

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Ivóvízhálózathól izolált, a tudomány számára új baktérium taxonok polifázikus leírása

BARNÁS KATALIN

Témavezetők:

Dr. Tóth Erika

Homonnay Zsolt Gábor

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET
MIKROBIOLÓGIA TANSZÉK



Budapest, 2012.

TARTALOMJEGYZÉK

1.BEVEZETÉS.....	2
1.1 A mikrobiális taxonómia alapjai.....	2
1.2 Az ivóvíz, mint mikrobiális élőhely	4
2.CÉLKITŰZÉS.....	6
3.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	6
3.1 Mintavételezés, baktériumtörzsek izolálása.....	6
3.2 Baktériumtörzsek morfológiai, biokémiai és fiziológiai vizsgálata	7
3.3 16 S rRNS génjének teljes szekvenálása	16
4.EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	20
4.1 PYM3-14 baktériumtörzs fenotípusos és genotípusos jellemzői	20
4.2 M4-14 baktériumtörzs fenotípusos és genotípusos jellemzői.....	23
4.3 M4-9 és M4-10 baktériumtörzsek fenotípusos és genotípusos jellemzői	25
4.4 PYM7-15 és PYM7-16 baktériumtörzsek fenotípusos és genotípusos jellemzői	28
5.ÖSSZEFOGLALÁS.....	30
6.FELHASZNÁLT IRODALOM	31
6.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	34

1. BEVEZETÉS

1.1 A mikrobiális taxonómia alapjai

A taxonómia az élőlények csoportokba sorolásának tudománya, ami során azokat rendszertani kategóriákba, úgynevezett taxonokba osztjuk be. Az eddig leírt baktérium fajok száma 9184 (http://old.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14).

A mikrobiális taxonómia számos területen fontos: a klinikai diagnosztikában, hiszen számos patogén faj illetve törzs ismert közülük, a mikrobiális ökológiában és a biotechnológiában is, mivel jelentős alkotói az ökoszisztémának, illetve sokukat használhatjuk az iparban is (Sutcliffe, 2011).

Egy egységes taxonómiai rendszer megalkotása azonban nem olyan egyszerű, alapvető probléma, hogy a mikrobiális mérettel rendelkező szervezeteket hogyan helyezzük bele az élővilág rendszerébe (Sapp, 2005).

A prokarióta-eukarióta elmélet szerint a prokarióták olyan szervezetek, melyeknek az eukariótákkal ellentétben nincsen maghártyával körülvett önálló sejtmagjuk és általában nincsenek membránalkotóik. Sok tudós kifejezte egyetértését ezzel az elképzeléssel, többek között Edouard Chatton (Sapp, 2005) is. Az élővilág ilyen jellegű felosztása kezdetben jónak tűnt, a biológiai rendszerezés alapjává vált, de később kételyek merültek fel vele kapcsolatban. Az egyik legfontosabb érv arra, hogy a prokarióta–eukarióta felosztás helytelen, az volt, hogy a prokarióták nem monofiletikus származásúak, mint ahogyan arra az elnevezésből következtethetnénk (Sapp, 2005).

Többek között Carl Woese is felállított egy pozitív definíciót, amit azon molekulák és funkciók alapján alkotott meg, amik szerint a prokarióták homológok az eukariótákkal: a kromoszóma szerveződése, sejt szintű regulációs mechanizmusok megléte, replikáció, transzláció, a riboszóma mérete illetve féligáteresztő membrán a sejt és környezete között.

További problémát jelentett, hogy a „pro” prepozíció arra a helytelen következtetésre vezethet el bennünket, hogy a prokarióták az eukariótákat megelőzően alakultak ki, esetleg az eukarióták a prokariótákból fejlődtek volna ki (Pace, 2009). Mindezek ellenére, ahogyan azt sokan, mint Gunther Stent (Stent, 1971) is gondolták, ez a hipotézis valószínűleg nem igaz.

A prokarióta kifejezés helyett Edouard Chatton (Sapp, 2005) Richard Owennel (Owen, 1860) együtt inkább a Protozoa szót használta.

Ernst Haeckel pedig 1866-ban a Protista, illetve a Schizophyta - hasadó növények – fogalmakat alkalmazta. A Bergey's Manual of Determinative Bacteriology című műben viszont - 1948-ban - a Protophyta szót a baktériumokra és a vírusokra is értik. A könyv későbbi kiadásában pedig a „Procaryota” kifejezés többes számú, nőnemű főnévként való használatát javasolják: „Procaryotae”. R. E. Buchanan részben egyet értett ezzel, szerinte az egyes számú Procaryota fogalmon kívül a hozzá hasonló Procaryotae vagy Procaryotes neveket is lehetne használni (Buchanan, 1970). A Monera kifejezést először, 1866-ban, Ernst Haeckel vetette fel a prokarióta szó szinonimájának (Pace, 2009). Végül kialakult a mikróba/mikroorganizmus fogalma, amely minden mikrobiális méretű szervezetet magában foglal. Ez egy alternatív megoldás, ellenben nagy hátránya, hogy a kifejezés pro- és eukarióta élőlényeket egyaránt magába foglal és nem valódi taxonómiai meghatározás (Pace, 2009).

A mikrobiológusok szerettek volna egy filogenetikán alapuló, természetes rendszert felállítani a korábban érvényben levő Whittaker-féle 5 királyságos rendszer helyett, amelyet molekuláris biológiai alapon lehet reálisan megtenni (Sapp, 2005), hiszen az eukariótáknál jól használható fenotípusos bélyegek a prokarióták körében méretükből adódóan nem használhatóak.

A filogenetikai rendszerezéshez több evolúciós óra (kronométer) is használható. Két csoportjuk ismeretes: konzervatív, hosszú időtávra (citokróom c, hiszton fehérjék), illetve változékonny, rövidtávra való kronométerek (mitokondriumon található D-hurok, fibrinopeptidek, hemoglobin) (Márialigeti, 1996; http://www.pbs.org/wgbh/evolution/library/05/1/pdf/l_051_06.pdf). A legsikeresebb molekuláris biológiai órának a 16S rRNS génje bizonyult, aminek segítségével Carl Woese alkott meg egy modern taxonómiai rendszert, melynek során a mikrobák 16S rRNS génjének, illetve az eukarióták 18S rRNS génjének szekvenciáját hasonlította össze. Ezt alkalmazzuk ma is leggyakrabban a taxonómiai kutatások során (Pace, 2009). A 16S rRNS génje azért alkalmas a molekuláris óra szerepére, mert univerzálisan elterjedt, az evolúció legkorábbi stádiumaiban alakult ki, tehát már a régebben kialakult élőlények esetén is használható, konzervatív a szerkezete, tehát változatlan a funkciója, kellő méretű, könnyen vizsgálható és a laterális géntranszfertől való lehető legteljesebb függetlenség jellemzi (Márialigeti, 1996).

Ezen szekvencia adatok alapján Carl Woese megalkotta az élővilág három doménből álló filogenetikai fáját, melynek tagjai: *Bacteria*, *Archea* és *Eucarya* (Woese, 1994).

Igen nehéz a prokarióta királyságok rendszerét összerakni a valódi sejtmaggal rendelkező élőlényekével, mivel teljesen mások a távolságok a két csoportban az egyes fajok között. Ez látszik a következő példán is: a béka filogenetikai értelemben sokkal közelebb áll az emberhez, mint esetenként a *Bacillus* nemzetség két faja egymáshoz (Márialigeti, 1996).

A biológiai rendszerezés alapegysége a faj (species). Az ivarosán szaporodó szervezeteknél fajnak nevezzük az egymás között ivarosán szaporodó egyedek összességét, melyek reprodukzív izolációval elhatárolódnak más csoportoktól.

A mikrobák többnyire aszexuálisan szaporodó élőlények, ezért rájuk az előbbi definíció nem érvényes. A mikrobiológiában többféle nézet létezik, de itt is, mint ahogy sok más esetben, a molekuláris biológiai módszerek segítségével határozhatjuk meg legkorszerűbben a faj fogalmát. A legáltalánosabban elfogadott nézet szerint, a baktériumok esetén azonos fajhoz tartozónak tekintünk két fajt, ha köztük a 16S rRNS génje alapján 97%-nál nagyobb a hasonlóság és a teljes genom DNS-DNS hibridizációs értékük 70% vagy ennél magasabb. Mindezek mellett fenotípusos tulajdonságaik hasonlósága is szükséges. Azonban ez a molekuláris alapú definíció sem teljesen tökéletes, mivel sokszor a 70%-os DNS-DNS hibridizációs érték és a 16S rRNS gén szekvencia hasonlóság nem korrelál, illetve bizonyos esetekben a 98% -os 16S rRNS gén szekvencia hasonlóságot jóval meghaladó különböző nemzetségekhez tartozó mikrobákat is találunk (pl. *Enterobacteriaceae* család). Az is előfordulhat, hogy a genotípusos tulajdonságok nincsenek teljesen összhangban a fenotípusos bélyegeikkel.

Mivel a prokarióta fajdefiníció jelenleg is vitatott, ezért a bakteriális taxonómusok inkább törzsekkel dolgoznak. A baktériumtörzs faj alatti kategória, és definíció szerint ismert eredetű, azonos szám-és betűjelzéssel ellátott, folyamatos átvétellel fenntartott tiszta tenyészet.

1.2 Az ivóvíz, mint mikrobiális élőhely

Az ivóvíz egy olyan „tápanyag”, ami az élő szervezet számára nélkülözhetetlen: nem tartalmazhat határérték feletti koncentrációban emberi egészségre káros anyagokat, a vízcsőhálózatból kikerülve színtelennek, szagtalanoknak és friss ízűnek kell lennie és fontos, hogy kezelése során ne keletkezzen egészségkárosító vagy minőségromló komponens. (201/2001. Kormányrendelet).

Téves elképzelés, hogy az ivóvíz egy majdnem steril közeg volna. Ez a szemlélet azért alakulhatott ki, mert hosszú ideig a tenyésztési nehézségek miatt a benne élő baktériumok

99,9%-át figyelmen kívül hagytuk, illetve higiéniai szempontból főleg a patogén fajokat szokás vizsgálni (Szewzyk és mtsai, 2000).

Az ivóvíz, mint oligotróf közeg alacsony szervesanyagtartalommal jellemezhető, ennek megfelelően ehhez a környezethez azon mikrobák tudnak adaptálódni, amelyek képesek kihasználni ezt a kevés szervesanyag mennyiséget (oligotróf mikroorganizmusok, 1-15 mg C/l tartalom mellett növekednek).

