

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Kísérletes Növénybiológia doktori program



TAUBER TAMÁS

SZENNYVÍZISZAP-ROTHASZTÓ
MIKROBAKÖZÖSSÉGEK VIZSGÁLATÁNAK
OPTIMALIZÁLÁSA

doktori értekezés tézisei

Témavezető:

DR. TÓTH ERIKA
egyetemi adjunktus
(ELTE Biológiai Intézet Mikrobiológiai Tanszék)

A Biológia Doktori Iskola vezetője:

PROF. DR. ERDEI ANNA
tanszékvezető egyetemi tanár
(ELTE Immunológiai Tanszék)

A Kísérletes Növénybiológia doktori
program vezetője:

PROF. DR. SZIGETI ZOLTÁN
tanszékvezető egyetemi tanár
(ELTE Növényélettani és Molekuláris
Növénybiológiai Tanszék)

Készült az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszékén
Budapest
2013

I. BEVEZETÉS

A metántartalmú biogáz termeltetése az egyik legszerencsésebb találkozási tudomány, technológiának és sürgős megoldáskeresésünknek a fogyasztói társadalmak keltette környezeti krízissel kapcsolatban, mely utóbbi vitathatatlanul korunk egyik legégetőbb problémája. A hulladékból energiát és biztonságos talajjavító adalékot előállító folyamat háttérében baktériumok összetett közösségeinek fáradhatatlan munkája áll, így nyilvánvaló, hogy e mikrobiális folyamatok tanulmányozása a biogáztermelő rendszerek hatásfok-növelésének és javuló kiszámíthatóságának ígéretét hordozza. Bár a mikrobaközösségekről való információszerzés leghatékonyabbnak számító eszközei kétségtelenül a nukleinsav-alapú vizsgálati módszerek, így miként a világban, úgy az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén is ezek a módszerek képezik a tudományos közösségelemzés húzóágát, régóta és folyamatosan jelen vannak a klasszikus mikrobiológiai és a közösség-kemotaxonómiai megközelítések is a tanszéki munkában.

A DNS- vagy fehérjealapú vizsgálómódszereknél kisebb felbontóképességük dacára a **kemotaxonómiai módszerek** jelentőségét a környezet-mikrobiológiában egyrészt a polifázikus szemlélet terjedése adja, másrészt az, hogy javukra írható kisebb költségvonzatuk, esetenként alacsonyabb idő- és munkaigényük, továbbá az is, hogy amplifikációs lépés híján eredményeik torzítás nélküli leképződései a mintában található abundanciaviszonyoknak. A zsírsav és kinonvizsgálatok alkalmazhatóságának alapja a közösség-mikrobiológiában egyrészt viszonylag egyszerű izolálhatóságuk, másrészt az a szerencsésnek mondható helyzet, hogy az eukarióta élővilág (leszámítva a gombákat) mindössze néhány kinont és kevésféle zsírsavat termel.

Mind a biogáztermeltetés tanulmányozásában, mind a biotechnológia számos egyéb területén igen hasznos kísérleti eszközök a laboratóriumi léptékű, azaz mintegy 0,1-10 dm³ térfogattal üzemelő bioreaktorok. Laboratóriumi léptékben azonban csupán igen kis gázhozam várható egy reaktorból, kis gázhozamok kielégítően pontos mérése pedig sokkal nehezebb feladat, mint amilyenek elsőre gondolhatnánk. Ezért a közösségvizsgálatokban tett erőfeszítéseink sorával párhuzamosan haladt egy, a laboratóriumi léptékű iszaprothasztó modellrendszerünk ellenőrzésére alkalmas, újfajta, kishozamú gázáramlást mérő módszer kifejlesztése is.

