

„TISZTA VIZET A POHÁRBA”
VÍZMINŐSÉG JAVÍTÁSÁT CÉLZÓ
VÍZMIKROBIOLÓGIAI ÉS VÍZKÉMIAI VIZSGÁLATOK
EGY VÁROSI IVÓVÍZHÁLÓZATON

Bálint Boglárka
biológus hallgató

Témavezető: Palatinszky Márton
tudományos segédmunkatárs

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológiai Intézet, Mikrobiológiai Tanszék
2010.

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS	2
II. CÉLKITŰZÉSEK	4
III. ANYAG ÉS MÓDSZER	5
<i>III.1. Mintavétel</i>	5
<i>III.2. A vízminták kémiai és fizikai paramétereinek meghatározása</i>	5
<i>III. 3. Sejtszám meghatározása epifluoreszcens mikroszkóppal DAPI festés mellett</i>	5
<i>III. 4. Polimeráz láncreakció (PCR)</i>	6
<i>III.4.1. A T-RFLP során alkalmazott, 16S rDNS specifikus Hot Start PCR</i>	6
<i>III.4.2. Klónkönyvtár és az ARDRA elemzés során alkalmazott PCR</i>	7
<i>III.5. Terminális restrikciós fragment-hossz polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálat</i>	7
<i>III.6. Klónkönyvtár készítés és amplifikált riboszomális DNS restrikciós analízis (ARDRA)</i>	9
<i>III. 7. Bázissorrend elemzés</i>	10
IV. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	11
<i>IV.1. Az egyes mintavételi pontok fizikai és kémiai paramétereinek meghatározása</i>	11
<i>IV.2. Sejtszámlálás epifluoreszcens mikroszkóppal, DAPI festés mellett</i>	13
<i>IV.3. T-RFLP ujjlenyomat vizsgálat eredményei</i>	14
<i>IV.4. Kompozit klónkönyvtár elemzés eredménye</i>	17
<i>IV.5. A T-RFLP vizsgálat összevetése a kompozit klónkönyvtár eredményeivel</i>	21
V. ÖSSZEFOGLALÁS, TOVÁBBLÉPÉSI LEHETŐSÉGEK	23
VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	24
VII. IRODALOMJEGYZÉK	25

I. BEVEZETÉS

A tiszta ivóvíz nélkülözhetetlen része mindennapos életünknek. Megfelelő minőségét szigorú magyar és európai uniós jogszabályok biztosítják, ellenőrzését pedig illetékes hatóságok kötelező rendszerességgel elvégzik. Magyarországon az ivóvíz minőségével illetve annak ellenőrzésével szemben támasztott követelményeket a 201/2001 (X.25) Kormányrendelet részletezi.

A vízminősítés során alkalmazott biológiai vizsgálatok azonban döntően a humán kórokozók kimutatására irányulnak, közegészségügyi szempontokat vesznek figyelembe, így általuk nem kaphatunk képet az ivóvíz baktériumközösségének összetételéről. További hátrányuk, hogy a szabványoknak megfelelő módszerek tenyésztésen alapuló kimutatásokat foglalnak magukba, melyek nagyfokú szelektivitása bizonyított. A ma ismert baktériumoknak kevesebb, mint 1%-át tudtuk eddig tenyésztésbe vonni, több olyan baktériumdivízió is létezik, amelyik egyáltalán nem tartalmaz tenyészhető fajokat (Hugenholtz P. et al. 1998; Dunbar J. et al. 1999).

A tenyésztésbe eddig nem vont fajok nagy száma a közösség szerkezeti vizsgálatok esetében szükségessé teszi a tenyésztéstől független, molekuláris alapú módszerek alkalmazását.

A terminális restrikciós fragment-hossz polimorfizmus (T-RFLP) egyike azon polimeráz láncreakción (PCR) alapú módszereknek, melyekkel közösségi ujjlenyomat vizsgálható. A T-RFLP eljárás során a közösségi DNS mintát olyan primerpár segítségével szaporítjuk fel, melynek egyike fluoreszcensen jelölve van. Az így kapott terméket restrikciós endonukleázzal emésztjük. A közösség egyes tagjaiból származó, eltérő szekvenciájú PCR termékekből az enzimatis hasítás révén különböző méretű, fluoreszcensen jelölt terminális DNS fragmentekhez jutunk, melyeket nagy felbontású kapilláris gélelektroforézis segítségével elválasztunk és lézergörnyítéssel detektálunk (Trotha R. et al. 2002).

A terminális fragmentek vándorlási sebessége a gél elektromos erőterében hosszuk függvényében eltérő, a méret növekedésével arányosan csökken a vándorlási sebesség. Az eljárás eredményeképp egy elektroferogramot kapunk, melynek X tengelyén a fragmenthossz, Y tengelyén pedig a fluoreszcens jel intenzitása szerepel. Az elektroferogramon megjelenő csúcsok görbe alatti területe arányos a hozzájuk tartozó szervezet közösségben képviselt relatív gyakoriságával, ami alkalmassá teszi ezt az eljárást szemikvantitatív diverzitáselemzésre, különböző közösségi minták elektroferogramjainak összehasonlításával

pedig vizsgálható a közösségek közötti hasonlóság mértéke (Liu W. et al. 1997; Wang M. et al. 2004).

A T-RFLP jó felbontóképességével és gyorsaságával szemben azzal a hátránnyal rendelkezik, hogy a vizsgálat után a DNS minta nem nyerhető vissza, így a fajok utólagos rendszertani beazonosítására nem használható.

Egy közösség tagjainak faji azonosítására leggyakrabban alkalmazott módszer a polimeráz láncreakción és molekuláris klónozáson alapuló klónkönyvtár analízis.

Ennek során a közösségi DNS izolátumokból először 16S rRNS génszakaszokat szaporítjuk fel PCR segítségével. Ezt követően az egyes amplikonokat vektorokba ligáljuk, a vektorokkal pedig kompetens sejteket transzformálunk. A kompetens sejteket differenciáló táptalajon felnevesztve szelektálni tudunk azokra a klónokra, melyek tartalmazzák a ligált inzertet. Az ily módon elkészített klónkönyvtár tagjai a közösségi PCR termék egy-egy DNS molekulájának kópiáját hordozzák. A beépített génszakaszokat visszanyerve bázissorrend elemzés végezhető és adatbázisok segítségével azonosítani lehet a közösség képviselőit. Ezt a módszert sikerrel alkalmazták ivóvizek baktériumközösségeinek leírására (Keinänen-Toivola M. et al. 2006; Williams M. et al. 2004; Revetta R. et al. 2007).

Szeged városának ivóvizét régóta érintő probléma az átlagosnál kisebb stabilitás. A csapból vett vízmintákban 3-5 nap állás után „biológiai uszadék” képződése tapasztalható. A probléma megoldásának érdekében és az egyéb tekintetben is kifogástalan vízminőség eléréséért a Szegedi Vízmű Zrt.-nél széleskörű vízminőség javító beruházások folynak, melyek keretén belül mikrobiológiai vizsgálatokat végeztünk.

A Szegedi Vízmű Zrt. átlagosan napi 35-40 000 m³ ivóvizet termel, melyet 7 vízműtelepen eloszló, 180-560 m mélyen lévő, védett vízadó rétegre telepített mélyfúrású kútjaiból nyer és a mintegy 650 km-nyi vízhálózat segítségével juttatja el a felhasználókig.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaink során a szegedi ivóvíz csökkent stabilitásának hátterében rejlő okokra kerestük a választ.

Mivel a jelenség hátterében olyan mikrobiológiai folyamatok szerepét véltük meghatározónak, amelyeket a konvencionális vízmikrobiológiai vizsgálatokkal nem kimutatható szervezetek okoznak, ezért vizsgálatainkat molekuláris módszerekre alapozva végeztük, amelyek kiegészítéseként vízkémiai elemzéseket alkalmaztunk.

Célunk volt (1) a Szegedi Vízmű Zrt. IV-es kútcsoporti kútjainak és a hozzájuk köthető hálózat vízében jelen levő mikrobaközösségek összehasonlító elemzése; (2) a közösségalkotó baktériumok rendszertani beazonosítása; (3) a kútvíz, a kezelőművi és hálózati víz baktériumszámának becslése, összehasonlítása és (4) a releváns vízkémiai paraméterek meghatározása.

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

III.1. Mintavétel

Két alkalommal (2009.XI.13. és 2009.XI.30) vettünk mintát a Szegedi Vízmű ZRt. IV-es számú kútcsoportjának kútjaiból, a kezelőmű meghatározott pontjairól, illetve 1-6-os számú hálózati mintavevő pontjairól.

A vízmintavételek a rendszeresített mintavételi csapokon történtek a csapok legalább 3 percig történő folytatása után. Aszeptikus vízmintát vettünk 2 liter térfogatban steril üvegedényekbe mikrobiológiai elemzésekre és 2x100 ml-t kémiai vizsgálatok céljából. 100 ml vízminta szulfidtartalmát a mintavétel során helyben tartósítottuk 1,5 ml 10%-os Cd-acetát és 1,5 ml 40%-os Na-hidroxid hozzáadásával.

A hálózati víz metántartalmának meghatározására egy hálózati mintavételi csapról vettünk mintát egy alkalommal. A mintavétel során a csapot 3 percig folyattuk, majd a vizet szilikoncsővel egy 100 ml-es mintavevő üvegbe vezettük, amely víz alatt, szájjal lefelé fordítva volt. A mintát víz alatt, buborékmentesen lezártuk, teflon szeptumos kupakkal. A mintát hűtve szállítottuk a laboratóriumba, és 2 napon belül feldolgoztuk.

III.2. A vízminták kémiai és fizikai paramétereinek meghatározása

A vízminták hőmérsékletének és oldott oxigén tartalmának meghatározását a mintavétel során HACH HQ20 típusú oldott oxigén/hőmérséklet szondával végeztük.

A szabványos vízkémiai elemzéseket az Országos Környezetegészségügyi Intézet végezte el a Magyarországon érvényes környezetegészségügyi előírásoknak megfelelő szabványok szerint. A metántartalom, kénhidrogén és szulfidtartalom meghatározását az ELTE Kémia Intézetének Környezetkémiai és Bioanalitikai Laboratóriuma végezte.

