

Egy posztvulkanikus területen létrejött forrásláp, a hargitai Szortyogó borvízláp mikrobaközösségei

36. OTDK Biológia szekció

készítette:

Kovács Krisztina

Biológus MSc I. évfolyam

témavezető:

Dr. Borsodi Andrea

habilitált docens

Mikrobiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS	1
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2
2.1	A Hargita kialakulása, jellemzői	2
2.1.1.	A Kelemen-Görgényi-Hargita hegyvonulat kialakulása, vulkanizmusa	2
2.1.2.	Posztvulkanikus tevékenységek, borvizek	2
2.1.3.	Hargitai ásványvizek geológiája	4
2.1.4.	Posztvulkanikus területek baktériumközösségei	6
2.2	Tőzezlápok jellemzése, ökológiai jelentősége	10
2.2.1.	Tőzezlápok típusai	10
2.2.2.	Hargitai lápok kialakulása, kutatásuk	11
2.2.3.	Hargitai forráslápok jellemző növényei	13
2.2.4.	A tőzezlápok mikroszkopikus élővilága	13
3	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
3.1	Mintavételi hely bemutatása, mintavétel	16
3.2	Vízkémiiai mérések	18
3.3	Sejtszámbecslés, DAPI festéssel	18
3.4	Tenyésztéses vizsgálatok	18
3.4.1.	Táptalajok, tenyésztés	18
3.4.2.	Identifikálás Maldi-TOF módszerrel	19
3.4.3.	DNS kivonás, PCR és Sanger-szekvenálás baktériumtörzsekből	20
3.5	Közösségi DNS kivonás, újgenerációs DNS amplikon-szekvenálás	21
4	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK	23
4.1	A fürdő vizének fizikai és kémiai paraméterei	23
4.2	A Szortyogó-borvízláp baktériumközösségeinek diverzitása	24
4.2.1.	A fürdő vizének tenyésztéses bakteriológiai eredményei	24
4.2.2.	A fürdő vizének NGS-sel feltárt baktériumközösségei	27
4.3	Eutróf lápok jellemző házas amőbái a Hargitán	32
5	KÖVETKEZTETÉSEK	34
	IRODALOMJEGYZÉK	35
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	37
	MELLÉKLET	38

1 Bevezetés

*„Mikroszkopizálóknak érdekes és hálás új kutatási terület volna a hargitai ásványvizeknek a biológiája, amely kutatásokra a külföldi irodalomban is oly kevés példa akad!”
(Bányai János Adatok a hargitai ásványvizek geológiájához 1929)*

Székelyföld földtani felépítéséből látható, hogy ez a terület a régmúltban sokkal változatosabb volt. Az évmilliók alatt Erdélyt többször is borította mélyebb vagy sekélyebb tenger. Később a tektonikus erők hatására ezek egyre kisebb tengeröblökké, majd félsós medencékké, legvégül pedig édes vízzel telt kisebb-nagyobb medencékké váltak, és ezekhez kapcsolódva kialakultak a folyóvölgyek, mocsarak és a tőzezlápok.

Dolgozatomban egy ilyen különleges élőhely, egy korábbi vulkanikus területen létrejött láp jellemzőit, mikroszkopikus élővilágát mutatom be. Tudomásom szerint korábban sem tenyésztési módszerekkel, sem újgenerációs szekvenálással nem vizsgálták ezt a területet. A szélsőséges környezeti feltételek, beleértve a hideget, a magas vas és mangán koncentrációt, valamint a nitrogén, a foszfor és az oxigén korlátozott hozzáférhetőségét, egyedülálló környezeti feltételeket biztosítanak az ott élő mikroorganizmusok számára. Filogenetikai és anyagcsere diverzitásuk feltárása segíthet választ kapni arra is, hogy a tőzezlápok milyen szerepet tölthetnek be az elemek biogeokémiai körforgásában. Mintavételi helyként a hargitai Szortyogó borvízláp (mai nevén, Hargitaligeti forrásláp) helyiek által kiásott fürdőjét választottam.

Dolgozatom első részben azokat a geológiai folyamatokat ismertetem, amelyek a lápot tápláló borvizek kialakulásához vezettek. A második részben a tőzezlápok kialakulását és jellemzőit veszem sora. Végül a környezeti baktériumok molekuláris és hagyományos kimutatási módszereit tekintem át. A mikrobiális genomikai adatok áradata ellenére a kísérleti tesztelés fontos a mikroorganizmusok sejtbíológijára, ökológiai szerepére és evolúciójára vonatkozó következtetések megerősítéséhez. Mivel a prokarióta diverzitás nagy része továbbra is tenyésztetlen és kevésbé ismert, a tenyésztés is kiemelt fontosságú. Kutatásomban megpróbáltam először rendhagyó módon Maldi-TOF módszerrel identifikálni a kitenyésztett baktériumokat, majd ezeket az eredményeket Sanger szekvenálással verifikálni. Legvégül pedig a tenyészthető baktériumok mellett megkísértem a molekuláris diverzitást is feltárni újgenerációs 16S rRNS gén alapú ampikon szekvenálással.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A Hargita kialakulása, jellemzői

A Hargita-hegység a Keleti-Kárpátok legbelső, nyugati vulkáni vonulatának délkeleti szegletében helyezkedik el. A Kárpátok vonulatával párhuzamosan futó belső hegységkoszorú része. Vulkáni eredetű, főleg andezitből áll. Legmagasabb csúcsa a Madarasi-Hargita (1801 m). A Kelemen-Görgény-Hargita vonulat részeként, a Görgényi-hegység folytatása. A hegység hossza a gerincvonalon 70 km, szélessége 20–25 km. Három részre tagolódik: Északi-Hargita, Központi-Hargita és Déli-Hargita.

2.1.1. *A Kelemen-Görgényi-Hargita hegyvonulat kialakulása, vulkanizmusa*

A Kárpát-Pannon térséget alkotó két nagy kőzetlemez (a nyugati az afrikai Alcapa és a keleti az európai Tisza-Dácia) tömbjének a mai helyére kerülése vezetett a Kárpátok felgyűrődéséhez, és a belső oldalát kísérő belső-kárpáti vulkáni vonulat kialakulásához. A konvergens lemezek ütközésekor fellépő szubdukció következménye a felette elhelyezkedő lemez szélső sávjában kialakuló mészkalkáli vulkanizmus és a lemezperemi gyűrthegységgel párhuzamos vulkáni ív létrejötte (KARÁTSZON D. 2009).

A Keleti-Kárpátok tűzhányólánca a Kárpátok legfiatalabb vulkáni területe, a 9 millió éve kezdődött vulkánosság a Csomádban zárult, ami Közép-Európa legfiatalabb tűzhányó-tevékenysége volt. Ennek a fiatalágnak köszönhető, hogy a hegylánc vulkáni képződményei még jól rekonstruálhatók, formái épek, a működéshez kapcsolódó borvizekkel, mofettákkal, és tőzegmohalápokkal együtt (SZAKÁCS S.- KARÁTSZON D. 2002).

2.1.2. *Posztvulkanikus tevékenységek, borvizek*

Sajátos földrajzi fekvésének, geológiai fejlődésének és szerkezetének köszönhetően Erdély nagy értékű természeti örökségnek ad otthont. A földtani érdekességek közül a legfontosabbak a vulkánkitörés utáni időszakok sokasága, amelyek a geológiai jelenségek ritka példái (SZAKÁCS A. 2010).

A vulkánok működése időszakos. Aktív tevékenységük szüneteiben vagy működésük végleges megszűnése után még hosszú ideig előfordulhat vulkáni utóműködés. Az erupciók teljes megszűnése után a felszínt alakító erők válnak dominánssá és ezeknek az eredménye lesz a mai ismert térszín. A külső módosító erőkkel párhuzamosan a gázömlések, gejzírek és ásványvíz feltörések is hozzájárulnak a környezet megváltoztatásához (BÁNYAI J. 1929).

A posztvulkáni jelenségek a kitörések végleges megszűnte után is jó ideig tapasztalható jelenségek gyűjtőneve. Nagy valószínűséggel a vulkáni folyamatokat tápláló, mélyen fekvő magmakamrák lehűlésének és gáztalanításának hatásai. Ahogy Dr. Szádeczky K. Gyula írt a késő vulkáni tevékenységekről, „A Székelyföld képződése” című értekezésében; „A vulkánizmus életének utolsó szakában azonban sok olyan anyagot termelt, sőt termel még most is, amelyik az emberre nézve fontos tényező.” Előfordulását és gyakoriságát számos helyi geológiai és földrajzi jellemző befolyásolja. E tényezők komplexitása határozza meg a helyben előforduló posztvulkáni megnyilvánulások egyedi jellemzőit, amelyek a tájak és biológiai élőhelyek széles spektrumát eredményezik, sajátos mikrokörnyezeteket alakítanak ki (SZAKACS A. 2010).

Leggyakoribb és legváltozatosabb előfordulásuk a neogén vulkáni tevékenység legfiatalabb területeihez kapcsolódik a Keleti-Kárpátokban, a Déli-Hargita környékén. Egy vulkán utolsó kitörése után sokszor még évezredekig keresztül is „tetszeleg”.

A felszínen megnyilvánuló posztvulkáni jelenség lehet:

Szolfatara, kénés kigőzölgés. (Nápoly mellett Pozzuoliban Szolfatara, a neve is innen ered).

Fumarola, gőzkürtő. Magas hőmérsékletű (100-300 °C) vízgőzfeltörések. (Tízezer Füst Völgye, Alaszka, Katmai Nemzeti Park).

Iszapfortyogók meleg vize sok agyagásványt old ki a kőzetekből, amit a felszivárgó gázok bugyogtatnak. Vulkáni területeken, agyagos térszíneken jelentkeznek (1. kép).



1. kép. Iszapfortyogók Homoródon (saját fotó)

Hévforrás a fumarolához hasonló jelenség, azonban hőmérséklete jelentősen alacsonyabb (100 °C alatt). A hévforrások vize mindig gazdag különféle oldott anyagokban,

például: kalciumban, magnéziumban, nátriumban, káliumban, lítiumban, bórban. Az ilyen hévforrásokat rendszerint gyógyhatásúnak tartják (ERDÉLYI I. et al. 1977) (FRANCIS P. 1981).

Mofetta, a vulkáni utóműködés során gáz formájában felszínre törő szén-dioxid. A szén-dioxid kísérőjeként előfordulhat nitrogén, vízgőz és kén-hidrogén is. Ismét Dr. Szádeczky K. Gyulától idézve „Visszatérve a mélybe húzódó, kialvó vulkáni működések kapcsán az előbbieket követő postvulkáni jelenségekre, a szénsavgázelszállásról vagy – (...) világnyelven hívják – mofettákról kell még megemlékezni. (...) ez a legalacsonyabb hőfokon végbemenő, legutolsó, legtávolabbi tartó megnyilvánulása az elhaló vulkáni életnek. (...) A mofetták elszálló szénsava nem egyéb, mint a vulkáni kitörés előtt képződött szénsavas kőzeteknek az aktív vulkáni anyag vegyi hatására felszabaduló gáza, (...) A szénsavgáz helyenként egymagában, szárazon lép a föld felületére, ahol a levegőnél kissé nehezebb súlyánál fogva a mélyedésekben, barlangokban meggyűl. Félelmetes, halálthozó helyek ezek a mélyedések, (...) Sokkal gyakoribb az az eset, hogy a felszálló szénsavgáz a föld kérgében keringő vízzel találkozik, (...) és így mint üdítő borvíz forrás jön a felületre. (...) Ezek nem csak szénsavat tartalmaznak, hanem az eruptív anyagból egyéb ásványos alkotórészek is kerülnek belé (...), ilyen módon nagyon sokféle: vasas, földes, kénes, alkalis savanyú ásványos gyógyvizek származnak (SZÁDECKY-KARDOSS GY. 1929).

2.1.3. Hargitai ásványvizek geológiája

A vulkáni utóhatásokra visszavezethető ásványvizek és gázforrások megmutathatják a felszín alatt zajló geokémiai folyamatokat. A Hargita nagy mennyiségű és változatos ásványvíz készletének segítségével betekintést nyerhetünk a Föld „életjelenségeibe”. Ha a források vegytani adatait összevetjük, a környezetük geológiai tulajdonságaival szabályszerűséget fedezhetünk fel. Különböző kőzettípusoknál más-más ásványvíz fordul elő. A fő tényező a Hargita vulkánosora, főleg a posztvulkanikus hatások miatt létrejövő szénsavas ásványvizek (borvizek, savanyúvizek) és a tiszta CO₂ gázömlések (BÁNYAI J. 1929).

Az ásványvizeket csoportosíthatjuk, vannak a savanyú vizek, a sós vizek, a Selters-típusú vizek, ezek átmenetet képeznek a sós és szénsavas vizek között és a „Büdös” vizek, amik kén-hidrogénforrások édesvízzel. A vizek sajátos csoportja a hőforrásokhoz sorolható hemiterma (langyos) források, jellemzően 20-26 °C-osak. Ezek fizikai tulajdonságuk alapján lettek besorolva, nem kémiai, mint az előző csoportok. Egykori gejzírek utolsó maradványainak tekinthetők (BÁNYAI J. 1929, 1934).

A hargitai borvizek létrejöttének megértéséhez megemlítem még az itt található gázforrások jellemzőit. A földből kiáramló gázforrások csoportosítása: 1. metán, 2. szén-dioxid,

3. kén, 4. nitrogén forrás, 5. vulkánokban, 6. ásványi zárványokban, 7. a termőtalajban előforduló gázok. A Hargita környéki posztvulkanikus hatásokra képződő gázforrások sajátos jellemzői a vidéknek. Mivel csak alig pár százaléknyi kén-hidrogént tartalmaznak a mofetták csoportjába tartoznak. A Hargita zóna összes gázömlése hasonló összetételű, több mint 95% CO_2 , és kis mennyiségben, H_2S , O_2 , N_2 és vízgőz. Ezek a repedéseken átszivárgó CO_2 gázömlések mutatják a már korábban említett egykori működő vulkáni élet legutolsó jelét. A kiömlés helyén felgyűlhet, megakadályozza a növényi élet fejlődését, mint valami beteg sebhely mutatja a kiömlés helyét. Az exhalációk nemcsak az élővilágra vannak hatással, de az anyakőzetet is megtámadják (BÁNYAI J. 1926, 1936).

Egészen más életteret biztosít, amikor a mélyben keringő víz telítődik ezekkel a CO_2 gázforrásokkal és kialakul a borvíz. A Keleti-Kárpátokban néhány ezer szén-dioxidban gazdag ásványvíz forrás van, a vulkanikus terület közelsége kedvez az aktív CO_2 kiválásnak. Az ásványvizek CO_2 -ben gazdagok, pezsegnek, buborékoló tócsákat hozhatnak létre (2. kép). A források helyét gyakran vas-hidroxid lerakódások jelölik (KIS M. et al 2020).



2. kép. Szénsavas, vasas borvíz forrás Kirulyfürdőn. A vas jellemzően oxidálódik a megcsapolódásnál és vas-hidroxid formájában csapódik ki a források környékén, ami rozsdás színt kölcsönöz a helynek. (saját fotó)

Kataszteradatok szerint 2000 forrás található a Hargitán. A CO_2 a víz oldóképességét is növeli, ásványi anyagokat is felold. Amikor feltörő gáz találkozik a földkéregben keringő hideg vízzel, nagy nyomás alatt sok elnyelődik belőle a vízben, az így keletkezett szénsavas víz pedig sok ásványi anyagot képes feloldani útja során. A vasas savanyú vizek a leggyakoribbak, ami érthető a terület geológiájából. A vas „húséges” kísérője a mangán, ami főként karbonát alakban oldódik az ásványvizekben (BÁNYAI J. 1934).

A vasas vizek egyik érdekes csoportja, az alkalikus, a másik a földes elemeket tartalmazó földes ásványvíz. Ez a típus andezit-agglomerátumon tör fel a felszínre, ahol közel

vannak az alaphegység rétegei. Jellemzőjük a magas magnézium- és kalcium-karbonát tartalom. Ilyen földes-vasas borvíz a **hargitaligeti Hargita**, régi nevén **Kamilla** (BÁNYAI J. 1929, 1934).

A felszínre törő ásványvizek helyenként az alacsonyan fekvő területeken, különböző kiterjedésű természetes „pezsgő” medencéket, lápokot, mocsarakat hozhatnak létre. Összetételüktől függően különböző színűek lehetnek. Sokukat mesterségesen megnagyobbították, átalakították, hogy gyógymedenceként használják (SZAKÁCS A. 2010).

