



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus

DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

**GYÓGYSZERMARADVÁNYOK (DIKLOFENÁK,
IBUPROFEN ÉS KARBAMAZEPIN), MINT
MIKROSZENNYEZŐ ANYAGOK BIOLÓGIAI
LEBONTÁSÁRA KÉPES MIKROORGANIZMUSOK
BEAZONOSÍTÁSA „OMIKAI” MÓDSZEREKKEL**

Pápai Márton

2025

Gödöllő

A doktori iskola

megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

tudományága: Környezettudomány

vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika
Tanszékvezető egyetemi tanár
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Környezettudományi Intézet
Talajtani és Agrokémiai Tanszék

Témavezető(k): Dr. Táncsics András
Tanszékvezető egyetemi tanár
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Molekuláris Ökológia Tanszék

Dr. Benedek Tibor
Kutatási és Termelési vezető
Plazmontech Kft.

.....

.....

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető(k) jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	7
1. Bevezetés	8
2. Célkitűzés.....	9
3. Irodalmi áttekintés.....	10
3.1. Gyógyszerhasználat mértéke világszinten	10
3.1.1. Nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID)	12
3.1.1.1. Diklofenák (DIC)	12
3.1.1.2. Ibuprofen (IBU)	13
3.1.2. Antiepileptikumok (AED)	14
3.1.2.1. Karbamazepin (CBZ)	15
3.2. A gyógyszerhatóanyagok környezetbe való kijutása.....	15
3.2.1. A diklofenák (DIC) kijutása a környezetbe.....	17
3.2.2. Az ibuprofen (IBU) kijutása a környezetbe.....	18
3.2.2.1. A karbamazepin (CBZ) kijutása a környezetbe	19
3.3. A gyógyszerhatóanyagok ökototoxicitása	20
3.3.1. NSAID-ok ökototoxicitása	21
3.3.2. A diklofenák ökototoxicitása	22
3.3.3. Az ibuprofen ökototoxicitása.....	23
3.3.4. Antiepileptikumok és a karbamazepin ökototoxicitása	24
3.4. A gyógyszerhatóanyagok eliminációja vizes ökoszisztémákból	25
3.4.1. Fizikai- és kémiai eljárások.....	25
3.4.2. Biológiai eljárások.....	27
3.4.3. Fejlett szennyvízkezelési technikák	28
3.4.4. Diklofenák baktériumokkal történő biodegradációja	30
3.4.5. Ibuprofen baktériumokkal történő biodegradációja.....	31
3.4.6. Karbamazepin baktériumokkal történő biodegradációja	32
4. Anyag és módszertan	34
4.0. Módszertani összefoglaló	34
4.1. Biofilm minták	35
4.2. A potenciálisan diklofenák, ibuprofen és karbamazepin lebontó baktériumok szelektív dúsítása és azonosítása.....	35
4.3. Közösségi DNS kinyerése a dúsítókból, metagenom vizsgálatok	36
4.3.1. A dúsító kultúrák metagenom vizsgálatai	36
4.3.2. A metagenomok összeállítása és feldolgozása.....	37

4.3.3. Genomok meghatározása a metagenomokból (MAGs).....	37
4.4. Gyógyszerhatóanyagbontó baktériumtörzsek izolálása.....	37
4.4.1. A baktérium izolátumok 16S rRNS gén alapú beazonosítása	38
4.5. Izolátumok gyógyszerhatóanyag-bontó képességének a vizsgálata	39
4.5.1. Resazurinos előtesztelés.....	39
4.5.2. HPLC mérések	40
4.5. Bakteriális konzorcium kialakítása és potenciális gyógyszerhatóanyagbontó képességének meghatározása.....	40
4.5.1. Együtt-tenyésztési vizsgálatok	41
4.5.2. A keresztcsíkozásos módszer	41
4.5.3. Agardiffúziós lyuk-teszt.....	41
4.5.4. A bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó hatékonyságának a vizsgálata ásványi tápoldatban; természetes vízmintában és szennyvíz effluensben	42
4.6. Terminális Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálati módszer.....	43
4.6.1. DNS szakaszok felszaporítása PCR segítségével a közösségi T-RFLP analízishez.....	43
4.6.2. A közösségi PCR termék restrikciós emésztése.....	44
4.6.3. Emésztett PCR termék etanolos precipitációja és analízise.....	44
4.7. Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok	45
4.7.1. Baktériumtörzs izolálás és a vizsgált törzs jellemzése	45
4.7.2. 16S rRNS gén szekvenálás és filogenetikai elemzések	46
4.7.3. Teljes genom szekvenálás (WGS) és elemzése.....	46
4.7.4. Filogenetikai fa rekonstrukciók.....	47
4.7.5. Pangenomikai vizsgálat és az új <i>Nocardioideus carbamazepini</i> környezetvédelmi vonatkozása	47
4.7.6. Morfológiai, fiziológiai és biokémiai vizsgálatok	48
4.7.7. Kemotaxonómiai elemzések	49
4.7.8. A CBZ_1 ^T törzs gyógyszerhatóanyag-bontó képességének a vizsgálata.....	50
4.8. A <i>Stenotrophomonas humi</i> DIC_5 törzs diklofenák biotranszformációja során keletkező metabolit meghatározása	50
4.8.1. Kísérlet, mintavétel és elemzés előkészítése.....	50
4.8.2. Célkomponensek elemzése UHPLC-TQ-MS/MS segítségével	51
4.8.3. A bomlástermékek azonosítása LC-MS módszerekkel	51
4.9. A <i>Stenotrophomonas humi</i> DIC_5 törzs diklofenák biotranszformációja során keletkező metabolit ökoltoxiológiai vizsgálata.....	52
4.9.1. <i>Allivibrio fischeri</i> akut biolumineszcencia teszt (Microtox®)	52

4.9.2.1. Zebradániók tartása és petegyűjtése	52
4.9.2.2. Mikroinjektálás	53
4.9.2.3. Az injektált embriók vizsgálata	53
5. Eredmények	54
5.1. Csíraszám becslés a dúsító tenyészetekből	54
5.2. A biofilm baktériumközösségének populáció dinamikája a szelektív dúsítás ideje alatt	55
5.3. Metagenomból összeállított bakteriális genomok rekonstrukciója.....	59
5.4. A dúsított kultúrák baktériumdiverzitása a tenyésztésfüggő megközelítés alapján	61
5.5. Az izolátumok gyógyszerhatóanyag biodegradációs képesség meghatározásának az előtesztelése.....	61
5.6 A vizsgált gyógyszerhatóanyagok hatékony biotranszformációjára képes izolátumok tenyésztési körülményeinek optimalizálása.....	63
5.7. Együtttenyésztési, azaz agardiffúziós lyukteszt és keresztcsíkozásos módszerek eredményei	64
5.8. A kialakított bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyag-bontó képességének és a konzorcium T-RFLP tesztelése ásványi tápoldatban (BHB).....	66
5.9. A kialakított bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyag-bontó képességének és a konzorcium T-RFLP tesztelése természetes vízmintában	67
5.10. A kialakított bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyag-bontó képességének és a konzorcium T-RFLP tesztelése szennyvíz effluensben.....	69
5.11. Az új baktériumfaj - <i>Nocardioides carbamazepini</i> sp. nov.- leírásának bemutatása	72
5.11.1. A <i>Nocardioides</i> sp. CBZ_1 ^T törzs izolálása és filogenetikai jellemzése	72
5.11.2. A <i>Nocardioides</i> sp. CBZ_1 ^T morfológiai jellemzői	74
5.11.3. A CBZ_1 ^T törzs kemotaxonómiai jellemzői.....	74
5.11.4. Fiziológiai és biokémiai jellemzők	75
5.11.5. A CBZ_1 ^T törzs gyógyszerhatóanyag-lebontási képessége	75
5.12. A <i>Stenotrophomonas humi</i> DIC_5 törzs diklofenák biotranszformációs kinetikája és a keletkező metabolit ökotoxicitásának vizsgálata	76
5.12.1. A <i>S. humi</i> DIC_5 törzs diklofenák biotranszformációs termékei.....	77
5.12.2. A diklofenák és a biotranszformációs minták akut toxicitás vizsgálata <i>Allivibrio fischeri</i> tesztorganizmokkal	78
5.12.3. A biotranszformációs minták hatása a mikroinjektált zebradánió embriókra	79
6. Következtetések és javaslatok	83
7. Új tudományos eredmények.....	91

8. Összegzés	92
9. Summary	94
10. Irodalmi jegyzék.....	96
11. Mellékletek	112
12. Köszönetnyilvánítás	123

Rövidítésjegyzék

AED	Antiepileptic Drugs (antiepileptikum gyógyszerszármazékok)
AOP	Advanced Oxidation Process (fejlett oxidációs folyamatok)
BHB	Bushnell-Haas ásványi tápoldat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBZ	carbamazepine (karbamazepin)
DIC	diclofenac (diklofenák)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid trifoszfát
EAOP	Electrochemical Advanced Oxidation Processes (elektrokémiai nagyhatékonyságú oxidációs eljárásokat)
EF	Fentonreakció
GC-MS	Gas Chromatography/Mass Mpectrometry (gázkromatográfia-tömegspektrometria)
IBU	ibuprofen
IC ₅₀	Half-maximal inhibitory concentration
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)
MAGs	Metagenome-Assembled Genomes- metagenomikusan összeszerelt genomok
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug (nem szteroid alapú gyulladáscsökkentő)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PhACs	pharmaceuticals (gyógyszerhatóanyagok)
RNS	ribonukleinsav
RPKM	Reads Per Kilobase Million (kilobázisonkénti olvasás millió leképezett leolvasásonként)
rpm	revolutions per minute (percenkénti fordulatszám)
sp.	species (faj)
TBE	tris puffer
TP	transformation product (átalakulási termék)
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism (terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)
UGI	unique genomic island

1. Bevezetés

Az antropogén tevékenységből a környezetbe kerülő káros anyagok, mind az emberi egészségre, mind pedig a vízi ökoszisztémákra káros hatással vannak. Az édesvízi ökológiai rendszerekben egyre nagyobb koncentrációban kimutatott szennyezőanyagok az emberiség legnagyobb és legégetőbb környezeti problémái közé tartoznak.

A környezetben is jelenlévő, egyre gyakrabban kimutatott, szerves szennyezőanyagok csoportjába a gyógyszerhatóanyagok (PhACs) is beletartoznak. A 2000-es évektől kezdődően egyre nagyobb figyelem kíséri a gyógyszermaradványok vízi környezetben való előfordulását, környezeti hatásukat és a potenciális toxicitásukat. A gyógyszermaradványok legnagyobb mennyiségben a kommunális szennyvíztelepek, a kórházi és az ipari gyártási folyamatok szennyvizeiből származnak. Mivel a mai szennyvíztisztítási eljárások nem elegendőek és alkalmatlanok ezen vegyületek eltávolítására, így nagy mennyiségben a felszíni- illetve felszín alatti vízbázisokba kerülnek és raktározódnak. A gyógyszermaradványok környezetben való jelenlétük akut és krónikus expozíció révén negatív hatással vannak a vízi élőlényekre, amelyekre még csak részben ismert toxikológiai hatásokat fejtenek ki.

Nem áll rendelkezésünkre elég információ a gyógyszerhatóanyagok lehetséges hosszú távú természeti- és közegészségügyi hatásairól. Emiatt elengedhetetlen a környezetben található gyógyszermaradványok mikrobiológiájának, biotranszformációjának és biodegradációjának megértése. Fontos továbbá a végső környezeti sorsuk pontos meghatározása, a kockázatbecslések elvégzése, fenntartható innovatív módszerek kidolgozása a gyorsabb eltávolítás érdekében.

Ennek okán kutatómunkám célja a diklofenák, ibuprofen és karbamazepin lebontó mikroorganizmusok dúsítása, izolálása és fajszerű beazonosítása, valamint a vizsgált gyógyszerhatóanyagok potenciális lebontására képes bakteriális törzsgyűjtemény létrehozása. A leghatékonyabb biodetoxifikációra képes izolátumokból egy bakteriális konzorcium kialakítása és vizsgálata természetes vízmintában, illetve elfolyó szennyvízben. A fenti célok eléréséhez tenyésztéstől függő mikrobiológiai módszereket és tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszereket alkalmaztam, illetve nagyműszeres analitikai eljárással határoztam meg a gyógyszerhatóanyagok biodegradációjának mértékét. A kutatás hosszú távú célja egy fenntartható és költséghatékony biotechnológiai megoldás kifejlesztése gyógyszermaradványok koncentrációjának csökkentésére.

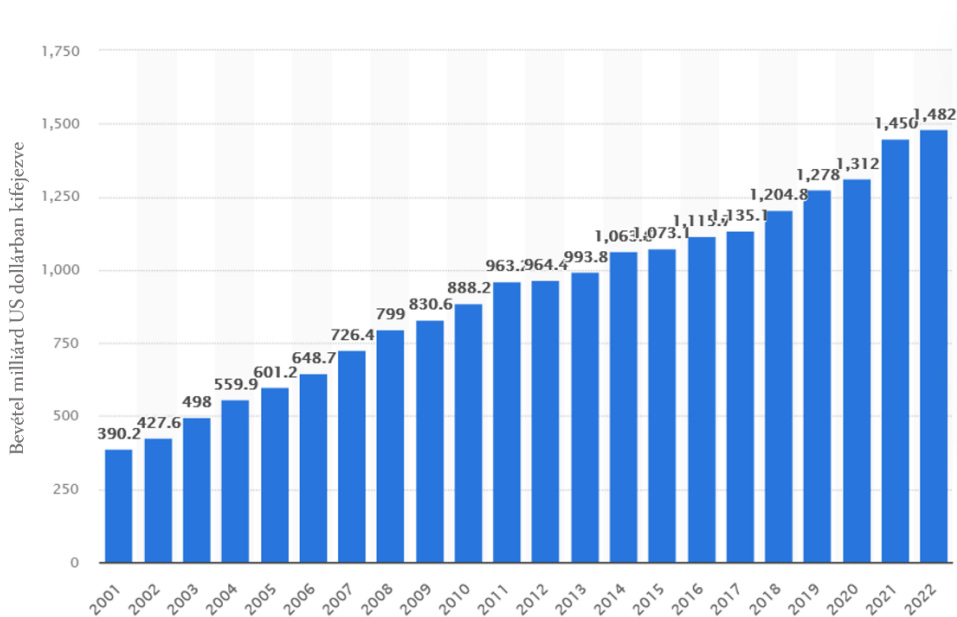
2. Célkitűzés

- A kutatás alapkérdése volt, hogy mely baktériumok képesek diklofenák, ibuprofen és karbamazepin bontására. Egy előzőleg már széleskörben vizsgált bakteriális biofilmből célom volt szelektíven felszaporítani és újgenerációs szekvenálási módszerekkel (metagenom elemzés) beazonosítani a potenciálisan gyógyszerhatóanyagbontó mikroorganizmusokat (Bacteria).
- A kutatás további célja volt, hogy a kísérletek során a környezeti mintából felszaporított, beazonosított, potenciálisan a diklofenák, ibuprofen és karbamazepin bontására képes autochton baktériumtörzseket izoláljak, fajsinten azonosítsak és gyógyszerhatóanyag biodegradáció/biodetoxifikáció tekintetében teszteljem.
- Célom volt a leghatékonyabb gyógyszerhatóanyagbontó baktériumtörzsek teljes genomjának elemzése metabolikus képességeinek feltárása.
- A leghatékonyabb gyógyszerhatóanyagbontó baktériumtörzsekből további célom volt egy bakteriális konzorcium kialakítása, mely tesztelésre került természetes vízmintában és szennyvíz effluensben egyaránt

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Gyógyszerhasználat mértéke világszinten

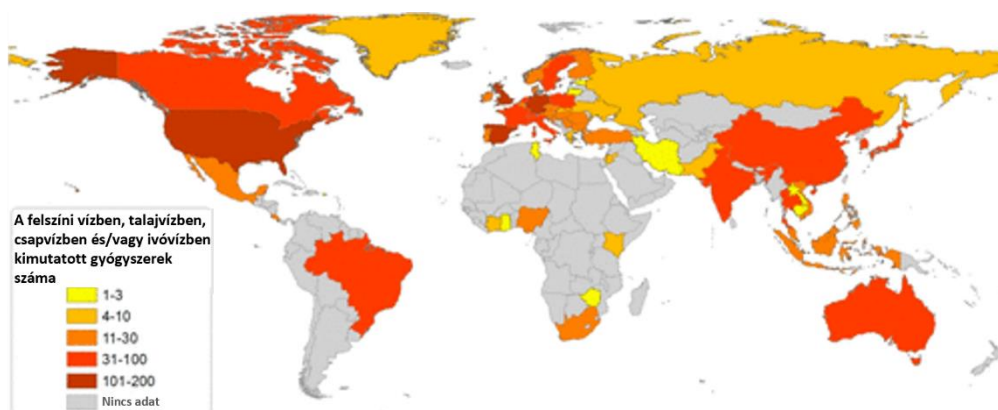
A modern orvoslás gyakorlata elképzelhetetlen gyógyszerek alkalmazása nélkül. Az egészségügyi szektorba való befektetések, a kutatások fejlesztése, az átfogó globális piaci elérhetőség és a világ népességének robbanásszerű ugrása példátlan mértékű növekedést okozott a gyógyszerek fogyasztásának, kibocsátásának és felhalmozódásának terén a környezetben (Van Boeckel et al., 2014). Csak az európai piacon több, mint 3000-féle gyógyszerkészítmény van jelen. Jelenleg körülbelül 4000 gyógyszerhatóanyag érhető el a globális piacon, éves globális fogyasztásuk közel 100 000 tonna/év (Lindim et al., 2017). A globális gyógyszeripari kiadások 2001-es adatai szerint 390 milliárd dollár volt, ami 2018-ra 1,2 billió dollárra nőtt és becslések szerint 2023-ra elérheti a 1,5 billió dollárt (IQVIA 2019). A legfrissebb 2023-as adatok alapján a becslés helytálónak bizonyult, ahogy azt az 1. ábra mutatja be (Mikulic 2023).



1. ábra A globális gyógyszeripari kiadások adatai 2001-től 2022-ig (Mikulic 2023)

A globális gyógyszerfogyasztással egyidejűleg a gyógyszermaradványok koncentrációja is egyre csak növekedni fog a környezetben (Silori et al., 2022). A gyógyszermaradványok mindenütt jelenlévő, egyre gyakrabban kimutatott szennyező anyagok és napjainkban az egyik leginkább aggasztó környezeti problémát jelentik (Khan et al., 2022a). Egy áttekintő tanulmány során Patel és munkatársai (2019) nyilvánvalóvá tették a gyógyszermaradványok előfordulását vízi (Miller et al., 2018) és szárazföldi (Kim et al., 2011) ökoszisztémákban az Európai Unióban

(Loos et al., 2013), az Egyesült Államokban (Kostich et al., 2014) és Kínában (Liu & Wong, 2013). Emellett egyre szélesebb körben jelennek meg a geoszférában (Riaz et al., 2018; Grenni et al., 2018) és a bioszférában (Wu et al., 2015; Bartrons et al., 2017) egyaránt. A közelmúltban a német Szövetségi Környezetvédelmi Ügynökség egyik kutató csoportja alaposan áttekintette (2. ábra) és összeállította a gyógyszer előfordulási adatokat 71 országban (Beek et al., 2016). Egy, a gyógyszerhatóanyagok jelenlétét vizsgáló ügynökség a világ 75 országából származó adatokat tekintette át. Összesen 1519 publikációból 178708 adatbejegyzést vizsgáltak meg (Eike et al., 2019). A felmérés szerint világszerte 771 gyógyszerhatóanyagot vagy azok metabolitjait mutatták ki; az EU-ban 596-ot. A kimutatott gyógyszermaradványok túlnyomó többségét a szennyvíztisztító telepek szennyvizeiben jelentették. A tanulmány szerint 19 anyagot mutattak ki a felszíni vizekben, a talajvízben vagy ivóvízben mind az öt ENSZ-régióban. A nyugat-európai, latin-amerikai és karibi országcsoportokban a leggyakrabban kimutatott gyógyszerek a diklofenák (DIC), az ibuprofen (IBU) és a karbamazepin (CBZ) voltak.



2. ábra Gyógyszeripari anyagok globális kimutatása ivóvízben/csapvízben, felszín alatti és felszíni vizekben (Beek et al., 2016)

A DIC, az IBU és a CBZ a leggyakrabban észlelt gyógyszerhatóanyagok az édesvízi ökoszisztémákban világszerte is. Ezek a vegyületek felszíni, talaj és ivóvízben is kimutathatóak (Lapworth és mtsai., 2012; Carmona és mtsai., 2014). A gyógyszermaradványok egyre nagyobb figyelmet kapnak, mivel káros hatással lehetnek a vízi szervezetekre (Loos és mtsai., 2013; Küster és Adler, 2014). Khan és munkatársai által közölt (2022b) tanulmány is alátámasztja, amelyben aggályaikat fejezik ki az ivóvízben megtalálható gyógyszerhatóanyagok emberi szervezetre gyakorolt negatív hatássukkal szemben. Annak ellenére, hogy a koncentrációjuk az ivóvízben a ng/l^{-1} tartományba esik, ami jóval alacsonyabb, mint a terápiás dózisok, fontos

problémát vet fel, mivel ezeknek a mennyiségeknek az emberi egészségre gyakorolt hosszú távú hatásai még mindig nem ismertek (Kim és mtsai., 2015).

3.1.1. Nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID)

A nem szteroid gyulladáscsökkentők az egyik legszélesebb körben és leggyakrabban alkalmazott fájdalomcsillapítók (Abdulla et al., 2013). A NSAID-ok legfőbb alkalmazási területe a mozgásszervi fájdalmak enyhítése, azonban használják lázcsillapításra, menstruációs görcsökre, fogorvosi műtétek alkalmával és fejfájásra egyaránt (Sütő 2019).

A prosztaglandinok hormonszerű vegyi anyagok a szervezetben, amelyek hozzájárulnak a gyulladás, a fájdalom és a lázhoz azáltal, hogy kitágítják az ereket, ezzel emelve a test hőmérsékletét. A prosztaglandinok termelésének csökkentésével a NSAID-ok segítenek enyhíteni a láz okozta kellemetlenséget, valamint mérsékelik a gyulladást és a vele járó fájdalmat. Számos olyan állapot tüneteinek enyhítésére használják, ahol fájdalom és gyulladás jelentkezik (Machado et al., 2017).

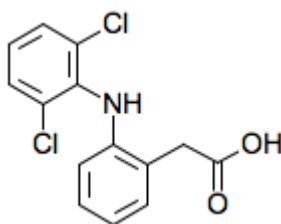
A NSAID-ok nagyon hatékonyak bizonyultak a fájdalom és a gyulladás csökkentésében, így széles körben alkalmazzák őket vény nélkül is. Az alacsony fogyasztói árak és kockázatok miatt fennáll a túlzott, előírásoknak nem megfelelő használat lehetősége. Az életkor előrehaladtával az idősebb használóknál nagyobb a szív- és érrendszeri, légúti gyulladás, gyomornyálkahártya fertőzése, vese- és májszövődmények kockázata (Wongrakpanich et al., 2018).

Másik probléma a környezetbe kikerülő NSAID-ok nagy mennyiségben történő felhalmozódása. A gyógyszermaradványok pseudoperzisztensek, mivel folyamatosan áramlanak a környezeti mátrixokba. Az oldhatóságuk, felszívódásuk, illékonyaságuk, biológiai lebomlásuk, polaritásuk és stabilitásuk széles tartományban változnak (Le-Minh et al., 2010). Azonban annak ellenére, hogy folyamatosan bomlanak és különböző eljárásokkal igyekeznek eltávolítani őket, így is felhalmozódnak a természetes mátrixokban (Ebele et al., 2017). Nagyon alacsony (ng/l - µg/l) koncentrációban is aktívak, ami ökotoxikus hatással lehet a környezetre (Rastogi et al., 2021).

3.1.1.1. Diklofenák (DIC)

A diklofenák (DIC) (2. ábra) egy nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer, amelynek kémiai képlete $C_{20}H_{15}Cl_2N_2O_3$ és molekulatömege 296,149 g/mol. A DIC a fenil-ecetsav osztályból származik, gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító és lázcsillapító tulajdonságokkal rendelkezik. Az egyik legszélesebb körben felírt NSAID világszerte (McGettigan & Henry,

2013). Az 1973-as bevezetése óta sok erőfeszítést tettek a különböző diklofenák termékek fejlesztésére. Napjainkban a leggyakrabban alkalmazott diklofenák sók közé tartozik a diklofenák nátrium és kálium sója. A diklofenák-nátrium előnyei közé tartozik, hogy *in vitro* nem akadályozzák meg a proteoglikánok szintézisét a porcokban terápiás koncentrációkban. A diklofenák-kálium fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatását hamarabb kifejti a jobb vízdékonyságának köszönhetően. Hatékony megfázás és influenza tüneteinek kezelésére beleértve a lázat is. Sokféle formában alkalmazhatóak ezek a gyógyszerhatóanyagok; tabletták, lágy gél kapszulák és por szájon át történő bevitelével (Altman et al., 2015).



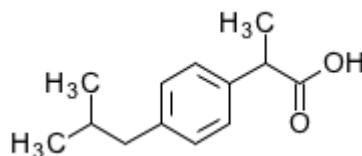
3. ábra A diklofenák szerkezete ([http 1](http://1))

Az egyik legnépszerűbb fájdalomcsillapítót széles körben használják humán egészségügyi ellátásban, egyénenként 195 és 940 mg közötti éves fogyasztás mellett (McGettigan & Henry, 2013). 86 országból származó egészségügyi adatok becslése szerint körülbelül 1309 tonna diklofenakot fogyasztanak el világszerte, ahol Ázsia fogyasztása az összesnek 40%-át, míg Európa 29%-át teszi ki (Acuña et al., 2015). Franciaország összes fájdalomcsillapító fogyasztásának 30,04%-át a diklofenák tette ki 2016-ban (Skaisté et al., 2018). Azonban ezek az adatok csak a humán gyógyászatból származó adatok, az állatgyógyászatban használt mennyiségekre vonatkozó adatok hiányosak (Lonappan et al., 2016).

3.1.1.2. Ibuprofen (IBU)

Az ibuprofen (IBU) (3. ábra) szintén egy nem szteroid alapú gyulladáscsökkentő gyógyszer (NSAID). Az ibuprofen propionsav-származék, fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő és lázcsillapító hatással rendelkezik. Enyhe-közepes fájdalom, láz kezelésére, valamint az arthrózis (porckopás), a reumatoid arthritisz, Bechterew-kór, köszvény, Bartter-szindróma esetén is hatásos, illetve a menstruációs görcsök tüneteinek enyhítésére használják (Wahbi et al., 2005). A COX-1 és COX-2 enzimek a ciklooxygenázok, amelyek szerepet játszanak a prosztaglandinok szintézisében. A prosztaglandinok fontosak a gyulladásos válasz, a fájdalom, a láz és más fiziológiai folyamatok szabályozásában. Az ibuprofen a COX-1 és a COX-2 aktivitásának gátlásával fejt ki a hatását, ezáltal gátolja a

prostaglandinok és tromboxán termelését (Chavez & DeKorte, 2003). A vegyület befolyásolhatja az immunmechanizmusokat. A humorális mechanizmusok nincsenek közvetlenül befolyásolva, viszont az ibuprofen magas koncentrációja megzavarhatja a perifériás limfociták és timociták sejtmembránjait. Ezzel befolyásolva a receptorhely felismerését (Famaey & Whitehouse, 1973).



4. ábra Az ibuprofen szerkezete (<http> 2)

Az Egyesült Királyság alapellátásában 2007-ben 4,5 millió receptet írtak fel ibuprofenre, leggyakrabban 400 mg-os tablettát (2,6 millió) értékesítettek a gyógyszertárak. Ezek a számok nem tartalmazzák a vény nélkül kapható készítményeket (Hawkins et al., 2007). Az ibuprofen tartalmú gyógyszerek 2019-ben a 35. helyen szerepelnek a legtöbbször felírt gyógyszerek listáján az Egyesült Államokban. Több, mint 21 millió receptet adtak ki a felhasználók részére (<http> 4.). A gyógyászati céllal felhasznált IBU legfeljebb 15%-a változatlan formában ürül ki. A környezeti mintákban ng/l és µg/l között találhatóak meg, beleértve a szennyvizet, felszíni vizeket, talajvizeket vagy tengervizet (Chopra & Kumar, 2020).

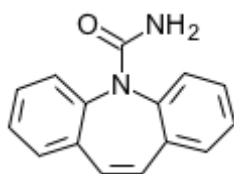
3.1.2. Antiepileptikumok (AED)

Az antiepileptikumok az epilepsziás rohamok gyakoriságának csökkentésére és tüneteinek mérséklésére használt gyógyszerek csoportja. Tudományosan nem bizonyították, hogy az AED-k képesek kigyógyítani az epilepsziás betegeket a rohamokból. A karbamazepint 1963-ban alkalmazták először gyógyszerként és azóta széles körben használják epilepszia, neuropátiás fájdalom és egyéb neurológiai állapotok kezelésére. Az 1990-es évek közepe óta újabb vagy második generációs AED-k váltak elérhetővé, köztük a közelmúltban két különböző, de szerkezetileg rokon vegyület: az oxkarbazepin és az eszlikarbazepin-acetát. A karbamazepin különböző formáival és az általános készítményekkel együtt ez azt jelenti, hogy a klinikusok számos lehetőség közül választhatnak az AED ezen osztályán belül (Gierbolini et al., 2016). Azonban általános az egyetértés, hogy nincs szignifikáns különbség a hatékonyságban a régi és az új AED-ek között. Mindegyik hasonló hatékonyaggal csökkenti a részleges rohamokat, így a hatásfok nem megkülönböztető tényező a különböző AED-ek között (Benbadis et al., 2014). Az epilepszia az egyik leggyakoribb krónikus neurológiai

rendellenesség, amely a lakosság közel 1%-át érinti világszerte, különösen a fejlődő országokban (Duncan et al., 2006). Az agyi neuronok szuperszinkron kisülései okozzák a visszatérő epilepsziás rohamokat (Manford 2017).

3.1.2.1. Karbamazepin (CBZ)

A karbamazepin (CBZ) (5. ábra) az egyik legrégebbi antiepileptikus gyógyszer, mind az Egyesült Államokban, mind világszerte. A neurológusok nagyon jól ismerik hatékonyságának spektrumát, előnyeit és korlátait és ennek eredményeként az egyik leggyakrabban használt AED (Gierbolini et al., 2016). A CBZ farmakológiai hatását a feszültségfüggő nátriumcsatorna inaktívált állapotának kötődésével és stabilizálásával fejt ki. A nátriumcsatornák három alapállapot között keringenek a depolarizációs szakaszban, így lehetnek nyugalmi, nyitott és inaktív állapotban. A karbamazepin megakadályozza, hogy a csatorna visszatérjen a nyugalmi formájába, amely érzékennyé válik a depolarizációra és az ezt követő ismétlődő neuronok stimulálására. A gyógyszer az inaktív állapotban kötődik a nátriumcsatornához lassítva a ciklikus folyamatot, a csatorna közvetítő szerepét (Elliott 1990; Löscher et al., 2020).



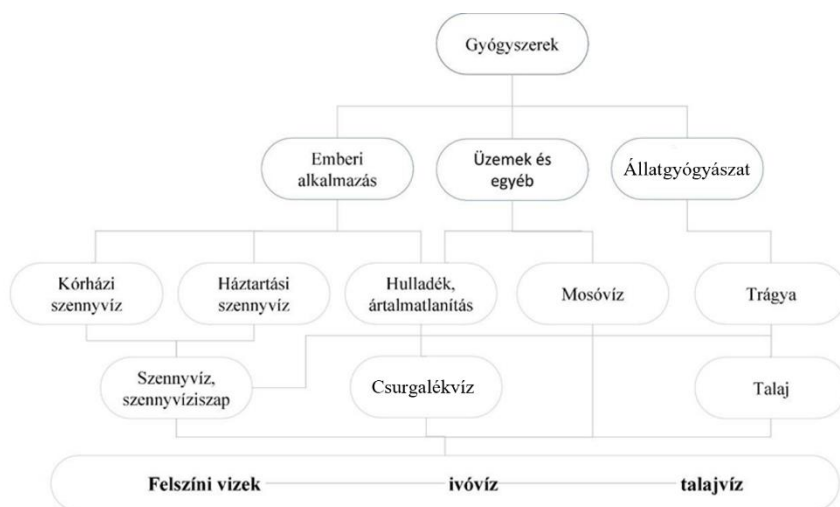
5. ábra A karbamazepin szerkezete (http 3)

In vivo a karbamazepin nem teljesen szívódik fel a gyomor-bél traktusokban, az orális dózis 20-30%-a változatlan formában kiválasztódik a széklettel, míg a kiindulási vegyület <3 %-a ürül vizelettel (Patsalos et al., 2008). A 90-es évektől kezdődően egyre szélesebb körben egyre több esetben alkalmazták a karbamazepint, ennek köszönhetően a fogyasztása 2015-re 1214 tonnára emelkedett világszinten (Oldenkamp et al., 2019). A karbamazepin terápiás dózisa általában napi 400 mg és 1200 mg között van. Ezt meghaladó adagolás esetén toxikus hatásokról beszélhetünk, mely bőrgyógyászati, hematológiai és neurológiai mellékhatásokat vonhat maga után (Maan és Saadabadi, 2021).

3.2. A gyógyszerhatóanyagok környezetbe való kijutása

A gyógyszerek és metabolitjaik pontszerű és nem pontszerű forrásokból folyamatosan kerülnek a környezetbe (Defra 2007). A vízi rendszerekben lévő gyógyszermaradványok legnagyobb része emberi felhasználásból származnak. A fel nem használt és lejárt gyógyszerek a mosdókagylókba, lefolyókba, WC-kbe öblítéssel vagy a háztartási hulladékkal együtt

kerülnek a környezetbe. A háztartási szemétbe dobott gyógyszerek hulladéklerakókba kerülnek. Innen a talajvíz csurgalékanyagává válnak, ha a hulladéklerakók nincsenek rendesen lezárva. A mezőgazdasági területeken műtrágyaként kijuttatott iszapok szennyező anyagai a felszíni és talajvízrendszerekbe kerülhetnek. A háztartási szennyvizek jelentik a környezet gyógyszermaradvány szennyezésének legnagyobb mértékét. A sok gyógyszer nagy koncentrációjú keverékét tartalmazó kórházi szennyvíz a második legnagyobb kibocsátó forrás. A gyógyszerek és metabolitjaik állati felhasználása miatt az állattenyésztés a harmadik legnagyobb kibocsátási forrás (Beek et al., 2016). A gyógyszergyártás, az akvakultúra és a mezőgazdasági öntözés is jelentősen hozzájárul a szennyezés mértékéhez (6. ábra).



6. ábra A gyógyszerhatóanyagok és azok maradványainak a környezetbe való kijutásának forrásai és természetes vizekbe vezető útvonalai (saját ábra)

A gyógyszergyártás pontszerű szennyeződés forrás, amely kifejezetten a gyártás helyére lokalizálódik. Azonban a gyártóegységek gondot jelentenek a rendkívül magas kiáramlási koncentráció miatt. A fejlődő országoknál ez jelentősebb probléma, mivel nem rendelkeznek megfelelő ipari szennyvízkezeléssel. Indiában 31 mg/l maximális ciprofloxacín koncentrációt jelentettek a kifolyó vizekben (Larsson et al., 2007). A pakisztáni Lahor-ban magas koncentrációban ciprofloxacín (3,0-5,25 mg/l) és doxiciklin (1,58-6,75 mg/l) kerültek rögzítésre a gyógyszergyár egységeinek szennyvizében (Hussein et al., 2016).

Azonban a fejlett országokban, mint például Kanadában és az Egyesült Államokban is magas gyógyszerkoncentrációkról számoltak be. Magas etaxalon (3800 µg/l) és oxikodon (1700 µg/l) koncentrációkat jelentettek az USA-beli New York-i szennyvíztisztító telepen (Phillips et al., 2010). Fájdalomcsillapítók (acetaminofen 461 000 ng/l; kodein 49 200 ng/l), antibiotikumok (penicillin 14 300 ng/l), vérnyomáscsökkentő szerek (diltiazem 1 160 000 ng/l) és szív- és érrendszeri betegségek kezelésére használt szerek (metoprolol 7 333 600 ng/l)

jelenlétét fedezték fel öt gyártási létesítmény szennyvíz kifolyójában a kanadai Ontario államban (Kleywegt et al., 2019). A gyógyszerek gyártása során keletkező szennyvizek általában 10-1000-szer magasabb gyógyszerkoncentrációkat tartalmaznak, mint más szennyvizek. Ez egyértelműen bizonyítja, hogy a gyógyszergyárak jelentik a legnagyobb gyógyszermaradvány forráspontokat.

Állatorvosi célokra érzéstelenítőket, antibiotikumokat, gyulladáscsökkentőket, hormonokat és nyugtatókat használnak (Bártíková et al., 2016). Az állattenyésztésben alkalmazott kiindulási gyógyszerek és metabolitjaik az állatok vizeletével és ürülékével kerülhetnek a környezetbe. Az akvakultúrákban a gyógyszereket haleledelbe keverve alkalmazzák, a pozitív hatás eléréséhez nagy mennyiségben tartalmazzák a tápok a vegyületeket (Mo et al., 2017). Az állattenyésztés és az akvakultúra kiemelkedő iparágak főképp a fejlődő országokban, ahol az előírások nem szabályozzák megfelelően az alkalmazott gyógyszerek mennyiségét.

Habár a felsorolt utakon kívül számos más forrása lehet a gyógyszerek környezetbe való kijutásának úgy, mint a gyógyszerrel kezelt állatok tetemének nem megfelelő elhelyezése, gyógyszerek szállítása során keletkezett hulladékok, csomagolási maradékok, illetve az illegális használtból származó szennyezések mennyisége (Gerencsérné et al., 2015). Ezekkel kapcsolatban azonban nem rendelkezünk megfelelő információkkal, hogy meg lehessen becsülni károsító hatásuknak mértékét.

3.2.1. A diklofenák (DIC) kijutása a környezetbe

A diklofenák esetében a hatóanyagot tartalmazó termékek nagy része vényköteles, azonban számos készítmény vény nélkül is kiváltható. A diklofenák nemcsak a WHO Esszenciális Gyógyszerlistáján szerepel, hanem a környezetben kimutatott 20 leggyakoribb gyógyszer között is megtalálható (Acuña et al., 2015). A diklofenákot a világ egyik leggyakrabban alkalmazott fájdalomcsillapítójaként tartják számon. A diklofenák általánosan alkalmazott beadási módjai az orális, intramuszkuláris, intravénás, transzdermális és a rektális. Vizelettel és széklettel ürül, főként metabolitjai formájában. A szennyvíztisztító telepeken végzett tökéletlen eltávolítás (21-40%-os) azt eredményezte, hogy a diklofenák és metabolitjai világszerte megtalálhatók a víztestekben (Di Lorenzo et al., 2021). Koncentrációja átlagosan a környezetben 45 ng/l-15 µg/l között figyelhető meg (Hanif et al., 2020).

Daspoort-ban (Dél-Afrika) a maximális gyógyszerkoncentráció a szennyvíztisztító telepbe befolyó és kifolyó vízben 246,3 és 243,6 ng/l volt a diklofenák esetében (1. táblázat). Szintén ebben a tanulmányban meghatározták a gyógyszer koncentrációkat a folyóvizekben, a

szennyvíztisztító teleptől feljebb és lejjebb a folyásirány mentén. Az átlagos koncentrációk diklofenák esetén 20,4 és 17,8 ng/l között voltak (Mhuka et al., 2020). Továbbá, Európa több országában, például Németországban (Kunkel & Radke, 2012), Csehországban (Lacine et al., 2013) és az Egyesült Királyságban (Kay et al., 2017) a diklofenák koncentrációja a felszíni vízmintákban az ökotoxikus szintet (Hoeger et al., 2005) meghaladó értékben volt jelen. Egy átfogó tanulmány során Amerika felszíni vizeiben vizsgálták a gyógyszerhatóanyagok előfordulását. Összesen 93 gyógyszerről számoltak be, melyből számos fájdalomcsillapító hatású volt. A diklofenák is megtalálható az USA felszíni vizeiben átlagos 42 ng/l koncentrációban (F). Egy kanadai szennyvíztisztító telepen magas, 64.89 µg/l koncentrációban észleltek diklofenákot a szennyvíz influensben. Ennek oka a gyógyszer magas fogyasztási gyakorisága, illetve a környéken található számos korház szennyvize, mely a szennyvíztelepre érkezik be. A telep kifolyó vize körülbelül 16 µg/l diklofenákot tartalmazott, így összességében az üzem csak 75%-ban képes eltávolítani a diklofenákot a tisztítási folyamat során (Lonappan et al., 2016). Magyarországon a szentendrei Duna vízében 70 és 442 ng/L közötti koncentrációban mértek diklofenákot, míg a csepeli részen hasonló értékeket, 59-418 ng/L-t mutattak ki (Jakab et al., 2020).

1. táblázat A vizsgált gyógyszerhatóanyagok koncentrációja vízmintákban

Ország	Víz típus	Gyógyszerhatóanyag	Mennyiség	Hivatkozás
Dél-Afrika	Szennyvíz befolyó	diklofenák	246.3 ng/l	Mhuka et al., 2020
	Felszíni vízfolyás		20.4 ng/l	Mhuka et al., 2020
	Szennyvíztisztító telep	ibuprofen	1.38 µg/l	Guerra et al., 2014
Németország	Felszíni vízfolyás	diklofenák	45 ng/l	Kunkel & Radke, 2012
	Szennyvíz kifolyó	karbamazepin	395-2100 ng/l	Meyer et al., 2016
	Felszíni vízminta		370 ng/l	
Egyesült Államok	Felszíni vízminta	diklofenák	42 ng/l	Deo 2014
Kanada	Szennyvíztisztító telep	diklofenák	64.89 µg/l	Lonappan et al., 2016
		ibuprofen	45 µg/l	Guerra et al., 2014
India	Felszíni vízminta	karbamazepin	13 ng/l	Ramaswamy et al., 2011
Magyarország	Felszíni vízminták	ibuprofen	4-110 ng/l	Gerencsérné et al., 2015
		diklofenák	20-931 ng/l	
		karbamazepin	30.4–272.6 ng/L	József et al., 2023

Ezek alapján nem csak új eliminációs módszerekre van szükség, hanem a gyógyszermaradványok fenntartható kezelésére is. Például a megmaradt gyógyszerek

megfelelő gyűjtése és ártalmatlanítása; gyógyszermaradványok és ipari szennyvizek szigorú ellenőrzése (Deo 2014).

3.2.2. Az ibuprofen (IBU) kijutása a környezetbe

A diklofenákhoz képest az ibuprofen tartalmú gyógyszerkészítmények többsége vény nélkül kaphatóak. Ennek okán nem meglepő, hogy a szennyvizekben kimutatott 20 leggyakoribb gyógyszerhatóanyag között az ibuprofen is szerepel (Kleemiss et al., 2020). Az ibuprofen gyorsan és szinte teljesen metabolizálódik a szervezetben, a vizeletben változatlan formában alig található. Csehország területén végzett kutatás (Březinova et al., 2018) is alátámasztja ezt az állítást, mely során az ibuprofen metabolitjait nagyobb koncentrációban mutatták ki a nyers szennyvízben, mint a kiindulási vegyületet.

Számos kutatócsoport foglalkozik az ibuprofen detektálásával talajvíz, felszíni víz, szennyvíz, illetve csapvíz mintákból a világ minden egyes részén. A felmérések azt mutatják, hogy a koncentráció a különböző országokban változik, azonban a vízi környezeti minták esetében a koncentrációk általában $\mu\text{g/l}$ nagyságúak. Szennyvíztisztító telepeken az ibuprofen 0.004-603 $\mu\text{g/l}$ koncentrációban mutatták ki Boszniában, Horvátországban, Görögországban, Kínában, Koreában, Svédországban, Svájcban és az Egyesült Királyságban (Luo et al., 2014). Kanadában (45 $\mu\text{g/l}$), Dél-Afrikában (1,38 $\mu\text{g/l}$) és Pakisztánban (1673 $\mu\text{g/l}$) jelentettek különböző koncentrációkat a szennyvízmintákban (1. táblázat) (Guerra et al., 2014). A felszíni vízminták esetében az átlagos koncentrációk az alábbiak voltak a vizsgált országokban: Kanadában (0,98 $\mu\text{g/l}$), Franciaországban (8,0 $\mu\text{g/l}$), Kínában (1417 $\mu\text{g/l}$) és Koreában (414 $\mu\text{g/l}$) (Almeida et al., 2013; Luo et al., 2014). Az előbbi adatokból jól látszik, hogy az ibuprofen koncentrációja az ökoszisztémában attól függ, hogy az egyes országok milyen kezelési módokat részesítenek előnyben az orvoslásban, illetve milyen szigorú szabályok vonatkoznak a gyógyszerek kibocsájtására, fogyasztására és semlegesítésére (Jan-Roblero & Cruz-Maya 2023).

