

A Szent Anna-tó üledékének baktériumközösségi profilja

XXXII. OTDK Biológia Szekció
biológus mesterszak, II. évfolyam
Molekuláris, Immun-, és Mikrobiológia szakirány

készítette:
Nagy Hajnalka

Eötvös Loránd Tudományegyetem

témavezetők:
Felföldi Tamás, adjunktus
Szabó Attila, doktorandusz

Budapest, 2015. 01. 06.

Tartalomjegyzék

Tartalom

1. A Szent Anna-tó és környezete.....	3
1. A Szent Anna-tó és környezetének jellemzése.....	3
1. Általános jellemzők	3
2. A Szent Anna-tó vizének fizikai, kémiai jellemzői	4
3. A Szent Anna-tó környezetének geológiája	5
4. Klíma és vegetáció.....	5
2. A Szent Anna-tó üledékrétegeinek korszakolása	6
2. Az üledékminták feldolgozása.....	8
1. Mintavétel, a minták korának becslése	8
2. A minták feldolgozásának lépései.....	9
1. Molekuláris biológiai módszerek	9
2. Tenyésztéses vizsgálatok összcsíraszám meghatározáshoz	14
3. Eredmények.....	15
1. Az A44, B96 és C56 mintákban előforduló baktérium taxonok ..	15
1. Nemzetségek	17
2. A tenyésztéses vizsgálatok eredményei	27
4. Konklúzió.....	28
5. Köszönetnyilvánítás.....	30
6. Irodalomjegyzék	30
7. Tételes szerzői hozzájárulás.....	33

1. A Szent Anna-tó és környezete

1. A Szent Anna-tó és környezetének jellemzése

1. Általános jellemzők

A Szent Anna-tó a romániai Hargita megyében, a Keleti-Kárpátokhoz tartozó Csomád-hegységben található kráter tó (*1. kép*), amely homokkő alapkőzeten kialakult talajon fekszik 950 méterrel a tengerszint felett. Vízfelszínének kiterjedése 0,193 km², a vízgyűjtő medencével együtt 2,15 km² (MAGYARI, E. et al. 2009). Legnagyobb hossza 620 m, legnagyobb szélessége 460 m. A tó lefolyástalan, más vízforrással nem áll közvetlen kapcsolatban (BEGY, CS. R. et al. 2011). A párolgás miatt eltűnő vízmennyiség pótlását az esővíz biztosítja (MAGYARI, E. et al. 2009). Legmélyebb pontja 6,55 m, ezt a vízmélységet 2012 májusában mérték. 2012-ben 60%-al, 2013-ban 45%-al csökkent az évi átlagos csapadékmennyiség a 2009-2011-es periódus átlagához képest, így 2013 októberében csak 5,58 m volt a legnagyobb mélység ugyanabban a pontban. 2014 csapadékosabb évnek minősült, ezért 2014 júliusában már 5,95 m-re emelkedett a vízszint a tó legmélyebb pontján (MÁTHÉ I. et al. 2014). Ez az érték az 1800-as években még 12,5 m volt, de a mélysége mellett természetesen a vízfelszín területe is csökkent az utóbbi két évszázadban (MAGYARI, E. et al. 2009).



1. kép: A Szent Anna-tó (FELFÖLDI T.)

2. A Szent Anna-tó vizének fizikai, kémiai jellemzői

A Szent Anna-tó sekély és viszonylag nagy tengerszint feletti magasságon fekszik, ezért nem alakul ki benne tartós termális rétegzettség. Nyáron a felső vízréteg jelentősen felmelegszik, akár 22°C-ra is, éjszaka pedig lehűl, így az eltérő hőmérsékletű rétegek közti sűrűségkülönbség miatt a teljes vízoszlop keveredik. A 2013-ban elvégzett vizsgálatok alapján, májusban és júniusban a tó vizének felső 1-2 méterében a hőmérséklet 19-22°C között mozgott, de 3 m alatt lecsökkent 14-17°C-ra. Júliusban és augusztusban a hőmérséklet a teljes víztestben 22°C körüli értékeket mutatott. Tavasszal és ősszel a tóvíz hőmérséklete a felső és alsó rétegekben is 10-12°C között alakult. Télen a vízfelszín közelében 0-1°C volt a jellemző érték, ami 1 m-es mélységig 4°C-ra emelkedett és az aljzatig fennmaradt (MÁTHÉ I. et al. 2014). A víztest párolgási rátája körülbelül 500 mm/év (BEGY, CS. R. et al. 2011)

A tó vize a vulkanikus eredetnek köszönhetően Ca^{2+} ionokban szegény és általában savas, pH-ja szezonálisan változik (MAGYARI, E. et al. 2009). A 2013-as év minden hónapjában, a helyszínen elvégzett mérések szerint a pH értékek 4,81 és 8,52 között mozogtak. A pH a felső és az alsóbb vízrétegekben is különbözik. A felső, 1-2 m-es vízrétegben magasabb, majd csökkenni kezd és a közepes mélységű rétegekben beáll egy viszonylag állandó szintre. Az aljzat közelében ismét növekedni kezd (MÁTHÉ I. et al. 2014).

A helyszíni vízkémiai vizsgálatok alapján az oldott oxigén koncentrációja 2,1-11,8 mg/L között mozgott. Jelentős csökkenést 4 méteres mélység alatt mutatott, tehát a víztest az aljzathoz közeli régiókat leszámítva egész évben aerob volt. Az összes szerves szén (TOC) átlagos koncentrációja 3,2 mg/L értéket mutatott. A vizsgált szervesetlen komponensek mindegyike alacsony koncentrációban van jelen a tó vizében, és egyik komponens esetében sem figyeltek meg egyértelmű, az évszakokkal, vagy a mélységgel összefüggő trendet. Az elemanalitikai vizsgálatokat három vízminta felhasználásával végezték el, amelyeket különböző mélységekből vettek 2013 júliusában. Tizenhat kémiai elem koncentrációját mérték meg. A Mg és az Al koncentrációja csökken a mélység függvényében, tíz másik elem nem mutatott egyértelmű trendet, melyek a következők: B, Ni, Sr, Fe, Mn, Ca, Na, Pb, Ba, Zn (MÁTHÉ I. et al. 2014).

2013 februárjában 3 centiméteres mélységből vettek üledékmintát, melyben 8 makroelem és 31 nyomelem mennyiségét vizsgálták. A makroelemek közül az Al, a Fe és a Ca volt benne legnagyobb mennyiségben. A nyomelemek esetében a Ti és a Ba koncentrációja elérte a 100 mg/kg fölötti értéket. A többi nyomelem koncentrációja viszont alacsony volt, gyakran a kimutathatósági határértéket sem érte el. A Romániában érvényes, talajokban lévő

nehézfémekre vonatkozó referenciaértékek szerint minden vizsgált elem mennyisége a normál határérték alatt maradt (MÁTHÉ I. et al. 2014).

3. A Szent Anna-tó környezetének geológiája

A Csomád-hegység geológiájának alakulásában a vulkanikus aktivitás volt a meghatározó, amely a késő terciér és kvaterner idők alatt vesztett az intenzitásából. Utóvulkáni tevékenység azonban manapság is zajlik a területen, ennek a jelei a hidrogén-szulfid, széndioxid gázáramlások, és ásványvizű források. A Nagy-Csomád egy vulkán, melynek két krátere van. Az egyik az idősebb, erodálódott Mohos, a másik az, amelyben a Szent Anna-tó alakult ki. A hegyet alkotó alapkőzet homokkő, ezt fedte be a kitörések során a mélyből feltörő láva és vulkanikus törmelék. A vulkán legkorábbi kitörése valószínűleg a holocén időkben, 42-35 ezer évvel ezelőtt következett be a kitörés anyagában talált faszén vizsgálata alapján. A Szent Anna-tó az utolsó kitörés következtében jött létre, ezen esemény pontos idejét azonban nem ismerjük. A tó a kialakulásakor valószínűleg még kisméretű és sekély volt, vízszintje később, körülbelül 8000 évvel ezelőtt kezdett emelkedni (MAGYARI, E. et al. 2009).

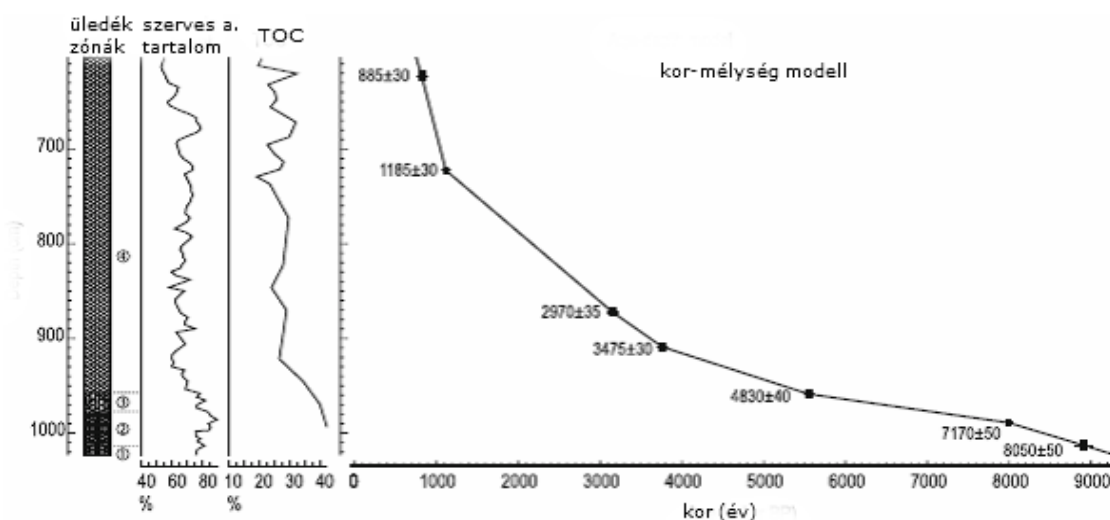
4. Klíma és vegetáció

A Keleti-Kárpátok a mérsékelt övben fekszik, klímája kontinentális. A Nagy-Csomád időjárási viszonyait főként a hegy magassága és a Tusnád-szurdokban fellépő fagy visszatartás jelensége határozza meg. A legmelegebb hónap július, a tóhoz legközelebb eső településen, Tusnádfürdőn az átlag hőmérséklet 18°C, a tó közelében csak 15°C. A leghidegebb hónap január, ekkor a középhőmérséklet -5°C körül mozog. Az évi átlagos csapadékmennyiség körülbelül 800 mm (MAGYARI, E. et al. 2009).