A források felszínre emelkedésének erejét a közeli patakok szintje szabja meg. Az erősen vasas és bőforrással feltörő víz sok kolloidális limonit szemcsét tartalmaz, ami vöröses okkersárga színt kölcsönöz neki. A mocsaras környezetben feltörő vizek a meleg nyári napokon teljesen bezöldülhetnek (3. kép). A légnyomás csökkenésével sárgára változnak, a szén-dioxid kibocsátás miatt, aminek hatására csökken az oldóképessége a víznek, és kicsapódik a vas. Az ilyen vizek felszínét ellepheti egy zöldes-rozsdás hab. Ezek valódi mikrokozmoszok mikroszkóppal vizsgálva (BÁNYAI J. 1929).



3. kép. Hargitaliget fürdője algavirágzáskor (saját fotó)

2.1.4. Posztvulkanikus területek baktériumközösségei

A szélsőséges környezeti paramétereket kedvelő életformákat extremofileknek hívják. Többségük baktérium és archaea, de eukarióták is előfordulhatnak közöttük. Maga az extremofil antropocentrikus kifejezés, a felfedezésük előtt úgy gondolták, hogy az élőlények az emberek által is megszokott környezeti feltételek között érzik jól magukat. Az extremofilek megismerése a Földön kívüli élet kutatásához is támpontot adhat, mivel ezek a szervezetek környezeti paraméterek szélsőséges értékeit tolerálják, és így feltételezhető, hogy más hasonló tulajdonságokkal rendelkező égitesteken is megélhetnek (KERESZTURI Á. 2011). Annak megértése, hogy az élet miként képes kihasználni a posztvulkanikus környezet előnyeit,

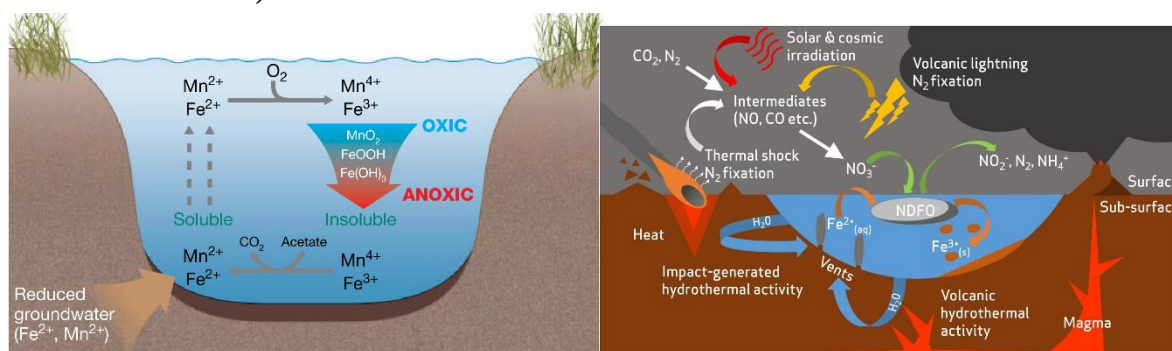
ugyancsak fontos a más bolygókon való élet lehetőségének megítéléséhez. Minden olyan égitesten, ami nem hűlt ki teljesen lehet számítani arra, hogy vulkanizmus jelen van. Ha ez adott, feltételezhető a lemeztektonika is, ami nem csak a vulkanizmus egyik kiváltó mechanizmusa, hanem az élet számára szükséges feltételek megteremtéséhez is hozzájárulhat, így elképzelhető, hogy az élet kialakulásához is. A vulkanikus környezetek geomikrobiológiájának megértése ezért asztrobiológiai jelentőséggel bír. A vulkanikus kőzetek figyelemre méltó mikrobiális sokféleséget rejthetnek. Különösen porozitástól függően a belső tereket szeretik kolonizálni. A kőzetekben megtalálható szervezetek nagyrésze inaktív, de *Bacteroides* és *Actinobacteria* fajokat sikeresen kitenyésztettek már több alkalommal is. Ezekre az organizmusokra jellemző, hogy ellenállnak a kiszáradásnak, a hőmérséklet ingadozásnak és némelyik tolerálja a nehézfémek magas koncentrációját is. Némelyik *Actinobacteria* spórákat fejleszthet, ami a szétterjedésüket is segíti, mások fonalas növekedésűek, ami a kőzetekbe való behatolásukat és kőzeten belüli terjedésüket segíti elő. A fototrófok ismertek arról, hogy a posztvulkanikus környezetek első kolonizálói közé tartoznak, ezek a pionír baktériumok leginkább kokkoid és fonalas formájúak. Az első megtelepedők között a kokkoid forma a domináns, ami érthető, mivel könnyebben terjed a levegőben. Megtelepedésük és elszaporodásuk után lehetőséget biztosítanak a szerves szént igénylő heterotrófoknak. A fototrófok mellett fontosak a kemolitotrófok is. Aktív vulkáni környezetben, ahol CO_2 , H_2S , SO_4 kibocsátás van, a kemolitotrófok primer termelése is szerves szént biztosít a heterotrófoknak. Később ezek a kőzetek andoszolokká alakulnak, majd legvégül ugyancsak a mikroorganizmusoknak köszönhetően termékeny talajjá. A fiatal andoszolok mikro- és makrotápanyagban szegények. Általában nagy Al- és Fe-tartalmúak, emellett huminsavban gazdagok és jelentős a foszfát visszatartó képességük, ami akadályozza a mikrobiális és növényi élet elterjedését. Kulcsfontosságú az andoszolok kezdeti kolonizációja, hogy az élet fejlődésének szempontjából megfelelővé váljon. Ezeknek a korai mikrobáknak képesnek kell lenni a túlélésre és növekedésre a mostohakörülmények között is (COCKELL C. S. et al. 2011).

A vas nagy mennyiségben 4,3 % (m/V) fordul elő a kontinentális kéregben, ez számos egyedi geokémiai jellemzővel párosulva lehetővé teszi, hogy a vas kölcsönhatásba lépjen más biológiailag fontos elem, például a szén, a kén, a foszfor körforgással. A vas redox ciklusa a Föld története során aktív és globális jelentőségű volt. A második leggyakoribb redox-aktív fém a mangán. A mangán bizonyos környezetben koncentrálódik, ami fokozza helyi geokémiai jelentőségét. A vas és mangán között mind geokémiai és mind mikrobiális szempontból sok a hasonlóság. Természetes környezetben való oxidációjukat és redukciójukat mikrobiális katalízis segíti elő (CANFIELD D. E. et al. 2005). A vasnak a felszínen két természetes állapota

van a ferro Fe^{2+} és a ferri Fe^{3+} vas. A harmadik oxidációs állapot a Fe^0 a Föld magjában fordul elő. A Fe^{2+} és a Fe^{3+} közötti átmenetek, egy elektronos oxidációk és redukciók. A vasvegyületek kémiai és anaerob légzés során redukálódhatnak, a Fe^{2+} szintén kémiai és kemolitotróf anyagcsere folyamán oxidálódhat. A mangán 5-10-szer kisebb mennyiségben van jelen a felszínen, mint a vas. Itt is két oxidációs állapotot különböztetünk meg Mn^{4+} és Mn^{2+} . A vas és a mangán ciklusok legfontosabb jellemzője, hogy oxidált és redukált formájuknak más az oldhatósága. A redukált vas és a redukált mangán oldható, az oxidált állapot például vas-oxid, vas-hidroxid neutrális kémhatású környezetben oldhatatlan és hajlamos kiüledni a vízi környezetben. Emiatt a tengeri és édesvízi üledék nagy részét kiteheti. Néhány baktérium és archaea anaerob légzése során a Fe^{3+} -t használja elektronakceptorként és általában képesek a mangánt is felhasználni, de akár az uránt is redukálhatja. Így a vas- és a mangán-oxid redukciója gyakori a vízzel borított talajokban, mocsarakban. Ilyenkor az oldható redukált vas és mangán az anoxikus üledékből diffúzióval újra oxigénnel teli régióba juthat, és kémiai vagy mikrobiológiailag oxidálódhat. A vas kémiai oxidációja semleges pH-n nagyon gyorsan lezajlik, a mangán nagyon lassú, de a baktériumoknak köszönhetően nagyságrendekkel növelhető. Ezután kicsapódik a fémoxid és újra leülepszik az anoxikus régióba, és a körfolyamat befejeződik. Savas pH-n nem oxidálódik spontán a ferrovas, acidofil kemolitotrófok *Leptospirillum ferrooxidans* és *Acidithiobacillus ferrooxidans* katalizálják a folyamatokat. Ilyenkor az energianyerés nagyon kicsi, ezért nagy mennyiségű vasat kell oxidálniuk a növekedésükhöz. A Fe^{2+} oxidáció egyes mikrobáknál nitrát redukcióval összekapcsolható (1. ábra) (MADIGAN M. T.-BENDER K. S. 2015).

Geokémiai bizonyítékok vannak arra, hogy a nitrát a ferrovas oxidálószerként szolgál az anoxikus környezetben, például tengeri üledékekben. Nitrátredukáló, vasoxidáló baktériumokat írtak le a közelmúltban, és ez a csoport ma már sokféle szervezetet foglal magában. Az első denitrifikáló baktériumok voltak, amelyek az energiát konzerválták a reakciókból. Mindegyik törzsben a vas-oxidáció a leggyorsabban a mixotróf növekedés során megy végbe, szerves szubsztrát, például acetát jelenlétében, de például a *Thiobacillus denitrificans* a jelek szerint kemolitoautotróf módon, vas-oxidációval növekszik szerves anyagok hiányában. A *Geobacter metallireducens* szintén oxidálja a vasat, miközben a nitrátot ammóniummá redukálja (CANFIELD D. E. et al. 2005). A mikrobiális nitrátfüggő Fe^{2+} oxidáció (NDFO) különlegességét bizonyítja az is, hogy tanulmányozták az asztrobiológiában. Ezeknek a mikrobáknak a feltételezett életképességét vizsgálták az egyszerű élet fenntartására a Mars korai környezetében. A feltételezések szerint léteztek olyan környezetek a Marson (A Mars mai felszíne hideg, száraz, és ki van téve ionizáló és UV-sugárzásnak, vagyis az élet számára

károsnak ítélt körülményeknek, de a Mars geológiai és geomorfológiai feljegyzéseiben található bizonyítékok megerősítik, hogy a korai Mars melegebb, nedvesebb és potenciálisan kedvezőbb felszíni körülmények uralkodtak), amik biztosíthatták az NDFO anyagcseréhez szükséges elektrondonorokat és akceptorokat. Ez azt jelenti, hogy az NDFO megvalósítható és logikus útja a feltételezett korai marsi élet vizsgálatának. A nitrátok felfedezése az NDFO-t a feltételezett, biológiai vasoxidáció életképes mechanizmusaként határozza meg a mai Marson, és NDFO segíthet bezárni a biogeokémiai vasciklusok kemotróf „hurkát” a Marson (1. ábra) (PRICE A. et al. 2018).



1. ábra. A vas és mangán redox ciklusa édesvízben és a hipotetikus NDFO a Marson (MADIGAN M. T.-BENDER K. S. 2015) (PRICE A. et al. 2018)

Az Euryarchaeota egy NDFO-ra képes tagjának izolálása egy tenger alatti füstölgőből arra utal, hogy az NDFO egy nagyon korai mikrobiális folyamat lehetett a Földön, mivel az ilyen környezetek az élet legkorábbi evolúciójában szerepet játszottak. A biológiai anaerob vasoxidáció mechanizmusai egymástól függetlenül többször is kialakultak a Földön. A vas paleokémiájából, fiziológiájából és az ezekben az utakban részt vevő redoxfehérje kofaktorokból származó bizonyítékok arra utalnak, hogy az NDFO lehet a legősibb vasoxidációs útvonal a földi életben (PRICE A. et al. 2018).

A vasat oxidáló fototrófok felfedezése meglehetősen új keletű és eddig csak mintegy hat törzset írtak le. Valamennyi törzs szoros rokonságban áll más fototróf bíbor és zöld baktériumokkal. és a biokémia is valószínűleg nagyon hasonló a fototróf szulfidoxidációhoz. Más anoxikus fototrófokhoz hasonlóan a vas-oxidálók is fotoautotróf módon növekednek H₂-vel, és ftoheterotróf módon szerves vegyületekkel. A szervezeteket sekély vizekből izolálták, édesvízi és tengeri felszíni üledékekből. Fotikus, anoxikus, vasban gazdag környezetet napjainkban kevés helyen találunk a Földön. A kiterjedt vasban gazdag üledéklerakódások arra utalnak, hogy 3,8 és 2,5 milliárd éve az óceán gazdag volt oldott vasban (CANFIELD D. E. et al. 2005).

A nem savas környezetben élő vas-oxidálók egy nagyon szűk redoxi tartományra korlátozódnak, ilyen mikroaerob élőhelyek akkor jönnek létre, amikor a redukált vasban gazdag

víz, oxigéndús környezettel találkozik. A két zóna határfelületén *Leptothrix* és *Gallionella* élhet meg, feltételezhető, hogy az ezeknél a baktériumoknál megtalálható hüvelyes és nyeles képződmények elősegítik, hogy ebben a szűk élettérben rögzíthessék magukat. A baktériumoknak arról is gondoskodniuk kell, hogy az oldhatatlan fémoxidok a sejten kívül rakódjanak le, erre extracelluláris szerves anyagot termelnek, ami megköti az fém-oxidokat (MADIGAN M. T.-BENDER K. S. 2015).

Mind a mangán, mind a vas nyomelemként nélkülözhetetlen az élő szervezetek számára. A vas iránti igény különösen fontos biogeokémiai szempontból, mert ezen elem hozzáférhetősége korlátozza a mikroorganizmusok növekedését a felszíni óceánok nagy részén, ezáltal befolyásolva a globális szén ciklust (CANFIELD D. E. et al. 2005).

2.2 Tőzeglápok jellemzése, ökológiai jelentősége

A Föld felületének ma hozzávetőleg csupán néhány százalékát borítják lápok, pedig potenciálisan akár a tízszeres területet is elfoglalhatnák ezek a különleges, értékes, változatos, fajgazdag, ám igen sérülékeny élőhelyek. A lápokra jellemző, kiemelkedő természeti értéket képviselő életközösségen a láp felszínéhez kötődő lápi növényzet, valamint az ehhez és ennek gyökérszónájához kötődő lápi, főként mikroszkopikus méretű fauna. A lápokra jellemző növény- és állatfajok egy része csak ezeken az élőhelyeken fordul elő, itt találja meg létfeltételeit, specialista fajok. Ezek a szűk ökológiai toleranciájuk miatt általában ritka, már csak néhány előfordulási hellyel rendelkező fajok, sokszor a lápi élőhelyek jellemző, úgynevezett karakterfajai. A láp természeti képződmény. Jellemző rá a sekély víztér, több biomassza képződése, mint lebomlása. Az élőrendszerek tőzeget halmoznak fel, ami folyamatosan vastagodó tőzegréteget képez. Ez a növekedés a fogyással (bomlás, erózió) egyensúlyt ér el (LÁJER K. 1998).

2.2.1. Tőzeglápok típusai

A tőzeglápokat több szempont szerint osztályozhatjuk. Ezek a lápfelszín alakja, a vízpótlás módja, a növényzet (a boreális és a mérsékelt övben), a tápanyagellátottság a talaj savanyúság, a klimatikus körülmények, a lápképződés helye.

A nemzetközileg leginkább elfogadott és leggyakrabban használt, az alak és felületi mintázat alapján történő besorolás. Lápökológia szempontból is ez látszik a legmegfelelőbbnek.

Ez alapján megkülönböztetjük a síklápokat, angol nyelvterületen, ezeket hívják „fen”-nek, és a dagadó- vagy fellápokat angolul „bog”. A dagadólápok tőzegfelülete a talajvízszintje fölé emelkedik és a vízpótlás tipikus esetben abból a csapadékból származik, ami a láp területére hullik, ombrogén. A dagadólápok osztályozása Osvald (1925) által:

- Kontinentális dagadólápok
- Balti típusú dagadólápok
- Atlanti dagadólápok
- Felföldi dagadólápok

A síklápok tőzegfelülete ezzel szemben a talajvízszint alatt marad. Vizük legnagyobb részét a lápterületen kívülről érkezik. A síklápok vize leginkább a talajvízből ered, minerogén. Ezt három csoportra bonthatjuk tovább:

- limnogén: tóból, vagy folyóból származik; feltöltődési lápok, ártéri lápok
- topogén: talajból származó, statikus víz; elmocsarasodással létrejött lápok
- szoligén: talajból származó, áramló víz; felszínen csörgedező vizű lápok, átszivárgásos lápok, forráslápok

Forráslápok feltörő rétegvizek (források) felett, általában kis kiterjedésben alakulnak ki. A friss, oxigéndús víz hatására a forráslápok tőzege jelentős mértékben lebomlott állapotban található.

