

## Magyarországi szikes vizek bakteriális biodiverzitásának megismerése, extremofil szervezetek polifázikus taxonómiai jellemzése

Az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén 2002 és 2006 között összehangolt, szezonális mintavételezéseket követően részletes vizsgálatokat végeztünk magyarországi szikes vizek bakteriális biodiverzitásának megismerésére, extremofil szervezetek polifázikus taxonómiai jellemzésére. E vizsgálatok keretében a Velencei-tó [Császár-öböl (CS), Német-tisztás (N), Lángi-tisztás (L), Agárd-Gárdony Hosszú-tisztás (G), Kajakpálya (K), és Fürdető (F)], a kiskunsági Kelemen-szék (K1), Zab-szék (K4) és Böddi-szék (K7), valamint a tiszántúli Nagy-vadas (H2) tó és Fehér-szik (H3) vízének és üledékének aerob és anaerob mikrobiális folyamataiban résztvevő baktériumközösségek faji összetételének, anyagcsere potenciáljának és ökológiai toleranciájának megismerése volt a cél. A mikróbaközösségek fajgazdagságát az alkalmazott módszerek szelektivitásából adódó torzítások csökkentésének érdekében hagyományos tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai diverzitás elemző módszerek egyidejű alkalmazásával kíséreltük meg felderíteni.

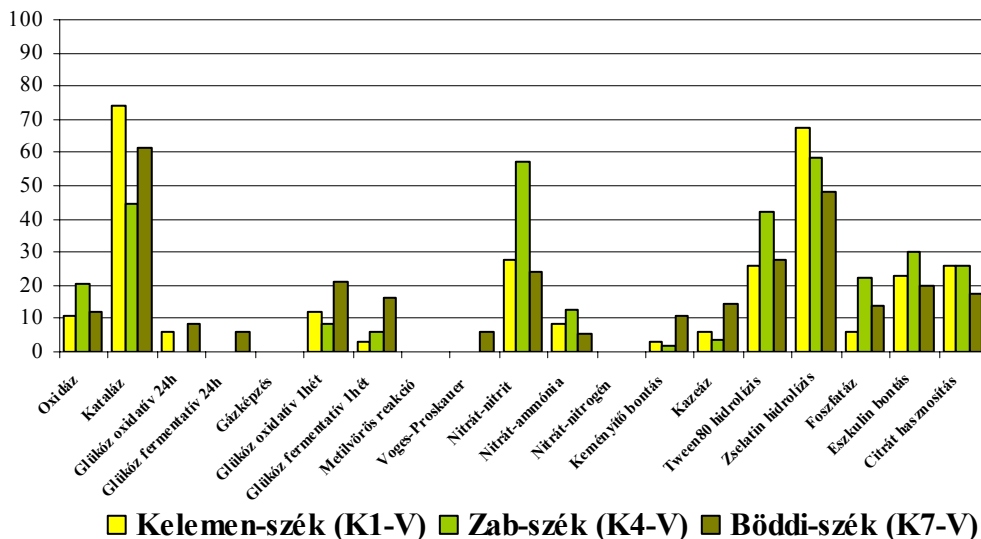
A kutatás öt éve alatt a 6 mintavételi terület összesen 26 pontjáról bakteriológiai vizsgálatok céljára az 1. táblázatban feltüntetett területi és időbeni bontásban végeztünk víz (V) és üledék (U) mintavételezéseket, melyekkel egyidejűleg mértük a víz néhány fizikokémiai paraméterét (vízmélység, hőmérséklet, pH, vezetőképesség, oldott O<sub>2</sub>) is.

	Velencei-tó (CS, N, L, G, K, F)	KNP			HNP	
		Kelemen-szék (K1)	Zab-szék (K4)	Böddi-szék (K7)	Nagy-vadas (H2)	Fehér-szik (H3)
2002	IV.15., VI.17., VIII. 5., X. 8.	IV. 19., VII. 8.	IV. 19., VII. 8.			
2003	V. 15., VI. 17., VIII. 12., X. 8.	V. 8., VI. 21., X. 29.	V. 8., VI. 21., X. 29.	V. 8., VI. 21., X. 29.	V. 7., X. 27.	V. 7., X. 27.
2004		IV. 27., VII. 1., X. 22.	IV. 27., VII. 1., X. 22.	IV. 27., VII. 1., X. 22.	IV. 29., VII. 9., X. 25.	IV. 29., VII. 9., X. 25.
2005		V. 13., VII. 18., XI. 10.	V. 13., VII. 18., XI. 10.	V. 13., VII. 18., XI. 10.	V. 5., VII. 20., XI. 14.	V. 5., VII. 20., XI. 14.
2006	V. 29., VIII. 8., X. 25.	V. 18., VII. 10.		V. 18., VII. 10.	V. 24., VII. 5.	V. 24., VII. 5.