A Tusnád-szurdokban hőmérsékleti inverzió figyelhető meg a fentebb említett fagy visszatartás miatt. Ennek köszönhetően a lombhullató bükkerdő öve a közönséges lucfenyő öve felett helyezkedik el. A tópartot részben bükkből, fűzből, lucfenyőből és nyírből álló erdő fedi, az észak-keleti részen pedig nyitott. A tavat körülvevő lejtőkön bükkerdő található, benne lucfenyő által alkotott foltokkal. Az 1800-as években a Szent Anna-tavat lucfenyőből álló erdő vette körül. A közelebbi fák gyakran kerültek kapcsolatba a tó vizével. A nyitott észak-keleti sarokban mocsár alakult ki, aminek az elmúlt években jelentősen megnőtt a kiterjedése. A mocsárban nagy mennyiségben van jelen a csőrös sás és a gyapjas magvú sás, emellett a tőzegmoha fajok és a fürtös lizinka is megtalálható (MAGYARI, E. et al. 2009).

2. A Szent Anna-tó üledékrétegeinek korszakolása

Magyari Enikő és munkatársai 2009-ben hét darab, 4 cm-es felbontással vett üledékminta korát vizsgálták. A mintavétel 7 cm átmérőjű, 100 cm hosszú Livingstone dugattyús mintavevővel történt a tó legmélyebb részén. A mélységeket a vízfelszíntől kezdve számolták. A minták korának meghatározását a bennük talált szerves anyag kora alapján végezték el ^{14}C radiokarbon módszerrel. A használt szerves anyagok különböző szárazföldi növények fosszilis maradványai voltak, például bükk rügyek és levéltöredékek, lucfenyő, molyhos nyír és juhar magok. Az eredmények szerint az üledék halmozódása a Szent Anna-tóban körülbelül 9300 évvel ezelőtt kezdődött el, és a halmozódás sebessége a 7900-5700 évvel ezelőtti időszakban igen lassú volt (1. ábra).



2. ábra: A Szent Anna-tó üledékének kor-mélység modellje. Bal oldali oszlopok: üledék zónák (a mélység cm-ben megadva), szerves anyag tartalom, összes szerves szén (total organic carbon) (MAGYARI, E. et al. 2009)

1. táblázat: Kovaalga fossziliák alapján megállapított zónák (MAGYARI, E. et al. 2009)

Zóna	Mélység (cm) Iszapréteg kora (év)	A tó és vízgyűjtőjének feltételezett tulajdonságai
SZA-D1	1023-1012 cm 9300-8875 év	A tó ebben az időszakban valószínűleg sekély volt és mezotróf, vagy oligotróf. Nagy számban voltak benne acidofil kovaalgák, ami arra utal, hogy tőzeges mocsár borította a partját, és a vízben magas volt a huminsavak koncentrációja.

SZA-D2	1012-969 cm 8875-6365 év	8000 évtől kezdve a tó vízszintje és trofitása növekedésnek indult. A tőzegmocsár kiterjedése nőtt, a vízben egy ideig az acidofil kovaalgák domináltak. A 8600-7400 közötti időszakban a mocsaras területek szezonálisan kiszáradtak.
SZA-D3	969-931 cm 6365-4550 év	A tó trofitása a mezotróf és az oligotróf státusz között váltakozott. A vízszint körülbelül 5250-ig fokozatosan emelkedett, majd átmeneti csökkenés következett be.
SZA-D4	931-839 cm 4550-2700 év	A tó vize ebben az időszakban oligotróffá és savassabbá vált. A vízszint kezdetben alacsony volt, a tőzegmocsár intenzívebben terjedt. 4300 és 3800 között a vízszint növekedésnek indult, ezt követően ismét alacsonyabbá vált.
SZA-D5	839-759 cm 2700-1615 év	A tó vízszintje és kiterjedése is jelentősen növekedett, továbbra is oligotróf volt. A part mentén tőzegmocsár helyezkedett el. Körülbelül 2000 évvel ezelőtt a vízszint csökkenni kezdett.
SZA-D6	759-600 cm 1615-760 év	A tó vize továbbra is oligotróf volt, de a szintje tovább csökkent. A fény eljutott az aljzatig, ami kedvezett a bentikus kovaalgák szaporodásának. A partmenti tőzegmocsár terjedt, ezt alátámasztja a tőzegmohákon élő epifiton kovaalgák megnövekedett mennyisége.

Célkitűzés

Az általunk végzett kutatás célja, hogy újgenerációs szekvenálás alkalmazásával meghatározzuk a Szent Anna tó üledéke különböző mélységű rétegeinek baktérium közösségeit, ami által átfogó képet alkothatunk a Szent Anna-tó üledékében levő baktérium közösség egészének összetételéről és annak változásáról hosszú időskálán.

2. Az üledékminták feldolgozása

1. Mintavétel, a minták korának becslése

Az általunk vizsgált szent anna-tavi üledék mintákat Braun Mihály és munkatársai (Magyar Tudományos Akadémia Atommagkutató Intézet) vették 2013. február 7.-én (2. kép).



2. kép: A vizsgált Szent Anna-tavi iszapminták a mintavevőben

A furatok mintázását Felföldi Tamás (Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék), Somogyi Boglárka (MTA ÖK Balatoni Limnológiai Intézet) és munkatársaik végezték. A furatokban a zónahatárokat a fentebb látható 1. táblázat alapján állapították meg. Az egyes zónák közepét, és két szélét mintázták. A minták felsorolása a 2. táblázatban olvasható. A minták szerves anyag tartalmát Máthé István és munkatársai (Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Biomérnöki Tanszék) határozták meg. A minták korának becslését a szerves anyag tartalom alapján Korponai János (Nyugat-magyarországi Egyetem, Kémia és Környezettan Intézeti Tanszék) végezte.

2. táblázat: A Szent Anna-tó iszaprétegeiből vett minták, T=tenyésztés, Csillaggal jelölt: a szekvenáláshoz felhasznált minták

A oszlop (1000-900cm), 87cm hosszú (zárójelben a minták kora)	B oszlop (900-800cm) 99cm hosszú
A3 (8026 év)	B17 (2986 év)
A13 (T) (7159 év)	B45 (T) (2425 év)
A22 (6410 év)	60cm-nél zónahatár (ez korrigálva 839cm)

27cm-nél zónahatár (ez korrigálva 969cm)	B73 (2004 év)
A32 (5760 év)	B96 (T) (1757 év)*
A44 (T) (5194 év)*	
A55 (4607 év)	
60cm-nél zónahatár (ez korrigálva 931cm)	
A75 (3806 év)	
C oszlop (800-700cm) 88cm hosszú	D oszlop (700-600cm) 80cm hosszú
C22 (1520 év)	D18 (T) (1231 év)
35cm-nél zónahatár (ez korrigálva 759cm)	D77 (229 év)
C56 (1370 év)*	

2. A minták feldolgozásának lépései

A feldolgozni kívánt iszapminták több ezer évesek, ezért úgy döntöttünk, hogy a hagyományos tenyésztési módszer helyett egy új molekuláris módszer, az újgenerációs szekvenálás alkalmazásával határozzuk meg a Szent Anna-tó üledékrétegeinek baktériumközösségi összetételét. Az újgenerációs szekvenálás nagy áteresztőképességű módszer, tehát segítségével egyszerre nagy mennyiségű DNS molekula nukleotid sorrendje határozható meg egyidejűleg. Ez lehetővé teszi a baktérium taxonok és gyakoriságuk részletesebb azonosítását a mintában.

1. Molekuláris biológiai módszerek

a) DNS izolálás

A DNS kivonásához QIAmp DNA Stool Mini Kitet és QIAcube DNS izoláló készüléket (Qiagen) használtuk. A kivonást a gyártó cég által megadott utasítások szerint végeztük el.

b) PCR

A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) az A3, A13, A22, A32, A44, A55, A75, B17, B45, B73, B96, C22, C56 és D18 mintákat használtuk fel, amelyek mélyebben és magasabban fekvő iszaprétegekből származnak. A DNS amplifikációhoz olyan primer párt választottunk, amely a bakteriális 16S rDNS egy meghatározott szakaszát sokszorozítja fel. Az általam használt primerek a 3. és 4. táblázatban szerepelnek. A 16S rDNS a bakteriális riboszóma kis alegységének felépítésében résztvevő 16S riboszómális RNS-t kódolja. A primerek a 16S

rRNS gén 450 bázispár hosszú szakaszát sokszorozzák fel, amely lefedi a gén V1-V3 variábilis régióját is (KLINDWORTH, A. et al. 2013). Ez a szakasz elég hosszú és változékony régiókat is tartalmaz, amelyek bázissorrendjének meghatározása lehetővé teszi, hogy a mintákban levő DNS szekvenciákat baktérium nemzetség szinten is azonosíthassuk. A PCR reakcióelegy összetétele és a reakció hőprofilja az 5. és 6. *táblázatban* olvasható.