III.3. Sejtszám meghatározása epifluoreszcens mikroszkóppal DAPI festés mellett

Mintánként 200 ml vizet fixáltunk 66 ml 8%-os paraformaldehid oldattal. A teljes mennyiséget leszűrtük (0,2 μ m GTTP membrán filter, Millipore), majd a filterből száradás után egy-egy darabot kivágtuk és 30 μ l DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festéket (1 μ g/ml) rámérve sötétben, szobahőmérsékleten 3 percig inkubáltuk. A filter darabokat 80%-os etanollal, majd desztillált vízzel mostuk, végül pedig sötétben, levegőn szárítottuk, s a további feldolgozásig -20°C-on tároltuk.

A sejtszámlálást Nikon80i epifluoreszcens mikroszkóp segítségével, ImageProPlus programcsomag felhasználásával végeztük. Az egyes minták átlagos sejtszámának

meghatározása a látótér méretének, a szűrőpapír felületének és az átszűrt vízmennyiségnek a figyelembe vételével történt.

III.4. Polimeráz láncreakció (PCR)

A kutatás folyamán több módszer alkalmazásánál is szükség volt DNS amplifikációra. A polimeráz láncreakciókhoz használt primereket az 1. táblázat tartalmazza. A reakcióelegyek összetételeit és hőprofiljait a 2.-5. táblázatok részletezik.

Primer neve	Szekvencia
27F	5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'
1387R	5' GGG CGG WGT GTA CAA GGC 3'
HEX-27F	5'(HEX)AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'
519R	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'
M13 spec. F	5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'
M13 spec. R	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

W = A vagy T

M = A vagy C

1. táblázat. A PCR reakciókhoz használt primerek

III.4.1. A T-RFLP során alkalmazott, 16S rDNS specifikus Hot Start PCR

Összetevők	Mennyiség 50 μ l végtérfogatra	Szakasz	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)
LC Taq polimeráz (Fermentas)	2 μ l	Kezdeti denaturáció	98	5:00
10x-es PCR puffer (Fermentas): 750mM Tris-HCl, 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1% Tween20	5 μ l	Taq bemérése	84	0:10
MgCl ₂ (Fermentas): 25 mM	4 μ l	Denaturáció	94	0:30
Reverz primer	0,5 μ l	Anneláció	52	0:30
Forward primer	0,5 μ l	Extenzió	72	0:45
dNTP (Fermentas)	10 μ l	Végső extenzió	72	10:00
DEPC víz	26,5 μ l	Hűtés	4	∞
Templát	0,5 μ l			
BSA (bovine serum albumin) (Fermentas): 20 mg/ml BSA, 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 50% (v/v) glycerol	1 μ l			

} 30 ciklus

3. táblázat: A Hot Start PCR reakció hőprofilja

2. táblázat. A Hot Start PCR reakcióelegy összetétele

III.4.2. Klónkönyvtár és az ARDRA elemzés során alkalmazott PCR

Összetevők	Mennyiség 50 µl végtérfogatra
LC Taq polimeráz (Fermentas)	1 µl
10x-es PCR puffer (Fermentas): 750mM Tris-HCl, 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1% Tween20	5 µl
MgCl ₂ (Fermentas): 25 mM	4 µl
Reverz primer	0,5 µl
Forward primer	0,5 µl
dNTP (Fermentas)	10 µl
DEPC víz	28,5 µl
Templát	0,5 µl

4. táblázat. A PCR reakcióelegy összetétele

Szakasz	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)
Kezdeti denaturáció	95	3:00
Denaturáció	94	0:30
Anneláció	52	0:30
Extenzió	72	1:00
Végző extenzió	72	10:00
Hűtés	4	∞

} 32 ciklus

5. táblázat. A PCR reakció hőprofilja

Minden amplifikációt Applied Biosystems 2720 Thermal cycler PCR készülékekben végeztünk. A reakciók sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztük. A PCR termékeket etídium-bromidot tartalmazó 1%-os agaróz gélben futattuk meg és UV fényvel detektáltuk.

III.5. Terminális restrikciós fragment-hossz polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálat

A T-RFLP vizsgálatokhoz a vízminták 1,8 liternyi mennyiségét steril, 0,45 µm pórusméretű, cellulóz nitrát membránszűrőn (Sartorius AG, Göttingen, Germany) szűrtük át. A szűrést követően a filterről Ultraclean™ Soil DNA Kit (MoBio Laboratories Inc. USA) használatával DNS-t izoláltunk. A DNS izolátumokból közösségi mintázatelemzés céljából a 16S rRNS génszakaszokat szaporítottuk fel 5' végen HEX (5'-Hexachloro-Fluorescein-CE Phosphoramidite) fluoreszcens festékkel jelölt 27F és jelöletlen 519R primerek segítségével, a III.4.1. pontban leírtaknak megfelelő módon.

A felszaporított DNS termékeket gyakran hasító restrikciós endonukleázok segítségével emésztettük. A hasítást párhuzamosan két enzimmel is elvégeztük. Az inkubáció 37 °C-os vízfürdőben, egy éjszakán át történt. A felhasznált restrikciós endonukleázokat, hasítóhelyüket és puffereiket a 6. táblázat, a hasítási reakcióelegy összetételét a 7. táblázat tartalmazza.

Enzim (Fermentas)	Hasítóhely	Puffer (Fermentas)
MspI	5' C/CGG 3' 3' GGC/C 5'	10x Puffer Tango
BsuRI	5' GG/CC 3' 3' CC/GG 5'	10x Puffer R

6. táblázat. A felhasznált hasítóenzimek, hasítóhelyük és puffereik

Összetevők	Mennyiség 20µl végtérfogatban
Enzim	0,3µl
Puffer	2µl
DEPC víz	7,7µl
Templát	10µl

7. táblázat. A hasítási reakció összetétele

A kapott hasítási termékeket a különböző só- és fehérje-szennyeződésektől etanolos precipitáció segítségével tisztítottuk meg: Az enzímreakció termékeit 3µl 3 M Na-acetát, 62,5µl 95%-os etanol és 14,5µl DEPC víz elegyében mértük. A reakcióelegyet keverés után 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a mintákat 20 percig 18000g-n centrifugáltuk 4°C-on Hermle Z233 MK-2 centrifuga segítségével, majd a csapadékról a felülúszót leöntöttük. A pelletehez 250 µl 70%-os etanolt mértünk, összekevertük és 10 percig 18000g-n és 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót ismét leöntöttük. A mintákról az etanol teljes eltávolításához Jouan RC 10.09 vákuumcentrifugát használtunk. A szárítás után a mintákat 20 µl DEPC kezelt, HPLC tisztaságú vízben vettük fel.

Az etanolos precipitációval megtisztított hasítási fragmenteket kapilláris gélelektroforézissel választottuk szét, GeneScanTM-500 TamraTM Standard belső standard segítségével. A mintákat előzetesen formamidban vettük fel. A megfelelő elválasztás biztosítása érdekében a hasítási termékeket 5 percig 98°C-on denaturáltuk, majd 2 percre 4 °C-ra helyeztük.

A kapilláris elektroforézist ABI Prism 310 automata szekvenátoron (Applied Biosystems) GeneSan üzemmódban végeztük POP-4 polimeren (Applied Biosystems) a gyártó által meghatározott futási paraméterekkel. A kapott elektroferogramokat GeneScan szoftver segítségével elemeztük. Az elektroforézishez használt futtatási elegy összetételét a 8. táblázat tartalmazza.

Összetevők	Mennyiség
Belső hossz standard	0,4 µl
Formamid	12,0 µl
Templát	0,5-8 µl

8. táblázat: A futtatási elegy összetétele

A DNS templát mennyiségét és koncentrációját annak megfelelően változtattuk, hogy az elektroferogramon megjelenő csúcsok magassága 800-5000 IFU (fluoreszcens intenzitás egység) közé essen. Ez ugyanis az a fluoescens intenzitási tartomány, amely a műszer által még biztonságosan detektálható, így egyszerű és kvantitatív kiértékelést tesz lehetővé.

Az egyes minták T-RFLP analízissel kapott profilját T-Align internetes program (Smith et al. 2005) felhasználásával vetettük egybe 0,5-ös konfidencia intervallum mellett, majd ez alapján PAST v.1.95 program segítségével, Bray-Curtis csoportelemző algoritmussal hasonlósági fát szerkesztettünk.

III.6. Klónkönyvtár készítés és amplifikált riboszomális DNS restrikciós analízis (ARDRA)

A klónkönyvtár készítéséhez 16S rRNS génre specifikus polimeráz láncreakciót végeztünk 27F és 1387R primerekkel a III.4.2. pontban leírtaknak megfelelően. A termékek ligálását, a transzformálást és az inzertet tartalmazó klónok szelektálását a pGEM[®]-T Vektor System (Promega) segítségével végeztük.

Az ARDRA elemzéshez az inzertet tartalmazó klónok telepeiből DNS-t izoláltunk, amihez a telepeket steril fogpiszkáló segítségével átfedtük 96 lyukú PCR mikrotiter lemezre, majd 50µl HPLC tisztaságú vizet adtunk hozzá. Vortex segítségével összekevertük és lecentrifugáltuk (1000g, 0:30 perc). A sejteket 98°C-on 5 percig denaturáltuk, majd a sejttörmelékcentrifugálással (4000g, 3 perc) különítettük el a DNS-t tartalmazó felülúszótól.

Nested PCR segítségével az izolált DNS-ből felszaporítottuk a hasítani kívánt 16S rRNS génszakaszt. A reakciót a IV.4.2. pontban leírtakkal megegyező módon végeztük. Az első PCR-hez M13 specifikus forward és reverz, a másodikhoz pedig 27F és 1387R primereket használtunk.

A nested PCR második lépése során kapott terméket BsuRI és MspI restrikciós endonukleázokkal emésztettük a III.5. pontban leírtaknak megfelelően. A hasítási fragmenteket gélelektroforézis segítségével választottuk szét 2%-os, etídium-bromidos agaróz gélen. A fragmentek szétválását UV fényvel való átvilágítással detektáltuk. A kapott mintázatok alapján az egyes klónokat (azonos hasítási mintázatot mutató) csoportokba soroltuk.

III. 7. Bázissorrend elemzés

A nested PCR során kapott terméket Viogene® PCR Advanced™ PCR Clean Up kit segítségével megtisztítottuk a további munkálatokat zavaró fehérje- és só-szennyezésektől, valamint a primerek dimereitől.