A polifázikus szemlélet jegyében készült, több ujjlenyomatmódszert párhuzamosan alkalmazó, közösségfeltárási vállalkozó tudományos munkák többségében a többféle eredmény külön-külön nyer valamiféle értelmezést a módszerek természetéből fakadó információknak és bizonytalanságoknak megfelelően. Az eredmények egymásra vonatkoztatását pedig jobbra diszkréten elkerülik a szerzők. A mindenkori olvasónak (és gyaníthatóan maguknak a szerzőknek is) könnyen támadhat az az érzése, hogy a sok ismeretlen faktor – mint amilyen a nem ismert (csak észlelt) fajok nagy száma egy ilyen mikrobaközösségben, az átfedő markertermelés okozta információvesztés, vagy az alkalmazott módszerek tökéletlenségeiből (például preferenciális DNS-amplifikációból) adódó várható információtorzulások – miatt az egész eredményértékelés tulajdonképpen csupán ügyesen átgondolt, és szakszerűen tálalt nem-tudás, illetve valószínű

forгатókönyveken való kreatív ötletelés, nem pedig tényleges közösségfeltárás vagy nyomon követés. Ez a bizonytalanság természetesen a rendelkezésünkre álló módszerek és a vizsgált tárgy természetéből fakadó, szükségszerűen adódó helyzet, ugyanakkor különös, hogy e helyzet meghaladására mintha kevés erőfeszítés irányulna a szakterület művelői részéről. Pedig érezhető, hogy az ismereteink és módszereink alapján kirajzolódó értelmezési horizonton túl rengeteg információ lapul még kitermeletlenül az adatsorok mélyén. Miként lehetne – legalább részben – hozzáférni ezekhez? Miként volna meghaladható az a polifázikus módszertani status quo, amelyben a mikrobiális ökológia bizonyos értelemben vesztegel, s hogyan volna lehetséges a rendelkezésre álló ujjlenyomatmódszerek eredményeit egy közös, egyenként mindegyiken továbbmutató szintézisbe rendezni?

II. CÉLKITŰZÉS

Munkánk egyik célja egy könnyen használható, laboratóriumi léptékű, biogáztermelő modellrendszer létrehozása, valamint e rendszer működési folyamatának nyomon követését lehetővé tevő egyszerű, könnyen kivitelezhető és használható, többcsatornás gázhozammérő módszer illetve eszköz kifejlesztése volt.

További célunk volt biogáztermelő közösségek vizsgálata respiratorikus kinon-, membránzsírsav-, és DNS-alapú ujjlenyomatmódszerekkel: (a) egy mezofil és egy termofil, félüzemi szennyvíziszap-rothasztóból származó mikrobaközösség összehasonlítása, (b) könnyen bontható szubsztrátok adagolásának hatásvizsgálata mezofil közösségeken, laboratóriumi modellrendszer alkalmazásával, valamint (c) egy félüzemi biogázreaktorokon elvégzett, mezofilről termofil hőmérsékletre való felfűtési folyamat hatásának monitorozása.

Utóbbi munkáinkhoz kapcsolódóan célunk volt végül egy adatkezelési módszer kidolgozása is, melynek alkalmazásával kimutathatjuk a különböző ujjlenyomat-módszerekkel létrehozott közösségi markermintázatok elemeinek közös termelő szervezetektől való származását az eredeti adatsorokban rejtve maradó időbeli együttmozgások kimutatása révén.