Az ivóvizek ökoszisztémájának vizsgálata sokszor a biofilmek megfigyelésében nyilvánul meg, mivel a baktériumok sok esetben nem szabadon úszva, hanem biofilmekben rögzülnek.

A biofilm felülethez kötődött mikróba sejtek összessége, amiket extracelluláris polimer mátrix zár közre (Donlan, 2002). A baktériumoknak előnyös a felszínekhez kötődniük, mivel ezek úgynevezett „antenna effektussal” bírnak, tehát védelmet biztosítanak a növekedéshez. Az is kedvező, ha térbeli elrendezésük szoros egymáshoz képest. Ennek az az oka, hogy így a szerves anyagokat közösen, sokszor kometabolizmussal tudják lebontani, illetve egymásnak képesek védelmet biztosítani (Szewzyk és mtsai, 2000). Ivóvízrendszerekben azért érdemes a biofilmek kialakulását megakadályoznunk, mert azokban jobban el tudnak a baktériumok szaporodni, mint a szabad vízfelületen.

Az ivóvíz tehát egy oligotróf közeg, mégis sok mikroorganizmus adaptálódott ehhez az igen alacsony szervesanyagtartalommal jellemezhető környezethez. Ezen mikrobák szabványos módszerekkel kevésbé tenyésztethetők, de oligotróf táptalajok és molekuláris vizsgálatok alkalmazásával rejtett diverzitásuk feltárható, így sok, korábban még tenyésztésbe nem vont szervezet kimutatható. Amennyiben e mikrobákat sikerül tenyésztésbe vonni, új taxonok leírása válik lehetővé és ezzel bővülnek mikrobiális taxonómiai ismereteink, ami humán egészségügyi vonatkozásokkal is bír.

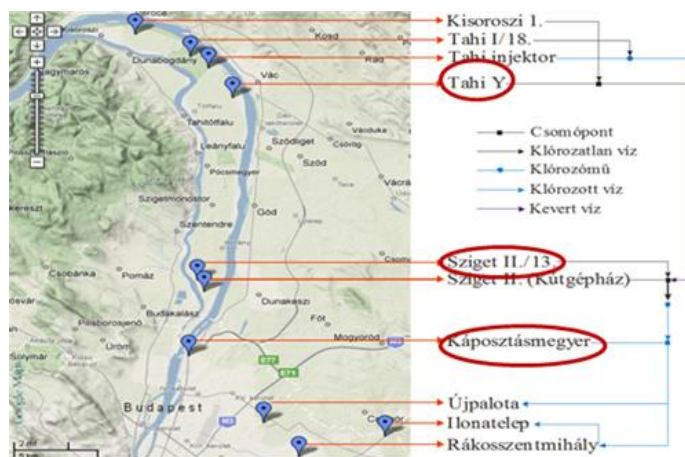
2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja korábban (2009-2010) a budapesti ivóvízhálózathól izolált, 16S rRNS génszekvenciájuk alapján új fajoknak tekinthető baktériumok polifázikus leírása.

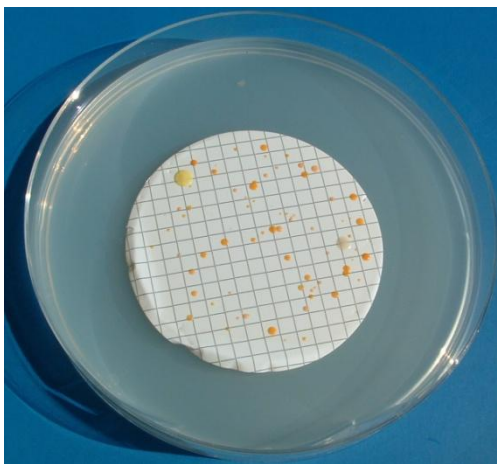
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Mintavételezés, baktériumtörzsek izolálása

Törzseink a budapesti ivóvizet szolgáltató rendszer három különböző pontjáról származnak. A Sziget II/13 kútvizéből (PYM3-14), a Káposztásmegyeri klórozóból (PYM7-15 és PYM7-16), illetve Tahiban az Y elágazásból (M4-14, M4-9, M4-10).



1. ábra: mintavételi helyek



2. ábra: A budapesti ivóvizet szolgáltató rendszerből vett vízmintából származó baktériumok telepei

Az izolálás R2A táptalajon történt (Reasoner és Geldreich, 1985), 1 hetes 28 °C inkubálást követően. A törzseket a vizsgálatok során szintén 28 °C-on, ugyanezen a táptalajon tartottuk fenn.

R2A táptalaj összetétele:

élesztőkivonat	0,5 g
proteázzal emésztett pepton	0,5 g
kazamino savak	0,5 g
glükóz	0,5 g
oldható keményítő	0,5 g
Na-piruvát	0,3 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05 g
agar	24 g
desztillált víz	1000 ml

3.2. Baktériumtörzsek morfológiai, biokémiai és fiziológiai vizsgálata

Vizsgálatainkat a parciális szekvenciájuk és fenotípusos különbségeik alapján újaknak ítélt törzsekkel és a filogenetikailag hozzájuk legközelebb, illetve közel álló rokonaikkal is elvégeztük. Az összehasonlításhoz irodalmi adatokat is felhasználtunk. Munkánk során az alábbi autentikus törzsekkel dolgoztunk, melyekkel minden fenotípusos vizsgálatot elvégeztünk (side by side analízis): *Lysobacter brunescens* (DSM 6979), *Arenimonas oryzae* (DSM 21050), *Undibacterium pigrum*, (DSM 19792), *Rhizobacter dauci* (DSM 11587), *Rhizobacter fulvus* (DSM 19916).

Gram festés (Claus,1992)

A fiatal (24 órás) baktériumtenyészetekből kenetet készítettünk előzőleg sterilizált tárgylemezekre, ezután hővel fixáltuk.

- a kenetet kristályibolyával megfestettük (1 perc)
- desztillált vízzel mostuk
- Lugol-oldatot öntöttünk rá (1 perc)
- desztillált vízzel mostuk
- színtelenítő alkohollal (96%-os) elszíntelenedésig mostuk
- desztillált vízzel mostuk
- szafraninnal megfestettük (1 perc)

A festés lényege, hogy egyes baktériumok sejtfala a kristályibolya-jód komplexet megköti, más fajok sejtfalából viszont a festék alkohollal kimosható, de hogy ezeket is láthatóvá tegyük, szafraninnal megfestettük, ezt nevezzük kontrasztfestésnek. Ennek eredményeképpen az első csoport lila színű lesz, őket Gram-pozitív baktériumoknak nevezzük, a másik csoport pedig pirosra színeződik, ezeket hívjuk Gram-negatív baktériumoknak.

Fénymikroszkópos vizsgálatok:

Ennek során megállapítottuk a baktériumok alakját, méreteit (μm), csoportosulását.

Tween 80 hidrolízis (Smibert és mtsai, 1994)

Ez a teszt arra való, hogy megvizsgáljuk a baktériumok Tween 80 bontási képességét, hogyha tartalmaznak lipáz enzimet, akkor képesek erre.

A Tween 80 agarra (polioxietilén-szorbitán-monooleát) pontoltással egy kacsnyi baktériumot vittünk fel, ezután egy hétig inkubáltuk 28 °C-on.

Ezután az jelentette a pozitív reakciót, ha Ca-oleát precipitációk jelentek meg az agaron, ami a Tween 80 bomlása következtében létrejött olajsav és a táptalajban lévő kalcium ionok reakciójából keletkezett.

Keményítő hidrolízis (Cowan és Steel, 1974)

Ennek során azt vizsgáltuk, hogy a baktériumok képesek-e a keményítőt bontani, ami akkor lehetséges, ha a baktériumok tartalmazznak α -amiláz enzimet, ami a keményítőt mono- és disszacharidokra képes bontani.

A keményítőtartalmú agar lemezekre pontoltással felvittünk egy kacsnyi baktériumot, ezután 28 °C-on egy hétig inkubáltuk.

Utána Lugol oldatot (KI-oldat) csepegtettünk a Petri csészére, aminek összetétele a következő:

I ₂	5,0 g
KI	10,0 g
desztillált víz	1000 ml

Az jelentette a pozitív reakciót, ha színtelen zónákat figyelhattunk meg a kolóniák körül, ami azért következett be, mert a baktérium amiláz enzimjével elbontotta a keményítőt és így annak spiráljába nem kerültek be a jód ionok és nem adott kék színreakciót. Negatív reakció esetén kék színű maradt a kolóniák körül a táptalaj.

Foszfátáz aktivitás teszt (Cowan és Steel, 1974)

Ezzel a teszttel vizsgáltuk meg a baktériumok foszfátáz aktivitását.

A nátrium-fenolftalein-foszfát tartalmú agarra felvittünk pontoltással egy kacsnyi baktériumot, ezután 28 °C-on egy hétig inkubáltuk. A táptalaj elkészítési módja a következő: 1000 ml steril alaptáptalajhoz 10 ml steril, 1%-os nátrium-fenolftalein-foszfát oldatot adagoltuk.

Ezután a Petri csészéket megfordítottuk és a tetejükbe pár csepp ammóniát csepegtettünk.

Az jelentette a pozitív reakciót, ha ennek hatására rózsaszín elszíneződést figyelhattunk meg. Ez esetben a foszfátáz enzim elbontja a nátrium-fenolftalein-foszfátot, a fenolftalein szabaddá válik és így indikátorként lúgos közegben rózsaszín színt ad.

D-glükóz oxidatív és fermentatív értékesítése (Hugh és Leifson, 1953)

Ennek során azt vizsgáltuk, hogy a baktériumok képesek-e a D-glükóz oxidatív vagy fermentatív lebontására.

Elkészítettük a steril alaptáptalajt, melynek összetétele a következő:

pepton	2,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
poragar	3,0 g
brómtimolkék 0,2%-os	
vizes oldata	15 ml
desztillált víz	1000 ml

pH=7,1-7,2

15percig, 121°C-on való sterilezés

A táptalajhoz annyi steril glükóz oldatot adtunk, hogy 1%-os legyen a végkoncentráció. Ezután a táptalajt tartalmazó csövek felének tetejére a glükóz fermentatív értékesítésének vizsgálatához 1 cm magasságban paraffinolajat rétegeztünk, hogy elzárjuk az oxigéntől a kémcső belsejét. Az így elkészült félszilárd magasagarokba szűrással beleoltottunk egy kacsnyi baktériumot, ezután egy, illetve két hétig inkubáltuk 28 °C-on.

