

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Egy budapesti termálfürdő baktériumközösségeinek vizsgálata tenyésztési módszerekkel

SZURÓCZKI SÁRA

Biológus szak, MSc II. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Tóth Erika

habilitált egyetemi adjunktus

ELTE, Mikrobiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK



Budapest, 2015.

Tartalomjegyzék

I. BEVEZETÉS	3
II. CÉLKITŰZÉS	5
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	5
III. 1. Mintavétel	5
III. 2. A minták feldolgozása	5
III. 2. 1. A tenyésztés során alkalmazott táptalajok és tenyésztési technikák	5
III. 2. 2. Csíraszámbecslés	8
III. 2. 3. Dúsítás	8
III. 2. 4. Poliuretán hab tömbök alkalmazása	8
III. 2. 5. Baktériumtörzsek izolálása	9
III. 2. 6. DNS izolálás a baktériumtörzsekből	9
III. 2. 7. A baktériumtörzsek 16S rRNS génjének felszaporítása	9
III. 2. 8. ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis, amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise)	10
III. 2. 9. A 16S rRNS gén szekvencia analízise	11
III. 2. 10. A szekvenciaadatok kiértékelése	11
IV. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKESELÉSÜK	11
IV. 1. Csíraszámbecslés eredménye a különböző táptalajokon	11
IV. 2. A baktériumtörzsek tenyésztésének/meghatározásának eredményei	12
IV. 3. Az ARDRA csoportosítás eredményei	12
IV. 4. A forrás és a medence vizéből kimutatott baktériumközösségek összehasonlítása	13
IV. 5. Táptalajok összetételének hatása a baktériumok tenyésztetőségére	15
IV. 6. Szilárdító anyagok (agar-agar, gelrite) hatása a tenyésztésre	16
IV. 7. A különböző tenyésztési módszerek (közvetlen szélesztés, dúsított tenyészetek, valamint pur habos technika) alkalmazása során nyert izolátumok 16S rRNS alapú azonosításának eredményei	18
IV. 8. Következtetések	19
V. ÖSSZEFOGLALÁS	21
VI. SUMMARY	22
VII. IRODALOMJEGYZÉK	23
VIII. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	27
IX. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	28

I. BEVEZETÉS

Magyarország termálvizekben (az a rétegvíz, amelynek hőmérséklete meghaladja a 30°C-ot) gazdag ország, ennek ellenére kevés kutatás indult hévízforrásaink mikrobaközösségeinek feltárására. Hazánk termál- és gyógyvizeinek többsége kalcium-magnézium-hidrogénkarbonátos hévíz, melyek a vizek teljes ásványianyag-tartalmának legalább 20%-át adják. Hévízfeltárássra az ország területének mintegy háromnegyedén van lehetőség (Liebe, 2001).

Hazánk geotermikus adottságai közismerten kedvezőek. A kiemelkedő földtani körülmények legfőbb oka, hogy a Kárpát-medencében a világátlagtól (30-35 km) eltérően a földkéreg mindössze 24-26 km vastag. A földkéreg vékonysága miatt a forró magma közelebb esik a földfelszínhez, így a magyarországi geotermikus grádiens értéke átlagosan 5°C/100 m, ami azt jelenti, hogy 100 méterenként a mélybe haladva 5°C-ot növekedik a hőmérséklet. Ez az érték a világátlagnak mindegy másfélszerese (Liebe, 2001). A jó vízvezető képződmények legnagyobb mélysége eléri a 2,5 km-t. Itt a hőmérséklet már a 130-150°C. A termálvíz kutakban felfelé haladó víz a kút csövezése mentén lehűl, ezért a felszínen a víz hőmérséklet ritkán haladja meg a 100°C-ot (Liebe, 2001).

Nagyszámú termál-, illetve gyógyfürdőink medencéinek feltöltését is források és kutak biztosítják (Liebe, 2006). Ezen fürdőinket milliónyian keresik fel gyógykezelések vagy csak egyszerűen kikapcsolódás céljából, amely vizekben azonban a kötelező higiénés és előírt kémiai paraméterek elemzésén kívül alig végeznek vizsgálatokat. A fürdőkbe járó emberek közvetítésével megnő az antropogén eredetű szennyeződések száma, ami közegészségügyi szempontból komoly problémákat is okozhat (Káli, 2014). Munkám során a Gellért-fürdő forrásvizében és medencéjének vizében fellelhető baktériumközösséget vizsgáltam.

A Dunántúli-középhegység karbonátos víztározó rendszeréhez tartozó Budai Termálkarszt egyik területe a Gellért-hegy, ahol számos forrás fakad. A Gellért-hegyben közel azonos hőmérsékletű (35-47°C) és kémiai összetételű források fakadnak (Erőss és mtsai, 2010). A gellért-hegyi forráscsoportra települt a Rác-fürdő, a Gellért-fürdő és a Rudas-fürdő (Anda, 2014). Az itt található Gellért-táró (GT) egy 1969-1978 között épült 1100 m hosszú mesterséges alagút, mely a Gellért-fürdő szivattyúházából indul észak-nyugati irányban, majd a Rác-fürdőnél éri el a végszelvényt. A GT-I. és a GT-III. számú kút a Gellért-fürdő termálvíz ellátását szolgálja (Vojnics, 2008).

A termálfürdők vizében a természetes és az antropogén eredetű ökológiai faktorok sokféleségei kombinálódnak, mindez tükröződik mikrobiológiai állapotukban is, amelyről

viszonylag kevés információval rendelkezünk. A termálvíz-források természetes mikrobaközösségeinek összetételét a geológiai környezet minősége (fizikai, illetve kémiai paraméterei) határozza meg: hőmérséklet, pH, redoxpotenciál, ionkoncentráció, oxigénkoncentráció, fényintenzitás (Némedi, 2013).

Ezek a vizek tápanyagszegény (oligotróf) élőhelyek, szénforrást csak alacsony ($1-15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) koncentrációban tartalmazzak. Ennek ellenére a mikroorganizmusok nagyfokú túlélő képességük és metabolikus flexibilitásuk révén képesek ebben a környezetben is fennmaradni. Limitált tápanyag- és energiaforrás esetén különböző stratégiákat alkalmaznak túlélésük érdekében: visszafogott szaporodás, csökkent sejtméret, vagy valamilyen felszínhez kötődés (Kéki, 2014). Ezen közegekből nehéz tenyésztéssel baktériumokat kimutatni, ismert, hogy a környezetben található mikrobáknak csak nagyon kis százalékát (0,001-10%) alkotják a tenyészthető szervezetek. Ennek számos oka lehet: a nem megfelelő táptalaj alkalmazása, ha a baktériumok élelciklusának nyugalmi szakaszát nem tudjuk megszakítani, ha az adott faj csak szintróf partner jelenlétében képes szaporodni, ha különleges tápanyagok, körülmények szükségesek az adott baktériumok növekedéséhez vagy ha bakteriocidek, antimikrobiális hatású szubsztrátok gátolják a szervezetek növekedését. Számos jelmolekula fontos szerepet játszik a tenyésztés során, amelyeket valószínűleg a hagyományos tenyésztési módszerek nem engednek érvényre jutni. A tenyésztés sikeressége valószínűleg nem csak attól függ, hogy mely tápanyagokat használjuk, hanem sokkal inkább attól, hogy ezeket milyen mennyiségben adjuk hozzá a táptalajhoz (Zengler, 2009).