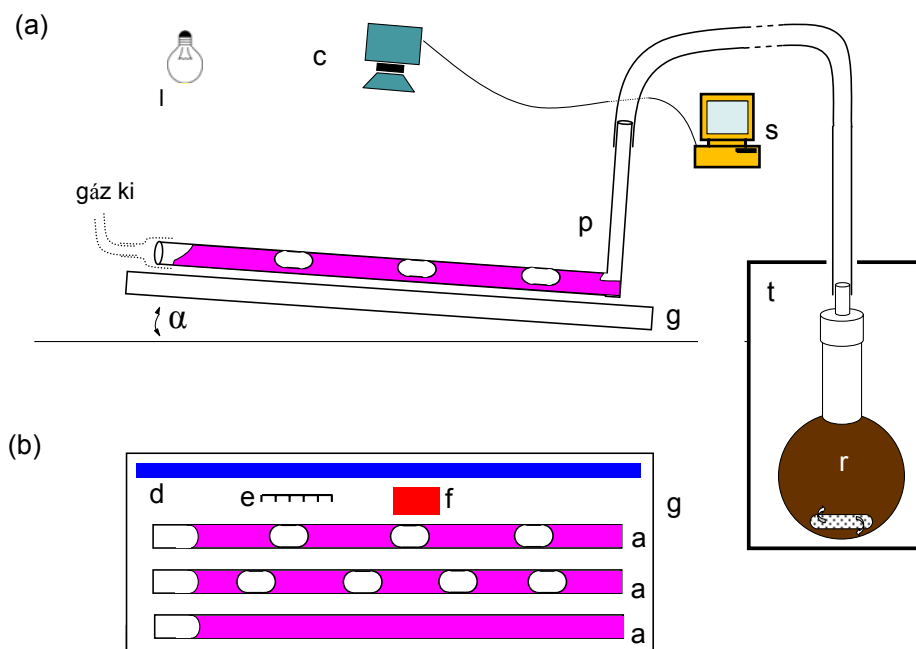
III. ANYAG ÉS MÓDSZER

III. A. Új módszer kidolgozása kis produkciójú gázforrások hozamának volumetriás mérésére

Az eszköz három jól elhatárolódó részből áll: 1: A csövek, melyekben a buborékok haladnak, és az ezeket körülvevő vizuális markerek. 2: Egy számítógéphez csatlakoztatható egyszerű kamera, és a számítógépen futó mintázatfelismerő szoftver.

Az eszköz párhuzamosan elhelyezett L-alakú üvegcsövekből, egy ezek rögzítésére, valamint ezek vizuális háttéréül szolgáló fehér tálcából, s az ezen elhelyezett színes jelekből áll, melyek a látvány értelmezését segítik a szoftver számára (1. ábra). A gáz nyomása a termelődés ütemében lassan nyomja lefelé a folyadékot az L-cső vékony ágában, s enyhe megdöntés esetén csak csekély ellennyomást kell leküzdenie. A könyökrészt elérve a gáz belép a vastagabb,

vízszinteshez közeli helyzetű ágba, majd a felhajtóerő valamint a felületi feszültség eredője szerint jól reprodukálódó módon szakad le a függélyes ág gázteréről, és önálló buborékként elindul a vastag csőágban. Amennyiben a folyadékot színes sókkal megfestjük, fölülnézetben a buborékok (az alattuk átáramló vékony folyadékréteg ellenére) a háttér színét engedik érvényesülni. Így egy egyszerű képelemző szoftver számára is könnyen értelmezhető képet kínál a cső: a folyadék színét mutató sávban a háttér színét mutató szakaszok (buborékok) jelennek meg, és mozognak állandó sebességgel egy irányba. A különböző reaktorokból táplált csövek párhuzamos elrendezésével több, de külön figyelemmel kísérhető sávot helyezhetünk a látótérbe, így minimális eszközbővítéssel többcsatornássá bővíthetjük eszközünket. A jó képalkotáshoz mindössze állandó, fehér, szórt fényre van még szükség, amely csillogás nélkül megvilágítja a csöveket (Tauber és mtsai. 2011).

