven eltérő összetételű mikrobaközösség található meg (pl. kültakarón: *Actinobacteria*, *Firmicutes* fajok, kopoltyún: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* szervezetek). A kopoltyú felületén nagyobb számban kimutathatók mikrobák, melyek valószínűsíthetően szerepet játszanak a gázcsere megfelelő

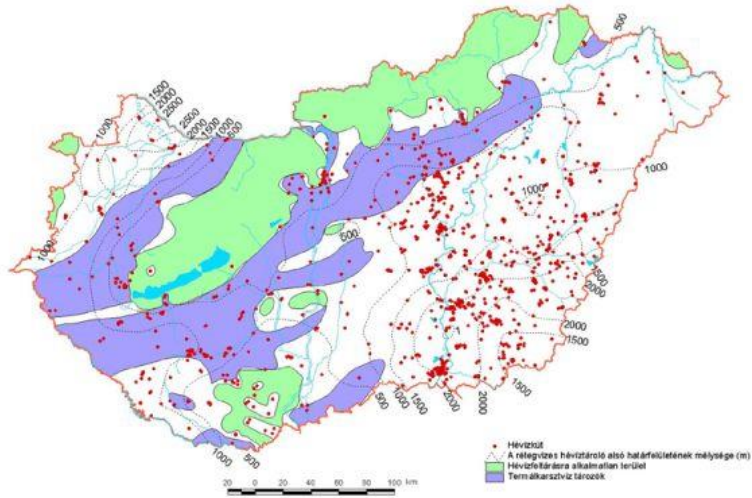
működésében (Wang et al., 2010; Lowrey et al., 2015; van Kessel et al., 2016). A környezetben bekövetkező változások pl. tápanyagtartalom, víz hőmérséklet, évszakok váltakozása stb. mind hatással vannak a halakat kolonizáló mikrobiális közösségekre (Bentzon-Tilia et al., Zarkasi et al., 2016). Nagyban befolyásolják a kültakarón és bélrendszerben megtalálható mikrobaközösség összetételét a közegre jellemző fiziko-kémiai paraméterek, így a víz pH értéke leginkább a kopolyút kolonizáló mikroszervezetekre hat szelektíven (Sylvain et al., 2016).

A **bélmikrobiom** kritikus szerepet játszik számos alapvető folyamatban, beleértve a bélszakaszok normál fejlődését, a tápanyagok emésztését, a vitaminszintézist, a kórokozókkal szembeni ellenállást és az immunmodulációt (Zhang et al., 2018). Megfigyelték, hogy a különböző bélszakaszok nemcsak eltérő funkciókat látnak el, hanem az enzimaktivitásukban, az oxigénkoncentrációjukban és a pH-értékükben megfigyelhető különbségek miatt eltérő mikrobiom összetétellel is rendelkeznek (Deguara et al., 2003; Solovyev et al., 2018). A halak emésztőrendszerében megközelítőleg 500 különböző baktériumfaj található, melyek között főként heterotróf és anaerob mikroorganizmusok vannak jelen (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* és *Firmicutes* fajok) (Merrifield és Rodiles, 2015; Montalban-Arques et al., 2015; Wang et al., 2018). A bélrendszer mikrobiótáját alkotó mikrobaközösséget elsődlegesen a fajokra jellemző táplálkozási stratégia befolyásolja (De Bruijn et al., 2018). A növényevő, mindenevő, ragadozó és a speciális vegyes plankton fogyasztó taxonok béltraktusában megtalálható közösségek között számottevő a különbség. A mindenevő és ragadozó életmódot folytató halfajok esetében nagyobb számban voltak kimutathatók *Fusobacteria* fajok, míg a plankton fogyasztók esetében inkább a *Cyanobacteria* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok jelentek meg magasabb arányban (Givens et al., 2015; Liu et al., 2016).

A halakat kolonizáló gombákról jelenleg igen hiányos ismeretekkel rendelkezünk (de Bruijn et al., 2018), azonban kopolyúrról származó izolátumokról már leírták a tömlősgombák (*Ascomycota*) törzsét, míg az emésztőrendszerben a tömlősgombák mellett a bazídiumos gombák (*Basidiomycota*) is azonosításra kerültek (Gatesoupe, 2007; Romero et al., 2014). Ezenkívül kopolyúrról és bélrendszerből kimutathatók archeák, állati egysejtűek, egysejtűes csillósok, melyek közül számos egysejtű (pl. *Ichthyophthirius multifiliis*, a darakór okozója) kifejezetten káros hatással bír a halak egészségügyi állapotára (de Bruijn et al., 2018).

2.5 Speciális élőhelyek Magyarországon

Az élő szervezetekre, valamint társult mikrobaközösségekre jelentős hatást gyakorol, ha egyedi ökológiai élettérben találják meg életfeltételeiket. A Pannon Biogeográfiai Régió, azaz a Kárpát-medence sajátos geológiai adottságainak köszönhetően

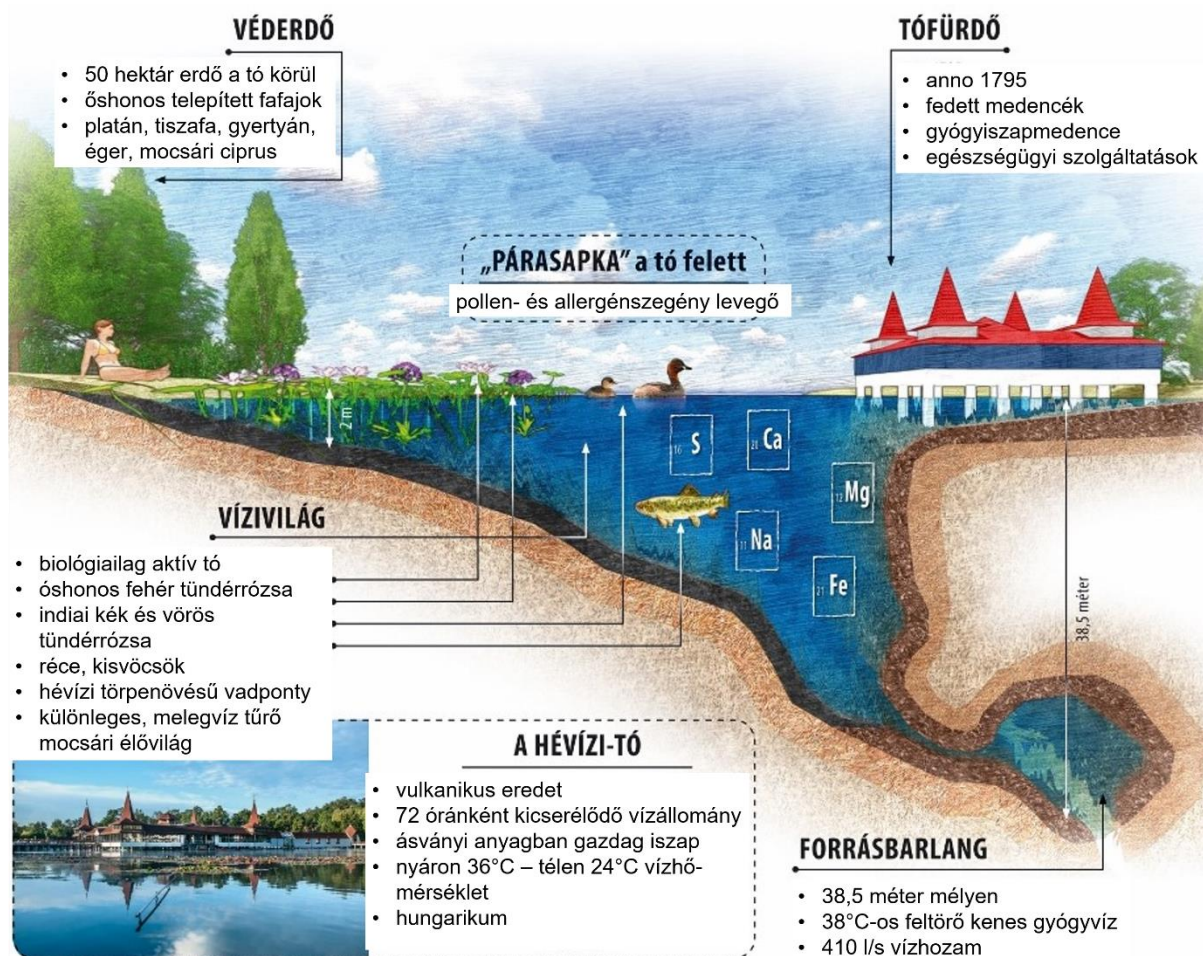


(vékony földkéreg, nagy 2. ábra Magyarország hévíztárolói. (Forrás: Györi et al., 2013) mennyiségű törésvonal) számos meleg víző forrással rendelkezik (2. ábra) (Less, 2011). Ezeken az élőhelyeken stabil, de sajátos környezeti viszonyok alakultak ki, emiatt pedig egyedülálló, azonban rendkívül sérülékeny élővilág jellemzi őket. A források környezetében formálódott sajátos környezeti körülményeket biztosító biotópokban olyan jellegzetes vízi élőlényközösségek alakulhattak ki (Sümei et al., 2012), melyek hosszútávú megőrzése a természetvédelem kiemelt feladata. A hosszú idő alatt kialakult élőlényközösségeket számos veszély fenyegeti. Az első és legfontosabb degradációs tényező a hőforrások vízgyűjtőjének a túlhasználata és bányászása, ami magának a hőforrásnak az elapadását, ezáltal pedig az ott élő állat- és növénytársulások eltűnését okozhatja (Müller, 2014). A másik erőteljes beavatkozás a trópusi, melegkedvelő fajok szándékos vagy véletlen betelepítése, mivel ezek a fajok kompetíciójukkal vagy ragadozásukkal az őshonos élőlények kipusztulását okozhatják, ezzel pedig indukálhatják az eredeti élőlénytársulások visszafordíthatatlan átalakulását (Takács et al., 2015).

2.6 A Hévízi-forrástó bemutatása

A Hévízi-forrástó (3. ábra) a Kárpát-medencében, Magyarország Nyugat-Dunántúli régiójában, Zala vármegye keleti részén, Keszthely északnyugati szomszédságában, a megyeszékhely Zalaegerszegtől 35 kilométerre keletre és alig 10 kilométerre a Balatontól található. A Hévízi-tó a Balaton-felvidéki Nemzeti Parkhoz tartozó Hévízi-tó Természetvédelmi Területen található, mely 60 hektáron terül el. A tó felszíne ebből mindössze 4,4 hektár nagyságú, a terület nagy részét véderdő borítja. A világon egyedülálló természetes tőzegmedrű forrástó mintegy 20-22 ezer évvel ezelőtt, a Balatonnal egyidejűleg alakult ki. A

Hévízi-forrástó egy természetes termálkarszt-forrás felett jött létre. A tó vízfelülete 46 350 m², térfogata 127 950 m³.



3. ábra: A Hévízi-tó sematikus ábrája, <http:3> alapján

A forrásbarlang forrásai szüntelenül táplálják a tó vizét. Az ovális, tölcsér alakú tó 38,5 méter mély alapján nyíló forrásbarlangja a Dunántúli-középhegység egyik nagy felszín alatti áramlási rendszerének hegységperemi feltörési helye. Mindkét forrás a Keszthelyi-hegység nyugati szegélyén egy észak-déli csapásirányú szerkezeti vonal mentén fekvő dolomitkarsztból származik (<http:2>). A 14 méter magas és 17 méter átmérőjű egytermes barlangban, melyet csupán egy iszapnyereg oszt ketté, a meleg és hideg források vize keveredik egymással. Innen ered a tavat tápláló termálvíz: a barlang nyugati oldalán 41°C-os víz tör fel a mélyből, mely megközelítőleg az összes forrásvíz 90%-át teszi ki, a visszamaradó 10%-ot pedig a keleti oldalon felbukkanó 26°C-os víz alkotja. A barlang járatán távozó kevert víz hőfoka 38°C-os (Plózer, 1975). A tó vizének utánpótlása jelenleg mintegy 30-40.000 liter/perc, melynek köszönhetően a tó teljes vízkészlete 72 óránként maradéktalanul megújul. A tó vize északon az északi-lefolyón keresztül az Ó-Berek-csatornába, délen a Hévízi-lefolyóba ömlik, azt követően befogadja a Zala folyó, végérvényesen pedig a Balatonba érkezik (<http:2>). A legmélyebb

ponttól (38,5 m) eltérően a tó átlag vízmélysége mindössze 1,5 m. A víztest átlaghőmérséklete évszakonként eltér, télen 24-26°C, nyáron pedig 33-36°C között ingadozik. A tavat és környezetét a 19/1993. KTM rendelettel természetvédelmi területté nyilvánították, jelenlegi kiterjedését pedig a 23/2006. KvVM rendelettel szabályozták (Várkonyi et al., 2018).

A tó gyógyvizéből egyszerre kimutathatók szénsavas és kénes anyagok. Kalciumban, magnéziumban, hidrogén-karbonátban és gáznemű anyagokban gazdag, ezenkívül radon tartalma ugyancsak kimagasló. A tó gyógyító hatása és reduktív kolloid kéntartalma a vízben megtalálható kénbaktériumoknak és a tőzegből kiváló finomszemcsés részeknek, illetve azok keveredésének köszönhető. A baktériumok a tó élővilágának meghatározó elemei, számtalan csoportjuk kimutatható a vízből. A tó sajátos képződményei a bakteriális bevonatok, azaz biofilmek, melyek a kráterek falán 1,5 m mélységtől, akár a forrásbarlang kezdetéig is megjelenhetnek. A biofilmképző mikroszervezetek a kénbaktériumokkal közösen jelentős szerepet játszanak a tó természetes anyagcseréjében (Várkonyi et al., 2018).

A forrástó planktonikus és üledékből izolált mikrobaközössége 2013-2015 között felmérésre került klasszikus tenyésztéses és (nem újgenerációs) molekuláris biológiai módszerekkel. A vizsgálati eredmények alapján leírásra került, hogy a planktonikus mikrobiális közösség tagjait az édesvizekre jellemző törzsek alkotják (*Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Alpha*-, *Beta*- és *Gammaproteobacteria*), melyek között az aerob és fakultatív anaerob heterotrófok a leggyakrabban kimutathatók (Krett et al., 2016). Az üledék esetében a tenyésztéses és molekuláris módszerekkel elvégzett vizsgálatok adatai alapján nagy számban kimutathatók a *Bacillus* (*Firmicutes*) mikroorganizmusok (Krett et al., 2013). Az összeállított klónkönyvtárak alapján a *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Deferribacteres*, *Spirochaetes*, *Nitrospirae* és *Verrucomicrobia* phylumok kerültek kimutatásra, melyek közül a *Gammaproteobacteria* és *Cyanobacteria* fajok dominanciája volt jellemző. A jelenleg elérhető tudományos publikációk alapján újgenerációs szekvenálással gyűjtött adatok a tó mikrobiális közösségéről még nem ismertek.

A Hévízi-forrástó extrém magas hőmérséklete és jellegzetes kémiai összetétele egy egyedülálló biológiai halközösség kialakulását tette lehetővé, mely jól látható a halállomány összetételében és az egyes fajok viselkedésében (Bíró et al., 2002; Specziár, 2004). Jelenleg csupán néhány halfaj önfenntartó állománya található meg állandó jelleggel a tóban, a szűnyogírtó fogasponty (*Gambusia holbrooki*), a szivárványsügér (*Archocentrus multispinosus*), a bíborsügér (*Hemichromis guttatus*), a naphal (*Lepomis gibbosus*) (Lökkös et al., 2016) és az őshonos törpenövésű vadponty (*Cyprinus carpio carpio morpha hungaricus*).

Ezen kívül alkalomszerűen a lefolyócsatornákon keresztül megfigyelhető a tóban egyes idegenhonos halfajok inváziószerű megjelenése pl. az ezüstkárászé (*Carassius gibelio*) (Várkonyi et al., 2018). A feltörő 38°C-os víz rendkívül kivételes növény, valamint állatvilágot teremtett a Hévízi-tóban, illetve az azt körülvevő védett véderdőben egyaránt.

A Hévízi-tó jelenleg rekreációs célú használatban van. A tó vize méltán híres a gyógyhatásáról, hiszen egyszerre vannak jelen benne a szénsavas és kénes anyagok, gazdag kalcium- és magnézium-, valamint hidrogén-karbonát-tartalma mellett kismértékben radont is tartalmaz. Oldott és gáznemű formában is megtalálhatók benne a gyógyhatású anyagok, ezért a mozgásszervi megbetegedésben szenvedőknek hatékony gyógyulási lehetőséget biztosít. A gyulladáscsökkentő kalcium és az idegcsillapító magnézium, az értágító szénsav gyógyhatásai mellett a karbonát jótékony hatással bír a bőrfelületre. A hévízi gyógyiszap ásványi anyag összetétele, jó hőtartó képessége és egyéb fizikai tulajdonságai miatt kiválóan alkalmas reumatikus, degeneratív mozgásszervi betegségek, egyes nőgyógyászati megbetegedések, meddőség, valamint műtétek utókezeléseként alkalmazásra (http:3). A tó Magyarország egyik leglátogatottabb gyógyfürdője mind hazai, mind nemzetközi viszonylatban - 2019-ben a településen rekord számú (1,233 millió) vendégéjszakát könyveltek el. Ebből következnek, hogy a tó és annak élővilága igen intenzív antropogén hatás alatt áll.

2.7 A hévízi törpenövésű vadponty bemutatása

Európában a közönséges pontyot (*Cyprinus carpio*) a középkor óta háziasítják. A tenyésztett fajták feltehetően a Duna mentén található vad populációkból származnak. Ezek a vad populációk jelenleg a természetben a Fekete-, Kaszpi- és Aral-tengerbe ömlő folyókban találhatók. Az őshonos törpenövésű vadpontyot (4. ábra) – mely valószínűsíthetően a dunai vadpontyból eredeztethető - több magyarországi termálvízű forrás környezetében elsőként Herman Ottó írta le 1887-ben (Müller et al., 2024).

Jelenleg a pontyváltozat egyetlen fennmaradt állománya a Hévízi-tóban található, emiatt egyedei feltételezhetően sajátos genetikai tulajdonságokkal és tűrőképességgel rendelkeznek.