A fermentatív cső esetén akkor tekinthettük a reakciót pozitívnak, ha mindkét cső teljesen sárga színű lett. Az oxidatív csőnél, ha erős savképzés volt, akkor a cső felső harmadában jelentkezett a sárga színreakció, gyenge savképzés esetén pedig a sárga elszíneződés csak a cső legfelső rétegében volt detektálható. Az utóbbi két esetben a fermentatív csőben nem történt színváltozás.

Ureáz aktivitás (Christensen, 1946)

Ez a teszt arra való, hogy megvizsgáljuk a baktériumok urea bontó képességét, ami az ureáz nevű enzimmel történhet.

Elkészítettük az alaptáplevest, melynek összetétele:

pepton	1,0 g
glükóz	1,0 g
NaCl	5,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Bacto-fenolvörös	0,012 g
agar	18 g
desztillált víz	1000ml

pH=6,8-7,0

sterilizálás: 121°C, 15 perc, 50°C-ra hűtve.

Ehhez a leveshez 100 ml, steril 20%-os urea oldatot adagoltunk. Az így elkészült urea táplevesbe 100 µl baktériumszuszpenziót pipettáztunk és 28 °C-on egy hétig inkubáltuk.

Pozitív reakció esetén a táptalaj pirosas lilára színeződött el, mivel az ureát a baktériumok el tudják hidrolizálni ammóniává, ami lúgos és a fenolvörös indikátort pirosas lilára színezi.

Negatív reakció esetén a táptalaj színe nem változott.

Metilvörös (MV) és Voges-Proskauer (VP) reakciók (Cowan és Steel, 1974)

Ezt a vizsgálatot annak eldöntésére végeztük el, hogy az adott baktérium képes-e a glükózt acetoinná fermentálni.

Elkészítettük a glükóz-foszfát táplevest, melynek összetétele a következő:

Proteose pepton	7,0 g
K ₂ HPO ₄	5,0 g
glükóz	5,0 g
desztillált víz	1000 ml

sterilezés: 121°C-on, 15 perc

A táplevesbe 100 µl baktériumszuszpenziót pipettáztunk és 28 °C-on egy hétig inkubáltuk.

Utána a beoltott glükóz-foszfát táplevesből 1 ml-t átöntöttünk egy másik kémcsőbe, hogy külön-külön el tudjuk végezni az MV és VP reakciókat is. Az MV reakciónál három csepp

metilvörös indikátort, a VP reakciónál 1 ml 5%-os Barrit A (α -naphtol), (96%-os alkoholban oldva) és 0,5 ml Barrit B (KOH) reagenst adtunk a tápleveshez.

Az MV reakciót akkor tekintettük pozitívnak, ha piros elszíneződést figyeltünk meg a táplevesben, ezt a metilvörös indikátor savas közegben, acetoin hatására mutatta. Negatív reakció esetén nem láttunk ilyen színváltozást.

A VP reakció is akkor volt pozitív, ha piros színreakciót láthattunk. Ennek oka az volt, hogy a Barrit A és Barrit B reagens egymással reagált és alkohol illetve oxigén jelenlétében acetoinnal piros diacetyl-kreatin komplexet képezett 20 percen belül. Negatív reakció esetén ez a színváltozás nem volt megfigyelhető.

Indolképzés (Cowan és Steel, 1974)

Ez a teszt arra való, hogy megvizsgáljuk a baktériumok triptofán bontó képességét.

100 μ l baktérium-szuszpenziót pipettáztunk pepton levesbe és egy hétig inkubáltuk 28 °C-on.

Ezek után 200 μ l Kovács-reagenst adtunk a tápleveshez és vortexeltük. A reagens összetétele a következő:

p-dimetil-amino-benzaldehid	5,0 g
izo-amilalkohol	75,0 ml
cc. HCl	25,0 ml

Pozitív reakció esetén pirosas lilás elszíneződést láthattunk a tápleves tetején, ellenkező esetben nem volt megfigyelhető ilyen elszíneződés. Ennek oka, hogy egyes baktériumok képesek a tápközegben lévő fehérjék bomlásából keletkező triptofánt elbontani piroszölősavvá és indollá. Az utóbbit Kovács-reagenssel detektáltuk, ami során pirosas lilás színű rozindol termék keletkezik.

Negatív reakció esetén pedig sárgás elszíneződést figyelhattunk meg.

Disszimilatív nitrátredukció kimutatása (Cowan és Steel, 1974)

Ennek során azt vizsgáltuk, hogy a baktériumoknak van-e nitrát redukáló képességük, ami során nitrit, nitrogéngáz, ammónia illetve dinitrogén-oxid keletkezhet.

Elkészítettük a nitrátlevest, melynek összetétele a következő:

KNO ₃	1,0 g
húskivonat	3,0 g
pepton (Proteose)	5,0 g
desztillált víz	1000 ml

sterilizés: 121°C-on, 15perc

Két kémcsőnyi táplevesbe 100-100 µl baktérium-szuszpenziót pipettáztunk, majd egy hétig inkubáltuk 28 °C-on. Az egyik csőbe Durham-csőveket tettünk.

Nitrogéngáz kimutatása

Pozitív eredmény esetén a Durham-csőben buborékokat figyelhattunk meg, ami a nitrogéngáz fejlődésre utalt. Ellenkező esetben negatívnak tekinthettük a reakciót.

Nitrit kimutatása

Az egyik kémcső tartalmához három csepp Griess-Ilosvay-féle reagenst (szulfanilsav és α -naftilamin 5N ecetsavban oldva) adtunk hozzá.

Az jelentette a pozitív reakciót, ha a táplevesben piros elszíneződést figyelhattunk meg. Ezt egy azofesték okozta, ami úgy keletkezett, hogy a Griess-Ilosvay reagens összetevői reakcióba lépnek egymással. Az ecetsav hatására a keletkező nitritből salétromsav lesz, amitől a szulfinsavból diazónium só keletkezik, ez α -naftilaminnal együtt alkotja a piros azofestéket.

Negatív eredmény esetén nem figyelhattunk meg színváltozást.

Ammónia kimutatása

A másik csőbe három-három csepp Nessler A (kálium-tetrajodo-merkurát(II)) illetve Nessler B (NaOH) oldatot cseppentettünk.

Pozitív reakció esetén narancssárga színváltozást figyelhattunk meg, a keletkező ammónia és a Nessler A és B reagensek által együtt képzett Hg(II)-[amido-trijodi-merkurát(II)] komplex miatt történt. Negatív eredmény esetén nem volt színreakció.

Ökológiai tűrőképesség vizsgálata:

A növekedés hőmérsékleti optimumának meghatározása

Ehhez a teszthez a törzseknek megfelelő tápleveseket készítettünk, majd ezekbe kevés baktérium szuszpenziót pipettáztunk és különböző hőfokú termosztátokba tettük (4°C, 28 °C, 37 °C, 45 °C), ahol egy hétig inkubáltuk. Ezután figyeltük a növekedésüket a kontrollhoz viszonyítva, ami a szobahőmérsékleten (28°C) hagyott kémcsövet jelentette.

Sótűrés vizsgálata

Ennek során elkészítettük a törzseknek megfelelő tápleveseket 0%, 1,5%, 2,5%, 5%-os NaCl koncentrációval, baktérium szuszpenziót pipettáztunk bele és szobahőmérsékleten egy hétig inkubáltuk. Ezek után figyeltük a baktériumok növekedését a 0%-os csőhöz viszonyítva.

pH tolerancia vizsgálata

Ennél a tesztnél ismét megfelelő tápleveseket készítettünk a pH3- pH11-es tartományban, baktérium szuszpenziót oltottunk bele és szobahőmérsékleten egy hétig inkubáltuk. Ezután kiértékeltek a baktériumok növekedését a kontrollhoz viszonyítva, ami a pH7 volt.

Gyorstesztek:

Api[®] ZYM (bioMérieux SA)

Ez a teszt a baktériumok enzimaktivitásának vizsgálatára szolgál, amit egy csíkon lévő 20 mikrocső alkot, aljukon enzimatiszubsztáttal és ennek pufferével.

- Minták előkészítése:
Fiatal baktériumtörzseinkből 5 ml 5 McFarlandes szuszpenziót készítettünk
- A rendszer előkészítése:
Az inkubáló doboz kis vályúiba steril desztillált vizet töltöttünk, hogy biztosítsuk a megfelelő nedvességtartalmat a baktériumok számára.
- A csíkok leoltása:
A mikrocsővekbe 65 µl baktériumszuszpenziót pipettáztunk.
- Inkubáció:
A csíkot 37 °C-on inkubáltuk és 4 óra illetve 1 nap után értékeltük ki az eredményeket.

- Kiértékelés:

Mindegyik mikrocsőbe 1-1 csepp ZYM A és ZYM B reagenst cseppentettünk, ezután a megfigyelt színreakciók alapján következtettünk a reakció kimenetelére (1.táblázat).

	Vizsgált enzim	Eredmény	
		Pozitív	Negatív
1	kontroll	színtelen vagy a minta színe (ha az intenzív színt mutat)	
2	Alkalikus foszfatáz	lila	színtelen vagy nagyon halvány sárga
3	Észteráz (C 4)	lila	
4	Észteráz Lipáz (C 8)	lila	
5	Lipáz (C 14)	lila	
6	Leucin-arilamidáz	narancssárga	
7	Valin-arilamidáz	narancssárga	
8	Cisztin-arilamidáz	narancssárga	
9	Tripszin	narancssárga	
10	α -kimotripszin	narancssárga	
11	Savas foszfatáz	lila	
12	Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	kék	
13	α -galaktozidáz	lila	
14	β -galaktozidáz	lila	
15	β -glükuronidáz	kék	
16	α -glükozidáz	lila	
17	β -glükozidáz	lila	
18	N-acetil- β -glükozaminidáz	barna	
19	α -mannozidáz	lila	
20	α -fukozidáz	lila	

1. táblázat: Api[®] ZYM kiértékelő táblázat

Api[®] 50CH (bioMérieux SA)

Ez a baktériumok szénforrás hasznosításának vizsgálatára való rendszer, amit egy csíkon lévő 50 mikrocső alkot, aljukon a megfelelő szénforrásokkal.

- Minták előkészítése:

Baktérium szuszpenziót készítettünk az Api[®] ZYM esetén már leírt módon, azzal a különbséggel, hogy itt API CHB/E médiumot használtunk hozzá.