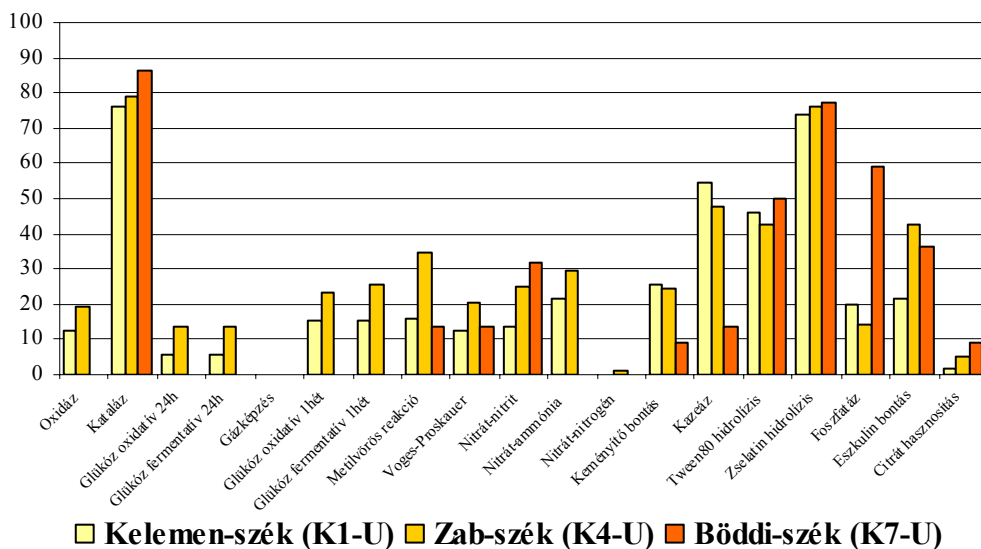
1. táblázat

A tenyésztésen alapuló vizsgálatok során az alföldi szikes tavak vizéből és üledékéből szerves anyagokban gazdag (KingB, DSMZ-1, DSMZ-607), illetve szegény (oligotróf), továbbá a tavak sókban gazdag és alkalikus környezetét tükröző (DSMZ-246, DSMZ-940) táptalajokon 2002 és 2004 között csaknem 600 baktériumtörzset izoláltunk. Közülük a kiskunsági székek vizéből 96 (Kelemen-szék: 31, Zab-szék: 32, Böddi-szék: 33), üledékéből 182 (Kelemen-szék: 96 Zab-szék: 63 Böddi-szék: 23), a tiszántúli vízterek üledékéből 98 törzs (Nagy-Vadas: 51, Fehér-szik: 47) összesen 26 kódolt tulajdonságot eredményező, részletes fenotípusos jellemzését végeztük el (1. ábra). A kitenyésztett törzsek között mindenütt nagyon magasnak bizonyult a Gram-pozitív szervezetek (átlagosan 75-97%) és az aerob tenyésztési feltételeknek köszönhetően a kataláz pozitívok (62-86%) aránya. A tiszántúli törzsek számottevően magasabb (59-78%) oxidáz aktivitással rendelkeztek, mint a kiskunságiak (0-20%). Általában valamennyi törzscsoportban alacsony volt a D-glükóz fermentációja és a fakultatív anaerob nitrát-légző aktivitás. Biopolimerek bontására a KNP tavainak üledékéből izolált törzsek általában 30-80%-os, míg a tiszántúli tavak üledékéből származó törzsek általában csak 10-50%-os arányban voltak képesek. A foszfatáz tesztben ugyancsak jelentős aktivitási különbséget (6-59%) észleltük a különböző helyről származó törzsek között.

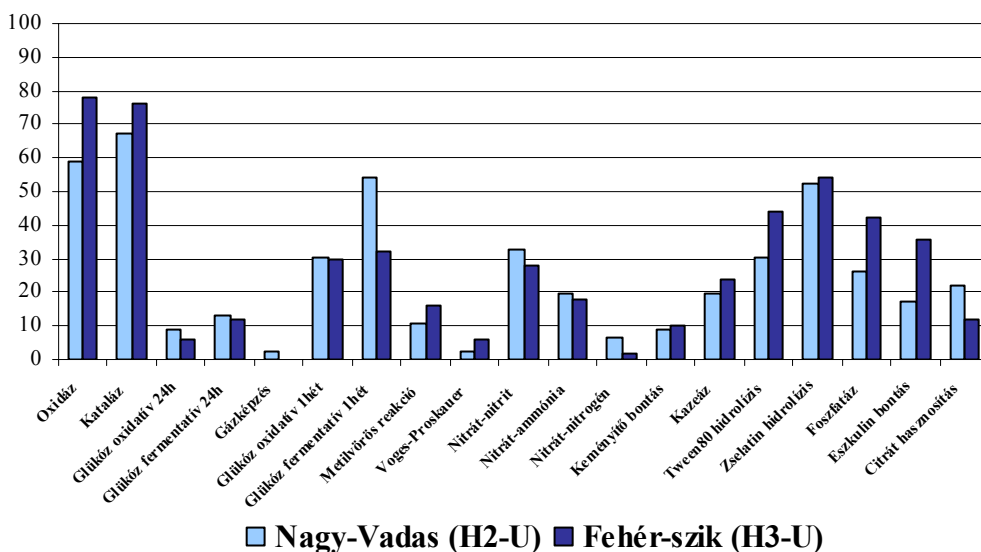
A nagyszámú baktériumtörzs fenotípusos tulajdonságainak összesített eredményei alapján többváltozós adatelemzést végeztünk. A hierarchikus cluster és a főkomponens-analízis eredménye egyértelműen a baktériumtörzsek mintavételi területek szerinti (kiskunsági és tiszántúli) elsődleges elkülönülésére utalt. A minták ezen szétválásán kívül megfigyelhető volt egy másodlagos csoportosulás is a tenyésztéshez felhasznált táptalajok típusa szerint (pl. az alkalikus és a tengervizes táptalajokról származó törzsek esetében).



1. ábra



2. ábra



3. ábra

Az izolált törzsek ökológiai tolerancia tulajdonságait NaCl és pH-tűrőképesség tesztekkel vizsgáltuk. NaCl hiányában a törzseknek csak igen kis hányada szaporodott. A többség számára az optimális növekedési feltételeket az 5–7 m/V%-os NaCl koncentrációjú (pH 8) táplevesek biztosították, az izolátumok mérsékelten halofil jellegére utalva. Az eltérő pH-értékű (5 m/V% NaCl) táplevesekbe oltott törzsek nem mutattak egyértelmű növekedési optimumot, a törzsek túlnyomó többsége kitűnően tolerálta a szélsőségesen lúgos körülményeket is fakultatív és obligát alkalofil szervezetek együttes jelenlétére utalva. Mindkét vizsgálat során erős táptalajfüggőség mutatkozott, a szélsőségesen szikes körülményeket jól modellező táptalajokról (alkalikus, tengervizes) izolált törzsek szélesebb skálán tolerálták a változó, illetve a kiemelkedően magas só és pH-értékeket.

A hierarchikus cluster analízissel kialakított csoportokból a nagyfokú metabolikus hasonlóságot mutató törzsek közül választott reprezentánsok faji szintű azonosítását a 16S rDNS parciális szekvencia analízisére alapoztuk. A faji szintű azonosítás eredményeinek összefoglalását a törzsek származási helyének feltüntetésével a 2. táblázat tartalmazza. A kiskunsági és tisztántúli szikes tavakból összesen 52 faj képviselőjét azonosítottuk 92-100%-os szekvencia hasonlósággal. A KNP területéről a Kelemen-székből 20, a Zab-székből 14, a Böddi-székből 20, míg a tisztántúli Nagy-vadasból 14 és a Fehér-szökből 19 fajt határoztunk meg, melyek az  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -Proteobacteriumok, valamint a Firmicutes kis és nagy G+C tartalmú Gram-pozitívok filogenetikai csoportjaiba tartoztak.

A kiskunsági székek víz és üledékmintáiból valamennyi mintavételi időpontban és táptalajról domináns előfordulásuként tenyésztettük ki a *Bacillus* és közelrokon nemzetségek alkalofil (pl. *B. horikoshii*, *B. pseudofirmus*) és alkalitoleráns (pl. *B. pumilus*, *B. cereus*) fajait. A tisztántúli üledékmintákból az izolált törzsek legnagyobb része ugyancsak fakultatív és obligát alkalofil *Bacillus* (pl. *B. alcalinulinus*, *B. alkalogaya*), illetve az alkalitoleráns és halotoleráns *Nesterenkonia lutea* fajokkal mutatott szekvencia egyezést. Valamennyi területről tenyésztésbe vontuk még a *Halomonas nitritophilus* faj képviselőit is. A kiskunsági és a tisztántúli szikes tavak üledékéből azonosított fajokat összevetve hasonló metabolikus aktivitású és filogenetikailag közelrokon taxonokat kaptunk. A törzsek fenotípusos tulajdonságainak összesített elemzése és a 16S rRNS gén szekvencia analízisek eredményei egyaránt arra mutattak rá, hogy a tisztántúli szikes vizek baktériumközösségei biokémiai tulajdonságaik és fajösszetételük tekintetében is különböznek a kiskunsági székektől. A kiskunságról izolált számos, pl. kifejezetten halofil szervezetet nem sikerült a tisztántúli üledékekből kitenyésztünk, míg ez utóbbi élőhelyről az alkalitoleráns, fakultatív halofil szervezetek sokkal nagyobb diverzitását tártuk fel.