A tisztított DNS-re az ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) felhasználásával szekvenáló reakciót állítottunk össze. A reakcióelegy összetételét és a reakció hőprofilját a 9-10. táblázatban mutatjuk be. A reakcióhoz Biometra T-Personal típusú PCR készüléket használtunk.

Összetevők	Mennyiség 10 µl végtérfogatra
Big Dye Terminator	1 µ
Puffer	1,5 µl
27 F	0,5 µl
DEPC víz	5 µl
Templát	2 µl

9. táblázat: A szekvenáló elegy összetétele

Szakasz	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)
Denaturáció	96	0:10
Anneláció	50	0:05
Extenzió	60	4:00
Hűtés	4	∞

} 28 ciklus

10. táblázat: A szekvenáló reakció hőprofilja

A szekvenáló reakció termékeit a különböző só- és fehérje-szennyeződésektől etanol precipitáció segítségével tisztítottuk meg a III.5. pontban leírtakkal megegyezően. A tisztított termékeket szárított formában, -20°C-on tároltuk a kapilláris gélelektroforézisig.

A bázissorrend meghatározására alkalmazott kapilláris elektroforézist a gödöllői Biomi Kft. végezte.

Az adatok kiértékelését MEGA4 (Tamura et al., 2007) program segítségével végeztük, majd a 16S rDNS szekvenciákat egybevetettük a rendszertani besorolásra leginkább alkalmas, publikus 16S rDNS adatbázissal (ARB), illetve a jelenleg ismert bakteriális típus törzsek 16S rDNS szekvenciáit tartalmazó adatbázissal (EZTAXON).

A klónok és a hozzájuk leginkább hasonló bázissorrendű, az ARB adatbázisban közölt 16S rDNS szekvenciákat azok rendszertani besorolásával együtt egy hasonlósági fán ábráztuk, melynek során „ClustalW” szekvenciaillesztési algoritmust, „Maximum composite likelihood” nukleotid szubsztitúciós modellt, és „Neighbour Joining” faszerkesztési eljárást alkalmaztunk.

IV. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

IV.1. Az egyes mintavételi pontok fizikai és kémiai paramétereinek meghatározása

Az ivóvíz baktériumközösségének kialakításában döntő szerepet játszanak a környezet fizikai és kémiai tényezői, ezért meghatároztuk a vízminták releváns fizikai és kémiai paramétereit. A kapott eredményeket a 11. és 12. táblázatok részletezik.

Mintavételi pont	Hőmérséklet (°C)	Oldott oxigén (mg/l)	Szulfidion (mg/l)	
	Nov. 30		Nov. 13.	Nov. 30
IV-02-01 kút	34,20	0,07	2,0	<0,1
IV-02-02 kút	31,40	0,10	–	<0,1
IV-02-03 kút	29,30	0,10	–	0,1
IV-04-01 kút	31,20	0,06	<0,1	0,1
IV-04-02 kút	27,50	0,06	<0,1	1,0
IV-04-03 kút	26,50	0,10	0,6	0,9
IV-05-01 kút	32,50	0,15	0,7	<0,1
IV-05-03 kút	30,00	0,10	<0,1	<0,1
IV-05-04 kút	26,80	0,08	1,0	0,1
IV-5A-01 kút	19,00	0,04	<0,1	<0,1
IV-5A-02 kút	21,20	0,02	<0,1	0,1
IV-5A-03 kút	20,70	0,04	0,6	<0,1
IV-06-01 kút	25,90	0,04	<0,1	N/A
IV-06-02 kút	23,20	0,06	<0,1	<0,1
IV-06-03 kút	26,70	0,06	1,2	<0,1
Bejövő (belső kutak)	28,10	0,06	–	<0,1
Bejövő (2-es, 4-es kúts.)	28,80	0,15	–	1,2
Klórozás utáni	27,20	0,09	0,5	<0,1
Tárolt víz	23,50	0,12	<0,1	<0,1
IV Hálózati betáp	27,00	0,09	<0,1	1,4
HÁL-1	20,30	0,08	<0,1	N/A
HÁL-2	24,10	0,08	<0,1	0,5
HÁL-3	16,60	0,12	<0,1	<0,1
HÁL-4	10,50	0,13	<0,1	<0,1
HÁL-5	18,20	0,05	<0,1	3,1
HÁL-6	23,30	0,07	0,1	<0,1

11. táblázat. A mintavételi pontok hőmérsékleti, oldott oxigén és szulfidion koncentráció adatai.
„N/A”: nincs mérhető adat, ill. nem értelmezhető; „–” nem történt mintavétel

Áttekintve az eredményeket szembevetve, hogy a víz magas hőmérsékletű és anaerob. Az oldott oxigén mennyisége a minták nagyobbik részében még a 0,1 mg/l értéket sem éri el. Ez a tény önmagában hozzájárul a víz hálózaton belüli stabilitásához, míg a gyakran perlátorral ellátott csapokon nyert víz tárolva aerálódik, és a vízben lévő elektrondonorokra alapozva gyors mikrobaszaporodás valósulhat meg.

A potenciális elektron donorok felmérésének céljából meghatároztuk a minták szulfidtartalmát. A kapott alacsony koncentrációértékek alapján a szulfidiont nem tekinthetjük számottevő mértékben elektrondonornak.

MINTA	KOIps mg/l		Klorid mg/l		Nitrát mg/l		Nitrit mg/l		Ammónium mg/l		Keménység mg/l CaO		Vas µg/l		Mangán µg/l		Szulfát mg/l		Vezetőképesség µS/cm 20°C	
	Nov. 13.	Nov. 30.	Nov. 13.	Nov. 30.	Nov. 13.	Nov. 30.	Nov. 13.	Nov. 30.	Nov. 13.	Nov. 30.	Nov. 13.	Nov. 30.	Nov. 13.	Nov. 30.	Nov. 13.	Nov. 30.	Nov. 13.	Nov. 30.	Nov. 13.	Nov. 30.
IV-02-01 kút	2	2,20	7	2	<0,5	1,9	<0,01	<0,01	1,09	1,09	20	47	71	55	54	66	19	<10	702	656
IV-02-02 kút	–	1,10	–	<2	–	0,7	–	<0,01	–	1,06	–	100	–	130	–	92	–	<10	–	479
IV-02-03 kút	–	1,15	–	<2	–	1,3	–	<0,01	–	1,03	–	100	–	110	–	81	–	<10	–	469
IV-04-01 kút	1,1	1,25	4	<2	0,6	0,6	<0,01	<0,01	1,28	1,23	54	62	96	117	53	90	<10	<10	513	513
IV-04-02 kút	1,5	1,05	4	<2	<0,5	1,1	<0,01	<0,01	1,27	0,95	92	104	151	212	39	88	<10	<10	474	477
IV-04-03 kút	0,85	1,15	3	2	<0,5	0,5	<0,01	<0,01	1,02	0,96	118	122	95	140	54	92	<10	<10	458	459
IV-05-01 kút	1,2	1,20	4	<2	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	1,31	1,23	52	60	50	70	51	73	<10	<10	516	515
IV-05-03 kút	1,1	1,00	3	<2	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	1,20	1,13	90	109	135	147	41	79	<10	<10	481	482
IV-05-04 kút	1,05	1,20	4	<2	<0,5	0,6	<0,01	<0,01	1,03	0,97	126	118	93	143	54	91	<10	<10	457	459
IV-06-01 kút	1,15	1,30	3	<2	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	1,01	0,93	112	116	93	150	51	96	<10	<10	470	469
IV-06-02 kút	1,45	1,15	4	2	<0,5	0,5	<0,01	<0,01	1,06	0,94	104	120	82	172	49	95	<10	<10	471	471
IV-06-03 kút	1,2	1,25	3	2	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	1,03	0,94	114	120	94	133	60	93	<10	<10	468	470
IV-5A-01 kút	1,05	1,30	4	<2	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	1,09	0,91	128	136	173	287	48	99	<10	<10	450	452
IV-5A-02 kút	1,15	1,20	3	<2	<0,5	0,5	<0,01	<0,01	0,96	0,90	128	135	150	257	54	121	<10	<10	448	450
IV-5A-03 kút	1,15	1,30	3	<2	<0,5	1,5	<0,01	<0,01	0,97	0,92	126	134	182	275	50	113	<10	<10	450	452
Bejövő (2, 4)	–	1,30	–	3	–	<0,5	–	<0,01	–	1,00	–	107	–	122	–	99	–	<10	–	478
Bejövő(belső)	–	1,20	–	<2	–	<0,5	–	<0,01	–	1,01	–	102	–	129	–	101	–	<10	–	469
Klór. Után	1,55	1,15	3	4	<0,5	<0,5	<0,01	0,02	0,93	0,90	118	117	82	120	53	125	<10	<10	465	472
Tározott víz	1,6	1,30	4	3	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	0,83	0,91	118	135	132	198	82	124	<10	<10	467	460
IV Betáp	1,25	1,05	4	3	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	0,94	0,93	112	108	72	119	60	91	<10	<10	472	470
HÁL-1	1,15	1,15	5	4	0,5	<0,5	<0,01	<0,01	0,94	0,92	116	115	97	201	56	88	<10	<10	467	473
HÁL-2	1,05	1,15	4	3	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	0,92	0,93	116	120	62	105	54	86	<10	<10	471	471
HÁL-3	1,8	1,20	4	3	<0,5	0,7	<0,01	<0,01	1,07	0,97	118	104	61	65	56	76	<10	<10	461	476
HÁL-4	1,2	1,10	5	4	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	0,96	0,92	116	114	53	96	57	86	<10	<10	469	473
HÁL-5	1,2	1,10	4	3	<0,5	0,7	<0,01	<0,01	0,95	0,92	116	115	69	95	57	101	<10	<10	467	473
HÁL-6	1,25	1,25	4	4	<0,5	<0,5	<0,01	<0,01	0,95	0,92	118	115	85	86	54	92	<10	<10	470	473

12. táblázat. A környezetegészségügyi szabványoknak megfelelő vízkémiai vizsgálatok eredményei.
A határérték feletti értékek szürke háttérrel kiemelve láthatók. „–” nem történt mintavétel

A 12. táblázatban bemutatott eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgált víz a legtöbb paraméter tekintetében igen jó minőségű, határérték alatti értékeket mutat. A mangán koncentrációja azonban a vízminták döntő többségében meghaladja az 50 µg/l-es határértéket. Különösen számottevő a határérték túllépés a november 30-ai minták esetében. A második mintasorozat tagjai között ezen felül néhány esetben a 200 µg/l-es határértéket meghaladó vas tartalmat is tapasztaltunk.