A PCR reakcióhoz használt primerek:

3. *táblázat*: Forward primer

Név	Szekvencia (Bakt 27F 5'-3')
Junior_L_27F_B	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

4. *táblázat*: Reverse primerek

Minta	Név	Szekvencia (Bakt 534R 5'-3')
A3	Junior_1_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
A13	Junior_2_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
A22	Junior_3_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
A32	Junior_4_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
A44	Junior_5_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
A55	Junior_6_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
A75	Junior_7_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
B17	Junior_8_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
B45	Junior_9_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
B73	Junior_10_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
B96	Junior_6_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
C22	Junior_8_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
C56	Junior_9_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG
D18	Junior_10_L_534R_A	ATTACCGCGGCTGCTGG

5. táblázat: A PCR reakcióelegy összetétele

desztillált víz	9,7 μ L
dezoxinukleotidok (Fermentas)	0,2 mM
5X Phusion HF Puffer (benne 7.5 mM $MgCl_2$) (Thermo Scientific)	4 μ L
szarvasmarha szérum albumin (Fermentas)	2 μ g
Phusion Hot Start II DNS Polimeráz (Thermo Scientific)	0,4 U
J27FB forward primer (Integrated DNA Technologies)	0,25 μ M
J1-J6 reverse primerek (Integrated DNA Technologies)	0,25 μ M
genomi DNS	1 μ L

6. táblázat: A PCR reakció hőprofilja

kezdeti denaturáció	98°C	2 perc	} 28 ciklus
denaturáció	98°C	10 másodperc	
anneláció	48°C	30 másodperc	
extenzió	72°C	30 másodperc	
végző extenzió	72°C	7 perc	
hűtés	4°C	∞	
reakció térfogat	20 μ L		

A PCR reakciót a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) készülékkel végeztem el. A PCR termékek méretét és minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem le. A hat darab PCR reakcióelegyből 5-5 μ L-t vettem ki, amiket 1%-os agarózgélben futtattam 100V-on, 20 percig 250 EX Gibco BRL Electrophoresis Power Supply (Life Technologies) készülékkel. Dokumentáció céljából a gél lefényképeztem áteső UV fényben. A PCR reakciót mind a hat minta esetében háromszor ismételt meg, így mindegyik mintából lett 45-45 μ L PCR termékem, amik a továbbiakban DNS könyvtárként szolgáltak. Azért alkalmaztunk három ismétlést, hogy csökkentsük a PCR reakció során fellépő esetleges hibákat, véletlenszerű hatásokat.

c) A PCR termékek tisztítása

A tisztításhoz a High Pure PCR Cleanup Micro Kitet (Roche) használtam a gyártó cég utasításai szerint. Ezzel a lépéssel eltávolíthatók a felszorzott DNS mellől a PCR reakció

során esetlegesen létrejött primer-dimerek és a reagensek. A tisztítás végén a PCR termékek 20-20 μ L térfogatba kerültek. Jelenlétüket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem a fentebb megadott körülmények szerint.

d) Könyvtárak DNS koncentrációjának meghatározása

A PCR termékek pontos koncentrációját 2100 Bioanalyzer (Agilent) készülékkel határoztuk meg. Ezzel az eszközzel a koncentráció mellett az is megállapítható, hogy a PCR reakció során keletkezett termékek hány bázispár hosszúak és mennyire sikerült megtisztítani őket a primer-dimerektől. Mind a hat tisztított PCR termékben a 10X-es hígítás után ezek aránya elenyésző mennyiségre csökkent.

A következő két lépésnél (emulziós PCR és szekvenálás) a gyártó cég (Roche) által megadott protokollokat követtük.

e) Emulziós PCR

Ehhez a lépéshez az A44, B96 és C56 jelű mintát választottuk ki, amelyek kora 5194, 1757 és 1370 évre becsülhető. Ezen módszer lényege, hogy a PCR reakció nagyon kisméretű gyöngyök felületén zajlik az olaj-víz emulzió cseppjeiben. Ezzel a lépéssel az egyféle molekulához tartozó detektálandó jelet több tízezerszeresére erősítjük. A DNS könyvtárból egyszálú DNS templátokat állítunk elő 100mM-os NaOH oldat segítségével. A gyöngyök felszínén oligonukleotid próbák vannak, amelyeknek a szekvenciái komplementerek a DNS templátokban levő adaptor szakaszokkal, ezekhez az oligonukleotidokhoz kötődnek az egyszálú DNS-ek a reakció során. Az optimális, ha egy darab gyöngyhez csak egy darab DNS molekula kötődik, és egy gyöngy kerül egy vízcseppbe az olaj-víz emulzióban. Miután a PCR reakció végbement a vízcseppekben, az adott gyöngy felületén csak az az egyféle DNS szekvencia sokszorozódik fel, amelyik hozzá kötődött, tehát klonális. Ha egy gyöngyhez többféle DNS templát kötődik, a szekvenálás során kevert jelet kapunk, ami hibának minősül. Miután elvégeztük az emulziós PCR-t, biotinizált komplementer oligonukleotidokat fúzionáltattunk a gyöngyökön lévő DNS mintákhoz és sztreptavidinnel borított mágneses gyöngyök segítségével elválasztottuk a DNS-sel borított gyöngyöket azoktól, amelyekhez nem kapcsolódott DNS. Az emulziós PCR-t a gyártó leírását követve végeztük (GS Junior Titanium emPCR Kit Lib-L, Roche).

f) Szekvenálás

Az emulziós PCR-rel felsokszorozott, 100 mM-os NaOH-dal egyszálúvá alakított DNS szekvenciák meghatározásához a GS Junior Roche 454 szekvenáló platformot használtuk. A Roche 454 működése a „szintézis általi szekvenálás” elvén alapul. A gyöngyökre immobilizált egyszálú DNS templatokat hibridizáltatjuk a szekvenáló primerekkel és inkubáljuk őket a következő enzimekkel, szubsztrátokkal: DNS polimeráz, ATP szulfuriláz, luciferáz, apiráz és adenzin 5' foszfoszulfát (APS), luciferin. Elsőként a négy dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP) valamelyike kerül nagy mennyiségben a reakciótérbe, amit a DNS polimeráz beépít a templatba a megfelelő bázissal szemben, ha az adott nukleotid a soron következő a bázissorrendben. Ezen reakció során annyi pirofoszfát (PPi) szabadul fel, ahány dNTP beépült a templatba. Az ATP szulfuriláz a pirofoszfátot az APS felhasználásával adenzin-trifoszfáttá (ATP) alakítja. Ezt az ATP-t a luciferáz hasznosítja, amikor a luciferint oxiluciferinné oxidálja. A luciferin oxiluciferinné alakulása során látható fény keletkezik a felhasznált ATP mennyiségével megegyező arányban. Ezt a fényt érzékeli egy nagyfelbontású kamera. A nem hasznosított nukleotidokat és ATP-t az apiráz bontja el. Minden nukleotid beépülésekor a fentebb leírt reakciók játszódhatnak le, amelyeknek fény felvillanás az eredményük, ezáltal lehet meghatározni a DNS szekvenciák nukleotid sorrendjét (HARRINGTON, C. T. et al. 2013).

g) Bioinformatikai elemzés

A szekvenálás során nyert adatokat a mothur v1.33 szoftverrel elemeztük (SCHLOSS, P. D. et al. 2009). A homopolimer és singleton szekvenciákat kizártuk az elemzésből. A singleton olyan egyedi szekvencia, amelyből csak egy darab van az adathalmazban és ezért valószínűsíthető, hogy szekvenálási műtermék. A kimérák kiszűrését a UCHIME programmal végeztük el. A kimérák szekvencia műtermékek, amelyek a PCR során keletkezhetnek (SCHLOSS, P. D. et al. 2009). A taxonok azonosításához csak a legmagasabb minőségű szekvenciákat használtuk fel. A szekvenciákat az ARB-SILVA bakteriális nukleinsav adatbázis szekvenciáihoz illesztettük a SINA illesztőprogrammal (QUAST, C. et al. 2013).

2. Tenyésztési vizsgálatok összcsíraszám meghatározáshoz

A tenyésztési vizsgálatokat Máthé István és munkatársai (Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Biomérnöki Tanszék) végezték el az alább felsorolt táptalajok alkalmazásával.

1. Módosított R2A, pH=7

Élesztőkivonat 0,50 g

Pepton 0,50 g

Kazamínosav 0,50 g

Glükóz 0,50 g

Keményítő (vízoldható) 0,50 g

Na-piruvát 0,30 g

K₂HPO₄ 0,30 g

MgSO₄ X 7 H₂O 0,05 g

Agar 15,0 g

Desztillált víz 1000,0 ml

Sterilizálás autoklávbán: 121°C, 15 perc

2. Keményítő-kazein tápagar

Keményítő (vízoldható) 10,0 g

Kazein (10 mL 0,1 N NaOH-ban feloldva) 1,0 g

K₂HPO₄ 0,5 g

Agar 18,0 g

Desztillált víz 1000,0 ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávbán: 121°C, 15 perc