Kutatási eredmények részletes bemutatása:

- Szabó G., Borsodi A., Vladár P., Cech G., Tóth E., Boros E., Márialigeti K. (2004) A Kiskunsági Nemzeti Park szikes tavainak bakteriológiai vizsgálata. Hidrológiai Közlöny 84 (5-6): 147-150.
- Borsodi A., Vladár P., Rusznyák A., Szabó G., Sipos R., Márialigeti K. (2005): Tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai vizsgálatok a Kiskunsági NP szikes tavainak baktériumközösségein. Hidrológiai Közlöny 85 (6): 23-25.
- Pollák B., Rusznyák A., Palatinszky M., Márialigeti K., Borsodi A. (2006) Tisztántúli szikes tavak baktériumközösségeinek összehasonlító vizsgálata. Hidrológiai Közlöny 86 (6): 88-90.

A törzsek között számos feltehetően a tudomány számára új fajt sikerült kitenyésztünk, melyek a már ismert közelrokon alkalofil és/vagy halofil fajokkal csak alacsony (92-95%) szekvencia hasonlóságot mutattak. Több olyan *Bacillus* nemzetségbe sorolt és az eddig ismert fajokkal csak nagyon alacsony szekvencia egyezést mutató törzset sikerült az alföldi szikes vizekből tenyésztésbe vonni, melyeknek a legközelebbi filogenetikai rokonát egy másik alföldi szikes víztérből izoláltuk.

Filogenetikai csoport (16S rRNS)	Legközelebbi rokon baktériumfaj	Hasonlóság	Származási hely
<b>Bacteria</b>			
<b>Proteobacteria</b>			
α-Proteobacteria	<i>Novosphingobium hassiacum</i>	97%	H3-U
	<i>Paracoccus alcaliphilus</i>	99%	K1-V
	<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	99%	K7-V
β-Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga atypica</i>	97%	H2-U
	<i>Hydrogenophaga defluvii</i>	97%	H3-U
γ-Proteobacteria	<i>Alishewanella fetalis</i>	97%	K7-V
	<i>Halomonas alkantarctica</i>	97%	K7-V
	<i>Halomonas boliviensis</i>	99%	K7-V
	<i>Halomonas nitritophilus</i>	97-99%	H2-U; H3-U; K1-U; K4-U; K7-U; K1-V
	<i>Halomonas desiderata</i>	98%	K1-U; K7-U; K1-V
	<i>Halomonas venusta</i>	98%	K7-V
	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	98-99%	H2-U; K4-U; K7-V
	<i>Xanthomonas campestris</i>	96%	K1-V
<b>Firmicutes</b>			
Nagy G+C tartalmú Gram-pozitívok	<i>Agromyces aurantiacus</i>	98%	K4-U
	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%	K7-V
	<i>Aureobacterium kitamiense</i>	99%	H2-U
	<i>Cellulomonas variformis</i>	98%	H2-U
	<i>Dietzia natronolimnea</i>	100%	K7-V
	<i>Kocuria rosea</i>	99%	H3-U
	<i>Micrococcus luteus</i>	99%	K4-U
	<i>Micrococcus terregens</i>	96%	H2-U
	<i>Myceligeners xiligouense</i>	98%	H3-U
	<i>Nesterenkonion aurantia</i>	95%	H2-U
	<i>Nesterenkonion halobia</i>	97%	K4-U
	<i>Nesterenkonion lutea</i>	98-99%	H2-U; H3-U; K7-V
	<i>Nesterenkonion sandarakina</i>	99%	K7-V
	Kis G+C tartalmú Gram-pozitívok	<i>Bacillus agaradhaerens</i>	94%
<i>Bacillus alcalophilus</i>		94%	H3-U; K4-U; K7-U
<i>Bacillus alkaliinulinus</i>		95%	H2-U; H3-U; K4-U
<i>Bacillus alkalogaya</i>		95%	H2-U; H3-U
<i>Bacillus clarkii</i>		92%	K1-U
<i>Bacillus cereus</i>		99%	K1-U; K4-U
<i>Bacillus cohnii</i>		99%	H3-U; K1-U; K4-U
<i>Bacillus firmus</i>		95%	K7-U
<i>Bacillus horikoshii</i>		97-98%	H2-U; H3-U; K1-U; K4-U; K7-U; K7-V
<i>Bacillus krulwichiae</i>		98%	H3-U; K1-U; K7-U
<i>Bacillus macroides</i>		99%	K1-U
<i>Bacillus niacini</i>		99%	K4-U
<i>Bacillus pseudoalcalophilus</i>		93%	H3-U
<i>Bacillus pseudofirmus</i>		97%	H3-U; K1-U; K4-U; K7-U; K1-V; K7-V
<i>Bacillus pumilus</i>		99%	H3-U; K1-U; K4-U
<i>Bacillus saliphilus</i>		93%	K7-V
<i>Bacillus simplex</i>		99%	K1-U
<i>Bacillus subtilis</i>		100%	H3-U; K4-U
<i>Halobacillus salinus</i>		96%	K1-U
<i>Marinibacillus campisalis</i>		96-98%	K1-U; K1-V
<i>Planococcus alkanoclasticus</i>		98%	H2-U
<i>Planococcus antarcticus</i>		97%	H3-U
<i>Planococcus maritimus</i>		98%	H3-U
<i>Sinococcus qinghaiensis</i>	94%	H2-U	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99%	H2-U	
<i>Staphylococcus warneri</i>	99%	K1-U	

2. táblázat

A polifázikus taxonómiai elveknek megfelelően részletes fenotípusos és genotípusos analízisnek vetettünk alá három a kiskunsági Kelemen-szék és Böddi-szék üledékéből kitenyésztett törzset, melyek az eddig leírt és ismert baktériumfajoktól nagymértékben eltérő tulajdonságaik alapján egy a tudományra nézve új faj, a *Bacillus aurantiacus* képviselői.