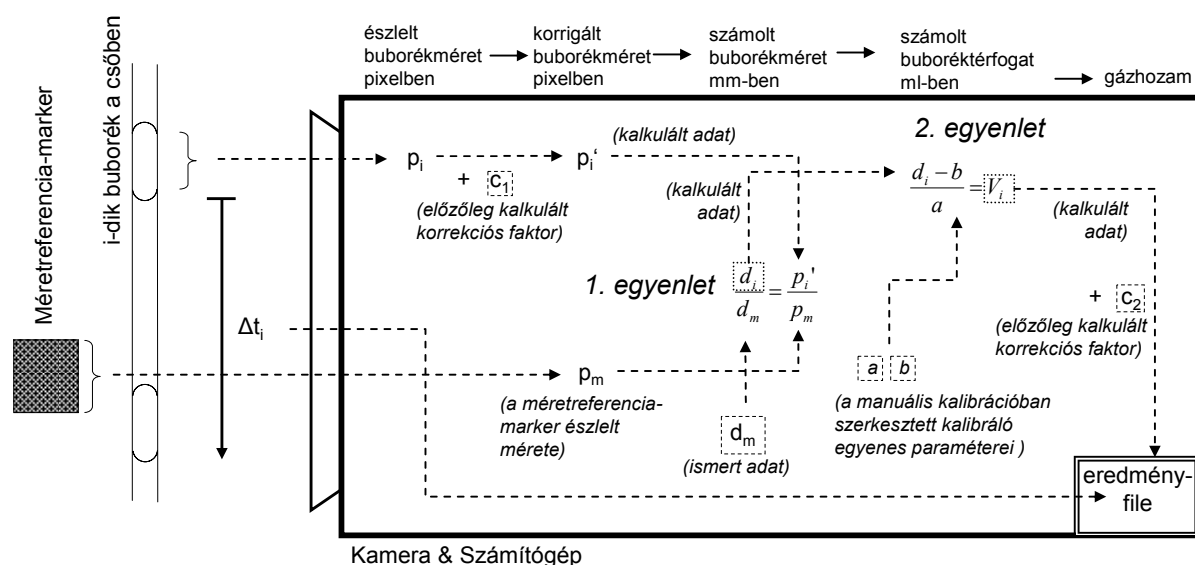


1. ábra. A gázhozammérő rendszer sematikus vázlata. (a) Oldalnézet: p L-alakú üvegcsővek festett folyadékkal töltve, bennük buborékok (fehér ellipszisek), g fehér tálca a csövek rögzítéséhez és vizuális háttérül, c kamera, l fényforrás, s számítógép, r kevertetett reaktor (gázforrás), t termosztátszekrény, α a megdöntés szöge (3-10°). (b) Felülnézet: d vizuális startvonal a szoftver számára a csövek automatikus kereséséhez, e milliméter-skála a manuális buborékméret-korrekcióhoz, f méretreferencia-marker automatikus buborékméret-meghatározáshoz.

Hogy számítógéppel végezhessük a buborék-képek automatikus analízisét, három feladatot kellett megoldani: pixel-osztályozás, buborékazonosítás és buborékméret-meghatározás. Az osztályozás egy egyszerű színelapú döntés, vajon a vizsgált pixel buborék, cső, színes marker vagy a háttér része-e. A döntés a három színkomponens (vörös, zöld, kék) mérésén alapszik egyszerű szín-szabályok és egy egyszerű döntési fa segítségével. Minden csőben külön történik a buborékok keresése. A pontos buborékméret-meghatározás céljából kerül a pontosan ismert hosszúságú színes méretreferencia-marker a látótérbe (1.b. ábra f). A szoftver minden észlelt buborék méretét összeveti e marker észlelt méretével, amiből meghatározható a buborék mm-ben kifejezett hossza, így a csövek és a kamera távolsága tetszőlegesen állíthatóvá válik. A buborék

térfogata arányos a buborék csőbeli hosszával. Manuális csőkalibrálás során megállapíthatjuk a buborék-hossz-értékeket a buboréktérfogat ellenében ábrázoló kalibrációs egyenes paramétereit, melyeket megadva a szoftvernek, az a buborék-hossz alapján kalkulálni tudja a buboréktérfogatot.

A szoftver azonban a meniszkuszok bonyolult fénytörési effektusai miatt fellépő fényerő- és színbeli eltérések következtében a meniszkuszok képi környezetét nem a buborék részeként fogja azonosítani, így a buborékok egy közel négyzetes résként jelennek meg a program számára a csőszínű sávban. Ezért a buborékok detektált hosszértékéhez rendre hozzá kell adnunk egy korrekciós faktort (c_1), amelyet pillanatfelvételek elemzésével állapíthatunk meg. Kalibráló mérések segítségével még egy korrekciós faktor (c_2) megállapítható, melyet a további buborékok térfogatához hozzáadva a szoftver kiküszöbölheti a kalibráló mérésben tapasztalt szisztematikus mérési hibát. A buborékszámoláson és -mérésen alapuló gázhozammérés elvét a 2. ábra mutatja.



2. ábra. A buborékészleléstől a hozamadatsor generálásáig tartó folyamat logikája. d_i az i -dik buborék hossza, d_m a méretreferencia-marker hossza, $[d]$ = mm; p_i és p_i' az i -dik buborék detektált illetve korrigált hossza, p_m a méretreferencia-marker detektált hossza, $[p]$ = pixelszám. V_i az i -dik buborék térfogata, $[V_i]$ = ml. Δt_i az $(i-1)$ -dik buborék és i -dik buborék észlelési időpontjainak különbsége. A szaggatott vonalkeretek a program számára a felhasználó által megadott paramétereket emelik ki. Az eredményfile egyszerű szövegfile.