- A rendszer előkészítése:

Hasonlóan, mint az Api[®] ZYM rendszernél, az inkubáló doboz kis vályúiba steril desztillált vizet töltöttünk.

- A csíkok leoltása:

A mikrocsőveket feltöltöttük baktérium szuszpenzióval.

- Inkubáció:

Egy napig szobahőmérsékleten inkubáltuk a csíkokat.

- Kiértékelés:

Pozitív eredmény esetén a fenolvörös pH indikátor színe sárgára változott, kivéve az eszkulinos csőnél, mert ott feketére.

3.3 16 S rRNS génjének teljes szekvenálása

DNS izolálása

A baktériumsejteket mechanikus úton, üveggyöngyökkel tártuk fel. Ennek során 100 µl didesztillált vízbe (DNáz mentes) raktunk egy kacsnyi baktériumot. Ezután egy késhegynyi steril üveggyöngyöt adtunk hozzá, majd sejtmalomban őröltük 30/sec frekvencián 2 percig. Az így kapott lizátumot 10000 g-n centrifugáltuk és PCR készülékben 99°C-on 5 percig denaturáltuk. (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 készülék). Utána 10000 g -vel 2-3 percig centrifugáltuk, majd vortexeltük.

A törzsek 16S rRNS génjének polimeráz láncreakcióval való felszaporítása

Törzseink 16S rRNS génjét teljes hosszban (kb. 1500 bázispár) felszaporítottuk polimeráz láncreakció (PCR) segítségével (Homonnay és mtsai, 2006).

10× Taq-puffer (Fermentas)	5 µl
MgCl ₂ -oldat (Fermentas)	4 µl
dNTP (Fermentas; 10mM)	10 µl
DEPC kezelt víz	26 µl
27 f primer ($6,5 \times 10^{-4}$ / µl)	0,5 µl
1492 r primer ($6,5 \times 10^{-4}$ / µl)	0,5 µl
Taq polimeráz (Fermentas; 1 U/ µl)	2 µl
DNS templát	1 µl
BSA (20 mg/ml)	1 µl
	50 µl

Hőprofil:

1. kezdeti denaturáció (98 °C): 5 perc
 2. denaturáció (94 °C): 30 mp
 3. anelláció (52 °C): 30 mp
 4. extenzió (72 °C): 1,5 perc
 5. végső extenzió (72 °C): 10 perc
- } 30 ciklus

Mivel a denaturáció 98 °C-on történt, ahol a Taq polimeráz féléletideje nagyon rövid, így ebből 1 µl helyett 2 µl-t mértünk hozzá a PCR reakcióhoz.

A PCR termékeket agaróz gél elektroforézissel detektáltuk (1% gél TBE pufferben).

A PCR termék megtisztítása

Ez a folyamat az EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit (Bio Basic Inc.) protokollja szerint zajlott le.

1. A PCR terméket egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe tettük és 3×-os térfogatnyi kötőpuffert adtunk hozzá. Kézzel kicsit fel-le forgattuk, hogy összekeveredjen.
2. Ezt az oldatot az EZ-10 oszlopra vittük át és állni hagytuk szobahőmérsékleten 2 percig, majd centrifugáltuk 10000 g-vel 2 percig.
3. Eltávolítottuk az átfolyót, ezután 750 µl mosó oldatot pipettáztunk az oszlopra és 10000 g-vel 2 percig centrifugáltuk.
4. Megismételtük a mosást a 3. pont alapján. Utána még 1 percig centrifugáltuk az oszlopot 10000 g-vel, hogy eltávolítsuk a maradék mosó oldatot is.
5. Az oszlopot áttettük egy üres 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, majd 2x 20 µl elúciós puffert mértünk az oszlopra és szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 percig, majd centrifugáltuk 10000 g-vel 2 percig, hogy a DNS eluálódjon.

Szekvenáló reakció

A mintáinkat BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kittel (Applied Biosystems), négyfajta primerrel (338f, 803f, 1055f, 519r) szekvenáltuk. Egy primerre a reakció összetétele:

Big Dye TM Terminator	1 µl
Big Dye TM Puffer	1,5 µl
primer ($6,5 \times 10^{-4}$ /µl)	0,5 µl
DNS Templát	3 µl
DEPC kezelt víz (Roth)	4 µl
	10 µl

A reakció hőprofilja:

- | | |
|---------------------------------|-------------|
| 1. denaturáció (96 °C): 10 perc | } 30 ciklus |
| 2. anelláció (50 °C): 5 perc | |
| 3. extenzió (60 °C): 4 perc | |

PCR termék tisztítása etanolos precipitációval

A reakcióterméket megtisztítottuk, melynek során 80µl precipitáló reagenst mértünk a mintához [3 µl Na-acetát, 62,5 µl 95%-os etanol, 14,5 µl DEPC kezelt desztillált víz (Roth)]. Vortexeltük, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, ezután 4°C-on 18600 g-vel 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, majd a csapadékhoz 250 µl 70%-os etanolt adtunk. Alapos vortexelést követően 4°C-on 18600 g-vel 10 percig centrifugáltuk, végül a felülúszó leöntése után a csapadékot vákuumcentrifugában kiszárítottuk.

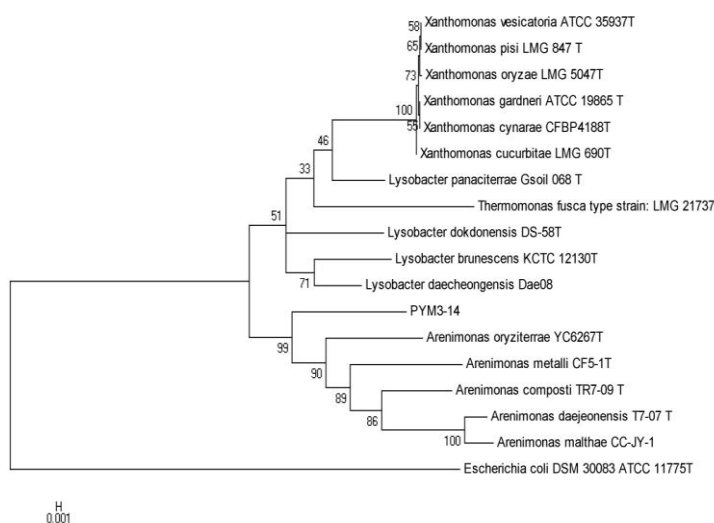
Szekvenciaadatok javítása, kiértékelése

A szekvenciáinkat a MEGA 3.1 programmal (Kumar és mtsai, 2004) illesztettük, majd az EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>) segítségével (Chun és mtsai, 2007) megkerestük a hozzájuk legközelebb álló rokon fajokat. Az új taxonok és a filogenetikailag hozzájuk közel álló rokonaik szekvenciái alapján filogenetikai fákat készítettünk, többféle módszerrel, a dolgozatban a Neighbour-Joining (Saitou és Nei, 1987) módszerrel készült filogenetikai törzsfák szerepelnek.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A *Herminiimonas arsenicoxidans* (Muller és mtsai, 2006) és *Mycobacterium hodleri* (Kleespies és mtsai, 1996) esetén az összehasonlításhoz szakirodalmi adatokra támaszkodtunk, mivel autentikus törzsek nem álltak rendelkezésre a vizsgálatokhoz.

4.1. PYM3-14 baktériumtörzs fenotípusos és genotípusos jellemzői

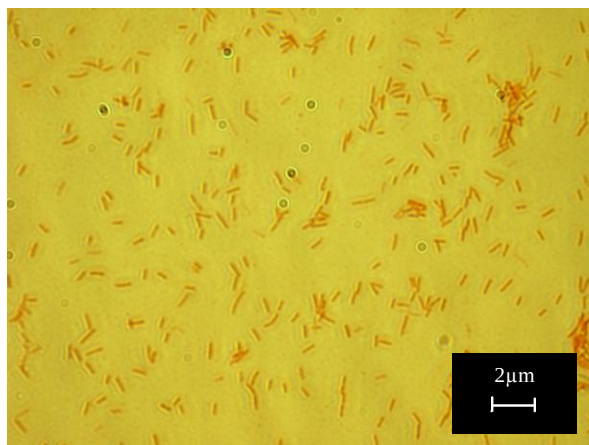


3. ábra: PYM3-14 és rokonai teljes 16S rDNS szekvenciája alapján készült filogenetikai fa. 1000 lókuszonként 1 nukleotid eltérés

A filogenetikai fa (3. ábra) alapján az általunk izolált törzshöz az *Arenimonas* (Aslam és mtsai, 2009) és a *Lysobacter* (Ten és mtsai, 2009) nemzetségek állnak a legközelebb, melyek a *γ-Proteobacteria Xanthomonadaceae* (Synder és mtsai, 2010) családjába tartoznak. A PYM3-14 legközelebbi rokonai az *Arenimonas oryzae* (Aslam és mtsai, 2009) és a

Lysobacter brunescens (Christensen és Cook, 1978). Az PYM3-14-hez a 16S rDNS szekvenciája alapján meghatározható hasonlóság az *Arenimonas oryzae* esetén 95,24%, *Lysobacter brunescens* esetén 94,47%. A filogenetikai törzsfát vizsgálva a PYM3-14 külön ágat képvisel. Azt, hogy az általunk izolált baktériumtörzs új fajt képvisel-e a nemzetségen belül, vagy teljesen új nemzetség, fenotípusos tulajdonságaik és kemotaxonómiai markereik alapján lehet eldönteni.

Az 1. képen a PYM3-14 morfológiája látható:



1. kép: PYM3-14 egyszerű festéssel készült mikroszkópi képe

A PYM3-14 részletes tulajdonságait az 1. táblázat tartalmazza.

Az általunk izolált PYM3-14 törzs számos eltérést mutat a hozzá legközelebb álló *Arenimonas oryztterrae*től (DSM 21050) (1. táblázat). E szerint a lipáz aktivitás jellemző a törzsünkre, míg az autentikus törzsből hiányzik. Ellenben az ammonifikáció; valin-arilamidáz, cisztin-arilamidáz, α -kimotripszin aktivitás és mannitol hasznosítás csak az *Arenimonas oryztterrae*-re jellemző. A PYM3-14 1,5 %-os sókoncentráción jobban nő az *Arenimonas oryztterrae*nél, viszont az autentikus törzs 37°C-on és pH5-ön nő jobban, mint a PYM3-14. A sejtek méretében is eltérés figyelhető meg.