Kutatási eredmények részletes bemutatása:

Borsodi A. K., Márialigeti K., Szabó G., Palatinszky M., Pollák B., Kéki Zs., Schumann P., Tóth E.M. (2007) *Bacillus aurantiacus* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (in press) IMP.:2.777

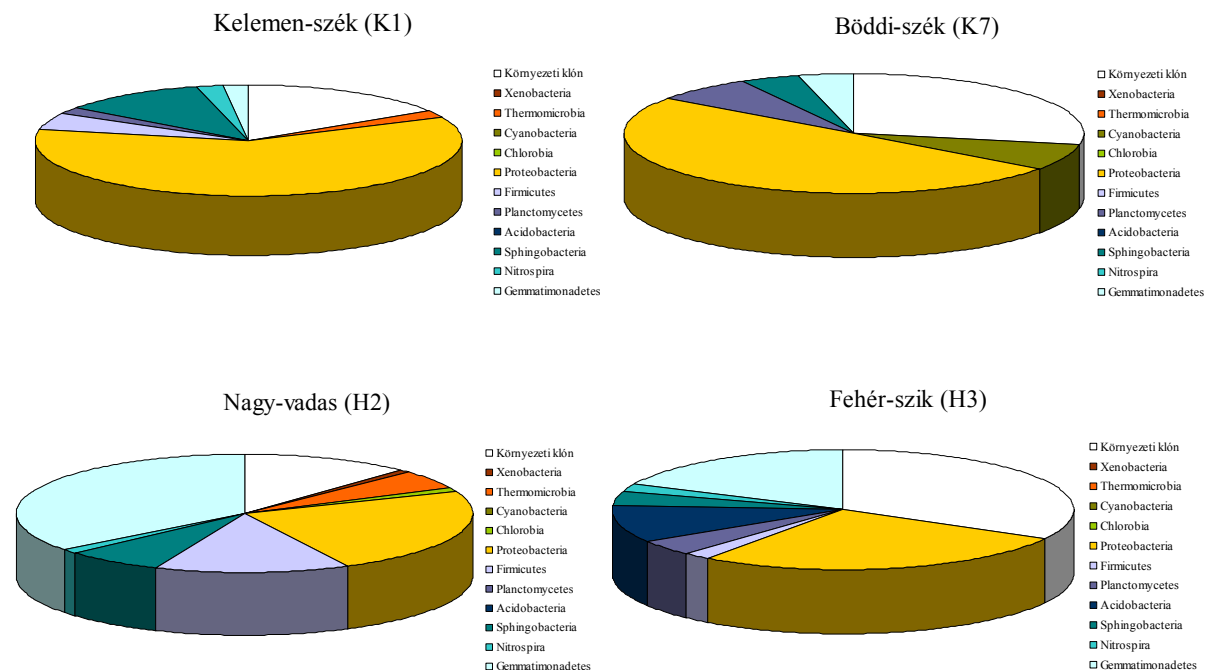
Hazánk legnyugatibb szikes tavának, a Fertőnek vizében dekomponálódó nádrizómák felületéről speciális táptalajon korábban kitenyésztett alkalofil és alkalitoleráns baktériumközösségek vizsgálatával igazoltuk a tudományra nézve új nemzetség és faj, a *Pannonibacter phragmitetus* ( $\alpha$ -Proteobacteria) jelenlétét.

Kutatási eredmények részletes bemutatása:

Borsodi A. K., Micsinai A., Kovács G., Tóth E., Schumann P., Kovács A. L., Böddi B., Márialigeti K. (2003) *Pannonibacter phragmitetus* gen. nov., sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium isolated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:555-561 IMP: 3.187

Borsodi A. K., Micsinai A., Ruszyák A., Vladár P., Kovács G., Tóth E. M., Márialigeti K. (2005) Diversity of alkaliphilic and alkalitolerant bacteria cultivated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *Microbial Ecology* 50 (1):9-18 IMP: 2.674

Tenyésztéstől független diverzitás vizsgálataink során a Kelemen-szék, a Böddi-szék, a Nagy-vadas és a Fehér-szik üledékmintáiból egy-egy 142, 118, 138 illetve 123 tagú 16S rDNS klónkönyvtárat hoztunk létre. A négy tóból származó összesen 521 klónt ARDRA mintázatok elemzését követően tavanként 66, 54, 81 illetve 49 eltérő hasítási mintázatú csoportba soroltuk (3. táblázat).



4. ábra

A csoport reprezentáns klónok szekvencia analízise a tenyésztéssel nyert eredményekhez képest minden esetben sokkal szélesebb filogenetikai diverzitást mutatott (4. ábra). A négy tóból összesen 11 már ismert filogenetikai csoport képviselőit sikerült kimutatnunk a tenyésztéssel nyert kettővel (Proteobacteria, Firmicutes) szemben. A kiskunsági üledékmintákban a klónszekvenciák több mint 50%-a tartozott a Proteobacteria törzsbe.

Filogenetikai csoport (16S rRNS)	Legközelebbi rokon baktériumfaj	Hasonlóság	Szármaszási hely	Klónok száma (%)			
				K1	K7	H2	H3
<b>Bacteria</b>				66 (100)	54 (100)	81 (100)	49 (100)
	környezeti minta klón	90-99%	K1; K7; H2; H3	11 (16)	15 (28)	9 (12)	16 (33)
<b>Xenobacteria</b>				0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
Deinococci	<i>Deinococcus grandis</i>	95%	H2				
<b>Thermomicrobia</b>				1 (2)	0 (0)	4 (5)	0 (0)
Chloroflexi	<i>Caldilinea aerophila</i>	90%	H2				
	<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	92%	H2				
<b>Cyanobacteria</b>				0 (0)	4 (7)	0 (0)	0 (0)
Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i> sp.	98-99%	K7				
<b>Chlorobia</b>				0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
Chlorobia	<i>Chlorobium chlorovibrioides</i>	90%	H2				
<b>Proteobacteria</b>				40 (60)	27 (50)	19 (24)	13 (27)
<b>α-Proteobacteria</b>							
	<i>Bosea minetatlensis</i>	94%	H2				
	<i>Defluvicoccus vanus</i>	87%	K1; K7				
	<i>Paracoccus</i> sp.	92%	K1				
	<i>Paracoccus kawasakienensis</i>	94%	K1				
	<i>Rhodoplanes</i> sp.	95%	K7				
	<i>Rhodovibrio</i> sp.	95%	K7				
<b>β-Proteobacteria</b>	környezeti minta klón	93-98%	H3				
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	98%	K1; H2				
	<i>Azoarcus</i> sp.	93-98%	K1				
	<i>Cupriavidus basilensis</i>	90%	K1				
	<i>Lautropia mirabilis</i>	94%	H3				
	<i>Rhodocyclus</i> sp.	96%	K7				
<b>γ-Proteobacteria</b>	környezeti minta klón	96%	K7; H3				
	<i>Achromatium</i> sp.	92-97%	K1; K7				
	<i>Cellvibrio japonicus</i>	94%	K1				
	<i>Ectothiorhodospira</i> sp.	92%	K7				
	<i>Halomonas</i> sp.	96%	K1				
	<i>Halomonas glaciei</i>	94%	H2				
	<i>Halomonas muralis</i>	92%	K1				
	<i>Halomonas pantelleriensis</i>	94%	K1				
	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	K1				
	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	99%	K1				
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98-99%	K1; H2				
	<i>Pseudomonas fulgida</i>	99%	K1; H2				
	<i>Pseudomonas gessardii</i>	99%	K1; H2				
	<i>Pseudomonas reactans</i>	99%	K1				
	<i>Pseudomonas synxantha</i>	100%	K1				
	<i>Serratia marcescens</i>	99-100%	K1; H2				
<b>δ-Proteobacteria</b>	környezeti minta klón	94%	K7				
	<i>Desulfuromonas africanus</i>	92%	H2				
	<i>Desulfuromonas michiganensis</i>	91-92%	H2; H3				
	<i>Desulfuromonas palmitatis</i>	92%	K1				
	<i>Geobacter hydrogenophilus</i>	93-94%	H2				
	<i>Nannocystis exedens</i>	92%	K7				
	<i>Polyangium vitelinum</i>	89%	K1				
	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	93%	H2				
	környezeti minta klón	94%	K7				
<b>Firmicutes</b>				3 (5)	0 (0)	11 (14)	1 (2)
Bacilli	<i>Bacillus halodurans</i>	94%	H3				
Clostridia	<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i>	93%	H2				
	környezeti minta klón	91%	K1				
Actinobacteria	<i>Actinoplanes nipponensis</i>	88%	H2				
	<i>Actinoplanes ianthiogenes</i>	92%	H2				
	<i>Actinomadura spadix</i>	92%	H2				
	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	93%	H2				
	<i>Kocuria rhizophila</i>	92%	H2				
	<i>Nesterenkonia lutea</i>	93%	H2				
	környezeti minta klón	92-94%	K1; H2				
<b>Wall-less forms</b>				1 (2)	4 (7)	0 (0)	2 (4)
Planctomycetes	<i>Pirellula</i> sp.	90%	K7				
	környezeti minta klón	94-96%	K1; H3				
<b>Fibrobacter</b>				0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (10)
Acidobacteria	környezeti minta klón	90-97%	H3				
<b>Sphingobacteria</b>				8 (11)	2 (4)	6 (7)	2 (4)
Sphingobacteria	<i>Aequorivita antarctica</i>	92%	K1				
	<i>Aquiflexum balticum</i>	90%	H2				
	<i>Cytophaga</i> sp.	92%	K1				
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	90-94%	K7; H2				
	<i>Taxeobacter gelupurpurascens</i>	86%	H2				
	környezeti minta klón	88-91%	K7; H2; H3				
<b>Nitrospirae</b>				1 (2)	0 (0)	1 (1)	1 (2)
Nitrospirae	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	91-96%	K1; H2				
<b>Gemmatimonadetes</b>				1 (2)	2 (4)	29 (36)	9 (18)
Gemmatimonadetes	környezeti minta klón	88-94%	K1; K7; H2; H3				