A tápanyagellátottság alapján megkülönböztetjük az oligotróf, a mezotróf és az eutróf lápok. Vegetációjuk alapján is osztályozhatók. A boreális és az északi mérsékelt övben a növénytársulások és a láptípusok között szoros kapcsolat van, a vegetáció leírása a lápi ökoszisztéma szempontjából nagyon informatív. További típusok a talajsavanyúság alapján, erősen acidofil (pH 3-4), acidofil (pH 5-6) és enyhén acidofil, neutrofil, bazofil (pH >6). Akvatikus, szupra-akvatikus, klimatikus körülmények szerint és képződés helye szerint tipizálva tavi láp, völgyláp, forrásláp stb.

A dagadó- és síklápok elkülönítésében a talajvíztábla magasságán kívül még a savanyúság-bázikusság grádiens, tápanyag hozzáférhetőség (N, P), pH segíthet. Például a **síklápok** jellemzően pH 5,5 feletti és HCO_3^- ot tartalmaznak (LÁJER K. 1998).

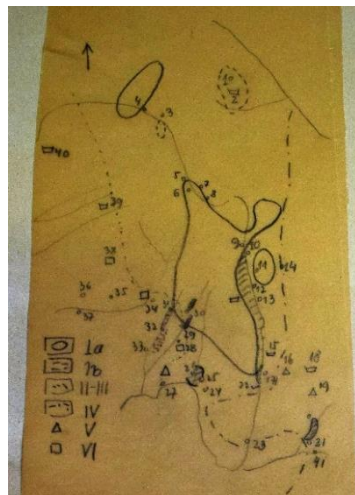
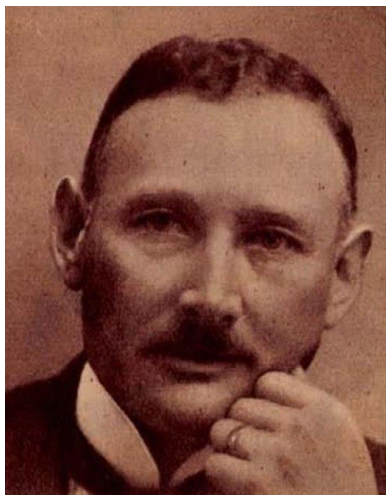
2.2.2. Hargitai lápok kialakulása, kutatásuk

A Hargita erupciója felépített egy, a kitörés során kidobódott törmelékanyagból álló egységes fennsíkot, ez feldarabolódott a patakok hátráló eróziója következtében, bár a felárkolást nehezítették az andezit törmelék közé beépült lávaárak. A felszabdalt plató mindenhol tele van elrejtett ingoványos mocsarakkal, ami érthető, mivel az andezit mállásakor olyan agyag jön létre, ami nem engedi beszívódni csapadékot, és mivel a területnek megfelelő esése sincs, elfolyni sem tud (BÁNYAI J. 1932).

A Hargita főgerince tele van kráterekkel. Idővel tengerszemeké alakultak, majd lápokká. Később a víz utat talált magának, ősi lefolyástalanságát egyedül a Szent-Anna tó őrizte meg. A

vizeket táplálták még a feltörő borvizes források is. Az ilyen ásványvizes források maguk körül is lokális lápokot képeztek. (NYÁRÁDY E. GY. 1929).

A magyarországi régi országos lápkutatások fő célja a tőzeg tüzelési célra való felhasználása volt. A lápok geokémiai értékelésének és vegyi összetételük meghatározásának legkiemelkedőbb kutatója Bányai János (4. kép) volt.



4. kép. Bányai János (1886-1971) és a kézzel rajzolt ásványvízzel átitatott láp térképe (Haáz Rezső Múzeum Történelmi Gyűjteménye, Bányai János Hagyaték)

Bányai János írt arról, hogy mivel a lápok atítató ásványvizek is különbözőek, úgy a keletkezett lápok is azok lesznek:

I. típus a szénsavasvizes láp: a, vasas lerakódásúak, b, meszes lerakódásúak. A vasas (a) lerakódásban gazdagok a Hargita posztvulkáni hatására keletkezett borvizek kiömlésénél keletkeztek. Jellemzőjük, hogy a mélységgel nő a savasság, az organikus anyag, a nitrogén, a nedvesség százaléka. Fogy a foszfor, kálium és a vas. Gyakoriak ezeknél a lápoknál a geobotanikai nevezetességek, a glaciális növények. Zónákra bonthatók: okkeres forráskúpok a források kiömlésénél vasokker borítással, ingoványos rész a forráskúpok között, és átmeneti zóna a láp szélénél. A meszes-magnéziumos (b) vízü lápokra a legjellemzőbb példa Borszéken van. A friss meszes víztől akár lúgos kémhatásúak is lehetnek ezek a lápok

II. típus a konyhasós. A szováti Fekete- és Medve-tó a legismertebb előfordulása. A pH neutrális, télen alkalikus. A sós víztől feliszapolt agyag, a láp növényi korhadékai és az állati maradványok keveredve fekete iszapot képeznek. Kén-hidrogén, metán és ammónia szabadul fel a bomlás során. Ebben a mikroorganizmusoknak is fontos szerepe van, szulfát-redukálók termelik a kén-hidrogént, a cellulózbontók a metánt a korhadó növényekből.

További típusok: III. metángázos sós iszap, az iszapfortyogóknál, IV. kénes lápok, a Keleti-Kárpátok homokköves, márgás, bitumenes zónájában sok kénhidrogénes borvíz

található, ezekre a lápokra jellemző kolloidális állapotban lévő kéntej, ami sárga bevonatot képez. Szerves életükről nincs adat. V. szulfátos vizek, szabad kénsav tartalommal (vitriolos vizek), az ilyen forrásnál létrejött láp sötét foltként látszódik a környezetében, a szélükön kezdődik valamelyest az élet a savanyú talajt kedvelő növényekkel, a pH 1-2 körüli. Az utolsó a VI.-os a vegyes típusú lápok (BÁNYAI J.).

2.2.3. Hargitai forráslápok jellemző növényei

A csíki medence növénytani szempontból nem ismert, Nyárády Erasmus Gyula többször is Bányai Jánossal együtt kutatta ezt az ismeretlen területet.

A csíki forráslápok jellemzően vasas vagy meszes borvizesek. Megfigyelhetők rajtuk a limonitsárból épült dombocskák, amik kráteréből folyik ki a forrásvíz, buborékolva, ha szénsavas a víz. Ezekbe a süppedős lápokba sem ember, sem állat nem merészkedik be. Növényritkaságaik a rovaremesztő *Drosera angelica* és *rotundifolia*, továbbá a jégkorszaki reliktum fajok, mint *Betula nana*, *Saxifraga hirculus*, amelynek ez a legdélebbi előfordulása. A láp szélére *Lathyrus paluster*, míg a vízfolyásoknál a rozsdás árkokban *Cicuta virosa* és *Peucedanum palustre*. A környező fák többsége *Alnus incana*, van közöttük *Betula pendula*, *Salix caprea*, *Fagus silvatica*, *Sorbus aucuparia*, a bokrok között *Spiraeaulmifolia*, *Lonicera nigra* f. *trichotoma* a domináns (NYÁRÁDY E. GY. 1929).

2.2.4. A tőzeglápok mikroszkopikus élővilága

„A biológus viszont kimutatja, (...) marhalábnyomában összegyűlt néhány kanálnyi esővíz óceán, egy csipetnyi mohatelep őserdő” (id. Entz Géza *A láthatatlan világról* 1881)

A 19. században már kutatták a mohapárnák alatti mikroszkopikus élőlényeket. E kutatások hazai úttörője id. Entz Géza, tanulmányt írt a mohák alatti teresztis Testacea fajokról. Több sajátos „Rhizopodát, gyökérlábú véglényt” fedezett fel (1876). Kovapikkelyes tokkal rendelkező *Euglypha*, *Trinema* fajokat, amik hasonlóak voltak a nagyobb vizekben élőkhöz. A fő mintavételi helyei a hegyvidékeken voltak. Az általa is megfigyelt Rhizaria fajoknál a ház változó nagyságú, és mozaikszerűen egymásmellé rakott pikkelyekből áll. Amikor nedves a talaj, a plazmatest megduzzad, szárazságban azonban mélyen visszahúzódik a házba (ENTZ G. 1876). Ezen kívül id. Entz Géza volt, aki világon elsőként kimutatta a protisztáknál a fotoszintetizáló szimbiontákat, saját elnevezésével a „levélzöldtestecskéket” is.

Később Daday Jenő írt 1883-ban a Mohos-tó (tőzegláp) faunájáról. Kétszer is tanulmányozta a Szent Anna-tavat, a Mohos-t és a két tó környékét. A tőzegláp környékének kis tócsáiból csillós és ostoros egysejtűeket, a kor kifejezését használva „ázalék állatokat” gyűjtött. A láp *Sphagnum* és *Drosera* fajainak gyökerei közül pedig *Diffugia*, *Nebela*,

Centropyxis, *Arcella*, *Trinema* nemekhez tartozó fajokat mutatott ki. Azonosításukban id. Entz Géza volt segítségére (DADAY J. 1883).

Földrajzi szélességünkön a lápok a hűvösebb, nedves területeken található jégkorszaki maradványok, vegetáció történeti emlékek. A lápok, főleg a *Sphagnum* lápok, domináns protisztái a házas amőbák. Korábban a Rhizopoda osztály Testacea rendjébe tartoztak. Jelenlegi ismereteink szerint polifiletikus csoport, az Amoebozoa, Rhizaria és Stramenopila szupercsoportokban, főleg az első kettőben bontakozott ki mai diverzitásuk. A házas amőbáknak az aktív élethez vízre van szükségük, élőhelyük kiszáradásakor betokozódnak. A lápok, különösen a tőzegmohás lápok valamennyi formája kiváló élőhely számukra (SCHNITCHEN C. et al. 2004). Vannak a csupasz, fagotróf, szabadon élő amőboid protiszták (az Amoebozoa és a Rhizaria csoport), és a növényi kórokozók (a Stramenopiles csoport) (MITCHELL E. A. 2010).

A protiszták fontos szerepet töltenek be a tápanyagkörforgásban és energiaáramlásban a talajban. Ilyen például a baktérium predáció pozitív hatása, vagy például néhány baktérium „hagyja”, hogy a protiszta fagocitálja, mivel képes túlélni a táplálék vakuólumban, ez szimbióta kapcsolattá is válhat. A baktériumot megvédi a protiszta, a baktérium pedig metabolitokat oszt meg vele. Ökológiai jelentőségük elemzése felfutóban lévő tudományterület, különösen intenzíven tanulmányozott a tőzegmohalápokban élő házas amőbák térbeli és szezonális heterogenitása és a mögötte rejlő környezet tényezők (WILKINSON D. M. et al. 2012).

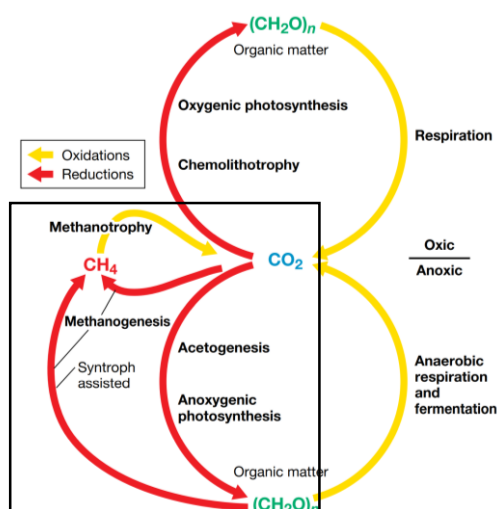
A tőzeglápok a világ szárazföldi területének ~2,84%-át borítják, mégis a szárazföldi szén jelentős részét teszik ki. Globálisan fontos szén raktárnak számítanak. A szén-dioxid megkötésére való képességük miatt a tőzeglápok fontos szerepet játszanak a globális éghajlat felmelegedésének mérséklésében, szárazföld és a légkör közötti szén-cserében, és az egészséges tőzeglápok számos más létfontosságú ökoszisztéma-szolgáltatást is nyújtanak (KITSON E., BELL N. G. 2020). Az északi tőzeglápok rendkívül heterogén ökoszisztémák. Ennek ellenére keveset tudunk a bennük lejátszódó folyamatokról, jobban meg kell értenünk a megfigyelt változékonyságot kiváltó folyamatokat, főleg a növények, mikrobák és a tőzeglápok szénkörforgása közötti kölcsönhatást. A kérdés megoldásának egyik megközelítése az ismétlődő, mikrobiológiai funkcionális jellemzők vizsgálata, hogy ökoszisztéma-szintű perspektívát nyújtson az ökológiai és biogeokémiai folyamatokról. A tőzeglápok házas amőbái a protiszták funkcionálisan fontos csoportja, amely alkalmas egy ilyen megközelítésre. A házas amőbák a tőzeglápok mikrobiális táplálékhálózatának lényeges részei, és kritikus szerepet játszanak a tápanyag- és szénkörforgásban (ZHANG H. et al. 2020).

Ahhoz, hogy megértsük a lápok jelentőségét és az ott élő mikrobák szerepét a globális szén körforgalomban tudni kell, hogy a kialakulásuk elsősorban növényi, állati és mikrobiális

eredetű szerves anyagok felhalmozódásának köszönhető. Ezek az anyagok megmaradnak köszönhetően az alacsony pH-értéknek és az általában anoxikus körülményeknek, amelyek csökkentik a bomlási tevékenységet. A tőzeglápok egyik legfontosabb jellemzője, hogy jelentős szerepet játszanak az üvegházhatású gázok kibocsátásával kapcsolatos biogeokémiai ciklusokban (PUGLISI E. et al. 2014).

A prokarióták is jelentősen hozzájárulnak a tőzegtalajon belüli szervesanyag-átalakulásokhoz, a tőzegláp szennyelő vagy -forrás állapotának kulcsfontosságú meghatározói. Aktivitásukat meghatározza az oxigénellátottság, a hőmérséklet és a pH. Az északi tőzeglápok mikrobiális tevékenysége is jelentősen hozzájárul a globális metán (CH_4) fluxushoz a természetközeli tőzeglápok nettó CH_4 -termelését az anaerob metanogén és aerob metanotróf populációk egyensúlya tartja fenn.

Míg a dagadólápokban a metanogenezist nagyrészt a hidrogenotróf (H_2 - CO_2 -függő) útvonal hajtja, addig a síklápokban az acetogén útvonal dominálhat. (KITSON E.-BELL N. G. 2020) (2. ábra).