Ez a populáció egy elszigetelt, önfenntartó és stabil állományt alkot a tóban, mely a képes volt alkalmazkodni az ott uralkodó szélsőséges hőmérsékleti és kémiai viszonyokhoz. A pontyváltozatot – vélhetően az extrém körülményekhez való alkalmazkodás kényszere miatt – törpenövésű egyedek alkotják (Müller et al., 2022). A törpenövésű egyedek akár több, mint 7 évig is élhetnek, méretük azonban ritkán haladja meg a 25 cm-es átlaghosszúságot és az 500 g-os testtömeget, míg a normál



4. ábra: Hévízi törpenövésű vadponty (*C. carpio carpio morpha hungaricus*) egyedek, saját fotó, 2023

pontyváltozat egyedei ettől eltérően 7 éves korban már 60 cm hosszúságúak és testsúlyuk átlagosan 10 kg (Specziár, 2010). A 12-17 cm-nél hosszabb és 1-2 éves kort betöltött halak mind ivarérettek és nem mutatnak az alultápláltságra vagy betegségekre utaló jeleket, noha a tó táplálékforrásai igen szűkösek (Ponyi, 2002). Ezért az itt élő halak szokatlanul nagy mennyiségben detritusszal táplálkoznak, azaz a vízfenéken felhalmozódó vagy vízben lebegő finom üledékkel, mely általában növényi szervesanyagok bomlásából eredeztethető. Müller és munkatársai leírták, hogy a Hévízi-tó önfenntartó törpe pontyállománya 2-4 évvel korábban, azaz egyéves korban ivarérik és 1-3 hónappal korábban, február és április között, 27-30 °C-os víz hőmérsékleten ívik, mint a normál pontyváltozat, mely jellemzően 4-5 éves korára válik ivaréretté, ívásuk pedig kora tavaszi és nyári hónapokban, 17-20 °C-os vízben zajlik (Horváth és Urbányi, 2000, Müller et al., 2024). A Hévízi-tóban megtalálható pontyok a tó sekélyebb részén ívnak, ahol a meder megközelítőleg 1,8 m mélységű. Az indiai vörös tündérrózsa hosszúvirágú alfajának (*Nymphaea ruba var. longiflora*) levélfonákján, illetve a parti övben megtalálható fonalas zöldmoszatban (*Cladophora*) fedezték fel a fejlődő embriókat rejtő ikraszemeket. A sikeres téli ívást az összegyűjtött ikrákból származó lárvák keltetőházi felnevelésével és in situ indukált szaporítással igazolták a vizsgálat során (Müller et al., 2024).

A törpenövésű pontyváltozatra minden bizonnyal hatással van a Hévízi-tó intenzív turisztikai terhelése: a magas látogatószám következtében a tóba kerülhetnek különböző gyógyszermaradványok, közöttük antibiotikumok is. A biológiailag aktív

gyógyszerhatóanyagok (Pharmaceutically active compounds, PhACs) ökológiai hatásai szerteágazók: igazoltan elváltozásokat okozhatnak a halak viselkedésében (Porseryd et al., 2017) testalakjában és pikkelymorfológiájában (Staszny et al., 2021), valamint szelekciós hatással lehetnek a tavat, illetve az abban élő állatokat kolonizáló mikrobiális közösség összetételére. Mérésükre lehetőség van kémiai analitikai vizsgálatokkal.

Emellett mikrobiológiai szempontból az antropogén hatások igazolására alkalmas lehet a terhelés alatt álló közegben, valamint a vadvilágban kimutatható antimikrobiális rezisztencia gének és rezisztens mikroszervezetek azonosítása, ahogyan arra Brealey és munkatársai (2021) kutatásai, valamint Ramey (2021) rávilágítottak.

2.8 Antibiotikum-rezisztencia a környezetben és vadvilágban

2.8.1 Antibiotikum-rezisztencia és rezisztencia gének

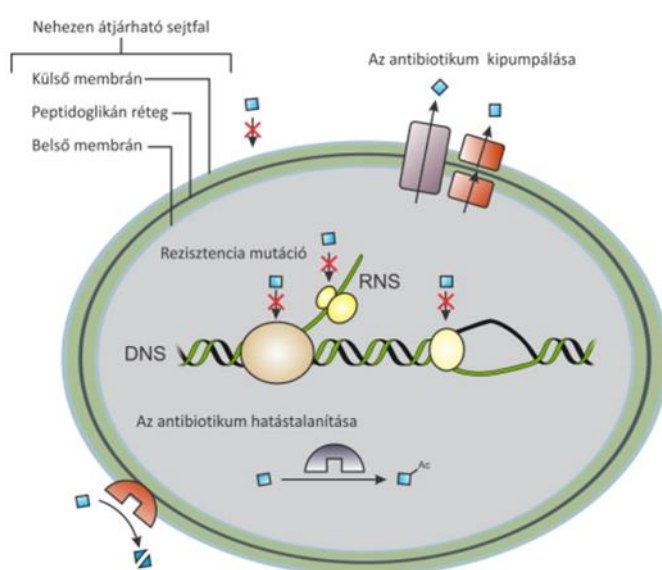
Az antibiotikumok speciális kockázati profillal rendelkező gyógyszerek, mivel nem megfelelő alkalmazás során a célszervezetek (elsősorban baktériumok) körében rezisztenciát, avagy ellenállóképesség kialakulását okozhatják (Wright, 2010). Amennyiben egy mikroorganizmus egy bizonyos antibiotikum hatásával szemben nem mutat ellenállóképességet, továbbá, ha nem rendelkezik sem horizontális géntranszfer útján szerzett, sem kromoszómális mutáción alapuló rezisztencia mechanizmussal (Martinez, 2014), akkor fennáll az antibiotikum érzékenység. Ezzel szemben antibiotikum-rezisztenciának nevezzük a természetes, vagy szerzett ellenállóképességet egy adott antimikrobiális szer hatásával szemben. Egy baktérium természetes módon, szervezeti felépítéséből adódóan is rendelkezhet rezisztencia génekkel, melyek ellenállóvá teszik egyes antibiotikum hatóanyagokkal szemben. Szerzett antibiotikum rezisztencia esetében a mikroszervezetek képesek mobilis genetikai elemeken kódolt rezisztencia géneket egymás között géntranszfer útján, nem csak faj-, hanem nemzetség szintjén továbbadni (Losonczy, 2001). Állatok és emberek antibiotikumos kezelése során a baktériumok genetikai állományában történő mutációk hatására szintén kialakulhat antibiotikum rezisztencia, mely rögzülhet a mikroszervezet genomjában (Woodford és Ellington, 2007). A környezetben ilyen erős szelekciós nyomás a kórokozókra ritkábban hat (Larsson és Flach, 2022).

Az antibiotikumok széles körű alkalmazása szelekciós nyomást gyakorol mind a kezelt szervezetekben, mind a környezetben jelenlévő baktériumokra az antibiotikum-rezisztencia gének (továbbiakban: ARG-k) megszerzésében és fenntartásában. Az ARG-k a DNS intracelluláris (iDNS) és extracelluláris (eDNS) frakciójaként egyaránt jelen vannak a

környezetben (Mao et al., 2014). Fontos megjegyezni, hogy az eDNS az iDNS-ből az elhalt baktériumsejtek lízise és az élő baktériumsejtek aktív szekréciója során keletkezik (Zhang et al., 2019). Az iARG-ek és eARG-ek gyakorisága és diverzitása különböző környezetben jelentősen eltérhet. Az iARG leginkább az uralkodó forma a baktériumok növekedését támogató, tápanyagban gazdag környezetben, például hulladékáramokban, míg az eARG nagyobb mennyiségben vannak jelen a talajban az üledékekben és a vízi közegekben, ahol gyakori a tápanyaghiány (Barnes et al., 2014; Mao et al., 2014). Az antibiotikum-rezisztencia átvihető vertikális géntranszfer (VGT) és horizontális géntranszfer (HGT) révén (Normark és Normark, 2002). Az iARG-ek horizontális átvitele konjugáció és transzdukció útján történhet, míg az eARG-ek túlnyomórészt természetes transzformáció útján terjednek (Miller et al., 2016). Korábban alábecsülték a természetes transzformáció hatását az antibiotikum-rezisztencia terjedésében, de a legújabb tanulmányok kimutatták, hogy ez az átviteli mechanizmus fontos szerepet játszik az ARG-ek környezetben való elterjedésében (Zhang et al., 2018). Az ARG-ek a következő kategóriákba sorolhatók az antibiotikumok azon hatóanyagcsoportja alapján, amellyel szemben rezisztenciát mutatnak: tetraciklinek (*tet*), szulfonamidok (*sul*), β -laktámok (*bla*), makrolidok (*erm*), aminoglikozidok (*aac*), fluorokinolonok (*fca*), colistin (*mcr*), vankomicin (*van*) és multidrog (*mdr*) (He et al., 2020). Ezek közül az európai felszíni vizekben megtalálható, (tisztított) szennyvízhez köthető ARG-ek leginkább a *sul*, *bla* és *mcr* gének, melyek az esetek többségében szerzett ARG-ek (Cacace et al., 2019).

2.8.2 Antibiotikum-rezisztencia mechanizmusok

Az antibiotikum-rezisztenciának négy típusa ismert (5. ábra). Egyik típusa, amikor az antimikrobiális szer képtelen megkötődni a mikroorganizmus sejtmembránján vagy nem képes azon átjutni. Más esetben ugyan bejut az antibiotikum a baktériumsejtbe, azonban efflux pumpák túlműködtetésével a mikroszervezet képes kipumpálni azt a sejtmembránon kívülre. Harmadik változata, amikor az antibiotikum bejut a baktériumba, viszont a célhelyen bekövetkező sejszintű változás következtében nem tudja ott kifejteni a hatását. Negyedik



5. ábra: Az antibiotikum-rezisztencia kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok Gram-negatív baktérium esetében (Forrás: Allen, 2010)

típusa, amikor a baktériumsejt antibiotikum-specifikus enzimek segítségével megemészti azt, így hatékonyságát veszti (Fernández és Hancock, 2012).

Jelentős egészségügyi kockázatot jelent világszerte a többszörös rezisztenciát mutató (multirezisztens – multidrug resistant (MDR), kiterjedt rezisztenciával rendelkező – extensively drug resistant (XDR), pánrezisztens – pan drug resistant (PDR)) mikroszervezetek folyamatosan növekvő ellenállóképessége az antimikrobiális szerekkel szemben, hiszen az eddig jól bevált antibiotikumok (széles spektrumú penicillinek, karbapenemek, aminoglükozidok stb.) sok esetben hatásukat veszítik a patogén kórokozókkal szemben. A **multirezisztens** mikroorganizmusok leggyakrabban olyan fertőzőes megbetegedéseket okozó „szuperbaktériumok”, amelyekkel szemben egyidejűleg egynél több antibiotikum hatóanyagcsoport is hatástalan (Magiorakos et al., 2012), emiatt megnehezül a fertőzések kezelése, esetenként pedig lehetetlenné válhat. A multirezisztens mikroszervezetek leginkább kórházban kezelt vagy bentlakásos intézményekben ápolott emberekre jelentenek veszélyt, ennek ellenére egészséges felnőttekben és gyermekekben is okozhatnak fertőzést ([http:4](http://4)). Azok a mikroszervezetek, melyekre a **kiterjedt rezisztencia** jellemző, egy vagy két hatóanyagcsoport kivételével minden antimikrobiális szerre rezisztensek (Horcajada et al., 2008). A **pánrezisztens** baktériumok által okozott fertőzések kezelése a legnehezebb, hiszen ezek a mikrobák az összes rendelkezésre álló antibiotikummal szemben képesek ellenállni (Falagas és Bliziotis, 2007).

2.8.3 Rezisztencia a környezetben

A felszíni vizek nélkülözhetetlen erőforrásként szolgálnak az élő szervezetek számára, azonban ez a közeg gyakran antropogén eredetű szennyező anyagok terhelése alatt áll (Vittecoq et al., 2016). Az elmúlt 40 év során a vízi ökoszisztémákban számszerűen kimutathatók az olyan szennyező anyagok, mint a gyógyhatású készítmények (Lee és Arnold, 1983), kozmetikumok, élelmiszerszerek vagy kábítószeres és ezek maradványai (Parida et al., 2021). A vízi ökoszisztémákba jutó gyógyszer-maradványok különböző forrásokból származhatnak: háztartási szennyvízből, kórházi és ipari szennyvízből, állattartásból származó szennyvízből vagy akár az akvakultúrából (Karkman et al., 2018). A szennyező anyagok közül az antibiotikumok környezeti megjelenése különösen nagy aggodalomra ad okot, mivel azok toxikus hatást fejthetnek ki az vízi élő szervezetekre (Danner et al., 2019), emellett pedig szerepet játszanak az antibiotikum rezisztencia és ezáltal a rezisztencia gének környezeti terjedésében (Valiakos és Kapna, 2021). Több publikációban is leírták, hogy az antibiotikum-rezisztenciát nem csak az antibiotikumok képesek kiváltani, hanem a nehézfémek és a

különböző biocidok is (Ramey és Ahlstrom, 2020). Számos tényező befolyásolhatja az antibiotikum-rezisztens baktériumok előfordulását a természetben, azonban a bizonyítékok túlnyomórészt azt a feltevést támasztják alá, hogy legnagyobb mértékben a környezetbe jutó antropogén anyagok járulnak hozzá az antibiotikum-rezisztens baktériumok elterjedéséhez a vadon élő állatok körében. Ezek az állatok jó indikátorai lehetnek a környezetben előforduló antropogén eredetű szennyezéseknek és segíthetnek azok lehetséges pontszerű forrásainak felderítésében (Ramey és Ahlstrom, 2020).

Az antibiotikum-rezisztencia mára egy globális problémává vált, melyet a „One Health” (Egy Egészség) koncepció egyik lényegi kérdéseként kezelnek (Robinson et al., 2017). Az antibiotikumok folyamatos használata az antibiotikum-rezisztencia terjedésének és perzisztenciájának jelentős növekedését eredményezte minden természetesvízi környezetben (Stewart et al., 2008). Környezeti szempontból a bizonyítékok alapján a víz az antibiotikum rezisztencia terjedésének fő helyszíne, ahogy azt a tisztított szennyvízzel terhelt befogadók (Galvin et al., 2010), a folyók (Dhanji et al., 2011), tavak (Hamelin et al., 2006) és tengerek (Zhao és Dang, 2012) vizéből végzett vizsgálatok is alátámasztják. Bár számos vadon élő fajban dokumentáltak antibiotikum-rezisztens baktériumokat, a legtöbb állat még soha nem volt közvetlenül kitéve antibiotikumoknak. Emiatt a már fentebb említett okokból a folyóvizekbe kerülő antibiotikumok és antibiotikum-rezisztens mikroszervezetek a vadon élő állatokban okozhatnak különböző megbetegedéseket. Mindemellett a különböző mikroszervezetek biofilmet alkotva képesek kolonizálni azok testfelületét, így a vándorló életmódot folytató állatok hordozó is lehetnek az antibiotikum rezisztens kórokozóknak és a rezisztencia géneknek.

A szakirodalom előzetes áttekintése alapján megállapítható, hogy kifejezetten a sajátos körülményekkel rendelkező élőhelyeken a mikrobiomot alkotó mikroszervezetek összetételének megváltozása befolyásolhatja egyes fajok eltűnését vagy fennmaradását. Ezeket a változásokat klasszikus mikrobiológiai, molekuláris genetikai módszerekkel deríthetjük fel leghatékonyabban, az antropogén hatások mérésére pedig kémiai analitikai módszerek és indikátor (például antibiotikum rezisztens) mikroszervezetek kimutatásával nyílik lehetőségünk. Hazai viszonyok között – főleg a hévízi törpenövésű vadponty esetében – rendkívül kevés információval rendelkezünk erről a témakörrel, mely hiány pótlása érdekében végeztem el a következő fejezetben részletezett kutatómunkát.

3. Vizsgálati módszerek

A tenyésztési mikrobiológiai vizsgálatokat, az antibiotikum rezisztens mikroszervezetek azonosítását, illetve a rezisztencia gének kimutatást a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetében végeztem. 2021 őszén, még az alapképzésem alatt csatlakoztam a tanszéken folyó projektmunkákba, ezáltal mire sor került a diplomadolgozatom elkészítésére, elsajátíthattam a tervezett vizsgálatok végrehajtásához szükséges különböző laboratóriumi módszereket.

3.2 Mikrobiológiai mintavételezés

A mintavételezés a Hévízi-tóban történt a 2022-2023. években összesen három alkalommal, egyszer a téli időszakban, egyszer nyáron, egy alkalommal pedig tavasszal. Ebből két alkalom a kísérlethez való csatlakozásomat megelőzően történt egy pedig azt követően. A helyszíni mintavétel több okból kifolyólag körülményes tervezést igényelt a kísérlet során, hiszen a Hévízi-tó hazánk egyik legnépszerűbb turisztikai célpontja, így mintavételezés céljából a fürdőhely kizárólag a nyitvatartási időn túl, este 7 órától közelíthető meg. Ezen felül a vizsgálatba vont törpenövésű vadponty populáció létszáma jelenleg bizonytalan, így az egyedek élve fogásának száma nehezen tervezhető előre, valamint a helyszíni mikrobiom mintázás szintén a körülmények által nehezített feladatnak számít. A mintavétel során minden alkalommal segítségünkre volt a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet és az AKI Természetesvízi Halökológia Tanszék több munkatársa is. A mintavétel során az állatjóléti előírások maradéktalanul betartásra kerültek, illetve az endemikus változat vizsgálatához szükséges állatkísérleti engedélyek rendelkezésre állnak. A Balatoni Limnológiai Kutatóintézet két engedéllyel is rendelkezik. Az egyik az Agrárminisztérium által kiállított országos engedély, mely felhatalmazza az kutatóintézet munkatársait arra, hogy Magyarországon bárhol végezhetnek kutatási célra halászati tevékenységet. Védett területen való védett faj lehalászása esetén az előbb említett engedélyhez szükséges még egy kiegészítő engedély. Emellett a kutatóintézet dolgozói rendelkeznek egy teljes körű kutatási és belépési engedéllyel a Balatonfelvidéki Nemzeti Park teljes területére, mely feljogosítja őket különböző fajok, beleértve a halak kifogására és elvitelére egyaránt. A pontyváltozat egyedeinek begyűjtéséhez a tóban állított panelhálók (36*1,5 m/12 panel/EN 14757) kerültek kihelyezésre, melyek felfűzhető motorcsónakon voltak megközelíthetők. A hálók segítségével megfogott egyedeket egyesével fogtuk ki, majd előre elkészített foszfát-puffer sóoldatot (PBS: 8g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na₂HPO₄; 0,24g KH₂PO₄; 1l desztillált víz), illetve aszparaginos dúsító tápoldatot tartalmazó műanyag mintagyűjtő csövekbe steril vattapálca segítségével a kopolyúról, a bőrfelületről, a béltraktus első harmadából, illetve ürülékből gyűjtöttük be a mintákat (törletet,

kaparékot, faecest) a tenyésztési mikrobiológiai vizsgálatokhoz. A mintázott egyedek paraméterei (ivar, testhossz és súly) mintavételkor felvételezésre kerültek, ám célzott leválogatásra nem volt lehetőségünk. A közösségi mikrobiológiai vizsgálatokhoz azonos mintatípusokból, DNA/RNA Shield collection tubes (Zymo Research, USA) segítségével gyűjtöttük be törletet, illetve biológiai mintát. Ezen kívül víz- és üledékmintát is vételeztünk a helyszínen (6. ábra): a mintával előzőleg átmosott teleszkópos edénnyel, amit steril, literes mintavételi üvegekbe mertünk. A mikrobaközösségek izolálásához szükséges vízmintavétel a felszíni vizek megfigyelésének és állapotértékelésének egyes szabályairól szóló 31/2004. (XII. 30.) KvVM rendeletet figyelembe véve és a felszíni vizek és azok üledékének mintavételezésére vonatkozó Magyar és Nemzetközi Szabványoknak megfelelően történt (MSZ 12750-2:1971. Felszíni vizek vizsgálata., MSZ EN ISO 5667-1:2007 Mintavétel felszíni vizekből., MSZ 12739-1:1978. Felszíni vizek üledékének vizsgálata - általános irányelvek., MSZ 12739-2:1978. Felszíni vizek üledékének vizsgálata - mintavétel és a minta előkészítése). A területen helyszíni fizikokémiai vizsgálatokat végeztünk (pH, vezetőképesség, redox-potenciál, nitrát, nitrit,), illetve fizikai paramétereket is feljegyeztünk (levegő- és víz hőmérséklet, páratartalom,