3. táblázat

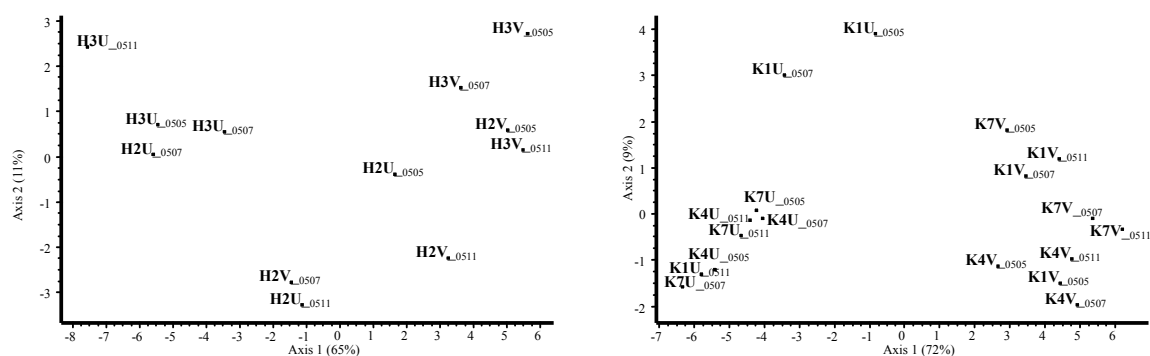
A tiszántúli üledékmintákban a Proteobacteria mellett a Gemmatimonadetes törzs képviselőinek domináns (18% illetve 36%) előfordulását mutattuk ki. Ezt a Gram-negatív baktériumokat magába foglaló újonnan leírt filogenetikai törzset ezidáig egyetlen tenyésztésbe vont faj képviseli. Környezeti szekvencia adatok alapján azonban nagyon elterjedt és meglepően széleskörű filogenetikai diverzitással rendelkezik. Gemmatimonadetes rokon szekvenciákat már korábban is azonosítottak szikes tavak, illetve talajok klónkönyvtáraiból, azonban az alföldi szikesekhez hasonló nagy arányban és filogenetikai diverzitásban (88-94 %) még sohasem. Csak a Nagy-vadasból azonosítottunk Xenobacteria, Thermomicrobia és Chlorobia, a Fehér-sziből Acidobacteria, míg a Böddi-székéből Cyanobacteria szekvenciákat. Az alföldi szikes tavak klónszekvenciáinak közel egyharmada olyan különféle környezeti mintákból származó klónszekvenciákkal mutatta a legnagyobb hasonlóságot, melyeknek filogenetikai helyzetét kitenyésztett fajok hiányában pontosan nem ismerjük (4. ábra). A klónkönyvtárak feldolgozása a tenyésztésen alapuló vizsgálatok eredményeivel a faji összetételben csak kismértékű átfedést eredményezett. Egyezést csak a kis G+C tartalmú Gram-pozitívok *Bacillus*, a nagy G+C tartalmú Gram-pozitívok *Kocuria* és *Nesterenkonia*, az  $\alpha$ -proteobaktériumok *Paracoccus* és a  $\gamma$ -proteobaktériumok *Halomonas* és *Pseudomonas* nemzetségei esetében találtunk, az azonosított fajok és azok aránya azonban jelentősen különbözött. A 3. táblázat adataiból kitűnik, hogy a klónszekvenciák a hozzájuk legközelebbi rokonságban álló ismert baktériumfajokkal a  $\gamma$ -Proteobacteria néhány jól tenyészthető képviselőjének a kivételével (*Pseudomonas* és *Serratia* fajok) általában csak rövid szekvencia szakaszokon és/vagy meglehetősen alacsony (86-96%-os) hasonlóságot mutattak. A klónszekvenciákkal legközelebbi rokon baktériumfajok között az általunk is tenyésztésbe vont és fenotípusosan jellemzett aerob kemoorganotróf heterotróf anyagcseréjű fajokon kívül más, specifikus metabolizmusú fajokkal rokon szekvenciákat is találtunk. Ezek a klónkönyvtárakból kimutatott és rendszerint nem, vagy csak rendkívül nehezen tenyészthető, pl. obligát anaerob, kemolitotróf és fototróf szervezetek feltehetően fontos szerepet töltenek be az alföldi szikes vizek lokális nitrogén, kén és foszfor forgalmában. A klónkönyvtárakból azonosított baktériumfajoknak egy részét eredetileg ugyancsak az alföldi szikesekhez hasonló alkalikus és/vagy sós tavi, illetve tengeri környezetekből izolálták.