A PYM3-14 törzset összehasonlítva a *Lysobacter brunescens* típustörzsével (DSM 6979) (2. táblázat), pH5 és pH11 esetén a PYM3-14 nő, a *Lysobacter brunescens* viszont nem. Az α -glükózidáz aktivitás, N-acetil glükózamin, indol és eszkulin hasznosítás, a 45°C és 2,5%-os só tőrése csak az autentikus törzsre jellemző. A sejtek alakjukban, méretükben is eltérnek egymástól. A *Lysobacter brunescens* 37°C –on jobban nő a törzsünkénél. A 37°C-on való növekedést tekintve a PYM3-14 törzs mindkét rokon fajtól elkülönül.

Megállapítható, hogy genotípusos vizsgálatainkat alátámasztva a PYM3-14 törzs fenotípusosan is egyértelműen elkülönül rokonaitól.

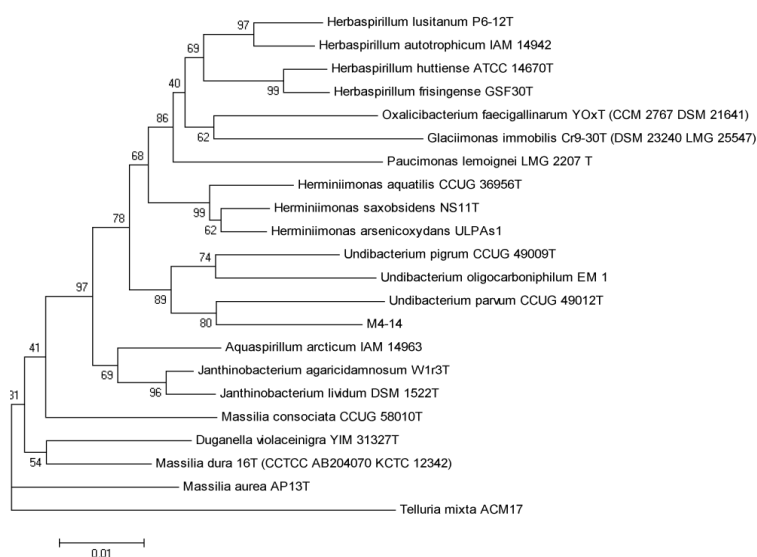
Génbanki száma HE616177, törzsgyűjteményi száma DSM 25526, javasolt új taxon neve: *Arenimonas subflavus*, indikálva sárgás színét.

Faj neve		<i>Lysobacter brunescens</i>	<i>Arenimonas oryzae</i>	Faj neve/törzs jelzése	PYM3-14	<i>Lysobacter brunescens</i> DSM 6979	<i>Arenimonas oryzae</i> DSM21050
Törzs jelzése	PYM3-14	DSM 6979	DSM 21050	α -metil-D-mannozid	-	-	-
Táptalajok	R2A	R2A	R2A	N-acetil-glükózamin	-	+	-
KLASSZIKUS FENOTÍPUSOS TESZTEK				Arbutin	-	-	-
Keményítő	-	-	-	Arbutin	-	-	-
Glü (Oxidatív)	-	-	-	Eszculin	-	+	-
Glü (Fermentatív)	-	-	-	Szalicin	-	-	-
Ureáz	-	-	-	Cellobióz	-	-	-
Metilvörös	-	-	-	Maltóz	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	Laktóz	-	-	-
Indol	-	+	-	Melibióz	-	-	-
NO ₃ – N ₂	-	-	-	Szukróz	-	-	-
NO ₃ – NO ₂	-	-	-	Trehalóz	-	-	-
NO ₃ – NH ₃	-	-	+	Inulin	-	-	-
API ZYM				Melezitóz	-	-	-
Alkalikus foszfatáz	+	+	+	D-raffinóz	-	-	-
Észteráz (C4)	+	-	+	Keményítő	-	-	-
Észteráz lipáz C8)	+	+	+	Glikogén	-	-	-
Lipáz (C14)	+	+	-	Xilitol	-	-	-
Leucin-arilamidáz	+	+	+	β -gentiobióz	-	-	-
Valin-arilamidáz	-	-	+	D-turanóz	-	-	-
Cisztin-arilamidáz	-	-	+	D-lixóz	-	-	-
Tripszin	+	+	+	D-tagatóz	-	-	-
α -kimo tripszin	-	-	+	D-fukóz	-	-	-
Savas foszfatáz	+	+	+	L-fukóz	-	-	-
Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	+	+	+	D-arabitol	-	-	-
α -galaktozidáz	-	-	-	L-arabitol	-	-	-
β -galaktozidáz	-	-	-	Glükonát	-	-	-
β -glükuronidáz	-	-	-	2-keto-glükonát	-	-	-
α -glükozidáz	-	+	-	5-keto-glükonát	-	-	-
β -glükozidáz	-	-	-	MORFOLOGIA			
N-acetil- β -glükozaminidáz	-	-	-	Gram festés	-	-	-
α -mannozidáz	-	-	-	Alak	pálcika	pálcika, fonal	pálcika
α -fukozidáz	-	-	-	Csoportosulás	magányos	magányos	magányos, párokban, csoportosulva
API 50CH				Méretek (μ m)	0,2-0,6× 0,8-2,1	0,2-0,5× 7- 70	0,5-0,6×2,3- 2,6
Glicerín	-	-	-	ÖKOLOGIAI TESZTEK			
Eritriol	-	-	-	4°C	-	-	-
D-arabinóz	-	-	-	28°C	+++	++	+++
L-arabinóz	-	-	-	37°C	+	+++	++++
Ribóz	-	-	-	45°C	-	+++	-
D-xilóz	-	-	-	pH3	-	-	-
L-xilóz	-	-	-	pH4	-	-	-
Adonitol	-	-	-	pH5	+	-	+++
β -metil-D-xilozid	-	-	-	pH6	+++	++	+++
Galaktóz	-	-	-	pH7	+++	+++	+++
D-glükóz	-	-	-	pH8	+++	+++	+++
D-fruktóz	-	-	-	pH9	++	+++	++
D-mannóz	-	-	-	pH10	+	+	+
L-szorbóz	-	-	-	pH11	+	-	+
Ramnóz	-	-	-	0%NaCl	+++	+++	+++
Dulcitol	-	-	-	1,5%NaCl	+++	++	+
Inozitol	-	-	-	2,5%NaCl	-	+	-
Mannitol	-	-	+	5%NaCl	-	-	-
Szorbitol	-	-	-				

2. táblázat: A PYM3-14 és legközelebbi rokonainak fenotípusos tulajdonságai (+: gyenge pozitív reakció)

4.2 M4-14 baktériumtörzs fenotípusos és genotípusos jellemzői

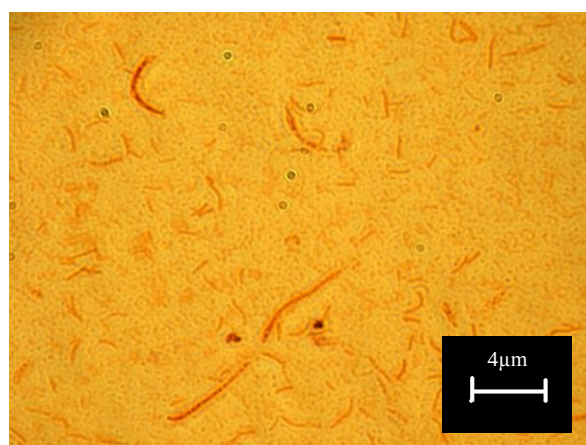
A filogenetikai fa (4. ábra) alapján az általunk izolált törzs Az *Undibacterium* nemzetséggel



4. ábra: M4-14 törzs és rokonai teljes 16S rDNS szekvenciája alapján készült filogenetikai fa. 100 lókuszonként 1 nukleotid eltéré

közeli (Kämpfer és mtsai, 2007), a *Herminiimonas* (Muller és mtsai, 2006) nemzetséggel távoli rokonságot mutat. Ezek a taxonok a *β-Proteobacteria* *Oxalobacteriaceae* családjába tartoznak. Az M4-14 törzs legközelebbi rokonai az *Undibacterium parvum* (Eder et al., 2011), az *Undibacterium pigrum* (Kämpfer és mtsai, 2007) és a *Herminiimonas arsenicoxidans* (Muller és mtsai, 2006). Az M4-14-hez az 16S rDNS szekvenciája alapján meghatározható hasonlóság az *Undibacterium parvum* esetén 96,33%, az *Undibacterium pigrum*nál 96,05%, a *Herminiimonas arsenicoxidans*nál 96,15%. Az M4-14 baktériumtörzs a filogenetikai fán külön ágat képvisel.

A 2. képen az M4-14 egyszerű festéssel készült képe látható:



2. kép: M4-14 egyszerű festéssel készült mikroszkópi képe

A képen jól látszik, hogy a hosszabb-rövidebb pálcikák mellett fonalas formák megjelenése is előfordul, ami legközelebbi rokonaira nem jellemző.

Az M4-14 részletes tulajdonságait a 3. táblázat tartalmazza.