Mivel a víz nem tartalmaz a fenti kémiai paraméterek alapján olyan mennyiségben elektron donorokat, melyekre alapozva az aerált víz mikrobiológiai instabilitása megmagyarázható, egy alkalommal egy hálózati mintavételi ponton a víz metántartalmát is

megmértük. Az értéke 4320 ± 860 ppm-nek adódott. Ez mintegy 13 mg/L oxigénnel egyenértékű oxidálószer fogyasztana a KOI mérésekor. Az igen magasnak bizonyult metántartalom alapján elmondható, hogy a szegedi ivóvíz olyan mennyiségű metánt tartalmaz, amire alapozva megvalósulhat az azt hasznosítani képes baktériumok elszaporodása.

IV.2. Sejtszámlálás epifluoreszcens mikroszkóppal, DAPI festés mellett

Az egyes vízminták sejtszámainak meghatározása céljából DAPI festés mellett epifluoreszcens mikroszkóppal történő sejtszámlálást végeztünk. Eredményeinket a 13. táblázat mutatja.

Minták	Nov. 13	Nov. 30
IV-02-01 kút	–	$1,79 \cdot 10^4$
IV-02-02 kút	–	$1,50 \cdot 10^4$
IV-02-03 kút	–	$1,36 \cdot 10^4$
IV-04-01 kút	$3,07 \cdot 10^4$	$1,15 \cdot 10^4$
IV-04-02 kút	$4,24 \cdot 10^4$	$1,02 \cdot 10^4$
IV-04-03 kút	$3,63 \cdot 10^4$	$1,38 \cdot 10^4$
IV-05-01 kút	$4,74 \cdot 10^4$	$1,33 \cdot 10^4$
IV-05-03 kút	$1,25 \cdot 10^5$	$3,29 \cdot 10^4$
IV-05-04 kút	$3,17 \cdot 10^4$	$1,36 \cdot 10^4$
IV-5A-01 kút	$9,47 \cdot 10^4$	$3,87 \cdot 10^4$
IV-5A-02 kút	$4,58 \cdot 10^4$	$6,40 \cdot 10^4$
IV-5A-03 kút	$5,03 \cdot 10^4$	$3,36 \cdot 10^4$
IV-06-01 kút	$3,07 \cdot 10^4$	$3,04 \cdot 10^4$
IV-06-02 kút	$6,01 \cdot 10^4$	$3,54 \cdot 10^4$
IV-06-03 kút	$2,48 \cdot 10^4$	$1,44 \cdot 10^4$
Bejövő 2,4	–	$5,73 \cdot 10^4$
Bejövő Belső	–	$3,23 \cdot 10^4$
Tározott víz	$8,40 \cdot 10^5$	$6,62 \cdot 10^4$
Klór. Után	$1,12 \cdot 10^5$	$9,61 \cdot 10^4$
IV-Betáp	$2,83 \cdot 10^5$	$9,19 \cdot 10^4$
Hál-1	$1,74 \cdot 10^5$	$1,93 \cdot 10^5$
Hál-2	$2,08 \cdot 10^5$	$9,88 \cdot 10^4$
Hál-3	$1,89 \cdot 10^5$	$1,45 \cdot 10^5$
Hál-4	$1,61 \cdot 10^5$	$3,30 \cdot 10^5$
Hál-5	$5,49 \cdot 10^5$	$2,22 \cdot 10^5$
Hál-6	$1,04 \cdot 10^5$	$1,28 \cdot 10^5$

13. táblázat: Az epifluoreszcens mikroszkópos sejtszámlálással kapott eredmények „–” nem történt mintavétel

A kutakból nyert vízmintákban még kisebb baktériumszám jellemző, ami a tározás során számottevően megnő. A november 13-ai minták esetében elmondható, hogy a klórozás nagymértékben lecsökkenti a sejtszámot, azonban a IV-es kútcsoport hálózati betápláló vezetékében már ismét megemelkedett mikrobaszám jellemző. A november 30-ai mintáknál a klórozás sejtszámot csökkentő hatását nem tudtuk kimutatni. A hálózati vizekben – hasonlóan mindkét mintasorozatban – magas baktériumszámot tapasztaltunk.

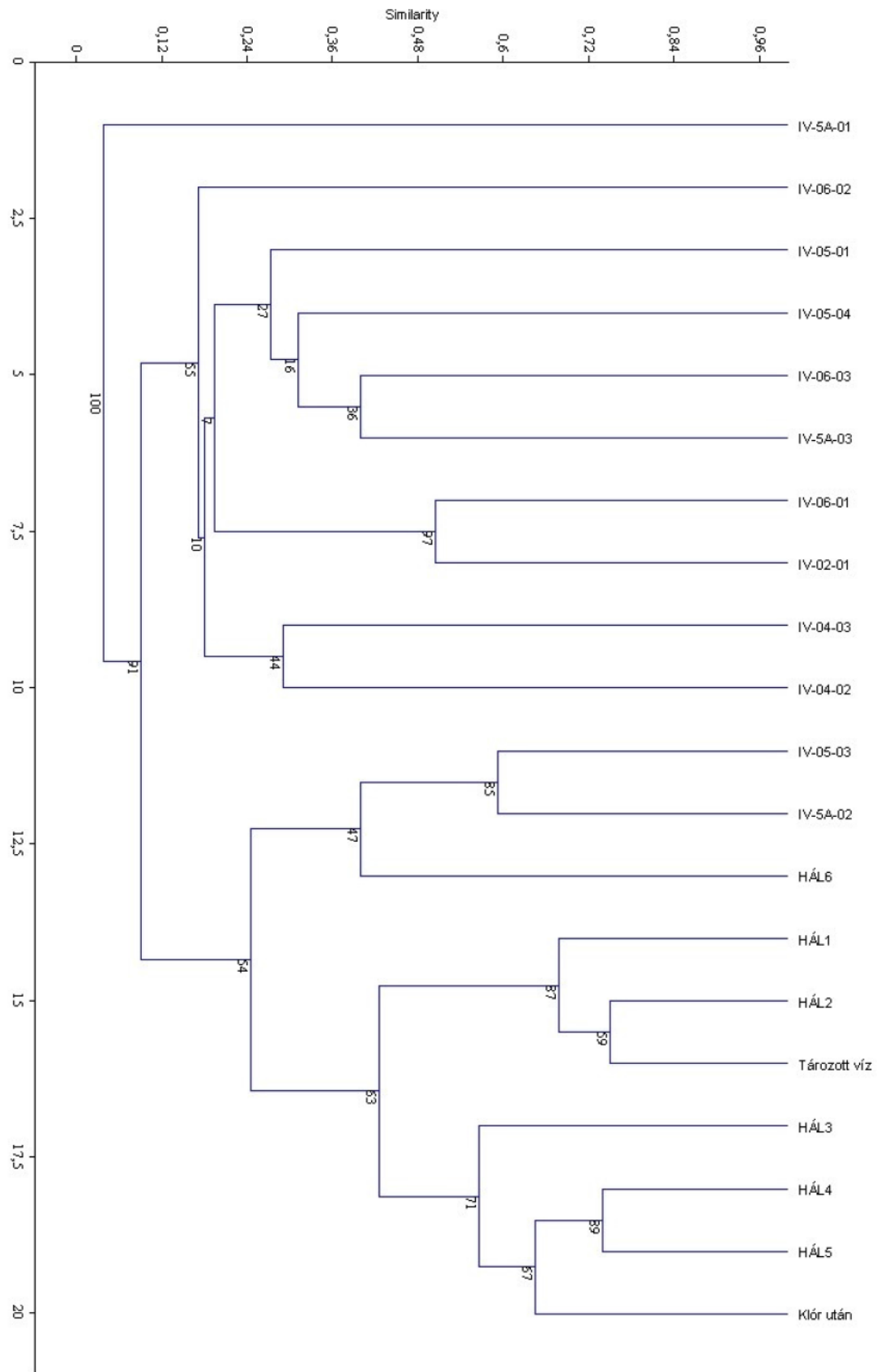
Megállapítható, hogy az első alkalommal vételezett vízmintákban általánosan nagyobb sejt- és csíraszám jellemző a kutak és a kezelőművi pontok mintáinak esetében, mint ami a második sorozatban tapasztalható. A különbség magyarázata lehet az a tény, hogy az egymást két héttel követő mintavételezések alkalmával eltérő üzemi állapot volt jellemző. A hálózati baktériumszámokban lényeges eltérés nem figyelhető meg.