A tenyésztési technikák finomítására számos megoldás született. A sikeres tenyésztéshez a baktériumok természetes környezeti tényezőit célszerű minél inkább megközelíteni, bármely környezeti mintából is igyekszünk minél nagyobb sokféleségben tenyésztetni a mikroorganizmusokat. A magas tápanyag-koncentrációjú táptalajok gyakran gátló hatással vannak az oligotróf baktériumok növekedésére, ezért célszerű alacsony tápanyag-koncentrációjúakat alkalmazni (Ferrari és mtsai, 2005). Az átlagnál hosszabb inkubációs idő lehetővé teszi a lassan növekvő baktériumok megjelenését (Davis és mtsai, 2004). A gelrite gellángumi (alternatív szilárdító anyag) segítségével szerves anyagokra érzékeny mikrobákat vonhatunk tenyésztésbe (Kamagata és Tamaki, 2004). A poliuretán habból készült, táptalajt tartalmazó blokkokat pedig baktériumok csapdába ejtéséhez használhatjuk (Yashumoto-Hirose és mtsai, 2005). Manapság ezen tenyésztéses vizsgálatok során legtöbbször R2A (Reasoner és Geldreich, 1985), vagy hígított Nutrient (Kim és mtsai, 1997), illetve M-27 (Stevenson és mtsai, 2004) és ún. oligotróf (McAlister és mtsai, 2002) táptalajokat alkalmaznak, melyekkel az adott környezetek aerob, heterotróf baktérium tagjait

térképezik fel. Ismert tény, hogy a tenyésztési eljárások során a táptalajok mindig szelektívek, egyféle táptalaj sosem tudja visszaadni az eredeti környezet összes paraméterét, ezért szükséges minél többféle táptalajt és tenyésztési eljárást alkalmaznunk egy közeg baktériumközösségének feltárása során. Továbbá hiába mutatjuk ki molekuláris alapon az adott szervezetek jelenlétét, csak a tenyésztésbe vont baktériumoknak határozhatjuk meg a környezetben betöltött szerepüket, fiziológiai jellemzőiket, például a velük szemben alkalmazandó vegyszerekre mutatott reakciójukat, érzékenységet (Kéki, 2014).

II. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja hagyományos tenyésztéses és speciális táptalajok valamint tenyésztési technikák segítségével a Gellért-fürdő 36°C-os forrásvizében és medencéjének vizében fellelhető baktériumközösségek feltérképezése és összehasonlítása, továbbá a tenyésztési technikáknak, az alkalmazott táptalajoknak és a szilárdító anyagoknak a tenyészthető baktériumközösségre gyakorolt hatásának vizsgálata.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III. 1. Mintavétel

A mintavétel 2013. 10. 28-án a Gellért-fürdő forrásvizéből és 36°C-os medencéjéből (vízmélysége 1 m, vízfelülete 50 m²) történt. Az 1000 ml vízmintát steril csavarkupakos üvegekbe vettük. A forrásvizet a forrásvíz-befolyóból töltöttük a steril üvegbe, a medence vizébe pedig belemerítettük a steril üveget.

III. 2. A minták feldolgozása

III. 2. 1. A tenyésztés során alkalmazott táptalajok és tenyésztési technikák

A forrás és a medence vizének tenyésztéses kísérleteiben 10%-os R2A táptalajt (Reasoner és Geldreich, 1985), valamint szerves anyagokat alacsony koncentrációban tartalmazó táptalajt (MM=minimál médium), különböző szilárdító ágenseket és tenyésztéses technikákat alkalmaztunk az 1. ábrán látható gondolatmenet szerint.

Az alkalmazott táptalajok összetétele:

- Nyomelem oldat:

FeSO ₄ x 7H ₂ O	2,0 g
H ₃ BO ₃	0,03 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,19 g
NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,024 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,002 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,144 g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,036 g
EDTA	5,2 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,0

- Markoelem oldat:

KNO ₃	1 g
KH ₂ PO	0,2 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,02 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,0

- Vitamin oldat:

4-aminobenzoe sav (difco)	40 mg
D(+)-biotin (reanal)	10 mg
Nikotinsav (reanal)	100 mg
Ca-D(+)-pantoteát (sigma)	50 mg
Piridoxin-hidroklorid	100 mg
Tiamin-hidroklorid (reanal)	100 mg
Desztillált víz	1000 ml

A hőérzékeny vitamin oldatot 0,2 µm pórusátmérőjű membránon átszűrve sterilizáltuk, majd a táptalajok autoklávozása után steril körülmények között adtuk hozzá azokhoz.

- 10%-os R2A:

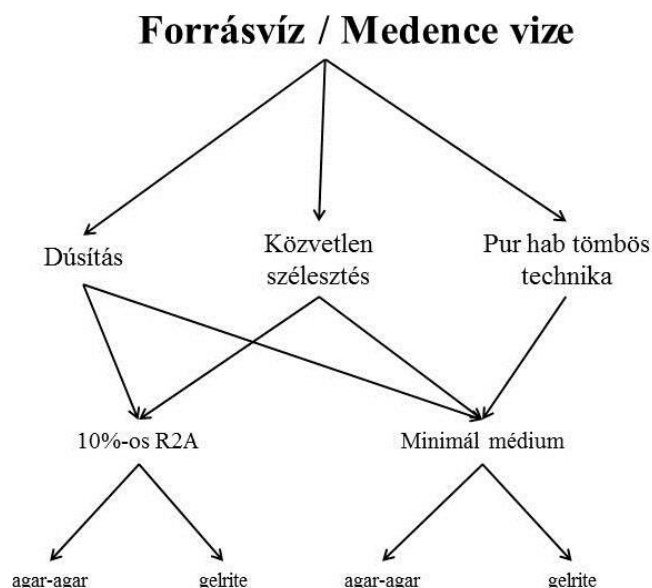
Az R2A táptalaj összetevőinek a tizedét használtuk fel. A gelrite szilárdító anyaggal készült R2A táptalajhoz literenként 12 g gelrite-ot adtunk. A gelrite egy extracelluláris poliszacharid, amelyet a *Sphingomonas* fajok termelnek.

- Minimál médium:

Nyomelem oldat	1 ml
Makroelem oldat	100 ml
Na-acetát	0,5 g
Metanol	2 ml
Glicerín	2 ml
Agar-agar/Gelrite	20,0 g/12,0 g
Forrásvíz	1000 ml
pH	7,0

Mindkét táptalajt agar-agar és gelrite szilárdító anyaggal is elkészítettük. A táptalajok elkészítéséhez nem desztillált vizet, hanem a fürdő forrásvizét használtuk, pH értéküket 7,0-re állítottuk be, majd 121°C-on 1 atm túlnyomáson 20 percig autoklávban sterilizáltuk őket.

Táptalajaink elkészítéséhez a későbbiekben desztillált vizet használtunk a fürdőből származó forrásvíz helyett. Ekkor a megfelelő szilárdságú táptalajt a gelrite-ot tartalmazó 10%-os R2A esetében literenként 0,3 g CaCl_2 és 0,6 g MgSO_4 hozzáadásával készítettük el. A gelrite-tal készült minimál médiumhoz literenként 0,5 g CaCl_2 és 0,75 g MgSO_4 , az agar-aggal készült táptalajhoz pedig 0,32 g CaCl_2 hozzáadására volt szükség.