2. ábra. A szén körforgalom bioszférához kötött lépései, kiemelve a metanotróf, metanogén, acetogén útvonalak (MADIGAN M. T.-BENDER K. S. 2015)

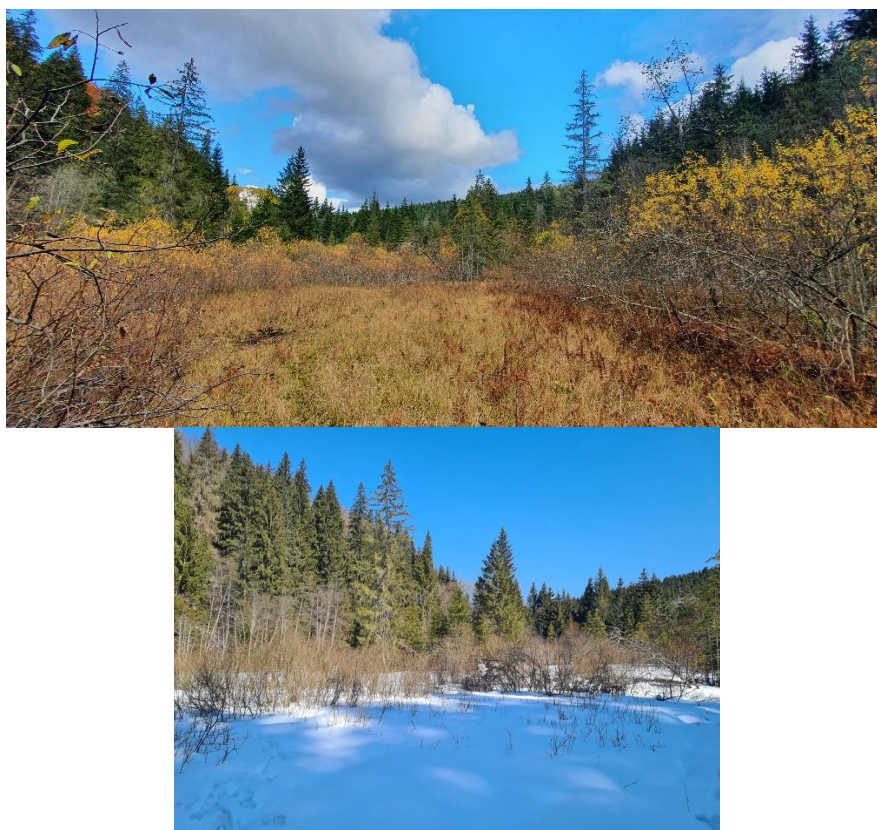
Célkitűzések

Kutatásom célja az volt, hogy tenyésztési és tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerekkel feltárjam a posztvulkanikus területen létrejött Szortyogó borvízláp baktériumközösségeinek taxonómiai diverzitását. Megerősítsem az extremofil vagy poliextremofil baktériumok jelenlétét. Kimutassam a tőzeglápokra jellemző szén ciklusban résztvevő metilotróf/metanotróf baktériumokat és a vulkanikus hatásokra létrejött ásványvizek vas és mangán redox ciklusában szerepet játszó baktériumokat.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Mintavételi hely bemutatása, mintavétel

A Szortyogó-borvízláp (Hargitaligeti forrásláp) a Hargita-hegységben, Kirulyfürdőtől északkeletre, Hargita megyében, Romániában található. A Csíkszereda-Udvarhelyi országúttól nem messze fekszik a Tolvajos patak völgyében, kb. 795 m magasságban, egy korábbi limonitból festéket őrlő Festőmalom közelében. A lápot Bányai János fedezte fel, mintegy 200 m hosszú és 100 m széles, a tőzeges anyag mintegy 120 cm mély lehet.



5. kép. A Szortyogó borvízláp (saját fotó)

A terület ásványvizei piroxénos andezites breccsán keresztül törnek a felszínre. A lápot tápláló forrás a Hargitaforrás, régi nevén Kamilla. Sűrű erdős környezetben fekszik, kétoldaltól is sziklával védve, ahol a Tolvajos patak is egy darabig andezittufa sziklák alá vájt mederben folyik. A forráslápon élénken buzgó korábban fürdésre használt borvízmedence van és még több helyen is apró források törnek fel (5-6. kép). Felszíne részben sáros, részben sásokkal fedett moha, de van színtiszta moha is, mely hosszan terül el. Bányai *Sphagnum* részleteket és *Drosera* fajokat is talált a mocsári mohák között. Az endemikus, jégkorszakbeli reliktum *Saxifraga hirculus* fajt itt írták le először Erdélyben, a láp azon részén él tömegesen, mely tiszta

mohából áll, minden más hozzásegődött növény nélkül (NYÁRÁDY E. GY. 1929) (BÁNYAI J. 1932).

A mintavételek részleteit az (1. táblázat) foglalja össze.

1. táblázat: A mintavételek időpontjának, helyének és az elvégzett vizsgálatoknak az összefoglalása

Mintavétel időpontja	2021.05.19	2021.09.17	2021.10.24	2022.02.18-19
Mintavétel helye	fürdőből a forrásnak vélt területről	fürdő	fürdő (környezeti DNS-hez 3 különböző pontról)	fürdő
Elvégzett vizsgálatok	víz kémia paraméterek mérése és tenyésztés	víz kémia paraméterek mérése és tenyésztés, klorofill-a, szabad széndioxid, vízben élő protiszták meghatározása	tenyésztés, kémiai paraméterek, TOC, oldott oxigén, klorofill-a, CO ₂ , környezeti DNS izolása, DAPI festés sejszámbecsléshez	helyszínen: vezetőképesség, pH, és oldott oxigén, laborban: vízkémia

Kiegészítésképpen még további két forrásból is mértünk fémeket referencia pontként, az egyik a tőzeglápon lévő forráskúpból, a másik 3 km-re Kirulyfürdön egy vasas-borvíz forrásból, a kísérlet célja az volt, hogy kiderítsem, hogy az irodalomnak megfelelően egy forrás hozta létre a lápot, vagy különböző források törnek fel, ha igen a lápot tápláló forrás mennyire egyezik a fürdőt létrehozóval.

A protiszták vizsgálatánál 2021.09.18-án Erdély legnagyobb lápjaából, az ugyancsak eutróf és vulkáni területen (egy kalderában) létrejött Lucs-tőzeglápból vettünk még mintát referenciaként.



6. kép. A láp területén felbukkanó források (saját fotó)

A mintavételkor mikrobiológiai vizsgálatok céljára 1-2 l vizet vettünk steril boroszilikát üvegbe. Vízkémiai vizsgálatokhoz további 2 l mintát vettünk steril műanyag flakonokba, később a megfelelőbb eredmények miatt a vizsgálat típusa szerint szükséges tartósítószer tartalmazó edénybe, a fémekhez 50 ml-t Falcon csőbe salétromsavval, a KOI_{kr} mintákhoz pedig 500 ml-t kénsavval tartósítva. A szabad-széndioxid meghatározáshoz víz alatt megtöltött és légmentesen lezárt üveget használtunk. Minden alkalommal történt a helyszínen hőmérséklet

mérés. A mintákat a laboratóriumban történő feldolgozásig 4-8 °C-on tároltuk és 24-48 órán belül a laboratóriumba szállítottuk.

A házas amőbák vizsgálata, meghatározása az ELTE Állatrendszertani és Ökológiai Tanszéken történt Dr. Török Júlia tanárnő közreműködésével.

3.2 Vízkémiai mérések

A kémiai méréseket a SBDK Környezetanalitikai Laboratórium Víz- és Élelmiszervizsgáló Laboratórium részlegén végeztük, szabványos módszerekkel. A fontosabb paraméterek: összes keménység, Mg, Ca komplexometriával; lúgosság, CO₂ meghatározás sav-bázis titrálással; KOI permanganometriával és kromátos roncsolással kromatometriával; BOI szondával oldott O₂ mérés; nitrogén formák, Cl stb. analizátorral fotometriásan; a fémek ICP-tömegspektrometriával. A helyszíni mérések az analitikai részlegtől kölcsönkapott HQ30D hordozható egysatornás multiméterrel történtek. A klorofill-a meghatározást az MSZ ISO 10260 szabvány szerint végeztem.

3.3 Sejtszámbecslés, DAPI festéssel

A sejtszámláláshoz epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam a vízmintákat, amihez előzőleg a vízből 10, 25, 50 ml mennyiséget leszűrünk membránfilterre, majd fixáltuk a mintát paraformaldehid oldatban (PFA), végül megfestettük. Az alkalmazott fluoreszcens festék a DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) volt. A preparátumot a mikroszkóp alá helyeztem, a DAPI festék abszorpciós maximuma 358 nm, emissziós maximuma 461 nm. 20 képet készítettem a látótérrel, a látóterenkénti sejtszámot a Nikon NIS-Elements BR szoftverrel határoztam meg. Az átlagolt sejtszámból, a látótér nagyságának, az átszűrt víz mennyiségének és a szűrőlap hasznos felületének ismeretében kiszámoltam a térfogategységnyi vízre vonatkoztatott sejtszám értékeket.

3.4 Tenyésztési vizsgálatok

3.4.1. Táptalajok, tenyésztés

A tenyésztéshez háromféle táptalajt alkalmaztam. Az R2A-t (DSMZ 830; dsmz.de) a szakirodalomban gyakran javasolták hasonló környezetben végzett tenyésztési vizsgálatokhoz, így én is ezt használtam. A TSS (Biomerieux) táptalajt azért választottam a második mintavételtől, mert már tudtam, hogy nem oligotróf a fürdő, és esélyt akartam adni a tápanyagigényesebb baktériumoknak is. Az UriSelect (Bio-Rad) táptalajt a könnyebb

azonosítás miatt, mert kromogén táptalaj. A felhasznált táptalajokat, inkubációs hőmérsékletet és időt az (2. táblázat) foglalja össze.

2. táblázat: A különböző mintavételek tenyésztési körülményei

Mintavétel időpontja	Minta azonosító	Táptalajok	Inkubáció hőmérséklet	Inkubáció ideje	Egyéb
2021.05.19	HT MALDI	TSS, URI, R2A	30 °C, 22 °C, 15 °C	2 nap - 1 hét	
2021.09.17	HT30, HT30U, HTR2A30 HT15, HU15, HV15	TSS (T), URI (U), R2A (V/R2A)	30 °C, 15 °C	3 nap, 1 hét	CO ₂ gázfejlesztő (a C, CO azonosítójú mintáknál)
2021.10.24	HT30C, HTR2A HT15B, HU15BCO, HV15BCO	TSS (T), URI (U), R2A (V/R2A)	30 °C, 15 °C	3 nap, 1 hét	CO ₂ gázfejlesztő (a C, CO azonosítójú mintáknál)

A májusi mintavétel kísérlet volt a megfelelő táptalajok kiválasztására és a megfelelő körülmények beállítására. Ez alapján mindhárom táptalaj megfelelőnek bizonyult, hőmérsékletnek a 15 °C (a fürdő hőmérséklete mintavételkor) és a 30 °C (lehetséges patogének miatt). Módszernek pedig az, hogy hígítás nélkül 100-100 µl-t szélesztettem 3-3 agarlemezre. A 15 °C-on 1 hétig inkubáltam, 30 °C-on 3 napig. Szeptembertől a normál légköri tenyésztéssel párhuzamosan emelt szén-dioxid tenziójú inkubálást is végeztem GENbag CO₂ gázfejlesztő zacskóval (Biomérieux).

Az izolátumokat R2A és TSS táptalajra oltottam át, majd a tiszta tenyészeteket identifikáltam és megfelelő táptalajon újra oltással tartottam fent (leginkább R2A, néhány esetben TSS), a kinőtt törzseket újraoltásig 4 °C-on tároltam.

3.4.2. Identifikálás *Maldi-TOF* módszerrel

Az elmúlt évtizedben a tömegspektrometria (MS) folyamatos fejlesztéseinek köszönhetően jelentős előrelépések történtek a mikrobiológiában. A mikroorganizmusok azonosításában ma már standardnak számító MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) MS lehetővé teszi a mikrobiológiai laboratóriumok számára a mikrobák megbízható, gyors és költséghatékony azonosítását. A mikroorganizmusok faji szintű azonosítása a mikrobiológia egyik legfontosabb feladata. Hagyományosan munkaigényes és időigényes biokémiai vizsgálatok elvégzésével valósult meg. Bár a jelenlegi szekvenálási technológiák nagyon pontos betekintést nyújthatnak, még mindig túlságosan lassúak és drágák. A molekuláris alapú tömegspektrometriai azonosítási módszer gyorsabb és hatékonyabb elemzést tesz lehetővé.

A taxonómiai azonosítás alternatív módszere, amelynél a közeg összetétele és az inhibitorok jelenléte kevésbé játszik szerepet. Ez a módszer gyorsnak és költséghatékónak bizonyult az izolátumok azonosítására, miközben kiszűri a rokonfajokat és a nem célzott taxonokat. Mivel a MALDI-TOF tömegspektrometria rendkívül érzékeny, a taxonómiai

azonosításhoz szükséges tömegspektrum rögzítéséhez csak viszonylag kis sejttömegre van szükség. A kereskedelembe kapható rendszerek általában olyan adatbázisokat biztosítanak, amelyek lehetővé teszik a keresett izolátum azonosítását a nemzetségtől a fajig terjedő szinten. Jelenleg azonban ezeket a rendszereket többnyire klinikai vagy élelmiszerekkel kapcsolatos környezetből származó mikroorganizmusok azonosítására használják (LEWIS W. H. et al. 2021).

Ez egy tömegspektrometriás vizsgálat. A módszer lényege (MALDI), hogy nagy energiájú lézer impulzusok ionizálják a fehérjéket, proteinek, peptideket. A névnek második fele a „TOF” (Time of Flight) arra utal, hogy felgyorsított ionok repülési idejét mérjük nanoszekundum pontossággal, vagyis repülési idő vs. tömegszám. Az elve, hogy a mikroorganizmusokban található genetikailag determinált fehérjéket (elsősorban a riboszómális), illetve fehérje összetételt azonosítjuk (MALDI Biotyper). A rendszervezérlő szoftver (flexControl) készíti a nyers tömegspektrumot. Minden mikroorganizmusnak van egy rá jellemző fehérje profilja, tömegspektruma (ujjlenyomat).

A törzseket direkt és extrakciós módon is feldolgoztam a készülék protokollja szerint (Bruker Microflex LT/SH smart) és tömegspektrumot készítettem a flexControllal. Az adatfeldolgozást a Bruker MBT Compass szoftterrel végeztem. Feldolgozás után két adatot kaptam, az egyik, hogy megfelelő volt a tömegspektrum vagy sem, ha az utóbbi, akkor az eredmény, hogy „nincs csúcs”, a másik eredmény a score, ami azt mutatja meg, hogy mennyire megbízható a fajazonosítás. „Score érték” > 2,00 azonosított species; 2,00 > „Score érték” > 1,70 azonosított genus; „Score érték” < 1,70 az azonosítás megbízhatósága nem megfelelő.

3.4.3. DNS kivonás, PCR és Sanger-szekvenálás baktériumtörzsekből

A tiszta tenyészetekből a DNS kivonáshoz fizikai feltárást alkalmaztunk. 100 µl steril vízbe 1 spatula üveggyöngyöt mértünk és egy kacsnyi biomasszát tettünk bele, majd 2 percig 30 Hz-en homogenizáltuk sejtmalomban (Retsch MM301). A sejtes törmeléket 0,5 percig centrifugáltuk 10000 rpm-en (HERMLE Z 233 MK-2 típusú centrifuga), majd hősokknak tettük ki 99 °C-on 5 percig PCR-készülékben (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 2700 és 2720 Thermal Cycler). Ezt követően 3 percig 10000 rpm-es centrifugálást végeztünk, majd a felülúszót, amiben a kinyert DNS volt, mélyhűtőben (-22 °C-on) tároltuk.

A 16S rRNS-t kódoló gént Bacteria-specifikus primerrel 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') (LANE D. 1991) és 1401R (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') (NÜBEL U. et al. 1996) polimeráz láncreakcióval sokszorozítottuk fel. A PCR-hez használt reakcióelegy összetétele: Taq DNS polimeráz puffer (0,2 mM), 2,5 µl; MgCl₂ (2 mM), 2 µl; Forward primer (27F) (0,65 mM) 0,25 µl; Reverse primer (1401R) (0,65 mM) 0,25 µl; dNTP (200-200 mM) 5

μl; Desztillált víz 14 μl; *Taq* DNS polimeráz enzim 0,5 μl; DNS templát 0,5 μl; 25 μl végtérfogatban.

PCR hőprofil:

Primer denaturáció	95 °C	5:00 perc	} 32 ciklus
Denaturáció	94 °C	0:30 perc	
Anneláció	52 °C	0:45 perc	
Extenzió	72 °C	1:00 perc	
Végső extenzió	72 °C	10:00 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A PCR sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. 1%-os agaróz gélben (100 ml TBE (Tris-borát-EDTA) puffer, 1 g agaróz, 3 μl DNS festék (ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution 20,000X) 20 perces 100 V-os futtatást követően UV megvilágítás alatt ellenőriztük a PCR termékeket. A PCR termékek 5 μl-éhez 3 μl töltőpuffert (30% (v/v) glicerin, 0,25 mM brómfenolkék) szuszpendáltunk és így pipettáztuk a töltőzsebekbe. Markerként Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3-t használtunk, melyből 3 μl-t mértünk az első töltőzsebbe.

A törzsek 16S rRNS gén bázissorrendjét Sanger szekvenálással határoztuk meg, az LGC Genomics (Németország) szolgáltatásának felhasználásával.

A szekvenciák minőségét a Chromas Lite programmal ellenőriztem. A törzsek azonosítását a 16S rRNS szekvenciák alapján az EzBioCloud internetes programmal végeztem (YOON S-H. et al. 2017).