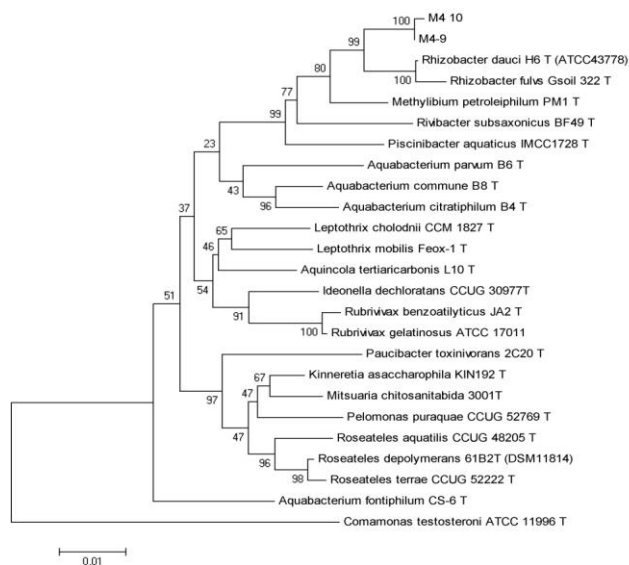
Faj neve		<i>Undibacterium pigrum</i>	Faj neve/törzs jelzése	M4-14	<i>Undibacterium pigrum</i> DSM 19792
Törzs jelzése	M4-14	DSM 19792	Szorbitol	-	-
Táptalajok	R2A	R2A	α -metil-D-mannozid	-	-
KLASSZIKUS FENOTÍPUSOS TESZTEK			N-acetil glükózamin	-	-
Foszfátáz	+++	+++	Amigdalín	-	-
Glü (Oxidatív)	-	-	Arbutin	-	-
Glü(Fermentatív)	-	-	Eszculin	-	+
Ureáz	-	-	Szalicin	-	-
Metilvörös	-	-	Cellobióz	-	-
Voges-Proskauer	-	-	Maltóz	-	-
Indol	-	-	Laktóz	-	-
NO ₃ – N ₂	-	+	Melibióz	-	-
NO ₃ – NO ₂	-	+	Szukróz	-	-
NO ₃ – NH ₃	+	+++	Trehalóz	-	-
API ZYM			Inulin	-	-
Alkalikus foszfátáz	+	+	Melezitóz	-	-
Észteráz(C4)	-	+	D-raffinóz	-	-
Észteráz lipáz (C8)	-	+	Keményítő	-	-
Lipáz(C14)	-	-	Glikogén	-	-
Leucin-arilamidáz	+	+	Xilitol	-	-
Valin-arilamidáz	+	+	β -gentiobióz	-	-
Cisztin-arilamidáz	-	-	D-turanóz	-	-
Tripszin	-	+	D-lixóz	-	-
α -kimotripszin	+	-	D-tagatóz	-	-
Savas foszfátáz	+	+	D-fukóz	-	-
Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	+	+	L-fukóz	-	-
α -galaktozidáz	-	-	D-arabitol	-	-
β -galaktozidáz	-	-	L-arabitol	-	-
β -glükuronidáz	-	-	Glükonát	-	-
α -glükozidáz	-	+	2-keto-glükonát	-	-
β -glükozidáz	-	-	5-keto-glükonát	-	-
N-acetil- β -glükozaminidáz	-	-	MORFOLÓGIA		
α -mannozidáz	-	-	Gram festés	-	-
α -fukozidáz	-	-	Alak	fonal, pálcika, hajlított	pálcika
API 50CH			ÖKOLÓGIAI TESZTEK		
Glicerín	-	-	4°C	-	++
Eritriol	-	-	28°C	+++	+++
D-arabinóz	-	-	37°C	-	++
L-arabinóz	-	-	45°C	-	-
Ribóz	-	-	pH3	-	-
D-xilóz	-	-	pH4	-	-
L-xilóz	-	-	pH5	-	+++
Adonitol	-	-	pH6	++	+++
β -metil-D-xilozid	-	-	pH7	+++	+++
Galaktóz	-	-	pH8	+++	+++
D-glükóz	-	-	pH9	+++	+++
D-fruktóz	-	-	pH10	+	+++
D-mannóz	-	-	pH11	-	++
L-szorbóz	-	-	0%NaCl	+++	+++
Ramnóz	-	-	1,5%NaCl	+++	++++
Dulcitol	-	-	2,5%NaCl	++	-
Inozitol	-	-	5%NaCl	-	-
Mannitol	-	-			

3. táblázat: Az M4-14 és közeli rokonának fenotípusos tulajdonságai (+: gyenge pozitív reakció; szürke szín: M4-14 eltér mindkét autentikus törzstől)

Törzsünket összehasonlítva az *Undibacterium pigrum* típustörzsével (DSM 19792) (2. táblázat), az α -kimotripszin aktivitás csak az M4-14-re igaz. A nitrogéngáz képzés, nitrát nitritté redukálása, C₄ észteráz, C₈ észteráz lipáz, tripszin, α -glükózidáz aktivitás és az eszkulin hasznosítása csak az autentikus törzsre igaz, az M4-14-re nem. Az M4-14 törzset fenotípusos tulajdonságai (2. táblázat) alapján összehasonlítva a *Herminiimonas arsenicoxidans* típustörzsével (DSM 17148), a nitrogéngáz képzés és a 4°C-on való növekedés az M4-14 törzsre nem, az autentikus fajra viszont jellemző, illetve méretükben, alakjukban is eltérnek egymástól. (Az autentikus törzsre a hajlított vagy bunkós végű pálcika és 0,5 μ m -0,7 μ m $\times$ 1,0 μ m -2,5 μ m méret jellemző).

Az M4-14 és a *Herminiimonas arsenicoxidans* törzsek is rendelkeznek az ammonifikáció, a 28 °C, a pH7 és pH8 tűrésének tulajdonságaival, illetve Gram festődésük is megegyezik. A szukróz, inulin, maltóz, D-glükóz fermentatív hasznosítása, ureáz aktivitás, indol képzés, ammonifikáció, 37 °C, 45 °C-on való növekedés sem az M4-14 –re sem a *Herminiimonas arsenicoxidans*ra nem jellemző. Megállapítható, hogy genotípusos vizsgálatainkat alátámasztva az M4-14 törzs fenotípusosan is egyértelműen elkülönül rokonaitól.

Génbanki száma HE616176, javasolt új taxon neve *Undibacterium hungaricum*, jelezve származását.



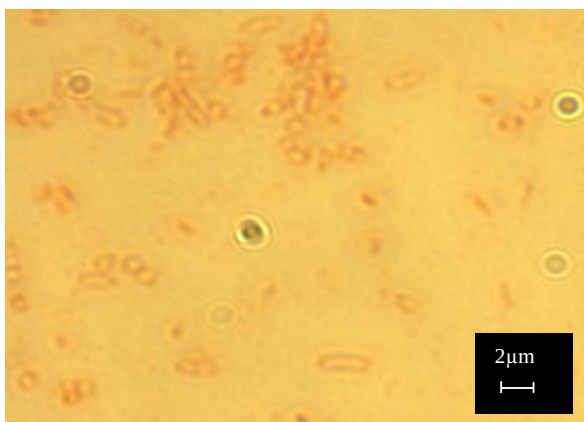
5. ábra- M9 és M4-10 törzsek és rokonai teljes 16S rDNS szekvenciája alapján készült filogenetikai fa. 100 lókuszonként 1 nukleotid eltérés

4.3 M4-9 és M4-10 baktériumtörzsek fenotípusos és genotípusos jellemzői

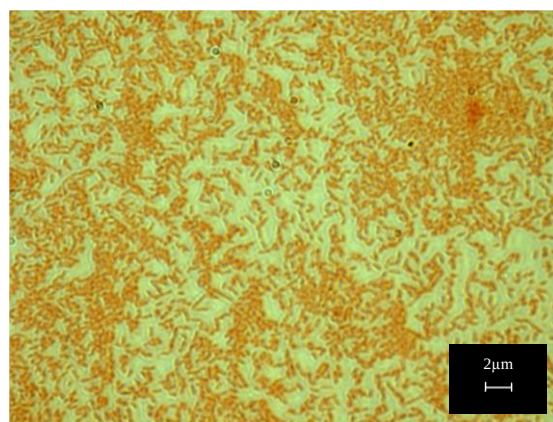
Az M4-9 és M4-10 törzsek a filogenetikai fa szerint (5. ábra) a *Rhizobacter* nemzetséghez állnak közel (Goto és Kuwata, 1988), ami a γ -*Proteobacteria* *Pseudomonadaceae* családjába tartozik. Az általunk izolált törzsek legközvetlenebb rokonai a *Rhizobacter dauci* (Goto és Kuwata, 1988) és a *Rhizobacter fulvus*

(Yoon és mtsai, 2007). Az 16S rDNS szekvenciája alapján meghatározható hasonlóság az M4-9 és M4-10 között 99,86%, így ezek nagy valószínűséggel egy fajt alkotnak, ezt a DNS-DNS hibridizáció dönti el. E hasonlóság az M4-9 és M4-10-hoz a *Rhizobacter daucinál* 98,55%, a *Rhizobacter fulvusnál* 98,01%. Az M4-9 és M4-10 törzsek a filogenetikai fán

elkülönülnek ugyan a legközelebbi rokonaiktól, egymáshoz viszont nagyon közel állnak. Az, hogy egyáltalán új faj-e, a fenotípus dönti el. A 3. és 4. képen az M4-9 illetve az M4-10 morfológiája látható:



3. kép: M4-9 egyszerű festéssel készült mikroszkópi képe



4. kép: M4-10 egyszerű festéssel készült mikroszkópi képe

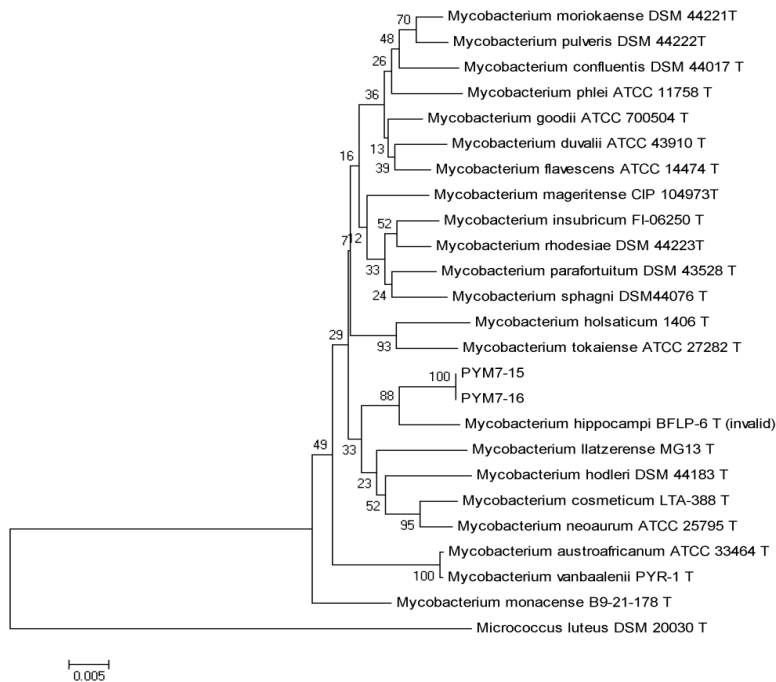
Ha összehasonlítjuk az M4-9 illetve M4-10 baktériumtörzseket fenotípusos tulajdonságaik alapján egymással, illetve legközelebbi rokonuk, a *Rhizobacter dauci* típustörzsével (DSM 11587), majd a *Rhizobacter fulvus* típustörzsével (DSM 19916), az M4-10 rendelkezik a nitrát nitritté való redukálásának tulajdonságával, míg az M4-9 nem, az M4-9 viszont nő 4°C-on és van cisztin-arilamidáz aktivitása az M4-10-el ellentétben. Így a két törzs közti eltérés nem jelentős, ami valószínűsíti azonos fajhoz való tartozásukat. A nitrát nitritté való redukciója csak az M4-10-re és a *Rhizobacter fulvus*-ra jellemző, míg a valin-arilamidáz aktivitás csak a *Rhizobacter fulvus*-nál nem fordul elő. A β -glükózidáz aktivitás csak a *Rhizobacter fulvus*-nál van jelen. Az eritriol-, L-arabinóz-, ribóz-, D-mannóz-, szukróz-, glikogénhasznosítás, pH11, 1,5%NaCl, 2,5%NaCl toleranciája illetve a hajlított pálcika alak csak a *Rhizobacter daucira* jellemző. Az M4-9 törzs nőtt 4°C-on is, míg a többi nem. A cisztin-arilamidáz aktivitás csak az M4-10 esetén hiányzik. Megállapítható, hogy míg a Naftol-AS-BI-foszfohidroláz működés, illetve a hosszabb méret csak az M4-9-re és M4-10-re igaz és az autentikusokra nem, addig a foszfatáz és alkalikus foszfatáz aktivitás, keményítő- illetve eszkulinbontás, pH5 és pH10 tűrése mindkét rokon fajra jellemző és az új törzsekre nem. Méretüket tekintve is eltérnek törzseink az autentikusoktól: az általunk izolált baktériumok nagyobbak. Eredményeink szerint az M4-9 és M4-10 baktériumtörzsek egymástól nem, az autentikus fajoktól viszont elkülönülnek, valószínűleg azonos fajhoz tartoznak, de a *Rhizobacter* nemzetségen belül új fajt képviselnek. Ennek alátámasztására DNS-DNS hibridizáció elvégzése szükséges. Az M4-9 és M4-10 tulajdonságait a 4. táblázat tartalmazza:

Faj neve			<i>Rhizobacter dauci</i>	<i>Rhizobacter fulvus</i>	Faj neve/törzs jelzése	M4-9	M4-10	<i>Rhizobacter dauci</i> DSM11587	<i>Rhizobacter fulvus</i> DSM 19916
Törzs jelzése	M4-9	M4-10	DSM 11587	DSM 19916	Szorbitol	-	-	-	-
Táptalajok	R2A	R2A	YM	R2A	α -metil-D-mannozid	-	-	-	-
KLASSZIKUS FENOTÍPUSOS TESZTEK					N-acetil glükózamin	-	-	-	-
Keményítő	-	-	+	+	Amigdalín	-	-	-	-
Foszfátáz	-	-	+++	+++	Arbutin	-	-	-	-
Glü (Oxidatív)	-	-	-	-	Eszculin	-	-	+	+
Glü (Fermentatív)	-	-	-	-	Szalicin	-	-	-	-
Ureáz	-	-	-	-	Cellobióz	-	-	-	-
Metilvörös	-	-	-	-	Maltóz	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	Laktóz	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	Melibióz	-	-	-	-
NO ₃ – N ₂	-	-	-	-	Szukróz	-	-	+	-
NO ₃ – NO ₂	-	+	-	+	Trehalóz	-	-	-	-
NO ₃ – NH ₃	-	-	-	-	Inulin	-	-	-	-
APY ZYM					Melezitóz	-	-	-	-
Alkalikus foszfátáz	-	-	+	+	D-raffinóz	-	-	-	-
Észteráz(C4)	+	+	+	+	Keményítő	-	-	-	-
Észteráz lipáz C8)	+	+	+	+	Glikogén	-	-	+	-
Lipáz(C14)	-	-	-	-	Xilitol	-	-	-	-
Leucin-arilamidáz	+	+	+	+	β -gentiobióz	-	-	-	-
Valin-arilamidáz	+	+	+	-	D-turanóz	-	-	-	-
Cisztin-arilamidáz	+	-	+	+	D-lixóz	-	-	-	-
Tripszin	-	-	-	-	D-tagatóz	-	-	-	-
α -kimotripszin	-	-	-	-	D-fukóz	-	-	-	-
Savas foszfátáz	-	-	-	-	L-fukóz	-	-	-	-
Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	+	+	-	-	D-arabitol	-	-	-	-
α -galaktozidáz	-	-	-	-	L-arabitol	-	-	-	-
β -galaktozidáz	-	-	-	-	Glükonát	-	-	-	-
β -glükuronidáz	-	-	-	-	2-keto-glükonát	-	-	-	-
α -glükozidáz	-	-	-	-	5-keto-glükonát	-	-	-	-
β -glükozidáz	-	-	-	+	MORFOLÓGIA				
N-acetil- β -glükozaminidáz	-	-	-	-	Gram	-	-	-	-
α -mannozidáz	-	-	-	-	Alak	pálcika	pálcika	egyenes v. hajlított pálcika	pálcika
α -fukozidáz	-	-	-	-	hossz (µm)	0,4-0,8×1,6-3,5	0,3-0,7×0,8-4,0	0,9-1,3×2,1-2,5	0,4-0,5×0,8-1,3
API 50CH					ÖKOLOGIAI TESZTEK				
Glicerín	-	-	-	-	4°C	+	-	-	-
Eritriol	-	-	+	-	28°C	+++	+++	+++	+++
D-arabinóz	-	-	-	-	37°C	-	-	-	-
L-arabinóz	-	-	+	-	45°C	-	-	-	-
Ribóz	-	-	+	-	pH3	-	-	-	-
D-xilóz	-	-	-	-	pH4	-	-	-	-
L-xilóz	-	-	-	-	pH5	-	-	++	++
Adonitol	-	-	-	-	pH6	+++	+++	+++	++
β -metil-D-xilozid	-	-	-	-	pH7	+++	+++	+++	+++
Galaktóz	-	-	-	-	pH8	+++	+++	+++	++
D-glükóz	-	-	-	-	pH9	++	++	++	++
D-fruktóz	-	-	-	-	pH10	-	-	++	+
D-mannóz	-	-	+	-	pH11	-	-	++	-
L-szorbóz	-	-	-	-	0%NaCl	+++	+++	+++	+++
Ramnóz	-	-	-	-	1,5%NaCl	-	-	+++	-
Dulcitol	-	-	-	-	2,5%NaCl	-	-	+++	-
Inozitol	-	-	-	-	5%NaCl	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-					

4.táblázat: Az M4-9, M4-10 és legközelebbi rokonainak fenotípusos tulajdonságai (+: gyenge pozitív reakció; szürke szín: M4-9 és M4-10 eltér mindkét autentikus törzstől)

Az M4-9 baktériumtörzshöz a HE616174, az M4-10 baktériumtörzshöz a HE616175 génbanki szám tartozik.

4.4 PYM7-15 és PYM7-16 baktériumtörzsek fenotípusos és genotípusos jellemzői



6. ábra: PYM7-15 és PYM7-16 törzsek és rokonai teljes 16S rDNS szekvenciája alapján készült filogenetikai fa. 100 lókuszonként 1 nukleotid eltérés

Az általunk izolált törzsekhez a filogenetikai fa (6. ábra) alapján a *Mycobacterium* nemzetség tagjai állnak a legközelebb, ami az *Actinobacteria* törzsbe tartozik. A PYM7-15 és PYM7-16 legközelebbi rokonai a *Mycobacterium hippocampi* (invalid, Balcázar et al, 2011) és a *Mycobacterium*

ilatzerense. (Gomila és mtsai, 2008). A 16S rRNS

gén szekvenciája alapján a PYM7-15 és PYM7-16 között a hasonlóság 100%. Ezeknek a *Mycobacterium hippocampi*hoz 98,62%, *Mycobacterium hodleri*hoz szintén 98,62%.

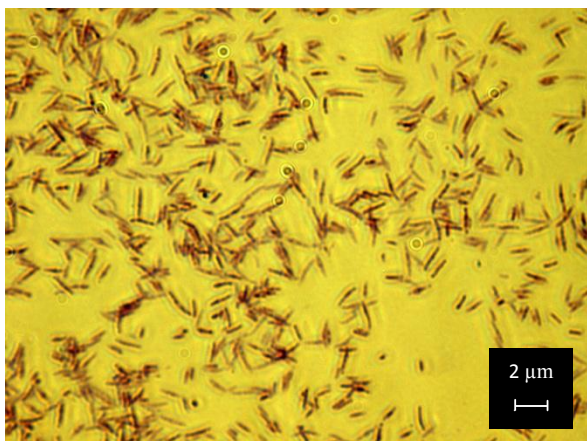
A PYM7-15 és PYM7-16 törzsek fenotípusos tulajdonságait tekintve ugyan elkülönülésük a legközelebbi rokonaiktól nem jelentős, elmarad az általános fajdefinícióban megkövetelt 98%-os hasonlóság, ugyanakkor a *Mycobacterium* nemzetség fajai taxonómiai revízió alatt állnak. Az általunk izolált törzsek pontos taxonómiai pozícióját DNS-DNS hibridizációval valamint részletes kemotaxonómiai vizsgálatok alapján kívánjuk megállapítani.