1. ábra. A vízmintákból történő tenyésztés során alkalmazott különböző technikák, táptalajok valamint szilárdító anyagok

III. 2. 2. Csíraszámbecslés

A forrás és a medence vizéből származó mintákból 3 tagú (forrásvíz), illetve 4 tagú (medence vize) hígítási sort készítettünk a mikrobiológia szabályainak megfelelően. A hígítási tagok 100-100 µl-nyi mennyiségét négyféle táptalajra (agar-agarral és gelrite-tal elkészített minimál médium és 10%-os R2A) szélesztettük, mindegyik hígítási tagból 5 párhuzamos mintát készítettünk. A szélesztett mintákat 36°C-on 9 napig, ezután még további 16 napon át 25°C-on termosztáltuk. Ezt követően minden táptalajon elvégeztem a minták heterotróf csíraszámbecslését.

III. 2. 3. Dúsítás

A forrás és a medence vizéből származó mintákat dúsítottuk, amihez kétféle dúsító levest alkalmaztunk: 10%-os R2A-t és minimál médiumot. Steril körülmények között 250 ml tápleveshez 50 ml vízmintát mértünk. A mintákat mágneses keverőlapon három hétig 36°C-on inkubáltuk.

A dúsított mintákból 3 tagú 100x-os hígítási sorozatot (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) készítettünk. A hígítási tagokból 100-100 µl-t szélesztettünk mind a négyféle táptalajra, majd a Petri csészéket 36°C-on egy hétig inkubáltuk.

III. 2. 4. Poliuretán hab tömbök alkalmazása

A dúsítás során egy olyan speciális tenyésztési technikát is kipróbáltunk, amely során poliuretán habból készült kockák alkalmazásával történt a baktériumok csapdába ejtése (2. ábra). A körülbelül 1 cm³ térfogatú poliuretán blokkok sterilizálása után azokat négyféle steril táptalajba mártottuk (agar-agarral és gelrite-tal elkészített minimál médium és 10%-os R2A), majd hagytuk, hogy a táptalajok megszilárduljanak a pur hab kockák felszínén és belsejében. Mindegyik dúsító táplevesbe (10%-os R2A és minimál médium) a megfelelő táptalajjal átitatott 2-2 db pur hab blokkot tettük bele (2 db agar-agarral és 2 db gelrite szilárdító anyaggal elkészítettet). A mintákat mágneses keverőlapon, 36°C-on, három héten át inkubáltuk.



2. ábra. A dúsító táplevesben elhelyezett poliuretán blokkok

A medence és a forrás vizét tartalmazó 10%-os R2A dúsító táplevesekbe elhelyezett poliuretán habból készült blokkok három hét után elmállottak a 36°C-on történő inkubálás

során. A tápleves pH-ját ekkor pH papírral ellenőriztük, és az 7,5-8 körüli volt. A dúsított mintákat ezután még 3 hétig szobahőmérsékleten (25°C) inkubáltuk, és 2013. 12. 16-án a minimál médium dúsító táplevesben megmaradt poliuretán blokkokból mintát vettünk. Steril dörzsmozsarakban steril dörzs segítségével a pur hab kockákból kipréselt levet steril pipettaheggyel felszívtuk, majd háromtagú 100x-os hígítási sort (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) készítettünk, melynek mindegyikéből 100-100 μ l-t pipettáztunk kétféle táptalajra: agar-aggarral, illetve gelrite-tal elkészített minimál médiumra. A szélesztett mintákat 36°C-on 4 napig inkubáltuk.

III. 2. 5. Baktériumtörzsek izolálása

A táptalajokról a baktériumtörzseket random módon izoláltam, amelyeket ezt követően a mikrobiológia szabályainak megfelelően tisztítottam. A továbbiakban a törzseket agar-aggarral és gelrite-tal készült minimál médiumon valamint agar-aggarral készült 10%-os R2A táptalajon tartottam fenn (miután a gelrite-tal készült 10%-os R2A táptalajról izolált baktériumok agar-aggarral készült 10%-os R2A-n is nőttek, így azokat a továbbiakban a könnyebb kezelhetőség érdekében azon tartottam fenn).

III. 2. 6. DNS izolálás a baktériumtörzsekből

600 μ l-es Eppendorf-csövekbe 100-100 μ l DEPC-cel (diethyl-pirokarbonát) kezelt RN-áz mentes vizet (dH₂O) pipettáztam, majd mindegyik csőbe 100 μ l steril üveggyöngyöt tettem. Ezt követően a tisztított, fiatal (48-72 órás) baktériumtenyészetekből egy kacsnyi mennyiséget szuszpendáltam az Eppendorf-csövekben lévő folyadékba, majd MM301 típusú sejtmalommal (Retsch, Haan, Germany) 2 percen keresztül 30 Hz-en rázattam őket. A sejtfeltárás után a csöveket centrifugáltam (5000 g), majd a nyers lizátumot PCR készülékben (GeneAmp PCR System 2700) 5 percen át 98°C-on denaturáltam. Ezt követte a csövek 5 percen át történő centrifugálása (10000 g). A DNS mintákat -20°C-on tároltam.

III. 2. 7. A baktériumtörzsek 16S rRNS génjének felszaporítása

A baktériumok 16S rRNS génjét polimeráz láncreakcióval GeneAmp PCR System 2700 készülékben felszaporítottam, ehhez 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') és 1401r (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC 3') primereket alkalmaztam. A PCR terméket agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztem: 2,5 μ l DNS festéket (GR DNA Stain; Fermentas) tartalmazó 1%-os agaróz gélben 20 percig, 100 V-on, TBE pufferben futtattam a termékeket. A molekulasúly markerként EcoRI+HindIII Marker 3-at (Fermentas) használtam. A DNS festékekkel megfestett PCR termékeket áteső ultraibolya fényben detektáltam.

Az alkalmazott polimeráz láncreakció összetétele:

dH ₂ O	28 µl
dNTP (1 mM; Fermentas)	10 µl
10X <i>Taq</i> puffer (Fermentas)	5 µl
MgCl ₂ oldat (25 mM; Fermentas)	4 µl
27f primer (0,2 µg*µl ⁻¹ ; Fermentas)	0,5 µl
1401r primer (0,2 µg*µl ⁻¹ ; Fermentas)	0,5 µl
<i>Taq</i> polimeráz (1U*µl ⁻¹ ; Fermentas)	1 µl
DNS templát	1 µl
Végtérfogat	50 µl

Az alkalmazott polimeráz láncreakció hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	3 perc
Denaturáció	94°C	0,5 perc
Anelláció	52°C	0,5 perc
Extenzió	72°C	0,45 perc
Végső extenzió	72°C	10 perc

III. 2. 8. ARDRA (amplified ribosomal DNS restriction analysis, amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise)

Az ARDRA során a baktériumtörzsek 16S rRNS génjének amplifikált szakaszait *MspI* (hasítási hely: GG↓CC) és *BsuRI* (hasítási hely: C↓CGG) restrikciós enzimekkel hasítottam, majd a kapott fragmentumokat 2%-os agaróz gélben futtattam, így a különböző nagyságú DNS szakaszok elváltak egymástól. A hasítási mintázat alapján a törzseket csoportosítottam.