3. Maláta tápagar

Maláta kivonat 50,0 g

Agar 18,0 g

Desztillált víz 1000,0 ml

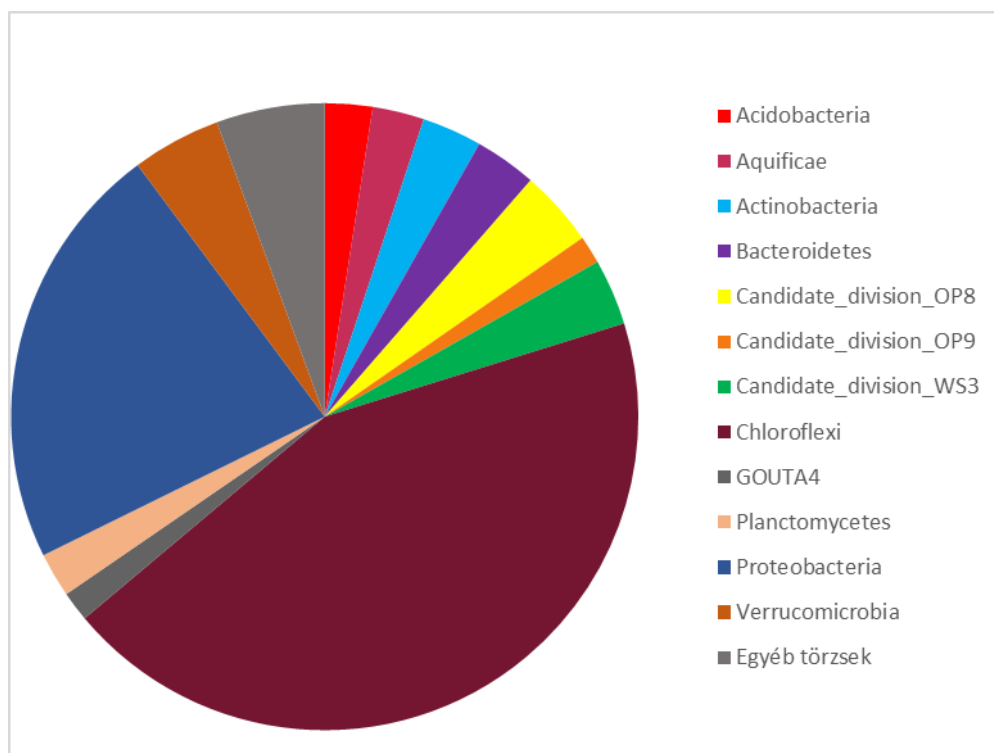
pH: 5,6

Sterilizálás autoklávbán: 121°C, 15 perc

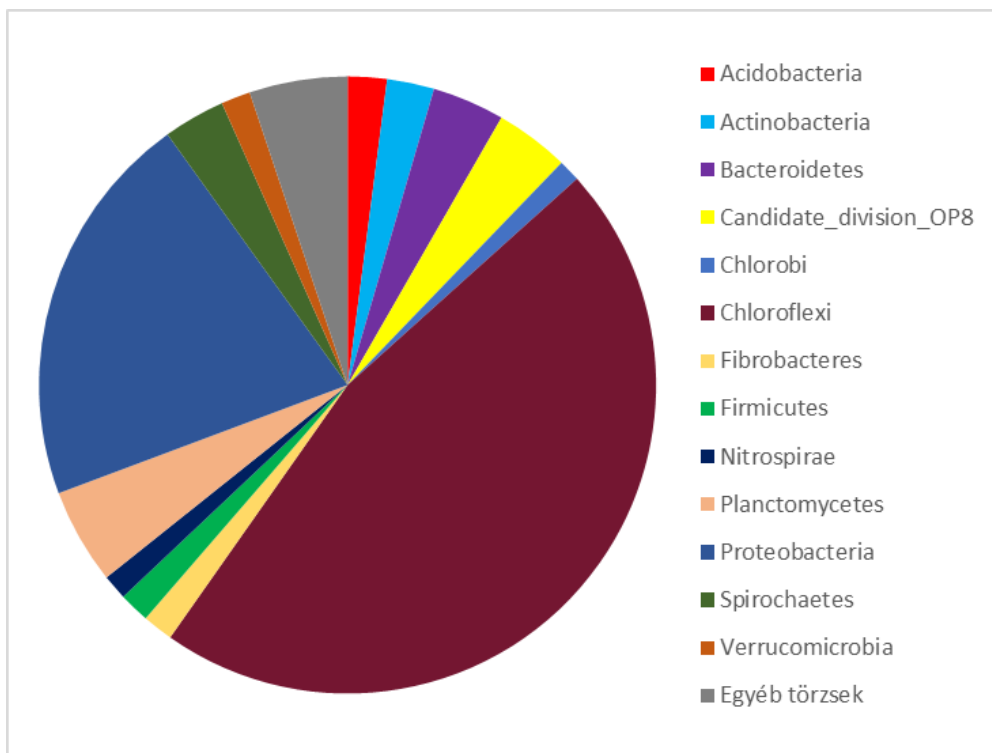
3. Eredmények

1. Az A44, B96 és C56 mintákban előforduló baktérium taxonok

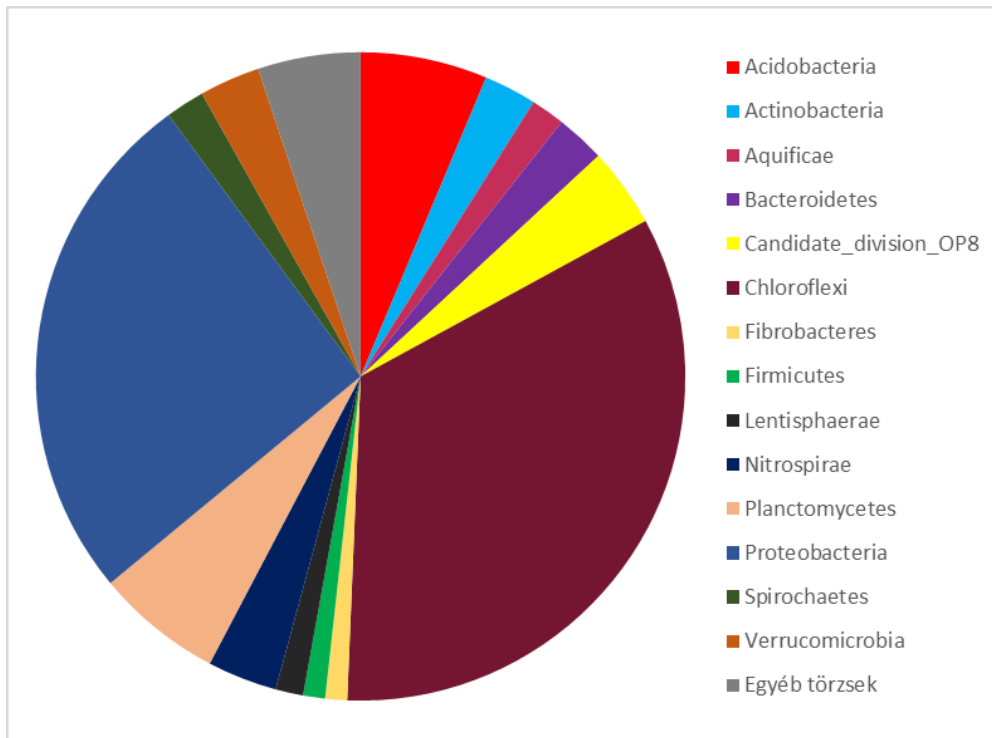
A minőségi szűrést követően az A44 mintában 1877, a B96 mintában 8286, a C56 mintában pedig 5869 szekvenciát kaptunk, amelyek a Bacteria doménen belül 39 baktérium törzset (phylum) fednek le. Mindhárom mintában a Chloroflexi és a Proteobacteria a két domináns baktérium törzs. A harmadik legtöbb szekvenciával rendelkező törzs a három mintában viszont már nem egyezik. Ez a törzs az A44 mintában a Verrucomicrobia, a B96 mintában a Planctomycetes, a C56 mintában az Acidobacteria. Mindegyik törzshöz tartozott sok olyan szekvencia is, amelyek az „unclassified” kategóriába estek. Ebbe a kategóriába olyan taxonok tartoznak, amelyeket eddig még sehonnan nem mutattak ki. Mi azokat a taxonokat elemeztük részletesebben, amelyeknek az aránya elérte az 1%-ot az adott mintában az összeshez viszonyítva, tehát a hozzájuk tartozó szekvenciák darabszáma az A44 mintában legalább 19, a B96 mintában 83, a C56 mintában 59. Az 1% feletti szekvencia darabszámmal rendelkező baktérium törzsek a 2., 3., és 4. ábrán láthatók, a nemzetségek pedig az 5., 6., és 7. ábrán.



2. ábra: Az A44 mintában talált baktérium törzsek (phylum). A színes szeletek vastagsága arányos az egyes törzsekhez tartozó szekvenciák darabszámával.

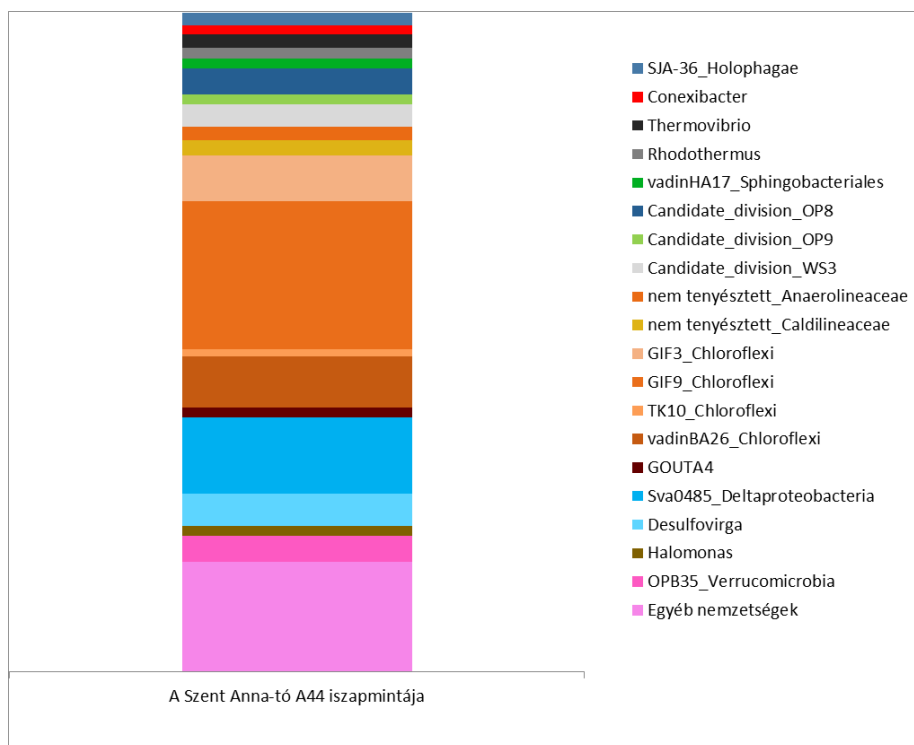


3. ábra: A B96 mintában talált baktérium törzsek (phylum). A színes szeletek vastagsága arányos az egyes törzsekhez tartozó szekvenciák darabszámával.