A kutatások és eredményeik összhangban vannak azzal az általános ténnyel, hogy az ibuprofen és metabolitjai nem távolíthatóak el hatékonyan aerob vagy anaerob körülmények között a szennyvíztisztító telepeken, megerősítve azt a tény, hogy új eljárásokra van szükség a gyógyszerhatóanyagok és metabolitjaik megfelelő eltávolításához (Březinova et al., 2018; Ajibola et al., 2021).

3.2.2.1. A karbamazepin (CBZ) kijutása a környezetbe

Az antiepileptikumok csoportjába tartozó gyógyszerhatóanyag a karbamazepin, melynek lebomlása élő szervezetben a májban történik. A hatóanyag adagolásától függően körülbelül

25-65 óra eliminációs felezési idővel rendelkeznek. Az orálisan beszedett karbamazepin esetében a vizelettel 72%-a, míg a széklettel 28%-a ürül ki a szervezetből, mely a szennyvízbe kerül, majd az élő víztestekbe. A kikerült vegyület biológiai úton keresztül alig bontható, mivel a környezetben alacsony koncentrációban nem képesek a mikroorganizmusok lebontó mechanizmusai hatásosan eltávolítani a karbamazepint (Metcalf et al., 2003; Zhang et al., 2008). Illetve a karbamazepin molekuláris szerkezetének és kémiai tulajdonságainak köszönhetően perzisztenciát mutatott a hagyományos kezelési eljárásokkal szemben (Hai et al., 2018).

A karbamazepint eredetileg epilepsziás rohamok enyhítésére fejlesztették ki, azonban jelenleg számos egyéb egészségügyi kezelés során alkalmazzák, például krónikus görcsök kezelésére (Hansen 1999). A karbamazepin az egyik leggyakrabban kimutatott gyógyszermaradvány a környezeti rendszerekben (Luo et al., 2014), illetve nyers szennyvízben is jelen van ng/l és µg/l koncentráció közötti tartományokban. India víztesteinek átfogó tanulmányozása során 13,0 ng/l koncentrációjú karbamazepint (1. táblázat) mutattak ki a Kaveri folyóban (Ramaswamy et al., 2011). A szentendrei Dunából vett mintákban 40 ng/L, míg a csepeli Dunából vett mintákban 54 ng/L maximális koncentrációt mértek Magyarországon (Jakab et al., 2020). Egy német kutatás során a települési szennyvíz másodlagos kibocsátásának hatását nézték három gyógyszerhatóanyagra kis és közepes folyókban összehasonlítva a mért környezeti koncentrációkkal. A másodlagos szennyvizekben a karbamazepin 395-2100 ng/l koncentrációban volt jelen, míg a kibocsátott helyektől lefelé a folyókban 370 ng/l-re csökkent (Meyer et al., 2016). Azonban így is a karbamazepin koncentrációja (<5 és 451 ng/l) magasabb volt a négy koreai tisztítótelep másodlagos szennyvizében tapasztaltakéhoz képest (Choi et al., 2008).

Alternatív megoldásként a talajt, mint harmadlagos szűrőként használják fel a gyógyszerhatóanyagok eltávolítására. Ennek tesztelését karbamazepinnel végezték el, mely során megfigyelték, hogy a talaj felső 30 cm-ében jelenik meg a vegyület nagy része. Illetve a talajok adszorbeálják a CBZ-t, ezzel lassítva a talajvízben való mozgását (Walker et al., 2012).

3.3. A gyógyszerhatóanyagok ökotoxicitása

A gyógyszerhatóanyagok alapvető funkciója, hogy biológiai választ kell kiváltaniuk bizonyos szervezetekben. Azonban a környezetbe kijutva releváns koncentrációkban biológiai válaszreakciókat válthatnak ki nem specifikus szervezetekben is. Figyelembe véve, hogy a legtöbb gyógyszerhatóanyag hosszabb ideig alacsonyabb koncentrációban található meg a vízi környezetben, a toxikus hatások inkább krónikusak, mint akutak (Khan et al., 2020). Az eltérő

vegyületek esetén eltérő semlegesítési mintákat figyeltek meg a környezetben. A szezonális változások befolyásolhatják a vízi környezetben zajló átalakulási folyamatokat, például az alacsony besugárzás, az alacsony hőmérséklet csökkenti a fotodegradáció és a mikrobiális lebomlás lehetőségét, ezáltal növelve a gyógyszeres szennyeződés veszélyét a vízi ökoszisztémában télen (Bernot et al., 2019). A vízi élőlények teljes életciklusuk alatt ki vannak téve ezeknek a mikroszennyező anyagoknak, így prenatális szakaszuk érzékenyebb a toxikus hatásokra. *In vitro* és *in vivo* vizsgálatokat is alkalmaznak a gyógyszervegyületek toxikus potenciáljának meghatározására. Kezdetben a toxicitási vizsgálatok során az általános végpontok a növekedés, a mortalitás és a szaporodás volt. Csak a közelmúltban fordítottak nagy figyelmet a fejlődési, molekuláris, szövettani és viselkedési szintre gyakorolt lehetséges hatásaik megfigyelésére (Khan et al., 2020).

A hagyományos szennyvízkezelési eljárások nem alkalmasak az újonnan megjelenő mikroszennyező anyagok eliminálására, egyelőre ez egy megoldásra váró probléma. A gyógyszermaradványok prezisztens anyagoknak minősülnek, azonban a biológiai aktivitásuk, keletkező bomlástermékeik akár károsabb hatást válthatnak ki, mint maga a kiindulási anyag (Oropesa et al., 2016).

Kristensen et al. (2018) figyelték meg, hogy a vizsgált csoport 2-4 héten keresztül tartó 1,2 grammos napi ibuprofen bevitel esetén férfiaknál reprodukív rendellenességet, úgynevezett kompenzált hipogonadizmust váltott ki. Ez okot ad a hasonló szennyező anyagok környezeti expozíciójának az emberi egészségre gyakorolt hatásainak további vizsgálatához. Egyelőre kevés bizonyítékot találtak arra vonatkozóan, hogy a gyógyszerhatóanyagok környezeti szempontból releváns koncentrációkban káros hatással lehetnek az emberi szervezetre. Illetve a gyógyszervegyületek természetes élőhelyen betöltött szerepéről is csak korlátozott ismereteink vannak (Ebele et al., 2017).

3.3.1. NSAID-ok ökototoxicitása

A nem szteroid gyulladáscsökkentő szerek (NSAID) a vízi ökoszisztémákat súlytó szennyező molekulák egyik kiemelkedő osztályát képviselik világszerte. A gerinctelenek döntő szerepet játszanak az ökoszisztéma működésében, így a NSAID-ok által kiváltott hatások veszélyes következményekkel járhatnak a teljes édesvízi trofikus láncre nézve. A NSAID-ok akut toxicitása csak a környezeti koncentrációknál jóval magasabb koncentrációk esetén jelentkeznek. Azonban a vízi ökoszisztémába kikerülő releváns koncentrációk során krónikus hatások mérhetőek az alkalmazott tesztszervezetek esetében (Parolini, 2020).

A környezetben a különféle gyógyszermaradványok keveréke felerősítheti egymást, illetve a kisebb koncentrációban lévő vegyületek toxicitását. Számos NSAID keverék által kiváltott toxicitást vizsgáltak édesvízi kéthéjú zebrakagylón (*Dreissena polymorpha*). A keverék jelentős celluláris stresszt eredményezett a kagylók lizoszóma membránjának destabilizációja esetén. Ezenkívül a keverék az apoptózis és a mikronukleuszok genetikai károsodásának számottevő növekedését idézték elő. Fontos megemlíteni, hogy keverék által kiváltott hatások magasabbak voltak, mint az egyes hatóanyagok külön-külön történő tesztelése során (Parolini et al., 2013).

A mai napig kevés információ áll rendelkezésre a nem szteroid gyulladáscsökkentők által kiváltott sejtszintű és szöveti hatásokról édesvízi fajokban. Ezenkívül a rövid és középtávú expozíció által kiemelt szubletális hatások aggasztóbbak lehetnek, mivel a természetes ökoszisztémában az élőlények egész életük során mérhető NSAID koncentrációnak vannak kitéve.

3.3.2. A diklofenák ökototoxicitása

A diklofenák környezetben történő széleskörű elterjedése miatt az elmúlt évtizedben nagyobb tudományos figyelmet kapott. Ennek okán számos tanulmány készült a diklofenák toxicitásának vizsgálatáról. A toxicitás mérésének általánosított és szabványosított módszere az akut immobilizációs teszt, melyet főként alacsonyabb rendű vízi testszervezeteken végeznek (Lonappan et al., 2016).

A vegyület toxicitását számos tanulmány vizsgálta különböző testszervezeteken, mint például nagy mocsári csigán (*Lymnaea stagnalis*). A környezetben fellelhető releváns koncentrációjú diklofenákkal (1-10 µg/l) kezelték az egyedeket, az expozíciós idők végén vizsgálták a csigák immunparamétereit. A diklofenák jelenléte immunválaszt váltott ki, immunszuppressziót nem figyeltek meg a csigák esetében (Boisseaux et al., 2017). Szintén környezeti koncentrációkkal megegyező mennyiségű diklofenákkal kezelték szivárványos pisztrángokat (*Oncorhynchus mykiss*). A vizsgálatok végén megfigyelhető volt a kezelt egyedek számos génjének expressziós változása, míg szervi elváltozások főképp a májban, a kopolyútkban és a vesékben voltak láthatóak. A diklofenák tubuláris nekrozist indukált a vesékben, valamint hyperpláziát és a bélbolyhok összeolvadását okozta (Mehinto et al., 2010). Összeségében elmondható, hogy a diklofenák környezeti koncentrációja megzavarhatja a halak biokémiai funkcióit és szövetskárosodáshoz vezethet. Akut diklofenák (mg/l) expozíciós kísérleteket végeztek víziolha (*Daphnia magna*) esetében. A diklofenák (0.40 mg/l) 21 napos

expozíciója után magas mortalitást tapasztaltak és a petetermelődés csökkenését figyelték meg (Du et al., 2016).

A diklofenák egy magasabb rendű szárazföldi faj nagymértékű pusztulását okozta Dél-Ázsiában, mivel a gyógyszermaradvány vesekárosodott okozott a veszélyeztetett keselyű faj (*Gyps bengalensis*) egyedeinél. Az ok a diklofenákot tartalmazó állatgyógyászatban használt gyógyszer jelenléte állati tetemekben, melyekkel a keselyű fajok táplálkoztak (Swan et al., 2006). A diklofenák-nátrium dóziszfüggő vizsgálatok során hím patkányok reprodukív rendszerében változásokat figyeltek meg. Egészséges felnőtt, termékeny hím patkányoknak 0.25; 0.5; 1.0 mg/kg diklofenák-nátriumot adtak 30 napon keresztül. A kezelés megváltoztatta a reprodukív metabolikus állapotot, a herék hiszto-architektúráját és vesetoxicitást idézett elő. Emellett jelentősen megváltoztatták a máj- és vesefunkciós paramétereket is (Vyas et al., 2019). Összességében diklofenák esetén már ismert, hogy ez a hatóanyag a vese, gyomor és bélrendszeri szövetek károsodásával fejt ki toxicitását számos vízi és szárazföldi élőlényben.

3.3.3. Az ibuprofen ökototoxicitása

Az ibuprofen, mint xenobiotikum, hosszú távú káros hatásai, valamint biológiai és farmakológiai aktivitása jobban dokumentáltak. Azonban az ilyen szennyező anyag lebomlása komoly aggodalomra ad okot. Az ibuprofen széleskörű elterjedtsége ellenére, a környezeti toxicitása és mikrobiális lebomlásának mechanizmusa, valamint ezen folyamatok genetikai háttere még mindig nem teljesen ismert.

Ezen a területen végzett tanulmányok többsége a biológiai hierarchia legmagasabb szintjén lévő káros hatásokra vonatkozik, így kihagyva az alszervezetek szintjét. Az akut IBU-expozíció során megfigyelt változások nagy része mg/l koncentráció esetén következik be, amely messze meghaladja a reális környezeti koncentrációkat. Ezen túlmenően minden további következmény, például a növekedési ütem, a szaporodás vagy a viselkedés mindig a biokémiai szintű változásokból adódik. Azonban több esetben is az alapvegyület toxikusabb intermedierekké alakult át, ilyen esetet figyeltek meg Kayani és mtsai. (2009). Ilyen például a diacilglicerinnel (ibuprofen-DG) konjugált ibuprofen, ahol a konjugátum több kromoszómapárban volt felelős a sejtosztódás gátlásáért és a párok szétválasztásának hiányáért. Parolini és munkatársai (2011) kimutatták, hogy az ibuprofen környezeti szempontból releváns koncentrációkban (0,2, 2,0 és 8,0 µg/l) való krónikus expozíció mérsékelt genetikai és sejtkárosodást okozott a zebrakagylóban (*Dreissena polymorpha*). Egy másik tanulmányban pedig az ibuprofen 0,1 µg/l koncentrációja felelős volt a medaka (*Oryzias latipes*) tojások kelésének késéséért (Han et al., 2010). Wang és mtsai. (2016) a környezetben releváns

koncentrációjú ibuprofen hatását vizsgálták három, a méregtelenítési folyamatokban részt vevő gének expressziójára nagy vízibolhában (*Daphnia magna*). A kapott eredményekből kiderül, hogy az ibuprofen-expozíciót követően az egy nőstényre jutó ikrák száma, valamint a testhossz szignifikánsan csökkent. Kimutatták, hogy az IBU alacsony koncentrációja (0,5 µg/l) a CYP360A és GST gének expresszióját gátolta, míg ennek megnövekedett koncentrációja (50 µg/l) indukálta expressziójukat. A rövid ideig tartó (6 órás) ibuprofen-expozíció gátolta a CYP314 gén expresszióját, míg a hosszabb ideig tartó (48 órás) expozíció indukálta annak expresszióját. Egy 2017-es kutatás során Di Nica és mtsai. (2017) *A. fischeri* vizsgálat során két szignifikánsan eltérő IC₅₀-értékről számoltak be 15 perces IBU expozíció után: 19,1 és 37,5 mg/l. A trofikus lánc minden szintjén megjelenik az IBU negatív hatása, ami jelzi az IBU környezetben előforduló koncentrációjának jelentőségét, ennek következtében fontos a fogyasztásának monitorozása, valamint a toxikológiai adatainak értékelése.

3.3.4. Antiepileptikumok és a karbamazepin ökotoxicitása

Az antiepileptikumok (AED) fogyasztásának növekvő tendenciája a vízi környezetben való széleskörű megjelenéséhez vezetett, ami komoly veszélyt hordoz mind az emberi egészségre, mind pedig a vízi szervezetekre. Az AED-ek, metabolitjaik és transzformációs termékeik mára széles körben megtalálhatóak a felszíni víztestekben, a talajvízben és az ivóvízben ng/l – µg/l koncentrációk közötti tartományban. A környezetben megtalálható releváns koncentrációjú AED-ek hatással vannak a vízi ökoszisztémára és a keletkező metabolitjai pedig károsíthatják az egyes vízi szervezetek antioxidáns kapacitását (Liu et al., 2023).

Az AED-ek csontos halakra kifejtett hatását vizsgálták, ahol általánosan megfigyelték, hogy a gyógyszerhatóanyagok szubletális hatásai befolyásolhatják az iparban felhasznált halfajok testtömegét és az egyedsűrűséget (Salahinejad et al., 2023).

A karbamazepin, mely szintén az AED-ek közé tartozik, az egyik legperzisztensebb gyógyszer a környezetben. Zebradánió, *Danio rerio*, esetében orálisan 3000 µg/kg karbamazepint jutattak be, ami szorongásoldó hatással bírt. Sötétségre való érzékenysége a szintjét már 200 µg/l koncentrációban is csökkentette. A zebradánió embriók 2 µg/l karbamazepin koncentráció esetében válnak érzékenyebbé az érintésre. Az embrionális stádiumban lévő egyedek 5 µg/l gyógyszerhatóanyag esetén a fényre adott válaszreakciójuk fokozódott. Azonban meglepő módon a lárvállapotban a magas CBZ koncentrációnak (42000 µg/l) való kitettség csökkentette a fényingerre adott válaszreakciót (Chen et al., 2020).

A másik tesztorganizmus, mely erősen kitett a karbamazepin negatív hatásának a vízibolha (*Daphnia magna*). Számos esetben megfigyelték, hogy a szaporodás egyedszáma szignifikánsan csökkent a CBZ expozíció hatására, a termékenység esetében minimum 30%-os visszaesést figyeltek meg. Illetve a karbamazepin jelenléte a testhossz csökkenését eredményezte Tian és mtsai. (2019) vizsgálatainak során. Magasabb (12,7 mg/l) CBZ koncentráció gátló hatással volt a *D. magna* egyedeinek növekedésére (Thaker 2005). Még magasabb karbamazepin 25,5-138 mg/l koncentráció tartomány között pedig alacsony akut toxicitást mutattak ki az egyes vízi növények, rákfélék, halak és kételtűek esetében. Megfigyelték, hogy a *D. magna* anyák CBZ-vel történő kezelése megnövelte a fejlődési rendellenességeket az embriókban és befolyásolta azok ivar meghatározását (Oropesa mtsai. 2016). Egy másik bolha faj esetén (*Gammarus pulex*) nagyon alacsony CBZ koncentráció (10 ng/l) esetén is 1.5 óra elteltével az úszási aktivitás közel felére történő visszaesését figyelték meg. Ezek az úszási aktivitásra gyakorolt tényezők potenciálisan hatással lehetnek a túlélési arányokra, illetve befolyásolhatják a populációjukat az ökoszisztémában (Nassef et al., 2010).

Ebből a fejezetből jól látszik, hogy a gyógyszermaradványok súlyos fejlődési és egészségügyi problémákat okozhatnak, különösen a vízi élőlények számára. A fentiekből jól látszik, hogy ezen vegyületek koncentrációját a környezetben csökkenteni kell. Ezért a következő fejezetben a gyógyszermaradványok eltávolítási lehetőségét tárgyalom.

3.4. A gyógyszerhatóanyagok eliminációja vizes ökoszisztémákból

A szennyvíztisztító telepeken (WWTP) nehéz elérni a valódi mineralizációt vagy a gyógyszermaradványok teljes eltávolítását hagyományos vízkezelési technológiák segítségével. A hagyományos rendszerek közé tartoznak a fizikai-kémiai és biológiai rendszerek, mint például ülepítés, koaguláció, szűrés, adszorpció/bioadszorpció aktív szén, eleveniszapos eljárás és kémiai fertőtlenítés. Míg a fejlett technikák közé tartozik a membránszűrés és az oxidáció (AOP), például az ózonos, az UV-fotolízis, a fotokatalízis és a Fenton-reakció. Óriási eltéréseket figyeltek meg a gyógyszermaradványok eltávolítási hatékonyságában az egyes szennyvíztisztító telepeken alkalmazott kezelési eljárások között. A szennyező anyagok fizikai-kémiai tulajdonságai és a változó működési paraméterek, mint például a pH, a szilárdanyag-visszatartási idő, a hidraulikus retenciós idő és a mikrobiális aktivitás is befolyásolják az eltávolítás hatékonyságát (Petrie et al., 2015).

3.4.1. Fizikai- és kémiai eljárások

A koaguláció-flokkuláció és a flotáció olyan fizikai-kémiai folyamatok, amelyek a vízkezelési folyamatok során alkalmazhatóak. A koagulációs folyamatokat általában

homokszűréssel, aktív szénnel történő szorpcióval és ózonos vagy klóros fertőtlenítéssel kombinálják (Suarez et al., 2009).

A koaguláció-flokkulációs eljárásokat arra tervezték, hogy a nem spontán ülepedő lebegő szilárd anyagok és kolloidok eltávolítását elősegítsék a szennyvízből (Vesilind, 2003). Egy, a kórházi szennyvizet vizsgáló tanulmány alapján elmondható, hogy az ibuprofen és a diklofenák esetében a maximális koncentráció csökkenés 30-60%-os tartományban volt koagulációs eljárások során. A karbamazepint és az antibiotikumokat általában a koagulációs folyamat nem eliminálja hatékonyan a folyadékfázisokból (Suarez et al., 2009).

Ígéretes szennyvíz tisztítási eljárásnak bizonyult a kémiai eljárások közé tartozó elektrokémiai nagyhatékonyságú oxidációs eljárásokat (EAOP). Az EAOP-ok környezetbarát megoldások, mivel az elektronokkal történő szennyvíziszap tisztításhoz nem szükséges kiegészítő eljárás. További előnyök közé tartozik a szennyezőanyagok eltávolításának nagy hatékonysága és a berendezés egyszerű kezelhetősége. Az EAOP-ok alkalmazásának a korlátja a viszonylag alacsonyabb oxidációs határfok, illetve a megnövekedett energiaköltség. Nagyobb figyelmet fordítanak az elektródanyagok stabilitására és a katalitikus aktivitásuk javítására különböző fémoxidok elektródon történő előállításával és adalékolásával (Wang et al., 2020).

Az előbb bemutatott fizikai-kémiai eljárásoknál sokkal hatékonyabb, ebből adódóan a leggyakrabban alkalmazott módszer a gyógyszerek eltávolítására az adszorpció. Az adszorpció egyszerű, fenntartható, költséghatékony és környezetbarát szennyvíztisztítási technika az összes többi létező technológia mellett (Rashid et al., 2021).

Egy budapesti aktív iszapos technológiával működő kommunális szennyvíztisztító telep cellulóزالapú anyagok eltávolításának hatékonyságát ellenőrizték. A vizsgálatok végén arra a következtetésre jutottak, hogy az új stratégia részeként finom, 3 vagy 1 mm-es rúdszítákat és 0,1 mm-es finom szitaszítákat kell alkalmazniuk a cellulóزالapú anyagok szennyvízből való kinyerésének fokozása érdekében (Tserendorj et al., 2024).

A korábbi időkhez képest manapság az olcsó adszorbenseket keresik, illetve nagyobb figyelmet fordítanak a porozitás növelésére, az anyag textúrájának a módosítására és az adszorbensek fajlagos felületének javítására. Ezekkel igyekeznek új nanoanyagokat létrehozni, amellyel növelhetik és javíthatják az adszorpció hatékonyságát. A szennyvíztisztító iparágnak proaktívnak kell lennie, fel kell mérniük a hulladékanyagok tulajdonságait és ipari mértékben hasznosítani a megszerzett tudást. Megvalósulása esetén ezen iparágak kulcsszerepet fognak vállalni a globális hulladékgazdálkodásban és új távlatokat nyithatnak a gazdaságilag megvalósítható szennyvízkezelés korszakában (Rashid et al., 2021).

3.4.2. Biológiai eljárások

A fizikai és kémiai eltávolítási módszerekhez képest a biológiai lebontási útvonalak sokkal inkább környezetbarátok és költségkímélőbb eljárások. A különböző szennyvízfajták lebontására többféle mikrobiális forrást használnak. A források általában baktériumok és gombák, amelyek nagymértékben részt tudnak venni a szerves komponensek lebontásában (Velusamy et al., 2022). A leghatásosabb *Streptomyces* faj bizonyítottan eltávolítja a szennyvíz szagát és a szerves kémiai komponenseit.

A szennyvíztisztítás általánosan három fő lépésre osztható, mint az elsődleges, másodlagos és harmadlagos lépés (Sathya et al., 2023). Az elsődleges lépés során a nagyobb szilárd részecskék és szennyeződések eltávolítása történik mechanikai módszerekkel. A folyamat során a szennyvizet átszűrjük nagyobb hálókön, hogy eltávolítsák a nagyobb szilárd anyagokat. Illetve lassú áramoltatással a szilárd anyagokat leülepítik a szennyvíz aljára. Az elsődleges lépés során így a szennyvízben lévő szilárd anyagok 50-70%-a eltávolításra kerül. A mikroorganizmusok az elsődleges fázis után lépnek be a szennyvíztisztítási folyamatba, amikor is a folyékony szennyvizet eljuttatják a másodlagos fázisba. Itt aerob és anaerob körülmények között hajtják végre a folyamatot. Aerob körülmények között a mikrobák lebontják a folyékony hulladék biológiai tartalmát. Az anaerob baktériumokat pedig az iszap mennyiségének csökkentésére, a metángáz előállítására, illetve a foszfor szennyvízből történő eltávolítására használják. A harmadlagos fázisban oxigén jelenlétében a szerves anyagokat tovább bontják a nitrifikáló baktériumok, amelyek az ammóniát nitráttá alakítják. A baktériumok a vízben lévő szabad oxigént használják fel a szennyvíz mérgező anyagainak lebontására (Zou et al., 2014).

Egy felmérés során 55 magyarországi szennyvíztisztító telepet vizsgáltak, hogy felmérjék a szennyvíz minőségét, az alkalmazott technológiákat és a kapcsolódó problémákat. A tisztítási hőmérséklet jelentős eltéréseket mutatott, a legkisebb értékek 10 °C alá, míg a legmagasabbak 26 °C fölé estek. Az influensz minősége a szerves anyag tartalom tekintetében is nagy változatosságot mutatott. A telepeken különböző biológiai nitrogéneltávolító technológiák alkalmazását értékelték, mint az intermittáló aeráció, az alacsony oldott oxigén (DO) koncentrációjú reaktorok, biofilterek és anammox folyamatok. Az alacsony szénforrás elérhetősége mellett a denitrifikáció előtérbe helyezése a fokozott biológiai foszfor eltávolítással szemben javította a nitrogén eltávolításának hatékonyságát (Trady et al., 2012).

Az anaerob ammónia-oxidáció (anammox) egy biológiai nitrogéneltávolító folyamat, az ammónium (NH_4^+) és a nitrit (NO_2^-) anaerob körülmények között történő oxidációján alapul. Egyre inkább elterjedt hazánkban a szennyvíz általános ammóniamentesítésére, mivel nagy

hatékonyságú és alacsony energiafogyasztású (Aib et al., 2022). Az anammox baktériumok lassú növekedési üteme jelentős kihívást jelent az eljárás számára, ezért a baktériumok visszatartásának javítása elengedhetetlen. A membrán bioreaktorokkal vagy szekvenáló szakaszos reaktorokkal történő növelése mellett az anammox baktériumok biofilm vagy szemcsés iszap formájában történő tenyésztése ígéretes megoldásnak tűnik (Wnag et al., 2022).

A biodegradációs folyamatok alkalmazása esetén elengedhetetlen, hogy tudomást szerezzünk a mikrobaközösség összetételéről és dinamikájáról. Az eliminációs hatékonyság vizsgálatakor megnézték, hogy milyen mikroorganizmusok játszanak szerepet a szennyvíz tisztítása során (Tiwari et al., 2017). Kimutatták, hogy a legdominánsabb közösség alkotók, melyek részt vesznek a gyógyszerbontásban a proteobaktériumok és az antinobaktériumok osztályába tartoznak. A következő nemzetségek képviselői voltak jelen a közösségben a *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Raoultella* és a *Streptomyces*, illetve számos gombafaj (*Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Phanerochaete sordida*). 90%-os hatékonysággal képesek voltak 25 különböző gyógyszerhatóanyagot eltávolítani, melyek között megtalálhatóak antibiotikumok, hormonok, fájdalomcsillapítók és lázcsillapítók is (Tiwari et al., 2017).

Mára már elmondható, hogy mikroorganizmusokkal a környezeti elemeket képesek vagyunk megtisztítani a felgyülemlett gyógyszerhatóanyagoktól (Domaradzka et al., 2016; Mudoch & Hay, 2015; Popa et al., 2014). Azonban a különböző típusú, szerkezetű gyógyszermaradványokat más és más baktériumokkal képesek hatékonyan eltávolítani. Illetve a kialakított mikroba közösségnek minden egyes tagjának eltérő körülmények szükségesek a megfelelő bontási arány eléréséhez. Ennek okán elengedhetetlen egy optimális közeg kialakítása, ahova egy tudatosan összeállított bakteriális konzorciumot juttatunk be, ezzel megcélozva a kiválasztott gyógyszerhatóanyagokat. A megfelelő körülmények és a konzorcium együttes hatása lehetővé teheti a szennyezett vizek eredményes, nagy hatásfokú tisztítását.

3.4.3. Fejlett szennyvízkezelési technikák

Az elektrokoaguláció hatékonyabb és eredményesebb módszernek bizonyult, mint a kémiai koaguláció (Mollah et al., 2004). Az eljárás lényege, hogy egy különleges fémötvözet anódon történő felhasználásával, elektrokémiai reakció segítségével, aktív kationokat hoznak létre, melyek hatékonyan elősegítik a koagulációt és a flokkulációt. Számos tanulmány vizsgálta a szennyvízből történő gyógyszerhatóanyagok eltávolítását elektrokoagulációs kezelések során. Az eredmények magas, közel 90% feletti eltávolítási hatékonyságot mutattak, ami azt jelzi, hogy ezen rendszerek hatékonyan távolítják el a gyógyszereket a szennyvízből (Alam et al., 2021; Ahmed et al., 2022).

A fejlett oxidációs eljárások hatékonyan távolítják el azokat a gyógyszereket, melyeket a hagyományos biológiai módszerek nem képesek. Ilyen módszerek közé tartoznak a Fenton-reakció (EF) hidrogén peroxid (H_2O_2) és a Fe(II) közötti reakciója során történő hidroxilgyökképződés. A Fenton-alapú reakciókat kifejezetten gyógyszerek lebontására használják, mivel a hidroxilgyököket az egyik legerősebb oxidálószernek tartják, mellyel a szerves anyagokat képes alacsony szelektivitással oxidálni. A Fenton-reakciókat általában savas pH-n (3-5) végzik. A reakciót hatékonynak találták gyógyszerhatóanyagok eltávolítására úgy, mint hidroxil-amin vagy, ciklohexán (Olvera-Vargas et al., 2021). Egy másik tanulmány is alátámasztotta, hogy EF (electro-Fenton) optimalizálását egy gyógyszerhatóanyag (trimethoprim) szintetikus oldataival végezték, míg a legjobb feltételeket valódi gyógyszeripari szennyvíz előkezeléséhez használták (Mansour et al., 2015). A szennyvíz összetétele nemcsak az elektrokémiai reakciókat befolyásolja, amelyek szennyező anyagok lebontásáért felelős oxidálószer termelődéséhez vezetnek, hanem az oxidálószer hatékonyságát és hozzáférhetőségét is nagyban meghatározhatja. A fent említett okok kapcsán az EF és a hozzá kapcsolódó technológiák ipari megvalósítása felé történő elmozdulás elengedhetlenné válik (Garcia-Segura et al., 2020).

A membránszűrési és a fejlettebb oxidációs eljárások (AOP) egyidejűleg nyújthatnak hatékony megoldást lebontási és elválasztási folyamatok során. A hagyományos membránszűrési technikák csak a szennyező anyagok egy részét képesek eltávolítani, míg a legkisebb lebontatlan gyógyszermaradványok megmaradnak a kezelt vízben (Rosman et al., 2018). Az új AOP-ok fontos szerephez juthatnak a gyógyszeripari szennyvizek kezelésében, mivel ezek a technológiák képesek a nem megfelelő, mérgező és biológiailag nem lebontható vegyületeket számos melléktermékké, végül pedig közömbös végtermékké oxidálni, hidroxilcsoportra és más gyökökre. A membránok ki vannak téve a szennyvízben lévő szennyeződések miatti elszennyeződésnek, ami a tiszta víz áramlásának csökkenését és az energiaigény növekedését eredményezni. Ezekben az esetekben a membránhibrid AOP-ok komplementer hatást fejtenek ki a membrán eltömődésének kiküszöbölésében, ezáltal fokozzák a membrán teljesítményét (Liang et al., 2014).

A fejlett szennyvíz kezelési eljárások még gyerekcipőben járnak, azonban tagadhatatlanul az elektrokémiai oxidáció és membránszűrő integráció tagadhatatlanul ígéretes módszer a gyógyszermaradványok kezelésére és eltávolítására. Az AOP-ok membránintegrációja lényeges hatékonyságot mutat és költség szempontjából is ígéretes módszer (Trellu et al., 2018).

3.4.4. Diklofenák baktériumokkal történő biodegradációja

A diklofenák biológiai eltávolításával eddig is számos tanulmány foglalkozott, amelyek meghatározták az alkalmazott baktériumtörzseket, valamint a táptalajban a hatóanyag koncentráció csökkenését. A diklofenák nagyfokú ellenállást mutat a biológiai lebontással szemben, ennek ellenére számos baktériumtörzset azonosítottak, amelyek képesek hatékonyan eliminálni a vegyületet.

Kutatások során megfigyelték, hogy egyes baktériumtörzsek képesek voltak lebontani a diklofenákot, mint egyedüli szénforrást (Domaradzka et al., 2016). *Raoultella* nemzetséghez tartozó két baktériumtörzs, a DD4 és KDF8 képesek voltak hatékonyan lebontani a diklofenákot (Domaradzka et al., 2016; Palyzová et al., 2019). A *Raoultella* sp. DD4-es izolátum diklofenák-bontó képességének tesztjele 0,6 mg/l kiinduló koncentráció mellett történt 6 napon keresztül. A vizsgálat végén az eredmények alapján látható volt, hogy a diklofenák 100%-ban lebomlott. A diklofenák lebontás során a KDF8-as törzs egy kombinált metabolikus útvonalat használ, melyben a katekol 1,2-dioxigenázt és a protokatekuát 3,4-dioxigenáz végzi a bifenil gyűrű oxidációját. (Palyzová et al., 2019).

Zur és munkatársai (2021) azt találták, hogy a DIC-eltávolítás hatékonysága szigorúan törzs-specifikus, és az elsődleges szubsztrát nem mindig előnyös. A többlet szén- és energiaforrások azonban könnyen lefedik az enzimszintézis energiaigényes lépéseit. Példa erre az *Enterobacter hormaechei* D15 izolátum, amelynek a diklofenák eliminációs rátája külső szénforrás nélkül 52,8%-ról glükóz jelenléte mellett 82%-ra nőtt. Szintén ezen kísérlet során a bontási hatékonyság 35%-ról 65%-ra nőtt az acetát hozzáadásával (Aissaoui et al., 2017).

A *Labrys portucalensis* F11 baktériumtörzsnek sikerült 6 nap alatt 100%-ban lebontania a diklofenákot acetát jelenlétében. Hat nap alatt 1,7 μM , míg 25 nap alatt 34 μM -nyi DIC-ot volt képes bontani. Amennyiben csak diklofenák állt rendelkezésre a tesztoldatban, mint egyedüli szén és energiaforrás, a vizsgált baktériumtörzs 70 %-os koncentráció csökkenést produkált a kiindulási mennyiséghez képest (Moreira et al., 2018). A *Rhodococcus ruber* IEGM 346-os törzs alacsony (50 $\mu\text{g/l}$) és magas (50 mg/l) kiindulási koncentrációban is képes volt lebontani a gyógyszerhatóanyagot. A vizsgálatok során glükóz jelenlétében 60 nap alatt eliminálódott az 50 mg/l diklofenák 50%-a, míg az alacsonyabb, 50 $\mu\text{g/l}$ kezdeti koncentrációnál a teljes lebomlás végbement 6 nap alatt (Ivshina et al., 2019).

Marchlewicz és munkatársai egy olyan baktériumkonzorcium fejlesztését tűzték ki célul, amely képes a paracetamol, az ibuprofen, a naproxen és a diklofenák lebontására. A meghatározott bakteriális konzorcium *Bacillus thuringiensis* B1 és *Pseudomonas moorei* KB4 törzsekből állt és 1:2 arányban tartalmazta azokat. A tesztek azt mutatták, hogy a

baktériumkonzorcium jelenlétében a gyógyszerek lebontása 4,88; 10; 0,1 és 0,05 mg/nap sebességgel történtek az ibuprofen, paracetamol, naproxén és a diklofenák esetében. A vizsgált törzseket a kísérlet során és utána is ki tudták mutatni. A kapott eredmények alátámasztották a baktériumkonzorcium sikeres tesztelését egy szennyvíztisztító telep valós környezetében (Marchlewicz et al., 2023).

3.4.5. Ibuprofen baktériumokkal történő biodegradációja

A gyógyszerhatóanyagok közül az ibuprofen az egyik legszélesebb körben használt NSAID. Számos olyan mikroorganizmust izoláltak, amely képes az ibuprofent szénforrásként felhasználni (Zur et al., 2021).

A *Variorax* nemezségbe tartozó *Variovorax* sp. Ibu-1 nevet viselő baktériumtörzs. biológiai lebomlási vizsgálata során 500 mg/l koncentrációban ibuprofent tartalmazó oldatban 75 óra elteltével körülbelül 40%-os ibuprofen koncentráció csökkenést tapasztaltak (Murdoch & Hay, 2015).

Egy, az ibuprofen biológiai lebontását vizsgáló tanulmányban az Argentínában található Riachuelo-Matanza-medencének a vízmintáit elemezték. A részletes 16S rRNS génszekvenciái adatok alapján a lebontó közösség baktérium alkotói a *Comamonas aquatica* és a *Bacillus* sp. voltak (Fortunato et al., 2016). A közösség 33 óra leforgása alatt képes volt 100 mg/l ibuprofent lebontani, a vegyület eltávolítását nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) követték nyomon.

Sharma és munkatársai (2019) által végzett munka során az ibuprofen lebontására képes baktériumtörzsek izolálására összpontosítottak. A dúsításra használt szennyvíz és iszapminta egy indiai város, Dzsaipur gyógyszergyártó üzeméből származott. A minták 20-200 mg/l koncentrációban tartalmaztak ibuprofent. Hat darab törzset sikerült izolálni, amelyek közül a KGP04-es nevű törzset *Micrococcus yunnanensis* fajhoz tartozóként sikerült azonosítani. A törzs mutatta a legmagasabb lebontási aktivitást, körülbelül 42%-osat, azonban a körülmények optimalizálásakor a degradációs potenciált 90% fölé sikerült vinni.

A kutatások során nem csak arra keresték a választ, hogy melyik baktériumok képesek a leghatékonyabb lebontásra, hanem hogy baktériumok együttes használata hatékonyabbá képes-e tenni a vegyületek eliminációját vagy sem. Az egyik ilyen esetben bakteriális konzorciumot alkalmaztak, amely 38 baktériumtörzset tartalmazott az ibuprofen (100 µg/g), diklofenák (20 µg/g) és triklózán (20 µg/g) gyógyszerhatóanyag hatékony lebontása érdekében. Az ibuprofen bontásáért többek között a *Novosphingobium* és a *Sphingomonas* fajok voltak a felelősek. A bontási eredmények azt mutatták, hogy a 3 vegyület közül az ibuprofen eliminálódott a

leggyorsabban, 45 nap elteltével 90%-os koncentráció csökkenést tapasztaltak (Aguilar-Romero et al., 2020).

Aguilar-Romero és munkatársai (2021) egy másik kutatás során szintén az ibuprofen gyógyszerhatóanyag lebontását vizsgálták egy konkrét baktériumtörzs segítségével, melyet folyami üledékből izoláltak. A *Sphingopyxis granuli* RW412 folyékony ásványisó tápközegeben 74 óra leforgása alatt több, mint 2 mM ibuprofent eliminált. Egy kommunális szennyvíztisztító telepről származó, ibuprofennel szennyezett szennyvízben az RW412 baktériumtörzs az ibuprofent 7-szer gyorsabban távolította el, mint az őshonos mikrobióta közösség.

3.4.6. Karbamazepin baktériumokkal történő biodegradációja

A karbamazepin jelenlétét számos környezeti elemről jelentették, ugyanis nagyrészt fizikai- és kémiai tulajdonságainak köszönhetően ellenálló mind a fotodegradációnak, mind pedig a biológiai lebontásnak. Minimális az eltávolítási hatékonysága a szennyvíztisztító telepeken és hosszú felezési idővel rendelkezik (Bessa et al., 2019). Egy romániai gyógyszermaradvány bontó kísérlet során a MUIG törzsgyűjteményből sikeresen kiválasztott *Streptomyces* MIUG 4.89 törzs hatékony, 35%-os CBZ eltávolítást mutatott 0.2 mg/l koncentráció mellett 7 nap leforgása alatt. A tenyésztés minimál tápoldatban történt, 5 g/l glükózzal kiegészítve aerob körülmények között (Popa et al., 2014).

A *Labrys portucalensis* F11 törzsről kimutatták, hogy szinte teljes mértékben képes volt biotranszformálni a karbamazepint különböző koncentrációk esetén is. A legalacsonyabb (~ 0.5 mg/l) koncentrációnál a teljes lebomlás már a 2. napon megtörtént. Magasabb (~ 5 mg/l) koncentrációnál is teljes volt a lebontás 20 nap elteltével. A legmagasabb (~ 10 mg/l) koncentráció esetén az inkubációs idő végén (30 nap) 95,4%-os volt a karbamazepin eliminációja. A közel 5 mg/l koncentráció esetén acetát hozzáadásával csökkentették a bontási időt (20 napra), míg a közel 10 mg/l koncentráció esetén a bontási hatékonyságot növelték (99%-ra) (Bessa et al., 2019). Az acetáttal kiegészített tápoldat energiát biztosíthat a sejtek növekedésének támogatásához, ezzel fokozva a mikroszennyező anyagok lebontását (Popa et al., 2014).

Szennyvíztisztító telep eleven iszapjából izolált *Pseudomonas* sp. CBZ-4 törzs 144 órás inkubációs idő után képes volt 50%-kal csökkenteni a kiindulási (10-160 mg/l) karbamazepin koncentrációt. Érdeklőség, hogy alacsonyabb releváns környezeti koncentráció esetében nem tudta lebontani a célvegyületet (Li et al., 2013).

A kínai Suzhou-ból származó szennyvíz eleveniszapjából Cui és munkatársai egy *Acinetobacter* sp. HY-7 baktériumtörzset izoláltak. Az *Acinetobacter* sp. HY-7 képes volt a

karbamazepin bontásra folyékony ásványisó közegben, mint egyedüli szén- és energiaforrás. A gyógyszerhatóanyag 48 %-át volt képes biodegradálni 10 nap elteltével (Cui et al., 2009).

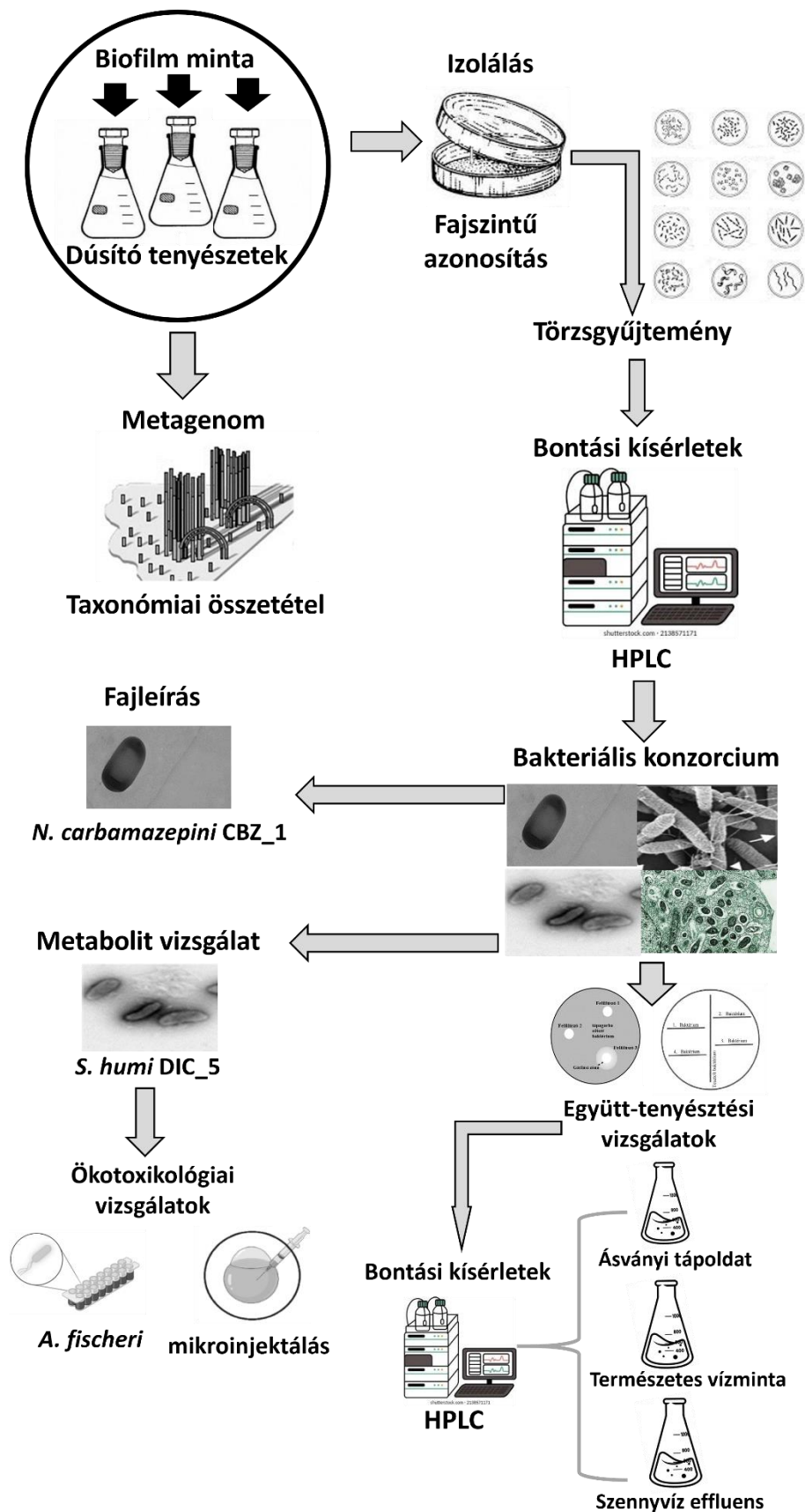
A következő tanulmány során Gauthier és munkatársai (2010) az ATCC nonprofit szervezettől beszerzett baktériumtörzsek gyógyszermaradvány biodegradációs képességét vizsgálták. *Rhodococcus rhodochrous* (ATCC 13808) esetében 15%-os karbamazepin bontást figyeltek meg 28 nap leforgása alatt. A karbamazepin kiindulási koncentrációja 100 mg/l volt, illetve a vizsgálatok glükóz (3.0 g/l) jelenléte mellett zajlottak (Gauthier et al., 2010).