Kutatási eredmények részletes bemutatása:

- Borsodi A., Vladár P., Rusznyák A., Szabó G., Sipos R., Márialigeti K. (2005): Tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai vizsgálatok a Kiskunsági NP szikes tavainak baktériumközösségein. Hidrológiai Közöny 85 (6): 23-25.
- Pollák B., Rusznyák A., Palatinszky M., Márialigeti K., Borsodi A. (2006) Tiszántúli szikes tavak baktériumközösségeinek összehasonlító vizsgálata. Hidrológiai Közöny 86 (6): 88-90.
- Borsodi A. K., Pollák B., Rusznyák A., Szabó G., Palatinszky M., Tóth E. M., Márialigeti K.: Bacterial species diversity in soda lakes of Kiskunság National Park (Hungary) compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. (poster, abstract) 11<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, Wien, Austria, 20-25 August 2006.
- Pollák B., Rusznyák A., Palatinszky M., Márialigeti K., Borsodi A.K. (2007) Comparative studies on bacterial communities from sediments of soda lakes located in the region of Tiszántúl, Hungary. (in preparation)

A mikróbaközösségek szerkezetében és aktivitásában megnyilvánuló szezonális változások nyomon követése céljából a közösséget alkotó mikroorganizmusok tenyésztése nélkül végeztünk összehasonlító vizsgálatokat ujjlenyomat módszerek alkalmazásával. Az anyagcsere ujjlenyomatok összehasonlításakor a mikróbaközösségek BIOLOG szénforrás hasznosító képességének statisztikai elemzése révén, a közösséget alkotó fajok meghatározása nélkül 2002-ben és 2003-ban a Velencei-tó egyes területeit, illetve 2003-ban és 2005-ben az alföldi szikes vízterek térbeni és időbeli változásait jellemeztük. A kiértékelések és statisztikai analízisek alapját az egyes mintavételi időpontokban és területeken vett hígított üledék és hígítatlan vízminták BIOLOG GN2 mikrotiter (MT) lemezekre inokulált, majd adott

inkubációs idő után OD<sub>590</sub>-nél leolvasott, az egyes szénforrások esetében a kontrollhoz (A1) viszonyított abszorpciós értékei képezték. A vizsgált paraméterek (az összaktivitási értékek, az átlagos színfejlődés mértéke) vonatkozásában a lokális különbségek mellett határozott szezonális mutatók mutatkoztak. Az üledékminták esetében az évszakos különbségek általában kifejezettebbek voltak, mint a vízmintákban, vagyis feltételezhető, hogy a metabolikusan aktív aerob kemoorganotróf sejtek aránya az üledék felső szintjében (pl. időszakos anaerobitás, oligotróf mikroökoszisztémák, stb. miatt) nagyobb mértékben ingadozik, mint a víztestben. A hasznosított szénforrások típusa alapján a baktériumközösségek általában erőteljes szénhidrát és biopolimer bontó aktivitással voltak jellemezhetőek. A közösségi szénforrás hasznosításon alapuló BIOLOG vizsgálatok eredményének értékelésekor azonban figyelembe kell vennünk, hogy a laboratóriumi körülmények között megfigyelt anyagcsere mintázatok alapján nem következtethetünk a valójában, in situ körülmények között megfigyelhető szénforrás hasznosításokra, de az anyagcsere-mintázatok vizsgálata alkalmas az egyes közösségek összehasonlítására és változásának nyomon követésére.



5. ábra

A főkomponens analízis eredményei alapján valamennyi mintavételi időpontban jelentősen eltért a víz és az üledék aerob kemoorganotróf mikroba közösségeinek fiziológiai profilja (5. ábra). Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a hazánkban elsőként alkalmazott BIOLOG rendszer elsősorban vízminták vizsgálata esetén alkalmas különböző élőhelyek mikroba közösségeire jellemző „anyagcsere ujjlenyomat” meghatározására és statisztikai elemzésére, az anyagcsere aktivitás változásainak időbeni nyomon követésére és az élőhely mikrobiális aktivitásában jelentkező térbeli eltérések feltérképezésére.

Kutatási eredmények részletes bemutatása:

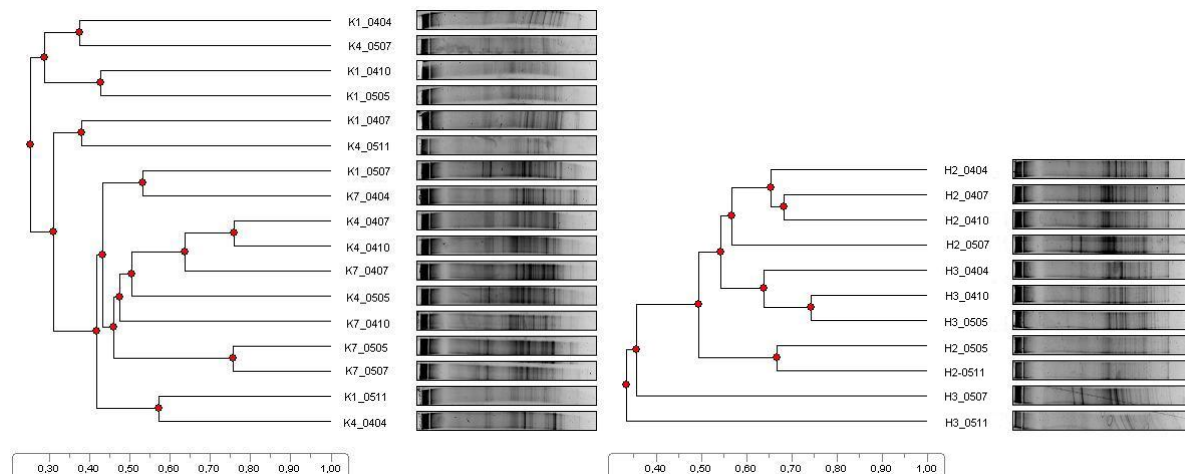
- Borsodi A. K., Vladár P., Cech G., Gedeon G., Beszteri B., Micsinai A., Reskóné N. M., Márialigeti K. (2003) Bacterial activities in the sediment of Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* 506-509:721-728 IMP: 0.720
- Borsodi A., Reskóné N. M., Gedeon G., Vladár P., Boros E., Márialigeti K. (2003) Szikes tavak baktériumközösségeinek szénforrás értékesítési vizsgálata BIOLOG rendszerrel. *Hidrológiai Közlemény* 83 (I-XII): 25-28.
- Borsodi A. K., Vladár P., Rusznyák A., Sipos R., Tóth E. M., Márialigeti K. (2004) Application of BIOLOG metabolic and DGGE genotypic fingerprint methods for studying sediment bacterial communities of Hungarian soda lakes. In: *Proceedings of the 9th Methodological workshop: Present methods for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates*. Chroňáková A., Krišťůfek V., Elhottová D., Malý S. (eds). Institute of Soil Biology AS CR, České Budějovice. (CD pp. 73-78)

Az egyes mintavételi helyek baktériumközösségeinek diverzitását, szezonális változását és az egyes fajok relatív abundanciáját egy molekuláris ujjlenyomat módszer, a Denaturáló Gradiens Gélelektroforézis (DGGE) segítségével is vizsgáltuk. Magyarországon ezt a módszert a jelen kutatási projekt keretében alkalmaztuk először mikrobiális ökológiai



vizsgálatokban, így a rutinszerű alkalmazást a kutatás első és második évében a módszer optimalizálása előzte meg.