3.5 Közösségi DNS kivonás, újgenerációs DNS amplikon-szekvenálás

A közösségi DNS kivonásához először is a fürdő 3 pontjából gyűjtött vízmintából 2x500 ml-t szűrtünk le egy-egy membránfilterre (0,7 μm), majd a 6 filterből (HL1A, 1B,2A,2B,3A,3C jelzéssel a DNeasy PowerSoil Kittel (QIAGEN) végeztük DNS kivonást a gyártó által meghatározott protokoll alapján.

Az általunk használt protokoll a 16S rRNS gén V3 és V4 variábilis régióinak szekvenálását tette lehetővé. A 16S rRNS gén V3-V4 régióját Bacteria-specifikus:

Bakt_341F: 5'-CS1-CCTACGGGAGGGCAGCAGCAG-3',

Bakt_805R: 5'-CS2-GGACTACHTACHVGGGTWTCTAAT-3' primer készlettel (HERLEMANN D. P. et al. 2011) amplifikáltuk.

Reakcióelegy összetétele és a PCR hóprofilja:

Mikrobiális DNS (5 ng/μl)	2,5 μl
Amplikon PCR Forward Primer 1 μM	5 μl
Amplikon PCR Reverse Primer 1 μM	5 μl
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	12,5 μl
Végtérfogat	25 μl

Primer denaturáció	95°C	3 perc	} 25 ciklus
Denaturáció	95°C	30 mp	
Anneláció	55°C	30 mp	
Extenzió	72°C	30 mp	
Végső extenzió	72°C	5 perc	
Hűtés	4°C-on		

A keletkezett PCR termékeket QIAxcel Advanced System (QIAGEN) kapilláris gélelektroforézissel ellenőriztük. Az amplikon DNS-koncentrációkat normalizáltuk. A paired-end amplikon szekvenálás Illumina MiSeq gépen, Illumina MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle) szekvenáló kit, Illumina Nextera Index Kit v2 Set A indexáló kit használatával történt.

A nyers adatokat a mothur szoftverrel (v1.44.3) dolgoztuk fel a fejlesztők által ajánlott protokollt követve (a https://mothur.org/wiki/miseq_sop hivatkozáson megtalálhatók). A protokoll a pair readek összeillesztéséből, a szekvenciák minőségi szűréséből (hossz, homopolimer hossz alapján, nem egyértelmű nukleotidok kiszűrése, kimérák kiszűrése), OTU clustering, szekvenciák klasszifikációjából (a taxonómiához), és az alfa diverzitásindexek kiszámolásából állt. A protokolltól való eltérések: a make.contig parancsnál (contigok összeszerelése) a deltaq érték 10, kiméra szűréshez a VSEARCH algoritmus (<https://peerj.com/articles/2584/>), ezen kívül eltávolítottuk a singletonokat (teljesen egyedi szekvenciák, amikből csak egyetlenegy van), majd a szekvenciákat az ARB-SILVA v138 referenciához illesztettük, és minden szekvenciát, ami nem a Bacteria doménbe tartozott pl archaea, eukarióta, mitokondriális és kloroplasztisz eredetű, unknown is eltávolítottuk.

Az OTU-kba a legalább 97%-ban egyező szekvenciákat rendeztük. Az alfa diverzitás mutatók kiszámolását a mothur beépített funkcióival végeztük (KOZICHA J. J. et al. 2013).

A baktériumok rendszerezésében minden módszer (EzBiocloud a Sanger-szekvenáláshoz, Bruker adatbázis a Maldi esetében és a Silva az NGS-nél) saját nevezéktanát és besorolását használtam, így közöttük bizonyos esetekben eltérések találhatók a dolgozatban.

4 Eredmények és értékelésük

4.1 A fürdő vizének fizikai és kémiai paraméterei

A helyszíni mérések során a forrásnak vélt helyen, félméteres mélységben történt a hőmérséklet mérés, és a víz hőfoka évszaktól függetlenül megközelítőleg 6 °C-os volt. A fajlagos vezetőképesség igen magas volt, minden mérés alkalmával $>2000 \mu\text{S}/\text{cm}$, ami a magas sótartalomnak köszönhető. Ion koncentráció alapján, béta-alfa-mezohalobikus, tehát közepesen sós (szikes). Ha a halobitást minőségileg közelítjük meg, akkor az eredmények alapján (szabad CO_2 , Ca, HCO_3 , $\text{pH}<8$) a fürdő béta-limno-típus, mégpedig a kation-anion eloszlás alapján Na-Ca-Mg- HCO_3 -os (FELFÖLDY L. 1987). Egyéb kémiai jellemzői alapján pedig szénsavas-vasas víz, így egyezik a terület geológiájából elvárttal (ezt még inkább igazolja a geotermális területekre jellemző magas mangán, bór és lítium ion szint) és az irodalomban fellelhető adatokkal is.

Amikor Bányai Jánosról kerestem irodalmat Székelyudvarhelyen a Haáz Rezső Múzeumban és a Székelyudvarhelyi Városi Könyvtárban, találtam egy leírást a hargitaligeti főforrás vizsgálatáról, 1950. augusztus 9-én vettek mintát és vizsgálatok után osztályozták azokat. A Palmer és a Csukarev-Priklonszkij-féle osztályozással levonhatunk következtetéseket a vizek geológiai eredetéről, sóösszetételéről, sajátosságairól, az utóbbi a legfontosabb kationok és anionok szerint csoportosítja őket. Ezek alapján a Hargita-liget kiömléses közeten jött létre, bikarbonátos, azon belül is nátriumos-magnéziumos-kalciumos (ugyanúgy, mint az én 2021-es méréseim alapján). Egyéb jellemzők szerint az 70 évvel ezelőtti leírásokban is földes-meszes, szénsavas-vasas. A mellékletben található egy táblázat a régi mérések adataival és Bányai János kézzel rajzolt vegytani elemzése a forrásról. (7.kép)

Egyéb vízminőséget befolyásoló tényezők szerint, mint például a trofitás, a szervetlenből szerveset létrehozó képessége szezonalitást mutat. Eutróf, algavirágzáskor eutrofikussá vált. A trofitás fokát a klorofill-a koncentrációból határoztam meg. A másik tényező a szerves anyagokat szervetlenné bontó képesség, a szaprobitás ugyancsak változó az év folyamán. A permanganátos KOI, és a BOI eredményeket használtam a szaprobitás fokának megítéléséhez. Így a béta-mezoszaprobikustól a katarobikus, tiszta vízig változik az év során (FELFÖLDY L. 1987). A mért kémiai paramétereket a (3. táblázat) foglalja össze a mellékletben.

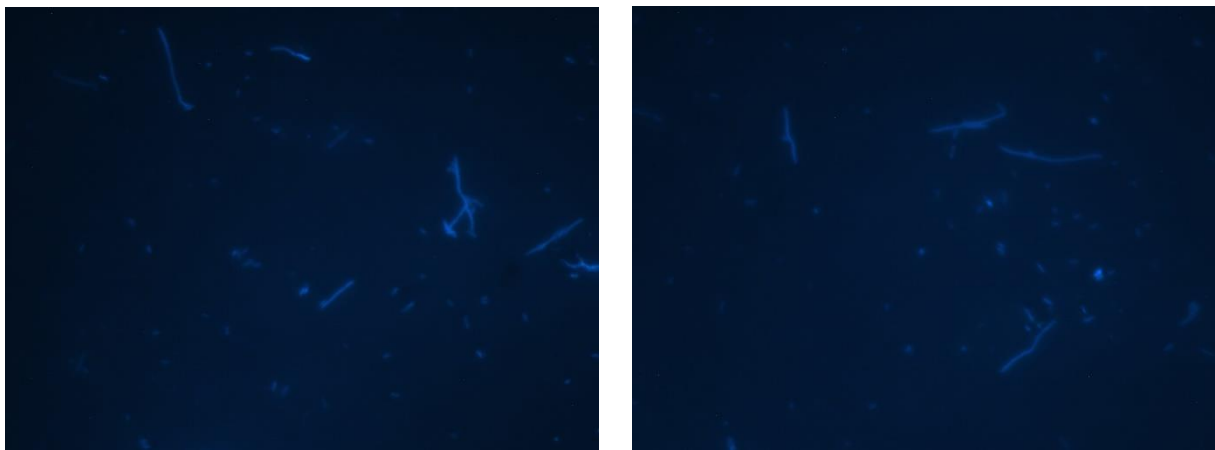
A referenciapontként használt tőzegből vett vízminta nagy valószínűséggel igazolja azt, hogy a lápot ugyanaz a borvíz táplálja tiszta forrásvízzel felhígulva, mint ami a fürdőt is feltöltötte, vagyis a Kamilla-forrás, ahogy a régi leírásokban is közölték.

4.2 A Szortyogó-borvízláp baktériumközösségeinek diverzitása

Az ökoszisztéma elemeinek kvantitatív vizsgálata feltétlenül szükséges ahhoz, hogy az egyes ökoszisztémákat megfelelő módon megérthessünk, a bennük folyó anyag- és energiaáramlást nyomon követhessük. Mikrobiális ökológiai szempontból elsődleges fontosságú, hogy egy adott élőhelyen előforduló mikrobákat mennyiségileg és minőségileg meg tudjuk határozni, hiszen csak ezek tulajdonságainak ismeretében tárhatjuk fel ezeknek az egyes ökoszisztémákban betöltött szerepét. Mivel a környezetből vett minták a mikrobák kevert populációit tartalmazzák, ez gyakran igen nehéz feladat. Baktériumok mennyiségének meghatározásának az egyik módja a direkt sejtszám meghatározás mikroszkóppal.

A környezeti (pl. felszíni víz) minták jelentős része nagy számban tartalmaz mikroorganizmusokat. A mikroszkópos elemzések szerint egységnyi térfogatra (ml) vonatkoztatva 10^4 - 10^7 nagyságrendben mutathatók ki sejtek bennük.

A leszűrt mintáim DAPI festékkal festettem meg és epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam. Látóterenként átlagosan 62 sejtet számoltam. Az átlagos sejtszám $5,7 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ lett. Az epifluoreszcens képeken szokatlan sejtmorfológiájú, pl. *Gallionella* szerű baktériumok sokasága volt látható, ami ugyan nem tenyésztethető, de jelenlétük és számuk egyértelműen összefüggésbe hozható a forrásvíz nagy vastartalmával (7. kép).



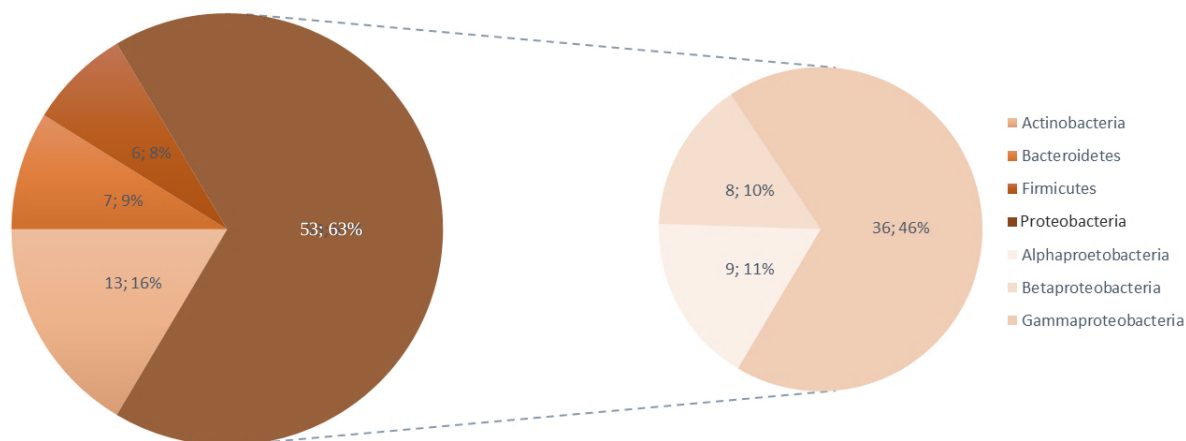
7. kép. Az átszűrt vízminták epifluoreszcens képe DAPI festés után (saját fotó)

4.2.1. A fürdő vízének tenyésztési bakteriológiai eredményei

A törzsek izolálása szempontjából az UriSelect táptalaj minősült a legjobbnak, mert kromogén lévén sokkal könnyebb volt megkülönböztetni rajta az izolátumokat, és ritkábbak voltak az azonosítás során az ismétlődések. Izolálás után viszont alkalmatlan volt a törzsek fenntartására, így arra az R2A-t és a TSS-t használtam. A tenyésztések során nem próbáltam

meg a fajok gyakoriságát megbecsülni, arra törekedtem, hogy minél több különböző törzset izoláljak. 83 tiszta tenyészetet hoztam létre és küldtem el Sanger-féle szekvenálásra.

A kitenyésztett törzsek a Bacteroidetes, a Proteobacteria, a Firmicutes és az Actinobacteria törzsbe tartoztak (3. ábra).



3. ábra. A kitenyésztett törzsek és leggyakoribb osztályok százalékos megoszlása

Leggyakoribb a Proteobacteria a mintákban, és ezen belül is a Gammaproteobacteria. osztály. Közülük 30 °C-on 28 törzs képviseltette magát, 15 °C-on 8. A kitenyésztett baktériumok több, mint 20 %-a tartozott a *Pseudomonas* nemzetségbe (leginkább pszichrofil pseudomonasok), és további 7 törzs az Enterobacteriales rendbe. Ez az eredmény várható volt, mivel a tenyésztés szelektív eljárás, a táptalajokon a táptalaj összetételének megfelelő anyagcseréjű baktériumtenyészet fejlődik ki. A Fe(III) redukcióra képes baktérium a Gammaproteobacteria osztályhoz tartozó fakultatív anaerob *Shewanella putrefaciens* volt. Az előzetes Maldi méréseknél, amik arra irányultak, hogy az ismétlődéseket kiszűrjem többször is (minden inkubációs körülményen) előfordultak, ami nem meglepő a vízminta semleges pH-ja, és magas mangán és vastartalma miatt. A *Shewanella putrefaciens* az elektronakceptorok széles skáláját képes felhasználni légzési anyagcseréjéhez, adott környezetben a számára energetikailag legkedvezőbbet használítja.

Az Alphaproteobacteria osztálynál a Brucellaceae család és a Rhizobiales rendbe tartozó további 3 család (Rhizobiaceae, Devosiaceae, és Rhodobacteraceae) volt a domináns. Utóbbi 2 család izolált tagjainak a szekvencia hasonlósága nem érte el a 98,6 %-ot. A leginkább érdekes, a HV15CO/32 számú törzsem volt, mivel a vulkanikus eredet miatt vártam az anoxikus fototrófok megjelenését. Ennek a törzsnek a legközelebbi rokona a *Luteovulum ovatum* fototróf, bíbor nemkén baktérium volt. Növekedése anaerob körülmények között nappal fotoorgano-heterotrófiával, aerob körülmények között sötétben kemoorgano-heterotrófiával történik.

Asszimilatórikus szulfátredukciót végez. Először egy iparilag szennyezett tóból izolálták (SRINIVAS T. N. et al. 2008).