Szintén egy szennyvíztisztító telep eleven iszapjából történő izolálás során két baktériumtörzset izoláltak *Starkeya* sp. C11 és a *Rhizobium* sp. C12, melyek képesek 10 mg/l koncentrációjú CBZ 35%-os lebontására. Az eddig felsorolt eredményekkel ellentétben ebben az esetben a plusz hozzáadott szénforrás (acetát) nem javította a biológiai lebomlás sebességét (Bessa et al., 2017).

A felsorolt tanulmányok mind alátámasztják, hogy a karbamazepin bontására tett kísérletek sikeresnek mondhatóak, azonban az is jól látszik, hogy csak egy esetben sikerült a gyógyszermaradvány teljes egészét eltávolítani vizes közegből.

4. Anyag és módszertan

4.0. Módszertani összefoglaló



4.1. Biofilm minták

A kutatás céljának megfelelő izolátumokat egy előzőleg már széleskörben vizsgált bakteriális biofilmből izoláltam. A vizsgálatok alapját képező bakteriális biofilm filogenetikai és funkcionális tekintetben nagy diverzitással jellemezhető, egyszerű- (BTEX) és policiklusos aromás szénhidrogének (naftalin) biológiai lebontására képes baktériumok izolálási forrásának bizonyult korábban. A lebontásban résztvevő kulcsfontosságú biodegradációs funkcionális géneket mutattak ki a biofilm baktérium közösségből, mint például a katechol-2,3-dioxigenázokat (C23O), benzil-szukcinát-szintáz (bssA) és a naftalin-1,2- dioxigenáz (NDO) (Benedek et al., 2016, 2018 és 2020). Feltételeztem, hogy a nagy filogenetikai és funkcionális diverzitással rendelkező biofilmben a hasonló aromás gyűrűvel rendelkező vegyületek, mint a diklofenák, ibuprofen és a karbamazepin lebontására képes baktériumok is megtalálhatóak.

A biofilm mintát streil 50 ml-es csövekbe gyűjtöttem 2019 decemberében. A vizsgált benzinnel szennyezett terület (~4 ha) Magyarország középső régiójában található. 2007-ben egy finomított termékvezeték véletlen szakadása miatt kb. 27 m³ gázolaj szivárgott ki, amely alifás és monoaromás (BTEX) szénhidrogénekkel szennyezte a környező talajt és az alatta lévő sekély talajvizet. Mivel az érintett talajvíz gyors *in situ* dekontaminálása kulcsfontosságú volt, a szennyeződési csóvában fizikai-kémiai Pump & Treat rendszert hoztak létre. A mintavevő a felszíntől 5 méteres mélységben van elhelyezve, amelyet közvetlenül a mintavétel előtt távolítanak el. A mintavétel előtt a szivattyút 1 hónapig víz alá helyezve tárolják, így lehetővé téve egy kompakt biofilm kialakulását. Az általános vízkémiai paraméterek rámutattak arra, hogy a mintavételezett kitermelő kútban a szennyezett talajvíz hipoxiás (oldott oxigén koncentrációja ≤ 2 mg/l) és enyhén lúgos (pH 7,5-7,8), a nitrát (3 mg/l) és szulfát (174 mg/l) szintje a talajvíz küszöbértéke alatt van (NO₃ - 25 mg/l, SO₄ 2- 250 mg/l). A P&T rendszer indításakor az analitikai kémia alapján a talajvíz fő szénhidrogén-szennyezője a toluol, a xilolok és a benzol volt. Mintavétel után a biofilm mintákat jégen tároltam és a laboratóriumba történő beérkezés után feldolgoztam. A rendszerről további információk a Benedek et al., 2016 tudományos publikációban találhatóak.

4.2. A potenciálisan diklofenák, ibuprofen és karbamazepin lebontó baktériumok szelektív dúsítása és azonosítása

A szelektív dúsítások során vitaminokkal kiegészített ásványi tápoldatot Bushnell-Haas (BHB: (CaCl₂ · 2H₂O 0.002 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.02 g, NH₄NO₃ 1 g, KH₂PO₄ 1 g, K₂HPO₄ 1 g, FeCl₃ · 6H₂O 0.005g, H₂O 1 l)) használtam, melyet egyedüli szén- és energiaforrásként külön-külön diklofenák nátrium sójával karbamazepinnel és ibuprofennel (100 mg/l) egészítettem ki.

Mindehárom gyógyszerhatóanyag a Sigma Alderich (Egyesült Államok) gyártótól lett berendelve. A dúsításokat 300 ml-es (vattával ledugózott) Erlenmeyer-lombikban végeztem, amelyek 100 ml dúsító tápoldatot tartalmaztak 1 ml biofilm baktériumszuszpenzióval (0.5 g biofilm 50 ml 0.9%-os NaCl sóoldatban szuszpendálva) kiegészítve. A dúsító tenyészetek 28 °C-on rázóinkubátorban (150 rpm) (fordulat/perc) 1 hónapig inkubálódtak. Az első hónap leteltével minden dúsító tenyészetből 10 ml-t átvittem egy friss dúsító tápoldatba (90 ml) és ismét inkubáltam további 1 hónapon keresztül. Ez a folyamat még egyszer megismétlésre került, így összeségében 3 hónapig zajlott a potenciálisan gyógyszerbontó biofilm-baktériumok szelektív dúsítása. A dúsítások során a célvegyületeken kívül nem használtam kometabolikus szubsztrátokat. Minden egyes hónap letelte után meghatároztam metagenom szekvenálás segítségével a dúsító tenyészetek filogenetikai összetételét és populációdinamikáját, illetve baktériumtörzseket izoláltam.

4.3. Közösségi DNS kinyerése a dúsítókból, metagenom vizsgálatok

A kezdeti biofilm mintákból (0.5 g) és az egyes hónapok dúsító tenyészeiből a teljes közösség DNS-ének kinyerését a DNeasy® PowerBiofilm Kit (Qiagen, Németország) segítségével végeztem a gyártó utasításait követve. A dúsító tenyészetek 40 ml mennyiségét 2360 g-vel 15 percen keresztül centrifugáltam Rotanta 460 R centrifugával (Hettich, Németország) és a közösségi DNS-t kivontam a pelletből.

4.3.1. A dúsító kultúrák metagenom vizsgálatai

A dúsított minták filogenetikai diverzitásának pontos meghatározására, valamint a kiinduló baktériumközösség szelektív dúsítás miatt fellépő időbeli dinamikájának a feltárására shotgun metagenom szekvenálást alkalmaztam a kiindulási biofilm minta teljes közösségi DNS-én, valamint a dúsító tenyészetek esetén (3-3 minta: DIC, IBU, CBZ 1., 2. és 3. havi dúsító tenyészetek) Illumina platformon (Illumina Inc., USA). A DNS minták koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) segítségével határoztam meg. A DNS tisztaságát agaróz gélelektroforézissel és az Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) készüléken vizsgáltam. Az Illumina szekvenáláshoz szükséges könyvtárakat a NEBNext UltraTM II DNA Library Prep Kit segítségével állítottam elő. A metagenom szekvenálást Illumina NextSeq platformon és NextSeq 500/500 High Output Kit v2.5-ös verziójával végezték. Galaxy Europe szervert alkalmazták a nyers szekvenciák előfeldolgozására (azaz sorozatszűrésre, leképezésre, minőségellenőrzésre). A gyenge minőségű leolvasásokat a Prinseq szűrte (min. hossz: 100; min. pontszám: 15; minőségi pontszám küszöbértéke a trimm pozíciókhoz: 20; a kiszámított

minőségi pontszámhoz használt csúszó ablak: 1). A szűrt szekvenciákat FastQC-vel ellenőriztem. A Prinseq által előállított szűrt szekvenciákat Megahit-tel állítottam össze (minimális kontighossz: 2000; minimális k-mer méret: 21; maximális k-mer méret: 141) (Li et al., 2015). A megtartott leolvasások downstream taxonómiai elemzését és megjelenítését a MEGAN6 szoftverrel végeztem (Huson et al., 2007). A nyers metagenom szekvencia leolvasások elérhetőek az NCBI-n a következő BioProject hozzáférési számon: PRJNA782474; a kezdeti biofilm BioSample hozzáférési száma SAMN23424265, a dúsító tenyészeteké pedig SAMN23439944-SAMN23439952.

4.3.2. A metagenomok összeállítása és feldolgozása

A minőség ellenőrzött szekvencia leolvasásokat a MetaSPAdes 3.15.0 verziójával állítottam össze (Nurk et al. 2017). A prodigal-t meta módban használtam a gének előrejelzésére a ≥ 1000 bp hosszúságú scaffoldok segítségével (Hyatt et al. 2010). A scaffoldok lefedettségét a metagenomikus leolvasások Bowtie 2-vel (Langmead and Salzberg 2012) történő leképezései alapján számítottam ki, és minden egyes scaffoldra konszenzusos taxonómiát határoztam meg a megfelelő scaffoldokon lévő egyedi gének taxonómiai annotációi alapján, a Borref100 adatbázisban írták le (Bornemann et al., (2020)).

4.3.3. Genomok meghatározása a metagenomokból (MAGs)

A genomokat két különböző binning eszközzel csoportosították: az Abawaca (<https://github.com/CK7/abawaca>) használatával, amelynél a minimum és maximum szekvencia-fragmentációs paraméterek 3 kbp és 5 kbp, illetve 5 kbp és 10 kbp voltak, valamint a MaxBin2 (Wu et al. 2016), amelyet mindkét marker készlettel alkalmaztak. Az összes generált bin-t a DAS eszközzel összesítettük és az uBin segítségével választottam ki. A rekonstruált genomok taxonómiai eredetét a GTDB-tk classify_wf munkafolyamat segítségével határoztam meg a GTDB r89 verziójával. A genomokat a Microbial Genome Annotation & Analysis Platform MicroScope segítségével annotáltam. Ezenkívül a xenobiotikumok metabolizmusával kapcsolatos gének feltételezett funkcióit azonosítottam és bioinformatikailag elemeztem a MaGe és az UniProt adatbázis segítségével.

4.4. Gyógyszerhatóanyagbontó baktériumtörzsek izolálása

Az egyes dúsító tenyészetekből baktériumtörzseket izoláltam hagyományos mikrobiológiai módszerek alkalmazásával (Pápai et al., 2023). A potenciálisan gyógyszerhatóanyagbontó baktériumok izolálását a dúsító tenyészetekből minden hónap letelte után végeztem el. Minden dúsító tenyészetből 1 ml-t használtam fel 10-szeres sorozathígítás készítéséhez fiziológiás

sóoldatban (0.9% NaCl). A sorozathígított mintákból 100 µl-t szélesztettem R2A (proteáz pepton 0.5 g; kazamínosavak 0.5 g; élesztőkivonat 0.5 g; dextróz 0.5 g; oldható keményítő 0.5 g; dikálium-foszfát 0.3 g; magnézium-szulfát 7H₂O 0.05 g; nátrium-piruvát 0.3 g; agar 15 g; pH 7) agarlemezeken felületére. A ráoltás után a Petri-csészéket 28 °C-on 48 órán keresztül inkubáltam. A kinövő, eltérő morfológiájú telepeket tisztító szélesztési technikával tisztítottam és ferde R2A agaron 4 °C-on tartottam fenn a további vizsgálatokhoz. A hosszabb távú megőrzés érdekében a tisztított törzseket - 80 °C-on tároltam glicerin-R2A oldatban (30% v/v).

4.4.1. A baktérium izolátumok 16S rRNS gén alapú beazonosítása

Első lépésként az izolátumok genomi DNS-ét a DNeasy® UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (Qiagen, Németország) segítségével vontam ki a gyártó utasításai alapján. A következő lépésben a baktériumfajokra specifikus 16S rRNS géneket PCR útján amplifikáltam a 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') és az 1492R (5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGAC TT-3') univerzális bakteriális primerekkel. A PCR reakcióelegy végtérfogata 50 µl, amely 5 µl, MgCl₂-al (2 mM) kiegészített 10 x DreamTaq™ puffert (ThermoFisher Scientific, Litvánia), 0.2 mM-t minden egyes dNTP-ből, 0.1 µM-t a primerekből, 1 U DreamTaq™ DNS polimerázt (ThermoFisher Scientific, Litvánia), ~30 ng DNS-t és nukleázmentes vizet tartalmazott. Az amplifikációhoz használt hőmérsékleti profil egy 3 perces kezdeti denaturációval indul 95 °C-on, majd követi egy 32 cikluson keresztül történő 30 másodperces denaturálás 94 °C-on, 30 másodperces anelláció 52 °C-on, 1 perces elongáció 72 °C-on. Utolsó lépésként 10 perc és 10 másodpercig 72 °C-on zajló végső elongációval zárul a folyamat.

Minden amplifikációt gél-elektroforézis segítségével ellenőriztem 1%-os (w/v) agaróz gélen, melyet UV lámpa fényében elemeztem ki. A PCR amplikonokat NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Németország) készlettel tisztítottam.

A következő lépésben a kapott 16S rRNS gének nukleotid szekvenciáit Sanger-szekvenálással határoztam meg BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA) segítségével. A szekvenciákat ABI 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, USA) segítségével elemeztem ki. Az eredményül kapott szekvenciák elektroferogramjait MEGA 11 (https://megasoftware.net/dload_win_beta) szoftver segítségével értékeltem ki, majd homológia BLAST-olást végeztem a GenBank adatbázisában (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) megtalálható 16S rRNS szekvenciákkal. A szekvenálás

során hozzávetőlegesen 1500 bázispárnyi leolvasott 16S rRNS szakaszok alapján a prokarióta mikrobák beazonosíthatóak, akár fajszinten is. Az azonosítás érdekében az EzTaxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>) adatbázisában felelhető 16S rRNS géneket használtam az izolátumok legközelebbi rokon típustörzseinek a meghatározásához. A vizsgálat során kapott 16S rRNS génszekvenciák adatainak az eredményeit a GenBank-ban helyeztem el (GenBank kódokat a 3. melléklet táblázata tartalmazza).

4.5. Izolátumok gyógyszerhatóanyag-bontó képességének a vizsgálata

4.5.1. Resazurinos előtesztelés

Tizzard et al. (2006) szerint a resazurin-alapú tesztek felhasználhatók a baktériumok lebontó képességének gyors vizsgálatára. Ugyanezt a megközelítést a munkacsoportunk már sikeresen alkalmazta egy korábbi tanulmányban az egyszerű aromás szénhidrogén bontó baktériumok esetén (Benedek et al. 2018).

Az izolált baktériumtörzsek esetében megvizsgáltam, hogy milyen mértékben képesek a vizsgált gyógyszerhatóanyagokat 10 mg/l DIC, IBU vagy CBZ egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani. Az előteszteléseket 3 párhuzamosban végeztem 100 ml Bushnell-Haas ásványi tápoldatban ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, NH_4NO_3 1 g, KH_2PO_4 1 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, H_2O 1 L, pH 7) resazurin redox indikátorral kiegészítve (1 mg/l). A tesztoldatokat fiziológiás sóoldatban szuszpendált baktériumsejt-szuszpenzióval (100 μl , $\text{OD}_{600\text{nm}}=1$) oltottam be. Baktériumot nem tartalmazó abiotikus tesztoldatokat és szénforrás nélküli tápközeget tartalmazó vakmintákat is beállítottam és kontrollként használtam. A vizsgált izolátumok aktivitását spektrofotometriásan mértem a tesztoldatok abszorbanciájának a mérésével 610 nm-en (resazurin indikátor abszorbanciája, A_{610}). A kontroll mintákhoz (abiotikus kontrollhoz és vak mintákhoz) képest a beoltott és a DIC, IBU vagy CBZ-vel kiegészített tesztoldat alacsonyabb A_{610} -es értéke a vizsgált izolátum aktivitását jelezte a gyógyszerhatóanyag jelenlétében, ami a feltételezhetően a biológiai lebontást jelzi az egyes baktérium izolátumok esetében. Minél nagyobb a mikrobiális aktivitás a tesztoldatokban, annál intenzívebb az A_{610} érték csökkenése. Minél nagyobb a különbség a 610 nm-en mért abszorbancia értékben a kontrollok és a tesztoldatok között, annál nagyobb a vizsgált izolátumok metabolikus aktivitása. Az előtesztelés két hétig zajlott, a tesztoldatokat rázóinkubátorban inkubáltam rázótermosztátban 145 fordulat/perc sebességgel és 27 °C-on. A kísérlet indításakor minden mikrokozmosz (beleértve az abiotikus és vakminták esetén is) majdnem egyező értékeket mutatott A_{610} -en (0.146 ± 0.002).

4.5.2. HPLC mérések

A HPLC vizsgálatokat a resazurinos tesztelésnél ismertetett ásványi tápoldatban végeztem alacsonyabb diklofenák, ibuprofen és karbamazepin koncentrációk mellett (1.5 mg/l). A resazurint már nem tartalmazó ásványi tápoldatokat (50 ml) 50 µl OD600 = 1 optikai denzitású baktérium szuszpenziókkal oltottam be és 28 °C-on 145 rpm fordulatszámon több hétig inkubáltam (esetenként három hónapig). Az egyedüli szén és energiaforrásként diklofenákot, ibuprofent vagy karbamazepint tartalmazó tesztoldatok mellett kometabolikus bontási kísérleteket is beállítottam. A kometabolikus bontási kísérletek során a gyógyszerhatóanyagok mellett a tesztoldatok könnyebben metabolizálható szén- és energiaforrásokat is tartalmaztak, úgymint élesztőkivonat (0.05 g/l vagy 0.3 g/l), glükóz (0.5 g/l vagy 3 g/l), nátrium-acetát (0.8 g/l) vagy nátrium-citrát (0.8 g/l). A bontási kísérleteket három párhuzamosban végeztem abiotikus kontroll minták kíséretében.

Bizonyos inkubációs idők letelte után, közvetlen a HPLC vizsgálatok előtt 2 ml tesztoldatot 0.45 µm-es cellulóz-acetát (Whatman) szűrőn HPLC fiolákba átszűrtem és direkt mértem Chromaster Hitachi HPLC készülékkel Ascentis C18-as oszlopon (150 x 0.46 mm) 0.02 M KH₂PO₄-acetonitrilt használva oldószerként izokratikus elúcióval (0:50%, v/v; 0.9 ml min⁻¹). A vegyületek detektálásához diódasoros detektort használtam. A diklofenákot 202 nm, az ibuprofent 196 nm, és a karbamazepin 214 nm-en detektáltam. A biodegradációs kísérletek végén meghatároztam az esetlegesen a biomasszához adszorbeált gyógyszerhatóanyagok mennyiségét is. A teljes mikrokozmosz baktériumszuszenzióját lecentrifugáltuk (2360 g 10 perc) és a biomasszát (pellet) 5 ml HPLC minőségű acetonitrilben újraszuspendáltam. A következő lépésben az újraszuspendált biomasszát 3-szor ultrahanggal kezeltem 30 másodpercen keresztül 20 kHz-en 20%-os amplitúdóval Branson Digital Sonifer (Emerson Industrial Automation) alkalmazásával. Két ultrahangos lépés között a szuszpenziókat 30 másodpercig vortexeltem. Az ultrahangos kezelés (szonikáció) után a mintákat centrifugáltam és a felülúszókat (0.22 µm-es nylon fecskendőszűrővel) gömbölyű fenékű bepárlóval (Sigma-Aldrich, Magyarország) pároltuk be maximum 40 °C-on és a maradékot 2.5 ml BHB ásványi sóoldatban újra feloldottam. Az oldatban lévő gyógyszerhatóanyagok koncentrációját HPLC-vel határoztam meg a fent leírtak alapján.

4.5. Bakteriális konzorcium kialakítása és potenciális gyógyszerhatóanyagbontó képességének meghatározása

A kutatás korábbi szakaszában kiválogatásra kerültek azok a baktériumtörzsek, illetve körülmények, amelyek esetében laboratóriumi vizsgálatok során a konzorcium a legnagyobb

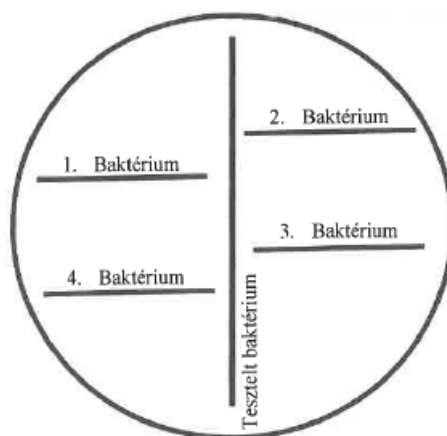
hatékonysággal bontotta a cél gyógyszerhatóanyagokat, mint jelen esetben a diklofenákot, az ibuprofent és a karbamazepint. Egy sikeres baktériumkonzorcium kialakítása során hatékonyabb lebontás válhat valóra, mivel a törzsek metabolikus képességei összeadódnak és egymást kiegészítve hatékonyabb bontásra lehetnek képesek.

4.5.1. Együtt-tenyésztési vizsgálatok

Célom volt az együtt-tenyésztési vizsgálatok során felmérni, hogy a kiválasztott baktériumtörzsek alkalmasak lehetnek vagy sem egy konzorcium létrehozására. A vizsgálatot két tenyésztéstől függő módszer alkalmazásával végeztem el, a keresztcsíkozásos, illetve az agardiffúziós lyuk-teszt segítségével.

4.5.2. A keresztcsíkozásos módszer

A vizsgálat során aktív baktériumtenyészetekkel (48 órás tenyészetek) dolgoztam. Az izolátumokat keresztcsíkhúzással szilárd R2A agar felületére oltottam, minden egyes vizsgálni kívánt törzssel megismételtem (7. ábra). A tesztmikrobák leoltását követően, az 1 hetes inkubálás után a lemezek értékelése az egyes csíkok közötti gátlási távolság vizsgálatával történik.



7. ábra Keresztcsíkozásos együtt-tenyésztési módszer bemutató rajza

4.5.3. Agardiffúziós lyuk-teszt

A vizsgálni kívánt baktériumokat (48 órás aktív tenyészeteket) beoltottam folyékony „Rich” tápoldatba és egy héten keresztül 28 °C-on inkubáltam 145 rpm rázatás mellett. „Rich” tápoldat 1000 ml desztilláltvízben 10.0 g proteóz peptont; 2.0 g hús peptont; 5.0 g casamino savat; 5.0 g élesztő kivonatot; 2.0g glicerint; 1.0 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g Tween 80 és 10.0 g glükózt 1000 ml dH_2O -ban feloldva tartalmaz pH 7.2.

Az egyhetes tenyészetekből az együtt-tenyésztési vizsgálatok napján $\text{OD}_{600}=1$ szuszpenziókat készítettem. 50 ml baktériumszuszpenziót centrifugáltam (4600 rpm, 20 perc) majd a pelletet

fiziológiás sóoldatban vettem fel a kívánt optikai denzitás eléréséhez. A kapott baktériumszuszpenziókkal (200 µl) külön-külön beoltottam 50-50 ml, 35 °C-ra visszahűtött R2A tápogart, amely sterilen szűrt (0.2 µm) TTC (2,3,5-trifenil-tetrazolium klorid) oldatott tartalmaz (1%-os TTC oldatból 500 µl-t adtunk 50 ml R2A agarhoz). Steril fülke alatt, 45 perc szilárdulási idő után a tápogarba steril pipettaheggyel segítségével 7 mm átmérőjű lyukakat fúrtam.

Az egyhetes „Rich” tenyészeteket (50 ml) 4600 rpm-en 15 percen keresztül centrifugáltam, hogy baktériumsejt mentes felülúszót kapjunk. A sterilitás érdekében a felülúszót 0.2 µm cellulóz-acetát membránszűrőn is átszűrtem egy steril Falcon csőbe (15 ml), mivel adott esetben a felülúszó antimikrobiális anyagokat is tartalmazhat. A leszűrt felülúszót belepipettáztam az R2A agarba előzőleg fúrt lyukakba. A felülúszóban található antimikrobiális anyagok a lyuk szélétől indulva bediffundálnak a táptalajba. Abban az esetben, ha az adott baktérium felülúszója tartalmazza a vizsgált baktériumra gátló hatását kifejtő anyagot, akkor a lyukak körül gátlási, feltisztulási zónák alakulnak ki. A TTC jelenlétének köszönhetően az agar azon részei, ahol a beoltott baktériumok képesek növekedésre rózsaszínné válnak, gátlási zónában kifehéredik. Végso kiértékelés a gátlási zónák méretének lemérésével történik.

4.5.4. A bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó hatékonyságának a vizsgálata ásványi tápoldatban; természetes vízmintában és szennyvíz effluensben

A konzorciumot alkotó baktérium törzsekkel történő vizsgálatok során 100 ml Bushnell-Haas ásványi tápoldatot (BHB) gyógyszerhatóanyag keverékkel (1.5-1.5 mg/l) 1:1:1 arányban diklofenákkal, ibuprofennel és karbamazepinnel egészítettem ki. Az egyedüli szén- és energiaforrásként felhasznált gyógyszerhatóanyagok mellett könnyebben metabolizálható szén- és energiaforrásokkal is elláttam a kiinduló tesztoldatot, úgy, mint élesztőkivonat (0.3 g/l) és glükóz (3.0 g/l). A tesztoldatokat 100 µl OD600 = 1 optikai denzitású baktériumszuszpenzióval oltottam be (R2A tápoldatban nőttek), amely 1:1 arányban tartalmazta a vizsgált baktériumtörzseket. A vizsgálatokat 3 párhuzamosban végeztem, abiotikus kontrollokat is belállítottam, mely a baktérium szuszpenzió kivételével az összes fent említett vegyületet tartalmazta. A teszteket 4 héten keresztül inkubáltam rázóinkubátorban 145 fordulat/perc sebességgel 28 ± 2 °C-on, és hetente egyszer vettem mintát minden egyes beállításból. Vizsgálatainkhoz a természetes vízmintát a Rákospatak Gödöllő (2. táblázat), Alsóparki szakaszán vettük 2022.03.16.-án, míg a szennyvíz effluenszt a Gödöllői Szennyvíztelep kifolyó (3. táblázat), tisztított szennyvize adta, ahol a mintavétel 2022.08.15.-én történt. A szennyvíz effluens általános fiziko-kémiai paramétereit a Wessling Hungary Kft.

határozta meg szabványosított módszerek alapján. A vizsgálat során a gyógyszerhatóanyagok koncentrációváltozásának nyomonkövetésére nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát használtam (HPLC). A 3 gyógyszerhatóanyag koncentrációjának nyomonkövetése HPLC készülékkel történt a 4.4.2 fejezetben leírtakkal megegyezően.

2. táblázat Kísérleti beállítások természetes vízminta vizsgálata során

Beállítás elnevezése	Vízminta	Vízminta kezelése	Baktérium konzorcium	Glükóz/Élesztő	Ammónium-nitrát (NH ₄ NO ₃)
Abiotikus kontroll	Rákospatak	szűrve	-	+	+
Biotikus Kontroll	Rákospatak	szűretlen	-	-	-
Minta I.	Rákospatak	szűretlen	+	-	-
Biotikus kontroll	Rákospatak	szűretlen	-	+	-
Minta II.	Rákospatak	szűretlen	+	+	-
Biotikus kontroll	Rákospatak	szűretlen	-	+	+
Minta III.	Rákospatak	szűretlen	+	+	+

3. táblázat Kísérleti beállítások szennyvíz kifolyó vízminta vizsgálata során

Beállítás elnevezése	Vízminta	Vízminta kezelése	Baktérium konzorcium	Glükóz/Élesztő	Ammónium-nitrát (NH ₄ NO ₃)
Abiotikus kontroll	szennyvíz kifolyó	szűrve	-	+	+
Biotikus Kontroll I.	szennyvíz kifolyó	szűretlen	-	-	-
Minta I.	szennyvíz kifolyó	szűretlen	+	-	-
Biotikus kontroll	szennyvíz kifolyó	szűretlen	-	-	+
Minta II.	szennyvíz kifolyó	szűretlen	+	-	+
Biotikus kontroll	szennyvíz kifolyó	szűretlen	-	+	-
Minta III.	szennyvíz kifolyó	szűretlen	+	+	-
Biotikus kontroll	szennyvíz kifolyó	szűretlen	-	+	+
Minta IV:	szennyvíz kifolyó	szűretlen	+	+	+

4.6. Terminális Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálati módszer

A tesztoldatokban a konzorcium tagjainak nyomonkövetésére egy T-RFLP módszert is kifejlesztettem. A cél az volt, hogy tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerrel kimutassam, hogy hogyan változik a konzorcium tagjainak relatív abundanciája a kísérletek folyamán az ásványi tápoldatban, illetve a természetes vízminta autochton baktériumközösségének jelenlétében.

4.6.1. DNS szakaszok felszaporítása PCR segítségével a közösségi T-RFLP analízishez

A T-RFLP egy olyan molekuláris biológiai módszer, amely alkalmas mikroba közösségének összetételében történő változások nyomon követésére és elemzésére.

Első lépésként a közösségi DNS-ből 16S rRNS génre specifikus PCR láncreakciót készítettem. A baktériumoknál ez a génszakasz a 16S rDNS körülbelül 1500 bázispár hosszúságú, ami számos konzervált régiót tartalmaz. Konzervált régiók olyan bázispár sorozatok, melyek minden baktérium esetében megtalálhatóak, megegyeznek. Ezek a konzervált szakaszok közötti variabilitás segítségével tudjuk összehasonlítani az egyes fajok genetikai kapcsolatát, hovatartozását.

A T-RFLP során szintén szükség van a vizsgálni kívánt templát szakaszok felsokszoroztatásához, amihez a fent leírtakhoz hasonlóan PCR reakciót alkalmaztam. Azonban itt szükség van egy fluoreszcensen jelölt primerre, amely jelen esetben a Forward primer (27f VIC). A PCR mastermix összemérése során ugyanazokat az összetevőket és mennyiségeket használtam és láncreakció szintén a 4.4.1. fejezetben leírtakkal megegyező módon zajlott. A fluoreszcens jelölés elengedhetetlen, mivel lehetővé teszi a terminális fragment hossz emésztés utáni meghatározást kapilláris gélelektroforézissal.

A szükséges PCR mastermix egy minta esetében 16S rDNS PCR-hez az alábbiakat tartalmazza: 5 µl 10x PCR puffer (Fermentas, Litvánia); 2 mM MgCl₂ (Fermentas, Litvánia); 0,3 µM forward primer: VIC fluoreszcens jelöléssel ellátott 27f 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Lane, 1991, Integrated DNA Technologies, Belgium); 0,3 µM reverse primer: 519r 5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3' (Turner et al., 1999); 1 U DreamTaq™ DNS polimeráz, 0,8 µM dNTP (dezoxi-nukleotid-trifoszfátok) (Fermentas, Litvánia); 2 µl templát DNSMQ víz a végső térfogat 50 µl-ig való kiegészítéséhez.

4.6.2. A közösségi PCR termék restrikciós emésztése

T-RFLP során használt restrikciós endonukleázok képesek a 16S rRNS génszakaszokat adott ponton hasítani, mivel bizonyos nukleotid szekvenciákat felismernek. Az előzőekben amplifikált fluoreszcensen jelölt PCR termékeket jelen esetben az *AluI* (AG↓CT hasítási hely; Thermo Scientific™, USA) enzimmel 37 °C-on emésztettem 1 órán keresztül. A reakció elegybe 2 µl Tango Buffer, 0,3 µl *AluI* enzim és 7,7 µl MQ víz került, melyhez 10 µl templátot adtam.

4.6.3. Emésztett PCR termék etanolos precipitációja és analízise

Az emésztett PCR termékeket etanolos precipitációnak vettem alá, hogy a megfelelő tisztaságú végterméket kapjak. Mintánként 3 µl 3M-os nátrium-acetátot, 62,5 µl 96%-os etanolt és 14,5 µl MiliQ vizet használtam. A homogenizálás asztali rázógép (vortex) segítségével történt, majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubálódott. Az inkubálást 4 °C-on 20 percen keresztül tartó 4600 rpm-n történő centrifugálás követte. A felülúszó leöntését követően a pelletre 180 µl 70%-

os etanolt pipettáztam, amit egy újabb centrifugálás követett (4 °C-on 15 perc, 4600 rpm). A felülúszót ismételten eltávolítottam. A minta megfelelő kiszáritása érdekében még 1 percen keresztül 1000 rpm-en még egyszer lecentrifugáltam, majd pár percre hagytam elpárologni a maradék etanolt is. A végső terméket 25 µl steril desztillált vízben szuszpendálva vettem fel. Az analízishez az *AluI* restrikciós enzimmel emésztett és tisztított DNS-ből 1 µl-t használtam, melyhez 18 µl Hi-Di formamidot és 0.4 µl standard meghatározott hosszúságú DNS fragment (LIZ 1200, Applied Biosystems, USA) adtam hozzá. Az ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA) segítségével történt a kapilláris gél-elektroforézis. Az eredményül kapott elektroferogramot GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, USA) programmal dolgoztam fel.

4.7. Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok

A doktori munkám alatt a dúsítások során céлом volt olyan baktérium törzseket izolálni, amelyek képesek lehetnek a kiválasztott gyógyszerhatóanyagok hatékony lebontására. Sikerült számos könnyen tenyésztethető és jól ismert baktérium fajt izolálni. Azonban egy esetben sikerült a tudomány számára még ismeretlen baktériumfajt is tenyésztésbe vonni, amely, mint később kiderült rendelkezik olyan génekkel, melyek segítségével képes az ibuprofen mérsékelt bontására.

A következőkben bemutatásra kerülnek, azok a vizsgálatok, amelyek elengedhetetlenek egy a tudomány számára új mikroorganizmus leírásához. Napjainkban a baktériumtörzsek azonosítása a 16S rRNS gének szekvenciáján alapszik. Potenciális új fajnak számít egy baktériumtörzs, melynek a 16S rRNS génje alapján alacsonyabb, mint 98%-os egyezést mutat más baktériumfajokkal (Johansen and Casamatta, 2005).

4.7.1. Baktériumtörzs izolálás és a vizsgált törzs jellemzése

Az izolálás folyamatát az 4.6. fejezetben leírtak alapján végeztem el. A *Nocardoides carbamazepini* CBZ_1^T-es új baktériumfaj izolálása egy bakteriális biofilmet tartalmazó felszínalatti vízmintából történt egy hónapos dúsítást követően, mely egyedüli szén és energiaforrásként karbamazepinnel (100 mg/l) volt kiegészítve. A mintát szintén glicerín-R2A oldatban (30% v/v) tároltam -80 °C-on.

A taxonómiai vizsgálatokhoz használt referenciaorganizmusok a *Nocardoides*-fajok olyan típus törzsei voltak, mint a *N. kongjuensis* DSM19082^T, a *N. nitrophenolicus* DSM15529^T és a *N. daeguensis* JCM17460^T. A DSM- és JCM-számmal ellátott törzseket a DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Németország) és a Japan Collection of Microorganisms, RIKEN (Wako, Japán) gyűjteményekből szereztem meg.

A vizsgálat különböző szakaszaiban, valamennyi törzs tenyésztéséhez R2A táptalajt használtam.

4.7.2. 16S rRNS gén szekvenálás és filogenetikai elemzések

16S rRNS alapon történő gén szekvenálást az 4.6.1. fejezetben leírtaknak megfelelően végeztem el. A CBZ_1^T törzs 16S rRNS génszekvenciáját a GenBank-ban MZ408918 elérhetési számon helyezték el.

A szekvenciák többszörös illesztését, az evolúciós távolság kiszámítását Kimura kétparaméteres modellje alapján, valamint a szomszédos kapcsolatok filogenetikai és a Maximum Likelihood fa építését is a MEGA X segítségével végeztem el. A fák topológiáját 10000 újramintavételezéssel (bootstrap) értékeltem.

4.7.3. Teljes genom szekvenálás (WGS) és elemzése

A CBZ_1T törzs teljes genomszekvenciálását a SeqOmics Kft. végezte el. A Nextera Mate Pair Sample Preparation Kit (Illumina, USA) segítségével párosított könyvtárakat hoztak létre a gyártó protokollja szerint. Összesen 13 µl Mate-Paired Tagment Enzyme-et használtak a 7-11 kbp hosszúság közötti DNS frakció létrehozásához. A 7-11 kbp DNS-frakciót a Zymoclean Large Fragment DNA Recovery kit (Zymo Research, USA) segítségével nyerték ki a gélből és a cirkularizált DNS-t a Covaris S2 segítségével távolították el. Minden minőségi mérést TapeStation 2200 műszerrel (Agilent, USA) végeztek. A végleges könyvtárak minőségének ellenőrzése Qubit (ThermoFischer, USA) segítségével történt és végül maga a szekvenálás Illumina MiSeq platformon történt a MiSeq Reagent Kit v2 (500 ciklus) felhasználásával. A de novo összeszerelést és a scaffoldingot a CLC Genomics Workbench Tool v11 (Qiagen, Németország) alkalmazásával végezték el. A *Nocardioides* sp. nov. CBZ_1T törzs teljes genomszekvenciáját elhelyeztem az NCBI nyilvános adatbázisában, ahol a következő nyilvántartási szám alatt érhető el: JAHTLF000000000.

A CBZ_1T törzs pontos rendszertani helyzetének megállapítása érdekében a rendelkezésre álló bakteriális genomok felhasználásával a CBZ_1T törzs és a legközelebbi rokonok közötti ANI (átlagos nukleotid hasonlóság) és dDDH (in silico digitális DNS-DNS hibridizáció) értékeket az EZ-Biocloud szerver alapú genom-genom távolság kalkulátor 2.1 verziója segítségével számoltam ki. Meghatároztam a CBZ_1T törzs és a rekonstruált *Nocardioides* sp. bin2 közötti ANI- és dDDH értékeket is.

A *N. daeguensis* JCM 17460T nyilvánosan elérhető genomszekvenciája nem állt rendelkezésre. Következésképpen a genom alapú filogenetikai vizsgálatokhoz a JCM 17460T törzs teljes

genomszekvenciáját a CBZ_1T törzs teljes genomjához hasonlóan a vizsgálat során meghatároztam. A *N. daeguensis* JCM 17460T törzs genomszekvenciájának nyilvántartási száma a következő: JAHUBO000000000.

A CBZ_1T törzs genomjának annotálását a Microbial Genome Annotation & Analysis Platform MicroScope (MaGe) (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>) segítségével végeztem. Emellett a xenobiotikumok metabolizmusához kapcsolódó gének feltételezett funkcióit azonosítottam és bioinformatikai szempontból elemeztem ki a MaGe és az UniProt adatbázis együttes használatával és BLAST keresések segítségével.

4.7.4. Filogenetikai fa rekonstrukciók

Első kísérletként a genom-alapú filogenetikai vizsgálatához a 92 központi gént („core gene”) elemző UBCG (up-to-date bacterial core gene) megközelítést használtam. A filogenetikai fát minden egyes génre, valamint a 92 UBCG-nek egy összefűzött szekvenciájára (UBCG-fa) készítettem el az NCBI-on elérhető genomok felhasználásával, azoknak a *Nocardioide*s fajok genomjaiból, amelyeket a 16S rRNS gén alapú filogenetikai fa létrehozásához használtam. Az összefűzött illesztésekből generált fa a teljes genomok valódi evolúciós változásait reprezentálja, azonban eltérhet az egyedi gének alapján generált fák topológiájától. Az egyes ágak robusztusságának becsléséhez kiszámítottam a Gén Támogató Indexet (GSI). Minél magasabb a GSI, annál robusztusabb az ág előfordulási gyakorisága.

A kapott UBCG filogenetikai következtetések megerősítése érdekében egy második filogenomikai fát generáltak 101 bakteriális teljes genóma és 120 bakteriális marker gén felhasználásával, amelyek különböző *Nocardioide*s fajok típus törzseiből származnak. Első lépésként a GTDB-Tk classify_wf (Genome Taxonomy Database Toolkit) munkafolyamatot alkalmazták a GTDB-Tk MSA fájl előállításához, amelyet a filogenetikai fa generálásához használtak az IQTree programmal (bootstrap allignációk száma: 1000, maximális iterációk száma: 1000, minimális korrelációs együttható: 0,99, perturbációs erősség: 0,5, IQTree leállási szabály: 100). Ezt követően a kapott Newick fájlt az iTOL programmal vizualizálták.

4.7.5. Pán genomikai vizsgálat és az új *Nocardioide*s *carbamazepini* környezetvédelmi vonatkozása

Az új faj és a többi *Nocardioide*s spp. közötti genomikai tartalmi különbségek megismerése érdekében pán genom-analízist végeztem a teljes genom alapú filogenetikai fa alapján meghatározott legközelebbi 23 *Nocardioide*s sp.-vel.

Az Anvi'o 7 segítségével adatbázis készült a 25 genomból (anvi-gen-contigs-database és anvi-gen-genomes storage). Az Anvi'o 7 egy bioinformatikai eszközkészlet, amely adatokat dolgoz fel, például metagenomikai adatsorokat, genomi adatokat és szekvenciális információkat különböző formátumokban. A kapott adatbázisból az anvi-pan-genome segítségével pángenom adatbázist hoztam létre. A pángenom adatbázist ANI-számításokkal egészítettük ki az Anvi'o-n belüli FastANI program használatával (anvi-compute-genome-similarity). A kapott eredményeket az anvi-display-pan segítségével vizualizáltam és az anvi-summarize segítségével összegeztem. Az új fajokra jellemző egyedi genomszigeteket (UGI) is meghatároztam.

Annak a megállapításnak a bizonyítása érdekében, hogy a kapott új *Nocardioides* sp. jelen van más gyógyszerhatóanyagokkal terhelt mintákban például a gyógyszeripari vegyületeknek kitett metagenomokban, a kapott CBZ_1^T törzs genomjára rátérképeztem a trimetoprimmel és a karbamazepinnel szennyezett mintákból származó metagenom szekvenciákat (Balcom et al., 2016; BioProjectAccession PRJNA286671) és a CoverM programmal relatív abundancia értékeket számoltam.