III. B. Biogáztermelő szennyvíziszap-rothasztók mikrobiológiai vizsgálata

A vizsgált reaktorok és minták

Mezofil-termofil összehasonlításban egy-egy (összesen kettő), félüzemi reaktorokból származó mintát dolgoztunk fel. Könnyen bontható szubsztrátok adagolás-vizsgálatánál egy kontroll és két párhuzamosan kezelt laboratóriumi modellreaktorból nyolc időpontban vett, összesen 25 mintát dolgoztunk fel. A felfűtéses vizsgálatban egy fokozatosan és egy hirtelen felfűtött félüzemi reaktorból vettünk 8-8 mintát különböző időpontokban. A minták egy részletét DNS-munkákra, egy másik részletét szerves oldószerkeletben kemotaxonómiai elemzés céljára tettük el.

Az alkalmazott vizsgálati módszerek

Mindhárom munkánkban elvégeztük a közösségi zsírsavprofil vizsgálatát, továbbá a mezofil-termoofil összehasonlításban illetve a felfűtéses kísérletben a közösségi kinonprofil is megvizsgáltuk. DNS-alapú vizsgálatok terén mindhárom munkánkban alkalmaztunk T-RFLP vizsgálatot (16S rRNS-gén), ám míg az első és harmadik munkánkban ez a közösség egészére kiterjedt és klónkönyvtár-elemzés egészítette ki, addig második munkánkban, a könnyen bontható szubsztrátok adagolásának vizsgálatában csupán az Archaea közösségalkotókat vizsgáltuk e módszerrel (ekkor a metil-koenzim-M-reduktáz enzim α alegységét kódoló *mcrA* gént vizsgálva). A Bacteria közösségalkotókat ebben az esetben denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) módszerrel vizsgáltuk 16S rRNS génjeik alapján..

A lipidfrakció preparálása során Findlay¹ módszerét vettük alapul, amelyet több ponton módosítottunk. A minták kezelésük és tisztításuk során csak zsírtalanított, tiszta eszközökkel kerültek érintkezésbe.

A mintákat diklórmetán : metanol 2 : 1 arányú elegybe helyeztük. Foszfátpuffert mértünk az elegyhez, és 6 órán át, 4 °C-on kevertettük. 24 óra elteltével további 10 ml diklór-metánt és 10 ml desztillált vizet adunk a keverékhez, s a jobb sejtfeltárás érdekében 10 percre ultrahangos rázatóba helyeztük az üvegedényeket. Ezt követően 12 órán át állni hagytuk az elegyeket. Az üvegben ilyenkor jól láthatóan elkülönül egy alsó, diklór-metános, és egy felső, vizes fázis. Centrifugálással elválasztottuk az iszap szilárd alkotóit a folyadékfázistól. A kloroformos fázist Whatmann-papíron átszűrve különítettük el a benne maradt szilárd részecskéktől és a vizes fázis maradékaitól. A tisztított szerves fázis vákuumos bepárlását (Büchi Rotavapor R-200) követően a lipidoldékony anyagokat kloroformban vettük fel. A lipidek tisztítása illetve elválasztása szilikagél alapú oktadecil oszlopon (Baker Bond Phase C18, 40 μ m Prep LC Packing) kezdődött. Kloroform átfolyatásával a kinonok számos egyéb anyag kíséretében lemosódnak az oszlopról, míg a glikolipidek és foszfolipidek adszorbeálódnak az állófázishoz. Ezeket 10-10 ml acetonnal, illetve metanollal eluáltuk. A kinonok (kloroformos) és a foszfolipidek (metanos) frakcióját további feldolgozásig -20 °C-on eltároltuk. Az ubi- és menakinonok egyéb anyagoktól illetve egymástól való elválasztását Kieselgel 60 F₂₅₄ típusú szilikagél vékonyréteg, majd későbbi munkáinkban SepPak[®] (Waters) szilika oszlopokon végeztük hexán:dietiléter elegyek használatával. Az eluált frakciókat bepároltuk, majd acetonitril-izopropanol elegyben visszaoldva vetettük alá HPLC-analízisnek. Azonosításuk autentikus baktériumtörzsekből izolált kinonokhoz viszonyítva történt.

A foszfolipideket tartalmazó metanos frakcióval Welch² módszere alapján dolgoztunk tovább. Az oldat vákuum-bepárlását követően a lipideket metanol-toluol 1:1 arányú elegyében oldottuk vissza, metanos KOH (0,2 N) oldatot adtunk hozzájuk, s 15 percig 37°C-on inkubáltuk.