IV.3. T-RFLP ujjlenyomat vizsgálat eredményei

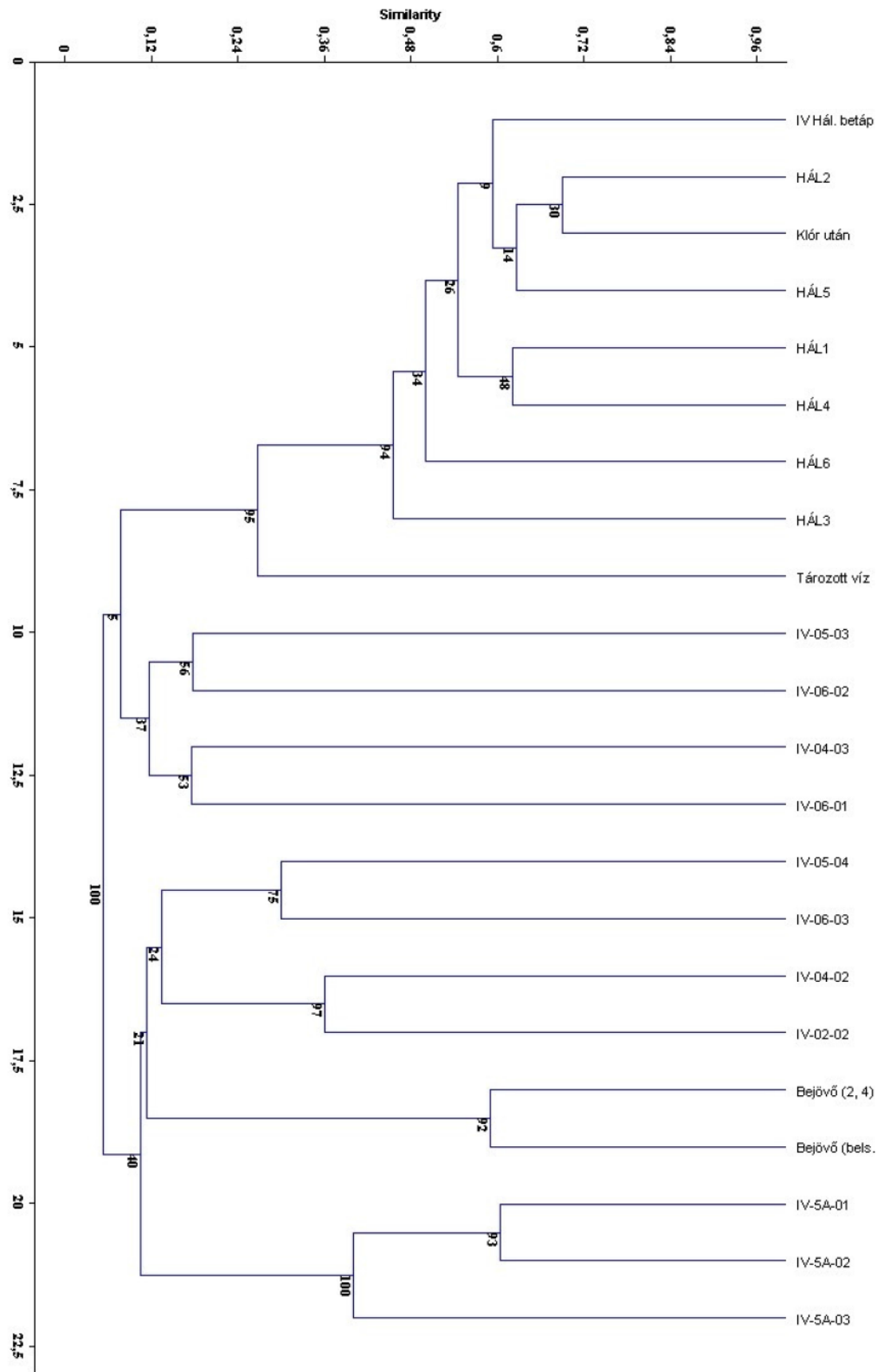
Az egyes vízminták baktériumközösségeinek szerkezetét T-RFLP molekuláris ujjlenyomat elemző módszer segítségével vizsgáltuk. A kapott eredmények alapján a mintákat hasonlósági fán ábráztuk (*1a. és 1b. ábrák*).

A minták mindkét hasonlósági fán két nagy csoportra válva különülnek el. Az egyik csoportot a kutak vizei képezik elkülönülve a kezelőművi mintáktól, melyek a hálózati mintákkal mutatnak közelebbi hasonlóságot és velük együtt alkotják a másik csoportot. Ez az éles elkülönülés jól tükrözi a klórozás hatására bekövetkező közösségszerkezeti változást az ivóvízrendszeren belül.

Az általunk mért fizikai és kémiai paramétereket egybevetettük a T-RFLP vizsgálat eredményeivel, de nem találtunk olyan paramétert, amely a vízminták hasonlósági fán való elhelyezkedését önmagában egyértelműen magyarázná. Valószínűsíthető, hogy a minták baktériumközösségeinek arculatát több tényező együttese, egymással szoros kölcsönhatásban határozza meg, illetve előfordulhat, hogy olyan paraméter van döntő befolyással a közösségszerkezet alakulására, amelyről nem áll rendelkezésre adatunk. A klónkönyvtár analízis eredményei alapján hasznos volna esetleges további vizsgálatok alkalmával a metántartalom mintavételi pontonkénti meghatározása.



1a. ábra. A november 13-i minták hasonlósági fája a T-RFLP ujjlenyomatok alapján.



1b. ábra. A november 30-i minták hasonlósági fája a T-RFLP ujjlenyomatok alapján.

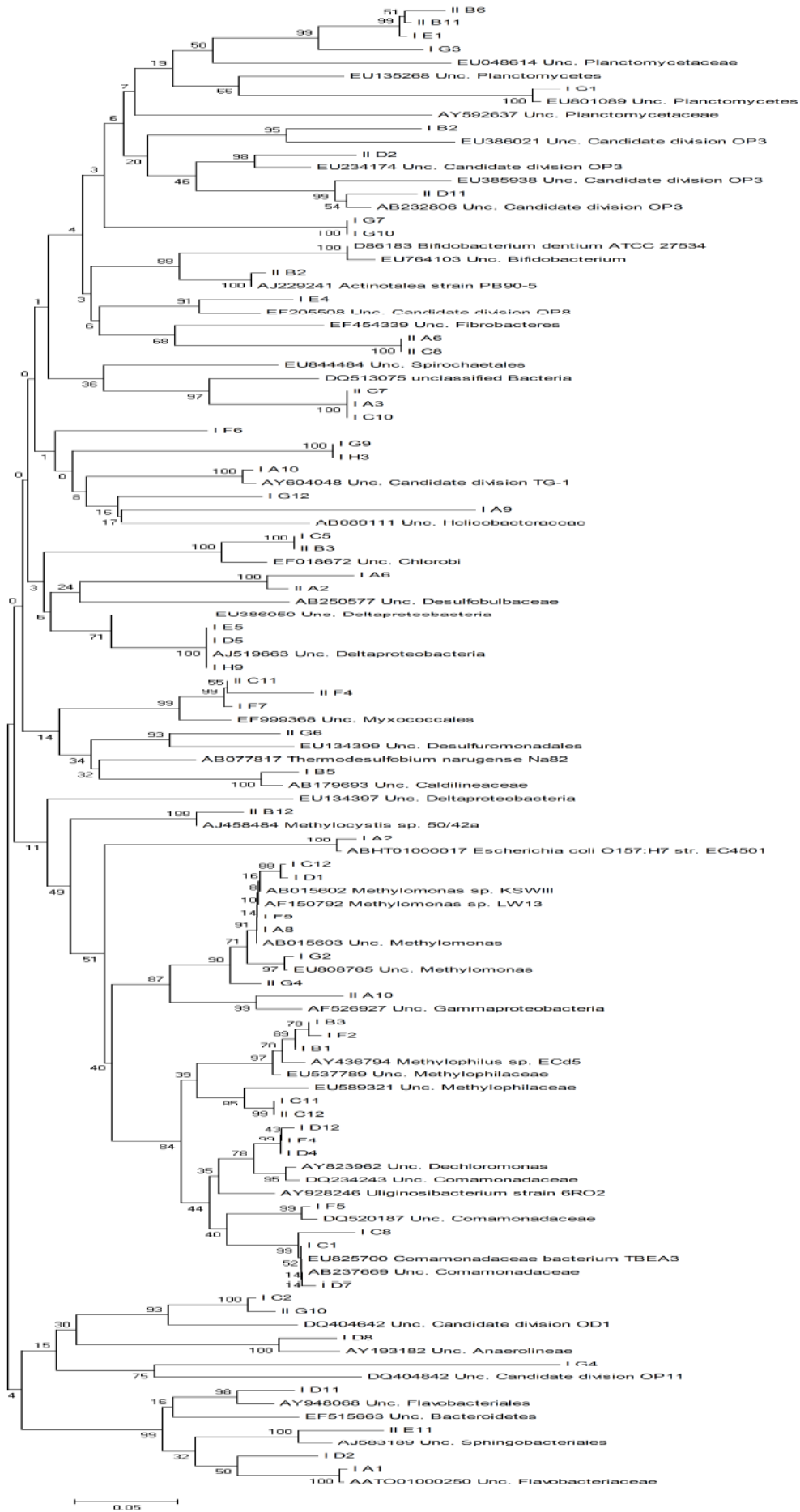
IV.4. Kompozit klónkönyvtár elemzés eredménye

A vizsgált ivóvíz közösségalkotó fajainak rendszertani azonosítása érdekében 16S rDNS alapú kompozit klónkönyvtárat hoztunk létre a második mintasorozat felhasználásával.

A könyvtárkészítéshez három, a T-RFLP vizsgálat alapján jellegzetes és eltérő közösségösszetételt mutató mintát (IV-05-04, IV-5A-02, HÁL-4) választottunk ki. A klónkönyvtár klónjainak csoportosításához ARDRA módszert alkalmaztunk.

A 192 tagú klónkönyvtárból 169 értékelhető ARDRA mintázatot adó klónt kaptunk, amiből 99 klón 17 csoportba sorolódott. Ezeket, a legalább két azonos mintázatú klónt tartalmazó csoportokat nevezzük major klónoknak, a fennmaradó 70 klón egyedi hasítási mintázatot mutatott, ezek a minor klónok.

Elvégeztük a major klónok mindegyikének és a minor klónok nagy részének bázissorrend elemzését, majd a kapott szekvenciákat egybevetettük a rendszertani besorolásra leginkább alkalmas publikus 16S rDNS alapú ARB adatbázissal, illetve a jelenleg ismert bakteriális típus törzsek 16S rDNS szekvenciáit tartalmazó EZTAXON adatbázissal. A klónokat és a hozzájuk leginkább hasonló bázissorrendű, az ARB adatbázisban közölt 16S rDNS szekvenciákat azok rendszertani besorolásával együtt egy hasonlósági fán ábrázoltuk, ami a 2. ábrán látható. Az egyes klónok klónkönyvtáron belüli részarányait, a hozzájuk rendszertanilag legközelebb eső típus törzs adatait, a hasonlóság fokát, és a típus törzs főbb releváns jellemzőjét a 14. táblázat tartalmazza.