4.7.6. Morfológiai, fiziológiai és biokémiai vizsgálatok

A CBZ_1^T-es izolátum sejtméretét, alakját és elrendeződését natív preparátumokkal és Gram-festéssel vizsgáltam Claus 1992.-es munkája szerint. Morfológiai tulajdonságainak megállapításához transzmissziós elektronmikroszkópiát (Morgagni 268) használtam (Szoboszlai et al., 2008). A transzmissziós elektronmikroszkópiához a sejeket 1 % (w/v) uranil-acetáttal negatívan festettem. Meghatároztam a CBZ_1^T törzs növekedését (28 °C, 7 pH) különböző táptalajokon, úgymint R2A tápoldatban (proteáz pepton 5 g, marhahús kivonat 3 g, NaCl 5 g), LB (tripton 10 g, élesztő kivonat 5 g, NaCl g) és TSA- triptikáz szója (tripton 15 g, szója pepton 5 g, NaCl). Az izolátum hőmérséklettűrését R2A táptalajon 4, 15, 23, 28 és 37 °C-on vizsgáltam. A növekedés optimális pH-értékét R2A táptalajban határoztam meg és a táptalajt citrát/NaH₂PO₄ puffer (0.1 M, pH tartomány 4.0-5.0), foszfátpuffer (0.1 M, pH tartomány 6.0-7.0), Tris puffer (0.2 M, pH tartomány 8.0-10.0) és NaOH (5 M, pH- tartomány 10.0-12.0) segítségével állítottuk be pH 4.0-12.0-re (1 pH egységenként). A sőtűrést a törzsek beoltásával határoztam meg R2A táptalajba, amelyet 0-4% (w/v) NaCl-dal egészítettem ki 1%-os egységenként. Az optimális tenyésztési körülmények meghatározása és a tolerancia tesztek során a baktériumok növekedését a baktériumszuszpenzió 600 nm-en történő optikai denzitásának (OD) mérésével követtem nyomon. Az anaerob körülmények közötti növekedést R2A tápoldatban vizsgáltam 0.15% (w/v) KNO₃ hozzáadásával és anélkül 28 °C-on. Az

anaerob körülmények biztosítása érdekében 100 ml-es, 50 ml R2A tápoldatot tartalmazó szérumüvegeket hermetikusan lezártam és steril körülmények között N_2/CO_2 -val (80:20, v/v) levegőztettem. Az oldott oxigén koncentrációját a palackokban non-invazív módon, az üveg belsejébe ragasztott PSt3 szenzorok segítségével, illetve Fibox 3 trace 3. verziójú száloptikás oxigénmérővel (PreSens) mértem.

A fiziológiai és biokémiai vizsgálatokat, mint például a kénhidrogén termelését ciszteinnél, a Tween 80, zselatin, kazein és keményítő hidrolízisé, valamint a DNáz aktivitását Barrow & Feltham (2003) protokollja szerint végeztem. A katalázaktivitást H_2O_2 (3%, v/v) hozzáadását követő buboréktermeléssel, az oxidázaktivitást pedig 1% (w/v) tetrametil-fenilédiamin-oxalát felhasználásával vizsgáltam.

CBZ_1^T törzset és a kiválasztott legközelebbi rokon fajok biokémiai jellemzőinek további meghatározásához API® 50CH, API® 20 NE és API® ZYM teszteket (bioMérieux, Franciaország) használtam a gyártó utasításai szerint.

4.7.7. Kemotaxonómiai elemzések

A kemotaxonómiai elemzéseket a Leibniz Intézet, DSMZ (braunschweig, Németország) végezte el.

A légzési kinonokat fagyasztva szárított sejtanyagból hexánnal extrahálták, majd szilika alapú szilárd fázisú extrakcióval tovább tisztították. A megtisztított mintákat HPLC-vel tovább elemzték fordított fázisú oszlop segítségével. Az ubikinonok esetében 270 nm-en, a menakinonok esetében 326 nm-en végezték el a relatív mennyiségi meghatározást.

A fagyasztva szárított biomasszából a poláris lipideket kloroform: metanol: 0.3%-os vizes NaCl keverékkel extrahálták és a kloroform fázisban nyerték vissza. A poláris lipideket kétdimenziós szilikagél vékonyréteg-kromatográfiával választották el. Az első irányt kloroform: metanol: víz, a másodikat pedig kloroform: metanol: ecetsav: víz viszonylatban fejlesztették. Az összes lipidanyagot foszformolibdénsav jelenlétében detektálták.

A törzs peptidoglikán szerkezetét nedves biomasszából határozták meg (centrifugált pellet szuszpendálva izopropanol/víz 1:1 v/v arányban) (Schumann, 2011).

A sejtes zsírsavak meghatározásához minden törzset R2A táptalajon tenyésztettem. A CBZ_1^T törzs és a legközelebbi rokonok celluláris zsírsavait Miller (1982) és Kuykendall (1988) módszerének kisebb módosításai alapján szappanosítással, metilálással és extrakcióval zsírsav-metil-észterekké (FAME) történő átalakítás után elemezték. A zsírsav-metilészter keverékeket

gázkromatográfiával választották szét, és lángionizációs detektorral detektálták Sherlock Microbial Identification System (MIS) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 19711 U.S.A.) segítségével. A csúcsokat automatikusan integrálták és a zsírsavak nevét és százalékos arányát a MIS Standard Software (Microbial ID) segítségével számították ki.

4.7.8. A CBZ_1^T törzs gyógyszerhatóanyag-bontó képességének a vizsgálata

A CBZ_1^T törzs karbamazepin és ibuprofen lebontására való képességét vizsgáltam. A biodegradációs tesztet 50 ml Bushnell-Haas ásványi közegben végeztem, amelyet az előzőekben említett gyógyszerek egyikével, mint egyedüli szén- és energiaforrás (1.5 mg/l) egészítettem ki. Ezt követően kometabolikus biodegradációs vizsgálatot is végeztem. A fent említett vizsgálati oldatokhoz a gyógyszervegyületek mellett könnyen asszimilálható szénforrásokat is alkalmaztam; például élesztőkivonatot (0.05 vagy 0.3 g/l) illetve glükózt (0.5 vagy 3 g/l) adtam.

A vizsgálatok további lépései úgy, mint az inkubálás, HPLC mérés és a biomassa vizsgálata a 4.4.2. fejezethez megegyezően zajlottak le.

4.8. A *Stenotrophomonas humi* DIC_5 törzs diklofenák biotranszformációja során keletkező metabolit meghatározása

A három vizsgált gyógyszerhatóanyag közül a diklofenák jellemezhető leginkább ökotoxikológiai hatásokkal. Számos tanulmány beszámol arról, hogy környezetben releváns koncentrációban a diklofenák vesekárosodást, reprodukciós zavarokat okozhat szárazföldi és vízi élőlények esetében. A kísérlethez kiválasztott baktérium a *Stenotrophomonas humi* DIC_5 törzs, amelyet a korábbi munkánkban (Pápai et al., 2023) alaposan megvizsgált baktériumbiofilmből izoláltunk és a bakteriális konzorcium tagjaként és szerepelt bontási kísérletekben korábban.

4.8.1. Kísérlet, mintavétel és elemzés előkészítése

A bakteriális konzorcium egyik tagját, a *Stenotrophomonas humi* DIC_5 törzset külön egy részletesebb bontási kísérletnek is alávettem, mely során kíváncsi voltam a keletkező metabolitra és annak toxikus hatására.

A bontási kísérlet beállításai, a HPLC mérés és a biomassa vizsgálata teljes mértékben megegyezett az 4.4.2. fejezetben leírtakkal.

A mintavételezés azonban eltérő volt, minden egyes héten 2 ml folyadékot vettem ki az oldatokból egy orvosi fecskendő segítségével és nylon fecskendőszűrővel (0.22 µm) szűrtem

(AIWSCI Corporation; Kína). Minden nap két mintát vettem 8 órás különbséggel 14 napon keresztül. A mintákat – 20 °C-on tároltam a kémiai elemzés megkezdéséig.

4.8.2. Célkomponensek elemzése UHPLC-TQ-MS/MS segítségével

A célkomponensek elemzést UHPLC-TQ-MS/MS műszerrel végeztem, többszörös reakciómonitorozás (MRM) üzemmódban a DIC (diklofenák) és TP (átalakulási termék) esetében. A DIC kvantitatív elemzéseéhez, valamint a mikrobiális DIC metabolitok félkvantitatív meghatározásához negatív üzemmódban, ESI ionforrással működő Agilent Ultivivo UHPLC-TQ-MS/MS (USA) készüléket használtam. Az ionforrástól függő körülmények a következők voltak: a gáz hőmérséklete 300 °C, a gázáramlás 12.0 L/perc, a porlasztónyomás 30 psi és a kapilláris feszültsége 3000 V volt negatív ion üzemmódban. Deszolváló- és kúpgázként nitrogént alkalmaztam. A rendszer MRM üzemmódban a 294/250.2, 294/214 (DIC) és 339.0/259.0, 339.0/295.0 (TP) tömegátmeneteket mérte. Az oszlop Agilent Eclipse Plus C18 RRHD, 1.8 µm (2.1x 50 mm) volt, amelyet magas hőmérsékleten (40 °C) tartottam. A DIC-ot és a TP-t az oszlopból (A) 0.1%-os hangyasav MeOH-ban mobilfázisokkal eluáltam gradiens elúciós programmal, 5 perces teljes futási idővel és 0.4 ml/perc áramlási sebességgel. Az injektálás térfogata 5 µl volt.

4.8.3. A bomlástermékek azonosítása LC-MS módszerekkel

Ebben a vizsgálatban a DIC metabolitok azonosítására és szerkezetének tisztázására HPLC-Q-TOF-MS-t, míg a további megerősítésére UHPLC-TQ-MS-t alkalmaztam. A nagy felbontású vizsgálatokhoz egy Agilent 1100 HPLC (USA) rendszer állt a rendelkezésemre, amely bináris oldószer adagoló rendszerrel és automatikus mintavevővel volt felszerelve. Az elválasztás Phenomenex Kinetec 2.6 µm, C18, 150 x 4.6 mm-es kromatográfiás oszlopon történt. Az injektálási térfogat 20 µl volt. Az eluens 0.1% HCOOH, 5 mM ammónium-formiát volt vízben (A) és MeOH (B), a teljes futási idő 18 perc volt, az áramlási sebesség 0.6 ml/perc. Az LC rendszer egy négyfázisú tandem tömegspektrométerhez (Agilent 6550 iFunnel Q-TOF-MS, USA) kapcsolódott Dual AJS ESI ionforrással. Az ionforrás negatív üzemmódban üzemelt a következő feltételek mellett: gáz hőmérséklet 200 °C, kapilláris feszültség 3500V, fúvókafeszültség 1000 V, „Skimmer” feszültség 65 V, Source offset 80 V, Source hőmérséklet 110 °C, függőnygáz hőmérséklete 350 °C, gáz-áramlás sebessége 14 L/perc és kúpgáz-áramlási sebessége 11 L/perc. A műszer csak tömegspektrometria üzemmódban működött a 100/ m/z és 1700 m/z közötti tömegtartományban. Háromlépcsős azonosítási protokollt alkalmaztam a táptalajban levő lehetséges TP-k megtalálására. A DIC izotópmintázata tipikus, két klóratom jelenléte mutatja, ami szintén sokat segített a TP-k megtalálásában.

4.9. A *Stenotrophomonas humi* DIC_5 törzs diklofenák biotranszformációja során keletkező metabolit ökoltoxikológiai vizsgálata

4.9.1. *Allivibrio fischeri* akut biolumineszcencia teszt (Microtox®)

A DIC biodegradációs végtermékei citotoxicitásának meghatározására az ISO 11348-2 (2007) szabvány szerint végeztem el az akut *Allivibrio fischeri* biolumineszcencia mérést. A toxicitást a sejtek lumineszcenciájának gátlása alapján határozták meg 30 perc expozíció után. Nagy hangsúlyt fektettünk a kontroll körülmények vizsgálatára, mivel a baktérium, amely maga is termelhet anyagcsere termékeket, befolyásolhatja a vizsgálat eredményét. A biodegradációs kísérletekből származó mintákat (abiotikus kontroll, biotikus kontroll, BHB+glükóz, DIC_5) szűrtem (0.22 µm cellulóz fecskendőszűrővel) és a minták NaCl koncentrációját 2 m/m%-ra állítottam be. A tiszta gyógyszerhatóanyag, a diklofenák toxicitása is meg lett határozva. A diklofenák 20 mg/ml törzsoldatát dimetil-szulfoxidban (DMSO, CAS 67-68-5, tisztaság ≥99,99%, Fisher Scientific, USA) készítettem és 1.00E +02 mg/l-ről 6.25E+00 mg/l-re hígítottam 2 m/m%-os NaCl oldatban, amely 1 v/v% DMSO-t tartalmazott. Az oldószeres kontrollminták 2 m/m%-os NaCl oldat és hígító oldat (2 m/m% NaCl; 1 v/v% DMSO) voltak a biológiai lebomlású mintákhoz, illetve diklofenákhoz. A DIC toxicitásának értékelése során a DMSO végső koncentrációja 0.5 v/v% volt a vizsgálatban, ami nem toxikus a vizsgált szervezetre. A vizsgálatokat két párhuzamosban, kontroll és kilenc különböző koncentrációjú vegyszerrel végeztem 15 ± 0.2 °C-on. A relatív biolumineszcenciát 30 perces inkubáció után a Microtox® Model 500 Analyzerrel (SDI) detektáltam és határoztam meg a biolumineszcencia gátlását. A biológiai lebomlásból származó mintákat és a DIC által okozott gátlást a kiindulási koncentráció százalékos arányában fejeztük ki, amely a lumineszcencia 50%-os csökkenését eredményezte a kontrollminta lumineszcencia intenzitásához képest. Minden egyes minta esetében az effektív koncentráció (EC50) értékeket a MicrotoxOmni® szoftverrel (1.1. verzió, AZUR Enviromental Ltd., Egyesült Királyság) 30 perc kontaktidő után elvégzett koncentráció válaszgörbékből lett számolva.

4.9.2.1. Zebradániók tartása és petegyűjtése

A zebradániók tartását és ikragyűjtését a Csenki et al. (2019) által leírtak alapján végeztem. A laboratóriumban tenyésztett vad típusú AB törzsű zebradániókat 30 nőstényből és 30 hímiből álló tenyész csoportokban lettek tartva a Magyar Agrártudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetében, Techplast ZebTEC recirkulációs rendszerében (Techplast S.p.A., Olaszország) 25.5 ± 0.5 °C, pH 7.0 ± 0.2, vezetőképesség 550 ± 50 µS (rendszer víz) és 14 : 10 óra fény- sötét periódus mellett. A halakat naponta kétszer etették száraz granulátummal

(Zebrafeed 400-600 μm , Sparos Lda., Portugália), amelyet naponta egyszer frissen kikelt élő *Artemia salina* eleséggel egészítették ki. A halakat a kísérletet megelőző napon késő délután tenyésztőmedencékbe (Techiplast S.p.a.) helyezték és az elválasztófalak eltávolításával másnap reggel hagyták őket ívni. Az egyes párok ívását késleltettem, hogy az 1 sejtes embriók folyamatos utánpótlását biztosítsam.

4.9.2.2. Mikroinjektálás

A mikroinjektálást a Csenki et al. (2019) által leírtak szerint végeztem el. Az injekciós térfogatok 75 μm cseppátmérőjűek voltak, ami 0.22 nL, 100 μm 0.52 nL, 150 μm 1.77 nL és 200 μm 4.17 nL injekciós térfogatnak felelt meg az abiotikus kontroll, a biotikus kontroll és a DIC_5 minták esetében. Különböző injekciós térfogatok segíthetnek a reakciók skálájának vizsgálatában, az anyag metabolizmusának, a farmakokinetikai viselkedésének vagy a toxikus hatásának a felmérésében. A BHB+glükóz közeg toxicitását csak a legnagyobb csepptérfogattal vizsgáltam. Minden mikroinjektálást 3 ismétlésben végeztem (ismétlésenként 20 tojás).

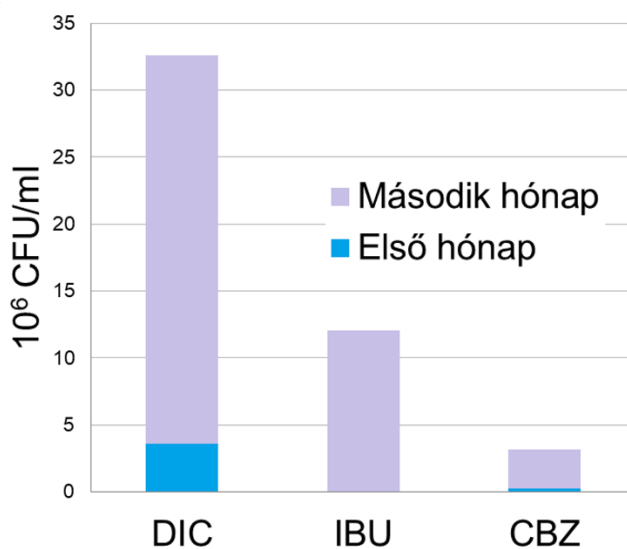
4.9.2.3. Az injektált embriók vizsgálata

Az embriók mortalitását 120 hpf (megtermékenyítés után eltelt idő órában) állapítottam meg a petesejtek koagulációja, a szomita képződés hiánya és a szívműködés alapján, majd 5 %-os metilcellulóz oldatot tartalmazó Petri-csészékbe helyeztem át őket. A szubletális tünetek dokumentálásra digitális képeket készítettem a lárvákról oldalirányban, 30x nagyítással sztereomikroszkóp alatt (Leica M205 FA, Leica DFC 7000T kamera és Leica Application Suite X szoftver Leica Microsystems GmbH, Németország).

5. Eredmények

5.1. Csíraszám becslés a dúsító tenyészetekből

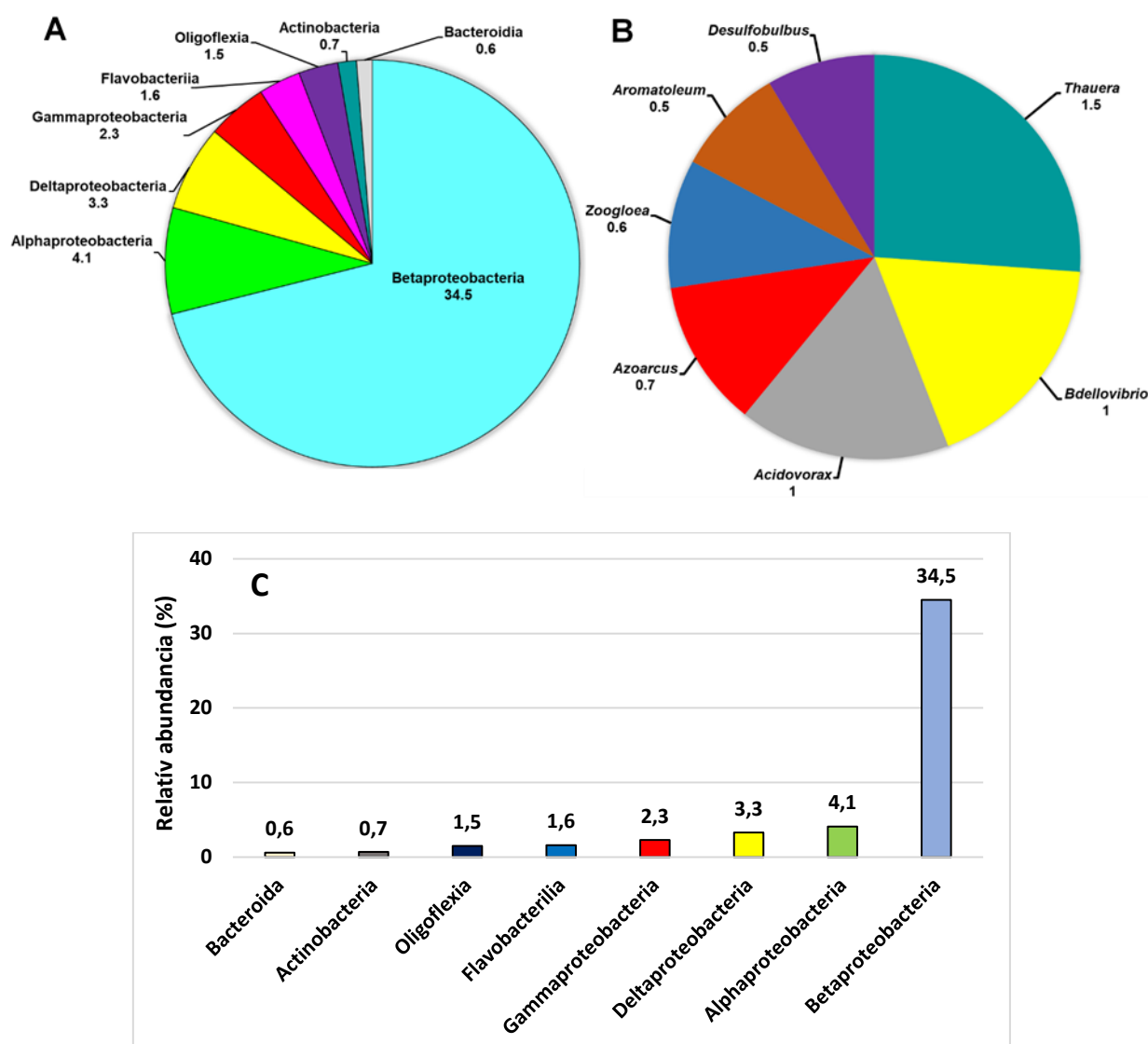
A dúsító tenyészetekben bekövetkezett változásokat az oldatok turbiditás-növekedésével lehet nyomon követni, amely a gyógyszerhatóanyag-bontó baktériumok elszaporodását vetíti elő. A dúsítók csíraszámbecslés eredményei az első és a második hónap végén a kiinduló közösség gyógyszerhatóanyaghoz való adaptációját jelezte (8. ábra). A DIC dúsító esetében volt megfigyelhető a legnagyobb összcsíraszám növekedés a második hónap végére. Az első hónaphoz képest ez 8x-os növekedést jelentett (2.9×10^7 CFU/ml vs. 3.6×10^6 CFU/ml). Azonban a legkiugróbb eredményt az IBU dúsítók 400x-os növekedése mutatta az első és a második hónaphoz viszonyítva (1.2×10^7 CFU/ml vs. 3×10^4 CFU/ml). Továbbá 11-szeres összcsíraszám növekedést volt tapasztalható a CBZ dúsítók esetében a második hónap végére (2.5×10^5 CFU/ml vs. 2.9×10^6 CFU/ml). A vizsgálat eredményeiből arra lehet következtetni, hogy a kiinduló biofilm baktériumközössége a diklofenákot, mint egyedüli szén- és energiaforrást könnyebben tudta hasznosítani, mint az ibuprofent és karbamazepint (8. ábra). A következtetés alapján elmondható, hogy a legellenállóbb vegyület a biológiai lebontással szemben a CBZ, mivel ezekben a dúsítókban tapasztalhatóak a legkisebb összcsíraszám értékek. Illetve erős gátló hatást fejt ki a mikróbák növekedésére a dúsító tenyészetekben.



8. ábra A csíraszám eredményei a dúsító tenyészetével diklofenák (DIC), ibuprofen (IBU) és a karbamazepin (CBZ) egyedüli szén- és energiaforrásokkal történő kiegészítése BHB ásványi tápoldatban

5.2. A biofilm baktériumközösségének populáció dinamikája a szelektív dúsítás ideje alatt

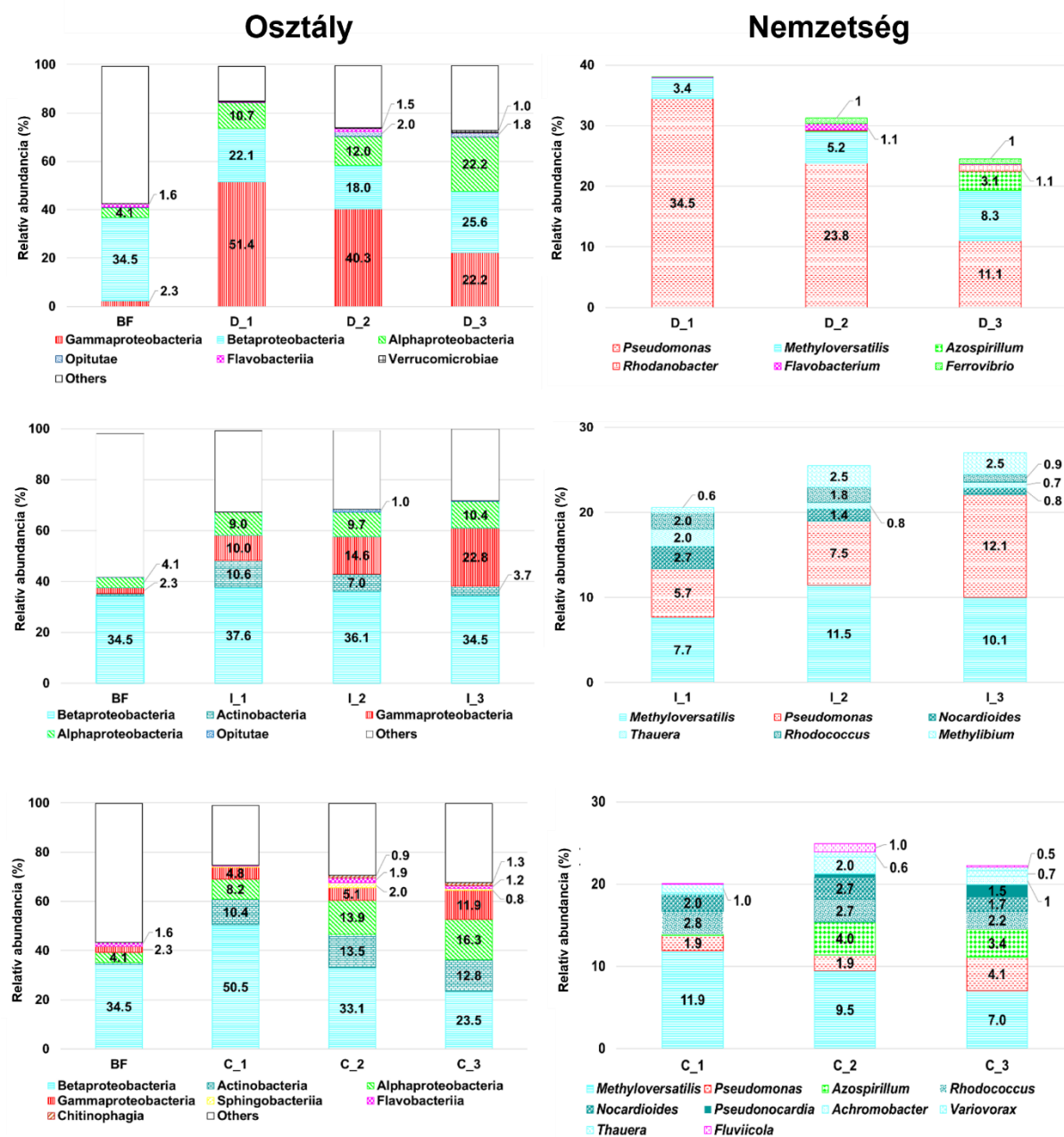
A kiindulási biofilm baktériumközösségét osztályszinten (9/A. ábra) túlnyomórészt a *Betaproteobacteria* dominálta, amelyet az *Alpha*-, *Delta*- és *Gammaproteobacteria*, valamint a *Flavobacteriia* követett. A nemzetségek szintjén (9/B. ábra) a *Thauera*, *Bdellovibrio*, *Acidovorax*, *Azoarcus*, *Zoogloea* nemzetségek képviselői voltak a legnagyobb számban jelen (százalékos relatív abundancia $\geq 0.5\%$) (9. ábra) (1. melléklet).



9. ábra A kezdeti biofilm baktériumközösség taxonómiai összetétele osztály (A; C) és nemzetség (B) szinten, a shotgun metagenom szekvenálással értékelve. A számok a relatív abundanciát jelölik, csak a $\geq 0.5\%$ -os relatív abundanciájú taxonok vannak feltüntetve

A diklofenák dúsítók mindegyikében az *Alpha*-, *Delta*- és *Gammaproteobacteria* domináltak. Míg a DIC dúsítókban a *Gammaproteobacteria*, addig az IBU és CBZ dúsítókban pedig a

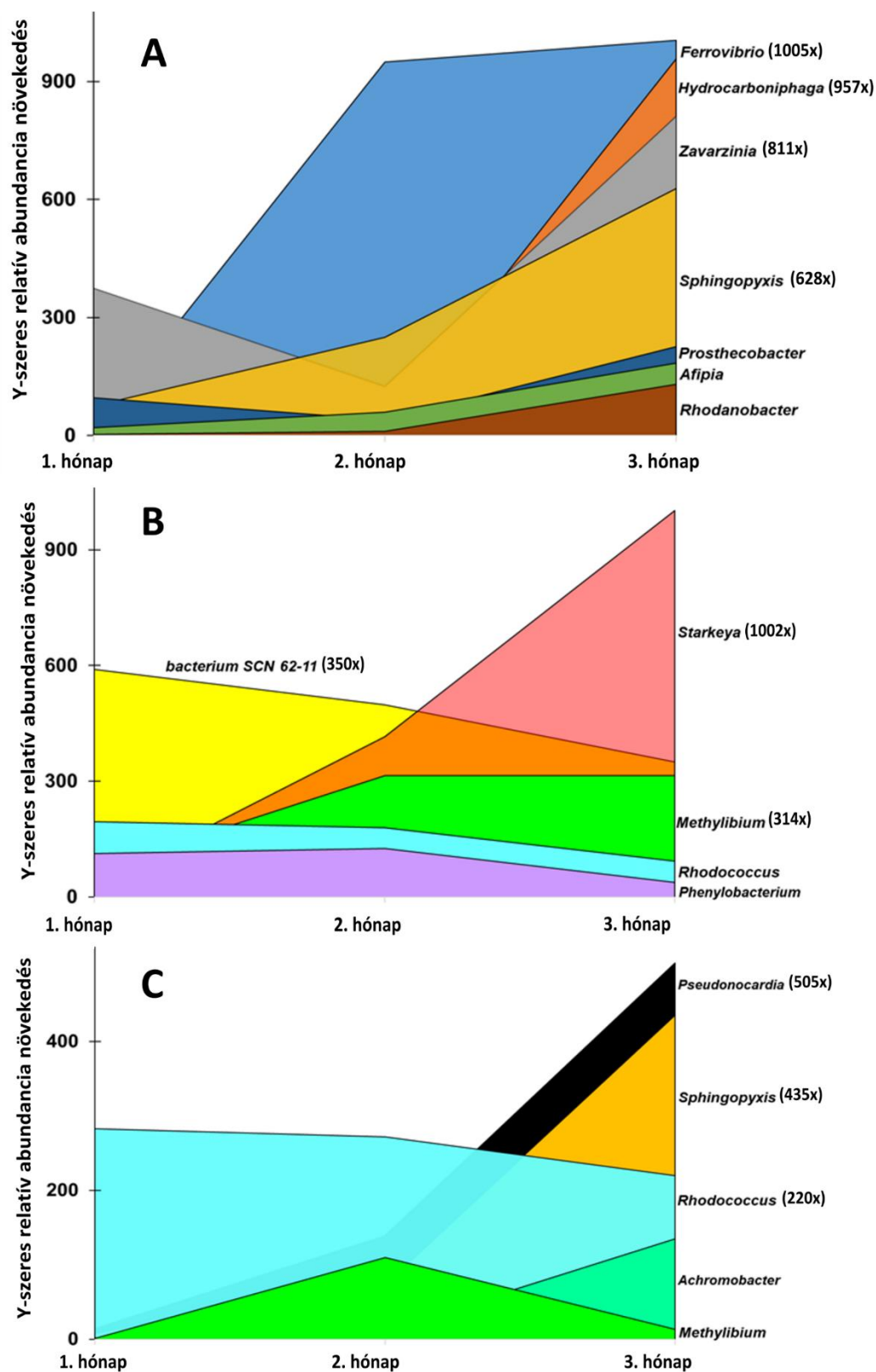
Betaproteobacteria osztály résztvevői voltak többségben jelen. Emellett az *Actinobacteria* csak az IBU és CBZ dúsításokban vált a közösség jelentős tagjává, 4 és 14% közötti relatív abundanciával (10. ábra).



10. ábra A diklofenák (D_n), ibuprofen (I_n) és karbamazepin (C_n) dúsításban talált baktériumok taxonómiai összetétele és időbeli dinamikája a három hónapos szelektív dúsítási időszak alatt (n), összehasonlítva a kezdeti biofilm baktériumközösséggel (BF). Csak azok a baktériumosztályok és nemzetségek szerepelnek, amelyek relatív gyakorisága ≥ 1% legalább az egyik mintában. A többi az 1%-nál kisebb relatív abundanciájú törzs összegét jelenti

Nemzetség szinten a DIC-dúsítók baktérium közösségét túlnyomó részben a *Pseudomonas* nemzetség tagjai dominálták, amelyet a *Methyloversatilis*, *Azospirillum*, *Ferrovibrio*, *Rhodanobacter* és *Flavobacterium* nemzetségek követték. Ezzel szemben a *Methyloversatilis* nemzetség tagjai voltak a legdominánsabbak az IBU és a CBZ dúsításokban, míg a *Pseudomonas* nemzetség a második, illetve a harmadik helyen állt a százalékos relatív gyakoriság alapján a két dúsítóban. Szintén az IBU és CBZ dúsító típusok esetén az *Actinobacteria* osztály képviselői, mint a *Nocardioidea*, *Rhodococcus* és *Pseudonocardia* a közösség kulcsfontosságú tagjaivá váltak. Az utolsó két hónapos CBZ dúsítás esetén az *Azospirillum* nemzetség is figyelemre méltó arányt ért el, közel 3.4-4%-os abundanciát (10. ábra).

Azonosításra kerültek azok a taxonok is, amelyek $\geq 0.5\%$ -os és legalább 100x-os százalékos relatív abundancia növekedést mutattak legalább az egyik dúsítási kultúrában a kiindulási biofilm baktériumközösségében mért kezdeti értékekhez képest. A DIC-dúsítások esetében a harmadik hónap végére a *Ferrovibrio*, a *Hydrocarboniphaga*, a *Zavarzinia* és a *Sphingopyxis* mutatta a legnagyobb százalékos relatív abundancia változást, ami 1005-, 957-, 811- és 628-szoros növekedést jelentett (11/A. ábra). Az IBU gyógyszerhatóanyagot tartalmazó dúsítóknál a legnagyobb százalékos relatív abundancia növekedést a *Starkeya* (1022-szeres), a *Methylibium* (314-szeres) és egy eddig még tenyésztésbe nem vont, metagenom alapján leírt SCN 62-11-jelű baktérium (350-szeres) (11/B. ábra) mutatta. Figyelemre méltó, hogy a *Pimelobacter* nemzetség legnagyobb százalékos relatív abundanciája az IBU dúsítóknál mindössze 0.18% volt, azonban mégis 1000-szeres növekedést mutatott az IBU dúsítások végére. A CBZ tartalmú dúsítóknál az egyik legszembetűnőbb százalékos relatív abundancia növekedés a *Pseudonocardia*, *Sphingopyxis* és a *Rhodococcus* nemzetségek esetében volt tapasztalható, amelyek 505-, 435-, illetve 220-szoros növekedést mutattak a 3. hónap végére (11/C. ábra) (2. melléklet).



11. ábra Az $\geq 0.5\%$ -os baktérium nemzetségek időbeli dinamikája, amelyek legalább 100-szoros növekedést mutatnak az azonos típusú (DIC, A; IBU, B; vagy CBZ, C) dúsítások legalább egyikében (1., 2. vagy 3. hónap) a kezdeti biofilm baktériumközösség százalékos relatív gyakoriságához képest

Az IBU dúsítókhoz hasonlóan a *Pimelobacter* mutatta a legnagyobb, közel 2700-szoros növekedést a 3. hónap végére, bár a nemzetség százalékos relatív abundanciája legfeljebb 0.32% volt az összes CBZ dúsítóban. Már két hónapos CBZ dúsítás után a nemzetség több, mint 4000-szeres növekedést mutatott a százalékos relatív abundanciában, ami a harmadik hónap végére megfeleződött.

Meglepő módon a legdominánsabb baktérium nemzetségek (10. ábra, nemzetség), mint például a *Pseudomonas*, a *Methyloversatilis* és az *Azospirillum* a dúsítások végére csak 11- és 60-szoros növekedést mutattak a százalékos relatív abundanciában.

5.3. Metagenomból összeállított bakteriális genomok rekonstrukciója

Három hónap elteltével, nagyobb szekvenálási mélységű dúsított kultúrák három további metagenomjából rekonstruáltam a legtöbb olyan baktérium genomját, amelyek a dúsítások során a legnagyobb százalékos relatív abundancia növekedést mutatták, mint például a *Ferrovibrio* sp., *Zavarzinia* sp., *Prosthecobacter* sp., *Rhodanobacter thiooxydans*, *Pseudonocardia* sp., *Sphingopyxis* sp., *Rhodococcus* sp. és *Achromobacter* sp. (2. melléklet; 4. táblázat). Ezen baktériumok genomszekvenciái alapján végzett anyagcsere elemzések azt mutatták, hogy olyan közösség alkotók találhatóak a dúsítókban, melyek a xenobiotikumok, például a benzoát/aminobenzoát, az egyszerű aromás szénhidrogének (pl. toluol, xilol, etil-benzol) és a PAH-ok (naftalin), halogénezett vegyületek (klórozott alkánok és alkének, klóroiklohexán stb.), szteroidok, sőt gyógyszerek (citokróom P450 enzimrendszer szabályoz) lebontásában is részt vehetnek (5. táblázat). A *Hydrocarboniphaga*, *Starkeya* és *Pimelobacter* nemzetségekhez tartozó baktérium genomokat nem tudtam rekonstruálni.

4. táblázat A dúsítások során a legnagyobb százalékos relatív abundancia növekedést mutató baktérium nemzetségek rekonstruált bakteriális genomjainak (MAG-ok) teljessége

	teljesség (%)	szennyeződés (%)	GC (%)	Méret (bp)	Dúsító típusa	NCBI hivatkozási szám
<i>Ferrovibrio</i> sp. bin D_3	94.4	1.6	63.8	4 912 046	DIC	JAOZVR0
<i>Zavarzinia</i> sp. bin D_3	82.3	0.4	67.0	3 502 898	DIC	JAOZVS0
<i>Prosthecobacter</i> sp. bin D_3	86.8	2.4	53.7	5 475 181	DIC	JAOZVT0
<i>Rhodanobacter</i> sp. bin D_3	89.5	9.8	67.2	4 096 456	DIC	JAOZVU0
<i>Pseudonocardia</i> sp. bin C_3	93.1	1.6	73.3	5 292 301	CBZ	JAOZVV0
<i>Sphingopyxis</i> sp. bin C_3	99.7	1.3	66.4	4 013 506	CBZ	JAOZVW0
<i>Rhodococcus</i> sp. bin C_3	75.3	0.8	62.3	5 816 165	CBZ	JAOZVY0
<i>Achromobacter</i> sp. bin C_3	96.0	3.4	67.8	6 447 600	CBZ	JAOZVX0

*A CheckM szoftverrel vizsgálva (Parks et al. 2015).

5. táblázat A vizsgált baktériumok genomszekvenciáinak alapján végzett xenobiotikumok lebontásában való részvételének az elemzése

Metagenom neve	Gén	Enzim	Részt vesz a xenobiotikumok biológiai lebontásában
<i>Ferrovibrio</i> sp. bin D_3	<i>mhpD</i>	2-keto-4-pentenoát hidratáz 2	Dioxin degradáció, Xilol degradáció
	<i>mhpE</i>	acetaldehid-dehidrogenáz	
	<i>fadN</i>	3-hidroxi-acil-CoA dehidrogenáz	Gyógyszeranyagcsere - citokróm P450 útvonal
	<i>inhA</i>	izonitril-hidratáz	
<i>Zavarzinia</i> sp. bin D_3	<i>ald</i>	3-szukcinoil-szemialdehid-piridin-dehidrogenáz	Gyógyszeranyagcsere - citokróm P450 útvonal
	<i>aofH</i>	flavin tartalmú monoamin-oxidáz	
	<i>kshA</i>	3-ketoszteroid-9-alfa-monooxygenáz	Szteroid degradáció
	<i>kshB</i>	3-ketoszteroid-9-alfa-monooxygenáz	
<i>Prostheco bacter</i> sp. bin D_3	<i>nemA</i>	N-etil-maleimid-reduktáz	Nitrotoluol degradáció
	<i>atzF</i>	allofanát hidroláz	Atrazin degradáció
<i>Rhodanobacter</i> sp. bin D_3	<i>pchA</i>	4-hidroxi-benzaldehid-dehidrogenáz	Toluol degradáció
	<i>namA</i>	NADPH dehidrogenáz	Aminobenzoát degradáció
	<i>acyP</i>	acilfoszfátáz	
<i>Pseudonocardia</i> sp. bin C_3	<i>adhB</i>	alkohol-dehidrogenáz B	Klór-alkán és klór-alkén degradáció
	<i>nlhH</i>	Karboxil-észteráz	Gyógyszeranyagcsere - citokróm P450 útvonal
	<i>lipV</i>	Lipáz	
<i>Sphingopyxis</i> sp. bin C_3	<i>hsaC</i>	vas-függő extradiol-dioxigenáz	Szteroid degradáció
	<i>ksdl</i>	szteroid delta-izomeráz	
<i>Rhodococcus</i> sp. bin C_3	<i>katG</i>	kataláz-peroxidáz	Gyógyszeranyagcsere - egyéb enzimatis útvo nalon
	<i>pyrE</i>	foszforiboziltranszferáz	
	<i>ndk</i>	nukleozid-difoszfát kináz	
<i>Achromobacter</i> sp. bin C_3	<i>cbnB</i>	klórmukonát cikloizomeráz	Fluor-benzoát degradáció
	<i>nemA</i>	N-etil-maleimid-reduktáz	Nitrotoluol degradáció
	<i>mhpP</i>	2-hidroxi-mukonát szemialdehid hidroláz	Xilol degradáció

* Nyers teljes adatsor megtalálhatóak Pápai et al. 2023 *Supplementary file3* cím alatt

5.4. A dúsított kultúrák baktériumdiverzitása a tenyésztésfüggő megközelítés alapján

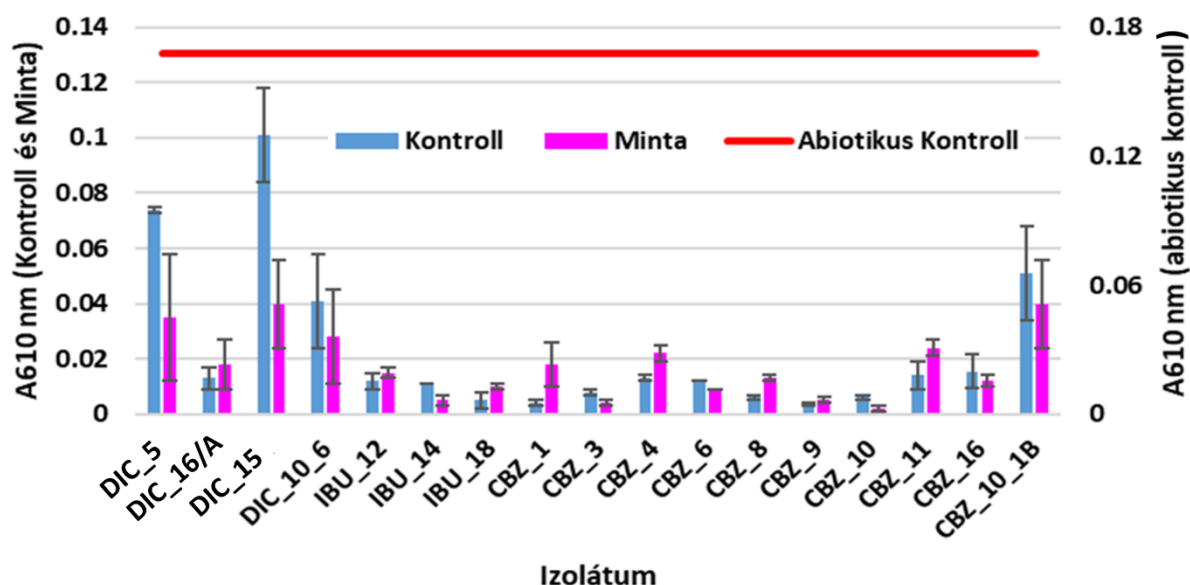
Összesen 31 baktérium izolátumot sikerült tenyésztésbe vonni, ebből 10 darabot a DIC, 9 darabot az IBU és 12 darabot a CBZ dúsítókból (3. melléklet). Osztályszinten az izolátumok a Gammaproteobaktériumok (14 izolátum), az Alphaproteobaktériumok (7), a Betaproteobaktériumok (7), az Actinobaktériumok (4) és a Bacillus (2) osztályba tartoztak. Az izolátumok többsége (13 izolátum) a *Pseudomonas* nemzetséghez tartozott (DIC 4; IBU 5 és CBZ 4 izolátum). A *Rhizobium* (DIC 3; IBU 2 izolátum), *Methyloversatilis* (1 izolátum minden dúsítóból), *Nocardioidea* (CBZ 2 izolátum), *Variovorax* (CBZ 2 izolátum) és *Bacillus* (IBU 1; CBZ 1 izolátum) nemzetség képviselői követték sorban a *Pseudomonas*-okat. A *Stenotrophomonas* (DIC dúsító), *Ancylobacter* (IBU), *Brevundimonas* (CBZ) és *Rhodococcus* (CBZ) nemzetségekből egy-egy izolátumot sikerült tenyésztésbe vonni. Az izolátumok közül 26 a Gram (-) és 5 a Gram (+) baktériumok csoportjába tartozik.