¹ Findlay R. H. (1996) The use of phospholipid fatty acids to determine microbial community structure. *Molecular Microbial Ecology Manual* 4(4): 1-17

² Welch D. F. (1991) Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4(4): 422-438

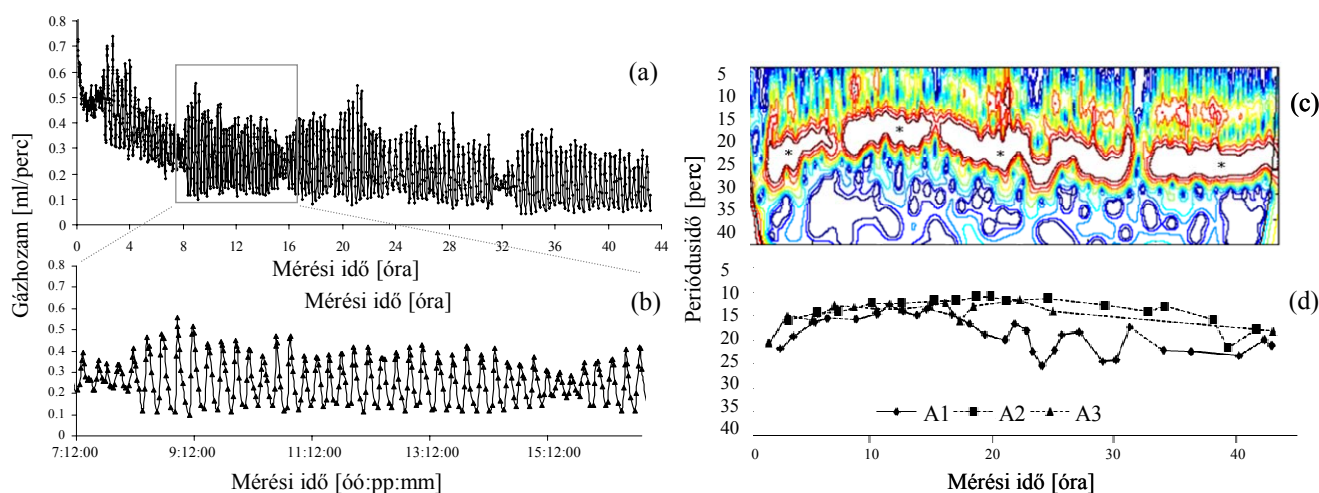
Ekkor történik a transzészterifikáció: a foszfolipidek zsírsavai metilészterekké alakulnak. Lehűlés után 0,2 N ecetsavoldatot adtunk az elegyhez, röviden (5 mp) vortexeltük a csöveket, majd kloroformot és desztillált vizet adtunk az elegyekhez. 30 másodperces erőteljes vortexeléssel a kloroformos fázisba ráztuk át a metilésztereket. A bepárolt, majd hexánban felvett metilésztereket gázkromatográfiával (HP 5890 gázkromatográf, HP1 kapilláris-oszlop, hélium vivógáz) választottuk szét. A zsírsavszármazékokat retenciós idejük alapján standard metilészterekhez viszonyítva határoztuk meg.

A módszerekkel nyert sokváltozós adatsorokat részben saját fejlesztésű szoftvereinkkel rendeztük illetve értékeltük.

IV. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

IV. A. Új módszer kidolgozása kis produkciójú gázforrások hozamának volumetriás mérésére

Elmondható, hogy (a) sikerrel megalkottunk egy mérési elvet és eszközt, mellyel párhuzamosan több kis hozamú gázforrás kibocsátása mérhető anélkül, hogy a gázforrások számának növelésével szorzatosan növekedne az eszközigény. Sikerrel kalibráltuk (b) standard gázforrás ellenében, és kielégítő mérési pontosságot értünk el. A módszer kiválóan működött bioreaktorok működésének nyomon követésében (c), amennyiben jól használható gázhozamprofilok generálásán túl a hozamok nem várt, rövid periódusidejű ingadozását is feltárta (3. ábra), és jól analizálható adatsorokat generált annak elemzéséhez. Igazoltuk, hogy a tapasztalt ingadozás oka a gáztermelő közösség működésében inherens módon rejlik, nem pedig kísérleti vagy mérési műtermékről van szó.