2. ábra. A kompozit klónkönyvtár klónjainak és a hozzájuk leginkább hasonló, az ARB adatbázisból származó DNS szekvenciák hasonlósági fája

Klón neve	Részarány a klónkönyvtárban	Legközelebbi rokon típus törzs	Típus törzs 16S rDNS szekvencia referencia száma	Szekvencia hasonlóság	Főbb jellemzők (genus szinten)
IC5	10.65	<i>(Ignavibacterium album Mat9-16)</i>	AB478415	80.0	Gram-, anaerob, termofil (Iino T. et al. 2009)
IA3	9.07	<i>(Clostridium tepidiprofundum SG508)</i>	EF197795	74.4	Gram+, termofil, anaerob, elemi ként redukálhat (Slobodkina G. et al. 2008)
IA8	5.92	<i>Methylomonas (scandinavica R5)</i>	AJ131369	94.3	Gram-, aerob, obligát metanotróf (Kalyuzhnaya M. et al. 1999)
IF4	5.33	<i>Dechloromonas (agitata CKB)</i>	AF047462	91.7	Gram-, fakultatív anaerob, klorát és perklorát redukáló (Achenbach L. et al. 2001)
IH9	4.73	<i>(Desulfosarcina cetonica DSM 7267)</i>	AJ237603	83.8	Anaerob, szulfát-redukáló (Müller J. et al. 1999)
IH1	4.54	<i>(Thermobrachium celere JW/YL-NZ35)</i>	X99238	78.1	Anaerob, termofil (Engle M. et al. 1996)
ID12	3.55	<i>Curvibacter (delicatus LMG 4328)</i>	AF078756	94.2	Gram-, aerob, régebben <i>Aquaspirillum</i> (Ding L.-Yokota A. 2004)
IB1	2.96	<i>Methylotenera (mobilis JLW8)</i>	DQ287786	95.2	Gram-, aerob, obligát metil-amin hasznosító (Kalyuzhnaya M. et al. 2006)
IA1	1.78	<i>Flavobacterium (cauense R2A-7)</i>	EU521691	94.9	Gram-, kemoorganotróf (Qu J. et al. 2009)
IG9	1.78	<i>(Thermodesulfobium narugense Na82)</i>	AB077817	77.5	Anaerob, termofil, szulfát-redukáló (Mori K. et al. 2003)
IC11	1.18	<i>Methylobacillus (flagellatus KT)</i>	DQ287787	91.4	Obligát metilotróf (Christoserdova L. et al. 2007)
IE4	1.18	<i>(Thermanaeromonas toyohensis ToBE)</i>	AB062280	80.5	Gram+, termofil, anaerob, tioszulfát-redukáló (Mori K. et al. 2002)
IG2	1.18	<i>Methylomonas scandinavica R5</i>	AJ131369	97.7	Gram-, aerob, obligát metanotróf (Kalyuzhnaya M. et al. 1999)
IG10	1.18	<i>(Pelobacter venetianus DSM 2394)</i>	U41562	76.5	Gram-, anaerob (Schink B.-Stieb M. 1983)
IIA2	1.18	<i>(Desulfuromonas acetexigens DSM 1397)</i>	U23140	80.7	Anaerob, szulfát-redukáló (Finster K. et al. 1994)
IIC8	1.18	<i>(Thermohalobacter berrensensis CTT3)</i>	AF113543	76.6	Gram-, anaerob, termofil, <i>Clostridiales</i> rokon (Cayol J. et al. 2000)
IIC12	1.18	<i>Methylobacillus (flagellatus KT)</i>	DQ287787	90.8	Obligát metilotróf (Christoserdova L. et al. 2007)
IID2	0.59	<i>(Acidicaldus organivorans Y008(T))</i>	AY140238	79.0	Gram-, kén-oxidáló, ferri vas-redukáló, termofil, acidofil (Johnson D. et al. 2006)
IIB2	0.59	<i>Actinotalea fermentans DSM 3133</i>	X83805	96.6	Gram+, fakultatív anaerob, mezofil (Yi L. et al. 2007)
IB5	0.59	<i>(Anaerolinea thermolimosa IMO-1)</i>	AB109437	82.5	Gram-, termofil, obligát anaerob (Yamada T. et al. 2006)
ID8	0.59	<i>(Anaerolinea thermolimosa IMO-1)</i>	AB109437	80.9	Gram-, termofil, obligát anaerob (Yamada T. et al. 2006)
IG1	0.59	<i>(Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis MB4)</i>	AF209708	73.5	Gram-, obligát anaerob, termofil, régebben <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> (Fardeau M. et al. 2004)
IIG4	0.59	<i>(Candidatus Accumulibacter phosphatis)</i>	AJ224937	89.5	Nem tenyésztethető genus, polifoszfat-akkumuláló (Miyachi R. et al. 2007)
IF7	0.59	<i>(Chondromyces pediculatus Cm p17)</i>	AJ233940	86.5	Gram-, aerob, mezofil (McCurdy H. 1971)
IIC11	0.59	<i>(Chondromyces pediculatus Cm p17)</i>	AJ233940	86.8	Gram-, aerob, mezofil (McCurdy H. 1971)
IIF4	0.59	<i>(Chondromyces pediculatus Cm p17)</i>	AJ233940	85.6	Gram-, aerob, mezofil (McCurdy H. 1971)
IC2	0.59	<i>(Corynebacterium efficiens YS-314)</i>	BA000035	81.2	Gram+, fakultatív anaerob (Fudou R. et al. 2002)
IIG10	0.59	<i>(Corynebacterium efficiens YS-314)</i>	BA000035	79.9	Gram+, fakultatív anaerob (Fudou R. et al. 2002)
IC1	0.59	<i>Curvibacter delicatus LMG 4328</i>	AF078756	98.5	Gram-, Comamonadaceae rokon (Ding L.-Yokota A. 2004)
ID4	0.59	<i>Dechloromonas (agitata CKB)</i>	AF047462	92.7	Gram-, fakultatív anaerob, klorát és perklorát redukáló (Achenbach L. et al. 2001)
IE5	0.59	<i>(Desulfofaba fastidiosa DSM 15249)</i>	AY268891	84.8	Szulfát-redukáló, mezofil (Abildgaard L. et al. 2004)

IB6	0.59	<i>(Desulfofabia gelida PSv2)9</i>	AF099063	85.2	Szulfátredukáló, pszichrofil (Knoblauch C. et al. 1999)
ID5	0.59	<i>(Desulfonema magnum DSM 2077)</i>	U45989	84.6	Gram-, obligát anaerob (Fukui M. et al. 1999)
IG12	0.59	<i>(Desulfovibrio alkalitolerans DSM 16529)</i>	AY649785	80.9	Gram-, obligát anaerob, szulfátredukáló, alkálitoleráns (Abildgaard L. et al. 2006)
ID2	0.59	<i>(Flavobacterium subsaxonicum WB 4.1-42)</i>	AM934666	84.6	Gram-, kemoorganotróf (Ali Z. et al. 2009)
IG3	0.59	<i>(Fodinicola feengrottensis HKI 0501)</i>	EF490376	77.0	Gram+ (Carlsohn M. et al. 2008)
IA10	0.59	<i>(Helicobacter brantae MIT 04-9366)</i>	DQ415546	79.0	Gram-, mikroaerofil, termofil (Fox J. et al. 2006)
IIB3	0.59	<i>(Ignavibacterium album Mat9-16)</i>	AB478415	80.2	Gram-, anaerob, termofil (Iino T. et al. 2009)
IIA10	0.59	<i>(Legionella oakridgensis Oak Ridge 10)</i>	Z32642	82.6	Gram-, aerob (Orrison L. et al. 1983)
IF5	0.59	<i>Limnohabitans (curvus MWH-C5)</i>	AJ938026	94.3	Gram-, kemoorganotróf, aerob/fakultatív anaerob (Hahn M. et al. 2010)
IF6	0.59	<i>(Melittangium alboraceum Me b7)</i>	AJ233907	77.5	Gram-, régebben Podangium (Spröer C. et al. 1999)
IIB12	0.59	<i>Methylocystis hirsuta CSC1</i>	DQ364433	97.9	Gram-, aerob, metanotróf (Lindner A. et al. 2007)
IC12	0.59	<i>Methylomonas (scandinavica R5)</i>	AJ131369	95.1	Gram-, aerob, obligát metanotróf (Kalyuzhnaya M. et al. 1999)
ID1	0.59	<i>Methylomonas (scandinavica R5)</i>	AJ131369	93.9	Gram-, aerob, obligát metanotróf (Kalyuzhnaya M. et al. 1999)
IF9	0.59	<i>Methylomonas (scandinavica R5)</i>	AJ131369	94.5	Gram-, aerob, obligát metanotróf (Kalyuzhnaya M. et al. 1999)
IB3	0.59	<i>Methylotenera (mobilis JLW8)</i>	DQ287786	94.7	Gram-, aerob, obligát metil-amin hasznosító (Kalyuzhnaya M. et al. 2006)
IF2	0.59	<i>Methylotenera (mobilis JLW8)</i>	DQ287786	95.0	Gram-, aerob, obligát metil-amin hasznosító (Kalyuzhnaya M. et al. 2006)
IIG6	0.59	<i>(Pelobacter acerylenicus WoAcy1 DSM2348)</i>	X70955	85.4	Gram-, obligát anaerob, mezofil (Schink B. 1985)
IC8	0.59	<i>Pseudorhodofera soli TBEA3</i>	EU825700	97.7	Gram-, Comamonadaceae rokon (Bruland N. et al. 2009)
ID7	0.59	<i>Pseudorhodofera soli TBEA3</i>	EU825700	98.5	Gram-, Comamonadaceae rokon (Bruland N. et al. 2009)
IB2	0.59	<i>(Rhodobacter vinaykumarii JA123)</i>	AM408117	78.5	Gram-, mezofil, fakultatív anaerob (Srinivas T. et al. 2007)
IE1	0.59	<i>(Rhodococcus aetherivorans 10bc312)</i>	AF447391	76.5	Gram+, aerob (Goodfellow M. et al. 2004)
IIE11	0.59	<i>(Salinimicrobium xinjiangense BH206)</i>	EF520007	84.2	Gram-, fakultatív aerob, mérsékelt halofil (Lim J. et al. 2008)
IG4	0.59	<i>(Saxeibacter lacteus DLS-10)</i>	AM778124	75.2	Gram+, aerob, mezofil (Lee S. et al. 2008)
IIB6	0.59	<i>(Streptacidiphilus rugosus AM-16)</i>	DQ904547	76.7	Gram+, aerob, acidofil (Kim S. et al. 2003)
IIB11	0.59	<i>(Streptacidiphilus rugosus AM-16)</i>	DQ904547	78.7	Gram+, aerob, acidofil (Kim S. et al. 2003)
IA9	0.59	<i>(Streptomyces resistomycificus NBRC 12814)</i>	AB184166	75.9	Gram+, aerob (Xu L. et al. 2005)
IIC7	0.59	<i>(Thermobrachium celere JW/YL-NZ35)</i>	X99238	76.7	Anaerob, termofil (Engle M. et al. 1996)
IA11	0.59	<i>Variovorax paradoxus IAM 12373</i>	D88006	99.5	Gram-, aerob, metilotróf közösség tagjaként is leírták (Willems A. et al. 1991)
ID11	0.59	<i>(Wandonia haliotis Haldis-1)</i>	FJ424814	82.7	Gram-, obligát anaerob, mezofil (Lee D. et al. 2010)

14. táblázat. A klónok klónkönyvtáron belüli részaránya, a hozzájuk rendszertanilag legközelebb eső típus törzs adatai, a 16S rDNS szekvencia hasonlóság és a típus törzs főbb releváns jellemzői. A rendszertani azonosítás bizonytalanságát zárójellel jelezzük.