Az eljárás során 7,7 µl DEPC kezelt RN-áz mentes vizet, 2 µl puffert (10x Buffer R, illetve 10X Buffer Tango; Fermentas), 0,3 µl restrikciós enzimet (*BsuRI*(HaeIII) 10U* µl⁻¹, illetve *MspI*(HpaII) 10U* µl⁻¹; Fermentas) és 10 µl PCR terméket mértem 600 µl-es Eppendorf-csövekbe, majd a reakcióelegyet 37°C-on 3 órán keresztül inkubáltam. A kapott DNS szakaszokat agaróz gélelektroforézis segítségével szétválasztottam: 2%-os agaróz gélben 80 V feszültségen, TBE pufferben, 80 percig futtattam, pUC Mix Marker 8 (Fermentas) molekulásúly marker használata mellett. Az eredményt lefényképeztem, a vizsgált törzseket hasítási mintázatuk alapján csoportosítottam, és kiválasztottam a csoportreprezentáns, valamint a csoportokon kívül eső törzseket, amelyeknek elvégeztem 16S rRNS gén alapú faji azonosítását.

III. 2. 9. A 16S rRNS gén szekvencia analízise

A PCR termékek tisztítását, törzseink 16S rRNS génjének szekvenálását és a kapilláris elektroforézist az LGC Genomics GmbH (Berlin, Németország) végezte.

III. 2. 10. A szekvenciaadatok kiértékelése

A törzseink faji szintű meghatározásához a kapott szekvenciákat Chromas programcsomag (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Ausztrália) segítségével ellenőriztük, javítottuk majd az EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) adatbázisban lévő baktériumtörzsek szekvenciáival összehasonlítva meghatároztuk a törzseink filogenetikai helyzetét.

IV. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

IV. 1. Csíraszámbeclés eredménye a különböző táptalajokon

Az általunk alkalmazott táptalajokon a tenyésztésbe vonható baktériumok száma legalább egy nagyságrenddel nagyobb volt a medencében, mint a forrásvízben. Ez nem meglepő, hiszen a medencében már a „fürdőző-hatás” érvényesül, bár a mintavétel pillanatában csak 12 ember tartózkodott a medencében.

Mindkét mintavételi hely esetén a gelrite-tal készült 10%-os R2A táptalajon kaptuk a legmagasabb csíraszámértéket (1. táblázat). Hasonló eredményt kapott Kamagata és Tamaki (2005) édesvízi üledék baktériumközösségének vizsgálata során, agar-agar és gelrite szilárdító anyagot tartalmazó közepesen alacsony tápanyag tartalmú PE03 táptalaj alkalmazásával (Kamagata és Tamaki, 2005).

Az agar-aggarral készített R2A táptalajon kaptuk a legkisebb értékeket (1. táblázat), ami azért is lényeges megállapítás, mivel a legtöbb kutatás során ezt a táptalajt alkalmazzák hagyományosan oligotróf környezetekben fellelhető baktériumközösségek feltérképezésére.

1. táblázat. A csíraszámbeclés eredményei (TKE/ml)

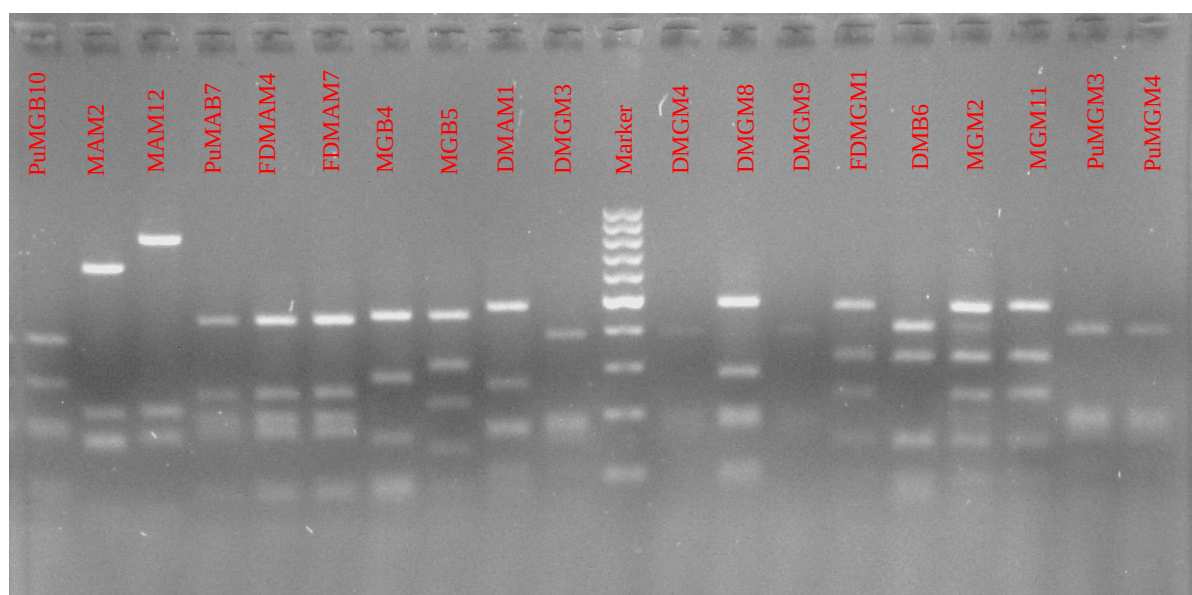
Forrás	10%-os R2A		minimál médium	
	agar-agar: $1,25 \cdot 10^1$	gelrite: $6,34 \cdot 10^2$	agar-agar: $1,08 \cdot 10^2$	gelrite: $6,08 \cdot 10^2$
Medence	10%-os R2A		minimál médium	
	agar-agar: $5,644 \cdot 10^2$	gelrite: $1,0949 \cdot 10^4$	agar-agar: $1,036 \cdot 10^4$	gelrite: $1,092 \cdot 10^4$

IV. 2. A baktériumtörzsek tenyésztésének/meghatározásának eredményei

A forrásvízből 53, a medence vizéből 68 baktériumtörzset, tehát összesen 121 törzset izoláltam. A különböző tenyésztési technikák alapján csoportosítva: a közvetlen szélesztett mintákból 24, a dúsított mintákból 73, a pur hab tömbös technika során pedig összesen 26 baktériumtörzset izoláltam.

IV. 3. Az ARDRA csoportosítás eredményei

Az ARDRA csoportosítás során 11 csoportot kaptunk, amelyekből a csoport nagyságától függően 1-3 csoportreprezentáns törzs 16S rRNS gén szekvenciáját határoztuk meg, valamint még 26 csoporton kívülálló törzsét.