A PYM7-15 és PYM7-16 tulajdonságait az 5. táblázat tartalmazza:

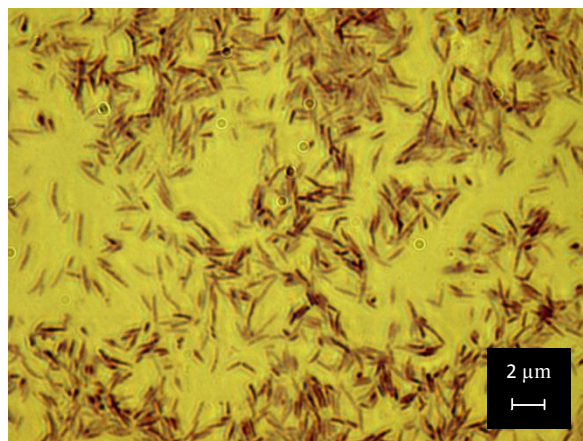
Törzs jelzése	PYM7-15	PYM7-16	Törzs jelzése	PYM7-15	PYM7-16
Táptalajok	R2A	R2A	Inozitol	-	-
KLASSZIKUS FENOTÍPUSOS TESZTEK			Mannitol	-	-
TW80	+	+	Szorbitol	-	-
Keményítő	-	-	α -metil-D-mannozid	-	-
Foszfátáz	-	+	N-acetil glükózamin	-	-
Glü (Oxidatív)	-	-	Amigdalín	-	-
Glü(Fermentatív)	-	-	Arbutin	-	-
Ureáz	-	-	Eszculin	-	-
Metilvörös	-	-	Szalicin	-	-
Voges-Proskauer	-	-	Cellobióz	-	-
Indol	-	-	Maltóz	-	-
NO ₃ – N ₂	-	-	Laktóz	-	-
NO ₃ – NO ₂	+	+	Melibióz	-	-
NO ₃ – NH ₃	-	+	Szukróz	-	-
API ZYM			Trehalóz	-	-
Alkalikus foszfátáz	+	-	Inulin	-	-
Észteráz(C4)	+	+	Melezitóz	-	-
Észteráz lipáz (C8)	+	+	D-raffinóz	-	-
Lipáz(C14)	-	-	Keményítő	-	-
Leucin-arilamidáz	+	+	Glikogén	-	-
Valin-arilamidáz	+	+	Xilitol	-	-
Cisztin-arilamidáz	+	+	β -gentiobióz	-	-
Tripszin	-	-	D-turanóz	-	-
α -kimotripszin	-	-	D-lixóz	-	-
Savas foszfátáz	+	+	D-tagatóz	-	-
Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	+	+	D-fukóz	-	-
α -galaktozidáz	-	-	L-fukóz	-	-
β -galaktozidáz	-	-	D-arabitol	-	-
β -glükuronidáz	-	-	L-arabitol	-	-
α -glükozidáz	+	+	Glükonát	-	-
β -glükozidáz	-	-	2-keto-glükonát	-	-
N-acetil- β -glükózaminidáz	-	-	5-keto-glükonát	-	-
α -mannozidáz	-	+	ÖKOLÓGIAI TESZTEK		
α -fukozidáz	-	-	4°C	-	-
API 50CH			28°C	+++	+++
Glicerín	-	-	37°C	+	-
Eritriol	-	-	45°C	-	-
D-arabinóz	-	-	pH3	++	+
L-arabinóz	-	-	pH4	+++	+++
Ribóz	-	-	pH5	+++	+++
D-xilóz	-	-	pH6	+++	+++
L-xilóz	-	-	pH7	+++	+++
Adonitol	-	-	pH8	+++	+++
β -metil-D-xilozid	-	-	pH9	+++	++
Galaktóz	-	-	pH10	++	+
D-glükóz	-	-	pH11	+	+
D-fruktóz	-	-	0%NaCl	+++	+++
D-mannóz	-	+	1,5%NaCl	+++	+++
L-szorbóz	-	-	2,5%Cl	+++	+++
Ramnóz	-	-	5%NaCl	+	+
Dulcitol	-	-			

5. táblázat: A PYM7-15 és PYM7-16 fenotípusos tulajdonságai (+: gyenge pozitív reakció)

Az 5. és 6. képen a PYM-15 és PYM7-16 morfológiája látható: szabályos és szabálytalan pálcák, időnként bunkós végű sejtekkel.



5. kép: PYM7-15 egyszerű festéssel készült mikroszkópi képe



6. kép: PYM7-16 egyszerű festéssel készült mikroszkópi képe

A PYM7-15 és PYM7-16 törzseket összehasonlítjuk egymással illetve a filogenetikailag hozzájuk közel álló *Mycobacterium hodleri* típustörzsével (DSM 44183). Foszfataáz, α -mannozidáz aktivitással, ammonifikáció, D-mannóz hasznosításának tulajdonságával a PYM7-16 rendelkezik, míg az alkalikus foszfataáz aktivitás és 37°C-on való növekedés csak a PYM7-15 törzse jellemző. Az autentikus törzzsel is összehasonlítva törzseinket, a 4°C-on, 45°C-on való növekedés nem figyelhető meg sem a PYM7-15, sem a PYM7-16, sem a *Mycobacterium hodleri* esetén, viszont 28°C-on mindegyik nőtt. A 37°C-on való növekedés csak az PYM7-15-re jellemző.

A PYM7-15 baktériumtörzshöz a HE616180, a PYM7-16 baktériumtörzshöz pedig a HE616181 génbanki szám tartozik.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Megerősítést nyert, hogy az általunk izolált baktériumok többsége a tudomány számára új taxonokhoz tartoznak. Annak eldöntésére, hogy pontosan mely taxonómiai szinten (új faj, új nemzetség) különülnek el, még további vizsgálatok szükségesek: részletes kemotaxonómiai elemzések (citoplazma membrán zsírsavak, sejtfalösszetevők, respiratorikus kinonok, poláris lipidek), esetenként DNS-DNS hibridizáció, Riboprint vizsgálat.

Az általunk új taxonoknak ítélt törzsek egyikének (PYM3-14) egy képviselőjét már a DSMZ törzsgyűjteményében leraktuk, ahol törzsgyűjteményi számot is kapott, a többinél az eljárás folyamatban van. Ezen kívül a szekvenciáikat internetes adatbázisban helyeztük el.

6. FELHASZNÁLT IRODALOM

Aslam Z., Park J.H., Kim S.W., Jeon C.O., Chung Y.R. (2009): *Arenimonas oryzae* sp. nov, isolated from a field of rice (*Oryza sativa* L.) managed under a no-tillage regime, and reclassification of *Aspromonas composti* as *Arenimonas composti* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59:2967-2972.

Buchanan (1970): National Archives of Canada, vol.6.

Christensen P. és Cook F.D. (1978): *Lysobacter*, a New Genus of Nonfruiting, Gliding Bacteria with a High Base Ratio. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 367-393.

Christensen W.B. (1946): Urea decomposition as a mean of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella*. *Journal of Bacteriology*. 52:461-466.

Chun J., Lee J.-H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K., Lim Y.-W. (2007): EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57:2259–2261.

Claus M. (1992): A standardised Gram staining procedure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8:451-452.

Cowan S.T., Steel K.J. (1974): Manual of identification of medical bacteria. University Press, Cambridge.

Crick F. H. C. (1958): The biological replication of macromolecules. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 12:138–163.

Donlan R. M. (2002): Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9):881–890.

Eder W., Wanner G., Ludwig W., Busse H.J., Ziemke-Kängeler F. és Lang E. (2011): Description of *Undibacterium oligocarboniphilum* sp. nov., isolated from purified water, and *Undibacterium pigrum* strain CCUG 49012 as the type strain of *Undibacterium parvum* sp. nov., and emended descriptions of the genus *Undibacterium* and the species *Undibacterium pigrum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61:384-391.

Gomila M., Ramirez A., Gascó J., Lalucat J. (2008): *Mycobacterium ilatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58:2769–2773.

Goto M. és Kuwata H. (1988): *Rhizobacter daucus* gen.nov., sp.nov., the Causal Agent of Carrot Bacterial Gall. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 233-239.

Homonnay Z. G., Kéki Z., G.-Tóth L., Tóth E. (2006): Balatoni planktonikus rákok (*Daphnia cucullata*, *Eudiaptomus gracilis*) tenyésztető baktérium-partnerei. *Hidrológiai Közöny*. 86:51-53.

Hugh R., Leifson E. (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 66:24-26.

Kämpfer P., Rosselló-Mora R., Hermansson M., Persson F., Huber B., Falsen E., Busse H.-J. (2007): *Undibacterium pigrum* gen.nov., sp.nov., isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57:1510-1515.

Kleespies M., Kroppenstedt R.M., Rainey F.A., Webb L.E., és Stackebrandt E. (1996) : *Mycobacterium hoderi* sp. nov., a New Member of the Fast-Growing *Mycobacteria* Capable of Degrading Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 683-687.

Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004): MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5: 150-163.

Márialigeti Károly (1996): A baktériumok ellentmondásos helye a biológiai sokféleségben. *Természet Világa*, II. különszáma: 58-61.

Muller D., Simeonova D. D., Riegel P., Mangenot S., Koechler S., Lièvremon D., Bertin P.N. és Lett M.-C. (2006): *Herminiimonas arsenicoxydans* sp. nov., a metalloresistant bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 1765–1769.

Owen R. S. (1860): *Palaeontology or a Systematic summary of extinct animals and geological relatives*. Adam and Charles Black, Edinburgh. 5.

Pace N. R. (2009): Problems with „Procaryote”. *Journal of Bacteriology*. 191(7):2008-2010.

Reasoner D.J., Geldreich E.E. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*. 49:1-7.

Saitou N., Nei M. (1987): The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.

Sapp J. (2005): The Prokaryote-Eukaryote Dichotomy: Meanings and Mythology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69(2):292-305.

Smibert R. M. és Krieg N. R. (1994): Phenotypic characterisation In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Szerkesztette: Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. Washington DC: American Society for Microbiology. 603-711.

Stainer R. Y. (1970): Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance, In: *Organization and control in prokaryotic cells.*: Charles H. P. és Knight B. C. (Editors) Twentieth Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, England. 1–38.

Sutcliffe I. C., Trujillo M. E., Goodfellow M. (2011): A call to arms for systematists: revitalising the purpose and practises underpinning the description of novel microbial taxa. *Antonie van Leeuwenhoek*. DOI 10.1007/s10482-011-9664-0.

Snyder E. E., Shalom J. M. és Dickerman A. W. (2010): Phylogeny of *Gammaproteobacteria*. *Journal of Bacteriology*. 2305–2314.

Stent G. (1971): *Molecular genetics. An introductory narrative.* W. H. Freeman Publishers, San Francisco, California.

Szewzyk U., Szewzyk R., Manz W., és Schleifer K.-H. (2000): Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology*. 54:81-127.

Ten L.N., Jung H.-M., Im W.-T., Yoo S.-A., Oh H.-M. és Lee S.-T. (2009): *Lysobacter panaciterrae* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59: 958–963.

Woese C. R. (1994): There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiological Reviews*. 58(1):1–9.

Yoon M.-H., Ten L.N., Im W.-T., Lee S.-T. (2007): *Methylibium fulvum* sp.nov., a member of the *Betaproteobacteria* isolated from ginseng field soil, and emended description of the genus *Methylibium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57:2062-2066.

Zuckerkindl E. és Pauling L. (1965): Molecules as documents of evolutionary history. Journal of Theoretical Biology. 8:357–366.

http://old.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14

http://www.pbs.org/wgbh/evolution/library/05/1/pdf/l_051_06.pdf

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Tóth Erikának, Homonnay Zalán Gábornak és Kéki Zsuzsának pótolhatatlan segítségüket, ami nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.