A baktériumizolációk két új baktériumfajt eredményeztek az IBU és a CBZ dúsításokból, amelyek az *Ancylobacter* és a *Nocardioidea* nemzetségbe tartoztak. Az izolátumok 16S rRNS génjei a *Nocardioidea* sp. CBZ_1 és CBZ_2, valamint az *Ancylobacter* sp. IBU_2 izolátumok 16S rRNS génjei 98% alatti szekvencia hasonlóságot mutattak a legközelebbi tenyésztett rokonok 16S rRNS génjeivel. Az új baktériumfajok elhatárolásához a 16S rRNS génszekvencia hasonlóságának határértéke 98.65% (Kim et al., 2014). A CBZ_1^T izolátumot a közelmúltban a *Nocardioidea* nemzetségen belül egy új leszármazási vonalként írtuk le, amelynek a *Nocardioidea carbamazepini* nevet adtuk (Benedek et al., 2022).

5.5. Az izolátumok gyógyszerhatóanyag biodegradációs képesség meghatározásának az előtesztelése

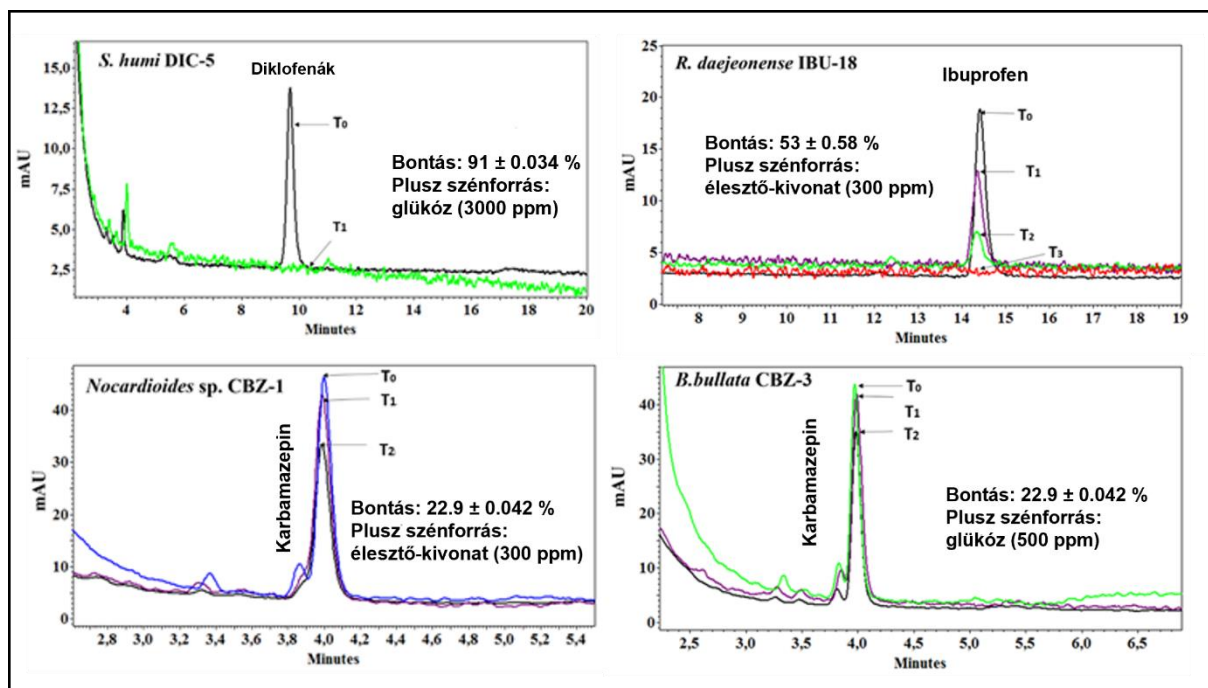
A rezazurinnal végzett előtesztelési vizsgálatok szerint a gyógyszervegyületek különböző hatást gyakoroltak a vizsgált szervezetekre. Egyes esetekben a hozzáadott szénforrás (DIC, IBU vagy CBZ) jelenléte gátolta a baktériumok növekedését, míg más esetekben a vegyületek jelenléte jelentősen növelte a baktériumok növekedését. Volt néhány példa, amikor a hozzáadott szénforrásnak látszólag nem volt jelentős hatása a vizsgált szervezetek aktivitására. Ezek az izolátumok inkább tolerálták a gyógyszervegyület jelenlétét, minthogy szénforrásként hasznosították volna azokat. A 31 izolált törzsből 16 izolátum toleránsnak bizonyult a gyógyszerek jelenlétével szembe, 8 izolátum növekedését gátolták a vegyületek, 7 izolátumot pedig potenciális lebontóként lett megjelölve (4. melléklet).

A DIC dúsítókból származó izolátumok közül a *S. humi* DIC_5 és a *R. daejeonense* DIC_15 törzset választottam ki további vizsgálatokhoz, mint potenciális diklofenák-bontó baktérium törzsek. A 2. és 3. hónapos IBU dúsítókból izolált *R. daejeonense* IBU_14 és IBU_18 törzsek potenciális IBU bontóként lettek megjelölve. A CBZ dúsítóból származó izolátumok közül 3 törzset jelöltem meg potenciális gyógyszerhatóanyag-bontóként, *N. carbamazepini* CBZ_1, *B. bullata* CBZ_3 és *V. paradoxus* CBZ_10 (12. ábra; 4. melléklet).



12. ábra Az előtesztelések során a lehetséges gyógyszerhatóanyagbontónak minősülő izolátumok. Abiotikus Kontroll – baktériummal nem beoltott tesztoldat; Kontroll – gyógyszerhatóanyagot nem tartalmazó tesztoldat; Minta – gyógyszerhatóanyagot tartalmazó tesztoldat baktériummal beoltva.

A HPLC mérések is alátámasztották az alábbi eredményeket, a *S. humi* DIC_5 és az *R. daejeonense* IBU_18 izolátumok gyógyszerhatóanyag-bontó képességét. Négy hét inkubáció után a DIC_5 törzs glükóz (3 g/l) jelenlétében szinte teljes eliminációra volt képes a DIC esetén ($91 \pm 0.034\%$ koncentráció csökkenés); egyéb szén- és energiaforrás (élesztő, nátrium-acetát) hozzáadásával nem sikerült magasabb biodegradációs arányt elérni. Szintén négyheti inkubáció után az IBU_18 izolátum mutatta a legmagasabb, $90.7 \pm 0.098\%$ -os IBU eliminációs arányt élesztőkivonat jelenlétében (0.3 g/l). Karbamazepin bontásban a CBZ_1-es izolátum mutatott 20% feletti értékeket élesztőkivonat (0.3 g/l) jelenlétében, illetve a CBZ_3-as izolátum szintén ezzel a plusz szénforrással kiegészítve elérte a $22.9 \pm 0.042\%$ -os bontási hatékonyságot. A 31 tagú törzsgyűjteményben megtalálható egyéb potenciális gyógyszerhatóanyag-bontó baktériumtörzsek csak 10% körüli bontási eredményekre voltak képesek.

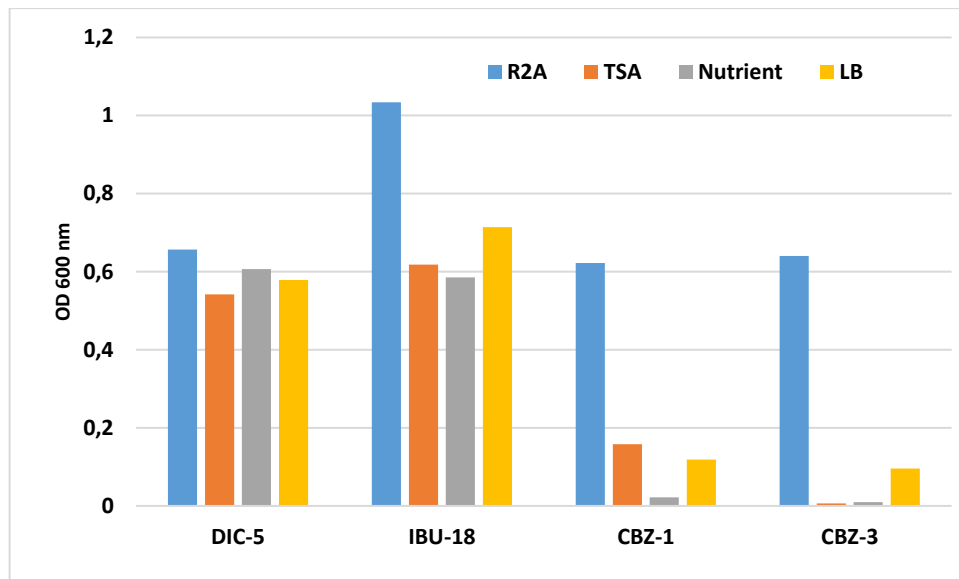


13. ábra A jelentős bontási képességet mutató törzsek gyógyszerhatóanyagbontó képességének mérése során kapott HPLC kromatogramok; „T” az idő hét megjelölésben

5.6 A vizsgált gyógyszerhatóanyagok hatékony biotransformációjára képes izolátumok tenyésztési körülményeinek optimalizálása

Az előzőekben kiválasztásra került gyógyszerhatóanyag-bontó izolátumok (DIC_5, IBU_18, CBZ_1 és CBZ_3) optimális tenyésztési körülményeinek a meghatározására a törzseket négy tápoldatban (R2A, TSA, nutrient, és LB; 2. ábra; 5. melléklet), hat eltérő NaCl koncentrációban (1-6%), öt különböző hőmérsékleti értéken (4, 15, 24, 27, 37 °C) és nyolc eltérő pH tartományban (4-11) vizsgáltam. Minden egyes beállítást 72 órán keresztül inkubáltam, majd a kísérlet végén meghatároztam az oldatok 600 nm-en mért optikai densitását.

A felhasznált tápoldatok közül a vizsgált törzsek minden esetben az R2A tápoldatban fejlődtek a legjobban, különösen igaz volt ez a CBZ_1 és CBZ_3 törzsekre, míg a másik két tápoldatban alig volt tapasztalható növekedés. Mind a négy vizsgált tápoldat alkalmasnak bizonyult a DIC_5 és az IBU_18 izolátumok tenyésztésére (14. ábra). Így a további optimalizálási kísérletek R2A tápoldatban végeztem.



14. ábra A kiválasztott törzsek tenyésztésére legalkalmasabb tápoldat kiválasztása 27 °C-on, semleges pH és 0 % NaCl koncentráció mellett

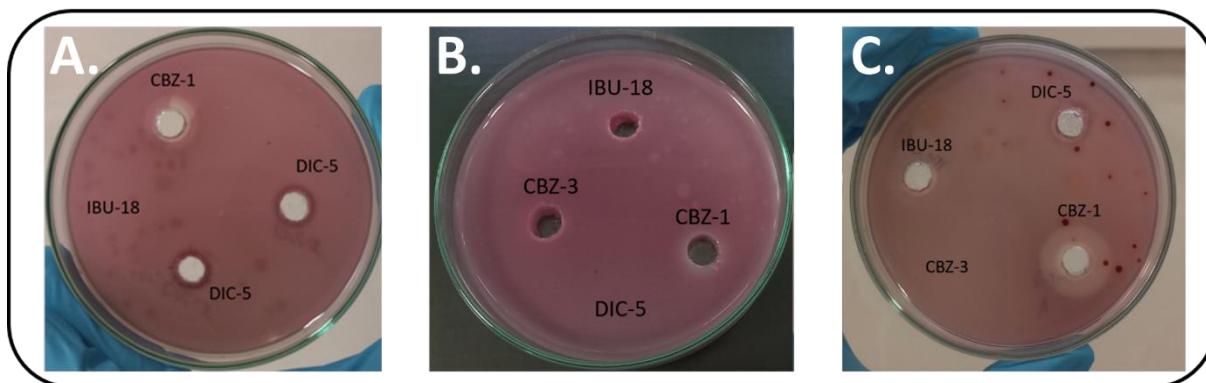
Az összes alkalmazott NaCl koncentráció tartomány közül csak a *S. humi* DIC_5 törzs volt képes 4%-nál magasabb koncentrációban (5%) növekedni. A DIC_5 törzs számára az optimális sókoncentráció 3% volt, amelynél a törzs elérte a legnagyobb OD értékét. A többi tesztelt izolátum 1-2% NaCl mellett érte el a maximális OD-értéket. A *R. daejeonense* IBU_18 törzs tenyésztésekor szintén 2%-os sókoncentráció esetén volt tapasztalható a legnagyobb növekedés. Az 1%-os koncentrációjú oldat volt a legmegfelelőbb körülmény a *Nocardioide* sp. CBZ_1, míg a *B. bullata* CBZ_3 esetében pedig a 2%-os NaCl koncentráció volt a legalkalmasabb (6. melléklet). A sókoncentrációs vizsgálatokat R2A tápoldatban, semleges pH és 27 °C mellett végeztem.

Mind a négy vizsgált törzs jó növekedést mutatott pH 7 és 9 között. A legszélesebb pH tűréssel rendelkező izolátumok a *S. humi* DIC_5 és a *R. daejeonense* IBU_18 voltak, amelyek 6-10 pH-n intenzíven növekedtek. A *B. bullata* CBZ_3 törzsnek volt a legszűkebb pH tűrés tartománya (7. melléklet). A törzsek későbbi tenyésztéséhez semleges vagy enyhén lúgos táptalajok használhatóak. A kiválasztott törzsek tenyésztésének optimális hőmérséklete 27 °C volt (8. melléklet).

5.7. Együtttenyésztési, azaz agardiffúziós lyukteszt és keresztcsíkozásos módszerek eredményei

Az agardiffúziós együtttenyésztési kísérlet során az volt tapasztalható, hogy a *Nocardioide* sp. CBZ_1 izolátum felülúszója enyhe növekedésgátló hatást fejtett ki a többi

vizsgált törzs növekedésére (15. ábra). A legerősebb növekedésgátlást, azaz a maximális gátlási zóna kialakulását a *B. bullata* CBZ_3 izolátumban figyeltem meg. A DIC_5 és a IBU_18 izolátum esetében csak enyhe gátlást fejtett ki. Azonban az agardiffúziós lyukteszt módszere nem alkalmas a DIC_5, IBU_18 és a CBZ_3-as törzs felülúszóinak a CBZ_1 törzsre gyakorolt hatásának vizsgálatára. Mivel a CBZ_1-es izolátum nem képes növekedni a tápagarba oltva ezért nem színezte el a tápagart, így nem lehet meghatározni az esetleges gátlási zónák kiterjedését sem.



15. ábra Együtt tenyésztési vizsgálatok agardiffúziós lyukteszt alkalmazásával, amelyen az agarba oltva a (A) *R. daejeonense* IBU_18, a (B) *S. humi* DIC_5 és a (C) *B. bullata* CBZ_3 baktériumtörzs volt

A keresztesíkozási módszer során a vizsgált izolátumok között gátló hatást nem lehetett megfigyelni egyik minta esetében sem. A 16. ábrán látható, hogy egyik törzs sem volt negatív hatással a többi törzs növekedésére a saját szaporodása révén, illetve tesztesíkok között nem láthatóak feltisztulási zónák. Így a módszer igazolta, hogy a négy kiválasztott izolátum konzorciumként alkalmazható a további kísérletek során.



16. ábra Keresztesíkozási módszer eredményei; az izolátumok között nem tapasztalható gátlási zóna, nem alakult ki feltisztulási régió

5.8. A kialakított bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyag-bontó képességének és a konzorcium T-RFLP tesztelése ásványi tápoldatban (BHB)

A kutatás korábbi szakaszában kiválasztott baktériumtörzsek sikeres együtt tenyésztetősége kapcsán megvizsgáltam a kialakított bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyag-bontó képességét ásványi tápoldatban (BHB). Egy T-RFLP módszert is kifejlesztettem a konzorcium tagjainak nyomon követése érdekében, a cél egy tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerrel a konzorcium tagjainak relatív abundancia változásainak a kimutatása a kísérletek során. Az *in silico* és *in vitro* T-RFLP vizsgálatok során a kiválasztott baktériumtörzseket *AluI* restrikciós enzimmel végeztem az amplikon emésztést. Az eredmények alapján a T-RFLP elektroferogramokon a következő T-RF-ek azonosíthatóak be az egyes izolátumok esetén (9. melléklet).

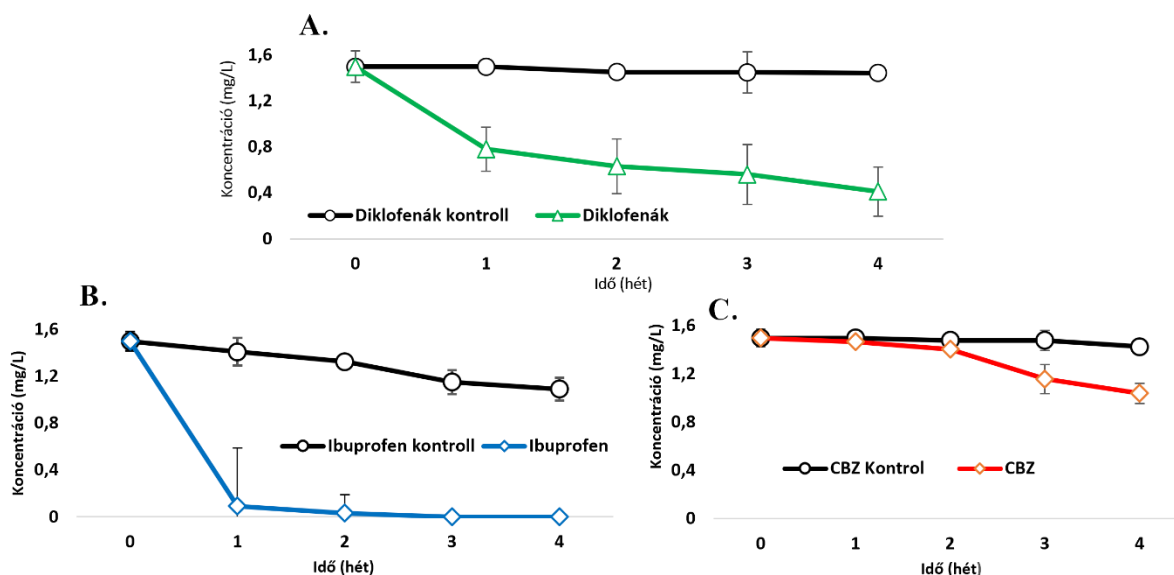
Stenotrophomonas humi DIC_5 – 71 bp

Rhizobium daejeonense IBU_18 – 202 bp

Nocardioideus carbamazepini CBZ_1 – 232 bp

Brevundimonas bullata CBZ_3 – 125 bp

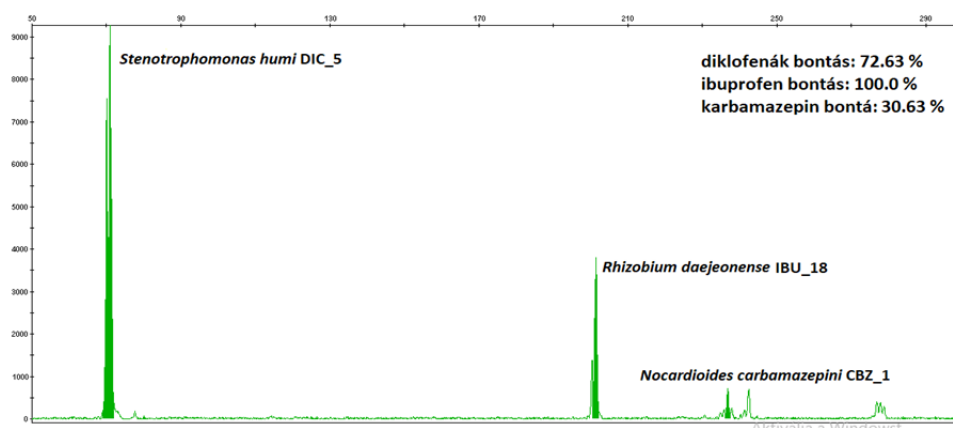
A vizsgálat ezen szakaszának eredményei azt mutatták, hogy az ásványi tápoldatban lévő bakteriális konzorcium jó hatékonysággal képes bontani a kérdéses gyógyszerhatóanyagokat (17.ábra).



17. ábra A konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képessége ásványi tápoldatban (BHB)

Már egy hét elteltével az ásványi tápoldatban a konzorcium az ibuprofent 93%-ban, a diklofenákot pedig 39%-ban bontotta. A lebontási arány minden héten növekedett és a negyedik hét végére a konzorciumban található baktériumok lebontották a diklofenák 72,6%-át (17/A.

ábra), az ibuprofen 100%-át (17/B. ábra), illetve a karbamazepin 30,6%-át (17/C ábra). Az ibuprofen esetében már a harmadik hétre teljes koncentráció vesztés történt, addig a karbamazepinnél a harmadik és negyedik hét során volt tapasztalható jelentősebb koncentráció csökkenés. Az abiotikus kontrollok esetén számottevő gyógyszerhatóanyag koncentráció csökkenés nem volt tapasztalható. A kísérlet végén a CBZ_3 izolátum kivételével a konzorcium minden tagja (DIC_5, IBU_18 és CBZ_1) kimutatható volt a tesztoldatban, de a karbamazepin-lebontó izolátum (CBZ_1) relatív mennyisége volt a legalacsonyabb, amely összhangban van a HPLC mérések eredményeivel (18. ábra).



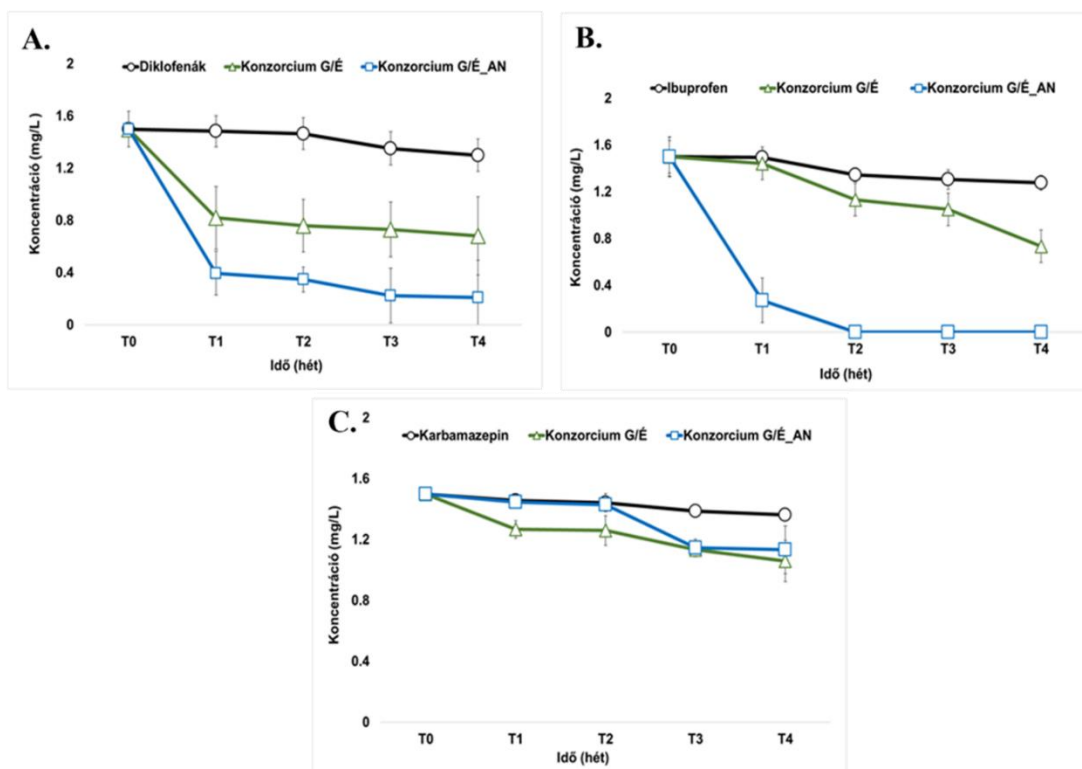
18. ábra A bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyag-bontó képessége ásványi tápoldatban négy hét elteltével, illetve a konzorciumot alkotó baktériumtörzsek T-RF csúcsai (T-RFLP elektroferogram)

5.9. A kialakított bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyag-bontó képességének és a konzorcium T-RFLP tesztelése természetes vízmintában

Természetes vízmintában történő különböző beállítások során a kialakított konzorcium az autochton baktériumközösség jelenlétében is jó hatékonysággal bontotta a diklofenákot és az ibuprofent bizonyos beállítások esetén, illetve a karbamazepin enyhe koncentráció csökkenését sikerült detektálni. Glükóz, élesztőkivonat és ammónium-nitrát hozzáadása a tesztoldatokhoz eredményezte a legjobb bontási hatékonyságot. Az egyes gyógyszerhatóanyagok eredményeinek elemzése során a negyedik hét végére a diklofenák 51,1%-os koncentráció csökkenést mutatott glükóz/élesztőkivonat jelenlétében, míg glükóz/élesztőkivonat/ammónium-nitrát jelenlétében közel 86%-os bontási eredményt produkált (19/A. ábra).

A másik vegyület, az ibuprofen esetében a glükóz/élesztőkivonat tartalmú tesztoldatban a diklofenákhoz hasonlóan 50,9%-os koncentráció csökkenés volt megfigyelhető. Azonban az előző tesztoldat ammónium-nitráttal történő kiegészítése során az ibuprofen két hét elteltével

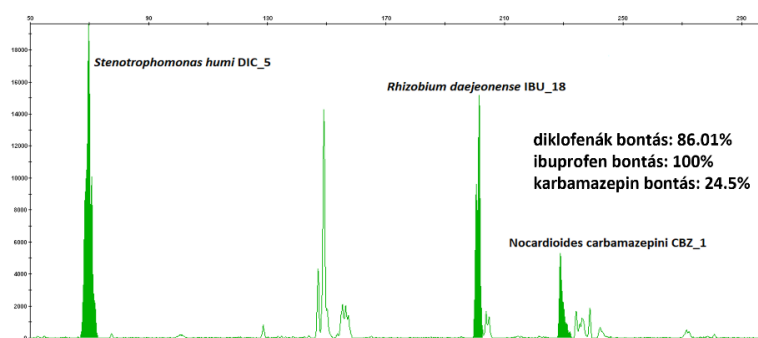
teljesen eliminálódott a közegből (19/B. ábra). A karbamazepin molekulaszervezete nagyon ellenálló a biodegradációval szemben, ez a kísérletek során is jól kivehető volt. A karbamazepin esetében alacsony mértékű bomlás figyelhető meg a különböző beállítások esetén. A konzorcium, függetlenül a tesztoldatoktól, 25%-os bontási eredményeket mutatott természetes vízmintákban, 1,5 mg/l kezdeti koncentráció mellett (19/C. ábra).



19. ábra A konzorcium gyógyszerhatóanyagbontó képessége természetes vízmintákban az autochton baktériumközösség jelenlétében. (Diklofenák, Ibuprofen és Karbamazepin – abiotikus kontrollok; G/É–glükóz és élesztőkivonat; G/É_AN – glükóz, élesztőkivonat és ammónium-nitrát). Az abiotikus és a biotikus I-III. mintákban nem történt gyógyszerhatóanyag koncentráció változás egyik esetben sem.

A konzorcium tagjai, a *S. humi* DIC_5, a *R. daejeonense* IBU_18 és a *N. carbamazepini* CBZ_1 a kísérlet végén a természetes vízmintákat tartalmazó tesztoldatokban T-RFLP analízissel kimutathatóak voltak. Az eredmények azt mutatták, hogy a konzorcium tagjai képesek voltak a gyógyszerek lebontására autochton baktériumközösségek jelenlétében is (20. ábra). Kijelenthető, hogy a konzorcium hozzáadása e két beállítás esetében minden esetben növelte a diklofenák és az ibuprofen lebontásának mértékét. A kísérletek során megfigyelhető, hogy a konzorcium jelenlétében a gyógyszerhatóanyagok lebomlása gyorsabb ütemben zajlott, illetve kijelenthető, hogy a konzorcium tagjainak bontási hatékonyságát nem befolyásolta az autochton baktériumközösség jelenléte. Az autochton baktérium közösség a konzorcium

jelenléte nélkül nem volt képes a plusz szén- és energiaforrások segítségével a gyógyszerhatóanyagok bontására.



20. ábra Természetes vízminta tesztoldat gyógyszerhatóanyagokkal, glükózzal, élesztőkivonattal és ammónium-nitráttal kiegészítve és bakteriális konzorciummal beoltva. A baktériumközösségének reprezentatív T-RFLP elektroferogramja a kísérlet végén (4 hét inkubáció elteltével)

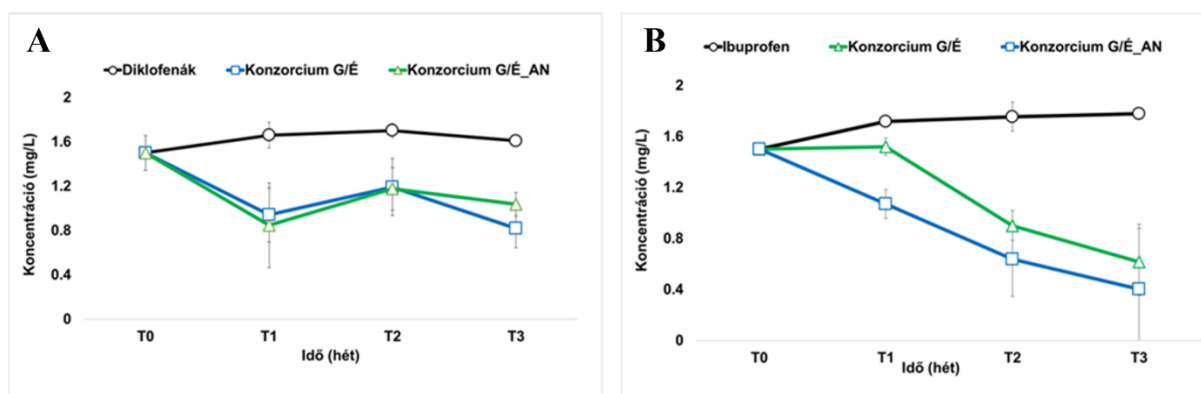
5.10. A kialakított bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyag-bontó képességének és a konzorcium T-RFLP tesztelése szennyvíz effluensben

A szennyvíz általános vízminőségi paramétereit a 10. melléklet foglalja össze. A mellékletben jól látható, hogy a szennyvíz kifolyó számos egyéb szerves anyagot tartalmaz ($\text{KOI } 6 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$), amelyek a nehezebben bomló gyógyszerhatóanyagok biológiai degradációját megakadályozhatják, hiszen könnyebben hasznosítható szén- és energiaforrást biztosítanak a bakteriális konzorcium számára. A szennyvíz kifolyó vizsgálata során számos beállítást használtam (6. táblázat), melyek közül csak azokat említem meg, ahol gyógyszerhatóanyag csökkenés volt megfigyelhető. A többi mintában nem történt gyógyszerhatóanyag koncentráció változás.

6. táblázat Kísérleti beállítások szennyvíz kifolyó vízminta vizsgálata során. Félkövérral szedve, ahol koncentráció csökkenés volt tapasztalható

Beállítás elnevezése	Vízminta	Vízminta kezelése	Baktérium konzorcium	Glükóz/Élesztő	Ammónium-nitrát (NH_4NO_3)
Abiotikus kontroll	szennyvíz kifolyó	szűrve	-	+	+
Biotikus Kontroll I.	szennyvíz kifolyó	szűretlen	-	-	-
Minta I.	szennyvíz kifolyó	szűretlen	+	-	-
Biotikus kontroll II.	szennyvíz kifolyó	szűretlen	-	-	+
Minta II.	szennyvíz kifolyó	szűretlen	+	-	+
Biotikus kontroll	szennyvíz kifolyó	szűretlen	-	+	-
Minta III.	szennyvíz kifolyó	szűretlen	+	+	-
Biotikus kontroll	szennyvíz kifolyó	szűretlen	-	+	+
Minta IV:	szennyvíz kifolyó	szűretlen	+	+	+

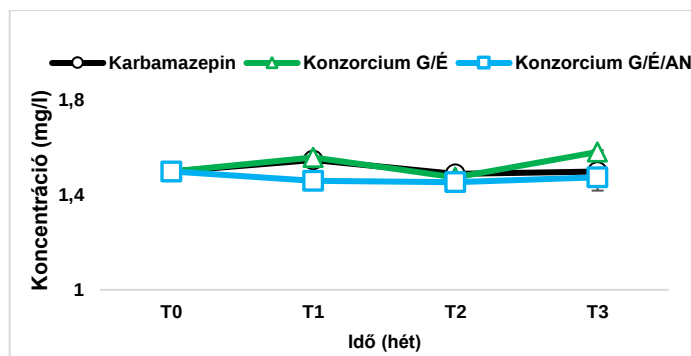
Az élesztőkivonatot és glükózt tartalmazó mintákban a legnagyobb mértékben ibuprofen bontás következett be, ugyanakkor kis mértékű diklofenák bontás is megfigyelhető volt a konzorcium jelenlétében. A négy hetes inkubációs idő végével a szennyvíz kifolyó konzorciummal való beoltása során 76,29%-os ibuprofen bontást detektáltam (21/B). Ugyanebben a mintában a diklofenák kezdeti intenzív koncentráció csökkenését stagnálás váltotta fel a vizsgálat második felében. Így alacsonyabb, mindössze 38,24%-os bontási értéket mutatott a 4. hét végére (21/A). A jelenség háttérében valószínűsíthetően az egyéb szennyvízben fellelhető szénforrások lehettek, amelyek könnyebb elérhetősége zavarhatja a diklofenák bontását.



21. ábra A konzorcium ibuprofen és diklofenák bontási hatékonysága a szennyvíz effluens esetén – abiotikus kontroll; glükóz/élesztőkivonat minta; glükóz/élesztőkivonat/ammónium-nitrát tartalmú minta. Az abiotikus és a biotikus I-IV. mintákban nem történt gyógyszerhatóanyag koncentráció változás egyik esetben sem.

Az élesztőkivonatot, glükózt és ammónium-nitrátot tartalmazó szennyvíz effluens mintákesetében, a konzorcium jelenlétében az ibuprofen és a diklofenák koncentráció csökkenése is megfigyelhető volt. Ebben a beállításban az ibuprofen a vizsgálat végére 79,33%-os csökkenést mutatott. Míg ugyanezen körülmények között a diklofenák csekélyebb, 30,85%-os bontási értéket mutatott (21 A/B).

Az eredményeket összefoglalva, a konzorcium jelenléte a szennyvíz effluensben a diklofenák és az ibuprofen bontását idézte elő leghatékonyabban, még hozzá az élesztőkivonatot, glükózt és NH_4NO_3 -ot is tartalmazó beállításban, ahol közel 80%-os ibuprofen és 30%-os diklofenák bontás volt tapasztalható. A harmadik gyógyszerhatóanyag, a karbamazepin esetében érdemi koncentrációváltozást nem lehetett detektálni egyik beállítás esetén sem (22. ábra).

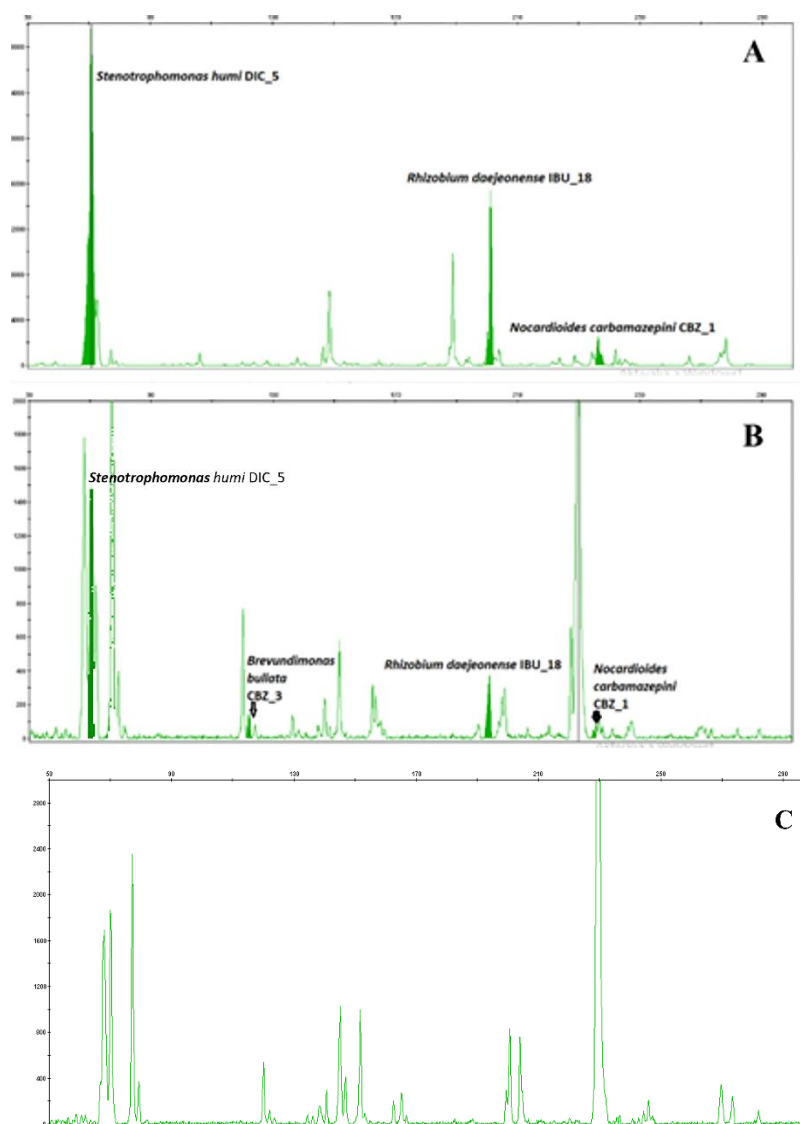


22. ábra A konzorcium karbamazepin bontási hatékonysága a szennyvíz effluens esetén – abiotikus kontroll; glükóz/élesztőkivonat minta; glükóz/élesztőkivonat/ ammónium-nitrát tartalmú minta.

A természetes vízmintához hasonlóan a szennyvíz effluens kísérlet utolsó hetében vett mintákon is elvégeztem a T-RFLP vizsgálatokat minden beállítás esetén. A glükózt és élesztőkivonatot egyszerre tartalmazó mintákban a CBZ-3 izolátum kivételével a konzorcium többi tagja is kimutatható volt (23/A. ábra).

A glükózt és élesztőkivonatot, valamint ammónium-nitrátot is tartalmazó minták T-RFLP profiljában a konzorciumhoz tartozó összes baktériumtörzs kimutatható volt. Ez azt jelzi, hogy a kiegészítő tápanyagok nemcsak a konzorcium növekedéshez, hanem a szennyvízben lévő helyi közösség növekedéséhez is hozzájárultak. Ammónium-nitrátot tartalmazó szennyvízben csak az IBU-18 és a DIC-5 törzseket mutattam ki magas relatív abundanciában. A CBZ-1 törzs nagyon alacsony koncentrációban volt jelen a mintákban, a CBZ-3 törzs pedig nem volt kimutatható ebben a közegben (23/B. ábra).

Fontos megemlíteni, hogy a kísérleti beállítások közül sem az abiotikus kontroll, sem pedig a különböző biotikus kontrollok esetében nem lehetett gyógyszerhatóanyag koncentráció csökkenést tapasztalni (21-22. ábra). Ezek alapján elmondható, hogy a szennyvíz effluens autochton baktériumközössége nem képes gyógyszerhatóanyag bontásra semelyik beállításban sem. Ez alapján kijelenthető, hogy bármilyen bontási eredmény csakis a beoltott bakteriális konzorcium hatására zajlott le. A T-RFLP is jól bizonyítja (23. ábra), hogy bontási eredményt elért mintákból készített elektroferogrammokon a bakteriális konzorcium tagjai is megjelennek és jól detektálhatóak a szennyvíz effluens autochton baktériumközössége mellett.



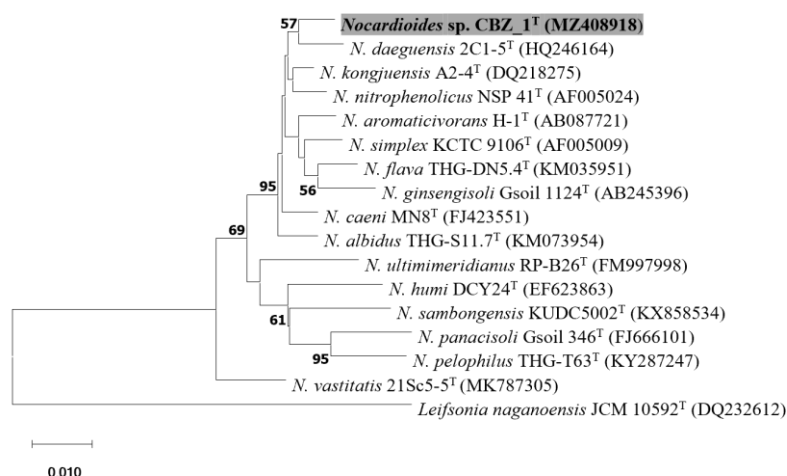
23 ábra (A) A glükózzal és élesztőkivonattal kiegészített konzorciumot tartalmazó, szennyvíz effluens T-RFLP elektroferogramja; (B) Szennyvíz effluens konzorciummal beoltva plusz glükózzal, élesztőkivonattal és ammónium-nitráttal kiegészített T-RFLP elektroferogramja; (C) a Szennyvíz effluens autochton baktériumközössége konzorcium nélküli T-RFLP elektroferogramja

5.11. Az új baktériumfaj -*Nocardioidees carbamazepini* sp. nov.- leírásának bemutatása

5.11.1. A *Nocardioidees* sp. CBZ_1^T törzs izolálása és filogenetikai jellemzése

A vizsgálat alapját képező, *Nocardioidees* sp. CBZ_1^T törzs az 1. havi karbamazepin dúsítóból lett izolálva. A CBZ_1^T törzs 16S rRNS génjének 1043 bp hosszúságú összefüggő szakaszát szekvenáltam és meghatároztam az izolátum rendszertani hovatartozását. A legközelebbi 16S rRNS génszekvenciák a *N. kongjuensis* DSM19082^T (98,4%), *N. daeguensis*

JCM17460^T (98,4%) és a *N. nitrophenolicus* DSM15529^T (98,2%) törzsekhez tartoztak (24. ábra).



24 ábra A 16S rRNS génszekvenciákon alapuló filogenetikai fa (maximum likelihood fa), amely a CBZ_1^T törzs és a *Nocardioideae* nemzetségen belüli legközelebbi rokonok közötti kapcsolatot mutatja (számok a bootstrap értékek mutatják)

7. ábrázat A *Nocardioideae* sp. CBZ_1^T törzs genomjának általános jellemzői

Jellemzők	Értéke
checkM* Teljessége (%)	98,5 (4 marker gén hiányzik)
checkM szennyezettsége (%)	0.8 (2 marker gén duplikálódott)
Méret (bp)	6,303,422
G+C aránya (mol%)	71.4
Össz gén szám	6407
Fehérjéket kódoló szekvencia szá,	6328
Pszudogének száma	2
Átlagos gén hossz (bp)	956
rRNS (16S, 23S, 5S)	5
tRNS gének	45
GenBank hozzáférési száma (NCBI)	JAHTLF000000000

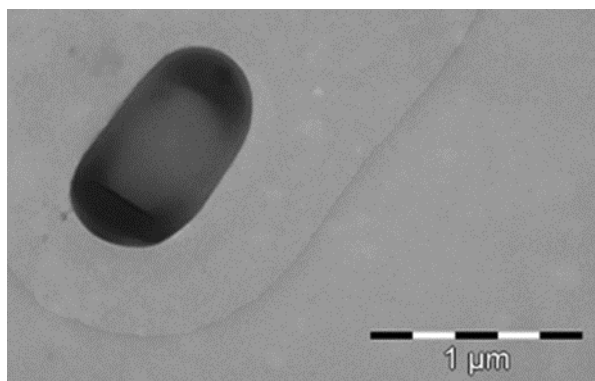
*A MicroScope platformba ágyazott CheckM egy automatizált módszer a mikrobiális genom minőségének értékelésére a teljesség és a szennyeződés szempontjából.

A CBZ_1T törzs szekvenált genomjának általános jellemzőit a 7. táblázat mutatja be. A genomszekvencia 25 kontigból épül fel. A kinyert genom mérete 6 303 422 bp volt, 71,43%-os G+C tartalommal, amely a *Nocardioide*s nemzetség G+C arányának tartományába esik (Evtushenko & Ariskina, 2015). A rendelkezésre álló genomok alapján a CBZ_1T törzs és a legközelebbi rokon törzsek közötti ANI és in silico DNS-DNS hibridizáció értékek 83,3-85,8 %, illetve 29,3-33,6% között értékek között mozogtak (12. melléklet). A kapott ANI és dDDH értékek alacsonyabbak voltak, mint az új baktérimfajok elkülönítéséhez szükséges 95-96%-os ANI és 70%-os dDDH küszöbértékek, így az eredmények azt mutatták, hogy a CBZ_1T törzs a *Nocardioide*s nemzetség egy új különálló fajt képviseli (Kim et al., 2014; Rosselló-Móra & Amann, 2015).