3. ábra. A1 periódus hozama maximális (mindenkori Δt -nyi) felbontással, melyen minden buborék adatpontja szerepel (a). A jelölt időszakokban a hozamingadozás frekvenciája maximális volt (b). A1 periódus hozamingadozásának Morell-féle hullámhossz-spektruma. (c), A reaktor hozamainak frekvenciaprofiljai (d)

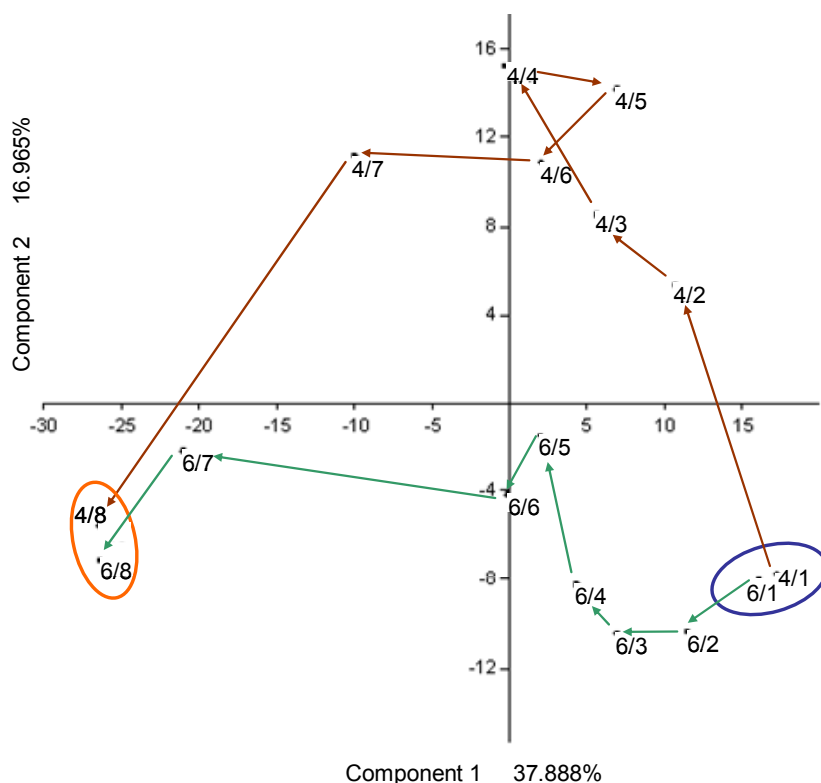
IV. B. A közösségvizsgálatok eredményei és értékelésük

A **mezofil-termofil összehasonlításban** a mezofil Archaea közösség domináns tagja a *Methanosaeta* fajt képviselte, emellett *Methanoculleus* és *Methanosarcina* fajokat azonosítottunk, valamint még tenyésztésbe nem vont Archaea-csoportok képviselőit. Ezzel szemben a **termofil** Archaea-közösséget egy *Methanosarcina* faj igen erősen dominálta. Két klón *Methanosaeta conciliine* illetve *Methanoculleus bourgensis*nek bizonyult 16S-rDNS szekvenciája alapján. A Bacteria közösségek esetében is szembevetendő a mezofil közösség nagyobb diverzitása. A domináns csoportok nagy része mindkét mintában eddig le nem írt, de környezeti klónként már kimutatott taxonok közeli rokonának bizonyult. Mindkét közösségből kimutattuk a Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides taxoncsoport tagjainak jelenlétét. Néhány esetben sikerült nemzetség-szintű meghatározást végeznünk klónok szekvenciaanalízisével, ahol a klónok a mintabeli csúcsokkal átfedő csúcsokat adtak T-RFLP-alapon. Ezek a klónok a *Nostocoida*, *Acidovorax* és *Smithella* nemzetségek tagjainak mutatkoztak a mezofil, és *Coprothermobacter*- illetve *Docdonella*-tagoknak a termofil közösségben. Zsírsvak alapján nem találunk komoly diverzitásbeli különbséget a kétféle reaktor között. Szembetűnő ugyanakkor, hogy a mintákból származó zsírsavmennyiség mezofil közösségből több mint háromszor akkora volt, mint a termofilokból kinyerhető. Jól látható a ciklopropil tartalmú (cy) és a többszörösen telítetlen (PUFA) zsírsavak kisebb arányú jelenléte a termofil reaktorban. A szulfátredukáló baktériumok zsírsavmarkerei (C_{15:1} és C_{17:1}) alárendelt szerepet mutatnak a zsírsavprofilok alapján, míg MK5(H2) kinonmarkerük erősen dominálta a kinonprofilokat. Ez azt mutatja, hogy bár a légző szervezetek között nagy arányban találunk szulfátredukálókat, a Bacteria-populációban mégis alárendelt a szerepük, a csoport nagy része tehát respiratorikus kinonokat nem termelő, fermentáló szervezet.