Összehasonlító 16S rDNS alapú teljes közösségi molekuláris diverzitás vizsgálatokat végeztünk az alföldi szikes tavakból (K1, K4, K7, H2 és H3) szezonális gyakorisággal gyűjtött felszínközeli üledékmintákkal a 2003-as, 2004-es és 2005-ös években. Az üledékminták molekuláris diverzitás vizsgálata során a DGGE fotókat kezdetben vizuális, majd később számítógépes szoftveres kiértékeléssel elemeztük, az egyes sávok mintázatainak (a diszkrét csíkok számának, elhelyezkedésének és intenzitásának) statisztikai értékelésével (6. ábra).



6. ábra

A kiskunsági (K1, K4, K7) és tiszántúli (H2, H3) tavak üledékmintáinak diverzitás elemzése során megfigyelhető volt, hogy a gélben az egyes sávok (minták) fő csíkjainak elhelyezkedése megegyezett, vagyis az egyes tavak meglehetősen állandó és részben sajátos (pl. K1) baktériumközösségekkel rendelkeztek. Szezonálisan azonban az egyes sávok intenzitása jelentősen változott, ami arra utalt, hogy az évek során a baktériumközösségek elsősorban nem a faji struktúra, hanem a különböző taxonok populáció arányainak változtatásával alkalmazkodnak a szélsőségesen változó környezeti feltételekhez.

A tenyésztésen és a klónozáson alapuló vizsgálatok eredményeivel részben egyezően a DGGE mintázatokból is kimutattuk a  $\gamma$ -Proteobacteria (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Microbulbifer* sp. és *Thioalkalispira microaerophila*) és az Actinobacteria (*Nesterenkonia halobia*, *Rhodococcus ruber* és *Saccharomonospora viridis*) fajok jelenlétét. A minden mintában és mintavételi időpontban megjelenő domináns csíkok szekvenciái a KNP mintákban a *Spirochaeta alkalica*, a *Spirochaeta africana* és a *Spirochaeta americana* obligát anaerob, halo-alkalofil baktériumfajok, a tiszántúli tavak esetében a *Gemmatimonas* nemzetség szekvenciáival mutatták a legnagyobb egyezést. Az identifikált taxonok többsége csak nagyon kis mértékű hasonlóságot mutatott már ismert fajokkal, ami ugyancsak számos potenciálisan új faj jelenlétére utal hazai szikes vizeinkben.

Kutatási eredmények részletes bemutatása:

Borsodi A. K., Vladár P., Rusznyák A., Sipos R., Tóth E. M., Márialigeti K. (2004) Application of BIOLOG metabolic and DGGE genotypic fingerprint methods for studying sediment bacterial communities of Hungarian soda lakes. In: Proceedings of the 9th Methodological workshop: Present methods for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates. Chroňáková A., Krišťůfek V., Elhottová D., Malý S. (eds). Institute of Soil Biology AS CR, České Budějovice. (CD pp. 73-78)

Borsodi A., Vladár P., Rusznyák A., Szabó G., Sipos R., Márialigeti K. (2005): Tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai vizsgálatok a Kiskunsági NP szikes tavainak baktériumközösségein. Hidrológiai Közlemények 85 (6): 23-25.

Pollák B., Rusznyák A., Palatinszky M., Márialigeti K., Borsodi A. K.: Comparative studies on bacterial communities from sediments of soda lakes located in the region of Tiszántúl, Hungary. (oral presentation, abstract Acta Microbiol. Immun. Hung. 52:124) 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, 2005. X. 26-28.

Borsodi A. K., Szabó G., Pollák B., Tóth E. M., Rusznyák A., Révész S., Márialigeti K.: Bacterial diversity in a soda lake of Kiskunság National Park (Hungary) evaluated by cultivation based and cultivation independent methods. (poster, abstract) 2nd FEMS Congress, Madrid, Spain, 4-8 July 2006.

A szulfátredukáló baktériumok (SRB) szulfáttal, mint terminális elektronakceptorral légző anaerob kemoorganotróf baktériumok, a vízi környezetekben a szerves anyagok anaerob lebontásának fontos résztvevői. Különösen igaz ez a Velencei tóra, amelynek szulfáttartalma (2-8 mM) jóval meghaladja az édesvizekre általánosan jellemző értéket (0,1-0,3 mM), ezért 2004. júniusában innen kezdtük meg a nádasok rizoszféra környezetéhez kapcsolódó domináns SRB azonosítását tenyésztésen alapuló és attól független DNS alapú molekuláris biológiai módszerekkel. A rizoszféra minták legnagyobb, még pozitív MPN hígítási tagjaiból PMB táptalaj felületére szélesztettünk és 47 különálló telepeket izoláltunk. A törzseket 16S és *dsr* (a szulfátredukáló baktériumokra specifikus deszulfít-reduktáz gén) PCR-eket követően, a felszaporított DNS szakaszok restrikciós mintázata alapján csoportosítottuk, majd a szekvencia analízis eredményeképpen *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio alcoholivorans*, *Desulfovibrio fructosivorans*, *Desulfovibrio aerotolerans*, és *Desulfotomaculum halophilum* fajokként azonosítottuk.

A szulfátredukáló közösség vizsgálatát ugyanezen mintából klónozással is elvégeztük a disszimilatőrikus szulfít reduktáz enzim (szulfátlégzési kulcsenzim) funkcionális génjére (*dsrAB* gén) tervezett primer párok alkalmazásával. A klónkönyvtár 90 pozitív klónját RFLP analízissel csoportosítottuk, majd a csoportreprezentánsok *dsrAB* génszakaszait parciálisan szekvenáltuk. A legközelebbi rokon szekvenciák a *Desulfovibrio aminophilus*, a *Desulfovibrio fructosivorans*, a *Desulfovibrio burkinensis*, a *Desulfovibrio desulfuricans*, a *Desulfobulbus elongatus*, és a *Desulfobulbus propionicus* voltak, melyek többsége csak alacsony hasonlósági szinten egyezett meg már leírt és az adatbázisban is megtalálható SRB fajokkal. A kitenyésztett SRB nemzetségek (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*), valamint a reprezentáns klónjaink legközelebbi rokonsági körébe tartozó nemzetségek (*Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*) egyaránt a részleges oxidáló SRB körébe tartoznak, azaz a szerves elektrondonorokat csak acetátig képesek oxidálni. Specifikus szénforrás hasznosító képességük révén sikeresek lehetnek a nád rizoszférájában, ahol egyrészt a gyökér exudátum összetétele, másrészt a tömegesen jelen lévő fakultatív és obligát anaerob fermentálók fermentációs végtermékei biztosítják a hasznosítható szénforrás kínálatot.