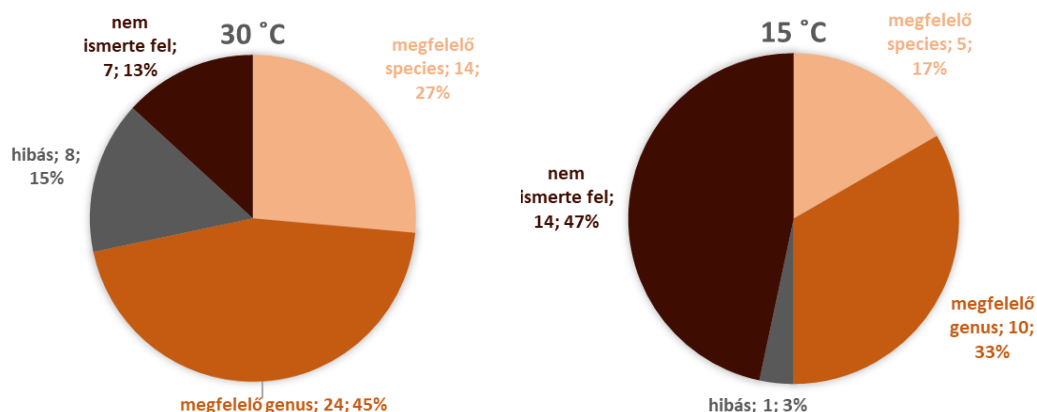
A Betaproteobacteria osztályt mindkét inkubációs hőmérsékleten a Burkholderiales rend tagjai reprezentálták ugyanazzal a 2 jellemző családdal (Comamonadaceae, Oxalobacteriaceae). Közülük kerültek ki a legkülönlegesebb izolátumaim, így a HTR2A30/2 (*Acidovorax wautersii*) és a HU15BCO/8 (*Simplicispira metamorpha*), melyek alacsony szekvencia hasonlósága, arra utalhat, hogy az izolátumaim esetleg új faj képviselői lehetnek. A *Janthinobacterium rivuli* Gram-negatív talajbaktérium. Lila-ibolya színű pigmentet, violaceint termel, mely egy indolszármazék, ami a baktérium által termelt triptofán oxidációjával keletkezik. Változatos energiaanyagcsere-képességeket mutat, és jól tűri a hideget, az ultraibolya sugárzást és más környezeti stresszhatásokat (GILLIS M., DE LEY J. 2006). *Herminiimonas glaciei* (HU15BCO/23 jelzésű törzs) Gram-negatív ultramikrobaktérium, egy 120 000 éves, 3042 m mély grönlandi gleccser jégmagjából izolálták 0,2 μm szűrővel történő dúsítási eljárással (LOVELAND-CURTZE J. et al. 2009). Az ultramikrobaktériumok (UMB) a baktériumok tartományába tartozó fajok, melyekre a proliferáló sejtek nagyon kis mérete (kevesebb mint 0,1 μm^3 térfogat) és kis genomja (3,2-0,58 Mb) jellemző. Több tíz UMB-fajt izoláltak különböző természetes élőhelyekről: tengervízből, talajból, iszapból, grönlandi jégtakaróból, permafroszt talajokból, valamint emberek és rovarok beleiből. Az UMB egyedi életfolyamatai a dehalorespiráció és az obligát vagy fakultatív epibiotikus parazitizmus. Az UMB természetének, evolúciójának és a bioszférában betöltött szerepének megértése szorosan összefügg a mikrobiológia és az általános biológia olyan problémáinak megoldásával, mint a mikrobiális sejtminimalizáció lényege és mechanizmusai, az önállóan szaporodó élő sejtek legkisebb megengedett mérete, élő szervezetek eredete. (DUDA V. et al. 2012).

A Bacteroidetes törzsben egy nemzetség volt domináns, mégpedig a *Flavobacterium*. Hőmérsékleti igény szerint több egyezés volt a 83 izolátum között a 2 inkubálási hőmérsékleten, de a *Flavobacterium* csak 15 °C-on nőttek. A *Flavobacterium* nemzetség élettanilag sokféle lehet, pszichrofil, pszichrotoleráns vagy mezofil, valamint halofil, halotoleráns. A kitenyésztett izolátumaim például a hidegkedvelő, sarkkörü tundra talajból izolált *F.cerinum* (ZHANG R. et al. 2019) és az antarktiszi mintákból izolált *F.psychroterrae* (KRÁLOVÁ S. et al. 2018) fajokkal mutattak nagyfokú szekvencia egyezést. A *F. bizetiae*-t először megbetegedett édesvízi halakból tenyésztették ki Kanadában (ABRY C. et al. 2020).

A Gram-pozitív sejtfalú baktériumok Firmicutes törzsét izolátumaim között (3.táblázat) a Bacilli osztály képviselte, több pszichrofil vagy pszichrotoleráns fajjal, például a *Sporosarcina globispora*, a *Planococcus citri* (halofil is).

Az Actinobacteria törzsbe sorolt izolátumaim a Microbacteriales és a Micrococcales rendek tagjai voltak. Gyakoribb nemzetségek, a *Rhodococcus*, a *Nesterenkonia*, a *Microbacterium* és a *Leucobacter* volt. A *Nesterenkonia* nemzetség tagjai extrémofilek, leginkább pszichrotrofok, halofilek, alkalofilek. Jelenleg a nemzetség négy érvényes fajt foglal magában. A *N.halotolerans*-t hiperszalin talajból izolálták a nyugat-kínai Xinjiang tartományban. NaCl-tolerancia a növekedéshez 0-25 %. A *N. lutea*-t ugyancsak Kínából származó sós talajmintából tenyésztették ki (LI W-J. et al. 2004) (LI W-J. et al. 2005).

A Maldi-TOF mérések során a hangyasavas extrakciós eredmények pontosabbak lettek, mint a direkt feldolgozás.



4. ábra. A Maldi-TOF mérések sikeressége a különböző hőmérsékleten inkubált törzsek függvényében.

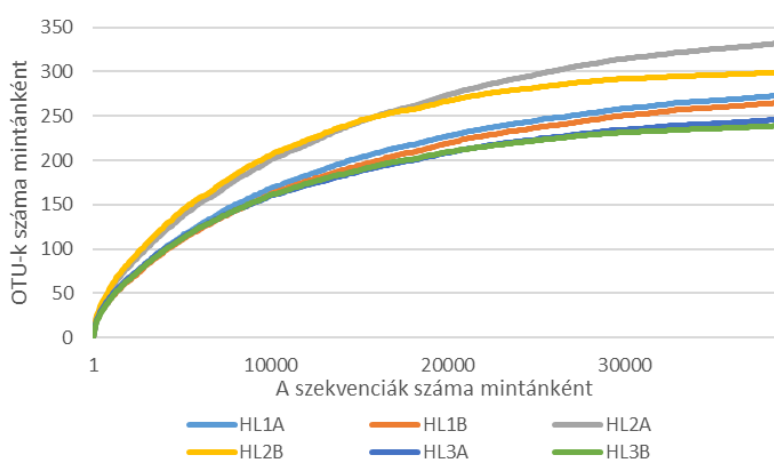
A riboszómális fehérje felismerése jóvoltából, amelyik species nem szerepel benne, de szerepel a genushoz tartozó másik faj, azt genus szinten megbízhatóan felismeri (4. ábra). A legújabb adatbázis frissítésnek köszönhetően rengeteg új környezeti baktérium is azonosíthatóvá vált. Jelenleg még nem használható a környezetből izolált baktériumok megbízható identifikálási módszerének, de megfelelő az ismétlődő izolátumok kiszűrésére a tömegspektrum alapján.

4.2.2. A fürdő vizének NGS-sel feltárt baktériumközösségei

A Szortyogó borvízláp fürdőjének vizéből vett 6 mintát közösségi DNS paired-end amplikon Illumina MiSeq szekvenálással is megvizsgáltuk. A mintákból quality check és szűrés után összesen 288527 szekvenciát kaptunk. A Coverage index alapján a szekvenciák száma megfelelő volt a vizsgált baktériumközösségek összetételének leírásához. Ezen kívül a fajtelítési „rarefaction” görbék is (5. ábra) azt mutatták, elegendő volt a szekvenálás mélysége a mintában előforduló OTU-k detektálásához.

A szekvenálás eredményeit, illetve a kapott adathalmaz alapján megállapított diverzitás indexeket a (4. táblázat) összegzi. A diverzitási indexek lényegében a fajsám:egyedszám

összefüggést jellemzik. A diverzitási indexekkel megbecsülhetjük egy-egy élőhely sokféleségét. Ennek a legegyszerűbb módja az előforduló fajok számát megbecsülni. A kimutatott fajok száma: Sobs (species observed). Azt, hogy a vizsgálat mennyire fedte le a közösségben található taxonokat a korábban leírt fajtelítődési görbével ábrázolhatjuk, ha a fajtelítődési görbe megközelíti az aszimptotát, akkor csaknem minden OTU-t kimutattunk a vizsgált mintából. A diverzitási indexek számításához minden minta szekvenciaszámát a legkisebb szekvenciaszámú mintához viszonyítottuk (subsampling). A Shannon és az Inverz Simpson index arra utalnak, hogy a fürdő különböző pontjain a baktériumközösségek diverzitása nagyon hasonló.



5. ábra. Fajtelítési görbe, amely megmutatja a mintám mennyire jól reprezentálja a vizsgált tárgy egészét

4. táblázat: NGS-sel feltárt baktériumközösségek legfontosabb paraméterei és diverzitás indexei

Minták	Szekvenciák száma	Coverage	Sobs	Shannon-index	Inverz Simpson
HL1A	49695	0,999	272,283	2,182	5,558
HL1B	54663	0,999	264,407	2,231	5,931
HL2A	55795	0,998	330,697	2,308	5,744
HL2B	38652	1,000	299,000	2,419	6,159
HL3A	46704	0,999	244,501	2,261	6,056
HL3B	43018	0,999	239,959	2,172	5,581

A vizsgált vízmintában a tenyésztéses eredményekhez hasonlóan a Proteobacteria törzs (65%) volt a domináns, majd a Bacteroidia (16%) és az Actinobacteria (6%). Összesen 8 olyan nemzetség volt, amelynek legalább 1% volt a relatív abundanciája mind a hat mintában: a *Rhodoluna*, az *Emticicia*, a *Fluviicola*, a *Flavobacterium*, a *Pseudorhodobacter*, a *Rhodoferrax* a *Comamonadaceae_unclassified*, és a *Methylophilaceae_unclassified* nemzetségek. A vizsgált szekvenciák elemzése során kevés ez idáig ismeretlen baktériumfajokhoz és kandidátus taxonokhoz sorolható szekvenciát találtam, kandidátus nemzetségbe tartozó baktériumfajokra

utaló szekvenciák aránya mindössze 0,13% volt, ezzel szemben nagyszámú (109), mostanáig tenyésztésbe nem vont (uncultured vagy unclassified) taxonba tartozó nemzetséget mutattunk ki. Ezek az összes szekvencia 33,25 %-át tették ki. A dominánsak a már korábban említett Comamonadaceae_unclassified és a Methylophilaceae_unclassified voltak.

A metilotróf Methylophilaceae ilyen nagyszámú jelenléte a vízmintában egyik meghatározó eredménye a kutatásomnak, mivel a Methylophilaceae tagjai, mint bebizonyosodott a közelmúltban, nagyon fontosak a szénciklusban, így jelentős szerepet tölthetnek be a tőzeglápokban végbemenő szén biogeokémia körforgásában. A Methylophilaceae a metilotróf baktériumok egyik különleges családja. A családba olyan szervezetek tartoznak, amelyek szén-szén kötést nem tartalmazó vegyületek (C1-vegyületek) metabolizmusára specializálódtak, legjellemzőbb szubsztrátjaik a metanol és a metilált aminok (BECK D. A. et al. 2014). Édesvízi fajok mindenütt jelen vannak, főleg a tavakban a diatóma- és/vagy cianobaktérium-virágzások idején akár a teljes prokarióta közösség 4%-át is kitehetik (1,32 % volt a hargitaligeti mintákban közvetlenül algavirágzás után), ami arra utal, hogy a növekedésüket támogató C1 szubsztrátokat az elsődleges termelők bocsátják ki (SALCHER M. M. 2019). A család másik különlegessége, hogy például a tengeri Methylophilaceae genomjai viszonylag kicsik (kevesebb, mint 1,3 Mb), amit az e fajokban bekövetkezett jelentős génvesztésnek tulajdonítanak (BECK D. A. et al. 2014). Megfigyelhető, hogy a legnagyobb számban előforduló vízi mikrobák sejt- és genommérete kicsi. A genom-streamlining elmélet a környezeti tényezők által vezérelt evolúciós szelekció által okozott génvesztést jósol, amely a korlátozó erőforrásokért küzdő, felsőbbrendű versenytársaknak kedvez. Az édesvízi üledékből a viszonylag oligotróf pelagikusba történő élőhely-átmenetet fokozatos génvesztés és adaptív nyereség kísérte. A génvesztés főként olyan funkciókat érintett, amelyek nem feltétlenül szükségesek vagy előnyösek ezeken az élőhelyeken. Az élőhely átmenetek során bekövetkező genomredukcióra kivételes modell a Methylophilaceae család, a különböző élőhelyekről származó, evolúciósan rokon mikrobák ilyen jellegű gyűjteménye ritka a mikrobiális világban (SALCHER M. M. 2019).

A másik várt csoport az anoxikus fototrófok voltak, mint a vulkanikus területek első kolonizálói. Meglepő módon az újgenerációs szekvenálással még a kitenyésztett fajok (*Rhodobacter*) szekvenciái sem voltak kimutathatók, helyette nagyon nagy abundanciával (összes szekvencia 27 %-a) voltak jelen a *Pseudorhodobacter* nemzetség képviselői. A *Pseudorhodobacter* nemzetség abban különbözik a *Rhodobacter* nemzetségtől, hogy nem rendelkezik a fotoszintézis teljes génjével. Jelenleg a *Pseudorhodobacter* nemzetség kilenc fajt tartalmaz, amelyeket különböző környezetekből, például tengervízből, édesvízből és talajból

izoláltak. Nem ismert azonban, hogy milyen funkciót töltenek be a természetben (KIM S., LEE H. 2019). Ez a taxonómiai eredmény valószínűleg téves, és a molekuláris módszerek korlátjait bizonyítja.

A leggyakoribb osztályokat és a jellemző nemzetségeiket, az előfordulási gyakoriságukkal és az általános jellemzőikkel a (5. táblázat) mutatja be.

5. táblázat: A Szortyogó borvízláp NGS-sel kimutatott domináns osztályai és jellemzői

	Nemzetség	Anyagsere típus	Viszonya az oxigénnel	Abundancia
Actinobacteria				
Microbacteriaceae	<i>Rhodoluna, Aurantimicrobium</i>	kemoorganotróf	aerob	6,39%
Bacteroidia				
Spirosomaceae	<i>Emticicia</i>	kemoorganotróf	obligát aerob	16,16%
Crocinitomicaceae	<i>Fluviicola</i>	kemoorganotróf	obligát aerob	4,83%
Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	kemoorganotróf	obligát aerob	4,59%
Paludibacteraceae	<i>Paludibacter</i>	kemoorganotróf	obligát anaerob	0,39%
Bdellovibrionia				
Bacteriovoraceae	<i>Bacteriovorax</i>	kemoorganotróf	aerob	0,24%
Campylobacteria				
Arcobacteraceae	<i>Pseudarcobacter</i>	mixotróf	aerob, mikroaerofil	0,16%
Gracilibacteria				
Gracilibacteria_fa	<i>Gracilibacteria_ge</i>	*		0,92%
JGI_0000069-P22_fa	<i>JGI_0000069-P22_ge</i>	*		0,59%
Alphaproteobacteria				
Rhodobacteraceae	<i>Pseudorhodobacter</i>	kemoorganotróf	aerob	27,08%
Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonadaceae_unclassified</i>	kemoorganotróf, fotoorganotróf	aerob, fakultatív anaerob	0,94%
Gammaproteobacteria				
Comamonadaceae	<i>Comamonadaceae_unclassified, Rhodoferax</i>	kemoorganotróf	fakultatív anaerob	34,12%
Methylophilaceae	<i>Methylophilaceae_unclassified</i>	kemoorganotróf, metilotróf	aerob	1,32%
Gallionellaceae	<i>Sideroxydans, Gallionella</i>	kemolitotróf, vas-oxidáló, mixotróf	mikroerofil	0,86%

* nem ismert

A kimutatott domináns törzsek között található a Gracilibacteria, aminek az érdekessége, hogy a csoport ahova tartozik, a Candidate Phyla Radiation (CPR) baktériumai szinte kizárólag tenyésztéstől független módszerekkel nyert genomok alapján ismertek. Ez a baktériumok egyik fő monofiletikus csoportja, amelyről jelenleg úgy gondolják, hogy legalább 74 különböző törzsből áll, és amelynek rendkívül kevés tenyésztett képviselője van (Lewis W. H. et al. 2021). A CPR-en belül a már említett Gracilibacteria (BD1-5) különösen kevésbé ismert, ami az alulmintavételezésnek és a rendelkezésre álló genomok eleve töredezett jellegének tudható be. A CPR-baktériumokat általában szimbiontáknak jósolják kiterjedt bioszintetikus hiányosságaik miatt. Bár monofiletikusak, életmódjukat tekintve nem egységesek (SIEBER C. M. et al. 2019). Emellett megfigyelték, hogy ott képviseltetik magukat nagyobb számban, ahol metanotrófok és metilotrófok is élnek. Ezeken a helyeken a metilotrófok főként az üledékrészecskékhez kötődve fordultak elő. A metanotrófok metabolitjait nagy valószínűséggel a metilotrófok hasznosítják, erre utal az is, hogy közel azonos volt az előfordulásuk ezeken a helyeken. A *Gracili* baktériumok két populációja is

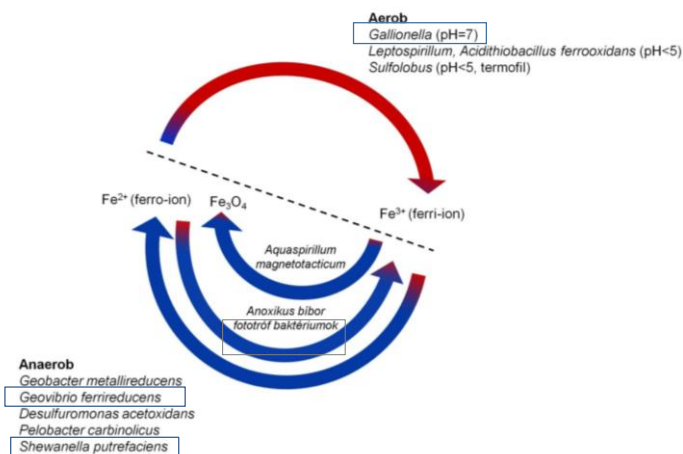
egymás utáni virágzást mutatott, amelyet valószínűleg a metánéhség időszaka váltott ki (KULOYO O. et al. 2020).