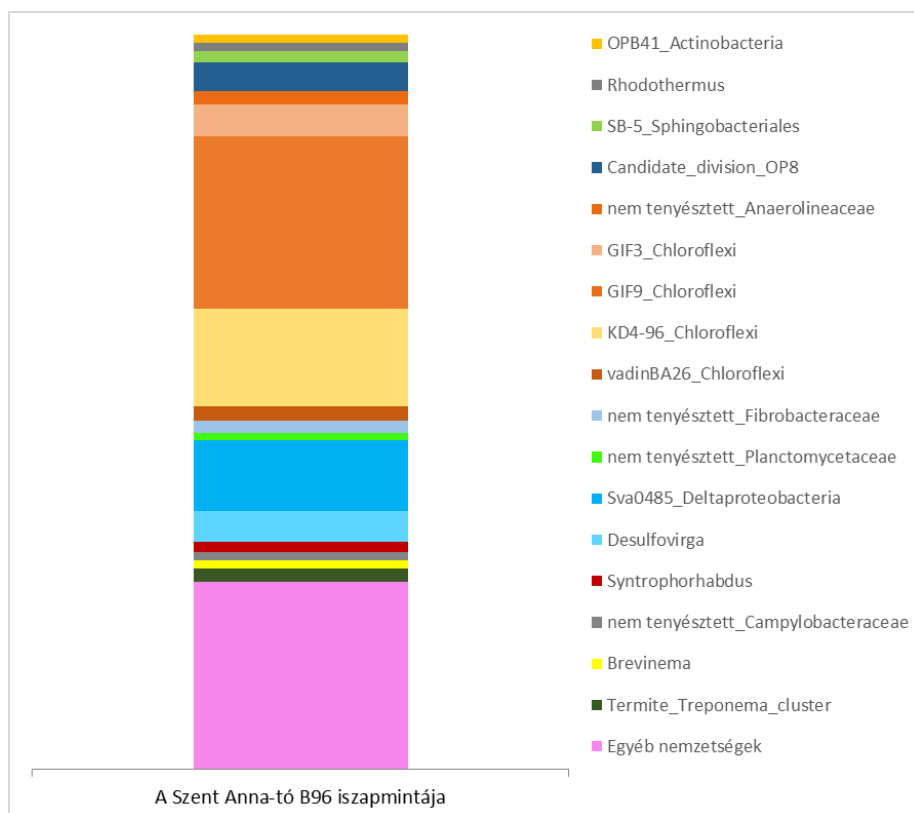


4. ábra: A C56 mintában talált baktérium törzsek (phylum). A színes szeletek vastagsága arányos az egyes törzsekhez tartozó szekvenciák darabszámával.

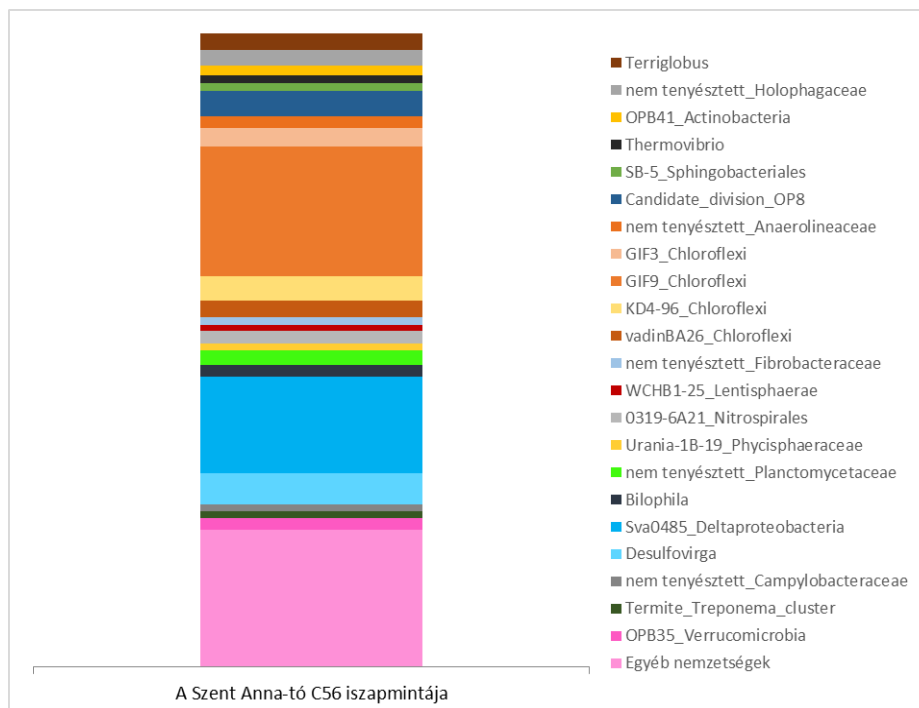
1. Nemzetségek



5. ábra: Az A44 mintában talált baktérium nemzetségek. A színes sávok vastagsága arányos az egyes nemzetségekhez tartozó szekvenciák darabszámával.



6. ábra: A B96 mintában talált baktérium nemzetségek. A színes sávok vastagsága arányos az egyes nemzetségekhez tartozó szekvenciák darabszámával.



7. ábra: A C56 mintában talált baktérium nemzetségek. A színes sávok vastagsága arányos az egyes nemzetségekhez tartozó szekvenciák darabszámával.

Az A44, B96 és C56 minták közös baktérium nemzetségei

A nemzetségnevek mögött az adott nemzetséghez tartozó szekvenciák darabszáma látható a címben szereplő sorrend szerint.

Mindhárom mintában a GIF9_Chloroflexi a domináns nemzetség. A második legtöbb szekvenciával rendelkező nemzetség az A44 és C56 mintában az Sva0485_Deltaproteobacteria, a B96 mintában a KD4-96_Chloroflexi.

a) *Candidate_Division_OP8* (74, 322, 232)

A Candidate Division OP8 törzs javasolt elnevezése az Aminicenantes. Ismertebb nemzetsége a '*Candidatus Aminicenans*', ide tartozó tenyésztett faj a '*Candidatus Aminicenans sakinawicola*', amelyet a Sakinaw-tóban és az Etoliko lagúna üledékében találtak meg. Heterotróf anyagcseréje van, szénforrásként aminosavakat hasznosít (RINKE, C. et al. 2013).

b) *Nem tenyésztett_Anaerolineaceae* (40, 153, 108)

A Chloroflexi törzs Anaerolineae osztályába tartozó tenyésztésbe nem vont nemzetség. Ennek az osztálynak kevés olyan faja van, amiket sikerült tenyésztésbe vonni, viszont nagyszámú, különböző 16S rDNS szekvencia került elő olyan élőhelyekről, mint például

üledékek, felületek, melegvízű források, anaerob szennyvíziszapok és édesvizek (SEKIGUCHI, Y. et al. 2003). A tenyésztésbe vont fajok jellemzői alapján az Anaerolineae osztály tagjai Gram-negatív sejtfalú, színtelen sejtek, amelyek hosszabb fonalakat hoznak létre. Spórát nem képeznek, nem végeznek aktív mozgást. Obligát anaerob kemoorganotróf szervezetek (YAMADA, T. et al. 2006). Az Anaerolineaceae család típus nemzetsége az *Anaerolinea*, melynek ismert faja az *Anaerolinea thermolimosa*. Ezt a fajt egy termofil szennyvíztisztító berendezés szemcsés iszapjából Yamada és munkatársai izolálták 2005-ben.

c) *GIF9_Chloroflexi* (421, 1943, 1198)

Ez a nemzetség a Chloroflexi törzs GIF9 osztályába tartozik, amelyet a környezeti mintákban talált 16S rDNS szekvenciák filogenetikai vizsgálata alapján hoztak létre. Igen változatos élőhelyeken találhatóak meg, mint például édesvízi üledékek, bioreaktorok, tengeri üledékek, metánszivárgások, hiperszalin környezetek. Eddigi eredmények szerint a GIF9 osztály tagjai főleg a szerves anyagban gazdag üledékekben és tengeri üledékekben, metánszivárgásoknál fordulnak elő. Genom alapú vizsgálatok szerint a standard elektron transzportlánc nagy része hiányzik belőlük, ezért valószínűleg obligát fermentálók. A növényi eredetű polimereket és cukrokat acetátig fermentálják, nagy valószínűséggel ezért vannak jelen nagy mennyiségben olyan anoxikus üledékekben, amelyeknek magas a szerves anyag tartalmuk. A cukrok, növényi anyagok mellett zsírsavakat és szerves savakat is bontanak. A genomjukban talált enzimek alapján kemolitotróf autotróf anyagcserére is képesek lehetnek, ha van jelen külső szén-dioxid (HUG, L. et al. 2013).

d) *GIF3_Chloroflexi* (131, 363, 177)

A Chloroflexi törzs GIF3 osztályának egyik nemzetsége, környezeti mintákból eddig csak 16S rDNS szekvenciák alapján azonosították. Valószínűleg obligát fermentálók, növényi eredetű polimereket és cukrokat fermentálnak, mint a GIF9 tagjai (HUG, L. et al. 2013).

e) *VadinBA26_Chloroflexi* (145, 169, 161)

A Chloroflexi törzs VadinBA26 osztályába tartozó nemzetség. Ebbe az osztályba sorolt 16S rDNS szekvenciákat eddig egy szennyvíz tisztító üzem anaerob iszapjából és észak-amerikai édesvízű tavakból írtak le (GICH, F. et al. 2001).

f) *Sva0485_Deltaproteobacteria* (217, 793, 890)

A Deltaproteobacteria altörzsbe tartozó tenyésztésbe nem vont nemzetség, valószínűleg Gram-negatív, nem spóráképző (BRENNER, D. J. et al. 2005).

g) *Desulfovirga* (92, 355, 289)

A Deltaproteobacteria altörzs Syntrophobacterales rendjébe tartozó nemzetség. Ismert törzseit anoxikus, szerves anyagokban gazdag édesvízi üledékekben találták meg. A nemzetség típusfaját, a *Desulfovirga adipica*-t Tanaka és munkatársai izolálták városi szennyvíztisztító anaerob rothasztójából 2000-ben. Filogenetikailag a *Syntrophobacter* és a *Desulforhabdus* nemzetségek álnak hozzá legközelebb. A baktérium sejtek pálcika alakúak, sejfaluk Gram-negatív, átmérőjük 0,8-2 µm, hosszuk 2,2-4 µm. Egyesével vagy párosával fordulnak elő, spórát nem képeznek. Egy darab poláris ostoruk van, amellyel aktívan mozognak. Kemoorganotróf szulfátredukálók, terminális elektron akceptorként szulfátot, tiosulfátot, szulfítot és ként hasznosítanak, melyeket kén-hidrogénné redukálnak. Nitrátot ilyen módon nem használnak. Elektron donorként és szénforrásként alkoholokat, C₁-C₁₂ egyenes láncú zsírsavakat, és egyéb szerves savakat hasznosítanak, ezeket szén-dioxidig oxidálják. Nitrogénforrásuk az ammóniumion (TANAKA, K. et al. 2000).