A legközelebbi rokonokhoz (23 *Nocardioide*s spp.) képest a pángenomikai vizsgálatok alapján az új *Nocardioide*s faj 1219 egyedi genomi szigetet (UGI) tartalmaz.

5.11.2. A *Nocardioide*s sp. CBZ_1^T morfológiai jellemzői

A CBZ_1^T izolátum Gram-pozitív, hosszúkas ovális alakú sejtjei 0.8-1.2 µm hosszúak és 0.4-0.6 µm szélesek. A negatívan festett preparátumok transzmissziós elektronmikroszkópi vizsgálata nem mutatott ki flagellumot (1. kép). R2A agaron tenyésztve az izolátum fehéres, áttetsző, lapos szabálytalan szélű telepeket képez. Optimális növekedést 28 °C hőmérsékleten, 8-as pH-n és 1% NaCl jelenlétében mutat.



1. kép A CBZ_1^T törzs sejtmorfológiájának transzmissziós elektronmikroszkópi képe negatív festést követően

5.11.3. A CBZ_1^T törzs kemotaxonómiai jellemzői

A CBZ_1^T törzs légzési kinonját 8 izoprén egységet tartalmazó tetrahydrogénezett menakinonként azonosították (MK8 H4, 98,8%). A fő poláris lipidek a foszfatidilglicerin (PG) és a difoszfatidilglicerin (DPG) voltak. Mind a fő légzőképes kinonokat, mind a poláris lipideket a *Nocardioide*s spp. jellemzőiként tartják számon (Roh et al., 2020).

A peptidoglikán teljes hidrolízise (100 °C, 4N HCl, 16 órán) muraminsavat (Mur) és a diaminopimelinsav (Dpm), alanin (Ala), glicin (Gly) és glutaminsav aminosavakat tartalmazta. Az aminosavak számszerűsítése GC/MS vagy N-heptafluotobutilén aminosav izobutilészterekkel a következő moláris arányt eredményezte (2,6 Ala; 1,4 Gly; 1,0 Glu; 0,8 Dpm). Az összes hidrolizátum enantiomerjeinek elemzése LL-Dpm jelenlétét mutatott ki. A fentiek alapján a következő peptidoglikán típus előfordulására következtettünk: A3y LL DpM-Gly.

A vizsgált törzsek sejtszintű zsírsavprofiljait a 13. melléklet foglalja össze. A CBZ_1^T törzs esetében a fő komponensek a következők voltak: 10Me C_{18:0} (20,7%), C_{18:1} ω9c (15,9%), C_{16:0} ISO (10,4%) C_{17:0} ISO (9,7%) és C_{17:1} ω6c (8,0%).

5.11.4. Fiziológiai és biokémiai jellemzők

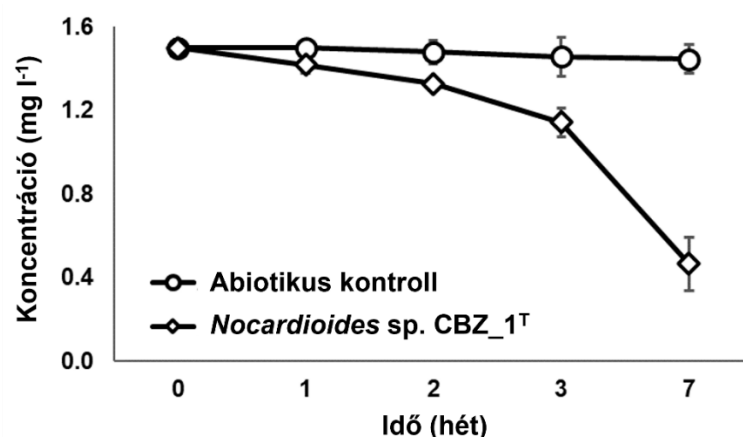
A CBZ_1^T törzs növekedése 6-9 pH tartományban volt megfigyelhető, az optimális érték a 8-as pH. A 15-37 °C közötti hőmérsékleti tartományban növekedett, de az optimális a 28 °C volt. Sótolerancia esetén a 0-3%-os NaCl koncentráció között növekedett, az optima 1% volt.

A CBZ_1^T törzs élettani és biokémiai jellemzőit, valamint enzimaktivitását a rokon típus törzsekével összehasonlítva a 14. és 15. melléklet mutatja be. A CBZ_1^T törzs oxidáz negatív és kataláz pozitív volt, a nitrátot képes nitráttá redukálni, ciszteinből H₂S-t termelt, indolt nem termelt és a glükózt nem fermentálta. Az izolátum nem hidrolizálta az arginint, a karbamidot és a keményítőt, de hidrolizálta az aesculint, a zselatint, a kazeint és a Tween 80-at. Az API[®] 50CH tesztcsíkokban található 49 vizsgált vegyület közül csak az almasavat és a D-glükózt volt képes asszimilálni. Az API[®] ZYM eredményei szerint a törzs mutatott alkalikus foszfatázt, észterázt, észteráz-lipázt, lipázt, leucin-, valin- és ciszteint-arilamidázt, tripszint, savas foszfatázt, naftol-AS-BI-foszfohidroláz, β-galaktozidáz, α-glükozidáz és β-glükozidáz, nem mutatott α-kimotripszin, α-galaktozidáz, β-glükunoridáz, N-acetil-β-glükozaminidáz és α-mannozidáz aktivitást.

5.11.5. A CBZ_1^T törzs gyógyszerhatóanyag-lebontási képessége

A CBZ_1^T törzs a vizsgálati körülmények között nem mutatott figyelemre méltó karbamazepin biodegradációt. Alacsony, 4%-os karbamazepin-koncentráció csökkenés volt észlelhető a 7 hetes időtartamú inkubációs idő elteltével.

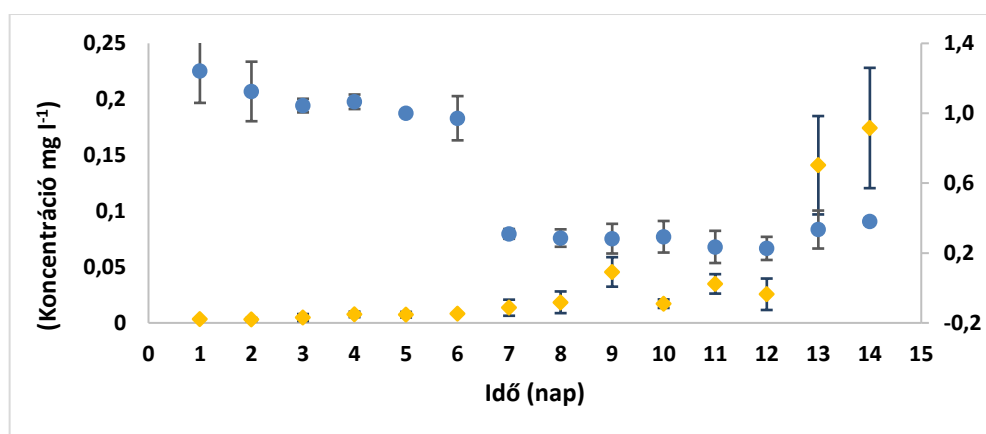
Azonban az ibuprofen esetében jelentős mértékű biológiai lebomlás volt észlelhető. A 7 hetes inkubáció után, 3,0 g/l glükóz jelenlétében, mint kometabolikus szubsztrát, a CBZ_1^T törzs a 1,5 mg/l koncentrációjú ibuprofen 70%-át eltávolította a tesztoldatból (25. ábra).



25. ábra Az ibuprofen lebomlási mértéke a *Nocardiodides* sp. CBZ_1^T törzs által

5.12. A *Stenotrophomonas humi* DIC_5 törzs diklofenák biotranszformációs kinetikája és a keletkező metabolit ökotoxicitásának vizsgálata

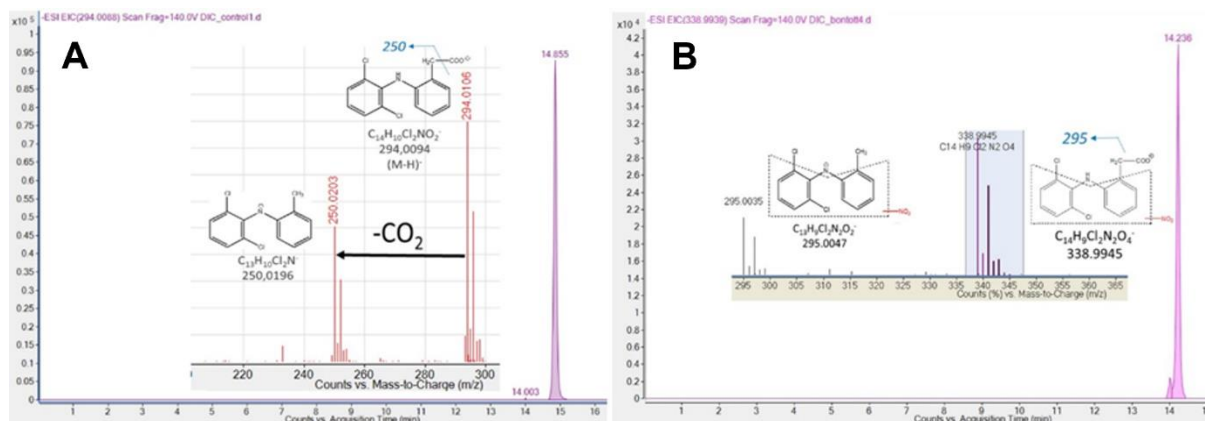
Az előzetes kísérletek során kiderült, hogy glükóz mennyiségének növelésével (3,0 g/l) négy hetes inkubációs idő után 72,1 %-os diklofenák (1,5 mg/l) biotranszformációt sikerült elérni a *S. humi* DIC_5-ös törzs esetében. A fő transzformációs kísérlet ezen előzetes tapasztalatok alapján lett beállítva, de a törzsoldat nagyobb mennyiségű baktériumszuszpenzióval lett beoltva. A 6. napon (26. ábra) a diklofenák koncentrációja 21,8%-os csökkenést mutatott, míg a 8. napra ez az érték elérte a 75,1%-ot. Ez idő alatt az abiotikus mintában a diklofenák koncentrációja nem változott a kiindulási értékhez képest. A biomassa teszt alapján elmondható, hogy a diklofenák nem adszorbeálódott a sejtek felületére, így a folyamat biológiai átalakulásnak minősíthető.



26. ábra A diklofenák biotranszformációjának kinetikája a *Stenotrophomonas humi* DIC_5 által (kék) és az átalakulás során keletkező metabolit, a nitro-diklofenák koncentrációjának a változása (narancssárga)

5.12.1. A *S. humi* DIC_5 törzs diklofenák biotranszformációs termékei

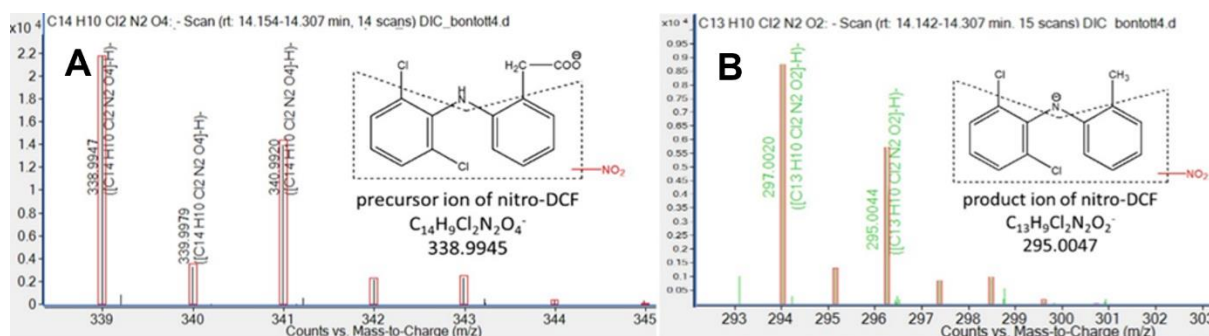
A metabolitok azonosítására és szerkezetének megerősítésére HPLC-Q-TOF-MS-t, míg az átalakulási termékek további megerősítésére félkvantitatív monitorozási műszert, UHPLC-TQ-MS-t alkalmaztam. A DIC fragmentációja ESI körülmények között m/z 250,0196-os fragmentumiont eredményezett, amely a CO_2 (44 Da) semleges elvesztését jelzi a deprotonált molekulaionból (M-H) 294,0094-es tömegszám mellett. További vízvesztés (18 Da) is keletkezett, azonban nagyon alacsony intenzitással (27/A. ábra).



27 ábra A kísérlet 14. napján gyűjtött (A) abiotikus kontrollminta diklofenákjának és (B) a *S. humi* DIC_5 törzzsel kezelt minta nitro-diklofenák extrahált ionkromatogramja (EIC) és tömegspektruma

A diklofenák retenciós ideje a HPLC-QTOF-MS rendszerben 14,86 perc volt. Az Agilent Mass Profinder szoftver által azonosított átalakulási termék molekulatömege 338.9950 g/mol volt, amely 14,23 perces retenciós időnél eluálódott az RP-HPLC-ből. A kiindulási vegyülethez képest eltolódott retenciós időt mutató átalakulási termék nagyobb polaritással rendelkezik. A molekula számított kémiai összetétele $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$ volt, melyet nitro-diklofenákként azonosítottam. A nitrocsoport helyét nem lehet eldönteni. Az extrahált ionkromatogramot (EIC) a nitro-DIC csak MS-spektrumával együtt mutatja a 27/B. ábrán.

A molekulaion és fragmentum számított, illetve mért tömege közötti különbség 0,07 mDa és -0,03 mDa volt, ami jóval a 2 mDa határ alatt van. Mind a prekursorion, mind pedig a nitro-DIC fragmentumionjának izotópeloszlása jól egyezik az kiszámítottal, ami azt jelzi, hogy a kapott eredmények megbízhatóak (28. ábra).



28. ábra (A) prekursor és (B) nitro-DIC metabolit izotóp eloszlása a *S. humi* DIC_5 törzzsel kezelt mintában, amely a kísérlet 14. napján lett gyűjtve

A nitro-DIC fragmentációs viselkedésének ismeretében érzékeny és szelektív analitikai módszert (UHPLC-TQ-MS) alkalmaztam az átalakulási termékek koncentrációjának változásának vizsgálatára. A nitro-DIC mindkét MRM tömegátmenete (339,0/259,0 és 339,0/295,0) jól detektálható volt a ($S/N > 3$) 3. nap után és ugyanazt az ionarányt mutatta, mint a DIC (+30%).

Az 28. ábra mutatja a nitro-DIC félkvantitatív elemzésének eredményét az összes mintában, ahol a kalibráláshoz diklofenák standard lett használva. A nitro-DIC koncentrációjának növekedése a 7. naptól mérhető és a 14. napra meghaladja a 150 ng/l koncentrációt a táptalajban.

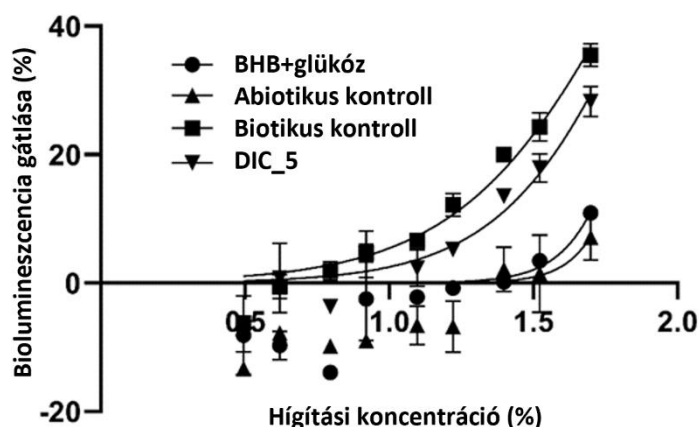
A diklofenák és a nitro-diklofenák koncentrációjának alakulása jó korrelációt mutat. A mért adatok alapján nem feltételeztem, hogy a nitro-DIC az egyetlen átalakulási termék, más átalakulási termék azonban nem lett kimutatva a mintából. A nitro-diklofenák ilyen mennyiségben könnyen mérhető volt, és ilyen tenyésztési körülmények között a diklofenák fő metabolitjának tekinthető.

5.12.2. A diklofenák és a biotranszformációs minták akut toxicitás vizsgálata *Allivibrio fischeri* tesztorganizmvel

A vizsgált tiszta gyógyszerhatóanyag, a diklofenák és a diklofenák biotranszformációjából származó minták (abiotikus kontroll, biotikus kontroll, BHB + glükóz, DIC_5) toxicitását az *A. fischeri* sejtek biolumineszcenciájának a 30 perces expozíciós ideje utáni változás mérésével ellenőriztem. A diklofenák hatékony koncentrációja 7 és 27 mg/l volt, ami a biolumineszcencia 10, illetve 50%-os csökkenését eredményezte. Az előző eredményekkel korrelálva, a 1,5 mg/l diklofenákot tartalmazó abiotikus kontroll minta maximális gátlása nem volt több 7%-nál. A kiindulási ásványi tápoldat glükózzal kiegészítve (BHB+glükóz), amiben a kísérlet zajlott szintén elhanyagolható 11%-os gátlást eredményezett (29. ábra).

A kísérletsorozat második felében megvizsgáltam, hogy az előző eredmények miként változnak a *S. humi* DIC_5 baktériumtörzs jelenlétében (29. ábra). Az eredmények alapján mind a biotikus kontroll, mind a DIC_5 baktériumtörzs kis mértékben toxikusnak bizonyult a tesztorganizmusra nézve. A biotikus kontroll és a DIC_5 maximális gátlásai 35,5%, illetve 28,6% voltak. Azok a koncentrációk, amelyeknél 50%-os lumineszcencia csökkenést figyeltünk meg, 73,4%-nak a biotikus kontrollnál és 89,2%-nak a DIC_5-nél (29. ábra) mutatkoztak.

Eredményeink azt mutatják, hogy az *S. humi* DIC_5 törzse képes toxikus bakteriális metabolitokat termelni. Sőt, úgy tűnik, hogy a baktérium endogén metabolitjai toxikusabbak, mint a táptalaj, amely a diklofenákot és annak metabolitjait is tartalmazza (29. ábra). Szintén figyelembe kell venni, hogy a biotikus kontroll alkalmazása szükséges a toxikológiai vizsgálatok során, és hogy a toxicitást olyan koncentrációs tartományban kell vizsgálni, amely közel áll a környezetben mért értékhez. Ellenkező esetben előfordulhat, hogy a baktériumok, amelyek a környezetben található gyógyszert bontják le ($\mu\text{g/L}$ koncentrációs tartományban), toxikusabbak lesznek, mint maga az aktív hatóanyag.

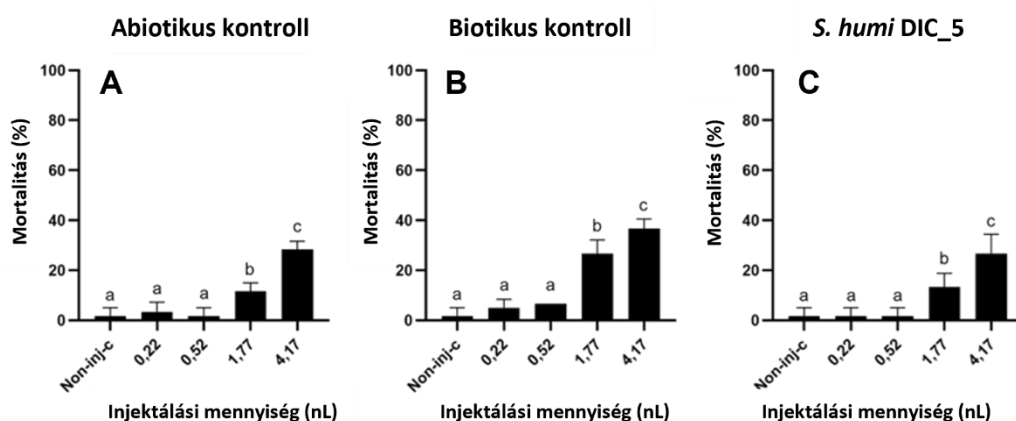


29. ábra Az *Aliivibrio fischeri* akut toxicitás teszt biolumineszcencia gátlása (%) a diklofenák biotranszformációs kísérletéből származó minták 30 perc utáni expozíciója során

5.12.3. A biotranszformációs minták hatása a mikroinjektált zebradánió embriókra

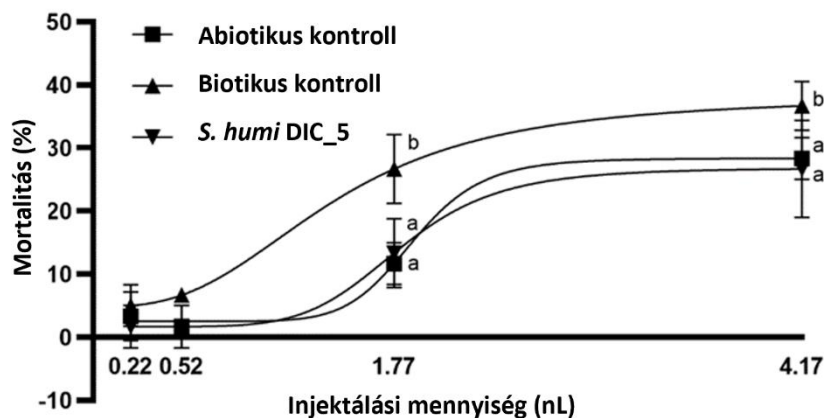
A diklofenák degradációjának biológiai értékelését a *Stenotrophomonas humi* DIC_5 baktérium által zebradánió embriók segítségével is elvégeztem a vizsgálatot. Az abiotikus kontroll, a biotikus kontroll és DIC_5 bomlástermék mellett a kiindulási ásványi tápoldat glükózzal kiegészített (BHB+glükóz) mintáján is elvégeztem.

A BHB+glükóz ásványi tápoldat 4,17 nl injekciós térfogattal 120 órás expozíció után jelentős ($13,3 \pm 5,44$ %) mortalitást okozott a kontrollhoz képest, ami azt jelenti, hogy ez a tápoldat viszonylag alacsony egyedi toxicitással rendelkezett az alkalmazott bioassay-ban. A biológiai transzformációs kísérlet összes mintája 4 különböző injektálási mennyiségben lett vizsgálva. Az eredmények értelmében az abiotikus kontroll, biotikus kontroll és a DIC_5-ös minták nem okoztak jelentős mortalitást a két alacsonyabb injektálási mennyiségnél (0,22 nL; 0,52 nL), azonban a két magasabb mennyiségű injektálásnál (1,77 nL; 4,17 nL) mind a három minta esetén jelentős dózisfüggő mortalitásnövekedés volt megfigyelhető (30. ábra). A legmagasabb beadott mennyiségnél a mortalitás az abiotikus kontrollnál $28,33 \pm 3,33\%$, a biotikus kontrollnál $36,67 \pm 3,5\%$ és a DIC_5 esetén pedig $26,67 \pm 7,70\%$ volt.



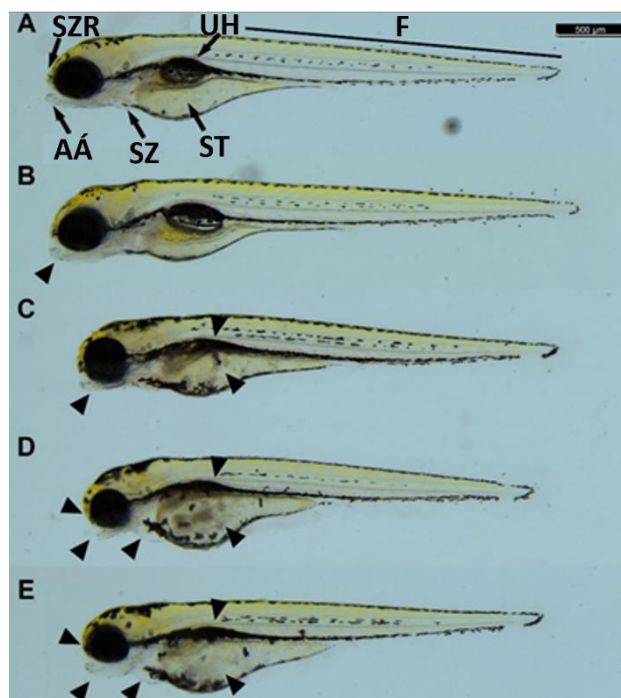
30. ábra Abiotikus kontroll (A), biotikus kontroll (B) és a *S. humi* DIC_5 (C) minták toxicitás vizsgálata a diklofenák biotranszformációs kísérletéből a nem injektált kontroll (Non-inj-c) zebradánió embriókkal szemben 120 órás expozíciós idő után. A különböző kisbetűk (a, b és c) szignifikáns különbségeket jeleznek ($p < 0.05$)

A biológiai transzformációs kísérletből származó minták mortalitás eredményeinek az összehasonlításakor a biotikus kontroll minta 1,77 és 4,17 nL injektált térfogatánál szignifikánsan magasabb mortalitás tapasztalható, mint az abiotikus és *S. humi* DIC_5 minták zebradánió embrió tesztekben (31. ábra). Az eredmények értelmében megállapítható, hogy a *S. humi* DIC_5 baktériumtörzs toxikus endogén hatású metabolitokat termel, amelyek a mikroinjektálással történő befecskendezés után jelentősen csökkentették a zebradánió embriók túlélését.



31. ábra Abiotikus kontroll, biotikus kontroll és a biotranszformációs kísérletből származó *S. humi* DIC_5 minták toxicitása az injektálások 120 órás expozíciós ideje után. A különböző kisbetűk (a, b és c) szignifikáns különbségeket jeleznek ($p < 0.05$)

A halálozáson túlmenően az embriók fejlődésében bekövetkező változások felmérése volt a következő lépés a 4,17 nL injektált térfogat 120 órás expozícióját követően. A nem injektált kontroll csoportban nem lehetett észlelni fejlődési rendellenességet (32/A. ábra). A BHB + glükóz injektálása enyhe alsó állkapocs rendellenességet okozott az embrióknál (32/B. ábra). Az abiotikus kontroll, diklofenákot tartalmazó kontroll injektálásánál a már leírtak mellett észlelhető voltak a sárgatest rendellenességei és a megrövidült testhossz. Ezek mellett az úszóhólyag felfúvódásának hiánya is megfigyelhető volt. Az összes életben maradt egyednél detektálható volt a fej enyhe deformitása (32/C. ábra). A biotikus kontrollal (32/D. ábra) és a *S. humi* DIC_5-tel kezelt mintákra (32/E. ábra) vonatkozóan az embriókban hasonló tünetek jelentkeztek mint az abiotikus mintában. Azonban a testhossz megrövidülése kifejezőbb volt. A képződő szívburok ödémák, szaglóterület erős alulfejlettsége és az alsó állkapocs jellegzetes torzulása csak ebben a két mintában jelent meg. Az előbb felsorolt tüneteket valószínűleg a metabolitok okozták, amelyeket az *S. humi* DIC_5 törzs termelt.



32. ábra Az injektált minták reprezentatív fejlődési rendellenességei a zebradánio embriók vizsgálata során (A) nem injektált kontroll; (B) BHB+ glükóz; (C) abiotikus kontroll; (D) biotikus kontroll; (E) *S. humi* DIC_5. A fekete nyílhegyek a fejlődési rendellenességekkel érintett területek helyét jelzik. Rövidítések: SZR: szagló régió; AÁ: alsó állkapocs; F: farok; UH: úszóhólyag; SZ: szívburók; ST: sárgatest. Méretség: 500 μ

6. Következtetések és javaslatok

A kísérletek során használt kiinduló biofilm már korábban sokoldalú baktériumközösség dúsítására szolgált, melyek biotechnológiai jelentőségű xenobiotikum lebontó baktériumoknak (BTEX és PAH) minősültek (Benedek et al., 2016; 2018; 2020 és 2021). A jelen vizsgálatok pedig az aktív gyógyszerhatóanyagok, mint a diklofenák, ibuprofen és karbamazepin jövőbeni potenciális biodegradációjára képes baktériumok azonosítására, izolálására és bontó képességének vizsgálatára fókuszál a kiinduló biofilmből.

A három gyógyszerhatóanyaggal külön-külön kiegészített dúsító tenyészetekből összesen egy 31 tagból álló (10 db DIC; 9 db IBU és 12 db CBZ), fajsztinon azonosított bakteriális törzsgyűjtemény jött létre, amelynek tagjai potenciálisan képesek lehetnek diklofenák, ibuprofen vagy karbamazepin bontására. A bakteriális törzsgyűjtemény azokat az ígéretes baktérium taxonokat tartalmazza, amelyek a dúsítás során végzett felmérések alapján nagy relatív abundanciát vagy annak növekedését mutatták. Ezeket a baktériumtörzseket sikerült tenyésztésbe vonni és genomjukat is sikerült rekonstruálni, amelyeken, génannotációt és metabolikus elemzéseket végeztünk. A dúsítási időszak alatt két nemzetség dominanciája volt megfigyelhető, a *Pseudomonas* és a *Methyloversatilis* nemzetségeké. Azonban ezen időszak során a relatív abundancia növekedésük elhanyagolható volt.

Korábbi kísérletek és tanulmányok már bizonyították, hogy a *Pseudomonas* nemzetség nemcsak rendkívül gazdag, hanem tagjai metabolikusan is rendkívül sokoldalúak és képesek különböző xenobiotikumok, például egyszerű aromás szénhidrogének lebontásában is részt venni (Nam et al., 2003; Hong et al., 2004). Emellett szakirodalmi adatok alapján feltételezhető volt a *Pseudomonas* nemzetség egyes tagjainak gyógyszerhatóanyag-bontó potenciálja, mert számos tanulmány beszámolt a nemzetség gyógyszerhatóanyag lebontó képességéről, mint például a diklofenák és a karbamazepin esetében is (Li et al., 2013; Jiang et al., 2014; Hemidouche et al., 2018; Daou et al., 2020; Marchlewicz et al., 2023). A három gyógyszerhatóanyag vizsgálata során meglepő módon a *Pseudomonas* izolátumok növekedését gátolta az adott gyógyszerhatóanyag, illetve kis számban toleránsnak bizonyultak a hatóanyag vegyülettel szemben. A *Methyloversatilis* nemzetség eddigi gyógyszerhatóanyag-bontó képességéről nincsen szakirodalmi adat. Az izolátumok közül az *M. discipulorum* DIC_12 és IBU_4 diklofenák- és ibuprofen toleránsnak minősültek, illetve a CBZ_11 növekedését gátolta a karbamazepin. A fenti eredményekből kiindulva a *Pseudomonas* és a *Methyloversatilis* izolátumok közül egyik sem mutatott kiugró metabolikus aktivitást a gyógyszerek jelenlétében, arra ad következtetést, hogy nem ezen baktériumok felelősek a kiválasztott

gyógyszerhatóanyagok lebontásáért. Valószínűsíthetőleg az elsődleges lebontók anyagszere termékeivel táplálkoztak, így létrehozva a mikrobák közötti táplálkozási kölcsönhatásokat (Seth & Taga, 2014).

A dúsításokat külön-külön megvizsgálva a diklofenák dúsítások esetén az alábbi nemzetségek lettek azonosítva, *Azospirillum*, *Rhodanobacter*, *Ferrovibrio*, *Hydrocarboniphaga*, *Zavarzinia*, *Sphingopyxis* és a *Prostheco bacter*, amelyek vagy magas relatív abundanciát, vagy kiemelkedő relatív abundancia növekedést mutattak. Számos nemzetség esetén, mint például az *Azospirillum*, *Ferrovibrio*, *Hydrocarboniphaga* vagy *Zavarzinia* nincs vagy kevés információ található meg a szakirodalomban az esetleges gyógyszerhatóanyag-bontó képességükről. A *Rhodanobacter* nemzetség esetleges gyógyszerhatóanyag lebontó képességét már alátámasztották, és a diklofenák lebontó mikrobaközösség részeként azonosították (Navrozidou et al., 2019). Egy eleveniszapos szennyvíztisztító telepről 4 baktérium törzset izoláltak, melyek képesek voltak bontani az ibuprofent, az egyik közülük a *Sphingopyxis* sp. TrD1 volt (Zhou et al., 2013). Szintén egy a *Sphingopyxis* nemzetségből származó *Sphingopyxis granuli* RW412 törzs képes volt az ibuprofen eltávolításra, mely alátámasztja a tényt, hogy olyan génekkel rendelkezik, melyek az ibuprofen mineralizációját elősegítik (Aguilar-Romero et al., 2021). A *Prostheco bacter* nemzetség esetén találhatóak még szakirodalmi adatok, melyek beszámolnak gyógyszerhatóanyag, például ibuprofen vagy karbamazepin, illetve testápolási termékek hatóanyagainak a lebontásáról (Tiwari et al., 2019; Rutere et al., 2020).

Az ibuprofen tartalmú dúsítókból a *Starkeya*, *Methylibium*, *Rhodococcus* nemzetségek képviselői és az SCN 62-11-jelű (kitenyésztetlen) baktérium kerül további tárgyalásra, mivel ezek a törzsek mutatták a legnagyobb relatív abundancia növekedést. A *Starkeya* sp. C12 baktériumtörzs esetében Bessa és munkatársai (2017) már leírták a törzs hatékony karbamazepin (10 mg/l) bontó képességét. Egyedüli szén- és energiaforrásként is sikeresen hasznosította (32%) a gyógyszervegyületet, illetve acetáttal kiegészítve is képes volt a bontásra. Tiwari és munkatársai (2019) vizsgálataiban a *Methylibium* nemzetség tagjai is megtalálhatóak voltak egy kórházi szennyvízkezelő bioreaktorában, mely nagy koncentrációban tartalmazott ibuprofent és karbamazepint. A *Rhodococcus* nemzetség számos tagja megtalálható a szakirodalomban, mint potenciális gyógyszerhatóanyag-bontó. A *Rhodococcus* sp. EsD20 törzs valószínűsíthetően az ibuprofen bontásban vett részt (Zhou et al., 2013), míg a *Rhodococcus ruber* IEGM 346 törzs a diklofenák bontására volt képes magas (50 mg/l) és alacsonyabb (50 µg/l) kiindulási koncentrációk esetében is (Ivshina et al., 2019), illetve a *Rhodococcus*

rhodochrous baktériummal a karbamazepin bontási kísérlet sikeres volt (Gauthier et al., 2010). Egy laboratóriumi bioreaktorból első alkalommal mutatták ki az SCN 62-11-jelű baktériumot, méghozzá egy tiociánt (SCN-) lebontó mikrobaközösségből (Kantor et al., 2015). Azonban a mai napig nem találhatók pontos információk arról, hogy a baktérium képes lenne részt venni gyógyszerhatóanyagok bontásában.

A karbamazepin tartalmú dúsító tenyészetekben a legnagyobb relatív abundancia növekedés a *Pseudonocardia*, a *Sphingopyxis*, a *Rhodococcus* és az *Achromobacter* nemzetségek esetén volt észlelhető. A *Pseudonocardia* és az *Achromobacter* nemzetségek esetében a mai napig nem számoltak be diklofenák, ibuprofen vagy karbamazepin biodegradációs képességről. Azonban az *Achromobacter* izolátumok esetében találtak antibiotikumok (szulfametoxazol) biodegradációjára példát (Liang et al., 2021). A *Sphingopyxis* és a *Rhodococcus* nemzetségeknek a gyógyszerhatóanyagok biodegradációjában betöltött szerepe pedig már fent tárgyalásra került.

Az egyéb baktérium nemzetségek, melyek említést érdemelnek a dúsítások során a *Variovorax*, a *Rhizobium*, és a *Nocardioides*. Nem mutattak kimagasló relatív abundancia növekedést, azonban valószínűsíthetően fontos baktériumközösségi tagok voltak. A *Variovorax* nemzetség esetében egy tanulmány található, melyben egy település szennyvizéből történő izolálás során a *Variovorax* sp. Ibu-1 baktérium törzs képes volt bontani közel 100%-ban az ibuprofent (500 mg/l) (Murdoch & Hay 2015). A *Rhizobium* nemzetség esetében Bessa és munkatársai (2017) bizonyították be, hogy a *Rhizobium* sp. C12 törzs képes volt a karbamazepint hasznosítani, mint egyedüli szén- és energiaforrás. A *Nocardioides* nemzetség gyógyszerhatóanyag lebontási képességéről elenyésző adat áll a rendelkezésünkre. Azonban gyógyszerhatóanyagok jelenlétében történő feldúsulások esetén több baktériumközösségből, illetve üledékből sikerült izolálni e nemzetségbe tartozó baktériumtörzseket (Rutere et al., 2020; Posselt et al., 2020). A kutatócsoportunk által, karbamazepinnel történő dúsítás során izolált *Nocardioides* sp. CBZ_1^T törzs *Nocardioides carbamazepini* néven lett leírva, mint új baktériumfaj. A bontási kísérletek során karbamazepin rezisztenciát és ibuprofen bontás lett detektálva az új baktériumfajnál (Benedek et al., 2022).

A 31 izolátumból álló, potenciálisan gyógyszerhatóanyagokat biodegradáló baktériumtörzsgyűjtemény diklofenák, ibuprofen és karbamazepin lebontó képességét határoztam meg. A bontási képességek feltérképezését követően egy bakteriális konzorciumot alakítottam ki, amely mindhárom gyógyszerhatóanyag esetében hatékony biodegradációra

képes. Az előtesztelés során rezsazurinos módszer alkalmazásával a kiválasztott izolátumok közül csupán 17 baktériumtörzs mutatott aktivitást a gyógyszerhatóanyagok jelenlétében. Ezek a törzsek közül 4 a diklofenák, 3 az ibuprofen és 10 a karbamazepin dúsítókából származtak, a 610 nm-en mért abszorbancia értékeik jóval alacsonyabbak voltak a mért abiotikus kontrollokhoz képest. A legtöbb izolátum növekedését gátolta a gyógyszerhatóanyagok jelenléte, a kontroll 610 nm-en alacsonyabb abszorbanciát mutatott, mint a minta; néhány izolátum képes volt növekedni plusz szénforrás hiányában, de aktivitásukat a gyógyszerhatóanyag gátolta. Egyes izolátumok abszorbanciaértékei a kontroll és a minta esetében közel azonosak voltak. Feltehetően ezek az izolátumok rezisztensek voltak a gyógyszerhatóanyagok jelenlétére. A feltételezés megerősítése érdekében műszeres analitikai módszert, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmazva lettek vizsgálva az izolátumok. A mérések során körvonalazódott, hogy kevés izolátum képes lebontani a vizsgált gyógyszerhatóanyagokat. Nem véletlen, hogy a környezetben leggyakrabban kimutatott vegyületek közé a diklofenák, ibuprofen és a karbamazepin is beletartoznak, mivel ezek a hatóanyagok nagyobb ellenállást mutatnak a biológiai lebontással szemben (Kleemiss et al., 2020; Parolini et al., 2020; Luo et al., 2014). Ezen okok miatt nehéz olyan baktériumtörzseket izolálni, amelyek hatékonyan, rövid időn belül képesek a gyógyszerhatóanyagok lebontására. Az elvégzett gyógyszerhatóanyag-bontó kísérletek értelmében a diklofenák (1.5 mg/l) biológiai átalakítására a *S. humi* DIC_5-ös izolátum volt képes glükóz (3.0 g/l) jelenlétében két hét inkubációs idő alatt. A legmagasabb ibuprofen bontást a *R. daejeonense* IBU_18-as izolátum produkálta, élesztő kivonattal kiegészített tápoldatban. A *B. bullata* CBZ_3 és a *Nocardioideis carbamazepini* CBZ_1-es izolátumok mutatták a legintenzívebb karbamazepin bontást glükóz, illetve élesztő kivonat jelenlétében. Na-acetát és a Na-citrát mint plusz szén- és energiaforrás nem növelte egyik izolátum esetében se a gyógyszerhatóanyag-bontó képességet.

A bakteriális konzorcium kialakításához a fent felsorolt 4 baktérium izolátum lett kijelölve, *Stenotrophomonas humi* DIC_5; *Rhizobium daejeonense* IBU_18; *Nocardioideis carbamazepini* CBZ_1 és *Brevundimonas bullata* CBZ_3. A kiválasztott izolátumok optimális tenyésztésének körülményei meghatározásra kerültek, semleges vagy enyhén lúgos 1-2 %-os sótartalmú R2A tápoldatban és 27 °C-on inkubálva növekednek a legideálisabban. Az együtttenyésztési vizsgálatoknál az agardiffúziós lyukteszt során az izolátumok esetében kizárólag a *Nocardioideis carbamazepini* CBZ_1-es törzs felülúszója váltott ki enyhe gátló hatást a többi baktériumtörzs szaporodására. A legerősebb gátlást a *B. bullata* izolátum fejtette ki. Emellett az agardiffúziós együtt-tenyésztési módszer nem bizonyult megfelelőnek a DIC_5,

IBU_18 és CBZ_3 törzsek felülúszóinak a CBZ_1 törzsre gyakorolt hatásának vizsgálatára. Mivel a CBZ_1 izolátum nem képes növekedni tápagarban, nem színezte el az agart, így a gátlási zóna nem volt detektálható. A másik együtt-tenyésztési módszer a keresztcsíkozás során ellentétben az agardiffúziós lyukteszttel nem volt tapasztalható semmi féle gátlási zóna az izolátumok között. Így kijelenthető, hogy a négy baktériumtörzs a *Stenotrophomonas humi* DIC_5; *Rhizobium daejeonense* IBU_18; *Nocardioidea carbamazepini* CBZ_1; *Brevundimonas bullata* CBZ_3 alkalmasnak tekinthető egy bakteriális konzorcium kialakításához.

A létrehozott bakteriális konzorcium gyógyszerhatóanyag-bontó képességének a tesztelése el lett végezve ásványi tápoldatban, természetes vízmintában (Rákospatak), illetve szennyvíz effluensben. Az izolátumok nyomonkövetése a kísérletek során T-RFLP módszerrel történt, mely alkalmasnak bizonyult erre a célra, kivéve a CBZ_3-as izolátum esetén, ahol csak a szennyvíz effluenshez hozzáadott glükóz, élesztőkivonat és ammónium-nitrát jelenlétében volt kimutatható. Valószínűsíthetően a többi tápoldatban nem volt képes a megfelelő növekedésre. A T-RFLP eredményei összességében azt mutatták ki, hogy a diklofenák és ibuprofen lebontásában résztvevő baktériumtörzsek a beoltást követően végig nagy relatív abundanciával voltak jelen a teljes inkubációs idő alatt. Azonban a karbamazepin lebontásában részt vevő törzsek alacsony relatív abundanciával voltak jelen. Ahhoz, hogy a T-RFLP eredmények teljes biztonsággal csak a konzorcium tagjait mutassák ki kellene zárni az autochton baktériumközösség összes tagját. Mivel előfordulhat, hogy valamelyik közösség alkotónak ugyan ott van a hasítási helye *AluI*-es enzimmel, mint a konzorcium egyik tagjának. Ennek következtében pozitív irányba változtathatja meg az eredményeket.

A különböző kísérleti beállításokból kapott eredmények azt mutatták, hogy a plusz ko-metabolit tápanyagforrások, például glükóz, élesztőkivonat és ammónium-nitrát hozzáadása javíthatja a konzorcium biodegradációs hatékonyságát. Több tudományos értekezés is beszámolt már korábban, hogy a tápoldathoz plusz hozzáadott szénforrások energiát biztosíthatnak a sejtek növekedésének támogatásához, ezzel elősegítve a mikroszennyező anyagok lebontását (Popa et al., 2014; Assiaoui et al., 2017). Azonban a természetes vízminta és a szennyvíz effluens T-RFLP elektroferogramjain jól látszik, hogy a hozzáadott kiegészítő tápanyagok nem csak a bakteriális konzorcium szaporodását segítették elő, hanem mind természetes, mind a szennyvíz effluens autochton baktérium közösségének a felszaporodását is. Ennek hatására nem csak a minták baktérium közösségét, hanem a konzorcium relatív abundanciáját is módosították, ezzel befolyásolva a bontási eredményeket. Azonban továbbra

is a konzorcium tagjai maradtak a dominánsok a tápközegben és ki tudták fejteni bontási képességüket. A fent említett okok miatt ezek is csak feltételezések és nem teljesen bizonyítható eredmények. Azonban az autochton baktériumközösség elektroferogramján a konzorciumot tartalmazó baktériumtörzseinek hasítási helyein nem látható más csúcs. Illetve bontási eredmény csak a konzorcium jelenlétében detektálható, így nagyobb biztonsággal kijelenthető, hogy a az egyes hasítási helyeken tényelg csak a konzorcium egyes tagjai láthatóak.