A *Bacteriovorax* nemzetség tagjai Gram-negatív baktériumok sejt parazitái, amelyek a periplazmatikus térben szaporodva elveszítik mozgás képességüket. A *Bacteriovorax* és a *Bdellovibrio* nemzetségeknek számos közös morfológiai és életmódbeli jellemzője van. A *Bacteriovorax* és a *Bdellovibrio* körülbelül $0,2-0,4 \times 0,5-1,4 \mu\text{m}$ méretűek, aerobok, az oxigént terminális elektronakceptorként használják, mezofilek. Tipikus Gram-negatív morfológiát mutatnak, és egyetlen, poláris, burkolt flagellummal mozognak. A *Bacteriovorax* nemzetség tagjai ugyanazokat az általános morfológiai és életciklusbeli jellemzőket mutatják, mint amelyeket a *Bdellovibrio* nemzetség esetében leírtak, ezen kívül e nemzetség tagjai kétfázisú életciklust mutatnak, amelyekben megjelenhet egy aktívan ragadozó, valamint egy PI (ragadozó független), szaprotróf forma is, amely képes tápközegen növekedni. A vad típusú törzsek egyetlen, poláris flagellummal mozognak. A PI sejtek (mutánsok) pleomorf, az egyszerű pálcikáktól a hosszú, szorosan spirális alakú sejtekig különböző sejtformákat mutatnak (KUEVER J. et al. 2005).

A legfőbb kutatási cél és így a legfontosabb eredmények a vas-ciklus redox folyamataiban részt vevő mikrobák (6. ábra) kimutatása volt. Ilyen volt a *Shewanella putrefaciens*, amit tenyésztéssel sikerült izolálni. De ilyen az NGS-sel kimutatott *Gallionella* nemzetség is, ami a kimutatott nemzetségek között is nagyobb relatív gyakorisággal bír, és a *Geobacter* nemzetség. Az előbbi Gram-negatív, mikroaerofil és kemolitotróf. Mikroszkópban vizsgálva vese alakú sejtek, amelyek extracelluláris, csavart kocsányt választanak ki, és képesek vasat, mint energiaforrást és szén-dioxidot, mint egyedüli szénforrást felhasználva növekedni. A mixotróf anyagcserét glükózzal, fruktózzal és szacharózzal is kimutatták. A Gallionellaceae családnak egy ismert faja van, a *Gallionella ferruginea*. Az organizmus csavart nyelet termel, amely számos szerves szálból álló kötegből áll, ami nagyon könnyen azonosíthatóvá teszi a *Gallionella*-t általában felületekhez kötődve, lassan áramló talajvízben, amely vasban gazdag, de alacsony szerves szén- és oxigénkoncentrációjú.

A második legjobban tanulmányozott Fe(III) redukcióra képes baktérium a szigorúan anaerob *Geobacter metallireducens* (modell organizmus) a nemzetség típusfaja. Elektrondonornak acetátot, elektronakceptornak pedig vasat használnak. Gram-negatívak és nem spóráképzőek. Minden *Geobacter* faj hőmérsékleti optimum szerint mezofil és csak szigorúan anoxikus körülmények között szaporodik. A *Geobacter* fajok alternatív elektronakceptorai a nitrát, az elemi kén, a fumarát, a malát, és a Mn(IV), U(VI), Co(III) (REITNER J., TIEL V. 2011). Ez a tulajdonsága (NDFO törzs) teszi számomra igazán érdekessé,

hogy NGS-sel sikerült (habár csak alacsony abundanciával) a *Geobacter* nemzetséget is kimutatni.



6. ábra. A vas ciklus jellegzetes baktériumai, jelölve, amiket sikerült kimutatni a fürdő vízében is (egyetemi jegyzet)

4.3 Eutróf lápok jellemző házas amőbái a Hargitán

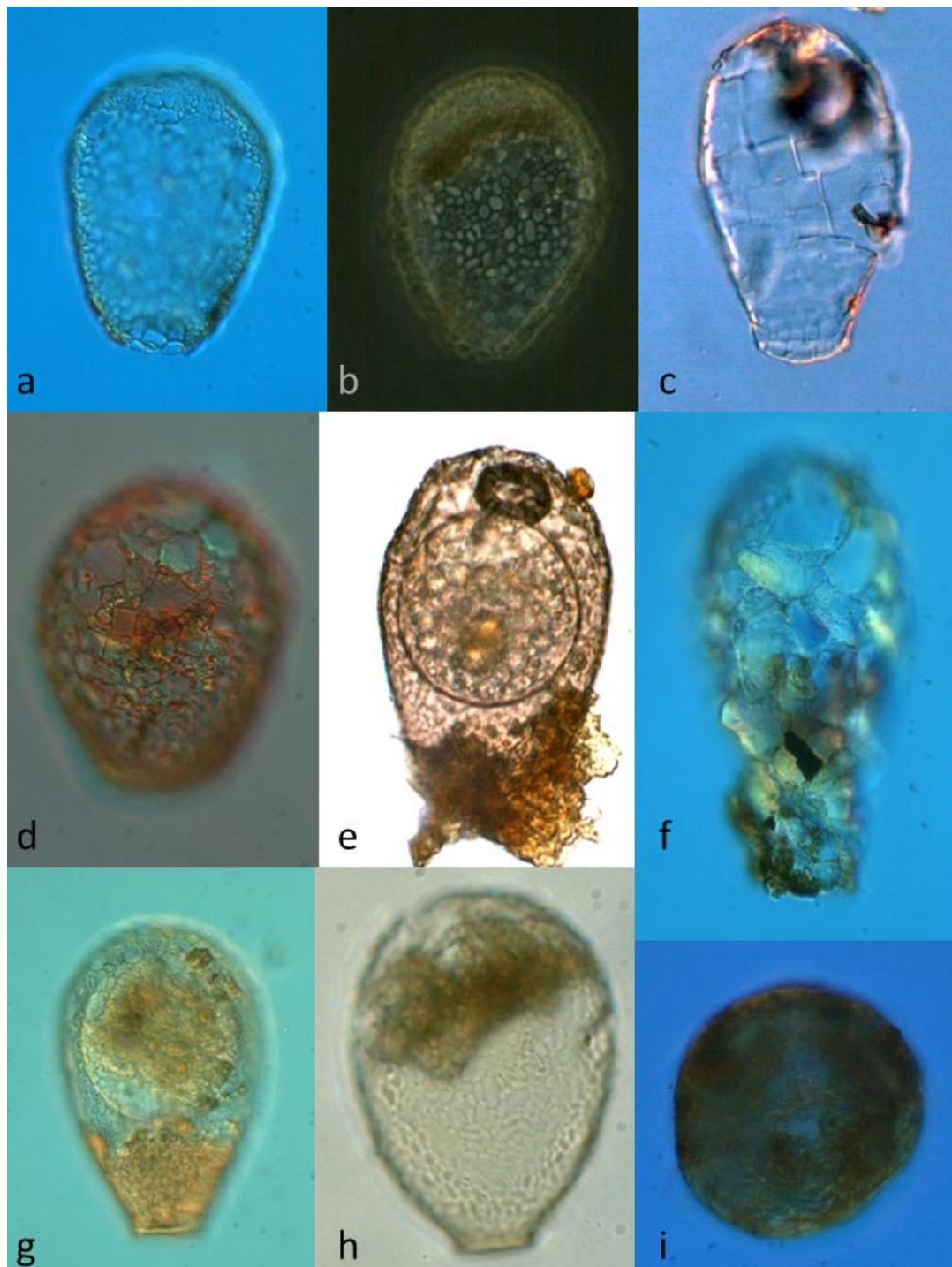
A házas amőbák olyan egysejtű protiszták, amelyek mindenütt jelen vannak a környezetben, tavakban, folyókban, mohákban és talajokban. Kicsik nagyjából a pollenszemek méretével megegyezők, és változatosak (eddig mintegy 2000 fajt írtak le, és általában 10 és 30 faj között vannak egy adott mintában). Fehérje-, mész- vagy kovasavas anyagból építenek héjat. Némelyikük környezetükből származó szerves vagy ásványi részecskék összeragasztásával képezi a testtát. Ezek viszonylag széles mérettartományt (több mint egy nagyságrendet) és a morfológiájuk alapján nagy változatosságát fednek le, ami lehetővé teszi a fajsztintű azonosítást. Ezek a testtát általában jól megőrződnek a tőzegben és a tavi üledékekben. A házas amőbák hosszú fosszilis múltra tekintenek vissza, a kövületek a kréta, a karbon és talán még a késő neoproterozoikum idejéből származnak. E hosszú fosszilis múlt ellenére a paleontológiai vizsgálataik a negyedidőszakra és különösen a holocénre összpontosítanak, ahol paleobioindikátorként használják őket tavakban és tőzeglápokban (MITCHELL E. A. et al. 2008).

A hargitaligeti borvízlápon kívül egy másik tőzeglápot is megvizsgáltunk, ami az előzetes vizsgálatok alapján ugyancsak eutróf élőhelynek bizonyult. Ez a Lucs tőzegláp volt. Innen két mintát vizsgáltunk mohát és vizet a lápszemekből, a Hargitaligetről csak a fürdőből vett víz mintát, mert az adott időszakban járhatatlan volt a láp területe.

A Török Júlia tanárnő segítségével meghatározott fajok zömmel nedves, savanyú úgynevezett erdei tőzegmoha mintákban vagy nagyon savanyú talajokban jellemzőek, de a

lápokban is előfordulhatnak. A jellemző fajok is igazolták, hogy nem tápanyagszegények ezek az élőhelyek. A vizesebb helyről vett mintákat *Arcella* fajok jól mutatják, míg a nedves kicsit *Sphagnumos* talajminta bizonyult a legfajgazdagabbnak.

A meghatározott taxonokat a (7. ábra) tartalmazza.



a) *Argynnia dentistoma*, b) *Argynnia dentistoma* a ház részletével, c) *Quadrullella symmetrica* (ház), d) *Heleopera petricola* (ház), e) *Heleopera rosea* cisztája, f) *Lagenodifflugia bryophila* (ház), g) *Nebela collaris* cisztája, h) *Nebela parvula* háza, i) *Trigonopyxis arcula* (ház); méretek: 80-120 μm között.

7. ábra. Jellegetes Arcellinida házas amőbák a vizsgált mintákból

5 Következtetések

A genomszekvenálási technológiák és a kifinomult metagenomikai módszerek fejlődése hozzájárult ahhoz, hogy drasztikusan megváltozzon a mikrobiális élet sokféleségéről alkotott véleményünk. A genomikai adatok jelentős bővülésével, amely az archeális és bakteriális diverzitás jobb megértéséhez vezetett, bár sok új faj képviselőjét nem tudjuk jelenleg tenyészteni. Amit jelenleg az archaeákról és a baktériumokról tudunk, annak nagy része vagy a kevés tanulmányozott, tenyésztett törzsekből ered, vagy a nem tenyésztett törzsekhez tartozó rekonstruált genomokból származik.

A molekuláris biológiai módszerek rohamos fejlődésének időszakában (ami számos fontos új ismeretet nyújtott a bolygónkon élő mikrobiális életről) elengedhetetlen, hogy különböző természetes környezetekből izoláljunk és tenyészünk baktériumokat, hogy láthassuk, megismerhessük a sejtszerkezetüket és fiziológiájukat, és hogy megértsük ökológiai szerepüket. Ezt a törekvést erősítik meg az új biokémiai reakciók és útvonalak példái, amelyeket tenyésztési kísérletek révén fedeztek fel, és melyek közül néhány útvonal pusztán genomikai módszerekkel nem volt kimutatható. Tenyésztés nélkül számos kérdés megválaszolatlan marad az organizmusok természetes környezetben betöltött szerepével kapcsolatban. Elengedhetetlen, hogy növeljük a környezetből származó mikroorganizmusok tenyésztésbe vonását. leginkább, melyek a legérdekesebbnek tűnnek, például azért, mert egy kevésbé jellemzett csoportot képviselnek, vagy amelyek a legnagyobb valószínűséggel javítják egy adott folyamat megértését. A tenyésztett fajok ~97%-a mindössze négy baktériumtörzsbe tartozik (Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes és Actinobacteria).

Összeségében elmondható, hogy a tőzeglápok rendkívül fontos lelőhelyek a múltbeli ökológiai, környezeti és éghajlati változások értékelése szempontjából is. Ismeretlen mikrobiális közösségeket rejtenek, melyek alkalmazkodtak az extrém körülményekhez, amelyek savasak, gazdagok oldott szerves C-ben és túlnyomórészt anoxikusak.

Számos, ilyen területekre jellemző baktériumot sikerült azonosítani, és kitenyészteni is. Képviseltették magukat a pszichrofil, metilotróf szervezetek, az anoxikus fototrófok, vas-oxidálók és vas-redukálók is.

Továbbiakban még szeretném a Hargita egyéb lapjait is bevonni a kutatásimba, hogy össze lehessen hasonlítani, és a terület jellegzetességeiből adódó egyezéseket keresni. Metagenomikai vizsgálatokkal feltárni, hogyan alkalmazkodtak a mikroorganizmusok a szélsőséges környezeti viszonyokhoz. A Maldi-TOF méréseket finomítani saját könyvtárak létrehozásával.