Az A44 és B96 minták közös baktérium nemzetségei

A nemzetségnevek mögött az adott nemzetséghez tartozó szekvenciák darabszáma látható a címben szereplő sorrend szerint.

a) *Rhodothermus* (30, 92)

A Bacteroidetes törzs Sphingobacteria osztályának tagja. Típusfaját, a *Rhodothermus marinus*-t Alfredsson és munkatársai írták le 1988-ban, tengeralatti forróvizű forrásból Izlandnál és ők hozták létre ezt a nemzetséget a megtalált faj alapján. Sejtfaluk Gram-negatív festődést mutat, a sejtek pálcika alakúak, végük kicsit görbült, nem mozognak aktívan. Vöröses színű karotinoid pigmenteket tartalmaznak, spórát nem képeznek. A sejtek átmérője 0,5 µm, hosszuk 2-2,5 µm. Termofil aerob heterotrófok, szénforrásként közönséges cukrokat, aszparaginsavat és glutaminsavat hasznosítanak. Halofil baktériumok, növekedésükhöz pH7 az optimális érték (ALFREDSSON, G. A. et al. 1988).

Az A44 és C56 minták közös baktérium nemzetségei

A nemzetségnevek mögött az adott nemzetséghez tartozó szekvenciák darabszáma látható a címben szereplő sorrend szerint.

a) *Thermovibrio* (39, 72)

Ez a nemzetség az Aquificae törzs Aquificales rendjének tagja. Huber és munkatársai hozták létre 2002-ben egy új baktériumfaj révén, melyet a Pápua Új-Guinea mellett levő Lihir-szigetnél izoláltak tengeralatti hidrotermális rendszerből. Ezt a fajt *Thermovibrio ruber*-nek nevezték el, mert extrém termofil élőhelyen találták meg és a sejtek vöröses színűek. Sejtfaluk Gram-negatív festődésű, alakjuk görbült pálca. Egyesével vagy párosával fordulnak elő, spórát nem képeznek. Obligát anaerobok, kemolitotróf autotróf anyagcseréjük van. Elektron donorként molekuláris hidrogént használnak, terminális elektron akceptorként pedig nitrátot, amit ammónium ionná redukálnak. Szénforrásuk a szén-dioxid. Növekedésükhöz pH6 körüli érték az optimális. A 16S rDNS alapú filogenetikai vizsgálatok szerint ez a nemzetség egy elkülönült leszármazási vonalat alkot az Aquificae törzsön belül (HUBER, H. et al. 2002).

b) *OPB35_Verrucomicrobia* (73, 112)

A Verrucomicrobia törzset hét osztályra osztották fel, amelyek közül négyet csak a 16S rRNS gén szekvenciák alapján különítettek el, mert tenyésztési vizsgálatokat még nem tudtak végezni. Ezek közé tartozik az ötös jelzésű osztály, amely két kládra különül. Az egyik klád 16S rRNS gén szekvenciáit eddig édesvízi és tengeri üledékből izolálták, emellett szennyezett víztározókból, anaerob üledékekből is. A tenyésztett fajok sejtfa Gram-negatív, kemoorganotróf heterotróf anyagcserével rendelkeznek. Fő szénforásaik a szénhidrátok, a komplex poliszacharidokat is beleértve. A filogenetikai analízisek szerint a Verrucomicrobia törzs a Planctomycetes és a Chlamydia taxonokkal áll szoros kapcsolatban (KRIEG, N. R. et al. 2011).

A B96 és C56 minták közös baktérium nemzetségei

A nemzetségnevek mögött az adott nemzetséghez tartozó szekvenciák darabszáma látható a címben szereplő sorrend szerint.

a) *OPB41_Actinobacteria* (85, 88)

Az Actinobacteria törzs Actinobacteria osztályába tartozó nem tenyésztett nemzetség. Az osztály ismert fajainak sejtjei lehetnek kokkoidok, pálcika alakúak, fonalakat és spórákat is képezhetnek. Főleg vízi és terresztrikus élőhelyeken élnek, de előfordulnak extrém élőhelyeken is, például mélytengeri üledékben, sivatagi talajokban (GOODFELLOW, M. et al. 2012).

b) *SB-5_Sphingobacteriales* (131, 76)

A Bacteroidetes törzs Sphingobacteria osztályának tenyésztésbe nem vont nemzetsége. Valószínűleg Gram-negatív, nem spóráképző baktériumok tartoznak ide. Anyagcseréjük aerob vagy fakultatív anaerob (KRIEG, N. R. et al. 2011).

c) *KD4-96_Chloroflexi* (1095, 222)

A Chloroflexi törzs KD4-96 osztályának tenyésztésbe nem vont nemzetsége, csak 16S rDNS szekvenciák kerültek elő eddig.

d) *Nem tenyésztett_Fibrobacteraceae* (133, 64)

A Fibrobacteres törzs Fibrobacterales rendjének tenyésztésbe nem vont nemzetsége. A Fibrobacteraceae család tenyésztett fajainak tulajdonságai alapján a sejtek sejtfala Gram-negatív, alakjuk lehet pálcika vagy ovoid. A sejtek csúszó mozgásra képesek, spórákat nem képeznek. Obligát anaerobok, a cellulózt, cellobiózt, glükózt és egyéb cukrokat acetátig, szukcinátig fermentálják (KRIEG, N. R. et al. 2011).

e) *Nem tenyésztett_Planctomycetaceae* (88, 135)

A Planctomycetes törzs Planctomycetales rendjébe tartozó nem tenyésztett nemzetség. A Planctomycetaceae család tenyésztett nemzetségeit tengeri, mocsaras és édesvízi élőhelyekről, talajokból, komposztból, szennyvíz iszapból izolálták. A sejtek Gram-negatív sejtfallal rendelkeznek, alakjuk változatos. Különböző függelékek lehetnek rajtuk, például fimbriák, tüskék, sörték. Optimális növekedési hőmérsékletük 20-41°C között van. Anyagcseréjük aerob vagy fakultatív anaerob kemoorganotróf heterotróf, elsődleges szénforrásként szénhidrátokat hasznosítanak (KRIEG, N. R. et al. 2011).

f) *Nem tenyésztett_Campylobacteraceae* (93, 65)

Az Epsilonproteobacteria altörzs Campylobacterales rendjébe tartozik. A Campylobacteraceae család tenyésztésbe vont fajai Gram-negatívak, a sejtek alakja lehet görbült, S-alakú vagy spirális pálca. Spórát nem képeznek, csillókkal aktív mozgásra képesek. Anyagcseréjük mikroaerofil kemoorganotróf heterotróf (BRENNER, D. J. et al. 2005).

g) *Termite_Treponema_cluster* (151, 60)

A Spirochaetes törzs *Treponema* nemzetségébe tartozó nem tenyésztett csoport, 16S rDNS szekvenciáit eddig természetekből mutatták ki. A tenyésztett *Treponema* fajok obligát anaerob kemoorganotróf heterotrófok, szénforrásként szénhidrátokat és aminosavakat hasznosítanak (KRIEG, N. R. et al. 2011).

Az A44 minta baktérium nemzetségei

A nemzetségnevek mögött az adott nemzetséghez tartozó szekvenciák darabszáma látható.

a) *SJA-36_Holophagae* (36)

Ez a baktérium nemzetség az Acidobacteria törzs Holophagae osztályába tartozik, melyet Fukunaga írt le 2008-ban 16S rRNS génszekvenciák filogenetikai analízise alapján. Gram-negatív, kemoorganotróf anyagcserével rendelkező baktériumok. Ebbe az osztályba kevés tenyésztésbe vont faj tartozik, de tengeri élőhelyekből és talajokból nagy számban mutattak ki 16S rDNS szekvenciákat (FUKUNAGA, Y. et al. 2008).

b) *VadinHA17_Sphingobacteriales* (28)

A Bacteroidetes törzs Sphingobacteria osztályának tenyésztésbe nem vont nemzetsége. Valószínűleg Gram-negatív, nem spóráképző baktériumok tartoznak ide. Anyagcseréjük aerob vagy fakultatív anaerob (KRIEG, N. R. et al. 2011).

c) *Conexibacter* (25)

Az Actinobacteria törzs Rubrobacteridae osztályába tartozó nemzetség. Monciardini és munkatársai izolálták erdei talajból 2003-ban és egy idetartozó fajt írtak le, a *Conexibacter woesei*-t. A sejtek pálcika alakúak és kisméretűek. Átmérőjük 0,6-0,7 µm, hosszuk 0,9-1,2 µm. Gram-pozitív festődésű sejtfallal rendelkeznek, spórát nem képeznek. Hosszú, peritrich elhelyezkedésű csillóik vannak, amelyekkel aktív mozgásra képesek. Aerob légzők, van

kataláz és oxidáz enzimük. A nemzetség legközelebbi rokonai a *Solirubrobacter* és *Patulibacter* nemzetségek (GOODFELLOW, M. et al. 2012).

d) *Halomonas* (28)

A Gammaproteobacteria altörzs Oceanospirillales rendjébe tartozik, 21 ismert faja van. Vreeland és munkatársai írták le 1980-ban. Eddig sós környezetből izolálták őket, például a Csendes-óceánból, árapály torkolatokból és hipersalin tavakból: a Holt-tengerből, az Utah államban található Nagy Sós-tóból és egy antarktiszi tóból. A sejtek egyenes vagy görbült pálcák, egy olyan faja van a nemzetségnek, aminek a sejtjei coccoidok. Átmérőjük 0,6-0,8 μm , hosszuk 1,6-1,9 μm . Sejtfaluk Gram-negatív, a pálca alakú sejtek aktív mozgásra képesek poláris, laterális vagy peritrich csillóikkal, ezek száma és elrendezése fajtól függ. Bizonyos körülmények között változatos hosszúságú fonalakat képeznek. Tenyésztethetők, telepeik sárgák vagy fehérek. Halotoleráns mikroorganizmusok, akár 32,5 m/v%-os NaCl koncentráció mellett is képesek szaporodni. Spórákat, intracelluláris granulumokat nem képeznek. Aerob kemoorganotrófok, de néhány faj anaerob körülmények között képes a nitrátot terminális elektron akzeptorként hasznosítani, vagy nitrát nélkül is növekedni, ha van a környezetében glükóz. A nitrátot nitritig redukálják, nitrogén gázt nem termelnek. Minden fajuk kataláz pozitív, a többség oxidáz enzimaktivitással is rendelkezik. Alacsony oxigén koncentráció esetén a mozgásuk hamar megszűnik. Szénforrásként szénhidrátokat, aminosavakat, szénhidrogéneket és polialkoholokat hasznosítanak, nitrogénforrásként pedig ammónium-szulfátot. Szilárd, 8%-os NaCl tartalmú CAS vagy MS táptalajon sima, átlátszatlan, csillogó telepeket képeznek (BRENNER, D. J. et al. 2005).