Az eltérő tápközegben történő vizsgálatok során az alábbi bontási eredmények tekinthetők a legmagasabbnak. BHB ásványi tápoldat esetén 72%-os diklofenák, 100%-os ibuprofen és 30%-os karbamazepin biodegradáció volt tapasztalható glükóz és élesztőkivonat jelenlétében. Karbamazepin az egyik legperzisztensebb gyógyszerhatóanyag a környezetben, illetve erős gátló hatást fejthet ki a baktérium-közösségre. Valószínűsíthetően ennek a két oknak tudható be az alacsonyabb karbamazepin bontási hatékonyság. Rákospatak vízminta esetén 86%-os diklofenák, 100%-os ibuprofen és 25%-os karbamazepin bontás volt detektálható glükóz, élesztő-kivonat és Na-acetát jelenlétében. A szennyvíz effluens esetében csekély 30%-os diklofenák, 79%-os ibuprofen biodegradáció volt megfigyelhető glükóz, élesztő-kivonat és Na-acetát jelenlétében. Jelentős karbamazepin elimináció nem volt tapasztalható, aminek oka az egyéb szennyvízben felelhető szénforrások lehettek, ami könnyebben elérhető szén- és energiaforrást biztosítottak, ezzel zavarva a gyógyszerhatóanyagok bontását.

A karbamazepinnel mint egyedül szén- és energiaforrással kiegészített dúsított tenyészetből izolált CBZ_1-es törzs azonosításával lehetőség nyílt egy új baktériumfaj leírására. A jelen pillanatban érvényes követelményeknek megfelelő (Kim et al., 2014; Rosselló-Móra C Amann., 2015) fenotípusos, kemotaxonómiai, illetve filogenetikai és genomikai elemzések elvégzése azt mutatta, hogy az ibuprofen biodegradációjára képes izolátum új baktériumfajt képvisel és a *Nocardioides* nemzetségbe tartozik. Ennek megfelelően az új faj a *Nocardioides carbamazepini* nevet kapta. Emellett egy bioinformatikai módszer segítségével, a metagenom binning-gel is rekonstruálni lehetett az új baktériumfaj genomját a dúsító tenyészetből izolált közösségi DNS-t felhasználva. Napjainkban a metagenom binning módszerével több százezer új baktériumfajt sikerült leírni metagenomokból (Almeida et al., 2019; Pasolli et al., 2019) anélkül, hogy tenyésztésbe vonnák azokat. Ennek a módszernek a sikeres alkalmazása újabb bizonyíték arra, hogy metagenom binning segítségével a tudomány számára elérhetővé válhatnak új baktériumfajok genomjai, így lehetővé téve a mikrobiális „sötét anyag” feltárását.

A *Stenotrophomonas humi* DIC_5 baktériumtörzs 1,5 mg/l kezdeti koncentrációban képes a diklofenák átalakítására. A szakirodalomi adatok alátámasztják, hogy a *Stenotrophomonas* nemzetség tagjai fontos szerepet játszanak szennyező anyagok, például policiklusos aromás szénhidrogének eliminációjában (Ryan et al., 2009). Illetve fontos ökológiai szerepet játszanak a nitrogén- és kénkörforgásban, gyakran szoros kapcsolatban állnak a növényekkel, és segítik azok növekedését, védik bizonyos kórokozók ellen (Heylen et al., 2007). Azonban a *Stenotrophomonas humi* diklofenák biotranszformációjára ez az első bizonyíték, a folyamat során egy átalakulási terméket sikerült azonosítani, a nitro-diklofenákot, mely tömegspektrometriai módszerekkel lett megerősítve. A kiindulási tápoldat nitrogénben gazdag környezet volt, mely ammónium- nitrátot tartalmazott. A különböző nitrogénformák fontos szerepet játszanak a szennyezőanyagok átalakulásában, mely folyamatok során nitrifikáló és denitrifikáló baktériumok vesznek részt (Chiron et al., 2010). Egy kutatócsoport megállapította, hogy a szennyvízben jelen lévő ammónium-nitrát a mikrobiális nitrifikációval kapcsolatos (Praskova et al., 2011). Az elvégzett vizsgálatok hangsúlyozták a gyógyszerhatóanyagok nitromódosításának fontosságát, mivel ez a biotranszformáció eredményeként olyan, nitrogénben gazdag vegyületeket eredményezhetett, ami mátrixként a szennyvízben is előfordulhat. Egy kutatás során hét spanyolországi szennyvízbefolyó mintából négyben a leggyakoribb diklofenák származék a nitro-diklofenák volt (Nassef et al., 2010). A vizsgálataim során a diklofenák koncentráció csökkenését a nitro-diklofenák koncentráció növekedése követte a 7. naptól. Az *A. fischeri* és a zebradánió embriókkal végzett ökotoxikológiai vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a diklofenák és a lebomlásból származó másodlagos termék a nitro-diklofenák nem toxikus a vizsgált tesztorganizmusokra az alkalmazott koncentrációkban. Érdekes módon a bakteriális metabolit termékek idegen anyag jelenléte nélkül (diklofenák) mérgezőbbek voltak a tesztorganizmusokra, mint a diklofenák önmagában vagy a biodegradált minták esetén. A baktériumok által okozott toxikus hatást ugyanakkor csökkentette a diklofenák jelenléte. Jól látszik, hogy a bontás hátterének vizsgálata és a keletkező melléktermékek toxicitásának ellenőrzése elengedhetetlen egy hatékony gyógyszerhatóanyagbontó baktérium szennyvízkezelésének alkalmazása során.

A mikrobiális szennyvíztisztítás területén végzett kutatások és fejlesztések elősegítése érdekében a tudományos közösségnek és az ipari szereplőknek szorosabb együttműködésre kell törekedniük, hogy minél több innovatív megoldás kerüljön megvalósításra. Ezzel a genetikai és biotechnológiai újítások gyorsabb bevezetése válhat lehetővé. A mikrobás szennyvíztisztítás

mellett új technológiák, mint például a nanotechnológia és a mesterséges intelligencia alkalmazása, forradalmasíthatják a szennyvíztisztítást. Az intelligens rendszerek segíthetnek a baktériumok optimális működésének figyelemmel kísérésében és a szennyvíztisztítás hatékonyságának javításában. A mikrobák által végzett szennyvízkezelés tehát nemcsak a vízminőség javításában, hanem a fenntartható vízgazdálkodásban is kulcsszerepet játszik. A jövőbeni kutatások és fejlesztések segíthetnek abban, hogy ezen technológiák még hatékonyabban és szélesebb körben alkalmazhatóak legyenek, ezáltal csökkentve a környezeti terhelést és elősegítve a fenntarthatóbb vízgazdálkodást.

7. Új tudományos eredmények

1. Sikertült olyan dúsítási körülményeket létrehozni, melyek alkalmasak voltak az általam használt közegből potenciálisan diklofenák, ibuprofen és karbamazepin biológiai bontására képes baktériumokat felszaporítani, beazonosítani és több esetben izolálni is. Eredményeim az *Environmental Science and Pollution Research* folyóiratban lettek közzölve (Pápai et al., 2023).
2. Meghatározásra kerültek a potenciálisan gyógyszerhatóanyagot bontó izolátumok, melyekből egy bakteriális konzorciumot hoztam létre. Ko-metabolikus szubsztrátok jelenlétében a kifejlesztett bakteriális konzorcium jó hatékonysággal bontotta a diklofenákot és az ibuprofent természetes vízmintában és szennyvíz effluensben egyaránt.
3. Sikertült egy ezidáig ismeretlen *Nocardioidea* nemzetségbe tartozó baktériumfajt izolálni. Az új faj leírásához szükséges nemzetközi előírások alapján végzett vizsgálatok eredményeként megállapítást nyert, hogy a karbamazepinnel módosított szelektív dúsító kultúrából származó, ibuprofén biodegradációjára képes baktériumtörzs egy új faj képviselője a *Nocardioidea* nemzetségen belül, amely a *N. carbamazepini* nevet kapta. Az eredmény a *Systematic and Applied Microbiology* szakfolyóiratban jelent meg (Benedek et al., 2022).
4. A *Stenotrophomonas humi* DIC_5 törzs esetén széleskörűen feltárásra került a diklofenák-bontó képessége, modern nagyműszeres analitikai módszerekkel. Emellett beazonosításra került a biodegradáció egyik köztes terméke, a nitro-diklofenák. Két ökotoxikológiai módszer alkalmazásával pedig megállapításra került, hogy a lebontás során keletkező anyagcseretermékek nem toxikusabbak, mint a kiinduló vegyület. A tudományos eredmény az *Applied Microbiology and Biotechnology* folyóiratban lett közzölve (Pápai et al., 2024).

8. Összegzés

A diklofenák, az ibuprofen és a karbamazepin az egyik leggyakoribb szennyező anyagok a felszíni vizekben, ahol a krónikus expozíciójuk jelentős káros hatásokkal bír az élő szervezetekre. A gyógyszerhatóanyagok természetes-, illetve szennyvízben lévő koncentrációjának a csökkentésére a biológiai és biotechnológiai megközelítéseken alapuló módszerek a legsokoldalúbb alternatívák, amelyek mikroorganizmusokat használnak a gyógyszermaradványok biodegradációjára. Eredményeim elmélyítik az alapvető ismereteket mind a gyógyszerhatóanyagok bakteriális lebontásáról, mind az új faj jelölt *Nocardioidea* sp. nov. CBZ_1 bakteriális törzsről, illetve a diklofenák biotranszformációja során keletkező metabolitról.

A dúsítások során feltárt bakteriális biofilmet túlnyomó részben Betaproteobaktériumok dominálták, amelyeket az Alpha-, Delta- és Gammaproteobaktériumok követtek. Nemzetség szinten a diklofenák és az ibuprofen lebontó dúsító tenyészetek esetén a *Pseudomonas* és *Methyloversatilis* nemzetségek képviselői domináltak. A karbamazepin dúsító tenyészetek az ibuprofen dúsító tenyészetekkel nemzetség szinten egyezést mutattak, ahol a *Pseudomonas*, a *Nocardioidea* és a *Rhodococcus* voltak a fő közösségalkotók.

A vizsgálatok alapján egy bakteriális törzsűjtemény jött létre, amelynek 31 tagja a fenti nemzetségeket képviselte, és mint potenciális gyógyszerhatóanyag-lebontó törzsek vizsgáltuk tovább őket. A rezazurinos előtesztelés és a bontási mérések eredményeként egy 4 izolátumból álló konzorcium jött létre, melynek tagjai *Stenotrophomonas humi* DIC_5; *Rhizobium daejeonense* IBU_18; *Nocardioidea carbamazepini* CBZ_1; *Brevundimonas mongoliensis* CBZ_3. Az együtttenyésztési vizsgálatok eredménye értelmében alkalmazható a 4 izolátum egyszere, mivel nincsenek egymásra növekedésgátló hatással. A konzorcium bontó képességének tesztelése a 3 gyógyszerhatóanyag esetében azt mutatta, hogy a diklofenákot és az ibuprofent minden esetben nagyobb hatékonysággal voltak képesek eliminálni plusz szénforrás jelenlétében, mint a karbamazepint. A konzorcium jelenlétét sikeresen nyomon lehetett követni a T-RFLP módszerrel.

A konzorcium egyik tagja, a *Nocardioidea* sp. CBZ_1^T új faj jelöltnek bizonyult. Minden kritériumnak megfelelt a fajleírás során és a *Nocardioidea carbamazepini* nevet kapta. A konzorcium másik tagjával, a *S. humi* DIC_5 baktériumtörzsszel végzett további vizsgálatok egy metabolit keletkezését bizonyították, méghozzá a nitro-diklofenákét. Az ökotoxikológiai vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a diklofenák biológiai lebontása során keletkező melléktermékek nem toxikusabbak a tesztorganizmusok számára, mint maga a

diklofenák. Az eredmények rávilágítanak, hogy összetett szennyvízkezelési módszerekre van szükség, amelyek figyelembe veszik a gyógyszer lebomlása során keletkező toxikus metabolitokat is. Ez áttörést hozhat a szennyvízkezelés területén, és hozzájárulhat a víz fenntarthatóságának biztosításához.

9. Summary

Diclofenac, ibuprofen, and carbamazepine are among the most common pollutants found in surface waters, where chronic exposure to them can have significant harmful effects on living organisms. Biologically and biotechnologically based methods that use microorganisms for the biodegradation of pharmaceutical residues are the most versatile alternatives for reducing the concentration of active pharmaceutical compounds in natural and wastewater. My findings deepen the basic understanding of both the bacterial degradation of pharmaceutical compounds and the newly identified *Nocardioides* sp. nov. CBZ_1 bacterial strain, as well as the metabolites produced during diclofenac biotransformation.

During the enrichment experiments, bacterial biofilms were predominantly dominated by Betaproteobacteria, followed by Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, and Gammaproteobacteria. At the genus level, in the diclofenac and ibuprofen-degrading enrichment cultures, the *Pseudomonas* and *Methyloversatilis* genera were dominant. In the carbamazepine-enriched cultures, there was a genus-level overlap with the ibuprofen-enriched cultures, where *Pseudomonas*, along with *Nocardioides* and *Rhodococcus*, were the main community members.

Based on the studies, a bacterial strain collection was established, consisting of 31 strains representing the above-mentioned genera, which were further investigated as potential pharmaceutical compound-degrading strains. Based on the results, a collection of 31 bacterial strains with potential for biological degradation of diclofenac, ibuprofen, and carbamazepine was established. Following pre-testing with resazurin and degradation measurements, a consortium of 4 isolates was formed, including *Stenotrophomonas humi* DIC_5, *Rhizobium daejeonense* IBU_18, *Nocardioides carbamazepini* CBZ_1, and *Brevundimonas mongoliensis* CBZ_3. Co-cultivation experiments indicated that the four isolates can be used together, as they do not exhibit any growth-inhibitory effects on each other. Testing the consortium's degradation capability for the three pharmaceutical compounds showed that diclofenac and ibuprofen were eliminated more efficiently in the presence of an additional carbon source than carbamazepine. The presence of the consortium was successfully tracked using the T-RFLP method.

One member of the consortium, *Nocardioides* sp. nov. CBZ_1T, was identified as a new species candidate. It met all the criteria during species description and was named *Nocardioides carbamazepini*. Further investigations with the other member of the consortium, *Stenotrophomonas humi* DIC_5, demonstrated the formation of a metabolite, specifically nitro-diclofenac. Ecotoxicological tests indicated that the by-products generated during diclofenac

biodegradation are not more toxic to the test organisms than diclofenac itself. These results highlight the need for complex wastewater treatment methods that also consider the toxic metabolites produced during the degradation of pharmaceuticals. This could lead to breakthroughs in wastewater treatment and contribute to ensuring water sustainability.

10. Irodalmi jegyzék

1. Abdulla, A., Adams, N., Bone, M., Elliott, AM., Gaffin, J., Jones, D. (2013) British Geriatric Society. Guidance on the management of pain in older people. *Age and Ageing*;42(Suppl 1), i1–57.
2. Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J. R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., & Barceló, D. (2015). Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment international*, 85, 327-333.
3. Aguilar-Romero, I., Romero, E., Wittich, R. M., & Van Dillewijn, P. (2020). Bacterial ecotoxicity and shifts in bacterial communities associated with the removal of ibuprofen, diclofenac and triclosan in biopurification systems. *Science of The Total Environment*, 741, 140461.
4. Aguilar-Romero, I., De la Torre-Zúñiga, J., Quesada, J. M., Haïdour, A., O’Connell, G., McAmmond, B. M., Van Hamme, J. D., Romero, E., Wittich, R-M., & Van Dillewijn, P. (2021). Effluent decontamination by the ibuprofen-mineralizing strain, *Sphingopyxis granuli* RW412: Metabolic processes. *Environmental Pollution*, 274, 116536.
5. Ahmad, A., Priyadarshini, M., Das, S., & Ghangrekar, M. M. (2022). Electrocoagulation as an efficacious technology for the treatment of wastewater containing active pharmaceutical compounds: A review. *Separation Science and Technology*, 57(8), 1234-1256.
6. Aib, H., Czegeny, I., Benhizia, R., & Czédli, H. M. (2024). Evaluating the Efficiency of Wastewater Treatment Plants in the Northern Hungarian Plains Using Physicochemical and Microbiological Parameters. *Water*, 16(24), 3590.
7. Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Harrouche, K., & Sghaier, H. (2017). Metabolic and co-metabolic transformation of diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 isolated from activated sludge. *Current microbiology*, 74(3), 381-388.
8. Ajibola, A. S., Adebisi, A. O., Nwaeke, D. O., Ajibola, F. O., & Adewuyi, G. O. (2021). Analysis, occurrence and ecological risk assessment of diclofenac and ibuprofen residues in wastewater from three wastewater treatment plants in south-western Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 25(3), 330-340.
9. Alam, R., Sheob, M., Saeed, B., Khan, S. U., Shirinkar, M., Frontistis, Z., Basheer, F., & Farooqi, I. H. (2021). Use of electrocoagulation for treatment of pharmaceutical compounds in water/wastewater: A review exploring opportunities and challenges. *Water*, 13(15), 2105.
10. Almeida, B., Kjeldal, H., Lolas, I., Knudsen, A. D., Carvalho, G., Nielsen, K. L., Barreto Crespo, M. T., Stensballe, A., & Nielsen, J. L. (2013). Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain I11. *Biodegradation*, 24, 615-630.
11. Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D., & Finn, R. D. (2019). A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*, 568(7753), 499-504.
12. Alneberg, J., Bjarnason, B. S., De Bruijn, I., Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U. Z., Lahti, L., Loman, N. J., Andersson, A. F., & Quince, C. (2014). Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature methods*, 11(11), 1144-1146.

13. Altman, R., Bosch, B., Brune, K., Patrignani, P., & Young, C. (2015). Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs*, 75, 859-877.
14. Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S. K., Anderson, J. L., Soudzilovskaia, N. A., Bodegom, P. M., Bengtsson-Palme, J., Anslan, S., Coelho, K. P., Harend, H., Huerta-Cepas, j., Medema, M. H., Maltz, M. R., Mundra, S., Olsson, P. A., Pent, M., Pölme, S., Sunagawa, S., Ryberg, M., Tedersoo, L., & Bork, P. (2018). Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, 560(7717), 233-237.
15. Balcom, I. N., Driscoll, H., Vincent, J., & Leduc, M. (2016). Metagenomic analysis of an ecological wastewater treatment plant's microbial communities and their potential to metabolize pharmaceuticals. *F1000Research*, 5.
16. Bartrons, M.; Peñuelas, J. (2017) Pharmaceuticals and Personal-Care Products in Plants. *Trends Plant Sci.*, 22, 194–203.
17. Bártíková, H., Podlipná, R., & Skálová, L. (2016). Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*, 144, 2290-2301.
18. Beek, T. a. d.; Weber, F.-A.; Bergmann, A.; Hickmann, S.; Ebert, I.; Hein, A.; Küster, A. (2016) Pharmaceuticals in the Environment- Global Occurrences and Perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* 2016, 35, 823–835
19. Benbadis, S. R., Stefan, H., Morita, D., Abou-Khalil, B., & Hogan, R. E. (2014). Pharmacologic decision-making in the treatment of focal epilepsy—a critical comparison of antiepileptic drugs. *US Neurology*, 10(2), 92.
20. Benedek T, Táncsics A, Szabó I, Farkas M, Szoboszlay S, Fábián K, Maróti G, Kriszt B (2016) Polyphasic analysis of an *Azoarcus Leptothrix*-dominated bacterial biofilm developed on stainless steel surface in a gasoline-contaminated hypoxic groundwater. *Environ Sci Poll Res* 23: 9019–9035
21. Benedek, T., Szentgyörgyi, F., Szabó, I., Kriszt, B., Révész, F., Radó, J., Maróti, G., & Táncsics, A. (2018). Aerobic and oxygen-limited enrichment of BTEX-degrading biofilm bacteria: dominance of *Malikia* versus *Acidovorax* species. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 32178-32195.
22. Benedek T, Szentgyörgyi F, Szabó I, Farkas M, Duran R, Kriszt B, Táncsics A. (2020) Aerobic and oxygen-limited naphthalene-amended enrichments induced the dominance of *Pseudomonas* spp. from a groundwater bacterial biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 6023-6043
23. Benedek, T., Szentgyörgyi, F., Gergőcs, V., Menashe, O., Gonzalez, P. A. F., Probst, A. J., Kriszt, B., & Táncsics, A. (2021). Potential of *Variovorax paradoxus* isolate BFB1_13 for bioremediation of BTEX contaminated sites. *AMB Express*, 11, 1-17.
24. Benedek, T., Pápai, M., Gharieb, K., Bedics, A., Táncsics, A., Tóth, E., Daood, H., Maróti, G., Wirth, R., Menashe, O., Bóka, K., & Kriszt, B. (2022). *Nocardioides carbamazepini* sp. nov., an ibuprofen degrader isolated from a biofilm bacterial community enriched on carbamazepine. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(4), 126339.

25. Bernot, M. J., Bernot, R. J., & Matthaei, C. D. (2019). Emerging organic contaminants (EOCs) in freshwaters in Dunedin, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 53(1), 3-14.
26. Bessa, V. S., Moreira, I. S., Tiritan, M. E., & Castro, P. M. L. (2017). Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 135-142.
27. Bessa, V. S., Moreira, I. S., Murgolo, S., Mascolo, G., & Castro, P. M. (2019). Carbamazepine is degraded by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Science of The Total Environment*, 690, 739-747.
28. Boisseaux P., Noury P., Thomas H., Garric J. (2017): Immune responses in the aquatic gastropod *Lymnaea stagnalis* under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 139, pp. 358-366
29. Bornemann, T. L., Esser, S. P., Stach, T. L., Burg, T., & Probst, A. J. (2020). uBin—a manual refining tool for metagenomic bins designed for educational purposes. *bioRxiv*, 2020-07.
30. Březinová, T. D., Vymazal, J., Koželuh, M., & Kule, L. (2018). Occurrence and removal of ibuprofen and its metabolites in full-scale constructed wetlands treating municipal wastewater. *Ecological Engineering*, 120, 1-5.
31. Carmona E, Andreu V, Picó Y (2014) Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *SciTotal Environ* 484: 53-63
32. Chavez, M. L., & DeKorte, C. J. (2003). Valdecoxib: a review. *Clinical therapeutics*, 25(3), 817-851.
33. Chen, H., Yang, H., Zhao, Y., Gu, X., & Martyniuk, C. J. (2020). Development and molecular investigation into the effects of carbamazepine exposure in the zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(23), 8882.
34. Chiron, S., Gomez, E., & Fenet, H. (2010). Nitration processes of acetaminophen in nitrifying activated sludge. *Environmental science & technology*, 44(1), 284-289.
35. Choi, K., Kim, Y., Park, J., Park, C. K., Kim, M., Kim, H. S., & Kim, P. (2008). Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Science of the total Environment*, 405(1-3), 120-128.
36. Chopra, S., & Kumar, D. (2020). Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation. *Heliyon*, 6(6).
37. Claus, D. (1992). A standardized Gram staining procedure. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 451-452.
38. Cui, C. Z., Hu, H. Y., Yu, Y. Q., & Yu, Y. (1992). Isolation of a bacterial strain capable of carbamazepine-degrading and biodegradation characteristics. *Microbiology*.
39. Cui, Y., Woo, S. G., Lee, J., Sinha, S., Kang, M. S., Jin, L., Kim, K. K., Park, J., Lee, M., & Lee, S. T. (2013). *Nocardioides daeguensis* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from activated sludge of an industrial wastewater treatment plant. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_10), 3727-3732.

40. Csenki, Z., Garai, E., Risa, A., Cserhádi, M., Bakos, K., Márton, D., Bokor, Z., kriszt, B., & Urbányi, B. (2019). Biological evaluation of microbial toxin degradation by microinjected zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, 227, 151-161.
41. Daou, C., Hamade, A., El Mouchtari, E. M., Rafqah, S., Píram, A., Wong-Wah-Chung, P., & Najjar, F. (2020). Zebrafish toxicity assessment of the photocatalysis-biodegradation of diclofenac using composites of TiO₂ and activated carbon from *Argania spinosa* tree nutshells and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 17258-17267.
42. Defra, U. (2007). Desk Based Review of Current Knowledge on Pharmaceuticals in Drinking Water and Estimation of Potential Levels. Department of Environment, Food, and Rural Affairs—Drinking Water Inspectorate, London, UK.
43. Deo, R. P. (2014). Pharmaceuticals in the surface water of the USA: a review. *Current environmental health Reports*, 1, 113-122.
44. Di Lorenzo, T., Cifoni, M., Baratti, M., Pieraccini, G., Di Marzio, W. D., & Galassi, D. M. P. (2021). Four scenarios of environmental risk of diclofenac in European groundwater ecosystems. *Environmental Pollution*, 287, 117315.
45. Di Nica, V., Villa, S., & Finizio, A. (2017). Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *Aliivibrio fischeri*: experimental results for single compounds and considerations of their mechanisms of action and potential acute effects on aquatic organisms. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(3), 807-814.
46. Domaradzka, D., Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., & Wojcieszynska, D. (2016). Toxicity of diclofenac and its biotransformation by *Raoultella* sp. DD4. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(5), 2211-2216.
47. Du, J., Mei, C. F., Ying, G. G., & Xu, M. Y. (2016). Toxicity thresholds for diclofenac, acetaminophen and ibuprofen in the water flea *Daphnia magna*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97, 84-90.
48. Duncan, J. S., Sander, J. W., Sisodiya, S. M., & Walker, M. C. (2006). Adult epilepsy. *The Lancet*, 367(9516), 1087-1100.
49. Ebele, A. J., Abdallah, M. A. E., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging contaminants*, 3(1), 1-16.
50. Eike D, Marcus R, Dirk J (2019) The database “Pharmaceuticals in the Environment” - Update and new analysis. Final Report. On behalf of the German Environment Agency. Umweltbundesamt, Wörlitzer Platz 1
51. Elliott, P. (1990). Action of antiepileptic and anaesthetic drugs on Na-and Ca-spikes in mammalian non-myelinated axons. *European journal of pharmacology*, 175(2), 155-163.
52. Evtushenko, L. I., & Ariskina, E. V. (2015). Nocardiodiaceae. *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*, 1-18.
53. Famaey, J. P., & Whitehouse, M. W. (1973). Interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and biological membranes—II: Swelling and membrane permeability changes induced in some immunocompetent cells by various non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology*, 22(21), 2707-2717.

54. Fortunato, M. S., Fuentes Abril, N. P., Martinefski, M., Trípodí, V., Papalia, M., Rádice, M., Gutkind, G., Gallego, A., & Korol, S. E. (2016). Aerobic degradation of ibuprofen in batch and continuous reactors by an indigenous bacterial community. *Environmental technology*, 37(20), 2617-2626.
55. Garcia-Segura, S., Nienhauser, A. B., Fajardo, A. S., Bansal, R., Conrad, C. L., Fortner, J. D., Marcos-Hernández, M., Rogers, T., Villagran, D., Wong, M. S., & Westerhoff, P. (2020). Disparities between experimental and environmental conditions: Research steps toward making electrochemical water treatment a reality. *Current Opinion in Electrochemistry*, 22, 9-16.
56. Gauthier, H., Yargeau, V., & Cooper, D. G. (2010). Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. *Science of the Total Environment*, 408(7), 1701-1706.
57. Gerencsérné B. R., Rácz G., Galambos I. (2015): Gyógyszermaradványok eltávolítása különböző típusú vizekből. In: Simon L., Vincze Gy. (szerk.): Szennyvizek és szennyvíziszapok hasznosítása a régió fenntartható mezőgazdaságáért. Nyíregyházi Főiskola, Nyíregyháza, 122 p., 21-33 p.
58. Gierbolini, J., Giarratano, M., & Benbadis, S. R. (2016). Carbamazepine-related antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy-a comparative review. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 17(7), 885-888.
59. Grenni, P., Ancona, V., Caracciolo, A. B. (2018) Ecological Effects of Antibiotics on Natural Ecosystems: A Review. *Microchem. J.* 2018, 136, 25–39.
60. Guerra, P., Kim, M., Shah, A., Alaei, M., & Smyth, S. A. (2014). Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*, 473, 235-243.
61. Hai, F. I., Yang, S., Asif, M. B., Sencadas, V., Shawkat, S., Sanderson-Smith, M., Gorman, J., Xu, Z. Q., & Yamamoto, K. (2018). Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in water: occurrences, toxicological effects, regulations and removal by wastewater treatment technologies. *Water*, 10(2), 107.
62. Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J. S., Zhang, X., & Giesy, J. P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocarpa*. *Aquatic toxicology*, 98(3), 256-264.
63. Hanif, H., Waseem, A., Kali, S., Qureshi, N. A., Majid, M., Iqbal, M., Ur-Rehman, T., Tahir, M., Yousaf, S., Iqbal, M. M., Khan, A. I., Zafar, M. I. (2020). Environmental risk assessment of diclofenac residues in surface waters and wastewater: a hidden global threat to aquatic ecosystem. *Environmental monitoring and assessment*, 192, 1-12.
64. Hansen, H. C. (1999). Treatment of chronic pain with antiepileptic drugs: a new era. *Southern medical journal*, 92(7), 642-649.
65. Hawkins, L. C., Edwards, J. N., & Dargan, P. I. (2007). Impact of restricting paracetamol pack sizes on paracetamol poisoning in the United Kingdom: a review of the literature. *Drug safety*, 30, 465-479.

66. Hemidouche, S., Favier, L., Amrane, A., Dabert, P., Le Roux, S., & Sadaoui, Z. (2018). Successful biodegradation of a refractory pharmaceutical compound by an indigenous phenol-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229, 1-16.
67. Heylen, K., Vanparys, B., Peirsegaie, F., Lebbe, L., & De Vos, P. (2007). *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(9), 2056-2061.
68. Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D. R., & Hitzfeld, B. (2005). Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic toxicology*, 75(1), 53-64.
69. Hong, H. B., Nam, I. H., Murugesan, K., Kim, Y. M., & Chang, Y. S. (2004). Biodegradation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and chlorodibenzo-p-dioxins by *Pseudomonas veronii* PH-03. *Biodegradation*, 15, 303-313.
70. Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., & Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome research*, 17(3), 377-386.
71. Hussain, S., Naeem, M., & Chaudhry, M. N. (2016). Estimation of residual antibiotics in pharmaceutical effluents and their fate in affected areas. *Pol. J. Environ. Stud*, 25(2), 607.
72. Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11, 1-11.
73. IQVIA – Institute for Human Data Science (2019) The global use of medicine in 2019 and outlook to 2023. <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/the-global-use-of-medicine-in-2019-and-outlook-to-2023> accessed 08.04.2021
74. Ivshina, I. B., Tyumina, E. A., Kuzmina, M. V., & Vikhareva, E. V. (2019). Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Scientific reports*, 9(1), 9159.
75. Jakab, G., Szalai, Z., Michalkó, G., Ringer, M., Filep, T., Szabó, L., Maász, G., Pinger, Zs., Ferincz, Á., Staszny, Á., Dobosy, P., & Kondor, A. C. (2020). Thermal baths as sources of pharmaceutical and illicit drug contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 399-410.
76. Jan-Roblero, J., & Cruz-Maya, J. A. (2023). Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. *Molecules*, 28(5), 2097.
77. Jiang, B., Li, A., Cui, D., Cai, R., Ma, F., & Wang, Y. (2014). Biodegradation and metabolic pathway of sulfamethoxazole by *Pseudomonas psychrophila* HA-4, a newly isolated cold-adapted sulfamethoxazole-degrading bacterium. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 4671-4681.
78. Johansen, J. R., & Casamatta, D. A. (2005). Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algological studies*, 117(1), 71-93.
79. József, T., Kiss, S. R., Muzslay, F., Máté, O., Stromájer, G. P., & Stromájer-Rácz, T. (2023). Detection and quantification of pharmaceutical residues in the Pest County section of the River Danube. *Water*, 15(9), 1755.

80. Kang, D. D., Froula, J., Egan, R., & Wang, Z. (2015). MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ*, 3, e1165.
81. Kantor, R. S., van Zyl, A. W., van Hille, R. P., Thomas, B. C., Harrison, S. T., & Banfield, J. F. (2015). Bioreactor microbial ecosystems for thiocyanate and cyanide degradation unravelled with genome-resolved metagenomics. *Environmental microbiology*, 17(12), 4929-4941.
82. Kay, P., Hughes, S. R., Ault, J. R., Ashcroft, A. E., & Brown, L. E. (2017). Widespread, routine occurrence of pharmaceuticals in sewage effluent, combined sewer overflows and receiving waters. *Environmental Pollution*, 220, 1447-1455.
83. Kayani, M. A., Parry, J. M., Vickery, S., & Dodds, P. F. (2009). In vitro genotoxic assessment of xenobiotic diacylglycerols in an in vitro micronucleus assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 50(4), 277-284.
84. Khan, A. H., Aziz H. A., Khan, N. A., Hasan, M.A., Ahmed, S., Farooqi, I. H., Dhingra, A., Vambol, V., Changani, F., Yousefi, M., Islam, S., Mozaffari, N., Mahtab, M. S. (2022b) Impact, disease outbreak and the eco-hazards associated with pharmaceutical residues: a Critical Review. *Int J Environ Sci Technol* 19: 677-688
85. Khan, A. H., Khan, N. A., Zubai, M., Shaida, M. A., Manzar, M. S., Abutaleb, A., Naushad, M., Iqbal, J. (2022a) Sustainable green nanoadsorbents for remediation of pharmaceuticals from water and wastewater: A critical review. *Environ Res* 204: 112243
86. Khan, H. K., Rehman, M. Y. A., & Malik, R. N. (2020). Fate and toxicity of pharmaceuticals in water environment: An insight on their occurrence in South Asia. *Journal of environmental management*, 271, 111030.
87. Kim, K.-R.; Owens, G.; Kwon, S.-I.; So, K.-H.; Lee, D.-B.; Ok, Y. S. (2011) Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water, Air, Soil Pollut.*, 214, 163–174.
88. Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_2), 346-351.
89. Kim, K. Y., Lai, F. Y., Kim, H. Y., Thai, P. K., Mueller, J. F., Oh, J. E. (2015) The first application of wastewater-based drug epidemiology in five South Korean cities. *Sci Total Environ* 524: 440–446
90. Kleemiss, F., Justies, A., Duvinage, D., Watermann, P., Ehrke, E., Sugimoto, K., Fugel, M., Malaspina, L. A., Dittmer, A., Kleemiss, T., Puylaert, P., King, N. R., Staubitz, A., Tzschentke, T. M., Dringen, R., Grabowsky, S., & Beckmann, J. (2020). Sila-ibuprofen. *Journal of medicinal chemistry*, 63(21), 12614-12622.
91. Kleywegt, S., Payne, M., Ng, F., & Fletcher, T. (2019). Environmental loadings of active pharmaceutical ingredients from manufacturing facilities in Canada. *Science of the Total Environment*, 646, 257-264.

92. Kostich, M. S., Batt, A.L., Lazorchak, J. M. (2014) Concentrations of prioritized pharmaceuticals in effluents from 50 large wastewater treatment plants in the US and implications for risk estimation. *Environ Pollut* 184: 354-359
93. Kristensen, D. M., Desdoits-Lethimonier, C., Mackey, A. L., Dalgaard, M. D., De Masi, F., Munkbøl, C. H., Styrihave, B., Antignac, J. P., Bizec, B. L., Platel, C., Schmidt, A. H., Jensen, T. K., Lesné, L., Guittot, S. M., Kristiansen, K., Brunak, S., Kjaer, M., Juul, A., & Jégou, B. (2018). Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(4), E715-E724.
94. Kunkel, U., & Radke, M. (2012). Fate of pharmaceuticals in rivers: deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water research*, 46(17), 5551-5565.
95. Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J., & Devine, T. E. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 358-361.
96. Küster A, Adler N (2014) Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369: 20130587
97. Lacina, P., Mravcová, L., & Vávrová, M. (2013). Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection for the analysis of selected drug residues in wastewater and surface water. *Journal of Environmental Sciences*, 25(1), 204-212.
98. Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
99. Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357-359.
100. Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E., Ward, R. S. (2012) Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ Pollut* 163: 287-303
101. Larsson, D. J., de Pedro, C., & Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials*, 148(3), 751-755.
102. Le-Minh, N., Khan, S. J., Drewes, J. E., & Stuetz, R. M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water research*, 44(15), 4295-4323.
103. Li, A., Cai, R., Cui, D., Qiu, T., Pang, C., Yang, J., Ma, F., & Ren, N. (2013). Characterization and biodegradation kinetics of a new cold-adapted carbamazepine-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. CBZ-4. *Journal of Environmental Sciences*, 25(11), 2281-2290.
104. Li, D., Liu, C. M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T. W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 31, 1674–1676.
105. Liang, R., Hu, A., Hatat-Fraile, M., & Zhou, N. (2014). Fundamentals on adsorption, membrane filtration, and advanced oxidation processes for water treatment. *Nanotechnology for Water Treatment and Purification*, 1-45.

106. Liang, D. H., Hu, Y., Cheng, J., & Chen, Y. (2021). Enhanced performance of sulfamethoxazole degradation using *Achromobacter* sp. JL9 with in-situ generated biogenic manganese oxides. *Bioresource Technology*, 333, 125089.
107. Lindim, C., van Gils, J., Cousins, I. T., Kühne, R., Georgieva, D., Kutsarova, S., & Mekenyan, O. (2017). Model-predicted occurrence of multiple pharmaceuticals in Swedish surface waters and their flushing to the Baltic Sea. *Environmental Pollution*, 223, 595-604.
108. Liu, L., Wong, M. H. (2013) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environ Inter* 59: 208-224
109. Liu, Q., Wang, L., Xu, X., Yan, S., Zha, J., Wang, D., & Zhu, D. (2023). Antiepileptic drugs in aquatic environments: Occurrence, toxicity, transformation mechanisms and fate. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-25.
110. Lonappan, L., Brar, S. K., Das, R. K., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity-a review. *Environment International*, 96, 127-138.
111. Loos, R., Carvalho, R., António, D. C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R. H., Schwesig, D., Gawlik, B. M. (2013) EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res* 47: 6475-6487
112. Löscher, W., Potschka, H., Sisodiya, S. M., & Vezzani, A. (2020). Drug resistance in epilepsy: clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options. *Pharmacological reviews*, 72(3), 606-638.
113. Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Liang, S., & Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the total environment*, 473, 619-641.
114. Maan, J. S., & Saadabadi, A. (2021). Carbamazepine. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
115. Machado, G. C., Maher, C. G., Ferreira, P. H., Day, R. O., Pinheiro, M. B., & Ferreira, M. L. (2017). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for spinal pain: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases*, 76(7), 1269-1278.
116. Manford, M. (2017). Recent advances in epilepsy. *Journal of neurology*, 264(8), 1811-1824.
117. Mansour, D., Fourcade, F., Soutrel, I., Hauchard, D., Bellakhal, N., & Amrane, A. (2015). Mineralization of synthetic and industrial pharmaceutical effluent containing trimethoprim by combining electro-Fenton and activated sludge treatment. *Journal of the Taiwan institute of chemical engineers*, 53, 58-67.
118. Marchlewicz, A., Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., & Wojcieszynska, D. (2023). Evaluation of the Defined Bacterial Consortium Efficacy in the Biodegradation of NSAIDs. *Molecules*, 28(5), 2185.

119. McGettigan, P., Henry, D. (2013). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. *PLoS medicine*, 10(2), e1001388.
120. Mehinto A. C., Hill E. M., Tyler C. R. (2010): Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.*, v. 44, 2176-2182.
121. Metcalfe, C. D., Koenig, B. G., Bennie, D. T., Servos, M., Ternes, T. A., & Hirsch, R. (2003). Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(12), 2872-2880.
122. Meyer, W., Reich, M., Beier, S., Behrendt, J., Gulyas, H., & Otterpohl, R. (2016). Measured and predicted environmental concentrations of carbamazepine, diclofenac, and metoprolol in small and medium rivers in northern Germany. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-16.
123. Mhuka, V., Dube, S., & Nindi, M. M. (2020). Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in wastewater and receiving waters in South Africa using LC-Orbitrap™ MS. *Emerging Contaminants*, 6, 250-258.
124. Mikulic, M. (2023) Pharmaceutical market: worldwide revenue 2001-2022.
125. Miller, L. T. (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of clinical microbiology*, 16(3), 584-586.
126. Miller, T. H.; Bury, N. R.; Owen, S. F.; MacRae, J. I.; Barron, L. P. A (2018) Review of the Pharmaceutical Exposome in Aquatic Fauna. *Environ. Pollut.*, 239, 129–146.
127. Mo, W. Y., Chen, Z., Leung, H. M., & Leung, A. O. W. (2017). Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 8978-8989.
128. Mollah, M. Y., Morkovsky, P., Gomes, J. A., Kesmez, M., Parga, J., & Cocke, D. L. (2004). Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation. *Journal of hazardous materials*, 114(1-3), 199-210.
129. Moreira, I. S., Bessa, V. S., Murgolo, S., Piccirillo, C., Mascolo, G., & Castro, P. M. (2018). Biodegradation of diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 152, 104-113.
130. Murdoch, R. W., & Hay, A. G. (2015). The biotransformation of ibuprofen to trihydroxyibuprofen in activated sludge and by *Variovorax* Ibu-1. *Biodegradation*, 26, 105-113.
131. Nam, I. H., Chang, Y. S., Hong, H. B., & Lee, Y. E. (2003). A novel catabolic activity of *Pseudomonas veronii* in biotransformation of pentachlorophenol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 284-290.
132. Nassef, M., Matsumoto, S., Seki, M., Khalil, F., Kang, I. J., Shimasaki, Y., Oshima, Y., & Honjo, T. (2010). Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 80(9), 1095-1100.

133. Navrozidou, E., Remmas, N., Melidis, P., Karpouzas, D. G., Tsiamis, G., & Ntougias, S. (2019). Biodegradation potential and diversity of diclofenac-degrading microbiota in an immobilized cell biofilter. *Processes*, 7(9), 554.
134. Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research*, 27(5), 824-834.
135. Oldenkamp, R., Beusen, A. H., & Huijbregts, M. A. (2019). Aquatic risks from human pharmaceuticals—modelling temporal trends of carbamazepine and ciprofloxacin at the global scale. *Environmental Research Letters*, 14(3), 034003.
136. Olvera-Vargas, H., Gore-Datar, N., Garcia-Rodriguez, O., Mutnuri, S., & Lefebvre, O. (2021). Electro-Fenton treatment of real pharmaceutical wastewater paired with a BDD anode: reaction mechanisms and respective contribution of homogeneous and heterogeneous OH. *Chemical Engineering Journal*, 404, 126524.
137. Oropesa A. L., Floro A. M., Palma P. (2016): Assessment of the effects of the carbamazepine on the endogenous endocrine system of *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research* volume 23, pages 17311–17321.
138. Palyzová, A., Zahradník, J., Marešová, H., & Řezanka, T. (2019). Characterization of the catabolic pathway of diclofenac in *Raoultella* sp. KDF8. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 137, 88-94.
139. Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), 1043-1055.
140. Parolini, M., Binelli, A., & Provini, A. (2011). Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6), 1586-1594.
141. Parolini, M., Pedriali, A., & Binelli, A. (2013). Application of a biomarker response index for ranking the toxicity of five pharmaceutical and personal care products (PPCPs) to the bivalve *Dreissena polymorpha*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 64, 439-447.
142. 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.
143. Pasolli, E., Asnicar, F., Manara, S., Zolfo, M., Karcher, N., Armanini, F., Beghini, F., Manghi, P., Tett, A., Ghensi, P., Collado, M. C., Rice, B. L., Long, C. D., Morgan, X. C., Golden, C. D., Quince, C., Huttenhower, C., & Segata, N. (2019). Extensive unexplored human microbiome diversity revealed by over 150,000 genomes from metagenomes spanning age, geography, and lifestyle. *Cell*, 176(3), 649-662.
144. Patsalos, P. N., Berry, D. J., Bourgeois, B. F., Cloyd, J. C., Glauser, T. A., Johannessen, S. I., Leppik, I. E., Tomson, T., Perucca, E. (2008). Antiepileptic drugs--best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2008 Jul;49(7):1239-76

145. Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U., Mohan, D. (2019) Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chem Rev* 119: 3510-3673
146. Pápai, M., Benedek, T., Táncsics, A., Bornemann, T. L., Plewka, J., Probst, A. J., Hussein, D., Maróti, G., Menashe, O., Kriszt, B. (2023). Selective enrichment, identification, and isolation of diclofenac, ibuprofen, and carbamazepine degrading bacteria from a groundwater biofilm. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(15), 44518-44535.
147. Pápai, M., Benedek, T., Sörös, C., Háhn, J., Csenki, Z., Bock, I., Táncsics, A., Kriszt, B. (2024). Biotransformation of diclofenac by *Stenotrophomonas humi* strain DIC_5 and toxicological examination of the resulting metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 485.
148. Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water research*, 72, 3-27.
149. Phillips, P. J., Smith, S. G., Kolpin, D. W., Zaugg, S. D., Buxton, H. T., Furlong, E. T., Esposito, K., & Stinson, B. (2010). Pharmaceutical formulation facilities as sources of opioids and other pharmaceuticals to wastewater treatment plant effluents. *Environmental science & technology*, 44(13), 4910-4916.
150. Popa, C., Favier, L., Dinica, R., Semrany, S., Djelal, H., Amrane, A., & Bahrim, G. (2014). Potential of newly isolated wild *Streptomyces* strains as agents for the biodegradation of a recalcitrant pharmaceutical, carbamazepine. *Environmental technology*, 35(24), 3082-3091.
151. Posselt, M., Mechelke, J., Rutere, C., Coll, C., Jaeger, A., Raza, M., Meinikmann, k., Krause, S., Sobek, A., Lewandowski, J., Horn, M. A., Hollender, J., & Benskin, J. P. (2020). Bacterial diversity controls transformation of wastewater-derived organic contaminants in river-simulating flumes. *Environmental science & technology*, 54(9), 5467-5479.
152. Praskova, E., Voslarova, E., Siroka, Z., Plhalova, L., Macova, S., Marsalek, P., Pistekova, V., & Svobodova, Z. (2011). Assessment of diclofenac LC50 reference values in juvenile and embryonic stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(4), 545–549.
153. Ramaswamy, B. R., Shanmugam, G., Velu, G., Rengarajan, B., & Larsson, D. J. (2011). GC–MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. *Journal of hazardous materials*, 186(2-3), 1586-1593.
154. Rashid, R., Shafiq, I., Akhter, P., Iqbal, M. J., & Hussain, M. (2021). A state-of-the-art review on wastewater treatment techniques: the effectiveness of adsorption method. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 9050-9066.
155. Rastogi, A., Tiwari, M. K., & Ghangrekar, M. M. (2021). A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *Journal of Environmental Management*, 300, 113694.
156. Riaz, L.; Mahmood, T.; Khalid, A.; Rashid, A.; Siddique, M. B. A.; Kamal, A.; Coyne, M. S. (2018). Fluoroquinolones (Fqs) in the Environment: A Review on Their Abundance, Sorption and Toxicity in Soil. *Chemosphere*, 191, 704–720.