A rokon típusörzsek illetve nemzetségek élettani jellemzőiből következtetni tudunk az általunk detektált közösségalkotók környezeti igényére és metabolikus potenciáljára. A találatok között igen nagy számban szerepelnek anaerob és termofil szervezetek– ez a vizek hőmérsékletét és alacsony oxigéntartalmát tekintve nem meglepő –, illetve az egy szénatomos vegyületek hasznosítására képes baktériumok (metilotrófok, metanotrófok), ami a víz magas metántartalmát jelzi. A vizsgált ivóvízben kimutattuk a klórozott vegyületeket hasznosítók jelenlétét is (pl. *Dechloromonas sp.*), ami a klórozott hálózati vizek általános jellemzője.

A beazonosításra került klónok többségének szekvencia hasonlósága a típusörzsekhez igen alacsony fokú, ami jól jelzi, hogy a vizsgált közeg jellemző baktériumközösségei a tudomány számára jórészt még ismeretlenek. Kevésbé ismert rendszertani csoportokba tartoznak a közösségek egyes domináns tagjai is (az IC5, IA3 ARDRA csoportok képviselői).

IV.5. A T-RFLP vizsgálat összevetése a kompozit klónkönyvtár eredményeivel

A november 30-án vett mintákból készült T-RFLP mintázatokat összevetettük az ugyanezen mintasorból készült kompozit klónkönyvtár major klónjainak T-RFLP mintázatával, így következtetni tudunk az egyes klónok közösségen belüli részarányaira

A major klónok legközelebbi rokon típusörzseit illetve a vízminták közösségeiben kimutatható maximális százalékos részarányukat a 15. táblázat mutatja. A 10% feletti értékeket szürke háttérrel kiemelve tüntettük fel.

Klón	IIA2	IG9	IA3	IH9	IIC8	IC11	IIC12	IF4	ID12	IB1	IA8	IG2	IC5	IE4
A klónhoz legközelebbi típusörzs rendszertani besorolása (genus)	<i>(Desulfuromonas)</i>	<i>(Thermodesulfobium)</i>	<i>(Clostridium)</i>	<i>(Desulfosarcina)</i>	<i>(Thermohalobacter)</i>	<i>Methylobacillus</i>	<i>Methylobacillus</i>	<i>Dechloromonas</i>	<i>Curvibacter</i>	<i>Methylothera</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>(Ignavibacterium)</i>	<i>(Thermanaeromonas)</i>
Bázissorrend hasonlóság a típusörzshöz	80,7 %	77,5 %	74,4 %	83,8 %	76,6 %	91,4 %	90,8 %	91,7 %	94,2 %	95,2 %	94,3 %	97,7 %	80,0 %	80,5 %
IV-02-01								2,08	3,30					
IV-02-02									3,36					
IV-04-02	0,50	3,22	13,54	3,94				2,98	4,76				3,07	
IV-04-03			17,29	1,37	0,95				20,37	9,57			2,28	
IV-05-01								44,39	54,44					
IV-05-03		1,86				2,01	1,09	6,36		1,20	8,17	30,16	1,23	
IV-05-04			1,67	1,49		14,08	14,96	24,79	39,69		13,04	10,29		
IV-06-01				2,20	0,42	2,40	1,80	1,76	1,79			4,46	0,79	0,50
IV-06-02						0,20	0,19	13,62	25,87		1,08		1,54	
IV-06-03								48,35	31,72	3,50	4,43	4,52		
IV-5A-01		2,44	36,10	17,14	0,49							1,58		
IV-5A-02		1,40	18,75	1,51		1,55	1,89	0,71	0,86	6,54	15,91	19,88	1,00	
IV-5A-03	0,42		10,34	4,57				19,49	31,95			4,70		
Tározott								6,56	18,77	32,80				
Klór után								17,66	16,37	18,98	18,18	3,71		
HÁL-1								33,32	34,25	16,85	19,85	11,39	3,25	1,40
HÁL-2								8,36	15,11	14,36	23,85	1,16	2,34	0,41
HÁL-3									21,54		27,59	8,89		
HÁL-4								9,70	25,96	20,70	20,70	2,17	0,40	1,87
HÁL-5								4,51	22,19		14,25			2,52
HÁL-6								34,28	19,50	2,59	17,04	21,10	1,60	1,08

15. táblázat. A kompozit klónkönyvtár major klónjainak legközelebbi rokon típusörzsei, illetve a vízminták közösségeiben kimutatható maximális százalékos részarányai.

Megállapítható, hogy a klórozás erős közösségszerkezeti változást idéz elő: eltűnik a *Desulfuromonas*, *Thermodesulfobium*, *Desulfosarcina*, *Thermohalobacter*, *Clostridium* és *Methylobacillus* nemzetségek dominanciája, és megerősödik a *Methylothera*, *Methylomonas* és *Thermanaeromonas* nemzetség.

Elmondható, hogy a hálózat mikrobaközösségei homogénebbek, csupán néhány faj dominálja azokat. A kutak esetében sokkal változatosabb mikrobaközösségeket láthatunk.

V. ÖSSZEFOGLALÁS, TOVÁBBLÉPÉSI LEHETŐSÉGEK

Kutatásaink alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált ivóvízrendszer kútjainak és a hálózatának mikrobaközössége bár átfedő, mégis jellegzetesen elválik egymástól. A jelentős közösség szerkezeti változás egyik okaként sikerült kimutatnunk a klórozás szerepét.

A vizsgált vízben domináns közösségalkotó fajok az egy szénatomos vegyületeket hasznosító metanotróf és metilotróf baktériumok, illetve nagy számban fordulnak elő az anaerob, fakultatív anaerob és a termofil szervezetek is.

Megállapítottuk, hogy mind a kútvíz, mind a hálózat vize anaerob, és az általunk elemzett mintában jelentősebb metántartalmat tudtunk kimutatni.

A kútvizek viszonylag alacsony baktériumszámával ellentétben a kezelőműveknél jelentős sejtszám növekedés tapasztalható, a hálózati vízmintáknál azonban csak néhány esetben sikerült további számottevő növekedést kimutatni. A baktériumszám hálózaton beüli stabilitásának hátterében a víz anaerobitása és a viszonylag csekély tartózkodási idő áll. Ezzel szemben a csapból való kifolyatással a víz - főképp a ma általában alkalmazott perlátor miatt - aerálódik. Az aerálódott víz metántartalma lehetővé teszi a metilotróf és metanotróf baktériumok számára a gyors elszaporodást. Ezen szervezetek biomasszája pedig más kemoorgano-heterotróf baktériumoknak szolgál tápanyagforrásként. Ezzel magyarázhatjuk a csapvízben néhány napi állás után a biológiai eredetű pelyhek megjelenését.

Megjegyezzük, hogy a hálózat egyes helyein esetleg kialakuló vízpangás hasonló folyamathoz vezethet akár anaerob körülmények között is. Anaerob körülmények között a biomassza képződése ugyan lassúbb, de semmiképp sem elhanyagolható.

A szegedi ivóvíz biológiai instabilitását és baktériumközösségének arculatát meghatározó tényezők még pontosabb feltárása érdekében további kutatások alkalmával hasznos lehetne a metántartalom szélesebb körű, több mintavevő pontra kiterjedő vizsgálata.

Az ivóvíz jelentősebb metántartalma melletti anaerob jellegét tekintetbe véve pedig érdekes új eredményeket szolgáltathatna a ma még oly kevésbé ismert anaerob metánoxidáló baktériumok feltárását célzó kutatómunka.

VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Palatinszky Mártonnak mindazért a tudásért, amire megtanított és aminek most igazán nagy hasznát veszem. Köszönöm a munkám során nyújtott segítséget, a tanácsokat és a támogatást.

Köszönöm Kéki Zsuzsinak és M. Tóth Erikának, hogy segítségemre voltak a mikroszkópos sejtszámlálásban.

Köszönettel tartozom Barkács Katalinnak a kémiai vizsgálatokban nyújtott segítségért.

Végezetül pedig köszönöm Dr. Márialigeti Károly tanszékvezető úrnak a lehetőséget, hogy kutatómunkámat az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén végezhettem.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

- Abildgaard, L., Nielsen, M. B., Kjeldsen, K. U., Ingvorsen, K. (2006): *Desulfovibrio alkalitolerans* sp. nov., a novel alkalitolerant, sulphate-reducing bacterium isolated from district heating water. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 56, 1019–1024
- Abildgaard, L., Ramsing, N. B., Finster, K. (2004): Characterization of the marine propionate-degrading, sulfate-reducing bacterium *Desulfofaba fastidiosa* sp. nov. and reclassification of *Desulfomusa hansenii* as *Desulfofaba hansenii* comb. nov. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 393-399
- Achenbach, L. A., Michaelidou, U., Bruce, R. A., Fryman, J., Coates, J. D. (2001): *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chloratereducing bacteria and their phylogenetic position. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 527–533
- Ali, Z., Cousin, S., Frühling, A., Brambilla, E., Schumann, P., Yang, Y., Stackebrandt, E. (2009): *Flavobacterium rivuli* sp. nov., *Flavobacterium subsaxonicum* sp. nov., *Flavobacterium swingsii* sp. nov. and *Flavobacterium reichenbachii* sp. nov., isolated from a hard water rivulet. – *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:2610-7
- Bruland, N., Bathe, S., Willems, A., Steinbüchel, A. (2009): *Pseudorhodofera soli* gen. nov., sp. nov., and *Pseudorhodofera caeni* sp. nov., betaproteobacteria belonging to the family *Comamonadaceae*. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:2702
- Carlsohn, M. R., Groth, I., Saluz H., Schumann P., Stackebrandt E. (2008): *Fodinicola feengrottensis* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a medieval mine. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1529-1536
- Cayol, J., Ducerf, S., Patel, B. K. C., Garcia, J., Thomas, P., Ollivier, B. (2000): *Thermohalobacter berrensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly halophilic bacterium from a solar saltern. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 559–564
- Chistoserdova, L., Lapidus A., Han C., et al. (2007): Genome of *Methylobacillus flagellatus*, Molecular Basis for Obligate Methylo-trophy, and Polyphyletic Origin of Methylo-trophy. – *J. Bacteriol.* 189(11):4020-4027.