e) *Nem tenyésztett_Caldilineaceae* (42)

A Chloroflexi törzs Caldilineae osztályának tagja, még nem sikerült tenyésztésbe vonni. A tenyésztett fajok tulajdonságai alapján a Caldilineae osztályba tartozó szervezetek sejtfala Gram-negatív, a sejtek fonalakat alkotnak. Nem mozognak aktívan, nem képeznek spórát. Fakultatív anaerob termofil baktériumok. Ezen osztály 16S rDNS szekvenciáit is nagy mennyiségben találták meg a nem tenyésztett_Anaerolineaceae nemzetségnél felsorolt élőhelyeken. Egy ismertebb faj a *Caldilinea aerophila*. Egyik törzsét egy szennyvíztisztító anaerob szemesítés iszapjából izolálták Japánban, másik törzsét szintén Japánban, egy melegvízi forrásból származó kéntelepéből írták le (SEKIGUCHI, Y. et al. 2003).

f) *TK10_Chloroflexi* (22)

A *Chloroflexi* törzs TK10 osztályának tenyésztésbe nem vont nemzetsége, csak 16S rDNS szekvenciák kerültek elő eddig.

g) *Candidate_Division_WS3* (64)

A *Candidate Division WS3* törzs másik, javasolt elnevezése *Latescibacteria*. Környezeti mintákban talált 16S rDNS szekvenciák alapján hozták létre. Ismertebb nemzetsége a '*Candidatus Latescibacter*', melybe egy tenyésztésbe vont faj tartozik, a '*Candidatus Latescibacter anaerobius*'. Ezt a fajt a brakkvizű Sakinaw-tóból izolálták. A sejtek kisméretű pálcák, anyagcseréjük anaerob (RINKE, C. et al. 2013).

h) *GOUTA4* (29)

16S rDNS szekvenciák alapján létrehozott törzsbe tartozó nemzetség, még nincsenek tenyésztésbe vont képviselői.

i) *Candidate_Division_OP9* (27)

A *Candidate Division OP9* törzset is 16S rDNS szekvenciák alapján hozták létre, javasolt elnevezése *Atribacteria*. 16S rDNS szekvenciáit az Etoliko lagúna üledékében, a Sakinaw-tóban és egy bioreaktorban mutatták ki. Ide tartozó nemzetség a '*Candidatus Caldatribacterium*', ennek egy ismertebb faja a '*Candidatus Caldatribacterium californiense*'. A sejtek kicsik, pálca alakúak, fermentatív anyagcserével rendelkeznek (RINKE, C. et al. 2013).

A B96 minta baktérium nemzetségei

A nemzetségnevek mögött az adott nemzetséghez tartozó szekvenciák darabszáma látható.

a) *Syntrophorhabdus* (109)

A *Deltaproteobacteria* altörzs *Syntrophobacterales* rendjébe tartozó nemzetség. A sejtek pálcika alakúak, nem mozognak aktívan. Obligát anaerobok, metanogénekkal és szulfát-redukáló baktériumokkal együttműködve aromás vegyületek oxidációjában vesznek részt. A nemzetség típus faja a *Syntrophorhabdus aromaticivorans*, amelyet anaerob szennyvíziszapból izoláltak (QIU, Y-L. et al. 2008).

b) *Brevinema* (93)

A Spirochaetes törzs Spirochaetales rendjébe tartozik. Eddig egy fajt ismerik, a *Brevinema andersonii*-t, amit néhány rágszálófaj véréből és egyéb szöveteiből izoláltak (KRIEG, N. R. et al. 2011).

A C56 minta baktérium nemzetségei

A nemzetségnevek mögött az adott nemzetséghez tartozó szekvenciák darabszáma látható.

a) *Terriglobus* (149)

Ez a nemzetség az Acidobacteria törzs Acidobacteriaceae családjának tagja. A sejtek pálcika alakúak, átmérőjük 0,5-0,7 µm, hosszuk 0,9-1,4 µm. Egyesével vagy csoportokban fordulnak elő, nem mozognak aktívan. Sejtfaluk Gram-negatív, extracelluláris mátrixot képeznek. Acidofil baktériumok, pH 4,5 és pH 7 között növekednek. Obligát aerobok, kemoorganotróf heterotróf anyagcserével rendelkeznek. Szénforrásként cukrokat hasznosítanak. A nemzetség típus fajtát, a *Terriglobus roseus*-t Eichorst és munkatársai írták le mezőgazdasági művelésbe nem vont talajokból 2007-ben. Legközelebbi rokonai az *Acidobacterium* és *Edaphobacter* nemzetségek (KRIEG, N. R. et al. 2011).

b) *Nem tenyésztett_Holophagaceae* (149)

Ez a baktérium nemzetség az Acidobacteria törzs Holophagae osztályába tartozik, melyet Fukunaga írt le 2008-ban 16S rRNS génszekvenciák filogenetikai analízise alapján. Az osztály tenyésztett fajai Gram-negatív, kemoorganotróf heterotróf baktériumok (FUKUNAGA, Y. et al. 2008).

c) *WCHB1-25_Lentisphaerae* (62)

A Lentisphaerae törzs Lentisphaeria osztályának tagja. Ebbe az osztályba kevés tenyésztett faj tartozik, a 16S rDNS szekvenciáit eddig édesvízi és tengeri élőhelyeken, anaerob rothasztókban, gerincesek ürülékében találták meg (KRIEG, N. R. et al. 2011).

d) *0319-6A21_Nitrospirales* (115)

Ez a nem tenyésztett nemzetség a Nitrospirae törzs Nitrospirales rendjébe tartozik. Az ismert fajok alapján a Nitrospirae törzs tagjai Gram-negatív, görbült vagy csavart pálca alakú

sejtek, többségük aerob kemolitotróf anyagcserével rendelkezik (BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W. 2001).

e) *Urania-1B-19_Phycisphaeraceae* (60)

A Planctomycetes törzs Phycisphaerae osztályába tartozó nem tenyésztett nemzetség. Az osztálynak egy tenyésztett képviselője van, a *Phycisphaera mikurensis*, viszont sok ide tartozó 16S rDNS szekvenciát találtak talajokban és tengeri élőhelyeken. A *Phycisphaera mikurensis* Gram-negatív, fakultatív anaerob baktérium (FUKUNAGA, Y. et al. 2009).

f) *Bilophila* (115)

Ez a nemzetség a Deltaproteobacteria altörzs Desulfovibrionales rendjébe tartozik. A sejtek pálcika alakúak, fonalakat képezhetnek. Sejtfaluk Gram-negatív festődésű, spórát nem képeznek. Anyagcseréjük anaerob kemoorganotróf heterotróf, a nitrátot nitritté redukálják. A nemzetség típus faját, a *Bilophila wadsworthia*-t eddig emlősök bélrendszeréből izolálták (BRENNER, D. J. et al. 2005).

2. A tenyésztési vizsgálatok eredményei

7. táblázat: Csíraszámok három különböző táptalajon (TKE=telep képző egység)

Minta	Csíraszám (TKE/g)		
	Módosított R2A	Keményítő-kazein tápagar	Maláta tápagar
A13	3×10^4	7×10^4	0
A44	$1,7 \times 10^3$	1×10^3	0
B17	$3,5 \times 10^3$	2×10^3	0
B96	$5,3 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	0
D18	$1,5 \times 10^3$	1×10^3	0

A kapott csíraszám értékekből láthatjuk, hogy viszonylag kevés baktérium nőtt ki az első két táptalajon. Friss iszapminta esetén a baktériumok mennyisége legalább 10^6 TKE/g lenne. A maláta tápagaron nem nőttek baktérium telepek, valószínűleg azért, mert nem volt megfelelő számukra a tápagar tápanyag összetétele, pH értéke.

4. Konklúzió

A Szent Anna-tó üledékéből vett A44 jelű minta kora 5194 évre becsülhető, a B96 mintáé 1757 évre, a C56 mintáé pedig 1370 évre, tehát a kapott eredmények az akkor élt baktériumközösséget jellemzik. Ezzel függhet össze az is, hogy igen sok ismeretlen taxon volt a vizsgált mintákban.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a három minta igen hasonló képet mutat phylum szinten, aminek több oka is lehet. Az egyik, hogy az iszapból kivont DNS nagy valószínűséggel a Gram-pozitív baktériumok által képzett endospórákból és nyugvó állapotban lévő Gram-negatív sejtekből származik. A baktérium sejtek akkor kerülnek nyugvó állapotba, vagy akkor képeznek endospórát, ha számukra kedvezőtlen fizikai, kémiai vagy biológiai körülmények közé kerülnek, például nem megfelelő a tápanyag ellátottság, a hőmérséklet, a pH, vagy az ozmotikus nyomás. Endospóraként, vagy nem spóráképzők esetében, nyugvó állapotban a sejtek nem osztódnak, morfológiájuk is megváltozik, nem folytatnak aktív anyagcserét. Ezek a baktériumok valójában életképesek, de nem tenyésztethetők, mivel nem ismerjük a pontos tenyésztési igényeiket. Lehetnek köztük olyan baktériumok is, melyek aktív anyagcserét folytatnak, osztódnak is, de az előbb említett ok miatt mégsem sikerül laboratóriumban tenyésztetni őket. Ilyen baktériumok tartoznak például a Verrucomicrobia, Acidobacteria, Actinobacteria és Proteobacteria törzsekbe (PUSPITA, I. D. et al. 2012). Tehát azok a taxonok maradnak fenn nagyobb eséllyel hosszabb időn keresztül, amelyek képesek spóráképzésre vagy nyugalmi állapotba kerülni, így az azonos szelekciós nyomásnak köszönhetően az egyes iszaprétegek baktériumközösségei hasonlóvá válnak. Azon taxonok, amelyek nem tudnak spórát képezni vagy nyugvó állapotba kerülni, elpusztulnak, DNS-ük pedig lebomlik, így eltűnnek a közösségből. Az is valószínű, hogy a fentebb említett okok miatt lettek viszonylag alacsonyak a csíraszámok a használt táptalajokon, de egyben az is bebizonyosodott, hogy a minták valóban tartalmaztak életképes sejteket. A minták phylum szinten mutatott hasonlóságának másik oka lehet az iszaprétegek közötti keveredés gáz-, vagy vízfeláramlásoknak köszönhetően, esetleg az iszapban élő élőlények révén. A tó iszapja azonban több méter mély, így kevésbé valószínű, hogy az előbb felsorolt hatások képesek lennének az egész iszapot összekeverni. Harmadik lehetőség, hogy a tó nyílt vizének képe nem változott jelentős mértékben az évezredek során, eltekintve a szezonális változásoktól. A szezonális változásoknak azonban nincs nagy jelentősége, mivel minden egyes iszapminta

esetében több év összeadódó állapotát látjuk. Az a legelfogadhatóbb, ha feltételezzük mindhárom felsorolt hipotézis együttes fennállását.