3. ábra. Egy ARDRA (enzim: BsuRI, molekulásúly marker: pUC Mix Marker 8) során kapott gélkép

IV. 4. A forrás és a medence vizéből kimutatott baktériumközösségek összehasonlítása

Mindkét mintavételi hely baktériumközössége változatos képet mutatott. A medence és a forrás vizében egyaránt az Alphaproteobacteria osztály tagjai domináltak, mellettük az Actinobacteria osztály képviselői jelentek meg magas számban. Rajtuk kívül még tenyésztettünk baktériumokat a Beta- és Gammaproteobacteria, illetve a Bacilli osztályból. A Deinococci osztály képviselője (*Deinococcus grandis*) csak a medence vizében, a Sphingobacteriia osztályba tartozó baktériumfaj (*Sphingobacterium composti*) pedig csak a forrásvízben jelent meg.

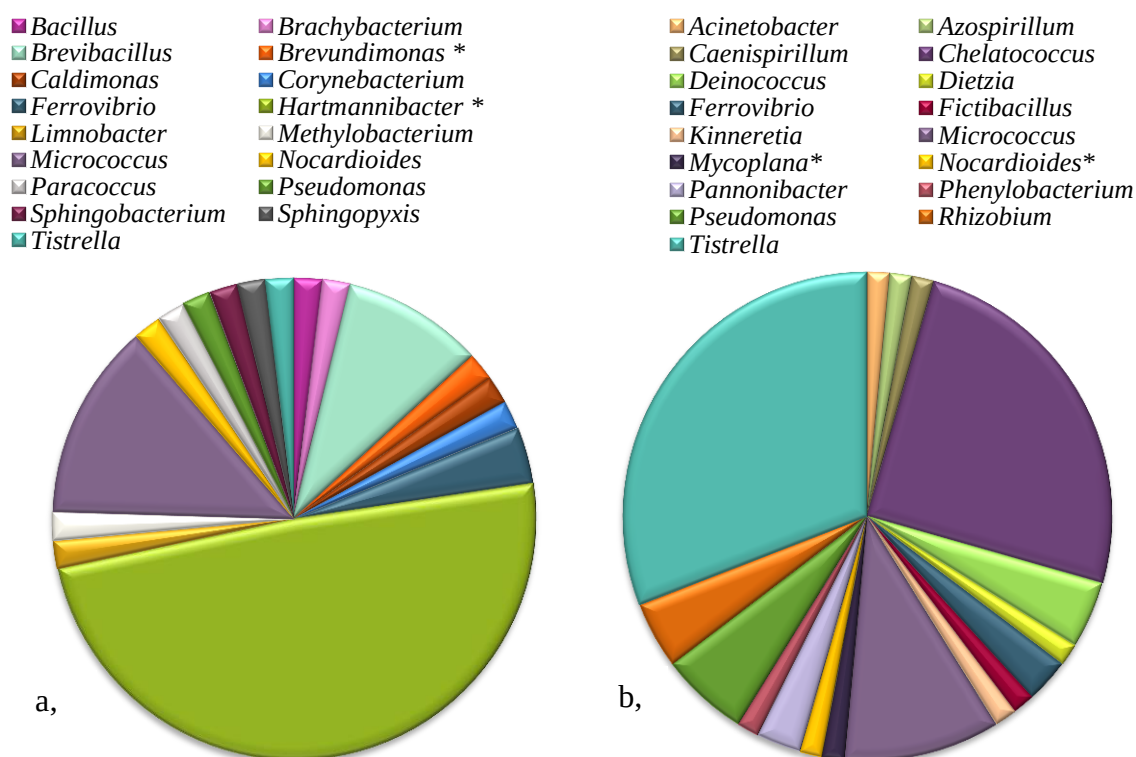
A tápanyagszegény környezetet vizsgáló korábbi kutatások szintén az Alphaproteobacteria osztály képviselőit mutatták ki nagy számban (Shauer és mtsai, 2003). Mellettük Betaproteobacteria, Actinobacteria, valamint a *Flavobacterium*, *Bacillus* és a *Staphylococcus* nemzetségek képviselőit szintén sikeresen izolálták oligotróf környezetekből R2A, nutrient, TSB (Tryptone Soya Broth), valamint Brain-Heart Infusion agar alkalmazásával (Chicote és mtsai, 2005). Megjegyzendő, hogy az utóbbiak jóval magasabb koncentrációban tartalmazznak tápanyagokat, mint ami az oligotróf közegekből történő tenyésztés során szükséges lenne.

A Villányi-hegység lábánál található Harkány kén- és hévízkútjában molekuláris klónozás segítségével obligát vagy fakultatív kén-, illetve szulfidoxidáló és szulfát/tioszulfátredukáló Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria és Deltaproteobacteria osztályok), illetve anaerob kén- és szulfitoxidáló Aquificae, Chlorobi és Chloroflexi törzsekbe tartozó baktériumokat mutattak ki. A Gram pozitív Firmicutes baktériumtörzs képviselőinek aránya meglepően kicsi volt a Gram negatív baktériumokhoz képest (Miseta, 2012). A Gellért-fürdő forrásvizében szintén a Proteobacteria törzsek domináltak.

Borsodi és mtsai (2012) a Budai Termálkarszt-rendszerhez tartozó Molnár János- és a Rudas-Török forrásbarlangot vizsgálták, amelynek forrásvize szulfátos-karbonátos és mérsékelt meleg hőmérsékletű (27-30°C). Eredményeik szerint legnagyobb számban a magasabb hőmérsékletű Molnár János barlangban a Firmicutes törzsbe tartozó termofil aerob és anaerob baktériumokat találtak. A Rudas-Török barlangban pedig a Proteobacteria törzs Deltaproteobacteria osztályának a kén- és szulfátredukáló képviselői fordultak elő legnagyobb számban (Borsodi és mtsai, 2012).

Amerika középnyugati területén található kórházának a 33°C-os, terápiás medencéjében molekuláris módszerekkel vizsgálták a jelenlevő baktériumközösséget. A Gammaproteobacteria és Bacterioides/Chlorobi taxonok, továbbá a *Bacillus* és a *Clostridium* nemzetségek domináltak a februári mintavétel során. Az augusztusi mintavétel során pedig a *Sphingomonadaceae* család és a *Mycobacterium* nemzetség képviselői jelentek meg nagy számban (Angenent és mtsai, 2005).

Mi munkánk során a Gellért-fürdő forrás és a medence vizéből 17-17 baktérium nemzetséget mutattunk ki, bár nagyon eltérő összetételben (4. ábra). A forrásvíz legjelentősebb képviselője egy olyan baktérium taxon volt, amely 16S rRNS gén szekvenciája alapján a *Hartmannibacter diazotrophicus*-szal mutatta a legközelebbi rokonságot (93,93%), és csakis a forrás vizéből lehetett kimutatni. Törzseink hasonlósága legközelebbi rokonához viszont olyan csekély, hogy bizonyosan a tudományra nézve új taxont sikerült tenyésztésbe vonnunk. A medencében legnagyobb számban a *Tistrella* és a *Chelatococcus* nemzetségekbe tartozó törzsek voltak jelen (4. ábra).



4. ábra. a, A forrásból kitenyésztett baktérium nemzetségek b, A medencéből kitenyésztett baktérium nemzetségek

*: a tudomány számára eddig ismeretlen baktérium taxonok

Mivel a medence vize a forrásból származik, ezért néhány nemzetség (*Ferrovibrio*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Tistrella*) mindkét mintavételi helyen (forrás és medence) megjelent, de a forrás és a medence baktériumközössége között kevés átfedést tudtunk kimutatni (4. ábra). Ez részben a medencében fellépő antropogén hatásnak köszönhető, illetve az ott jelenlévő gyorsabban növekvő heterotróf baktériumok túlnőhették a forrásban megtalálható, lassabban növekvő baktériumokat.