6. ábra: A hévízi-tó vizének mintázása, saját fotó, 2023

légnyomás stb.). Az oldott oxigén koncentrációjának mérését HI 98194 kombinált terepi műszerrel végeztük, ami az oldott oxigén mérésén felül alkalmas pH- érték, redoxpotenciál, vezetőképesség, összes oldott anyag és hőmérséklet mérésére is. A különböző paraméterek mérése érdekében a szonda 3 szenzort tartalmaz (pH, EC, DO). A műszer kalibrációját

egypontos gyorskalibrálással, illetve hagyományos hárompontos kalibrációval is el lehet végezni. Az eszköz -5-55°C között képes mérést végezni. A pH szenzor mérési tartománya 0-13, a vezetőképesség szenzor mérési tartománya 0-200 µS/cm, az oldott oxigén szenzor mérési tartománya 0-50 mg/l. A klorofill-a, a cianobakteriális klorofill és a turbiditás mérése a BBE AlgaeTorch2 algafáklya használatával történt. A műszer pulzáló amplitúdó alapelven működő fluoriméter, amely több hullámhosszon (470, 525, 610, 700 nm) képes detektálni a klorofill-a fluoreszcenciát. Azaz az algák pigmentjeit három különböző színű LED gerjeszti, ezáltal az algák különböző intenzitású vörös fényt bocsátanak ki. A fény intenzitása alapján számítja ki a műszer a különböző algatípusok koncentrációját. A 2023. évi nyári helyszíni mintavétel során általam vizsgált fizikokémiai paraméterek az alábbi táblázatban találhatók:

1. Táblázat: A Hévízi-tó vízmintájának fizikokémiai paraméterei a nyári mintavétel alkalmával (2023.07.04.)	
minta neve:	HÉ-VÍZ
páratartalom:	70%
léghőmérséklet:	23°C
légnymomás (mbar):	1015
szélsebesség:	6 km/h
látótávolság:	14 km
időjárás:	napos
UV-index:	0
megelőző csapadék (mm):	0
víz hőmérséklet:	32,1°C
víz pH:	7,4
vezetőképesség/EC (µS):	816
redoxpotenciál/ORP (mV):	177
oldott oxigén (mg/L):	2,6
klorofill-a tartalom:	19,3
cianobakteriális klorofill:	0
turbiditás:	3

A mintákat a szabványban előírtak szerint, 4°C-os hőmérsékleten szállítottuk a laboratóriumba, ahol azokból további analitikai és mikrobiológiai vizsgálatokat végeztünk.

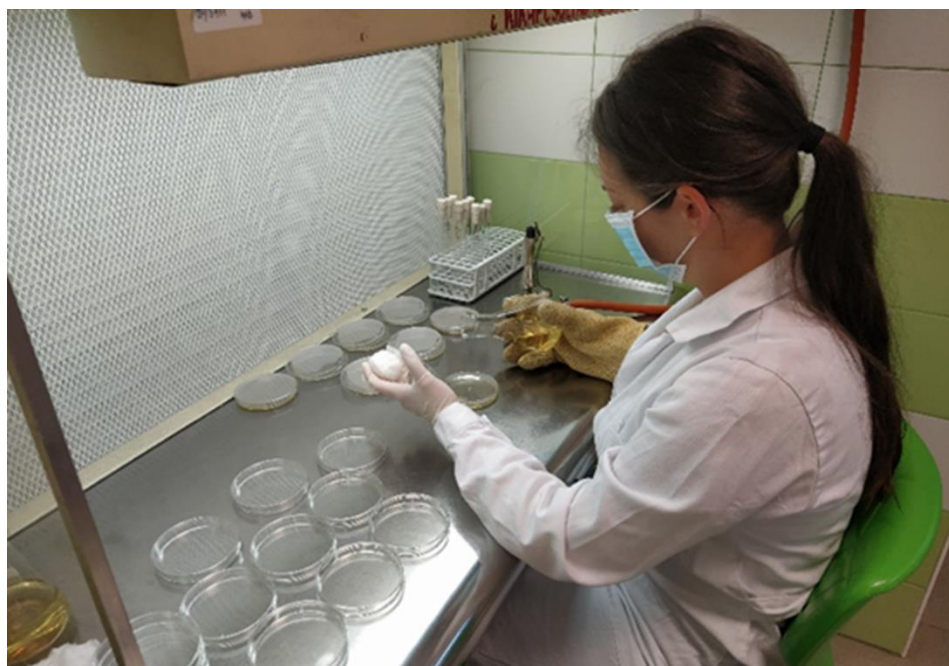
3.3 Gyógyszeranalitikai vizsgálatok

A Hévízi-tó népszerű turisztikai célpont mind hazai, mind nemzetközi viszonylatokban, a nagy látogatószám miatt azonban a tavat folyamatosan intenzív antropogén hatások érik. Mivel a tavat két barlang forrásvíze táplálja, így emberi tevékenységből származó háttérszennyezés nincs, ezért kijelenthetjük, hogy a tóból kimutatható különböző gyógyszermaradványok a tavat rekreációs célokból használó látogatóktól származtathatók. A vízmintákból a gyógyszeranalitikai vizsgálatokat a Eurofins Analytical Services Hungary Kft.

végezte a saját, a NAH által NAH-1-1398/2019 számon akkreditált Környezetanalitikai vizsgálólaboratóriumukban. A vizsgálat során 1290_HPLC_6495C_QQQ készüléket használtak, a méréseket pedig a WBSE-124:2019, illetve az EPA Method 1694:2007 vizsgálati módszerrel végezték. A vizsgálatok során összesen 132 vegyület került elemzésre, közöttük antibiotikumok, antiepileptikumok, antireumás szerek, nikotin és bomléstermékei, H2 hisztamin receptor antagonistá hatóanyagok, hormonok, kardiovaszkuláris szerek, nem-szteroid gyulladáscsökkentők, röntgen kontrasztanyagok, vérnyomáscsökkentők, vizelethajtók és egyéb anyagok (pl. műanyaglágyítók, koffein). A kimutatási határ komponenstől függően $>0,02 \mu\text{g/l}$ és $>0,001 \mu\text{g/l}$ között volt.

3.4 Tenyésztéses mikrobiológiai vizsgálatok

Az előzetes mikrobiológiai vizsgálatok során négy különböző táptalajon (R2A, tripton-glükóz-élesztőkivonat (15g agar, 0.5g élesztőkivonat, 0.5g pepton, 0.5g kazein hidrolizátum, 0.5g glükóz, 0.5g keményítő, 0.3g nátrium-piruvát, 0.3g kálium-dihidrogén-foszfát, 0.024 magnézium-szulfát, 1000ml desztillált víz); TGE-1 (12g agar, 3g élesztőkivonat, 1g glükóz, 5g pepton, 1000ml desztillált víz); Louria-Bertani - LB (16g agar, 10g NaCl, 5g élesztőkivonat, 1000ml desztillált víz) és eozin-metilénkék – EMB (13.5g agar, 10g pepton, 2g kálium-dihidrogén-foszfát, 5g laktóz, 5g szacharóz, 0.4g eozinsárga festék, 0.4g metilénkék, 1000ml desztillált víz)) vizsgáltuk a pontyokról izolált törzsek telepszámát és telepmorfológia alapján a becsülhető diverzitását. Megállapítottuk, hogy a további vizsgálatokhoz a TGE-1 táptalaj a leginkább alkalmas (a táptalajon tapasztalt telepszám és látható telepmorfológiai változatosság



7. ábra Labormunka, saját fotó, 2023

alapján). Annak érdekében, hogy mindhárom mintatípus esetében minél szélesebb körben, minél több baktériumtörzset tudjak izolálni, majd később faj szinten azonosítani, a további tenyésztési mikrobiológiai vizsgálatok ezért már kizárólag TGE-1 táptalajokon történtek (7. ábra).

Első lépésként elkészítettem a laboratóriumba beérkezett környezeti és szövetminták tízes alapú hígítási sorát, melyet TGE-1 agarra szélesztettem, amit 28°C-on 48 órás inkubációs idő követett. Ezt követően telepszám meghatározást végeztem (CFU, colony forming units), majd a táptalajokon felszaporodott mikroszervezetek közül eltérő fenotípusos jegyek alapján kiválasztottam egymástól valószínűsíthetően különböző törzseket, amiket tisztítószélesztéssel elkülönítettem egymástól. Ezt a továbbiakban kétszer is megismételt TGE-1 agarra való tisztítószélesztés követte. A további felhasználásig a folyadékkultúrában felvett baktériumtörzseket 30 v/v %-os glicerinnel elegyítve, -80°C-on, fagyaszttva tároltam.

A tisztítószélesztésen átesett baktériumtörzsek faj szintű azonosításának kezdeti lépése a DNS izolálás overnight kultúrából, melyhez a tisztítványokat 5 ml TGE-1 táptalajban, rázótermosztáton inkubáltam 28°C-on 110 rpm (round per minute) fordulatszámon, 18± órán keresztül. Az inkubációs idő leteltét követően 1400 µl folyadékkultúrát steril Eppendorf csőbe mértem, majd maximális fordulatszám mellett Eppendorf MiniSpin mikrocentrifuga segítségével 3 perc alatt lecentrifugáltam. A felülúszó fázis eltávolításával nyert bakteriális pelletet ezt követően mikrohullámmal kezeltem a sejtek feltárása érdekében (3 perc maximális teljesítményen, majd 2 perc szobahőmérsékletű inkubációt követően 1 perc ismétlés). A kezelést követően 50 µl MQ víz segítségével a pelletet reszuszpendáltam, majd ismételt centrifugálást követően a felülúszó fázisban lévő DNS-t steril Eppendorf csőbe átmértem. Az így nyert mintákat felhasználásig -20°C-on tároltam.

A mikrobiomot alkotó tenészhető mikrobaközösség tagjainak faj szintű identifikációját 16S rDNS szekvenálás módszerével végeztem. Az előzetesen kinyert DNS-ből polimeráz láncreakció (PCR) során a DNS előre meghatározott célszakaszát, azaz a fajspecifikus 16S rDNS gént nagy mennyiségben felsokszorozítottam. A reakció során forward (27f: 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') és reverz (1492r: 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT- 3') primereket alkalmaztam, melyek kijelölik a sokszorozítani kívánt célszekvencia elejét és végét. Ezen kívül szükségünk van DNS-polimeráz enzimre, ami lemásolja számunkra az amplifikálandó szakaszt; nukleotidokra, melyből az enzim szintetizálja az új DNS szálakat; pufferre, ami a megfelelő működéséhez szükséges kémiai környezetet biztosítja a DNS-polimeráz számára. A polimeráz láncreakció három fő lépésből áll, ezek közül

első a denaturáció, mely során magas hőmérséklet hatására a hidrogénhid-kötések felbomlanak, ami a DNS kettős szálainak szétválását okozza. Így jön létre az egyszálú templát, amit a reakció további lépéseiben felhasználunk. Az anelláció alacsonyabb hőmérsékleten játszódik le, ami elősegíti az adott primerek DNS szálakhoz való tapadását. Utolsó lépésként az elongáció következik, mely során a DNS-polimeráz enzim a szabad nukleotidok felhasználásával sokszoros kópiában felépíti a célzott DNS szekvenciánkat. Az alábbi PCR mastermix-et alkalmaztam 50 µl végtérfogatú reakcióelegyre számolva (Radó, 2019):

DNS templát	1 µl
27f forward és 1492r reverz primer (1 µM)	0,5-0,5 µl
Dream Taq DNS-polimeráz (Thermo Scientific, USA)	0,25 µl
GreenTaq puffer (Thermo Scientific, USA)	5 µl
dNTP (deoxiribonukleinsav-trifoszfátok (4 µM)	10 µl
MQ (nukláz-mentes) víz	32,75 µl

A polimeráz láncreakció automata Eppendorf Mastercycler® készülékben játszódott le, az alábbi hőprofil alatt: 95°C - 3 min 32x (94°C - 30 sec, 52°C - 30 sec, 72°C - 1 min), 72°C - 10 min, 4°C ∞). A reakció sikerességét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztem. Az eljárás során 70 ml SB pufferben (0,4 g NaOH; 3,044 H₃BO₃; 1000 cm³ desztillált víz) feloldottam 0,7g agarózt, majd a visszahűlt oldathoz 3,5 µl EcoSafe (Pacific Image Electronics, Kanada) festéket adagoltam. A gélbe fűsűsorokat helyeztem, melyek helyén az eltávolításukat követően zsebek keletkeztek. A zsebekbe 5 µl PCR terméket pipettáztam és minden egyes mintasor első zsebébe 3 µl DNS molekula markert (GeneRuler™ DNA Ladder Mix (1 mennyiség GeneRuler; 1 mennyiség Loading Dye, 4 mennyiség MQ víz)) töltöttem be, amely lehetőséget ad a PCR termék hozzávetőleges méretének meghatározására. A foszfátsoportok miatt 7-es pH értéken a DNS molekula negatív töltéssel rendelkezik, emiatt egyenáram hatására a DNS a gélben a pozitív pólus felé vándorol. A DNS könnyedén kimutatható a gélben, mivel a DNS szálba beépült EcoSafe festék UV fény hatására fluoreszkál. A mintákat 45 percen át, 110 V feszültség alatt futtattam, majd a PCR termékek jelenlétét UV fény alatt detektáltam.

Ahhoz, hogy meghatározzam a PCR termékek 16S rDNS amplifikált régiójának a pontos bázissorrendjét, a PCR termékek tisztítását végeztem el, amihez a gyártói utasításokat követve a NucleoSpin PCR Clean-up kit-et (Macherey-Nagel) alkalmaztam. A kitisztított PCR termékeket ismét megvizsgáltam agaróz gélelektroforézis segítségével és a pozitív eredményt mutató termékeket később a szekvenáló PCR alapjaként - mint DNS templát - használtam fel. A szekvenáló polimeráz láncreakció elvégzésével tudjuk megállapítani a DNS szekvencia nukleotid sorrendjét. A didezoxi (Sänger-féle) vagy láncterminációs szekvenálás nagyban

megegyezik a hagyományos polimeráz láncreakcióval, hiszen ugyanaz a reakció zajlik le a már leírt reakció alkotókkal, azonban a négyféle dezoxiribonukleinsav-trifoszfát (dNTP) mellett négyféle módosított, fluoreszcens festékkel (fluoroflórral) megjelölt didezoxinukleotid-trifoszfátot (ddNTP) is hozzáadunk a reakcióközeghez. A DNS polimerizáció során az újonnan felépülő szálba a nukleotidok koncentrációjának arányától függ, hogy a komplementer dNTP vagy ddNTP épül-e be. Abban az esetben, ha dNTP épül be a szálba, akkor tovább folytatódik a szál felépítése, ugyanis a dNTP 3' végén egy -H csoport figyelhető meg, ami szerepet játszik a nukleotidok beépítésében. Ezzel ellentétben a ddNTP 3' végén -OH csoport van jelen, így kapcsolódási pont hiányában az új szál szintézise leáll. Ezzel a módszerrel kialakulnak a DNS templát különböző hosszúságú fragmentjei, melyek végén fluoreszkáló bázisok foglalnak helyet. Egy 10 µl végtérfogatú szekvenáló reakcióelegyre számolva az alábbi összetételt alkalmaztam: 4 µl tisztított PCR termék; 1 µl Big Dye; 1,5 µl Big Dye puffer; 0,5 µl forward primer (27f, 88f, 338f vagy 803f); 3 µl nukleáz-mentes víz. A reakció az alábbi hőprofil alatt futott: 96°C - 1 min, 28x (96°C - 10 sec, 51°C - 5 sec, 60°C - 4 min), 4°C ∞.

A 16S rDNS gén megközelítőleg 1550 bázispár hosszúságú, melyből 600-700 bázispár szekvenálása esetén már nagy valószínűséggel faj szinten azonosítható az adott baktériumtörzs (Church et al., 2020). A szekvenálás előkészítéséhez a szekvenáló PCR termék kicsapatása szükséges, melyet az etanol precipitáció módszerével végeztem. A folyamat során a mintát acetát mixszel (1,5 µl 2M-os nátrium-acetát; 7,25 µl nukleáz-mentes víz; 31,25 µl 95%-os EtOH) elegyítettem, majd 10 percen át szobahőmérsékleten inkubálódott. A keveréket 4600 rpm fordulatszámon, 4°C-on, 30 percen át centrifugáltam, majd a felülúszó fázist eltávolítottam a mintákról. Ezt követően a mintákra mértem 180 µl 70%-os etil-alkoholt, majd újból centrifugáltam a mintákat 4°C-on, 20 percen keresztül 4600 rpm fordulatszámon, amit a felülúszó fázis ismételt dekantálása követett. A kicsapatott DNS-re rámértem 20 µl Hi-Di formamidot, ami által felvehetők a fluoreszcensen jelölt termékek. Az előkészített mintákat 4°C-on inkubáltam 24 órán át, ezt követően pedig az ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) készüléken játszódtott le a szekvenciák bázissorendjének megállapítása. A nyers szekvenciákat MEGA (v. 7.0.26) szoftver segítségével manuálisan szerkesztettem, majd a faj szintű meghatározáshoz az EzBioCloud (Yoon et al., 2017) adatbázisában megtalálható 16S rDNS szekvenciákkal vettem össze az eredményeket.

3.5 Közösségi mikrobiológiai vizsgálatok

A szekvenálás-alapú metagenomika alkalmazásával képesek vagyunk meghatározni komplex mikrobiális közösségek pontos összetételét a környezetből vett mintákból, anélkül,

hogy izolálni, tenyésztetni kellene a közösség különálló tagjait. A molekuláris biológiai vizsgálatokat szintén mindhárom mintatípus (víz-, üledékminta, hévízi pontyból származó biológiai minták (bőrfelület, kopolyú, emésztőrendszer)) esetében elvégeztem.