Anaerob szulfát-redukáló baktériumközösségek (SRB) egészséges és degradálódó nádrizoszférákban kialakuló diverzitását a Velencei-tóból származó minták esetében a DGGE futási körülményeinek optimalizálását követően, specifikus primerpárok alkalmazásával is teszteltük. Az elvégzett vizsgálatok eredményei alapján nem lehetett egyértelműen különbséget tenni az egészséges és a pusztuló állományú nádrizoszféra minták SRB diverzitása között. Valamennyi, a gélből kivágott DNS szakasz szekvencia analízise egy ezidáig még nem tenyésztett, elsősorban különböző talajokból származó, a SRB között diszkrét filogenetikai ágat képviselő környezeti klón-szekvenciákkal mutatta a legnagyobb hasonlóságot.

Kutatási eredmények részletes bemutatása:

Vladár P., Vajna B., Borsodi A. K., Márialigeti K. (2004) Genus level DGGE analysis for species of Desulfovibrionaceae derived from reed rhizosphere samples of a Hungarian soda lake. In: Proceedings of the 9th Methodological workshop: Present methods for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates. Chroňáková A., Křišťůfek V., Elhottová D., Malý S. (eds). Institute of Soil Biology AS CR, České Budějovice. (CD pp. 97-101)

Vladár, P., Rusznyák, A., Márialigeti, K., Borsodi, A. K. (2007): Diversity of sulphate-reducing bacteria inhabiting reed (*Phragmites australis*) rhizosphere in Lake Velencei (Hungary) revealed by a combined cultivation-based and molecular approach. *Environ. Microbiol.* (in-press) IMP.:4.559

Egy korábbi OTKA pályázat (T032444) kutatásait lezárandó és kiegészítendő összehasonlító vizsgálatokat folytattunk a velencei-tavi egészséges és pusztuló állományú nádasok rizoszférájában élő baktériumközösségek összetételével, szezonális változásával kapcsolatban. Megállapítottuk, hogy az egészséges és a pusztuló állományok tenyészthető aerob baktériumközösségeinek összetételében határozott különbség figyelhető meg. Bár kifejezetten kórokozó szervezeteket nem azonosítottunk, a pusztuló rizómákon inkább a vizekre és üledékekre jellemző, szaprotróf fajok domináns előfordulása volt jellemző. Az egészséges rizómákról többségében növény-asszociált baktériumokat, ismert növényi-növekedést serkentő fajok jelenlétét mutattuk ki.

2004. áprilisában biofilm mintákat gyűjtöttünk a nádszárak tartósan víz alá merülő részéről a Kelemen-szék (KNP) és a Nagy-Vadas-tó (HNP) területén. A mintákból többféle táptalajra szélesztettünk, majd összesen 260 törzset izoláltunk random módon. A hagyományos vizsgálatokba vont 164 baktériumtörzset fenotípusos tulajdonságaik alapján numerikus analízissel csoportosítottuk. A 16S rDNS szekvencia analízissel faji azonosításra kerülő csoportrepresentáns törzseket ARDRA mintázatuk összehasonlítását követően választottuk ki. A tenyésztésen alapuló vizsgálatok eredményeképpen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Halomonas*, *Nesterenkonia*, *Paracoccus* és *Planococcus* nemzetségbe tartozó baktériumokat határoztunk meg. A baktériumközösségek faji diverzitásának további elemzésére a mintákból tenyésztés nélkül közösségi DNS-t izoláltunk és 16S rDNS alapú klónkönyvtárat hoztunk létre. A 140 klónt ARDRA elemzésüket követően 45 csoportba soroltuk. A csoportrepresentáns klónok többsége ezidáig még tenyésztésbe nem vont baktérium klónokkal mutatott 93 és 99% közötti hasonlóságot. A többi klón a *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas* és *Agrobacterium* nemzetségek jelenlétére utalt. Mintáink vizsgálatának eredményei a nád víz alatti részén található biofilm baktériumközösségek nagyfokú filogenetikai és metabolikus diverzitására engednek következtetni. A tenyésztésen és a tenyésztéstől független módszeren alapuló faji szintű identifikáció igazolta, hogy a biofilmben élő baktériumok feltehetően anyagcsere sokféleségük révén segítik a közösség egészének alkalmazkodását a gyorsan változó környezeti feltételekhez.

Kutatási eredmények részletes bemutatása:

- Micsinai A., Borsodi A. K., Csengeri V., Horváth A., Oravecz O., Nikolauz M., Reskóné N. M., Márialigeti K. (2003) Rhizome-associated bacterial communities of healthy and declining reed stands in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* 506-509:707-713 IMP: 0.720
- Rusznyák A., Borsodi A., Márialigeti K. (2006) Diverzitás vizsgálatok kiskunsági és hortobágyi szikes vizek nádasainak baktériumközösségein. *Hidrológiai Közöny* 86 (6): 98-101.
- Borsodi A. K., Rusznyák A., Molnár P., Vladár P., Reskóné N. M., Tóth E. M., Sipos R., Márialigeti K. (2007) Metabolic activity and phylogenetic diversity of reed (*Phragmites australis*) periphyton bacterial communities in a Hungarian shallow soda lake. *Microbial Ecology* (accepted) IMP.:2.674

Az OTKA pályázat öt éves futamideje alatt a kutatási megbízási szerződésben vállalt feladatainknak eleget tettünk:

- Tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai diverzitás elemző módszerek együttes alkalmazásával betekintést nyertünk a szikes (extrém) élőhelyekhez adaptálódott autochton alkalofil és halofil mikrobaközösségek szerkezetébe.

- A 16S rRNS és a dsrAB funkcionális gén egyidejű vizsgálatán alapuló kombinált eljárással feltártuk a szikes vizek nádasainak rizoszférájában élő anaerob szulfátredukáló baktériumközösségek eddig még ismeretlen faji struktúráját.

- Új mikrobiológiai módszerek (a BIOLOG közösségi szénforrás értékesítés vizsgálata és statisztikai elemzése, valamint a Denaturáló Gradiens Gél Elektroforézis) hazai bevezetésével és alkalmazásával összehasonlítottuk a különböző szikes vizek mikrobaközösségeinek szerkezetében és aktivitásában megnyilvánuló változásokat, következtetéseket vontunk le a mikrobaközösségek anyagforgalmi dinamikájára vonatkozóan.

- A tavi környezetek kémiai sajátosságainak figyelembevételével kifejlesztett szelektív táptalajokon a tudományra nézve több új extremofil baktérium taxon tenyésztésbe vonására és leírására került sor.

- Kutatásaink eredményeinek megkezdődtek a biotechnológiai gyakorlatban történő alkalmazásai: az általunk izolált alkalofíl baktériumtörzsekkel kísérletek folynak (Czéh és mtsai, 2005; 2006) erőművi pernye komposztálósos ártalmatlanítására.

A kutatás során a résztvevők összetételében a szerződésben megjelölt személyekhez képest nem következett be változás, a vállalt költségtervtől nem történtek jelentős pénzügyi eltérések.

Budapest, 2007. február 22.