A *Deinococcus grandis*, *Dietzia cinnamea* és *Acinetobacter baumannii* fajokat korábban humán mintákból írták le, és ezek a fajok a Gellért-fürdő medencéjének vizében voltak megtalálhatóak. A *Deinococcus grandis* fajt a Human Microbiome Project során emberi bőrfelületről izolálták (The NIH HMP working group, 2009). A *Dieztia cinnamea* fajt egy csontvelő transzplantáción átesett páciens végbélkörnyéki bőrfelületéről írták le (Yassin és mtsai, 2007). Az *Acinetobacter baumannii* pedig egy oppotunista patogén, amely legyengült szervezetű emberekben tüdőgyulladást, húgyúti fertőzéseket, sebfertőzéseket és agyhártyagyulladást okozhat (Choi és mtsai, 2008). Ezen baktériumok tehát nagy valószínűséggel a mi esetünkben is emberi eredetűek. Az egyik általunk izolált, tudomány számára eddig ismeretlen törzs (FDRGB2/b) a 16S rRNS gén szekvenciája alapján *Brevundimonas vesicularis*-szal mutatta a legközelebbi rokonságot (97,24%), amely baktérium szintén fakultatív patogén, endocarditist (Yang és mtsai, 2006), peritonitist (Choi és mtsai, 2006) és septicus arthritist (Sofer és mtsai, 2007) képes okozni.

A medence vizének egyik domináns baktériumfaja a *Tistrella mobilis* volt (4. ábra), amely fajt eddig a Közép-Atlanti-hátságból (Cui és Shao, 2009) és szennyvízből (Shi, 2002) származó vízmintákból írtak le. Ez a baktérium irodalmi adatok szerint egy didemnin nevű antimikrobiális vegyületet termel. A didemnin a fehérje és DNS szintézist képes gátolni, ezért jelenleg rákellenes hatását is vizsgálják (Xu és mtsai, 2012). Ezen baktérium ilyen domináns megjelenése a medencében tenyésztett baktériumaink között további vizsgálatok tárgyát képezheti.

IV. 5. Táptalajok összetételének hatása a baktériumok tenyésztetőségére

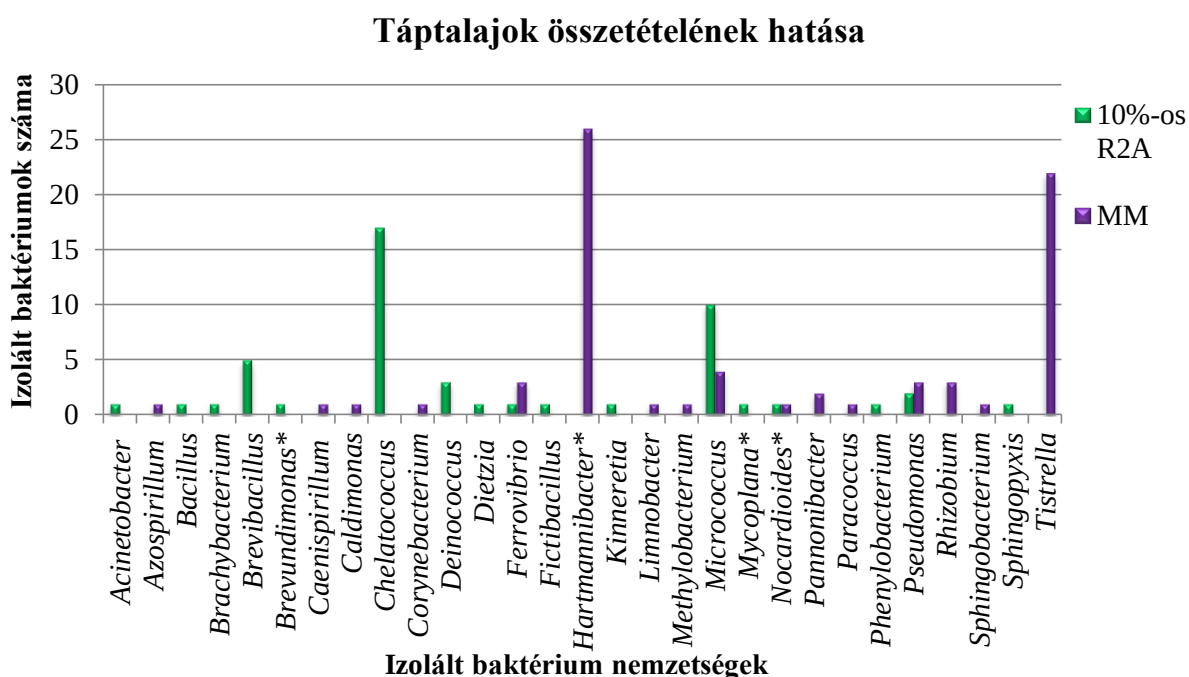
A 10%-os R2A és a minimál médiumról (MM) egyaránt eltérő és változatos baktériumközösséget sikerült izolálnunk. Mivel a táptalajok összetételükben különböztek, ezért mindegyik táptalaj más-más tápanyagokat hasznosító baktériumközösségek növekedésének kedvezett.

A 10%-os R2A és MM táptalajokon is az Alphaproteobacteria osztály képviselői mutatkoztak dominánsnak (6, illetve 11 nemzetség). Az Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria

és Actinobacteria osztályok képviselői mindét táptalajokon nőttek. A Sphingobacteria osztály képviselője csak minimál médiumon, a Bacilli és a Deinococci osztályba tartozó nemzetségek pedig csak 10%-os R2A táptalajon jelentek meg.

Legnagyobb számban a *Tistrella* nemzetség tagjai és a *Hartmannibacter diazotrophicus*-szal legközelebbi rokonságban álló (93,93%) faj képviselői jelentek meg a táptalajokon. Ezen taxonok csak minimál médiumon nőttek (5. ábra). Csak a *Ferrovibrio*, a *Micrococcus*, a *Nocardioides* és a *Pseudomonas* nemzetségek képviselői jelentek meg mindkét táptalajon (5. ábra).

Ismert, hogy valamilyen módon minden táptalaj szelektív. Ezért bármely környezet esetén a minél teljesebb diverzitás feltárásához célszerű minél többféle táptalajt párhuzamosan alkalmazni a tenyésztési vizsgálatok során.



5. ábra. A forrás és medence vizében előforduló tenyésztett baktérium taxonok az alkalmazott táptalajok függvényében

*: a tudomány számára eddig ismeretlen baktérium taxonok

IV. 6. Szilárdító anyagok (agar-agar, gelrite) hatása a tenyésztésre

Az Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria, Actinobacteria és Bacilli osztályok képviselői mindét szilárdító anyaggal elkészített táptalajokon nőttek. A Deinococci és a Sphingobacteria osztály képviselői csak az agar-agar tartalmazó táptalajokon jelentek meg.