A molekuláris biológiai vizsgálatok kiindulási alapját a mintákból kinyerhető közösségi DNS jelenti. Első lépésként a laboratóriumba beérkezett mintákból a ZymoBiomics® DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research, USA) segítségével a közösségi DNS-t extrakcióját végeztem el a gyártói ajánlásnak megfelelően. Elsőként a mintát belemértem egy rázatógönggyökkel teli lízis csőbe, majd 10 percen keresztül vortex segítségével rázattam. Ezt követően a csöveket centrifugáltam, majd 400 µl felülúszó fázist átmértem egy steril, 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és 800 µl (2x-es térfogatú) lízis puffer oldatot pipettáztam rá. A gyűjtőcsőbe Spin-Away™ filtert helyeztem, majd az összes mintát (1200 µl) rámértem a szűrőre. Egy centrifugálást követően a gyűjtőcsőbe átfolyt folyadékot eltávolítottam, a filtert pedig áthelyeztem egy újabb gyűjtőcsőbe a szűrő felületén megtapadt DNS kinyerése érdekében. A szűrőt ezt követően két lépésben átmostam először 400 µl DNS előkészítő pufferrel, majd 1100 µl DNS tisztító pufferrel. A szűrletet ismét dekantáltam és a filterre rámértem 100 µl DN-ase mentes vizet, ami leoldja a szűrőre tapadt DNS-t. Ezt 5 perc inkubációs idő és újabb centrifugálás követte. Következő lépésként előkészítettem egy Zymo-spin™ III-HRC filtert, melyre 600 µl ZymoBIOMOCSTM előkészítő oldatot pipettáztam és 8,000 RPM (round per minute) fordulatszámon 3 percig centrifugáltam. Az előkészített III-HRC filterre rámértem a Spin-away szűrőről visszaoldott DNS-t, majd maximum fordulatszámon 3 percen keresztül centrifugáltam a mintát. A centrifugálás végén nyert tiszta DNS-t a későbbi felhasználásig steril Eppendorf csőben, -20°C-on tároltam.

A teljes izolált közösségi DNS a mintában fellelhető összes élőlény örökítőanyagát tartalmazza, ezért annak érdekében, hogy egyáltalán kimutathassuk a mintákban baktériumok jelenlétét, 16S rDNS polimeráz láncreakciót futtattam, eredményét pedig agaróz gélelektroforézis vizsgálattal ellenőriztem a már fentebb ismertetett folyamat szerint. Pozitív eredmény esetén a mintákat újgenerációs szekvenálásnak vetettük alá a mintákat az Eurofins Biomi Kft. Illumina Miseq tömegszekvenáló platformján. Az 16S rDNS gén amplicon-alapú szekvenálása során a kódoló génszakasznak csak egy részletét vizsgáljuk: a V3 és V4 hipervariábilis régióját (kb. 479 bázispár), amelyet a humán mikrobiom vizsgálatokban a mikrobiális közösség taxonómiai osztályozására használtak, kétlépéses PCR módszerrel (Fadrosh et al., 2014). A V3 régió előtt és a V4 régió után adapterek ligálása történik az 5' és 3' végeken, melynek köszönhetően két lépésben történik a szekvenálás. A reakcióban fusion

primereket alkalmazunk, melyek egy Illumina-specifikus részből és egy baktérium-specifikus részből állnak. A szekvenálás elindul a forward és a reverz primer irányából is, majd optimális esetben a két szekvenálási read (kb. 250-250 bázispár) összeér. A folyamat végén egy trimmelés történik, ahol az azonosításra nem alkalmas bázisokat pl. primerek levágjuk, a számunkra fontos szekvenciákat pedig összeillesztjük, a nem megfelelő minőségű szekvenciákat pedig kiemeljük az adatok közül a Mothur MiSeq SOP (v. 1.48.0) szoftver (Kozich et al., 2013) segítségével. Az eredményeket exportáltuk, majd Microsoft Excel program segítségével feldolgoztuk. Ezzel a módszerrel a 16S rDNS variábilis régiók alapján összehasonlíthatóvá válnak az egyes minták baktériumközösségei akár nemzetség szinten, valamint diverzitás indexek számolhatók.

3.6 *P. aeruginosa* kimutatása és antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok

A rendkívül szélsőséges környezeti viszonyok mikrobiológiai közösségre gyakorolt szelekciós nyomásának értékelését antibiotikum rezisztens mikroszervezetek kimutatásával terveztük elvégezni, melynek keretében kimondottan a *Pseudomonas aeruginosa* faj (a továbbiakban: *P. aeruginosa*) kimutatására fókuszáltam. A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó *P. aeruginosa* aerob, Gram-negatív baktérium, mely a kórházi környezeten kívül a környezeti elemek szinte mindegyikében kimutatható. Egyre nagyobb figyelem szereződik a fajra, mióta kutatások bebizonyították, hogy kórházi környezetben ez az egyik legjelentősebb humán megbetegedéseket okozó opportunista patogén (Losonczy, 2001), azaz a legyengült immunrendszerű szervezetbe bekerülve súlyos, sok esetben gyógyíthatatlan megbetegedést okoz, az antibiotikumokra való alacsony érzékenysége által. Képes multirezisztencia kialakítására, vagyis egyidejűleg kettő vagy több antibiotikumcsoport hatóanyagával szemben is ellenállóságot mutathat, ami számos esetben hátráltatja a fertőzőes megbetegedések hatékony kezelését (Barcs, 2001). Emellett a *P. aeruginosa* ismert biofilmképző, így potenciálisan szerepet játszhat biotikus és abiotikus felületek kolonizációjában, így akár az egyes magasabbrendű szervezetek mikrobiomjában is megtalálható. Mindezek miatt az antibiotikum-rezisztens *P. aeruginosa* törzsek jelenléte segítségünkre lehet az intenzív antropogén terheltség mikroszervezetekre gyakorolt szelekciós hatásának becslésében.

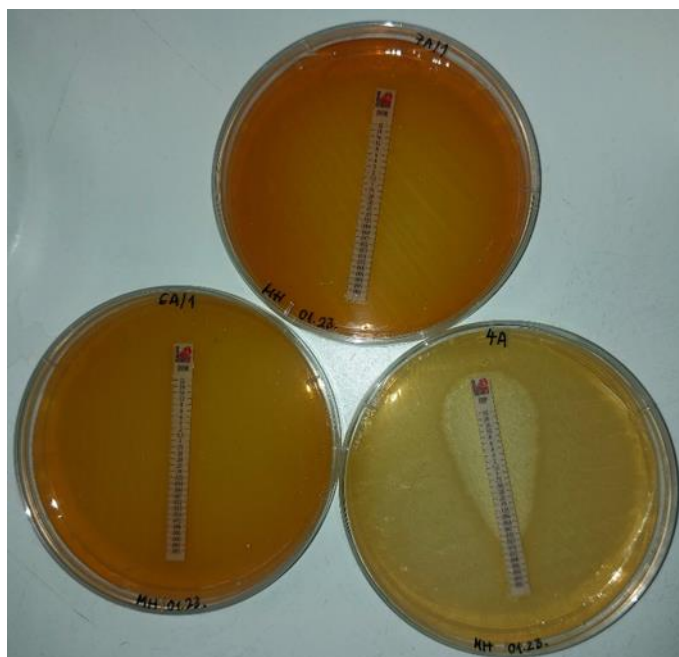
A helyszíni mintavételezés során aszparaginos dúsító oldatot (3g L-aszparagin; 1g K₂HPO₄; 0,5g MgSO₄ x 7H₂O; 10 cm³ glicerín; 1000 cm³ desztillált víz) tartalmazó mintavételi csövekbe steril vattapálca segítségével vettünk törletet a hévízi pontyról (bőrfelület, kopolyúlemezek közül vett törlet, faeces), mely oldat alkalmas a célszervezet (*P. aeruginosa*) szelektív felszaporítására. A laboratóriumba beérkezett mintákból a baktériumszuspenzió

cetrimid agarra került szélesztésre, amit 37°C-on, 24 órás inkubációs idő követett. A cetrimid agar a legtöbb baktérium faj növekedésére a gátló hatást gyakorol, azonban a *P. aeruginosa* képes a tápközegben szaporodni. A *P. aeruginosa*-t cetrimid agaron tenyésztve könnyen megkülönböztethetjük más fajokól. A telepei körül sárgás, zöldes, idővel barnás pigmentáció jellemzi, mely különböző vízoldékony pigmentek (pyocyanin, pyoverdin, pyorubrin) extracelluláris termelésével magyarázható (Kothari et al., 2022). A faj szintű identifikáció megerősítése érdekében a 16S rDNS V2 és V8 variabilis régióira tervezett, *P. aeruginosa* fajra specifikus PCR-t hajtottam végre (PA-SS-F (5'-GGGGGATCTTCGGACCTCA-3') és PA-SS-R (5'-TCCTTAGAGTGCCCCACCCG-3') primerek segítségével. A módszer előnye, hogy nem igényel szekvenálást, a *P. aeruginosa* faj identifikációjához elegendő a 956 bp hosszúságú fragment kimutatása (Spilker et al., 2004; Atzél et al., 2008). A vizsgálathoz alkalmazott mastermix összetétele (végtérfogat: 50 µl):

Templát DNS	1.0 µl
GreenTaq puffer (10x)	5 µl
PA-SS f és r primer (100pM)	0,5-0,5 µl
dNTP (4mM)	10.0 µl
Taq polymerase	0.25 µl
MQ víz	32.75 µl

95°C, 2 min 25x (94°C, 25 sec 58°C, 40 sec 72°C, 40 sec) 72°C, 1 min 4°C, ∞

A hévízi pontyok felületéről izolált *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum rezisztencia profilját fenotípusos módszer (Liofilchem test strips) segítségével, az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ajánlásai alapján vizsgáltam. Első lépésben a *P. aeruginosa* törzstenyészetekből TGE-5 ferde táptalajon friss overnight baktériumtenyészeteket hoztam létre, majd 0,9%-os fiziológias sóoldatban 0,5 McFarland zavarosságú baktérium



8. ábra: Antibiotikum rezisztens *P. aeruginosa* törzs, saját felvétel, 2024

szuszpenziót készítettem. A baktérium szuszpenziót steril vattapálca segítségével 20 ml előre megöntött Mueller-Hinton táptalaj felületére három irányban szélesztettem. A minimális gátló

koncentrációk értékének meghatározásával számszerűsíthető az antimikrobiális szerekkel szembeni ellenállóképesség mértéke. A vizsgálathoz minden lemezre steril csipesz segítségével egy antibiotikum hatóanyaggal átitatott tesztcsíkot helyeztem. A tesztcsíkkal ellátott lemezek 24 órán keresztül 35°C-on inkubálódtak. Az inkubációs idő letelte után a tesztcsíkok közvetlen közelében kialakuló gátlási ellipszis és a tesztcsík metszéspontjában (breakpoint) leolvasható a minimális gátló koncentráció érték (Minimal Inhibitory Concentration – MIC), melynek kiértékeléséhez szintén az EUCAST kategóriáit (S – sensitive (érzékeny), R – resistant (rezisztens)) használtam (8. ábra). Abban az esetben, ha a MIC érték nem volt egyértelműen leolvasható, akkor a gyártó (Liofilchem) utasításai szerint végeztem az azonosítást. Összesen kilencféle, hat hatóanyagcsoportba sorolható antibiotikum készítmény hatását vizsgáltam, melyek a *P. aeruginosa* esetében jelenleg terápiás jelentőséggel bírnak, akár önmagukban vagy más készítményekkel kombinálva. A mintákból azonosított baktériumtörzsekre vonatkozó vizsgálati eredményeket az alábbi készítmények MIC (minimális gátló koncentráció) értékei alapján mutattam ki. A minimális gátló koncentráció értékeket az EUCAST ajánlásai alapján minősítettem. A vizsgálat során alkalmazott készítmények az 2. táblázatban kerülnek felsorolásra:

2. Táblázat: A <i>P. aeruginosa</i> törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatához használt hatóanyagok		
Antibiotikum neve	Hatóanyagcsoport	Vizsgált koncentrációgrádiens
Ceftazidime	Kefalosporinok	0.016-256 mg/l
Ciprofloxacin	Fluorokinolonok	0.002-32 mg/l
Levofloxacin	Fluorokinolonok	0.002-32 mg/l
Imipenem	Karbapenemek	0.016-256 mg/l
Doripenem	Karbapenemek	0.002-32 mg/l
Meropenem	Karbapenemek	0.002-32 mg/l
Netilmicin	Aminoglikozidok	0.016-256 mg/l
Colistin	Polimixinek	0.016-256 mg/l
Piperacillin	Penicillinek	0.016-256 mg/l

3.7 Antibiotikum-rezisztencia gének kimutatása

A szakirodalomban több forrás is leírja, hogy a környezetben, felszíni vizekben és (tisztított) szennyvízzel terhelt víztestekben, gyakran kimutathatók az antibiotikum-rezisztens *P. aeruginosa* törzsek (Anyanwu et al., 2021; Gonzalez-Vila et al., 2021; Milligan et al., 2023), melynek környezetegészségügyi jelentősége azonban akkor kiemelkedő, ha átadható rezisztencia mechanizmusok játszanak kialakulásában szerepet. Ezért az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatokat követően az előzetesen faj szinten azonosított *P. aeruginosa* törzsek esetében ellenőriztem, hogy kimutathatók-e szerzett rezisztencia gének a bakteriális genomban. A colistin rezisztencia legtöbbször mobilis genetika elemeken kódolt, átadható rezisztencia

mechanizmus, mely a rezisztens törzsek és rezisztencia gének környezetbe kerülésével a természetes mikrobaközösség körében is teret nyerhet. Ilyen átadható rezisztencia gének a colistin esetében az *mcr* gének (Hussein et al., 2021). Az *mcr-1* gént Liu és munkatársai írták le, akik 2015 végén egy Lancet-cikkben publikálták eredményeiket. Ez a gén a foszfoetanolamin-transzferáz enzimsaládot kódolja, amelynek *Escherichia coli*-ban történő expressziója a foszfoetanolamin hozzáadását eredményezi a lipid A-hoz, és ily módon rezisztenciát kölcsönöz a kolisztinnel szemben (Liu et al., 2016). Egy hasonló gént, az *mcr-2*-t belga izolátumokban írták le (Xavier et al., 2016), azóta pedig nyolc további plazmidon hordozott *mcr*-gént írtak le (Hussein et al., 2021).

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredménye után kiválasztásra kerültek a szerzett colistin rezisztenciáért felelős *mcr* gének közül az *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* és *mcr-5* ARG-ek. Az *mcr* gének azonosításához a Multiplex PCR módszert alkalmaztam, mely ugyanazon az elven alapul, mint egy általános PCR, azonban ebben az esetben több primer-pár kerül egyszerre a mastermixbe. A keresett ARG-ek vizsgálatban alkalmazott primer szekvenciák (Li et al., 2017) az alábbi táblázatban (3. táblázat) láthatók:

3. táblázat: a keresett génszakaszok primer-párjai és azok bázispár (bp) hossza			
ARG neve	forward primer 5' - 3'	reverz primer 5' - 3'	bp
<i>mcr-1</i>	AAAGACGCGGTACAAGCAAC	GCTGAACATACACGGCACAG	213
<i>mcr-2</i>	CGACCAAGCCGAGTCTAAGG	CAACTGCGACCAACACACTT	92
<i>mcr-3</i>	ACCTCCAGCGTGAGATTGTTCCA	GCGGTTTCACCAACGACCAGAA	169
<i>mcr-4</i>	AGAATGCCAGTCGTAACCCG	GCGAGGATCATAGTCTGCCC	230
<i>mcr-5</i>	CTGTGGCCAGTCATGGATGT	CGAATGCCCCGAGATGACGTA	98

Az *mcr* gének azonosításához alkalmazott multiplex PCR-t a Rebelo és munkatársai által kidolgozott protokoll alapján végeztem (Rebolo et al., 2018). 25 µl végtérfogatra számolva az alábbi reakcióelegyet készítettem el:

DNS templát	2 µl
Primer mix	5 µl (0,5 µl minden primerből)
Dream Taq PCR mastermix (Thermo Scientific, USA)	12,5 µl
MQ (nukláz-mentes) víz	5,5 µl

A multiplex PCR optimalizálásához 5, az *mcr-1-mcr-5* géneket hordozó kontrolltörzset használtam pozitív kontrollként, melyeket a DTU (Technical University of Denmark) bocsájtott rendelkezésünkre, illetve csak a mastermixet tartalmazó mintát negatív kontrollként. A

polimeráz láncreakciót ismét Eppendorf Mastercycler® készülékben futtattam le, az alábbi hőprofil alatt:

94°C, 15 min; majd 25X (94°C, 30 sec + 58°C, 90 sec + 72°C, 60 sec) + 72°C, 10min; 4°C, ∞

A kapott eredmény gélelektroforézis segítségével ellenőriztem, a már fentebb ismertetett módon.

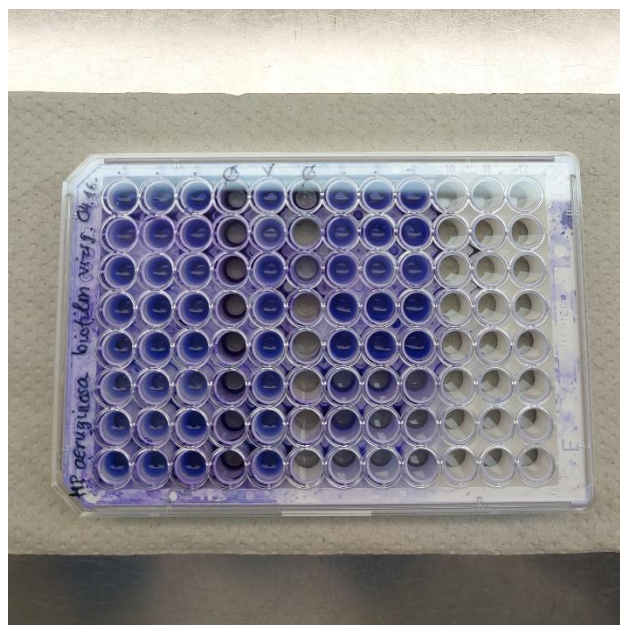
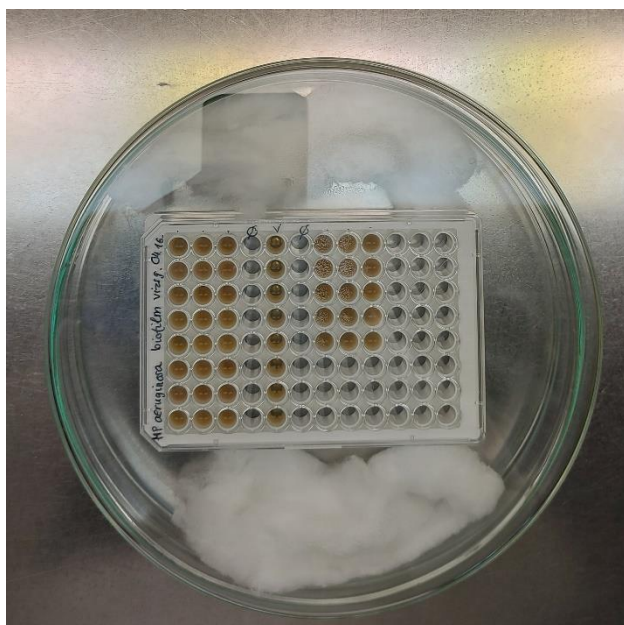
3.8 Biofilmképzés vizsgálata

A vizsgálatba vont *Pseudomonas aeruginosa* törzsek biofilmképző képességének meghatározása fontos annak megismerése szempontjából, hogy egy adott baktériumtörzs képes lehet-e biotikus/abiotikus felületeken biológiai hártya képzésére. A biofilmképzés mértékét a Stepanovic és munkatársai (Stepanovic et al. 2000), továbbá Kumari és munkatársai (Kumari et al, 2013) által leírt, módosított mikrotiter plate módszer alapján végeztem (9. ábra). A vizsgálat előkészítéséhez a *P. aeruginosa* törzsekből 5 ml TSB (Tryptic Soy Broth: Tripton szója tápeves; Merck, Németország) táplevest 100 µl tiszta baktériumtenyésztellel beoltottam és friss overnight tenyészetet készítettem. Következő nap egy steril, 96 lyukat tartalmazó, PS anyagú műanyag mikrotiter lemez mélyedéseibe mind a 13 törzsből 20 µl baktériumszuspenziót és 230 µl TSB tápoldatot mértem, összesen három ismételtsben. A baktériumszuspenzió zavarosságát a pontos mérés érdekében Genesys 10S UV-VIS készülék segítségével állítottam be 600 nm hullámhosszon, $OD_{600} = 0.6 \pm 0,02$ értékre. A párhuzamos kontroll minták esetében 250 µl steril tápoldatot pipettáztam a lemez mélyedéseibe. A plate-et egy nedves vattával kibélelt nagyméretű, steril üveg petricsészbe helyeztem a párolgásból adódó folyadékveszteség elkerülése érdekében, majd 48 órán át 35°C-on statikus módon (rázatás nélkül) inkubáltam. Az inkubáció végeztével a lemez minden egyes mélyedéséből leöntöttem a tápoldatot, majd azokat három ismételtsben átmostam 250 µl foszfátsóoldattal (PBS). A mélyedések falára feltapadt baktérium sejteket 250 µl 99,9%-os metanol segítségével fixáltam, majd 15 perces várakozási idő után a lemez tartalmát újból eltávolítottam. Ezt követően 250 µl, 5%-os kristályibolya festék oldattal a fixált baktérium sejteket megfestettem, majd 20 percen keresztül szobahőmérsékleten pihentettem. A továbbiakban a lemez mélyedéseit desztillált vízzel kitisztítottam, majd a mélyedések falára tapadt, megfestett baktérium sejteket 33%-os jégecettel visszaoldottam. A leolvasás alkalmával a BioTek ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek, USA) készüléket használtam, mely segítségével a minták optikai denzitását 550 nm-es hullámhosszon mértem be. Az eredményeket kiértékelését ugyancsak a Stepanovic és munkatársai (Stepanovic et al. 2000) által publikált tanulmányban

leírtak alapján végeztem, a törzseket a biofilmképző képesség alapján a negatív kontrollhoz viszonyítva az alábbi csoportokba soroltam:

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1. $OD \leq OD_c$ | nincs biofilm képzés (0) |
| 2. $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ | gyenge biofilm képzés (+) |
| 3. $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ | közepes biofilm képzés (++) |
| 4. $4 \times OD_c < OD$ | erős biofilm képzés (+++), |

ahol OD_c értékét a negatív kontroll szórásának háromszorosát összeadva a negatív kontroll átlag OD értékével határoztam meg.