- Ding, L., Yokota, A. (2004): Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2223–2230
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S., Davis, J., Kuske, C. (1999): Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. – *App. Environ. Microbiol.* 65(4): 1662-1669.
- Engle, M., Li, Y., Rainey, F., DeBlois, S., Mai, V., Reichert, A., Mayer, F., Messner, P., Wiegel, J. (1996): *Thermobrachium celere* gen. nov., sp. nov., a rapidly growing thermophilic, alkalitolerant, and proteolytic obligate anaerobe. – *Int J Syst Bacteriol.* 46(4):1025-33.
- Fardeau, M., Salinas, M. B., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Verhé, F., Cayol, J., Patel, B. K. C., Garcia, J., Ollivier, B. (2004): Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 467–474
- Finster, K., Bak, F., Pfennig, N. (1994): *Desulfuromonas acetexigens* sp. nov., a dissimilatory sulfur-reducing eubacterium from anoxic freshwater sediments. – *Arch. Microbiol.* 161:328-332
- Fox, J. G., Taylor, N. S., Howe, S., Tidd, M., Xu, S., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. (2006): *Helicobacter anseris* sp. nov. and *Helicobacter brantae* sp. nov., Isolated from Feces of Resident Canada Geese in the Greater Boston Area. – *Appl. Environ. Microbiol.* 72(7): 4633–4637

- Fudou, R., Jojima, Y., Seto, A., Yamada, K., Kimura, E., Nakamatsu, T., Hiraishi A., Yamanaka, S. (2002): *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamicacid-producing species from soil and vegetables. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1127–1131
- Fukui, M., Teske, A., Aßmus, B., Muyzer, G., Widdel, F. (1999): Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*). – *Arch. Microbiol.* 172(4): 193-203
- Goodfellow, M., Jones, A. L., Maldonado, L. A. & Salanito, J. (2004): *Rhodococcus aetherivorans* sp. nov., a new species of methyl t-butyl ether-degrading actinomycetes. – *Syst. Appl. Microbiol.* 27(1), 61-65
- Hahn, M. W., Kasalický, W., Jezbera, J., Brandt, U., Jezberová, J., Šimek, K. (2010): *Limnohabitans curvus* gen. nov., sp. nov., a planktonic bacterium isolated from a freshwater lake. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60,1358-1365
- Hugenholtz, P., Goebel B. M., Norman R. P. (1998): Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. – *Journal of Bacteriology*, Sept. 1998, p. 4765–4774
- Iino, T., Mori, K., Uchino, Y., Nakagawa, T., Harayama, S., Suzuki, K. (2010): *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring, and proposal of *Ignavibacteria* classis nov. for a novel lineage at the periphery of the green sulfur bacteria. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1376-1382
- Johnson, D. B., Stallwood, B., Kimura, S., Hallberg, K. B. (2006): Isolation and characterization of *Acidicaldus organivorus*, gen. nov., sp. nov.: a novel sulfur-oxidizing, ferric iron-reducing thermo-acidophilic heterotrophic Proteobacterium. – *Arch. Microbiol.* 185(3):212-21
- Kalyuzhnaya, M. G., Bowerman, S., Lara, J.C., Lidstrom, M. E., Chistoserdova L. (2006): *Methylotenera mobilis* gen. nov., sp. nov., an obligately methylamine-utilizing bacterium within the family Methylophilaceae. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2819–2823

- Kalyuzhnaya, M. G., Khmelenina, V. N., Kotelnikova, S., Holmquist, L., Pedersen, K., Trotsenko, Y. A. (1999): *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden. – *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 565-572.
- Keinänen-Toivola, M. M., Revetta, R. P., Domingo, J. W. (2006): Identification of active bacterial communities in a model drinking water biofilm system using 16S rRNA-based clone libraries. – *FEMS Microbiol. Lett.* 257:182–188.
- Kim, S. B., Lonsdale, J., Seong, C., Goodfellow, M. (2003): *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943)^{AL}) emend. Rainey et al. 1997. – *Antonie van Leeuwenhoek* 83: 107–116
- Knoblauch, C., Sahm, K., Jørgensen, B. B. (1999): Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 4:1631-43.
- Lee, D., Choi, E., Moon, S., Ahn, S., Lee Y. S., Jung, J. S., Jeon, C. O., Whang, K. Kahng, H. (2010): *Wandonia haliotis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family *Cryomorphaceae*, phylum *Bacteroidetes*. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 510-514
- Lee, S. D., Park, S. K., Yun, Y., Lee, D. W. (2008): *Saxeibacter lacteus* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from rock. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 906–909
- Lim, J. M., Jeon, C. O., Lee, S. S., Park, D. J., Xu, L. H., Jiang, C. L., Kim, C. J. (2008): Reclassification of *Salegentibacter catena* Ying et al. 2007 as *Salinimicrobium catena* gen. nov., comb. nov. and description of *Salinimicrobium xinjiangense* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Xinjiang province in China. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 438-42
- Lindner, A. S., Pacheco, A., Aldrich, H. C., Staniec, A. C., Uz, I., Hodson, D. J. (2007): *Methylocystis hirsuta* sp. nov., a novel methanotroph isolated from a groundwater aquifer. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1891–1900

- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. – *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522
- McCurdy, H. D. (1971): Studies on the Taxonomy of the *Myxobacterales*. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21, 40-49
- Miyauchi, R., Oki, K., Aoi, Y., Tsuneda, S. (2007): Diversity of Nitrite Reductase Genes in "*Candidatus Accumulibacter phosphatis*"-Dominated Cultures Enriched by Flow-Cytometric Sorting. – *Appl. Environ. Microbiol.* 73(16): 5331–5337
- Mori, K., Hanada, S., Maruyama, A., Marumo, K. (2002): *Thermanaeromonas toyohensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic anaerobe isolated from a subterranean vein in the Toyoha Mines. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1675–1680
- Mori, K., Kim, H., Kakegawa, T., Hanada, S. (2003): A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. – *Extremophiles* 7:283–290
- Müller, J. A., Galushko, A. S., Kappler, A., Schink, B. (1999): Anaerobic degradation of m-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. – *Arch Microbiol.* 172(5):287-94.
- Orrison, L. H., Cherry, W. B., Tyndall, R. L., Fliermans, C. B., Gough, S. B., Lambert, M. A., McDougal, L. K., Bibb, W. F., Brenner, D. J. (1983): *Legionella oakridgensis*: unusual new species isolated from cooling tower water. – *Appl. Environ. Microbiol.* 45(2): 536–545.
- Qu, J., Yuan, H., Li, H., Deng, C. (2009): *Flavobacterium cauense* sp. nov., isolated from sediment of a eutrophic lake. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2666-2669
- Revetta, R. P., Domingo, J. W. S., Kelty, C., Humrighouse, B., Oerther, D., Lamendella, R., Keinänen-Toivola M., Williams, M. M. (2007): Molecular diversity of drinking water microbial communities: a phylogenetic approach. – *Proceedings of Disinfection* 4-7.2.2007:629-645.

- Schink, B. (1985): Fermentation of acetylene by an obligate anaerobe, *Pelobacter acetylenicus* sp. nov. – *Arch. Microbiol.* 142: 295- 301
- Schink, B., Stieb, M. (1983): Fermentative Degradation of Polyethylene Glycol by a Strictly Anaerobic, Gram-Negative, Nonsporeforming Bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. – *Appl. Environ. Microbiol.* 46(2): 532
- Slobodkina, G. B., Kolganova, T. V., Tourova, T. P., Kostrikina, N. A., Jeanthon, C., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Slobodkin, A. I. (2008): *Clostridium tepidiprofundii* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 852–855
- Smith, C. J., Danilowicz, B. S., Clear, A. K., Costello, F. J., Wilson, B., Meijer, W. G. (2005): T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. – *FEMS Microbiology Ecology* 54 (2005) 375–380
- Spröer, C., Reichenbach, H., Stackebrandt, E. (1999): The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1255-1 262
- Srinivas, T. N. R., Kumar, P. A., Sasikala, C., Ramana, C. V., Imhoff, J. F. (2007): *Rhodobacter vinaykumarii* sp. nov., a marine phototrophic alphaproteobacterium from tidal waters, and emended description of the genus *Rhodobacter*. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1984-1987
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. – *Mol. Biol. Evol.* 24(8):1596–1599.
- Trotha, R., Reichl, U., Thies, F. L., Sperling, D., König, W., König, B., (2002): Adaptation of a fragment analysis technique to an automated high-throughput multicapillary electrophoresis device for the precise qualitative and quantitative characterization of microbial communities. – *Electrophoresis* 23: 1070-1079.
- Wang, M., Ahrné, S., Antonsson, M., Molin, G. (2004): T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for

- comparison of fecal microbiota in infants of different ages. – *J Microbiol Methods* 59(1):53-69
- Williams, A., De Ley, J., Gillis, M., Kersters, K. (1991): *Comamonadaceae*, a New Family Encompassing the Acidovorans rRNA Complex, Including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov. for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41,445-450
- Williams, M. M., Domingo, J. W. S., Meckes, M. C., Kelty, C. A., Rochon, H. S. (2004): Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. – *J Appl Microbiol* 96(5):954-964
- Xu, L., Jiang, Y., Li, W., Wen, M., Li, M., Jiang, C. (2005): *Streptomyces roseoalbus* sp. nov., an actinomycete isolated from soil in Yunnan, China. – *Antonie van Leeuwenhoek* 87:189–194
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada H., Kamagata, Y. (2006): *Anaerolinea thermolimos* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1331–1340
- Yi, L., Schumann, P., Chun, J., (2007): *Demequina aestuarii* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of the suborder Micrococccineae, and reclassification of *Cellulomonas fermentans* Bagnara et al. 1985 as *Actinotalea fermentans* gen. nov., comb. nov. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 151–156