Irodalomjegyzék

- BÁNYAI J. 1926: A Hargita gázforrásai. – Földrajzi Közlemények pp. 55-58.
- BÁNYAI J. 1929: A Hargita vulkánikus kőzeteinek elterjedése. In Csutak V. (szerk.): Emlékkönyv a Székely Nemzeti Múzeum 50 éves jubileumára. – Castor és Pollux Könyvkiadó, Sepsiszentgyörgy. pp. 503-507.
- BÁNYAI J. 1929: Adatok a hargitai ásványvizek geológiájához. In Csutak V. (szerk.): Emlékkönyv a Székely Nemzeti Múzeum 50 éves jubileumára. – Castor és Pollux Könyvkiadó, Sepsiszentgyörgy. pp. 508-515.
- BÁNYAI J. 1932: A hargitai opálbarlang. – Erdélyi Múzeum. pp. 54-62.
- BÁNYAI J. 1934: A székelyföldi ásványvizek. – Erdélyi Múzeum. pp. 349-362.
- BÁNYAI J. 1936: Természetes gázforrások. Különös tekintettel a székelyföldi előfordulásokra. – Erdélyi Múzeum. pp. 220-243.
- BÁNYAI J. ismeretlen: Ásványvizekkel átitatott lápok Kelet-Erdélyben. Haáz Rezső Múzeum Történelmi Gyűjteménye Bányai János kéziratgyűjtemény 117. pallium. Székelyudvarhely Románia.
- BECK D. A.–MCTAGGART T. L.–SETBOONSARNG U.–VOROBEEV A.–KALYUZHNAIA M. G.–IVANOVA N.–CHISTOSERDOVA L. 2014: The Expanded Diversity of Methylophilaceae from Lake Washington through Cultivation and Genomic Sequencing of Novel Ecotypes. – PLoS ONE. pp. 1-12.
- CANFIELD D. E.–CHRISTENSEN E.–THAMDRUP B. 2005: Aquatic geomicrobiology.: Advances in Marine Biology: Volume 48.: Elsevier Science & Technology.
- COCKELL C. S.–KELLY L.–SUMMERS S. 2011: Microbiology of Volcanic Environments. In Horikoshi K. (szerk.): Extremophiles Handbook, – Springer Nature. pp. 918-933.
- DADAY J. 1883: Adatok a Szent-Anna és Mohos tó faunájának ismeretéhez. – Orvos-természettudományi értesítő II. pp. 17-34.
- DUDA V.–SUZINA N.–POLIVTSEVA V.–BORONIN A. 2012: Ultramicrobacteria: Formation of the concept and contribution of ultramicrobacteria to biology. – Mikrobiologija. pp. 417-425.
- ENTZ G. 1876: Néhány moha alatt élő gyökérlábúról. – Orvos-természettudományi értesítő I.
- FELFÖLDY L. 1987: A biológiai vízminősítés. In Dr. Muts R. (szerk.). – VGI, Budapest.
- FRANCIS P. 1981: A vulkánok. – Gondolat Könyvkiadó, Budapest.
- GILLIS M.–DE LEY J. 2006: The Genera Chromobacterium and Janthinobacterium. In Dworkin M. (szerk.): The Prokaryotes. – Springer Science+Business Media LLC. pp. 737-746.
- HARANGI S.–LUKÁCS R. 2019: A Kárpát-Pannon térség neogén-kvarter vulkanizmusa és geodinamikai kapcsolata. – Földtani Közöny. pp. 197-232.
- HERLEMANN D. P.–LABRENZ M.–JÜRGENS K.–BERTILSSON S.–WANIEK J. J.–ANDERSSON A. F. 2011: Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. – The ISME journal. pp. 1571-1579.
- KARÁTSÓN D. 2009: A Börzsönytől a Hargitáig vulkanológia felszínfejlődés ősföldrajz. – Typotex Elektronikus Kiadó Kft, Budapest.
- KARÁTSÓN D.–TIMÁR G. 2004: Az Eperjes-Tokaji és a Kelemen-Görgényi-Hargita vulkáni vonulat összehasonlító térfogatszámítása SRTM-adatok alapján: vulkanológiai és felszínfejlődési következtetések. A magyar földrajz kurrens eredményei: II. Magyar Földrajzi Konferencia / Táj tér tervezés: Geográfus Doktoranduszok VIII. Országos Konferenciája. Szeged pp. 1-16.
- KERESZTURI Á. 2011: Asztrobiológia. – Magyar Csillagászati Egyesület, Budapest.
- KIM S.–LEE H. 2019: Draft Genome Sequence of Urease-Producing Pseudorhodobacter sp. Strain E13 Isolated from the Yellow Sea in Gunsan South Korea. – Microbiology Resource Announcements.
- KIS M. B.–BACIU C.–ZSIGMOND A. R.–KÉKEDY-NAGY L.–KÁRMÁN K.–PALCSU L.–MÁTHÉ I.–HARANGI SZ. 2020: Constraints on the hydrogeochemistry and origin of the CO₂-rich mineral waters from the Eastern Carpathians – Transylvanian Basin boundary. – Journal of Hydrology.
- KITSON E.–BELL N. G. 2020: The Response of Microbial Communities to Peatland Drainage and Rewetting. A Review. – Frontiers in Microbiology. 11.
- KOZICHA J. J.–WESTCOTTA S. L.–BAXTERA N. T.–HIGHLANDER S. K.–SCHLOSS P. D. 2013: Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. – Applied and Environmental Microbiology Vol. 79. Issue 17. pp. 5112-5120.
- KRÁLOVÁ S.–SVEC P.–BUSSE H. J.–STANKOVÁ E.–VÁCZI P.–SEDLÁČEK I. 2018: Flavobacterium chryseum sp. nov. and Flavobacterium psychrotarrae sp. nov. novel environmental bacteria isolated from Antarctica. – International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. pp. 3132-3139.
- KUEVER J.–RAINEY F. A.–WIDDEL F. 2005: Class IV. Deltaproteobacteria class nov. In Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2. The Proteobacteria. Part C. The Alpha – Beta – Delta – and Epsilonproteobacteria. – Springer, New York. pp. 1053-1057.
- Kuloyo O.–Ruff E. S.–Cahill A.–Connors L.–Zorz J. K.–Hrabe de Angelis I.–Nightingale M.–Mayer B.–Strous M. 2020: Methane oxidation and methylotroph population dynamics in groundwater mesocosms. – Environmental Microbiology. pp. 1222-1237.

- LÁJER K. 1998: Bevezetés a magyarországi lápok vegetációökológiájába. In Bartha D. (szerk.): TILIA.–Bartha D., Sopron. pp. 84-238.
- LANE D. 1991: 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt E., Goodfellow M. (szerk.): Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.– John Wiley and Sons, New York. pp. 115-148.
- LEWIS W. H.–TAHON G.–GEESINK P.–SOUSA D. Z.–ETTEMA T. J. 2021: Innovations to culturing the uncultured microbial majority.–Nature Reviews Microbiology. pp. 225-240.
- LI W.-J.–CHEN H.-H.–KIM CH.-J.–ZHANG J.-Q.–PARK D.-J.–LEE J.-CH.–XU L.-H.–JIANG CH.-L. 2005: *Nesterenkonia sandarakina* sp. nov. and *Nesterenkonia lutea* sp. nov., novel actinobacteria, and emended description of the genus *Nesterenkonia*.–International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. pp. 463-466.
- LI W.-J.–CHEN H.-H.–ZHANG Y.-Q.–SCHUMANN P.–STACKERBRANDT E.–XU L.-H.–JIANG C.-L. 2004: *Nesterenkonia halotolerans* sp. nov. and *Nesterenkonia xinjiangensis* sp. nov. actinobacteria from saline soils in the west of China.– International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. pp. 837-841.
- LOVELAND-CURTZE J.–MITEVA V. I.–BRENCHLEY J. E. 2009:*Herminiimonas glaciei* sp. nov. a novel ultramicrobacterium from 3042 m deep Greenland glacial ice.–International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. pp. 1272-1277.
- MADIGAN M. T.–BENDER K. S. 2015: Brock Biology of Microorganisms.–Pearson Education.
- MITCHELL E. A.–CHARMAN D. J.–WARNER B. G. 2008: Testate amoebae analysis in ecological and paleoecological studies of wetlands: past present and future.–Biodiversity and Conservation. pp. 2115-2137.
- MÜHLE E.–ABRY C.–LECLERC P.–GOLY G.-M.–CRISCUOLO A.–BUSSE H.–KÄMPFER P.–BERNARDET J. –CLERMONT D.–CHESNEAU O. 2020: *Flavobacterium bizetiae* sp. nov. isolated from diseased freshwater fish in Canada at the end of the 1970s. – International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. pp. 1-8.
- NYÁRÁDY G. E. 1929: A vizek és vízben bővelkedő talajok növényzetéről a Hargitában. In Csutak V. (szerk.): Emlékkönyv a Székely Nemzeti Múzeum 50 éves jubileumára.– Castor és Pollux – Könyvkiadó, Sepsiszentgyörgy. pp. 557-615.
- PRICE A.–PEARSON V. K.–SCHWENZER S. P.–MIOT J.–OLSSON-FRANCIS K. 2018:Nitrate-Dependent Iron Oxidation: A Potential Mars Metabolism.– Frontiers in Microbiology.
- PUGLISI E.–ZACCONE C.–CAPPA F.–COCCONCELLI P.–SHOTYK W.–TREVISAN M.–MIANO T. M. 2014: Changes in bacterial and archaeal community assemblages.–Biology and Fertility of Soils. pp. 815-826.
- REITNER J.–THIEL V. 2011: Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series.– Springer Science+Business Media B.V.,Dordrecht.
- SALCHER M. M.–SCHAEFLE D.–KASPAR M.–NEUENSCHWANDER S. M.–GHAIR R. 2019: Evolution in action: habitat transition from sediment to the pelagial leads to genome streamlining in Methylophilaceae.–The ISME Journal. pp. 2764-2777.
- SCHNITCHEN C.–TÓTHMÉRÉSZ B.–MAGYARI E.–GRIGORSZKY I.–BRAUN M. 2004: Láphidrológiai változások rekonstrukciója.–Természetvédelmi Közlemények. pp. 209-218.
- SIEBER C. M.–PAUL B. G.–CASTELLE C. J.–HU P.–TRINGE S. G.–VALENTINE D. L.–ANDERSEN G. L.–BANFIELD J. L. 2019: Unusual Metabolism and Hypervariation in the Genome of a Gracilibacterium (BD1-5) from an Oil-Degrading Community.–mBio.
- SRINIVAS T. N.–KUMAR P.–SASIKALA C.–SPRÖER C.–RAMANA C. 2008: *Rhodobacter ovatus* sp. nov. a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a polluted pond.–International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. pp. 1379-1383.
- SZÁDECKY-KARDOSS GY. 1929: A Székelyföld képződése. In Csutak V. (szerk.): Emlékkönyv a Székely Nemzeti Múzeum 50 éves jubileumára.– Castor és Pollux Könyvkiadó, Sepsiszentgyörgy. pp. 491-502.
- SZAKÁCS A. 2010: Post-volcanic Phenomena in the East Carpathians. In Evelpidou N.,Mauro F.,Tecim V.,Figueiredo T.,Vassilopoulos A. (szerk.): Natural Heritage from East to West Case studies from 6 EU countries .–Springer Nature. pp. 87-95.
- SZAKÁCS S.–KARÁTSÓN D. 2002: A belső-kárpáti mészkáli vulkánosság. In Karátson D. (szerk.): Magyarország földje Kitekintéssel a Kárpát-medence egészére.– Magyar Könyvklub, Budapest. pp. 73-77.
- WILKINSON D. M.–MITCHELL E. A. 2010: Testate Amoebae and Nutrient Cycling with Particular Reference to Soils.– Geomicrobiology Journal. pp. 520-533.
- WILKINSON D. M.–CREEVY A. L.–VALENTINE J. 2012: The Past Present and Future of Soil Protist Ecology.–Acta Protozoologica. pp. 189-199.
- YOON S.-H.–HA S.-M.–KWON S.–LIM J.–KIM Y.–SEO H.–CHUN J. 2017: Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies.– International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. pp. 1613-1617.
- ZHANG H.–AMESBURY M. J.–PIILO S. R.–GARNEAU M.–GALLEGO-SALA A.–VÄLIRANTA M. M. 2020: Recent Changes in Peatland Testate Amoeba Functional Traits and Hydrology Within a Replicated Site Network in Northwestern Québec Canada.–Frontiers in Ecology and Evolution. pp. 1-12.
- ZHANG R.–ZHANG X.-Y.–SUN X.-K.–MU D.-S.–DU Z.-J. 2019: *Flavobacterium cerinum* sp. nov. isolated from Arctic tundra soil.– International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. pp. 3745-3750.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani azoknak az embereknek, akik nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el:

Dr. Borsodi Andreának, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette, hogy elkészüljön ez a kutatás, emellett az útmutatást, segítséget a szakirodalom felkutatásában, a tanácsokat, és a türelmét,

Dr. Török Júliának, aki megismertetett a protisztológiával, a segítségét a határozásban, a gyönyörű fotókat a beazonosított fajokról,

Szász Szabolcsnak a minták szállításáért, hogy időben a laborba kerülhessenek, de legfőképpen azért, mert nélküle nem ismerhettem volna meg ezt a különleges élőhelyet,

Megyes Melindának az újgenerációs szekvenálásban és a bioinformatikai adatértékelésben nyújtott segítségével,

Horváth Renátának, aki nélkül nem készült volna ilyen átfogó vízkémiai felmérés,

Dr. Osztie Hildának, laborvezetőmnek, aki lehetővé tette, hogy a munkahelyemen csinálhassam a tenyésztéseket, és a MALDI-TOF identifikálást,

Dr. Gáspár Erzsébetnek, aki megengedte, hogy az SBDK KL VÍZ eszközeit használhassam,

Dr. Tóth Erikának, akik lehetővé tette, hogy az ELTE Mikrobiológiai Tanszéken végezzem a kutatásom.

Köszönöm a munkatársaimnak a segítségüket, támogatásukat, az SBDK KL VÍZ vízmikrobiológiai laborjának, hogy bármikor kérhettem tőlük tanácsot, az ELTE Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak, hogy szükség esetén bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Melléklet

Komponenes neve	Mérési szabvány jelzet	2021.05.19	2021.09.17	2021.10.24	2022.02.18-19.	Tőzeg	Vas-forrás	Mértékegység
pH (laborban)	MSZ 1484-22:2009 8.1. szakasz	6,68	6,60	6,54	6,53 (6,62)	6,30	6,20	-
Fajl. vez. kép. (laborban)	MSZ EN 27888:1998	2002	2010	2111	2069 (2350)	1513	1190	µS/cm
KO _l ps	MSZ 448-20:1990	3,37	3,0	2,1	0,9		0,7	mg/L O ₂
Ammónium ion	ISO 15923-1:2013 B melléklet	0,63	0,19	0,56	1,08		0,54	mg/L
Nitrit ion	ISO 15923-1:2013 D melléklet	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02		<0,02	mg/L
Nitrát ion	ISO 15923-1:2013 C melléklet	<1	5	<1	<1		<1	mg/L
Klorid ion	ISO 15923-1:2013 E melléklet	33	1	40	40		35	mg/L
Szulfát ion	ISO 15923-1:2013 G melléklet	<5	<5	<5	<5		20	mg/L
Lúgosság	MSZ 448-11:1986 5.1. szakasz	25,2	27	27	26	19	13	mmol/L
Összes keménység	MSZ 448-21:1986 3. fejezet	509	507	514	493		245	mg/L CaO
Ca ion	MSZ 448-3:1985 3. fejezet	176,7	189	181	178		87	mg/L
Mg ion	MSZ 448-3:1985 2. fejezet	113,7	105	113	106		53	mg/L
Karbonát ion	MSZ 448-11:1986 6.2. szakasz	<3	<3	<3	<3	<3	<3	mg/L
Hidrogénkarbonát ion	MSZ 448-11:1986 6.2. szakasz	1536,5	1645	1676	1588	1161	810	mg/L
Oldott foszfát	ISO 15923-1:2013 F melléklet	<0,05	0,07	0,05	0,09		0,07	mg/L
Összes foszfát	MSZ 448-18:2009 8.2. szakasz	0,18	-	0,23	0,33		2,64	mg/L
Összes nitrogén	ISO 15923-1:2013 F melléklet	1,33	2,1	1,06	1,19		1,21	mg/L
KO _l kr	MSZ 12750-21:1971 3. fejezet	20,9	50,4	17,6	11,2			mg/L
Vas ion	MSZ EN ISO 17294-2:2017	842	972	695/~4000	5228	1651	12755	µg/L
Mangán ion	MSZ EN ISO 17294-2:2017	167	303	325	325	377	189	µg/L
Nátrium ion	MSZ EN ISO 17294-2:2017	120	193	192	197	128	131	mg/L
Kálium ion	MSZ EN ISO 17294-2:2017	12,7	26	26	25	20	15	mg/L
Lítium ion	MSZ EN ISO 17294-2:2017	235	383	507	389	340	364	µg/L
Bór ion	MSZ EN ISO 17294-2:2017	3,2	6,4	7,0	5,3	4,8	2,8	mg/L
Alumínium ion	MSZ EN ISO 17294-2:2017	-	4,8	46	6,7	129,0	12	µg/L
Összes szárazanyag	MSZ 448-19:1986 4. fejezet	1783	1606	1631	1725		1030	mg/L
Összes só	MSZ 260-3:1973	1230	1093	1118	908		852	mg/L
Biokémiai oxigénigény	MSZ EN 1899-2:2000	4,17	3,13	3,51	1,74			mg/L
Szulfid	MSZ 448-14:1990	<0,01	0,02	-	<0,01		<0,01	mg/L
Szabad széndioxid	MSZ 448-23:1983	-	600	750	662		1706	µg/L
TOC	HACK LCK380 követta teszt	-	-	2,9	-			mg/L
Klorofill-a	MSZ ISO 10260	-	149,85	60	-			mg/L
Oldott oxigén	MSZ EN 25814:1998	-	-	4,1	(6,82)			mg/L

(/-)ben a helyszínen mért adatok HQ30D hordozható egységatornás multiméterrel

3. táblázat: A vízkémiai eredmények összefoglaló táblázata