9. ábra: biofilmképzés vizsgálata Stepanovic et al. (2000) módszere alapján, saját fotók, 2024

4. Eredmények és értékelések

4.1 A felszíni vízminta gyógyszeranalitikai vizsgálatainak eredménye

Az Anyag és módszer fejezetben leírt gyógyszeranalitikai vizsgálatokra a 2023. nyári mintavétel során volt lehetőségünk a helyszínen vételezett vízminta (HÉ-V) esetében. Az Eurofins Analytical Services Hungary Kft. által elvégzett gyógyszeranalitikai vizsgálatok eredményeit kiértékelve elmondható, hogy a Hévízi-tó vizéből 132 vizsgált gyógyszermaradvány közül 8 különböző gyógyszermaradvány volt kimutatási határérték felett detektálható. Az azonosított gyógyszermaradványok koncentrációja más, antropogén terhelés alatt álló magyarországi felszíni vizekhez képest így mind kimutatási esetszámban (8/132, mind koncentrációban (0,001-0,09 µg/l) alacsonyabb értéket mutat. Egyrészt ez köszönhető annak, hogy a Hévízi-tó vizének egésze a forrásbarlangból tör fel, így gyakorlatilag semmilyen háttérszennyezés nem befolyásolja a víz minőségét. Másrészt a források akkora vízhozammal táplálják a tó vizét, hogy annak vízkészlete megközelítőleg 3-3,5 nap teljesen kicserélődik, így a vízben jelenlévő szennyezőanyagok koncentrációja rendkívül gyorsan hígul és távozik a Hévízi-lefolyón át. Az analitikai eredményekből könnyen kiszámítható felszíni vízben mért összes gyógyszerkoncentráció, az antibiotikum maradványokra vonatkozó adatokból pedig az összes antibiotikum koncentráció. A 4. táblázatban mutatom be a vízmintából kimutatott gyógyszermaradványok koncentrációját:

4. Táblázat: A Hévízi-tó vizéből kimutatható gyógyszermaradványok koncentrációja		
Kimutatott paraméter	Mértékegység	Minta jele
		HÉ-V
Koffein	µg/l	0,09
Metoprolol	µg/l	0,001
Ibuprofen	µg/l	0,01
Paracetamol	µg/l	0,057
Progeszteron	µg/l	0,002
Biszfénol-A	µg/l	0,02
Ofloxacin	µg/l	0,001
Szulfapiridin	µg/l	0,002
Össz. gyógyszer	µg/l	0,183
Össz. antibiotikum	µg/l	0,003

A koffein volt kimutatható a legnagyobb koncentrációban (0,09 µg/l), ami a szakirodalmi adatok alapján még így is alacsonyabb értéket mutat az édesvízi tavakban mért átlagos koncentrációkkal szemben. Az édesvízi tavak vízrendszerét széles körben vizsgálták koffein tekintetében, és a jelentett koncentrációk 0,019 és 37,48 µg/l közé esnek (Subedi et al., 2014; You et al., 2015; Mar da Costa et al., 2016; Zhang et al., 2017; Chau et al., 2018; Williams et al., 2019). A szakirodalom alapján a koffein leggyakrabban a szennyvíztisztítók tisztított

szennyvizével jut be a természetes felszíni víztestekbe, a Hévízi-tó esetében azonban az összes gyógyszermaradvány feltételezhetően a tavat használó látogatólétszámhoz köthető. A metoprolol, egy béta-blokkoló készítmény, az egyik leggyakrabban felírt vérnyomáscsökkentő gyógyszer. Általában a szennyvízből kerül a vízkörforgásba, ezért világszerte kimutatható felszíni vizekben (aus der Beek et al., 2016; Eike et al., 2019). Több publikáció eredménye is arról számolt be, hogy a metoprolol a halakra, gerinctelenekre, illetve a zöld algákra is káros hatást gyakorol (Santos et al., 2010; Maszkowska et al., 2014). Az Európai Unió 93/67EEC irányelve a metoprololt a vízben élő szervezetekre károsnak ($10 < EC50 < 100$ mg/l) minősítette. Az ibuprofen és a paracetamol nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID-ok), melyek a vízi ökoszisztémákban világszerte a leggyakrabban kimutatható terápiás szerek (aus der Beek et al., 2016). Bár a NSAID-ok koncentrációja a felszíni vizekben alacsony, ezen molekulák magas biológiai aktivitása potenciális toxicitást eredményezhet a nem célzott vízi szervezetekre (Parolini, 2020). Gutiérrez-Noya és munkatársai kutatásukban leírták, hogy környezeti szempontból releváns koncentrációban (1,5 és 11,5 µg/l között) az ibuprofen képes megváltoztatni pontyok (*Cyprinus carpio*) esetében az embrionális fejlődést, teratogén hatású és szerepe van az oxidatív stressz kiváltásában az oociták és embriók körében (Gutiérrez-Noya et al., 2020). A kutatócsoport ugyanezeket a vizsgálatokat elvégezte paracetamol hatás (0,5 µg/l – 3,5 µg/l) alatt, mely során az ibuprofen vizsgálatánál kapott eredményekhez hasonló következtetésekre jutott (Gutiérrez-Noya et al., 2021). A progeszteron és a biszfenol-A (BPA) ösztrogénhatású vegyületek. A progeszteron egy női szteroidhormon, mely természetes módon jelen van a női szervezetben. A szteroid hormonok a környezetvédelmi kutatások szempontjából kiemelt fontosságú, mivel ezek alkotják az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok (EDC-k) egyik legaktívabb gyógyszercsoportját, amelyek befolyásolhatják a vízi gerincesek, különösen a halak szaporodásbiológiáját és fejlődésmenetét (Tamsin et al., 2021; Christen et al., 2010). A szintetikusan előállított progeszteront leginkább a humán gyógyászatban alkalmazzák. Léteznek fogamzásgátló tabletták melyek kizárólagosan progeszteron-tartalmúak, illetve alkalmazzák hormonkezelésként abban az esetben, ha progeszteron-hiány jelentkezik a szervezetben. A BPA egy széleskörben alkalmazott alapanyag melyet elsősorban polikarbonát műanyagok előállítására használnak. BPA-t tartalmaznak olyan mindennapi tárgyak is mint a cumisüvegek, ételhordó és -tároló edények, műanyag palackok (Minghong et al., 2017). Kutatások kimutatták, hogy a BPA képes befolyásolni a vízi szervezetek szaporodását, normál fejlődését, hatással lehet a kiválasztó szervrendszerre és az immunfunkciókra (Bo-Mi et al., 2018). Az antibiotikumok közül a fluorokinolok közé tartozó ofloxacin, továbbá a szulfonamidokhoz csoportosítandó szulfapiridin került kimutatásra. Az

ofloxacint leggyakrabban humán gyógyászatban szemcseppként, bakteriális szemfertőzések kezelésére alkalmazzák. A szulfapiridin szintén a humán gyógyászatban használják, ahol emésztőrendszeri gyulladásos panaszok enyhítésére alkalmazható. Összességében elmondható, hogy az összes gyógyszermaradvány olyan alacsony, környezeti szempontból elhanyagolható koncentrációban mutatható ki, hogy azok valószínűleg nem gyakorolnak jelentős hatást a tóban élő halak egészségére, vagy életminőségére, azonban a tó vizében és üledékében jelenlévő, illetve a hévízi pontyot kolonizáló mikroszervezetekre a tóban uralkodó extrém körülményekkel együttesen szelekciós hatást gyakorolhatnak, ennek igazolására, vagy cáfolására azonban további vizsgálatokra lenne szükség.

4.2 Tenyésztési mikrobiológiai vizsgálatok eredménye

Az előzetes mintázásokkal együtt a tenyésztési vizsgálatok során a hévízi pontyból származó három mintatípus (bőrfelület, kopoltyú, emésztőrendszer/faeces) esetében megközelítőleg 100 izolátumot sikerült faj szinten identifikálnunk (lásd 1. sz. melléklet), melyek közül az amplikonszekvenálással azonosított top 10 baktériumnemzetségből (lásd 4.3 fejezet eredményei) 4 nemzetség (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* és a *Cetobacterium*) képviselőit mutattuk ki. Mindhárom mintatípusról (bőrfelület, kopoltyú, emésztőrendszer) kimutatható volt a *Serratia liquefaciens* és az *Enterobacter quasiroggkampii*, így ezek a baktériumok jelentősnek bizonyultak a pontyváltozat kolonizációjában. Az azonosított fajok között nagy számban megtalálhatóak voltak az *Aeromonas* nemzetségbe tartozó fajok, pl. az *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila* és az *Aeromonas caviae*, melyek bizonyítottan halpatogének és képesek fertőzéses megbetegedéseket okozni halak esetében, illetve a kolonizált halak elfogyasztásával humán megbetegedések okozói is lehetnek (Abd-El-Malek, 2017; Li et al., 2020; Anjur et al., 2021; de Silva et al., 2021). Kopoltyúfelületről azonosításra került a *Pseudomonas*-ok közé tartozó *Pseudomonas mosselii* is, mely friss publikációk szerint bizonyítottan képes mérsékelni az *Aeromonas* nemzetségbe tartozó fajok, főleg az *A. hydrophila* által okozott megbetegedések kialakulását (Zhang et al., 2020; Wang et al., 2023). Ezen kívül említésre méltóak a kopoltyúról és bőrfelületről származó *Serratia* nemzetség *Serratia marcescens* és *Serratia nematodiphila* fajokhoz tartozó tagjai, melyek széles körben elterjedtek a környezetben. Könnyen megkülönböztethetők tenyésztési vizsgálatok során más baktériumfajoktól, mert másodlagos anyagcseretermékként jellegzetes, pirosan pigmentált prodigozint termelnek (10. ábra) (Venil és Lakshmanaperumalsamy, 2009; Oboga et al., 2014). A tudományos életben a prodigiozin felé nagy érdeklődés irányul, mert ez a molekula számos hasznos tulajdonsággal rendelkezik,

pl. antioxidáns aktivitás jellemzi, emellett gombaellenes, antivirális és -bakteriális, immunszuppresszív, daganatellenes hatását már igazolták (Giri et al., 2009, Mathalom et al., 2018). Mivel a prodigiozin révén ezek a mikroszervezetek széles spektrumú biológiai aktivitással rendelkeznek, így feltételezhető, hogy szerepet játszanak a törpenövésű pontyváltozat extrém viszonyokhoz való alkalmazkodásában.



10. ábra Prodigozint termelő mikroszervezetek, saját fotó, 2023

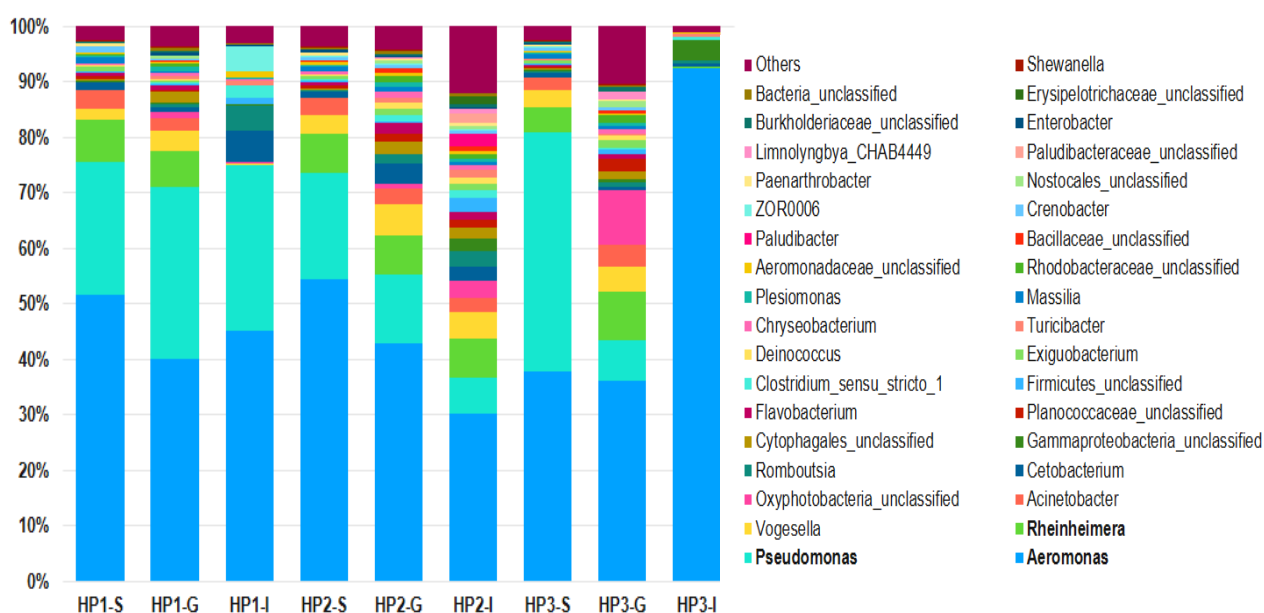
Fontos megemlíteni, hogy a vizsgálatba vont hévízi törpenövésű vadponty egyedek egyike sem mutatta bakteriális, vagy egyéb fertőzés külső/belső jeleit, tehát az azonosított mikroszervezetek feltehetően az egészséges mikrobiom részét képezik.

4.3 Közösségi mikrobiológiai vizsgálatok eredményei

Az 16S amplikonszekvenálás során kapott eredmények nemzetség szinten kerültek meghatározásra. Az átláthatóság érdekében a közösségi DNS-ből kimutatható top 30 taxon kerül bemutatásra ebben az alfejezetben egy téli (2022) és egy nyári (2023) mintavétel esetében. A tóból származó vízminta közösségi DNS-ének kivonását (150-500 ml) 0,4 μ m pórusátmérőjű szűrőn terveztük, azonban ezt a lépést nem várt eszközhiány miatt nem tudtuk elvégezni, így vízmintákból közösségi DNS izolálás nem történt. Iszapvizsgálatra is projekt során csupán egy alkalommal (2023 nyár) volt lehetőségünk. A hévízi ponty biológiai mintáinak (bőrfelület, kopoltyú, emésztőrendszer) esetében elmondható, hogy a bakteriális DNS izolálás a 2022 évi téli mintavizsgálatoknál mindhárom mintatípus esetében három ismételtsben sikeres volt, azonban a 2023 nyári mintavételnél kihívásokkal szembesültünk. A bakteriális DNS mennyisége gélelektroforézissel, Nanodrop műszerrel és egy Illumina próbaszekvenálással is

ellenőrzésre került, ám amplikonszekvenálásra csak három minta (két különböző egyedről származó faeces és egy bőrfelületről származó) bizonyult alkalmasnak.

Eredményeim alapján elmondható, hogy a téli mintavételezés során begyűjtött és sikeresen elemzett minták (11. ábra) más mikrobaösszetételt mutattak, mint a nyári szezonban (12. ábra), mely feltehetően a víz hőmérséklet-változásnak, illetve a hévízi ponty táplálkozásában bekövetkező szezonális eltéréseknek köszönhető. Téli időszakban mind a bőrfelület és a kopolyú, mind pedig az emésztő rendszer esetében az *Aeromonas* nemzetség tagjai, a *Pseudomonas* és a *Reinheimera* fajok dominálnak a mikrobiális közösségben, míg nyári időszakban az emésztőrendszer esetében *Oxyphotobacteria*, *Lymnolyngbya* és *Nostocales* cianobaktériumok és a Gram-pozitív *Romboutsia* baktériumfajok voltak nagy számban jelen, illetve az *Aeromonas* és a *Clostridium* nemzetség tagjai is kimutatásra kerültek. A nyári iszapmintában a faeces mintához hasonlóan az *Oxyphotobacteria*, *Lymnolyngbya* és *Nostocales* csoporthoz tartozó fotoszintetikus cianobaktérium fajok mutattak dominanciát, így erősödni látszik az a feltételezés, hogy a törpenövésű változat tápláléka (nyári időszakban) az üledékben lebegő cianobaktériumokból áll.