Az agar-agar szilárdító anyagot tartalmazó táptalajokról 20, a gelrite-tal készületekről pedig 16 baktérium nemzetséget mutattunk ki. Fontosnak tartom kiemelni, hogy mindkét

táptalaj esetén jellemző, hogy a két különböző szilárdító anyag alkalmazásakor kevés az átfedés a tenyésztett baktérium taxonok között (6. ábra). Csak a *Brevibacillus*, a *Chelatococcus*, a *Hartmannibacter*, a *Micrococcus*, a *Pseudomonas* és a *Tistrella* nemzetségek nőttek mindkét szilárdító anyaggal elkészített táptalajokon (6. ábra).

Mindkét táptalajon (10%-os R2A és minimál médium) a *Ferrovibrio*, a *Micrococcus*, a *Nocardioidea* és a *Pseudomonas* nemzetségek jelentek csak meg (5. ábra), amelyek közül a *Ferrovibrio* nemzetség képviselői csak az agar-aggal készült táptalajokon nőttek, a *Pseudomonas*, a *Micrococcus* és a *Nocardioidea* genus tagjai pedig mindkét szilárdító ágenszt tartalmazó táptalajokon tenyésztethetőek voltak (6. ábra). Tehát nem tehető pontos megállapítás arra vonatkozóan, hogy a táptalajok összetételétől független-e a szilárdító ágensek hatása a baktériumok tenyésztésére. Ennek pontosabb meghatározására még további vizsgálatok szükségesek. A legmagasabb csíraszámértékeket viszont a gelrite-tal elkészített táptalajokon kaptuk (1. táblázat).



6. ábra. Az agar-agar és gelrite szilárdító ágenssel elkészített táptalajokról (10%-os R2A és minimál médium) izolált baktérium nemzetségek összehasonlítása

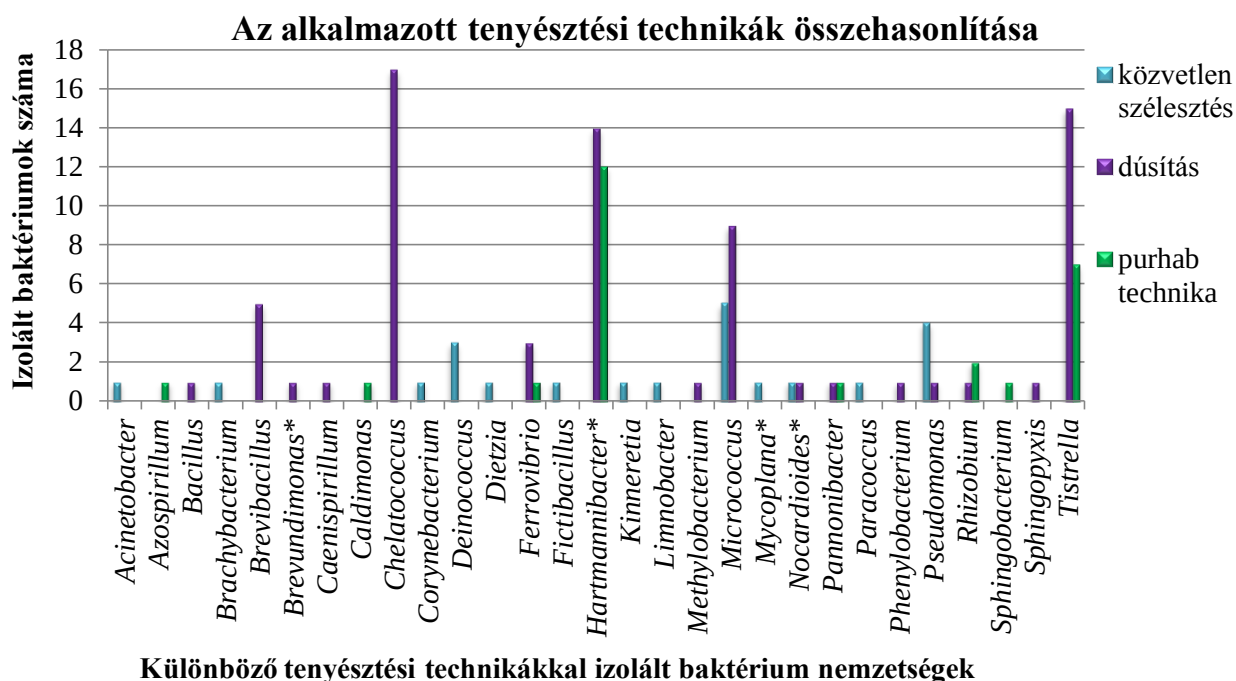
*: a tudomány számára eddig ismeretlen baktérium taxonok

IV. 7. A különböző tenyésztési módszerek (közvetlen szélesztés, dúsított tenyészetek, valamint pur habos technika) alkalmazása során nyert izolátumok 16S rRNS alapú azonosításának eredményei

Az Alphaproteobacteria osztály képviselőit mindhárom tenyésztési technika segítségével dominánsnak mutattuk ki. A legátfogóbb képet a fürdő baktériumközösségéről a közvetlen szélesztés során kaptuk, mert ennek segítségével sikerült a legkülönbözőbb baktérium osztályokból (Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Bacilli, Deinococci) képviselőket izolálnunk.

Dúsításkor bizonyos szervezetek, melyeknek az adott körülmények kedveznek, túlszaporodhatják a nehezebben alkalmazkodó társaikat, ugyanakkor ha meghosszabbítjuk a tenyésztési időt, akkor a lassabban növekvő mikrobáknak is esélyt adunk, hogy megjelenjenek a táptalajokon, ezért lehetett, hogy dúsítást követően az Alphaproteobacteria osztály lassabban növekedő képviselőivel is találkoztunk tenyésztés során.

A poliuretán blokkok alkalmazása során is az Alphaproteobacteria osztály, kis mennyiségben pedig a Betaproteobacteria és a Sphingobacteriia osztály képviselőit mutattuk ki. Yasumoto-Hirose és munkatársai (2005) öt féle, agar-agar szilárdító anyaggal elkészített táptalajokkal bevont poliuretán kockák segítségével izoláltak tengervízből nagy számban Alpha-, Gammaproteobacteria és Firmicutes taxonokba tartozó baktériumokat.



7. ábra. A különböző tenyésztési technikák segítségével kitenyésztett baktérium nemzetségek

*: a tudomány számára eddig ismeretlen baktérium taxonok

A dúsítás és a pur habos technika alkalmazása során az Alphaproteobacteria osztálynak több nemzetségét (11, illetve 7 nemzetséget) mutattuk ki a fürdőből, mint a közvetlen szélesztés során (2 nemzetséget). A nagy számban jelenlévő *Hartmannibacter diazotrophicus*-szal legközelebbi rokonságban álló új fajt csak a dúsítás és a pur habos technika alkalmazása során mutattuk ki. A *Brevundimonas vesicularis*-szal legközelebbi rokonságban álló fajt csak a dúsítás segítségével izoláltuk (7. ábra). A dúsítás és a pur hab technika alkalmazása tehát a ritkábban kitenyésztett, illetve az eddig nem tenyésztethető fajok megjelenésének kedvezett, és mivel ezek lassan növekvő baktériumok, az inkubációs idő megnövelése is hozzájárulhatott izolálásukhoz.