157. Roh, S. G., Lee, C., Kim, M. K., Kang, H. J., Kim, Y. S., Kim, M. J., Malik, A., & Kim, S. B. (2020). *Nocardioides euryhalodurans* sp. nov., *Nocardioides seonyuensis* sp. nov. and *Nocardioides eburneiflavus* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2682-2689.
158. Rosman, N., Salleh, W. N. W., Mohamed, M. A., Jaafar, J., Ismail, A. F., & Harun, Z. (2018). Hybrid membrane filtration-advanced oxidation processes for removal of pharmaceutical residue. *Journal of colloid and interface science*, 532, 236-260.
159. Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 209-216.
160. Rutere, C., Knoop, K., Posselt, M., Ho, A., & Horn, M. A. (2020). Ibuprofen degradation and associated bacterial communities in hyporheic zone sediments. *Microorganisms*, 8(8), 1245.
161. Ryan R. P., Monchy, S. Cardinale M., Taghavi S., Crossman L., Avison M. B., Berg G., Lelie D., & Dow J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7, pages 514–525.
162. Salahinejad, A., Meuthen, D., Attaran, A., Chivers, D. P., & Ferrari, M. C. (2023). Effects of common antiepileptic drugs on teleost fishes. *Science of The Total Environment*, 866, 161324.
163. Sathya, R., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Vijayaraghavan, P., Ilavenil, S., & Rejiniemon, T. S. (2023). Towards sustainable wastewater treatment by biological methods—A challenges and advantages of recent technologies. *Urban Climate*, 47, 101378.
164. Schumann, P. (2011). Peptidoglycan structure. In *Methods in microbiology* (Vol. 38, pp. 101-129). Academic Press.
165. Seth, E. C., & Taga, M. E. (2014). Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Frontiers in microbiology*, 5, 350.
166. Sharma, K., Kaushik, G., Thotakura, N., Raza, K., Sharma, N., & Nimesh, S. (2019). Fate of ibuprofen under optimized batch biodegradation experiments using *Micrococcus yunnanensis* isolated from pharmaceutical sludge. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 8315-8328.
167. Silori, R., Shrivastava, V., Singh, A., Sharma, P., Aouad, M., Mahlknecht, J., & Kumar, M. (2022). Global groundwater vulnerability for Pharmaceutical and Personal care products (PPCPs): The scenario of second decade of 21st century. *Journal of Environmental Management*, 320, 115703.
168. Skaistė K., Gintautas G., Aušra V., Arūnas S., Kęstutis P., Edmundas K. (2018): Impact of the World Health Organization Pain Treatment Guidelines and the European Medicines Agency Safety Recommendations on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use in Lithuania: An Observational Study. *Medicina*, 54(2), 30p.
169. Song, W. Z., & Thomas, T. (2017). Binning_refiner: improving genome bins through the combination of different binning programs. *Bioinformatics*, 33(12), 1873-1875.
170. Suarez, S., Lema, J. M., & Omil, F. (2009). Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation. *Bioresource technology*, 100(7), 2138-2146.

171. Sütő G., (2019): Nemszteroid gyulladáscsökkentő szerek a mozgásszervi fájdalom csillapításában. *Orvosi Hetilap*, 160(22): 855–8860.
172. Swan G. E., Cuthbert R., Quevedo M., Green R. E., Pain D. J., Bartels P., Cunningham A. A., Duncan N., Meharg A. A., Oaks J. L., Parry-Jones J., Shultz S., Taggart M. A., Verdoorn G., Wolter K. (2006): Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biology letters* (2), 279–282, doi:10.1098/rsbl.2005.0425.
173. Szoboszlay, S., Atzel, B., Kukolya, J., Toth, E.M., Marialigeti, K., Schumann, P., Kriszt, B. (2008). *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12): 2748–2754.
174. Thaker P. D. (2005). Pharmaceutical data elude researchers. *Environment Science & Technology*, 39(9):193A-194A.
175. Tian Y., Xia X., Wang J., Zhu L., Wang J., Zhang F., Ahmad F. (2019). Chronic Toxicological Effects of Carbamazepine on *Daphnia magna* Straus: Effects on Reproduction Traits, Body Length, and Intrinsic Growth. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* volume 103, pages723–728.
176. Tiwari B., Sellamuthu B., Ouarda Y., Drogui P., Tyagi R. D., Buelna G. (2017). Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresource Technology*, Volume 224, Pages 1-12.
177. Tiwari, B., Sellamuthu, B., Piché-Choquette, S., Drogui, P., Tyagi, R. D., Vaudreuil, M. A., Sauvé, S., Buelna, G., & Dubé, R. (2019). The bacterial community structure of submerged membrane bioreactor treating synthetic hospital wastewater. *Bioresource technology*, 286, 121362.
178. Tizzard, A. C., Bergsma, J. H., & Lloyd-Jones, G. (2006). A resazurin-based biosensor for organic pollutants. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5), 759-763.
179. Tardy, G. M., Bakos, V., & Jobbágy, A. (2012). Conditions and technologies of biological wastewater treatment in Hungary. *Water Science and Technology*, 65(9), 1676-1683.
180. Trelu, C., Coetsier, C., Rouch, J. C., Esmilaire, R., Rivallin, M., Cretin, M., & Causserand, C. (2018). Mineralization of organic pollutants by anodic oxidation using reactive electrochemical membrane synthesized from carbothermal reduction of TiO₂. *Water research*, 131, 310-319.
181. Tserendorj, D., Illés, Á., Károly, Á., Stadler-Szalai, R., Sandil, S., Mireisz, T., Dobosy, P., Baranya, S., Adányi, M., & Zárny, G. (2024). Microfiber emission from a municipal wastewater treatment plant in Hungary. *Scientific Reports*, 14(1), 12041.
182. Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338.
183. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, Laxminarayan R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 14:742–750.
184. Velusamy, K., Periyasamy, S., Kumar, P. S., Jayaraj, T., Gokulakrishnan, M., & Keerthana, P. (2022). Transformation of aqueous methyl orange to green metabolites using bacterial

strains isolated from textile industry effluent. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102126.

185. Vesilind, P. (Ed.). (2003). *Wastewater treatment plant design* (Vol. 2). IWA publishing.
186. Vyas, A., Purohit, A., & Ram, H. (2019). Assessment of dose-dependent reproductive toxicity of diclofenac sodium in male rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(5), 478-486.
187. Wahbi, A. A., Hassan, E., Hamdy, D., Khamis, E., & Barary, M. (2005). Spectrophotometric methods for the determination of Ibuprofen in tablets. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 18(4), 1-6.
188. Walker, C. W., Watson, J. E., & Williams, C. (2012). Occurrence of carbamazepine in soils under different land uses receiving wastewater. *Journal of environmental quality*, 41(4), 1263-1267.
189. Wang, L., Peng, Y., Nie, X., Pan, B., Ku, P., & Bao, S. (2016). Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 179, 49-56.
190. Wang, Z., Wang, Z., Lu, Y. Y., Sun, F., & Zhu, S. (2019). SolidBin: improving metagenome binning with semi-supervised normalized cut. *Bioinformatics*, 35(21), 4229-4238.
191. Wang, J., Yao, J., Wang, L., Xue, Q., Hu, Z., & Pan, B. (2020). Multivariate optimization of the pulse electrochemical oxidation for treating recalcitrant dye wastewater. *Separation and Purification Technology*, 230, 115851.
192. Wang, L., Gu, W., Liu, Y., Liang, P., Zhang, X., & Huang, X. (2022). Challenges, solutions and prospects of mainstream anammox-based process for municipal wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 820, 153351.
193. Wongrakpanich, S., Wongrakpanich, A., Melhado, K., & Rangaswami, J. (2018). A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. *Aging and disease*, 9(1), 143.
194. Wu, X.; Dodgen, L. K.; Conkle, J. L.; Gan, J. (2015) Plant Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products from Recycled Water and Biosolids: A Review. *Sci. Total Environ.*, 536, 655–666.
195. Wu, Y. W., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2016). MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 32(4), 605-607.
196. Yoon, J. H., Cho, Y. G., Lee, S. T., Suzuki, K. I., Nakase, T., & Park, Y. H. (1999). *Nocardioides nitrophenolicus* sp. nov., ap-nitrophenol-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 675-680.
197. Yoon, J. H., Lee, J. K., Jung, S. Y., Kim, J. A., Kim, H. K., & Oh, T. K. (2006). *Nocardioides kongjuensis* sp. nov., an N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(8), 1783-1787.
198. Zhang, Y., Geißen, S. U., & Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161.
199. Zhou, N. A., Lutovsky, A. C., Andaker, G. L., Gough, H. L., & Ferguson, J. F. (2013). Cultivation and characterization of bacterial isolates capable of degrading pharmaceutical and

personal care products for improved removal in activated sludge wastewater treatment. *Biodegradation*, 24, 813-827.

200. Zou, H., Lu, X., & Abualhail, S. (2014). Characterization of denitrifying phosphorus removal microorganisms in a novel two-sludge process by combining chemical with microbial analysis. *Journal of Chemistry*, 2014.
201. Żur, J., Marchlewicz, A., Piński, A., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2021). Degradation of diclofenac by new bacterial strains and its influence on the physiological status of cells. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 124000.

Internetes hivatkozások

http 1: <https://www.genome.jp/entry/D07816>

http 2: <https://www.genome.jp/entry/D00126>

http 3: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?D00252

http 4: <https://clincalc.com/DrugStats/Top300Drugs.aspx>

11. Mellékletek

- 1. melléklet** A minták filogenetikai diverzitásának meghatározásához használt baktériumokkal kapcsolatos metagenom szekvencia leolvasások száma

Minta megnevezése	Minta típusa	bps száma	Szekvencia leolvasási (SRA) számok
BF	Kiindulási Biofilm	1 266 554	SRR17027096
D_1	DIC 1. hónap	2 316 533	SRR17049155
I_1	IBU 1. hónap	1 940 477	SRR17049152
C_1	CBZ 1. hónap	1 762 731	SRR17049149
D_2	DIC 2. hónap	2 308 433	SRR17049154
I_2	IBU 2. hónap	2 121 575	SRR17049151
C_2	CBZ 2. hónap	2 293 835	SRR17049148
D_3	DIC 3. hónap	2 356 073	SRR17049153
I_3	IBU 3. hónap	2 091 048	SRR17049150
C_3	CBZ 3. hónap	2 183 933	SRR17049147

- 2. melléklet** Potenciális gyógyszerhatóanyag biodegradációs képességgel bíró baktérium nemzetségek, amelyek a dúsítás 3. hónapjának végére a legmagasabb százalékos relatív abundancia növekedést mutatták a nemzetség százalékos relatív abundanciájához képest a kezdeti biofilm baktériumközösségben

Nemzetség	Százalékos relatív abundancia növekedése a dúsítás 3. hónapjának végére (-szeres növekedés) *		
	DIC	IBU	CBZ
<i>Achromobacter</i>			135
<i>Ferrovibrio</i>	1005		
<i>Hydrocarboniphaga</i>	957		
<i>Methylibium</i>		314	
<i>Pimelobacter</i>		997	2692
<i>Prosthecobacter</i>	226		
<i>Pseudonocardia</i>			505
<i>Sphingopyxis</i>	628		435
<i>Zavarzinia</i>	811		
<i>Afipia</i>	184		
<i>Rhodanobacter</i>	130		
<i>Starkeya</i>		1002	
<i>Rhodococcus</i>		93	220
<i>bacterium</i> SCN 62-11		350	

*minimum 50-szeres relatív abundancia növekedés felett kerültek be a törzsek a táblázatba

3. melléklet Az 1., 2. és 3. hónapos DIC, IBU és CBZ dúsítókból nyert izolált törzsek taxonómiai hovatartozása

Izolátumok neve	Legközelebbi rokon törzsek 16S rRNS gén alapján	Filogenetikai hovatartozás	bp	16S rRNA gén szekvencia hasonlóság (%)	16S rRNA gén szekvencia szám	Dúsító
DIC_1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	Gammaproteobacteria	1434	99.23	OM818629	DIC, 1. hónap
DIC_5	<i>Stenotrophomonas humi</i> DSM 18929 ^T	Gammaproteobacteria	1444	99.58	OM818630	
DIC_8	<i>Pseudomonas kribbensis</i> 46-2 ^T	Gammaproteobacteria	1443	99.51	OM818631	
DIC_11	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 ^T	Bacilli	1460	99.72	OM818632	DIC, 2. hónap
DIC_12	<i>Methyloversatilis discipulorum</i> FAM1 ^T	Betaproteobacteria	1436	100.0	OM818633	
DIC_14	<i>Rhizobium daejeonense</i> KCTC 12121 ^T	Alphaproteobacteria	1396	99.35	OM818634	
DIC_15	<i>Rhizobium daejeonense</i> KCTC 12121 ^T	Alphaproteobacteria	1387	99.13	OM818635	
DIC_16/A	<i>Rhizobium daejeonense</i> KCTC 12121 ^T	Alphaproteobacteria	1385	99.13	OM818636	DIC, 3. hónap
DIC_17	<i>Pseudomonas kribbensis</i> 46-2 ^T	Gammaproteobacteria	1434	99.44	OM818637	
DIC_18	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	Gammaproteobacteria	1436	99.02	OM818638	
IBU_1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	Betaproteobacteria	1435	99.23	OM818639	IBU, 1. hónap
IBU_2	<i>Ancylobacter defluvii</i> SK15 ^T	Actinobacteria	1381	97.88	OM818640	
IBU_4	<i>Methyloversatilis discipulorum</i> FAM1 ^T	Betaproteobacteria	1427	99.86	OM818641	
IBU_9	<i>Pseudomonas kribbensis</i> 46-2 ^T	Gammaproteobacteria	1419	99.42	OM892062	
IBU_12	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM11331 ^T	Gammaproteobacteria	1437	99.86	OM818642	
IBU_13	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	Gammaproteobacteria	1449	99.93	OM818643	IBU, 2. hónap
IBU_14	<i>Rhizobium daejeonense</i> KCTC 12121 ^T	Alphaproteobacteria	1385	99.35	OM818644	
IBU_17	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	Gammaproteobacteria	1440	99.23	OM818645	IBU, 3. hónap
IBU_18	<i>Rhizobium daejeonense</i> KCTC 12121 ^T	Alphaproteobacteria	1395	99.05	OM818646	
CBZ_1*	<i>Nocardioides carbamazepini</i> CBZ_1 ^T	Actinobacteria	1411	100	OM818617	CBZ, 1. hónap
CBZ_2	<i>Nocardioides carbamazepini</i> CBZ_1 ^T	Actinobacteria	1415	100	OM818618	
CBZ_3	<i>Brevundimonas mongoliensis</i> R-10-10 ^T	Alphaproteobacteri	1368	99.11	OM818619	
CBZ_4	<i>Pseudomonas kribbensis</i> 46-2 ^T	Gammaproteobacteria	1376	99.64	OM818620	
CBZ_6	<i>Rhodococcus qingshengii</i> JCM 15477 ^T	Actinobacteria	1399	100.0	OM818621	
CBZ_7	<i>Pseudomonas moorei</i> RW10 ^T	Gammaproteobacteria	1387	99.19	OM818622	
CBZ_8	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM11331 ^T	Gammaproteobacteria	1426	99.58	OM818623	

CBZ_9	<i>Variovorax paradoxus</i> NBRC 15149 ^T	Betaproteobacteria	1442	99.23	OM818624	
CBZ_10	<i>Variovorax paradoxus</i> NBRC 15149 ^T	Betaproteobacteria	1430	99.23	OM818625	CBZ, 2. hónap
CBZ_11	<i>Methyloversatilis discipulorum</i> FAM1 ^T	Betaproteobacteria	1301	100.0	OM818626	
CBZ_13	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	Gammaproteobacteria	1425	99.13	OM818627	CBZ, 3. hónap
CBZ_16	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	Bacilli	1449	99.79	OM818628	

4. melléklet A resazurin vizsgálat eredményei, potenciális gyógyszerhatóanyag lebontó baktériumok kiválasztása HPLC elemzéshez

Tesztelt Izolátumok	A minták abszorbananciája 610 nm ± STD			
	Abiotikus	Blank ^γ	Minta ^δ	Előtesztelés eredményei
Diclofenák Dúsítás				
<i>P. stutzeri</i> DIC-1		0.100 ± 0.007	0.144 ± 0.004	Növekedésgátlás ^ε
<i>S. humi</i> DIC-5		0.074 ± 0.001	0.035 ± 0.023	Potenciális bontó ^θ
<i>P. kribbensis</i> DIC-8		0.146 ± 0.002	0.135 ± 0.003	Gyógyszerhatóanyag toleráns ^λ
<i>P. aquatilis</i> DIC-10_6		0.041 ± 0.017	0.026 ± 0.017	Potenciális bontó
<i>B. mobilis</i> DIC-11		0.144 ± 0.004	0.147 ± 0.004	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>M. discipulorum</i> DIC-12	0.146 ± 0.01	0.073 ± 0.010	0.084 ± 0.012	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>R. daejeonense</i> DIC-14		0.018 ± 0.001	0.087 ± 0.022	Növekedésgátlás
<i>R. daejeonense</i> DIC-15		0.101 ± 0.017	0.040 ± 0.016	Potenciális bontó
<i>R. daejeonense</i> DIC-16/A		0.013 ± 0.004	0.018 ± 0.009	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>P. kribbensis</i> DIC-17		0.014 ± 0.001	0.119 ± 0.004	Növekedésgátlás
<i>P. stutzeri</i> DIC-18		0.045 ± 0.008	0.119 ± 0.010	Növekedésgátlás
Ibuprofen Dúsítás				
<i>P. stutzeri</i> IBU-1		0.140 ± 0.0015	0.138 ± 0.006	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>Ancylobacter</i> sp. nov. IBU-2		0.145 ± 0.0035	0.146 ± 0.006	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>M. discipulorum</i> IBU-4		0.130 ± 0.002	0.134 ± 0.002	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>P. kribbensis</i> IBU-9		0.142 ± 0.000	0.146 ± 0.002	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>P. veronii</i> IBU-12	0.146 ± 0.01	0.0120 ± 0.003	0.015 ± 0.002	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>P. stutzeri</i> IBU-13		0.103 ± 0.002	0.107 ± 0.002	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>R. daejeonense</i> IBU-14		0.011 ± 0.002	0.005 ± 0.002	Potenciális bontó
<i>P. stutzeri</i> IBU-17		0.071 ± 0.0005	0.091 ± 0.001	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>R. daejeonense</i> IBU-18		0.012 ± 0.003	0.004 ± 0.001	Potenciális bontó
CBZ Dúsítás				
<i>N. carbamazepini</i> CBZ-1		0.041 ± 0.004	0.021 ± 0.002	Potenciális bontó
<i>N. carbamazepini</i> CBZ-2		0.004 ± 0.001	0.018 ± 0.008	Növekedésgátlás
<i>B. bullata</i> CBZ-3		0.008 ± 0.001	0.004 ± 0.001	Potenciális bontó
<i>P. kribbensis</i> CBZ-4		0.013 ± 0.001	0.022 ± 0.003	Növekedésgátlás
<i>R. qingshengii</i> CBZ-6		0.012 ± 0.000	0.009 ± 0.000	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>P. moorei</i> CBZ-7	0.146 ± 0.01	0.092 ± 0.0005	0.063 ± 0.006	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>P. veronii</i> CBZ-8		0.006 ± 0.001	0.013 ± 0.001	Growth inhibition
<i>V. paradoxus</i> CBZ-9		0.004 ± 0.0005	0.005 ± 0.001	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>V. paradoxus</i> CBZ-10		0.006 ± 0.001	0.002 ± 0.001	Potenciális bontó
<i>M. discipulorum</i> CBZ-11		0.014 ± 0.005	0.024 ± 0.003	Növekedésgátlás
<i>P. stutzeri</i> CBZ-13		0.031 ± 0.006	0.040 ± 0.01	Gyógyszerhatóanyag toleráns
<i>B. cereus</i> CBZ-16		0.0155 ± 0.006	0.012 ± 0.002	Gyógyszerhatóanyag toleráns

α - STD – Standard eltérés értéke

β – nem beoltott, abiotikus kontroll minták

γ – beoltott minták, gyógyszerhatóanyag nélkül

δ – beoltott minták, amelyek tartalmazzák az adott gyógyszer célvegyületet

ε – a minta 610 nm mért értéke jelentősen magasabb, mint a vakpróbáé – feltehetően a baktériumok növekedését gátolta a vizsgált gyógyszervegyület jelenléte. A „növekedésgátlás” küszöbértékét úgy meghatároztuk, hogy a kapott A610 nm értékek között legalább 1.5-2-szeres különbség legyen.

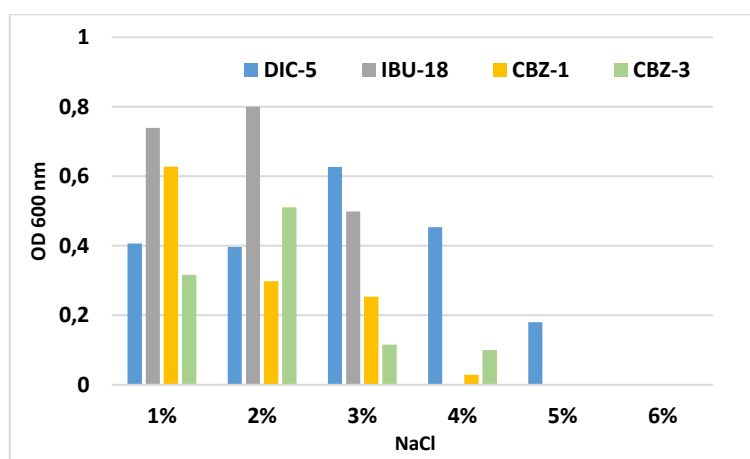
θ – a minta A610 nm értéke feltűnően alacsonyabb, mint a vakanyagé – a vizsgált gyógyszerkeverék jelenléte a vakaanyaghoz képest nagyobb bakteriális aktivitást váltott ki a mintában. A „potenciális lebontó” küszöbértékét úgy határoztuk meg, hogy a kapott A610 nm értékek között legalább 2-szeres különbség legyen.

λ – nem volt szignifikáns különbség a vak és a minta A610 nm értékei között. Feltehetően a vizsgált vegyület nem serkentette és nem is gátolta a baktériumok növekedését. Az izolátum tolerálta a vizsgált gyógyszerkeverék jelenlétét.

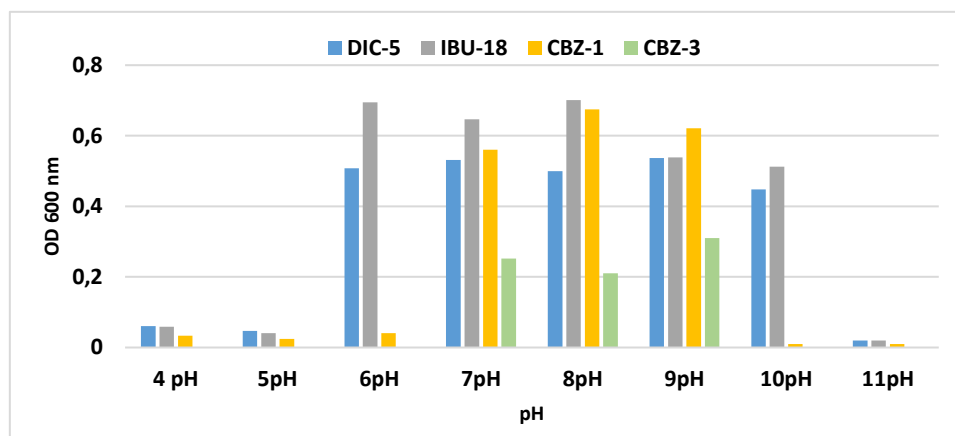
5. melléklet A tenyésztések során használt tápoldatok összetétele

Összetevő	R2A	TSA	Nutrient	LB
Nátrium-klorid (g)	-	5	5	10
Élesztőkivonat (g)	0,5	-	2	5
Húskivonat (g)	-	-	1	-
Trypton (g)	-	15	-	10
Pepton (g)	0,5	-	5	-
Szója pepton (g)	-	5	-	-
Keményítő (g)	0,5	-	-	-
Dikálium- hidrogén foszfát (g)	0,3	-	-	-
Magnézium-szulfát · 7 H ₂ O (g)	0,05	-	-	-
Nátrium – piruvát (g)	0,3	-	-	-
D-glükóz (g)	0,5	-	-	-
Kazamínosav (g)	0,5	-	-	-
dH ₂ O (ml)	1000	1000	1000	1000

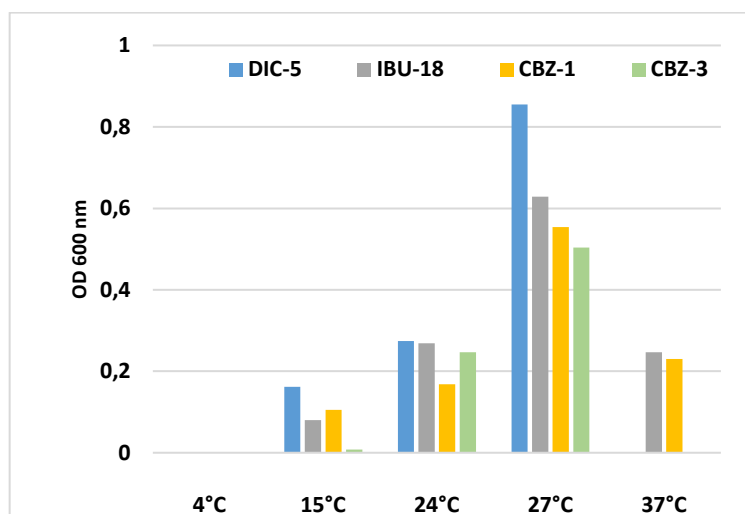
1. 6. melléklet A kiválasztott izolátumok sótűrése (NaCl), tenyésztésükhöz optimális sókoncentráció meghatározása



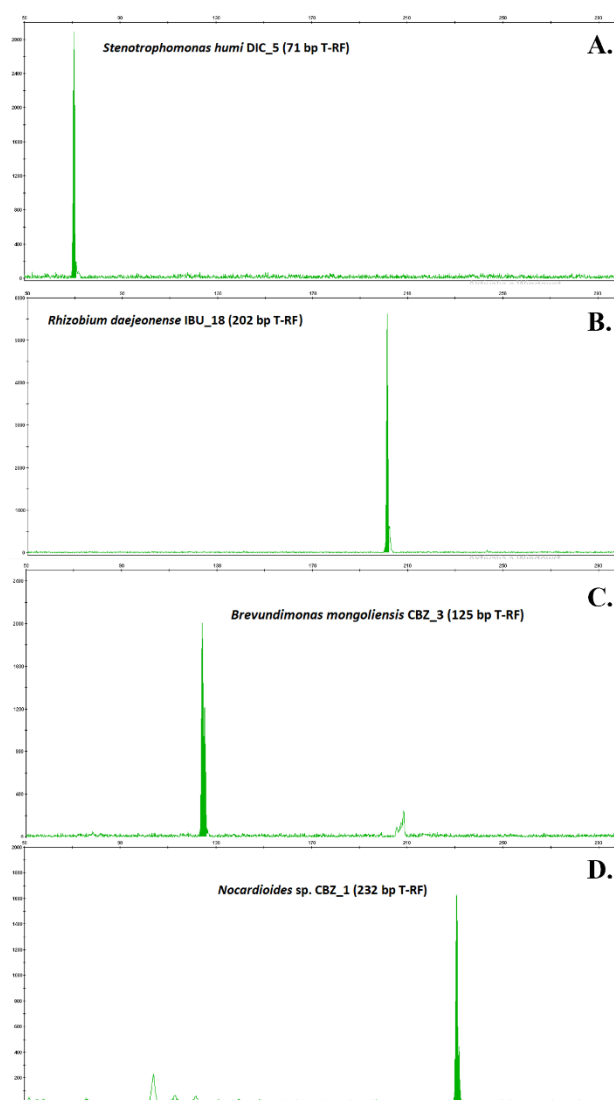
7. melléklet A vizsgált izolátumok pH toleranciája, illetve a tenyésztésükhöz legmegfelelőbb pH érték meghatározása



8. melléklet A vizsgált izolátumok hőmérséklet toleranciája, illetve a tenyésztésükhöz legoptimálisabb hőmérsékleti értékek meghatározása



9. melléklet A baktériumok genomi 16S *rRNS* génjei alapján kapott T-RFLP elektroferogramok. (A. DIC-5; B. IBU-18; C. CBZ-3; D. CBZ-1 izolátum)

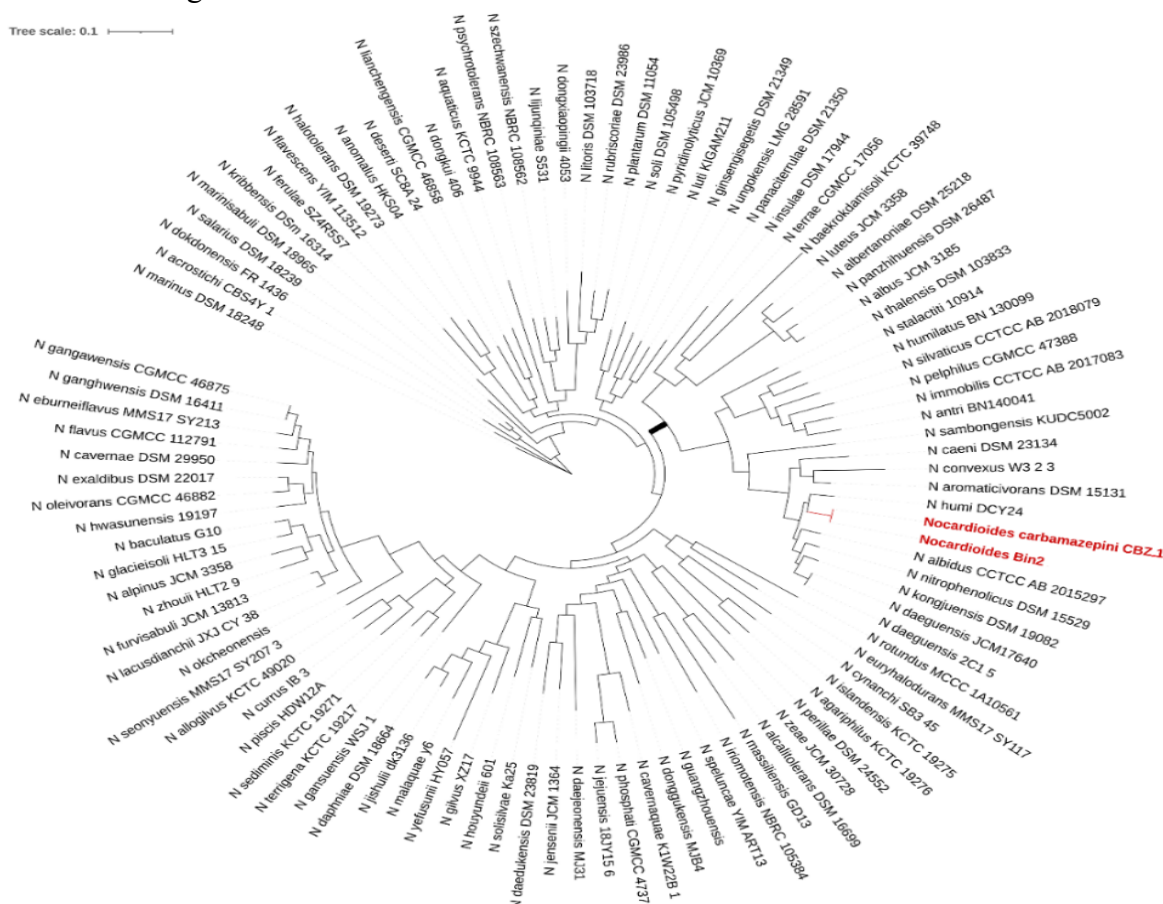


10. melléklet A vizsgálatok során felhasznált szennyvíz effluens fiziko-kémiai paramétereiről

Vizsgált paraméter	Mértékegység	Minta jele IBUG
pH ¹		8,36
Vezetőkéesség 20 °C-on ²	μS/cm	1240
KOlp _s ³	mgO ₂ /dm ³	6,0
p-lúgosság ⁴	mmol/dm ³	0,1
m-lúgosság ⁴	mmol/dm ³	5,7
Hidrogén-karbonát ⁴	mg/dm ³	336
Karbonát ⁴	mg/dm ³	6
Hidroxid ⁴	mg/dm ³	<2
Fluorid ⁵	mg/dm ³	<0,5
Klorid ⁵	mg/dm ³	200
Bromid ⁵	mg/dm ³	<0,5
Ortofoszfát ⁶	mg/dm ³	3,1
Szulfát ⁵	mg/dm ³	70
Ammónium ⁷	mg/dm ³	0,04
Nitrit ⁸	mg/dm ³	0,05
Nitrát ⁵	mg/dm ³	73
Vas (oldott) ⁹	μg/dm ³	70
Mangán (oldott) ⁹	μg/dm ³	20
Nátrium (oldott) ⁹	mg/dm ³	167
Kálium (oldott) ⁹	mg/dm ³	23,1
Kalcium (oldott) ⁹	mg/dm ³	80,7
Magnézium (oldott) ⁹	mg/dm ³	30,7
Összes keménység ¹⁰	mgCaO/dm ³	184

- (1) MSZ EN ISO 10523:2012
- (2) MSZ EN 27888:1998
- (3) MSZ EN ISO 8467:1998
- (4) MSZ EN ISO 9963-1:1998
- (5) MSZ EN ISO 10304-1:2009
- (6) MSZ EN ISO 6878:2004 4. fejezet
- (7) MSZ ISO 7150-1:1992
- (8) MSZ EN 26777:1998
- (9) MSZ EN ISO 11885:2009
- (10) MSZ 448-21:1986 4. 5. fejezet és Függelék

11. melléklet A GTDB-Tk classify_wf munkafolyamat segítségével kapott 101 *Nocardioides* genom felhasználásával kapott filogenetikai fa. A filogenetikai következtetéshez 120 bakteriális markergén lett felhasználva



12. melléklet A CBZ_1^T törzs és a korábban megállapított *Nocardiodes* legközelebbi rokon fajok közötti filogenetikai rokonság a teljes genomszekvenciaák alapján

	<i>Nocardiodes</i> sp. CBZ_1 ^T törzs			
	16S <i>rRNS</i> gén szekvencia hasonlóságok (%)	ANI (%)	dDDH (%)	Mol% G+C
<i>N. kongjuensis</i> DSM 19082 ^T	98.4	83.3	29.7	72.1
<i>N. daeguensis</i> JCM 17460 ^T	98.4	85.5	30.1	74.9
<i>N. nitrophenolicus</i> DSM 15529 ^T	98.2	85.1	29.3	71.4
<i>Nocardiodes</i> sp. bin2	-*	99.9	99.4	71.4

*A rekonstruált *Nocardiodes* sp. bin2 genomban nem mutattak ki 16S *rRNS* gént.

13. melléklet A CBZ_1^T törzs és a rokon fajok sejtes zsírsavprofiljai. Taxa: 1. CBZ_1^T törzs; 2. *N. kongjuensis* DSM 19082^T; 3. *N. nitrophenolicus* DSM 15529^T; 4. *N. daeguensis* JCM 17460^T. Az összes adat százalékban van feltüntetve minden egyes zsírsav esetén; - nem található. Azon zsírsavak esetén nem történt feltüntetés, amelyek 1.%-nál alacsonyabb mértékben voltak jelen

Zsírsavak	1	2	3	4
Telített				
C _{16:0}	4.44	1.81	2.10	1.99
C _{17:0}	1.03	0.59	1.09	0.56
C _{18:0}	3.26	3.58	-	3.50
Telítetlen				
C _{17:1} ω6c	8.00	9.18	7.12	11.02
C _{17:1} ω8c	2.17	2.04	2.24	2.11
C _{18:1} ω7c	1.87	1.69	1.98	1.88
C _{18:1} ω9c	15.90	16.52	19.63	19.59
Elágazó láncú zsírsavak				
iso-C _{15:0}	3.38	1.67	2.65	1.56
iso-C _{16:0}	10.42	22.27	11.98	23.72
iso-C _{16:1} H	1.89	1.77	0.83	1.28

iso-C _{17:0}	9.73	8.02	12.10	7.34
anteiso-C _{17:0}	2.04	4.22	6.49	2.87
iso-C _{18:0}	0.59	2.63	1.28	3.12
10-Methyl zsírsavak				
C _{16:0}	2.18	1.60	1.63	1.30
C _{17:0}	3.08	3.80	3.24	3.61
Hidroxi zsírsavak				
C _{16:0} 2-OH	2.45	0.57	1.26	0.69
Összesített jellemzők^a	4.48	1.89	2.53	1.94
TBSA ^b 10Me C _{18:0}	20.72	13.45	18.96	9.09

^aA összegzett jellemzők két vagy három zsírsavból álló csoportokat jelentenek, amelyeket gáz-foliadék kromatográfiával nem lehetett szétválasztani a MIDI rendszerrel. Összesített jellemzők: 3, C_{16:1} ω7c/C_{15:0} ISO 2-OH.

^bTuberkuloszearinsav

14. melléklet A CBZ_1^T törzs élettani és fenotípusos jellemzői a *Nocardoides* nemzetségen belüli közeli rokon fajokkal összehasonlítva. Törzsek: 1. CBZ_1^T törzs; 2. *N. kongjuenssi* DSM 19082^T; 3. *N. nitrophenolicus* DSM 15529^T; 4. *N. daeguensis* JCM 17460^T

Jellemzők	1	2	3	4
Nitrát nitritté történő redukciója	+	-	-	+
H ₂ S termék	+	+	+	+
Oxidáz	-	-	w	+
Kataláz	+	+	+	+
Indole előállítás	-	-	-	-
Glükóz fermentációja	-	-	-	-
Hidrolízis				
Arginin	-	-	-	-
DNS	+	+	+	+
Urea	-	-	+	-
Aesculin	+	+	+	-
Zselatin	+	+	+	+
Kasein	+	+	-	+

Tween 80	+	+	+	+
Keményítő	-	+	+	+
<i>Asszimiláció</i>				
D-glükóz	+	+	+	-
L-arginin	-	-	-	-
L-arabinóz	-	-	w	-
D-mannóz	-	-	w	-
D-mannitol	-	w	w	-
N-acetil-glükózamin	-	w	w	-
D-maltóz	-	w	w	-
Kálium-glükonát	-	w	w	-
Kaprinsav	-	-	-	-
Adipinsav	-	w	w	w
Almasav	+	w	w	w
Trinátrium-citrát	-	w	w	-
Fenilecetsav	-	-	-	w
<i>Sav termelés</i>				
D-maltóz	-	-	-	-
Mannóz	-	w	w	-
Ribóz	-	-	+	+
D-fruktóz	-	-	+	-
D-glükóz	-	-	-	w
Laktóz	-	-	-	-
L-arabinóz	-	-	-	-
Cellobióz	-	-	-	-
Xilóz	-	-	+	+

Szimbólumok: + pozitív, - negatív, w gyenge pozitív

15. Melléklet A CBZ_1^T törzs és a legközelebbi rokonok enzimatisz aktivitása az API[®] ZYM teszt (bioMérieux SA, Franciaország) szerint. Törzsek: 1. CBZ_1^T törzs; 2. *N. kongjuenssi* DSM 19082^T; 3. *N. nitrophenolicus* DSM 15529^T; 4. *N. daeguensis* JCM 17460^T

Enzimvizsgálatok	1	2	3	4
Alkalikus foszfátáz	+	+	+	+
Eszteráz (C 4)	+	+ (- ^a)	+ (- ^b)	+
Ezsteráz-lipáz (C 8)	+	+	+	+
Lipáz (C 14)	+	-	-	-
Leucin arilamidáz	+	+	+	+
Valin arilamidáz	+	+ (- ^a)	+	+
Cisztein arilamidáz	+	+ (- ^a)	+	+
Tripszin	+	+ (- ^a)	+	+
α-limotripszin	-	-	-	-
Savas foszfátáz	+	+	+	+
Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	+	+	+	+
α- galaktozidáz	-	-	-	-
β- galaktozidáz	+	w (- ^a)	w (+ ^b)	w (+ ^c)
β- glükunoridáz	-	-	-	-
α- glükozidáz	+	+	+	+
β- glükozidáz	+	+ (- ^a)	w	w (+ ^c)
N-acetil-β-glükozaminidáz	-	-	-	-
α- mannozidáz	-	-	-	-
α-fukozidáz	-	-	-	-

Szimbólumok: + pozitív, - negatív, w gyenge pozitív

^a*N. kongjuenssi* DSM 19082^T típusörzs adatai (Yoon et al., 2006).

^b*N. nitrophenolicus* DSM 15529^T típusörzs adatai (Yoon et al., 1999).

^c*N. daeguensis* JCM 17460^T típusörzs adatai (Cui et al., 2013).

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindenkinek, aki hozzájárult doktori disszertációm elkészítéséhez. Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőimnek **Dr. Táncsics Andrásnak** és **Dr. Benedek Tibornak**, akik iránymutatásaikkal, szakmai tanácsaikkal és támogatásukkal folyamatosan segítettek munkámat. Köszönöm, hogy mindig rendelkezésre álltak. **Dr. Kriszt Balázs** intézetigazgatónak, hogy lehetővé tette a munka megvalósítását.

Köszönetet mondok a Molekuláris Ökológia Tanszék tagjainak, akik mindig segítettek az experimentális munkák során, és akik szakmai tudásukkal hozzájárultak kutatásaim előrehaladásához. Külön köszönet illeti **Farkas Milánt, Márton Dalmát, Vásárhelyi Ernát, Balogh Rékát**, akik munkám során segítettek, és akik tanácsaikkal, ötleteikkel gazdagították kutatásaimat.

Köszönöm továbbá az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet munkatársaimnak is, akik a kutatásom napi részleteiben részt vettek, és akik türelemmel és lelkesedéssel támogatták a projektet.

Köszönöm a családomnak és barátaimnak a szeretetet, türelmet és megértést, amit az évek során tanúsítottak, és hogy mindig ott álltak mellettem. Az ő támogatásuk nélkül nem sikerült volna elérnem ezt a mérföldkövet.

Végül köszönetet mondok minden olyan intézménynek és alapítványnak, amelyek anyagi támogatást nyújtottak kutatásaimhoz.