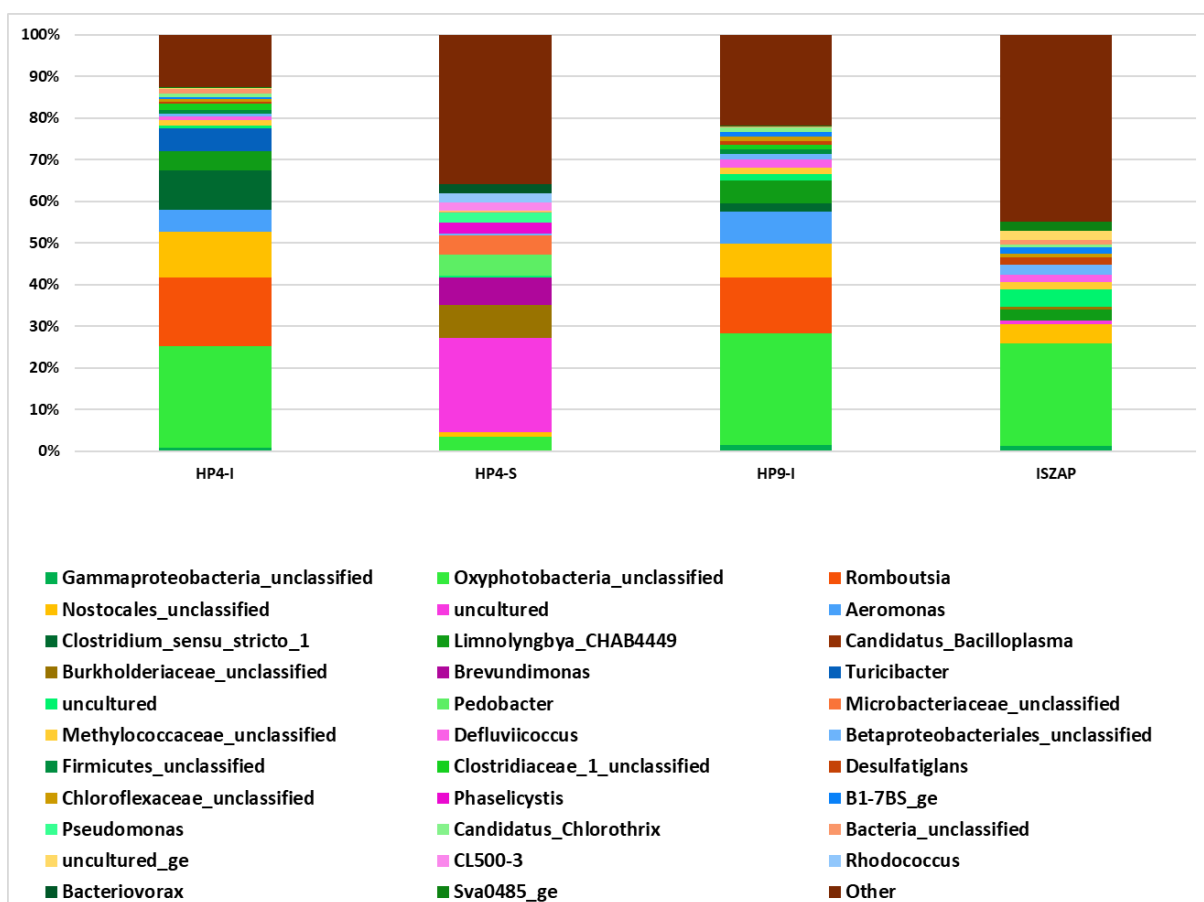


11. ábra Közösségi DNS-ből azonosított TOP 30 baktériumnemzetség a téli mintavétel esetében

HP: hévízi ponty mintaszám, S: bőrfelület (skin), G: kopolyú (gill), I: emésztőrendszer (intestine)

Vizsgálataink alapján a várakozásoknak megfelelően (Shannon diverzitás index alapján) az emésztőrendszer mikrobiomja bizonyult a legdiverzebbnek, a legkisebb változatosságot pedig a bőrfelületen tapasztaltuk.

A nyári mintavétel során jelentős abundanciát mutattak az *Oxyphotobacteria* csoportba tartozó fajok, oxigéntermelő fototrófként ismertek (Shih et al., 2017), valamint a *Nostocales* fajok, amelyek pedig a trópusi és szubtrópusi rezervoárok inváziós fajaként vannak számontartva (McGregor és Fabbro, 2000). A szakirodalom alapján a *Romboutsia* fajok, melyek az emésztőszervi mintákból (HP4-I, HP9-I) jelentős arányban voltak kimutathatók, képesek szabályozni a halak glükóz metabolizmusát azáltal, hogy rövid szénláncú zsírsavakat termelnek az inzulinszekréció serkentésére, egyidejűleg pedig csökkentik a táplálék szénhidrát-tartalmát a vércukorszint csökkentésének érdekében (Fan et al., 2024).



12. ábra: Közösségi DNS-ből azonosított TOP 30 baktériumnemzetség a nyári mintavétel esetében

HP: hévízi ponty mintaszám, S: bőrfelület (skin), I: emésztőrendszer (intestine)

4.4 A *P. aeruginosa* kimutatása, az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok és a rezisztencia gének kimutatásának eredményei

A hévízi törpenövésű vadponty kültakarójáról, kopolyájáról, illetve víz- és üledékmintából is sikeresen kimutatásra kerültek *P. aeruginosa* törzsek, melyek a 3.6. fejezetben ismertetett fajspecifikus PA-SS PCR alapján is faj képviselőinek bizonyultak.

Összesen 13 baktériumtörzs esetében végeztem el az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatokat, melynek eredményét az alábbi táblázatokban (5.1 és 5.2 táblázat) foglaltam össze:

5.1 Táblázat: Antibiotikum rezisztencia vizsgálat Minimális Gátló Koncentráció (MIC) eredményei a vizsgált <i>P. aeruginosa</i> törzsek esetében							
Antibiotikum neve	Törzsgyűjteményi jel és mintatípus						rezisztencia (R>) (EUCAST)**
	1A	2A	3A	4A	5A	6A	
	S	G	S	G	S	S	
Ceftazidime	2	3	1.5	.5	1.5	3	8
Ciprofloxacin	.032	.047	.032	.032	.023	.064	.5
Levofloxacin	.125	.125	.5	.047	.032	.5	2
Imipenem	4*	6*	6*	4*	1	6*	4
Doripenem	-	12*	32*	.25	.125	12*	2
Meropenem	1.5	4	-	-	-	-	8
Netilmicin	-	.25	.75	.5	.19	.5	8
Colistin	3	3	3	1.5	1.5	4*	4
Piperacillin	4	3	12	1.5	4	32*	16

5.2 Táblázat: Antibiotikum rezisztencia vizsgálat Minimális Gátló Koncentráció (MIC) eredményei a vizsgált <i>P. aeruginosa</i> törzsek esetében								
Antibiotikum neve	Törzsgyűjteményi jel és mintatípus							rezisztencia (R>) (EUCAST)**
	7A	8A	9A	11A	13A	HÉ-V	H-ISZ	
	G	G	S	G	S	víz	iszap	
Ceftazidime	1.5	22mm	1	1	2	1.5	2	8, 17 mm
Ciprofloxacin	.38	.016	.064	.094	.023	.047	.047	.5
Levofloxacin	.19	.032	.19	.19	.19	.25	.19	2
Imipenem	4*	38mm	4*	4*	4*	6*	8*	4, 20mm
Doripenem	12*	-	8*	32*	-	16*	12*	2
Meropenem	8*	.016	-	-	8*	-	-	8
Netilmicin	.19	-	.38	.38	-	.38	.5	8
Colistin	3	15mm	4*	4*	2	4*	4*	4
Piperacillin	8	.38	12	32*	4	12	32*	16

*Rezisztencia

** (EUCAST) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024 alapján

S: bőrfelület (skin), G: kopolyú (gill)

Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok eredményei alapján ellenállóképességet több hatóanyagcsoportba tartozó készítmény esetében is azonosítottam. A karbapenemek csoportjába sorolható imipenemmel és doripenemmel szemben szinte mindegyik vizsgálatba vont törzs rezisztenciát mutatott. A szintén ebbe a csoportba tartozó meropenem két törzsszel szemben vesztette el a hatását. Ezeken kívül a polimixinekhez sorolandó colistin és a penicillin besorolású piperacillin esetében nagy számban voltak megfigyelhetők rezisztens törzsek. Összesen 5 db *P. aeruginosa* törzset tekinthetünk multirezisztensnek, mivel két vagy három

eltérő hatóanyagcsoportba tartozó antibiotikummal szemben mutatnak ellenállóképességet. Az, hogy ilyen arányban kimutathatók antibiotikum rezisztens mikroszervezetek egy endemikus halfaj mikrobiótájában, mindenképp figyelemfelkeltő és feltehetően összefüggésben áll a közeget érő intenzív antropogén terheléssel.

A klinikai szempontból jelentős colistin rezisztencia esetében igazolni kívántam, hogy átadható *mcr* gének tehetők-e felelőssé a tapasztalt rezisztenciáért, melyhez az Anyag és módszer fejezetben ismertetett multiplex PCR eljárást alkalmaztam a Rebelo és munkatársai által kidolgozott protokoll szerint (Rebelo et al., 2018). Annak ellenére, hogy az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok során több törzs is mutatott ellenállóságot a colistinnel szemben, a vizsgálatba vont *P. aeruginosa* törzsek genomjából nem volt kimutatható az átadható colistin rezisztenciáért felelős, a vizsgálat tárgyát képező 5 különböző *mcr* gén (*mcr1-mcr5*) egyike sem, azaz a tapasztalt rezisztenciáért feltehetően valamilyen univerzális rezisztencia mechanizmus és nem átadható, plazmid-mediált *mcr* gének felelősek.

4.5 Biofilmképzés vizsgálat eredményei

Munkám során szerettem volna értékelni, hogy az azonosított *P. aeruginosa* törzsek képesek-e biofilmet képezni, azaz biotikus, vagy abiotikus felületekhez tapadva stabil biológiai hártást alkotni. Ehhez az Anyag és módszer fejezetben bemutatott, kristályibolya festésen alapuló mikropate lemezen elvégezhető eljárást alkalmaztam polisztirol felületen. A tapasztalható biofilmképző képességre vonatkozó vizsgálatok eredményeit foglalja össze a 6. táblázat.

6. Táblázat: A <i>P. aeruginosa</i> törzsek biofilmképző képességének a vizsgálati eredménye			
Törzsgyűjteményi jel	Származási hely	Biofilmképzés (számszerűsítve)	Biofilm képzés (értékelés a Stepanovic skálán)
1A	bőrfelület	0,393	nem biofilmképző
2A	kopolyú	0,358	nem biofilmképző
3A	bőrfelület	0,311	nem biofilmképző
4A	kopolyú	0,337	nem biofilmképző
5A	bőrfelület	0,353	nem biofilmképző
6A	bőrfelület	0,167	nem biofilmképző
7A	kopolyú	0,282	nem biofilmképző
8A	kopolyú	0,403	nem biofilmképző
9A	bőrfelület	0,407	nem biofilmképző
11A	kopolyú	0,346	nem biofilmképző
13A	bőrfelület	0,338	nem biofilmképző
HÉ-V	víz	0,541	nem biofilmképző
HÉ-ISZ	üledék	0,515	nem biofilmképző

Az eredmények alapján elmondható, hogy egyik vizsgáltba vont *P. aeruginosa* törzs sem volt képes a mikrotiter plate felületén biofilmképzésre. Ez azonban nem azt jelenti, hogy a hévízi törpenövési vadpontyot nem képesek kolonizálni a kimutatott baktériumtörzsek, hiszen a halak felületén már kialakult mikrobaközösségek által képződött biofilm befogadhat a környezetből újabb fajokat, illetve biológiai felületen a vizsgálat során használt polisztirol lemezhez képest jelentősen eltérő lehet a biofilmképzés mértéke. Ezek alapján a biofilmképződés további vizsgálata a jövőben indokolt.

7. Következtetések, javaslatok

A mikrobiom vizsgálatok során a kimutatott eredményekből arra következtethetünk, hogy a hévízi törpenövésű vadponty valóban unikális mikrobiommal rendelkezik. A tenyésztési mikrobiológiai vizsgálatok elvégzésével olyan baktériumfajok (pl. *Serratia* nemzetség tagjai) kerültek azonosításra, melyek valószínűsíthetően szerepet játszanak a pontyváltozat extrém körülményekhez való alkalmazkodásában és táplálékszerzésében. Azonban ezen mikrobaközösségek összetételét legnagyobb mértékben a hévízi törpenövésű vadponty élőhelyét jellemző környezeti viszonyok határozzák meg. Emiatt a jövőben javasolt lehet a fogságban tartott, eltérő környezeti hatásoknak kitett egyedeken is elvégezni a mikrobiom vizsgálatokat, hogy kimutatható legyen a környezeti viszonyok mikrobiomot alkotó mikroszervezetekre gyakorolt szelekciója, illetve javasolt egy teljeskörű, szezonális, iszap és vízmintavétellel kísért mintázás. Érdekes lehet a későbbiekben a baktériumokon túl a mikrobiomban megtalálható vírusok és gombák felmérése, hiszen köztük is előfordulhatnak olyan taxonok, melyek hatással lehetnek a pontyváltozat alkalmazkodó-képességére.

Az antropogén hatások tekintetében elmondható, hogy a Hévízi-tó vizéből más bolygatott felszíni víztestekhez képest alacsony koncentrációban kerültek kimérésre a gyógyszermaradványok, ami a tó gyors vízcseréjének köszönhető. A *P. aeruginosa* törzsek kimutatásával és az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok elvégzésével célunk volt a szélsőséges környezeti viszonyok mikrobiológiai közösségre gyakorolt szelekciós nyomásának értékelése, valamint az antropogén hatások felmérése. Az elmúlt években a környezetből egyre több antibiotikumoknak ellenálló *P. aeruginosa* került kimutatásra, mely az antropogén hatások állandó jelenlétéről tanúskodik. Az a tény, hogy biológiai, víz és iszap mintákból egyaránt kimutattuk a *P. aeruginosa* faj képviselőit, önmagában bizonyítéka a Hévízi-tó intenzív antropogén terhelésének. A 13 kimutatott *P. aeruginosa* törzsből 11 ellenálló volt a vizsgált antibiotikumokkal szemben, ebből 5 törzs pedig multirezisztenciát mutatott, mely összefüggésben állhat a felszíni vizet érő terhelésekkel, de az extrém körülmények miatt is kialakulhattak univerzális rezisztencia mechanizmusok a közegben kimutatható baktériumok között (pl. efflux pumpa túlműködése). Mivel több törzs is rezisztenciát mutatott a colistinnel szemben, ezért megvizsgáltam, hogy jelen van-e az átadható colistin rezisztenciáért felelős *mcr* gének közül az *mcr1-mcr5* gén bármelyike, de ezek közül egyik sem volt kimutatható. A továbbiakban érdemes lehet a vizsgálatba vont törzseken teljes genom szekvenálást végezni, hiszen annak birtokában pontosabb képet kaphatunk a virulenciáért, biofilmképzésért és a rezisztenciáért felelős génekről. Eredményeim alapján javasolt lenne a Hévízi-lefolyó

mintázása mind gyógyszeranalitikai, mind antibiotikum-rezisztens mikroszervezetek szempontjából, hiszen a partmenti szegmensben a lassú lefolyás következtében felhalmozódhatnak ezek a szennyező anyagok. Javasolható továbbá a turisztikai jelentőségű tó esetében a látogatószám, a vízminőség, valamint az ökoszisztémára gyakorolt hatások közötti összefüggések átfogó értékelése, mely alapján egy fenntarthatóbb, környezetbarát turizmus alakulhat ki a tó természeti értékeinek megőrzése és a hévízi törpenövésű vadponty állomány megóvása érdekében.

8. Összefoglalás

A hévízi törpenövésű vadponty jelenleg az egyetlen endemikus, önfenntartó halfaj a Hévízi-tóban. A tóban uralkodó szélsőséges környezeti viszonyok és a folyamatos antropogén terhelés képesek befolyásolni a mikrobiomot alkotó mikrobaközösség összetételét, mely szerepet játszhat a pontyváltozat túlélésében vagy veszélyeztetésében. Diplomadolgozatom elkészítése során célom volt a hévízi törpenövésű vadpontyra jellemző mikrobaközösség meghatározása klasszikus mikrobiológiai és molekuláris biológiai módszerekkel, illetve a szélsőséges környezeti viszonyok és a vízhasználatból eredő terhelés mikrobiológiai közösségre gyakorolt szelekciós nyomásának vizsgálata gyógyszermaradványok és antibiotikum-rezisztens mikroszervezetek kimutatásával. Ezen kívül vizsgálatokat végeztem arra vonatkozóan, hogy a kimutatott antibiotikum-rezisztens baktériumtörzsek rendelkeznek-e átadható rezisztencia génekkel azokkal az antimikrobiális szerekkel szemben, melyek hatástalannak bizonyultak ellenük.

A kutatómunka során a Hévízi-tó víz, üledékmintáiból, illetve a hévízi törpenövésű vadponty egyedekről vételezett minták (bőrfelület, kopoltyú, emésztőrendszer) klasszikus mikrobiológiai vizsgálatával több, mint 100 izolátumot sikerült faj szinten azonosítani. Minden vizsgált mintatípus esetben kimutatásra került az antropogén hatásokkal szoros összefüggést mutató *P. aeruginosa* faj, melynek izolátumai közül 11 törzs antibiotikum rezisztensnek bizonyult, azonban polisztirol felületén biofilmképzésre nem voltak képesek. A törpenövésű vadpontyról származó izolátumok esetében a *Serratia liquefaciens* és az *Enterobacter quasirogerkampii* fajok bizonyultak jelentősnek, mivel a fajok képviselői mindhárom mintatípus (bőrfelület, kopoltyú és emésztőrendszer) esetében kimutatásra kerültek. Élettani szerep szempontjából megemlítenéd a kopoltyúról azonosított *Serratia marcescens* és az emésztőrendszerből több alkalommal kimutatott *Serratia nematodiphila*, melyek prodigiosin termelésük által széles spektrumú biológiai aktivitással (antibakteriális, antifungális, algicid hatással) jellemezhetők, így szerepük lehet a törpenövésű pontyváltozat helyi viszonyokhoz való alkalmazkodásában. A közösségi mikrobiológiai vizsgálatok eredménye alapján a törpenövésű pontyváltozat bakteriális közösségére a minta jellegétől függetlenül téli időszakban a *Gammaproteobacteria* osztály, ezen belül az *Aeromonadaceae* és a *Pseudomonadaceae* család túlsúlya, illetve nyári időszakban az *Oxyphotobacteria* cianobaktérium fajok jellemzők, mely utóbbi az iszapban is abundáns mikrobacsoport. Legdiverzebbnek az emésztőrendszer mikrobaközössége, míg a legkevésbé változatosnak a bőrfelület mikrobiomja bizonyult. A Hévízi-tó antropogén terheltségét az elvégzett

gyógyszeranalitikai vizsgálatok alapján jelentősen csökkenti az intenzív vízkicserélődés, azonban az antibiotikum-rezisztens *P. aeruginosa* baktériumtörzsek jelenléte intenzív antropogén hatásról, vagy a faj extrém körülményekhez való alkalmazkodásáról ad bizonyosságot és feltárása figyelmet érdemel. A jövőben érdemes lehet elvégezni a törzsek teljes genom szekvenálását, mely segítségével feltárható, hogy a rezisztenciát mutató baktériumtörzsek rendelkeznek-e más átadható, antibiotikum rezisztenciáért felelős génekkel, vagy valamilyen univerzális mechanizmus áll az antibiotikum-rezisztencia hátterében.