Csak közvetlen szélesztéssel is sikerült új baktérium taxont kimutatni: a *Mycoplana dimorpha*-val és a *Nocardioides daphniae*-vel legközelebbi rokonságban álló fajokat, ezért egy átfogóbb kép megismerése érdekében a tenyésztési eljárásoknál közvetlen szélesztési technikát is fontos alkalmaznunk (7. ábra).

Kevés átfedés volt azonban a három tenyésztési technikával kimutatott baktériumközösségek között, ezért az oligotróf közegek mikrobaközösségének minél teljesebb körű feltérképezéséhez szükséges egyidejűleg többféle tenyésztési technikát alkalmaznunk.

IV. 8. Következtetések

Az általunk vizsgált Gellért-fürdő medencéjének vízében legnagyobb számban a *Tistrella* és a *Chelatococcus* nemzetségekbe tartozó baktériumok voltak jelen. A baktériumok csíraszama a medencevízben a „fürdőző hatás” miatt egy nagyságrenddel nagyobb volt, mint a forrásvízben. A forrásvíz legjelentősebb képviselője egy olyan új taxon volt, ami a *Hartmannibacter diazotrophicus*-szal állt legközelebbi rokonságban (93,81%) a 16S rRNS gén szekvenciája alapján. Az általunk alkalmazott 10%-os R2A és a minimál médiumról (MM) egyaránt eltérő és változatos baktériumközösséget sikerült izolálnunk, de mivel a táptalajok összetételükben különböztek, ezért mindegyik táptalaj más-más tápanyagokat hasznosító baktériumközösségek növekedésének kedvezett. A két különböző szilárdító anyag (agar-agar és gelrite) alkalmazásakor szintén kevés átfedés volt a tenyésztett baktérium taxonok között, a legmagasabb csíraszámértékeket a gelrite-tal elkészített táptalajokon kaptuk. Az agar-aggarral készített 10%-os R2A táptalajon kaptuk a legkisebb értékeket, ami azért is lényeges megállapítás, mivel a legtöbb kutatás során ezt a táptalajt alkalmazzák hagyományosan oligotróf környezetekben fellelhető baktériumközösségek feltérképezésére.

Az alacsony szerves anyag tartalmú speciális táptalajok, tenyésztési technikák és a megnövelt inkubációs idő alkalmazása az oligotróf közegekben található, lassabban növekvő, ritkább fajok és a tudomány számára új baktérium taxonok megjelenésének is kedveztek. Új baktérium taxonok kitenyésztésére legalkalmasabb a minimál médium táptalaj (tápanyagokat csekély mennyiségben tartalmazott) alkalmazásának kombinálása volt a speciális tenyésztési technikákkal és a megnövelt inkubációs idővel. Mindenképpen szükséges az új táptalajok és tenyésztési technikák kiterjesztése, viszont a sikeres tenyésztéshez a baktériumok természetes környezeti tényezőit célszerű minél inkább megközelíteni, bármely környezeti mintából is igyekszünk minél nagyobb sokféleségben tenyésztésbe vonni a mikroorganizmusokat.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

A termálfürdők vizében a természetes és az antropogén eredetű ökológiai faktorok sokféleségei kombinálódnak, mindez tükröződik mikrobiológiai állapotukban is. Magyarországon a termálfürdőket ellátó források mikrobaközösségeinek feltárására eddig kevés, a medencék vizének teljes baktériumközösségének vizsgálatára pedig eddig nem indultak kutatások. Munkánk során a Gellért-fürdő termálforrása és medencéje vizének mikrobiológiai állapotát térképeztük fel hagyományos és speciális tenyésztési módszerekkel. A baktériumok izolálásához 10%-os R2A valamint szerves anyagokat alacsony koncentrációban tartalmazó (minimál médium) táptalajokat (forrásvíz hozzáadásával) alkalmaztunk agar-agar és gelrite szilárdító anyagokkal. Az izolált baktériumtörzseket ARDRA csoportosítás után 16S rRNS génjük szekvenciája alapján azonosítottuk.

A baktériumok csíraszama a medencében a „fürdőző-hatás” miatt egy nagyságrenddel nagyobb volt a forrásvízben észlelnél, és a legnagyobb csíraszám értékeket a gelrite-tal elkészített táptalajokon (10%-os R2A, minimál médium) kaptuk. A forrás és medence vizében eltérő összetételű mikrobaközösség megjelenését tapasztaltuk, bár mindegyik táptalajon és mintavételi helyen az oligotróf közegekben domináns Alphaproteobacteria képviselőit mutattuk ki nagy számban. A medence vizében a legnagyobb számban a *Tistrella* és a *Chelatococcus* nemzetségekbe tartozó baktériumok voltak jelen. A forrásvíz legjelentősebb képviselője egy olyan új taxon volt, ami a *Hartmannibacter diazotrophicus*-szal állt legközelebbi rokonságban (93,93%).

Sikerült a tudomány számára új taxonokat izolálni, amelyek 16S rRNS génjük alapján a *Nocardioides daphniae*, *Mycoplana dimorpha*, *Hartmannibacter diazotrophicus*, és *Brevundimonas vesicularis* fajokkal állnak legközelebbi rokonságban. Új baktérium taxonok kitenyésztésére legalkalmasabb a minimál médium táptalaj alkalmazásának kombinálása volt a speciális tenyésztési technikákkal és a megnövelt inkubációs idővel. Fontos megjegyezni, hogy egy közeg baktériumközösségének tenyésztési feltárása során szükséges minél többféle táptalajt és tenyésztési eljárást alkalmaznunk, és a sikeres tenyésztéshez a baktériumok természetes környezeti tényezőit célszerű minél inkább megközelíteni.

VI. SUMMARY

Thermal baths are water environments combining a wide variety of natural and anthropogenic ecological factors, which appears also in their microbiological characteristics. So far in Hungary there have been only a few researches that studied the whole bacterial diversity of the well, none of them studied the whole bacterial diversity of the pool water of thermal baths yet. In the present study the microbial community of the well and pool water in Gellért bath was studied with conventional and special cultivation methods in detail. 10% R2A and minimal synthetic media (with „bath water”) with agar-agar and gelrite were used to isolate bacteria. Strains were indentified by sequencing their 16S rRNA gene after grouping them by ARDRA.

Because of the anthropogenic effect, the quantity of cultivable bacteria was at least 10 fold higher in the pool as compared to the well. The largest quantity of cultivable bacteria was on the 10% R2A and minimal synthetic media with gelrite. There were different microbial community in the well and in the pool water, but on each applied media and from each sample the dominance of Alphaproteobacteria was characteristic. The largest groups in the pool water belonged to the *Tistrella* and *Chelatococcus* genera. The dominant member in the well water belonged to a new taxon, its similarity to *Hartmannibacter diazotrophicus* as closest relative was 93,93%.

From each sample novel species could be isolated: *Nocardioides daphniae*, *Mycoplana dimorpha*, *Hartmannibacter diazotrophicus*, and *Brevundimonas vesicularis* based on their 16S rDNA sequence. In order to cultivate novel taxa the best method was the combined use of minimal synthetic media, special cultivating techniques and increased incubation time. It is important to note that in case of studying a bacterial diversity with cultivation-dependent methods it is necessary to use a wide range of cultivation media and techniques, and to mimic the natural enviroment of bacteria.