Mindhárom mintában a Chloroflexi törzs volt jelen legnagyobb mennyiségben, összesen 6638 darab szekvencia tartozott hozzá, ami érthető, ha figyelembe vesszük, hogy ezen taxon képviselői főleg szerves anyagokban gazdag édesvízi üledékekben fordulnak elő, ilyen üledék a Szent Anna-tóé is. A Chloroflexi törzs tagjai fontos szerepet játszanak az ökológiai rendszerek szén-körforgalmában azáltal, hogy lebontják az olyan komplex növényi polimereket, mint a keményítő és a cellulóz, emellett a hosszú szénláncú cukrokat is degradálják. Az általuk termelt acetát elektron donorként, vagy szénforrásként szolgálhat más mikroorganizmusok számára. Az anaerob acetogén anyagcseréjük révén sokféle útvonalon képesek acetil-koenzim A-t előállítani, ami előnyös tulajdonság, ha olyan környezetben élnek, ahol például a szezonális változások miatt a tápanyagok üledékbe történő kiülepedése nem egyenletes (HUG, L. et al. 2013).

Az anaerob nemzetségek (pl: *Desulfovirga*, *Thermovibrio*, *Syntrophorhabdus*) valószínűleg már eleve az iszapban éltek, mivel a vízoszlopban magas az oxigén ellátottság. Az aerobok (pl: *Halomonas*), nagy része a vízből történő kiülepedésnek köszönhetően kerülhetett az üledékbe, más részük (pl: *Conexibacter*, *Terriglobus*) pedig szintén benne élt.

A Szent Anna-tó környékén még ma is zajlanak utóvulkáni működések, amelyek több ezer évvel ezelőtt esetleg még intenzívebbek lehettek, talán a tó aljából is törtek fel melegvízi források, ami magyarázhatja a termofil *Rhodothermus* és *Thermovibrio* nemzetségek jelenlétét.

A nagy áteresztőképességű molekuláris módszerek alkalmazása új távlatokat nyithat a paleolimnológiai kutatásokban, mivel a segítségükkel az ökológiai rendszerek mikrobiális közösségeinek összetétele és összetételének változása hosszabb, több ezer éves időskálán is rekonstruálható. A mikroba közösségek diverzitása mellett akár az egyes nemzetségek, fajok története is nyomon követhetővé válhat (DOMAIZON, I. et al. 2013).

Kutatásunk további célja, hogy a Szent Anna tó üledéke többi rétegének baktérium közösségeit is meghatározzuk, ami által átfogóbb képet alkothatunk a Szent Anna-tó üledékében levő baktérium közösség egészének összetételéről és annak változásáról hosszú időskálán.

5. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Felföldi Tamásnak és Szabó Attilának, hogy nagyon sokat segítettek ezen kutatás kivitelezésében, és sok hasznos tanáccsal láttak el dolgozatom megírása során.

6. Irodalomjegyzék

- ALFREDSSON, G. A., KRISTJANSSON, J. K., HJÖRLEIFSDOTTIR, S. and STETTER, K. O. (1988). *Rhodotermus marinus*, gen. nov., sp. nov., a thermophilic, halophilic bacterium from submarine hot springs in Iceland. *Journal of General Microbiology* 134, 299-306.
- BEGY, R. CS., TIMAR-GABOR, A., SOMLAI, J. and COSMA, C. (2011). A sedimentation study of St. Ana lake (Romania) applying the ^{210}Pb and ^{137}Cs dating methods. *Geochronometria* 38 (2), 93-100.
- BOONE, D. R. and CASTENHOLZ, R. W. (2001). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 1. The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. *Springer*, New York (NY). 451-464.
- BRENNER, D. J., KRIEG, N. R. and STALEY, J. T. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 2. The Proteobacteria. Part B. *Springer*, New York (NY). 300-306.
- BRENNER, D. J., KRIEG, N. R. and STALEY, J. T. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 2. The Proteobacteria. Part C. *Springer*, New York (NY). 922., 938-939., 1145.
- DOMAIZON, I., SAVICHTCHEVA, O., DEBROAS, D., ARNAUD, F., VILLAR, C., PIGNOL, C., ALRIC, B. and PERGA, M. E. (2013). DNA from lake sediments reveals the long-term dynamics and diversity of *Synechococcus* assemblages. *Biogeosciences* 10, 3817-3838.
- FUKUNAGA, Y., KURAHASHI, M., YANAGI, K., YOKOTA, A. and HARAYAMA, S. (2008). *Acanthopleuribacter pedis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from a chiton, and description of *Acanthopleuribacteraceae* fam. nov., *Acanthopleuribacterales* ord. nov., *Holophagaceae* fam. nov., *Holophagales* ord. nov. and *Holophagae* classis nov. in the phylum Acidobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2597-2601.
- FUKUNAGA, Y., KURAHASHI, M., SAKIYAMA, Y., OHUCHI, M., YOKOTA, A. and HARAYAMA, S. (2009). *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov. and *Phycisphaerae* classis nov. in the phylum Planctomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 55, 267-275.

- GICH, F., GARCIA-GIL, J., OVERMANN, J. (2001). Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch Microbiol* 177, 1-10.
- GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H.-J., TRUJILLO, M. E., SUZUKI, K., LUDWIG, W. and WITHMAN, W. B. (2012). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 5. The Actinobacteria. *Springer*, New York (NY). 34., 2018-2023.
- HARRINGTON, C. T., LIN, E. I., OLSON, M. T., ESHLEMAN, J. R. (2013). Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med* 137 (9), 1296-1303.
- HUBER, H., DILLER, S., HORN, C. and RACHEL, R. (2002). *Thermovibrio ruber* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-reducing bacterium that forms a deep branch within the phylum Aquificae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1859-1865.
- HUG, L. A., CASTELLE, C. J., WRIGHTON, K. C., THOMAS, B. C., SHARON, I., FRISCHKORN, K. R., WILLIAMS, K. H., TRINGE, S. G. and BANFIELD, J. F. (2013). Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome* 1:22.
- KLINDWORTH, A., PRUESSE, E., SCHWEER, T., PEPLIES, J., QUAST, C., HORN, M., GLÖCKNER, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41:el.
- KRIEG, N. R., STALEY, J. T., BROWN, D. R., HEDLUND, B. P., PASTER, B. J., WARD, N. L., LUDWIG, W. and WITHMAN, W. B. (2011). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 4. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. – *Springer*, New York (NY). 330., 473., 545., 730., 739., 787., 795-799., 880.
- MAGYARI, E., BUCZKÓ, K., JAKAB, G., BRAUN, M., PÁL, Z., KARÁTSZON, D., PAP, I. (2009). Palaeolimnology of the last crater lake in the Eastern Carpathian Mountains: a multiproxy study of Holocene hydrological changes. *Hydrobiologia* DOI 10.1007/s10750-009-9801-1
- MÁTHÉ, I., VÖRÖS, L., SOMOGYI, B., FELFÖLDI, T., KONCZ, M., FIKÓ, R. D., SZABÓ, A., JURECSKA, L., SZILVESZTER, SZ., ZSIGMOND, A. R., MÁRIALIGETI, K. (2014). A Szent Anna krátertó mikrobiológiai vizsgálata. Sapiientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda, Románia (Kutatási jelentés)
- PUSPITA, I. D., KAMAGATA, Y., TANAKA, M., ASANO, K. and NAKATSU, C. H. (2012). Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbes Environ* Vol. 27, No. 4, 356-366.
- QIU, Y.-L., HANADA, S., OHASHI, A., HARADA, H., KAMAGATA, Y. and SEKIGUCHI, Y. (2008). *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology* Vol.74, No. 7, 2051-2058.

- QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., PEPLIES, J., GLÖCKNER, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41, D590-D596.
- RINKE, C., SCHWIENTEK, P., SCZYRBA, A., IVANOVA, N. N., ANDERSON, I. J., CHENG, J-F., DARLING, A., Malfatti, S., SWAN, B. K., GIES, E. A., DODSWORTH, J. A., HEDLUND, B. P., TSAMIS, G., SIEVERT, S. M., LIU, W-T., EISEN, J. A., HALLAM, S. J., KYRPIDES, N. C., STEPANAUSKAS, R., RUBIN, E. M., HUGENHOLTZ, P. and WOYKE, T. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter (Supplementary information). www.nature.com/nature.
- SCHLOSS, P. D., WESTCOTT, S. L., RYABIN, T., HALL, J. R., HARTMANN, M., HOLLISTER, E. B., LESNIEWSKI, R. A., OAKLEY, B. B., PARKS, D. H., ROBINSON, C. J., SAHL, J. W., STRES, B., THALLINGER, G. G., VAN HORN, D. J., WEBER, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75, 7537-7541.
- TANAKA, K., STACKEBRANDT, E., TOHYAMA, S. and EGUCHI, T. (2000). *Desulfovirga adipica* gen. nov., sp. nov., an adipate-degrading, Gram-negative, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 639-644.
- YAMADA, T., SEKIGUCHI, Y., HANADA, S., IMACHI, H., OHASHI, A., HARADA, H. and KAMAGATA, Y. (2006). *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1331-1340.

7. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott NAGY HAJNALKA a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- DNS izolálást,
 - PCR reakciót,
 - PCR termékek tisztítását, ellenőrzését agaróz gélelektroforézissel,
 - Kapott eredmények kiértékelését
- végeztem el.

Az emulziós PCR elvégzésében és a szekvenálás előkészítésében résztvettem.

Budapest, 2015. január 06.

Nagy Hajnalka

aláírás