Mivel a hévízi törpenövésű vadponty mikrobiomját kolonizáló mikroorganizmusok összetételét nagyban befolyásolhatják az élőhelyre jellemző fizikokémiai paraméterek, illetve az ott kimutatható különböző szennyező anyagok, ezért tervezzük a pontyváltozat fogságban tartott, szabályozott környezeti viszonyok között élő egyedeinek a mikrobiom vizsgálatát is elvégezni. A Hévízi-lefolyó mintázásával pedig a jövőben még részletesebb képet kaphatunk a természetvédelmi területet veszélyeztető antropogén hatásokról, illetve az őshonos fajokat kiszorítani képes invazív fajok jelenlétéről. Összességében elmondható, hogy munkánk hozzájárulhat az endemikus törpenövésű pontyváltozatot veszélyeztető tényezők megismeréséhez és a jövőben segítheti a változat megóvásához szükséges intézkedéseket.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kaszab Editnek, aki amellet, hogy lehetőséget biztosított az AKI Környezetbiztonsági Tanszékén zajló kutatási munkában való részvételre és segítette számomra a laboratóriumi rutin elsajátítását, szakmai felkészültségével és értékes tanácsaival támogatta a dolgozatom elkészülését. Továbbá szeretném kifejezni hálámat a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet munkatársainak, elsősorban Dr. Specziár András tudományos tanácsadónak, valamint a MATE-AKI Természetesvízi Halökológia Tanszék munkatársainak: Dr. Ferincz Árpád tanszékvezető, tudományos főmunkatársnak, valamint Dr. Müller Tamás egyetemi tanárnak és Varga Ádám PhD hallgatónak a mintavételezés során nyújtott segítségükért. Külön köszönet Prikler Bence PhD hallgatónak, aki a labormunkák során nyújtott számomra sok szakmai segítséget.

A kutatómunkám elkészülését az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-23-2-I-MATE-16 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatása, valamint a kutatás a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal által kibocsátott támogatói okirat alapján megvalósult pályázat (2022-1.2.6-TÉT-IPARI-TR-2022-00002) segítette.

Dr. Kaszab Edit témavezetői munkáját a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (BO/00236/20/4) támogatta.

Irodalomjegyzék

- Abd-El-Malek AM. (2017): Incidence and virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in fish. *Vet World* (1), 34-37.
- Amato K. R., Yeoman C. J., Kent A. N., Righini, F., Carbonero, A., Estrada, H. R., Gaskins, R. M., Stumpf, S., Yildirim, M., Torralba, M. et al. (2013): Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal* 7(7), 1344–1353
- Anjur N, Sabran SF, Daud HM, Othman NZ. (2021): An update on the ornamental fish industry in Malaysia: *Aeromonas hydrophila*-associated disease and its treatment control. *Vet World* 14(5), 1143-1152.
- Anyanwu, M. U., Okpala, C. O. R., Chah, K. F., & Shoyinka, V. S. (2021): Prevalence and traits of mobile colistin resistance gene harbouring isolates from different ecosystems in Africa. *BioMed research international*, 2021(1), 6630379.
- Atzél, B., Szoboszlay, S., Mikuska, Z., 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(1-2), 143-155.
- Austin B. (2006): The bacterial microflora of fish, revised. *ScientificWorld J*, 6, 931-945.
- Bahrndorff S., Alemu T., Alemneh T., Lund Nielsen J., (2016): The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology. *International Journal of Genomics*, 2016, 5304028.
- Banerjee S., Schlaeppi K., van der Heijden M. G. A. (2018): Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nat Rev Microbiol*. 16, 567–576.
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014): Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental science & technology*, 48(3), 1819-1827.
- Bar-On, Y.M., Phillips R., Milo, R. (2018): The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 6506–6511.
- aus der Beek, T.; Weber, F.-A.; Bergmann, A.; Grüttner, G.; Carius, A. (2016): Pharmaceuticals in the Environment: Global Occurrence and Potential Cooperative Action under the Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM); Umweltbundesamt: Dessau, Germany.
- Bentzon-Tilia M., Sonnenschein E.C., Gram L (2016): Monitoring and managing microbes in aquaculture – Towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnology* 9, 576–584.
- Bíró P., Specziár A., & Keresztessy K. (2002): Fish species assemblages in inflowing waters of Lake Balaton (Hungary). *SIL Proceedings, 1922-2010*, 28(1), 273–278.
- Bo-Mi K., Jin Y. Jo, Nayun L., Nayoung L., Seonock W., Jae-Sung R., Seungshic Y. (2018): Bisphenol A induces a distinct transcriptome profile in the male fish of the marine Medaka *Oryzias javanicus* *Biochip Journal*, 12 (2018), pp. 25-37
- Brealey, J. C., Leitao, H. G., Hofstede, T., Kalthoff, D. C., & Guschanski, K. (2021): The oral microbiota of wild bears in Sweden reflects the history of antibiotic use by humans. *Current biology*, 31(20), 4650-4658.
- Brinchmann M.F. (2016): Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using -omics technologies. *Molecular BioSystems*. 12, 2056–2063.
- de Bruijn I., Liu Y., Wiegertjes G.F., Raaijmakers J.M. (2018): Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiology Ecology*. 94, fix161.
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C. M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., ... & Berendonk, T. U. (2019): Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water research*, 162, 320-330.

- Cardinale, B., Duffy, J., Gonzalez, A. *et al.* (2012): Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486, 59–67.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (CBD). 2010 *Global biodiversity outlook 3*. Montreal, Canada: CBD Secretariat.
- Chakrabarty A.N. Dastidar S.G. Ganguli M. Chattopadhyay D. (1990): ‘DNA’ as contaminants in antibiotics and its capacity to transform bacteria to drug resistance. *Indian J Exp Biol* 28: 58–62.
- Chau H.T.C., Kadokami K., Duong H.T. *et al.* (2018): Occurrence of 1153 organic micropollutants in the aquatic environment of Vietnam. *Environ Sci Pollut Res* 25, 7147–7156.
- Christen V., Hickmann S., Rechenberg B., Fent K. (2010): Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: a concept for their identification based on their mode of action *Aquat. Toxicol* 96(3), 167-181.
- Church D. L., Cerutti L., Gürtler A., Griener T., Zelazny A., Emler S. (2020): Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev* 33:10.1128/cmr.00053-19.
- Costa S, Lopes I, Proença DN, Ribeiro R, Morais PV. (2016): Diversity of cutaneous microbiome of *Pelophylax perezi* populations inhabiting different environments. *Sci. Total Environ* 572, 995-1004.
- Dhanji, H., Murphy, N.M., Akhigbe, C., Doumith, M., Hope, R., Livermore, D.M. *et al.* (2011) Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b: H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 512–516.
- Danner M.C., Robertson A., Behrends V., Reiss J. (2019): Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects *Sci. Total Environ.*, 664, 793-804.
- Davey, M.E.; O’Toole, G.A. Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64, 847–867.
- Dawood M.A.O. (2021): Nutritional immunity of fish intestines: important insights for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 13, 642–663.
- Deguara S., Jauncey K., Agius C. (2003): Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream *J. Fish Biol.*, 62, 1033-1043.
- Dupré J. O., O’Malley M. A. (2010): Varieties of living things: life at the intersection of lineage and metabolism. In: Normandin S, Wolfe C, editors. *Vitalism and the Scientific Image in Post-Enlightenment Life Science; History, Philosophy and Theory of the Life Sciences*. Dordrecht: Springer; 2009. 1800–2010.
- Eike, D.; Marcus, R.; Dirk, J. (2019): *The Database “Pharmaceuticals in the Environment”-Update and New Analysis*; Texte; Umweltbundesamt: Dessau, Germany, Volume 67.
- Elif-Kaval O., Okan A., Ahmet-R O. (2018): Oxidative and genotoxic effects of bisphenol A on primary gill cell culture of Lake Van Fish (*Alburnus tarichi* Gildenstädt, 1814), 34, 914-924.
- Fadrosh, D.W., Ma, B., Gajer, P. *et al.* (2014): An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* 2, 6
- Falagas, M. E., & Bliziotis, I. A. (2007): Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era?. *International journal of antimicrobial agents*, 29(6), 630-636.
- Fan, Z., Ke, X., Jiang, L., Zhang, Z., Yi, M., Liu, Z., ... & Wang, M. (2024). Genomic and biochemical analysis reveals fermented product of a putative novel *Romboutsia* species involves the glycometabolism of tilapia. *Aquaculture*, 581, 740483.
- Fernández, L., and Hancock, R.E.W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 661–681.

- Fields MW, Yan T, Rhee S-K, Carroll SL, Jardine PM, Watson DB, Criddle CS, Zhou J. 2005 Impacts on microbial communities and cultivable isolates from groundwater contaminated with high levels of nitric acid–uranium waste. *FEMS Microbiol. Ecol* 53, 417–428.
- Flemming, H. C., Stefan, W. (2019): Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 247–260.
- Fontaine SS, Novarro AJ, Kohl KD. (2018): Environmental temperature alters the digestive performance and gut microbiota of a terrestrial amphibian. *J. Exp. Biol* 221, jeb. 187559.
- Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D. & Cormican, M. (2010) Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4772–4779.
- Gatesoupe F.J. (2007): Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*. 267, 20–30.
- Geffen Y., Rosenberg E. (2005): Stress-induced rapid release of antibacterials by scleractinian corals. *Mar. Biol.* 146, 931–935.
- Giri, A. V., Anandkumar, N., Muthukumaran, G. and Pennathur, G. (2004). A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC microbiology*, 4(1), 11.
- Givens C., Ransom B., Bano N., Hollibaugh J. (2015): Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series*: 518, 209–223.
- Gonzalez-Avila, L. U., Loyola-Cruz, M. A., Hernández-Cortez, C., Bello-López, J. M., & Castro-Escarpulli, G. (2021): Colistin resistance in *Aeromonas* spp. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5974.
- McGregor, G. B., & Fabbro, L. D. (2000). Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 5(3), 195–205.
- Grime, J. P., Pierce, S. (2012): The evolutionary strategies that shape ecosystems. John Wiley & Sons.
- Gtérrez-Noya V. M., Gómez-Oliván L. M., Ramírez-Montero M.C., Islas-Flores H., Galar-Martínez M., Dublán-García O., Romero R. (2020): Ibuprofen at environmentally relevant concentrations alters embryonic development, induces teratogenesis and oxidative stress in *Cyprinus carpio*, *Science of The Total Environment*, Volume 710, 136327
- Gtérrez-Noya V. M., Gómez-Oliván L. M., Ramírez-Montero M.C., Islas-Flores H., Galar-Martínez M., García-Medina S. (2021): Survival and malformations rates, oxidative status in early life stages of *Cyprinus carpio* due to exposure to environmentally realistic concentrations of paracetamol, *Science of The Total Environment* 768, 144585
- Győri F., Hézsóné Böröcz A., Kiss G., Lehmann-Dobó A., Meszlényi-Lenhardt E., Balogh L. (2013): Wellness, sport- és egészségturizmus. Szegedi Tudományegyetem Juhász Gyula Pedagógusképző Kar Testnevelési és Sporttudományi Intézet, Szeged, Magyarország.
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.A., Bekal, S. et al. (2006) A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from great lakes recreational waters. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4200–4206.
- Hansen G.H., Olafsen J.A. (1999): Review Article: Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. *Microbial Ecology* 38, 1–26.
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., & Alvarez, P. J. (2020): Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *NPJ Clean Water*, 3(1), 4.
- Heydari, S. & Eftekhar, F. (2015): Biofilm formation and β -lactamase production in burn isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur J. Microbiol.* 8, 1–5.

- Ho A., Di Lonardo D. P., Bodelier P. L. E. (2017): Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology, *FEMS Microbiology Ecology* 93(3), fix006.
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., ... & Grau, S. (2019): Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), 10-1128.
- Horváth L. és Urbányi B. (2000): Halak szaporodáspiológiája. 214-343. p. In: Horváth L. (szerk.) Halbiológia és Haltenyésztés. Második kiadás. Budapest: Mezőgazda kiadó, 440 p.
- Hussein, N. H., Al-Kadmy, I. M., Taha, B. M., & Hussein, J. D. (2021). Mobilized colistin resistance (mcr) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Molecular biology reports*, 48(3), 2897-2907.
- van Kessel M.A.H.J., Mesman R.J., Arshad A., Metz J.R., Spanings F.A.T., van Dalen S.C.M., van Niftrik L., Flik G., Wendelaar Bonga S.E., Jetten M.S.M., Klaren P.H.M., Op den Camp H.J.M. (2016): Branchial nitrogen cycle symbionts can remove ammonia in fish gills. *Environmental Microbiology Reports*. 8, 590–594.
- Kothari A., Kumar S. K., Singh V. et al. (2022): Association of multidrug resistance behavior of clinical *Pseudomonas aeruginosa* to pigment coloration. *Eur J Med Res* 27, 120.
- Krett, G., Palatinszky M. (2009): A polyphasic study on the species diversity of the sediment microbiota of Lake Hévíz. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56(4), 339-355.
- Krett, G., Vágány, V., Makk, J., Jáger, K., Reskóné, M., Márialigeti, K., & Borsodi, A. (2013). Phylogenetic diversity of bacterial communities inhabiting the sediment of Lake Hévíz — A comparison of cultivation and cloning, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 60(2), 211-235.
- Krynak KL, Burke DJ, Benard MF. (2017): Rodeo™ herbicide negatively affects Blanchard's Cricket Frogs (*Acris blanchardi*) survival and alters the skin-associated bacterial community. *J. Herpetol* 51, 402-410.
- Larsson, D. G., & Flach, C. F. (2022): Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257-269.
- Lee W.Y., Arnold C. R. (1983): Chronic toxicity of ocean-dumped pharmaceutical wastes to the marine amphipod *Amphithoe valida* Mar. Pollut. Bull., 14(1983), 150-153.
- Lennon J. T, Muscarella M. E., Placella S. A., Lehmkuhl B. K. (2018): How, When, and Where Relic DNA Affects Microbial Diversity. *mBio.*, 9(3), e00637-18.
- Less Gy. (2011): Magyarország földtana. Miskolci Egyetem Földtudományi Kar. Miskolc.
- Li T., Li H., Gatesoupe F-J., She R., Lin Q., Yan X., Li J., Li X. (2017): Bacteria Signatures of 'Red-Operculum' Disease in the Gut of Crucian Carp (*Carassius auratus*). *Microbial Ecology* 74, 510–521.
- Li, T.; Raza, S.H.A.; Yang, B.; Sun, Y.; Wang, G.; Sun, W.; Qian, A.; Wang, C.; Kang, Y.; Shan, X. (2020): *Aeromonas veronii* Infection in Commercial Freshwater Fish: A Potential Threat to Public Health. *Animals* 10, 608.
- Liu H., Guo X., Gooneratne R., Lai R., Zeng C., Zhan F., Wang W. (2016): The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*. 6, 24340.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8
- Llewellyn M.S., Leadbeater S., Garcia C., Sylvain F-E., Custodio M., Ang K.P., Powell F., Carvalho G.R., Creer S., Elliot J., Derome N. (2017): Parasitism perturbs the mucosal microbiome of Atlantic Salmon. *Scientific Reports*. 7, 43465.
- Losonczy Gy. (2001): A klinikai epidemiológia alapjai, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest

- Lowrey L., Woodhams D.C., Tacchi L., Salinas I. (2015): Topographical Mapping of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Microbiome Reveals a Diverse Bacterial Community with Antifungal Properties in the Skin. *Applied and Environmental Microbiology*. 81, 6915–6925.
- Lökkös A., Müller T., Kovács K., Várkonyi L., Specziár A., Martin P. (2016): The alien, parthenogenetic marbled crayfish (Decapoda: Cambaridae) is entering Kis-Balaton (Hungary), one of Europe's most important wetland biotopes. *Knowl Manag Aquat Ec* 417, 16.
- Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist, B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L. (2012): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281.
- Mao, D., Luo, Y., Mathieu, J., Wang, Q., Feng, L., Mu, Q., ... & Alvarez, P. J. J. (2014): Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation. *Environmental science & technology*, 48(1), 71-78.
- Marchesi, J.R., Ravel, J. (2015): The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31.
- Mar da Costa N.Y., Boaventura G.R., Mulholland D.S. et al. (2016): Biogeochemical mechanisms controlling trophic state and micropollutant concentrations in a tropical artificial lake. *Environ Earth Sci* 75.
- Martinez, J.L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov. Today Technol.* 11, 33–39.
- Maszkowska, J.; Stolte, S.; Kumirska, J.; Łukaszewicz, P.; Mioduszevska, K.; Puckowski, A.; Caban, M.; Wagil, M.; Stepnowski, P.; Białk-Bielińska, A. (2014): Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study. *Sci. Total Environ.* 493, 1122–1126.
- Mathlom, G. S., Hayder, N. H., & Mahmood, M. S. (2018). Synergistic effect of biosurfactant and prodigiosin produced by *Serratia marcescens* as antimicrobial agent. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol* 6(2), 1601-1615.
- Merrifield D.L., Rodiles A. (2015): 10 - The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In Beck B.H. - Peatman E (eds.): *Mucosal Health in Aquaculture*. Academic Press, San Diego, 273–295.
- Miller, J. H., Novak, J. T., Knocke, W. R., & Pruden, A. (2016): Survival of antibiotic resistant bacteria and horizontal gene transfer control antibiotic resistance gene content in anaerobic digesters. *Frontiers in microbiology*, 7, 263.
- Milligan, E. G., Calarco, J., Davis, B. C., Keenum, I. M., Liguori, K., Pruden, A., & Harwood, V. J. (2023): A systematic review of culture-based methods for monitoring antibiotic-resistant *Acinetobacter*, *Aeromonas*, and *Pseudomonas* as environmentally relevant pathogens in wastewater and surface water. *Current Environmental Health Reports*, 10(2), 154-171.
- Minghong W., Chenyuan P., Zhong C., Lihui J., Penghui L., Ming Y. (2017): Bioconcentration pattern and induced apoptosis of bisphenol A in zebrafish embryos at environmentally relevant concentrations *Environ. Sci. Pollut. Res* 24, 1-11.
- Montalban-Arques A., De Schryver P., Bossier P., Gorkiewicz G., Mulero V., Gatlin D.M., Galindo-Villegas J. (2015): Selective Manipulation of the Gut Microbiota Improves Immune Status in Vertebrates. *Frontiers in Immunology* 6, 512.
- Moya A., Ferrer M. (2016): Functional Redundancy-Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. *Trends in Microbiology* 24, 402–413.
- Muletz-Wolz CR, Almario JG, Barnett SE, DiRenzo GV, Martel A, Pasmans F, Zamudio KR, Toledo LF, Lips KR. (2017): Inhibition of fungal pathogens across genotypes and temperatures by amphibian skin bacteria. *Front. Microbiol* 8, 1551.
- Müller T. (2014): Kísérlet a váradi maradványcsiga (*Melanopsis parreysi*) és a Racovitza-kele (*Scardinius racovitzai*) megmentésére. *Halászat* 107/3: 12–13.

- Müller, T., Ferincz, Á., Weiperth, A., Ivánovics, B., Tóth, B., Bógó, B., Horváth, J., Urbányi, B., Specziár, A. (2024): Uncommon life history and winter spawning of common carp (*Cyprinus carpio*) in a natural thermal spring, under temperate climate. *Fish Physiol Biochem* (Online ahead of print)
- Normark, B. H., & Normark, S. (2002): Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine*, 252(2), 91-106.
- Ogba O. M., Mandor B. I. és Omang H. M. (2014). Antibiotic susceptibility pattern of *Serratia marcescens* isolates from wound infections in a tertiary health institution in Calabar, Nigeria. *El Mednifico Journal*, 2(3), 223-226
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO (2007): Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5(7), e177.
- Parata L., Sammut J., Egan S. (2021): Opportunities for microbiome research to enhance farmed freshwater fish quality and production. *Reviews in Aquaculture*. 13, 2027–2037.
- Parida V.K., Saidulu D., Majumder A., Srivastava A., Gupta B., Gupta A. K. (2021): Emerging contaminants in wastewater: a critical review on occurrence, existing legislations, risk assessment, and sustainable treatment alternatives *J. Environ. Chem. Eng.*, 9 (2021), Article 105966
- Parolini M. (2020): Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review, *Science of The Total Environment* 740, 140043
- Pflughoeft KJ, Versalovic J (2012): Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol* 7:99–122.
- Plózer I. (1975): A hévízi tó kráterének forrásbarlangja. 1975. február 12. — Kézirat, MBFH. Földtani, Geofizikai és Bányászati Adattár, T. 23380. Budapest
- Ponyi J. (2002): A Hévízi forrástó ökológiai állapota. *Hévízi Könyvtár* 15, Szent András Állami Reumatológiai és Rehabilitációs Kórház, Hévízfürdő
- Porseryd, T., Kellner, M., Caspillo, N.R., Volkova, K., Elabbas, L., Ullah, S., Olsén, H., Dinnétz, P., Hällsröm, I.P. (2017): Combinatory effects of low concentrations of 17 α -etinylestradiol and citalopram on non-reproductive behavior in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 193, 9-17.
- Radó J. (2019): Ubikviter baktériumok környezetbiztonsági vizsgálata, Doktori értekezés, SZIE, Gödöllő, 116 p.
- Ramey, A. M. (2021): Antimicrobial resistance: Wildlife as indicators of anthropogenic environmental contamination across space and through time. *Current Biology*, 31(20), R1385-R1387.
- Ramey A. M., Ahlstrom C. A. (2020): Antibiotic resistant bacteria in wildlife: perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. *J Wildl Dis* 1 January 2020; 56 (1), 1–15.
- Rebelo AR, et al. (2018): Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Euro Surveill*. 2018;23(6):pii=17-00672.
- Robertson, L. A. (2023): Antoni van Leeuwenhoek 1723–2023: a review to commemorate Van Leeuwenhoek's death, 300 years ago. *Antonie van Leeuwenhoek* 116, 919–935.
- Robinson, T.P.; Bu, D.P.; Carrique-Mas, J.; Fèvre, E.M.; Gilbert, M.; Grace, D.; Hay, S.I.; Jiwakanon, J.; Kakkar, M.; Kariuki, S.; et al. (2016): Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110, 377–380.
- Romero J. Ringø E., Merrifield D.L. (2014): The Gut Microbiota of Fish. In *Aquaculture Nutrition*. John Wiley & Sons Ltd, 75–100.
- Runnalls T.J., Margiotta-Casaluci L., Kugathas S., Sumpter J.P. (2010): Pharmaceuticals in the aquatic environment: steroids and anti-steroids as high priorities for research *Hum. Ecol. Risk Assess*, 16(6), 1318-1338.
- Santos, L.H.M.L.; Araújo, A.N.; Fachini, A.; Pena, A.; Delerue-Matos, C.; Montenegro, M.C.B.S.M. (2010): Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95.

- Schumann, W. (2012). Thermosensor systems in eubacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 739, 1–16.
- Shih, P. M., Hemp, J., Ward, L. M., Matzke, N. J., & Fischer, W. W. (2017). Crown group Oxyphotobacteria postdate the rise of oxygen. *Geobiology*, 15(1), 19–29.
- de Silva L.A.D.S., Wickramanayake M.V.K.S., Heo G.-J., (2021): Virulence and antimicrobial resistance potential of *Aeromonas* spp. associated with shellfish, *Letters in Applied Microbiology*, 73(2), 176–186.
- Solovyev M.M., Izvekova G.I., Kashinskaya E.N., Gisbert E. (2018): Dependence of pH values in the digestive tract of freshwater fishes on some abiotic and biotic factors. *Hydrobiologia*, 807, 67–85.
- 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. *J Clin Microbiol* 42(5), 2074–2079.
- Specziár A. (2004): Life history pattern and feeding ecology of the introduced eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in a thermal spa under temperate climate, of Lake Hévíz, Hungary. *Hydrobiologia* 522, 249–260.
- Specziár A. (2010): Fish fauna of Lake Balaton: stock composition, living conditions of fish and directives of the modern utilization of the fish stock. *Acta Biol Debr Suppl Oecol Hung* 23, 7–185.
- Staszny, A., Dobosy, P., Maasz, G., Szalai, Z., Jakab, G., Pirger, Z., Szeberenyi, J., Molnar, E., Pap, L.O., Juhasz, V., Weiperth, A., Urbanyi, B., Kondor, A.C., Ferincz, A. (2021): Effects of pharmaceutically active compounds (PhACs) on fish body and scale shape in natural waters. *PeerJ* 9, e10642.
- Stecher B., Maier L., Hardt W-D. (2013): ‘Blooming’ in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology* 11, 277–284.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Čvabic-Vlahovic M. (2000): A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40, 175–179.
- Stewart, J.R.; Gast, R.J.; Fujioka, R.S.; Solo-Gabriele, H.M.; Meschke, J.S.; Amaral-Zettler, L.; Del Castillo, E.; Polz, M.F.; Collier, T.K.; Strom, M.; et al. The coastal environment and human health: Microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environ. Health* 7, S3.
- Subedi B, Codru N, Dziewulski DM et al (2014) A pilot study on the assessment of trace organic contaminants including pharmaceuticals and personal care products from on-site wastewater treatment systems along Skaneateles Lake in New York State, USA. *Water Res* 72, 28–39.
- Sümeği P., Molnár D., Sávai S., Gulyás S. (2012): Malacofauna evolution of the Lake Peșea (Püspökfürdő), Oradea region, Romania. *Folia naturae Bihariae* 39, 5–29.
- Sylvain F-É., Cheaib B., Llewellyn M., Gabriel Correia T., Barros Fagundes D., Luis Val A., Derome N. (2016): pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Scientific Reports*. 6, 32032.
- Takács P., Maász G., Vitál Z., Harka Á. (2015): Aquarium fishes in the outflow of the thermal Lake Hévíz, *Pisces Hungarici* 9, 59–64.
- Turnbaugh P. J., Ley R. E., Hamady M., Fraser-Liggett C. M., Knight R., and Gordon J. I., (2007): “The human microbiome project,” *Nature* 449(7164), 804–810.
- Uribe C., Folch H., Enriquez R., Moran G. (2011): Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinárni medicína* 56, 486–503.
- Valiakos G., Kapna I. (2021): Colistin resistant mcr genes prevalence in livestock animals (swine, bovine, poultry) from a multinational perspective. A systematic review. *Vet. Sci* 8, 265.
- Várkonyi L., Müller T., Specziár A., Urbányi B., Bernáth G. (2018): A Hévízi-tó környezeti sajátosságai és az ott élő „törpenövésű” vadponty bemutatása, *Halászat*, 111(1), 31–32.

- Venil, C. K. and Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, 5(3), 49-61.
- Vittecoq M., Godreuil S., Prugnolle F., Durand P., Brazier L., Renaud N., Arnal A., Aberkane S., Jean-Pierre H., Gauthier-Clerc M., Thomas F. and Renaud F. (2016), Antimicrobial resistance in wildlife. *J Appl Ecol*, 53, 519-529.
- Wang W., Zhou Z., He S., Liu Y., Cao Y., Shi P., Yao B., Ringø E. (2010): Identification of the adherent microbiota on the gills and skin of poly-cultured gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Aquaculture Research*. 41, e72–e83.
- Wang, L. C., Chen, L. H., Chiu, Y. C., Liou, C. Y., Chen, H. C., Lu, C. Y., & Chen, J. L. (2023). Teleost skin microbiome: an intimate interplay between the environment and the host immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 108869.
- Webb V., Davies J. (1993): Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes? *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2379–2384.
- Williams M, Kookana RS, Mehta A et al (2019): Emerging contaminants in a river receiving untreated wastewater from an Indian urban centre. *Sci Total Environ* 647, 1256–1265.
- Woegerbauer M. Lagler H. Graninger W. Burgmann H. (2005): DNA in antibiotic preparations: absence of intact resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2490–2494.
- Woodford, N., & Ellington, M. J. (2007): The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(1), 5-18.
- Wright, G. D. (2010): Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology*, 13: 589–594.
- Yarsley, V. E. & Couzens, E. G. (1945), *Plastics*, Middlesex: Penguin Books Limited
- Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. (2017): Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill*. 2016;21(27):30280
- Xia J., Lu L., Jin C., Wang S., Zhou J., Ni Y., Fu Z., Jin Y. (2018): Effects of short term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol* 209, 1-8.
- You L, Nguyen VT, Pal A et al (2015): Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors. *Sci Total Environ* 536:955–963.
- Zarkasi K.Z., Taylor R.S., Abell G.C.J., Tamplin M.L., Glencross B.D., Bowman J.P. (2016): Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Gastrointestinal Microbial Community Dynamics in Relation to Digesta Properties and Diet. *Microbial Ecology* 71, 589–603.
- Zhang, D., Xu, D. H., Shoemaker, C. A., & Beck, B. H. (2020). The severity of motile *Aeromonas* septicemia caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in channel catfish is influenced by nutrients and microbes in water. *Aquaculture*, 519, 734898.
- Zhang, J., Liu, J., Lu, T., Shen, P., Zhong, H., Tong, J., & Wei, Y. (2019): Fate of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion of sewage sludge: Role of solids retention times in different configurations. *Bioresour Technol*, 274, 488-495.
- Zhang L., Wu W., Lee Y.K., Xie J., Zhang H. (2018): Spatial heterogeneity and co-occurrence of mucosal and luminal microbiome across swine intestinal tract *Front. Microbiol.*, 9, 48.
- Zhang P, Zhou H, Li K et al (2017): Occurrence of pharmaceuticals and personal care products, and their associated environmental risks in a large shallow lake in north China. *Environ Geochem Health* 40:1525–1539.
- Zhang, Y., Li, A., Dai, T., Li, F., Xie, H., Chen, L., & Wen, D. (2018): Cell-free DNA: a neglected source for antibiotic resistance genes spreading from WWTPs. *Environmental science & technology*, 52(1), 248-257.

Zhao, J. & Dang, H. (2012) Coastal seawater bacteria harbor a large reservoir of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China. *Microbial Ecology* 64, 187–199.

Zogg GP, Zak DR, Ringelberg DB, White DC, MacDonald NW, Pregitzer KS. (1997): Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 475-481.

http:1: <http://www.matud.iif.hu/06jun/12.html> (Hozzáférés ideje : 2024. február)

http:2: <https://www.bfnp.hu/hu/tajvedelmi-korzetekrol/hevizi-to-tt-hu#partnerek?dataStoreId=> (Hozzáférés ideje : 2024. április)

http:3: <https://www.spaheviz.hu/rovatok/hevizi-gyogyto>, <https://www.spaheviz.hu/rovatok/hevizi-gyogyszap> (Hozzáférés ideje: 2024. április)

http:4: https://www.antsz.hu/felso_menu/rolunk/sajto/sajtokozlemenyek/160418_oek_modszertani_level_mrk.html (Hozzáférés ideje: 2024. március)

Nyilatkozatok

NYILATKOZAT

Dzsudzsák Emília Laura hallgató (Neptun azonosítója: ABU0ZV) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: Gödöllő, 2024 év október hó 30. nap


belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Dzsudzsák Emília Laura
A Hallgató Neptun kódja: ABU0ZV
A dolgozat címe: A hévízi törpenövesű vadponty (*C. carpio carpio morpha hungaricus*) mikrobiom analízise
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Környezetbiztonsági Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumba. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumban.

Kelt: Gödöllő, 2024. 10. 29.

Hallgató aláírása

1. sz. melléklet

A faj szintű identifikáció eredményei

mintajel	minta eredete	izolálás	16S PCR	fajok (16S rDNA)	egyezés
HPS-1	EDIT_HP3_EMB_1	+	+	Citrobacter europaeus	99,18
HPS-2	EDIT_HP3_EMB_2	+	+	UTMB_s	99,19
HPS-3	EDIT_HP3_EMB_3	+	+	Citrobacter europaeus	99,65
HPS-4	EDIT_HP3_LB_1	+	+	Aeromonas veronii	99,32
HPS-5	EDIT_HP3_LB_2	+	+	Aeromonas veronii	99,51
HPS-6	EDIT_HP3_R2A_1	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-7	EDIT_HP3_R2A_2	+	+	Aeromonas veronii	99,65
HPS-8	EDIT_HP3_TGE_1	+	+	Aeromonas veronii	99,08
HPS-9	EDIT_HP3_TGE_2	+	+	Aeromonas veronii	99,05
HPS-10	EDIT_HP3_TGE_3	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-11	1-R2A-50	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-12	2-R2A-10	+	+	Acinetobacter schindleri	98,14
HPS-13	2-TGE5-10-1	+	+	JUGK_s	97,67
HPS-14	2-TGE5-10-2	+	+	Microbacterium algeriense	99,68
HPS-15	2-TGE5-50	+	+	Pseudomonas extremaustralis	100
HPS-16	3-TGE5-10	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-17	3-TGE5-50-1	+	+	Brevundimonas bullata	99,66
HPS-18	3-TGE5-50-2	+	+	Brevundimonas vesicularis	99,12
HPS-20	3-R2A-10-2	+	+	Rhodococcus cerastii	100
HPS-21	3-R2A-10-3	+	+	Aeromicrobium ponti	99,52
HPS-22	3-R2A-50-1	+	+	Arthrobacter bussei	99,68
HPS-23	3-R2A-50-2	+	+	Arthrobacter bambusae	98,7
HPS-24	3-R2A-50-3	+	+	Paenarthrobacter aurescens	99,76
HPS-25	4-TGE5-10	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-26	4-R2A-10	+	+	Sphingomonas mali	97,43
HPS-27	4-R2A-50	+	+	LMLE_s	98,78
HPS-29	HP3-TGE5	+	+	MOBT_s	99,53
HPS-30	HP4-TGE5	+	+	CABVIN_s	99,68
HPS-31	HP1-G-1	+	+	Enterobacter quasiroffenkampii	99,13
HPS-32	HP1-G-2	+	+	Enterobacter quasiroffenkampii	99,66
HPS-33	HP1-S-1	+	+	Raoultella planticola	99,85
HPS-34	HP1-S-2	+	+	Enterobacter quasiroffenkampii	99,46
HPS-35	HP1-S-3	+	+	Serratia liquefaciens	99,5
HPS-36	HP1-I-1	+	+	Serratia nematodiphila	99,47
HPS-37	HP1-I-2	+	+	Serratia nematodiphila	99,84
HPS-38	HP1-I-3	+	+	Serratia marcescens	99
HPS-39	HP2-S-1	+	+	Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila	98,61
HPS-40	HP2-I-1	+	+	Serratia liquefaciens	99,87
HPS-41	HP2-I-2	+	+	Enterobacter mori	98,79
HPS-42	HP2-I-3	+	+	Raoultella planticola	98,93
HPS-43	HP2-G-1	+	+	Aeromonas caviae	99,51
HPS-44	HP2-G-2	+	+	Serratia liquefaciens	99,88
HPS-45	HP3-S-1	+	+	Citrobacter freundii	99,1
HPS-46	HP3-S-2	+	+	Enterobacter quasiroffenkampii	99,69
HPS-47	HP3-I-1	+	+	Enterobacter quasiroffenkampii	99,64
HPS-48	HP3-I-2	+	+	Klebsiella aerogenes	100
HPS-49	HP3-G-1	+	+	Aeromonas veronii	99,64
HPS-50	HP4-S-1	+	+	Enterobacter quasiroffenkampii	99,27
HPS-51	HP4-S-2	+	+	Glutamicibacter arilaitensis	98,64
HPS-52	HP4-S-3	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-53	HP4-G-1	+	+	Serratia marcescens	98,2
HPS-54	HP7-I-10^2-1	+	+	Ignatzschineria cameli	97,57
HPS-55	HP7-I-10^2-2	+	+	Aeromonas veronii	99,83
HPS-56	HP7-I-10^2-3	+	+	Moellerella wisconsensis	99,65

HPS-57	HP7-I-10 ³ -1	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-58	HP7-I-10 ³ -2	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-59	HP7-G-10 ² -1	+	+	Aeromonas veronii	99,81
HPS-60	HP7-G-10 ² -2	+	+	Aeromonas veronii	98,3
HPS-61	HP7-G-10 ² -3	+	+	Arthrobacter oryzae	99,63
HPS-63	HP7-G-10 ³ -2	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-65	HP8-I-10 ² -2	+	+	Aeromonas veronii	98,94
HPS-66	HP8-I-10 ² -3	+	+	Aeromonas veronii	99,84
HPS-67	HP8-I-10 ² -4	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-70	HP8-G-10 ² -2	+	+	Aeromonas veronii	99,4
HPS-71	HP8-G-10 ³ -1	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-72	HP8-G-10 ³ -2	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-73	HP8-G-10 ³ -3	+	+	Aeromonas veronii	99,62
HPS-74	HP8-S-10 ² -1	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-75	HP8-S-10 ² -2	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-76	HP8-S-10 ⁴ -1	+	+	Micrococcus luteus	99,8
HPS-77	HP9-I-10 ² -1	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-78	HP9-I-10 ² -2	+	+	Aeromonas veronii	99,83
HPS-79	HP9-I-10 ² -3	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-80	HP9-I-10 ² -4	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-81	HP9-I-10 ² -5	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-82	HP7-I-COL-1	+	+	Aeromonas jandaei	99,44
HPS-85	HP7-I-CRE-3	+	+	Aeromonas allosaccharophila	100
HPS-86	HP7-G-CRE-1	+	+	Moellerella wisconsensis	99,52
HPS-88	HP8-I-COL-1	+	+	Aeromonas veronii	99,47
HPS-89	HP8-I-CRE-1	+	+	Citrobacter amalonaticus	98,71
HPS-90	HP8-I-CRE-2	+	+	Aeromonas veronii	99,84
HPS-91	HP8-G-COL-1	+	+	Sphingobium yanoikuyae	99,67
HPS-92	HP8-G-CRE-1	+	+	Aeromonas caviae	100
HPS-96	HP9-G-COL-1	+	+	Aeromonas veronii	99,47
HPS-97	HP9-G-CRE-1	+	+	Aeromonas veronii	100
HPS-100	HP8-I-Cetr	+	+	Aeromonas veronii	98,48
HPS-101	HP8-S-Cetr	+	+	Pseudomonas mosselii	99,39
HPS-102	HP8-G-Cetr	+	+	Aeromonas veronii	99,69