A **könnyen bontható szubsztrátok adagolása** jól látható, karakterisztikus változásokhoz vezetett a gázhozamban. A fehérje adagolása azonnali, markáns gázhozamnövekedést eredményezett. A keményítő adagolása kezdetben határozott hozamcsökkenéssel járt a kontrollreaktorokhoz képest. Ezt követően azonban erős hozamnövekedés indult meg jelentős időbeli eltolódással a két kezelt reaktor esetében. A C jelű kezelt reaktor jóval később reagált a keményítőadagolásra, mint a B jelű. Étolaj-adagolás esetén a kezelt reaktorok alacsonyabb, de állandóbb gázprodukciónak mutattak, mint a kontroll. A minták egymástól inkább a zsírsavtípusok mennyiségi arányaiban különböztek, mintsem a zsírsavak előfordulásában. A leggyakoribb zsírsavak az élővilágban általánosan elterjedt (így kevés taxonómiai információt hordozó) C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:0}, C_{18:1} zsírsavak valamint az elágazó láncú anteizo C_{15:0} és izo C_{15:0} zsírsavak voltak minden mintában. A minták zsírsav-alapú klaszteranalízise azt mutatta, hogy kontroll-minták hasonlítottak egymáshoz legjobban, az olajkezelt minták ezekhez közel kerültek, illetve további kontroll mintákkal keveredtek, míg a keményítő- és fehérjekezelt minták külön csoportosultak. A DGGE-mintázat alapján készített klaszteranalízis a zsírsavakéhoz hasonló módon egy csoportba rendezte a kontrollmintákat. A B reaktor esetében jól elkülönülnek a keményítőbontás

megindulása előtti és az azt követően vett minták. A fa topológiájáért felelős sávok nagy része kevert szekvenciákból állónak bizonyult, a kivágott sávok 22%-ának (14 sáv) esetében azonban sikerrel járt a szekvenciavizsgálat. Ez minden mintában Bacteroidetes-dominanciát mutat, de a Clostridiales és Thermotogales csoportok tagjai is kimutathatók voltak. A T-RFLP-profilok tanúsága szerint az Archaea csoport kisebb diverzitással képviselteti magát a közösségben. Csak a *Methanoculleus* csoportot sikerült nemzetség-szinten azonosítani. A közösség alkalmasint eleve fel van készítve fehérjebontásra, hiszen a kommunális szennyvíziszap nagy része bakteriális biomassza, így sok fehérjét tartalmaz. A keményítő késedelmes hozamnövelő hatása látványosan szemlélteti a baktériumok alkalmazkodását a megváltozott életkörülményekhez, valamint hogy ez az alkalmazkodás időt igényel. A lassú, de kiegyensúlyozott gáztermelés az étolaj adagolása során azt mutatja, hogy a közösségben folyamatosan jelen van a trigliceridek bontásának képessége, ám ez viszonylag lassú folyamat. Összességében szennyvíziszaprothasztó modellrendszerünk mezofil közösséget széles szubsztráthasznosítási spektrummal rendelkező, robosztus, Bacteroidetes dominanciájú közösségként írhatjuk le, mely kényelmes alanya lehet számos szubsztrátadagolási kísérletnek, amelyek kiváló és gyors nyomon követését teszi lehetővé a gázhozammérés.

A felfűtéses kísérletben a DNS-markerek mindkét reaktorban diverzitásingadozást mutattak a hőmérsékletváltást követő illetve a hőmérsékletemelés alatti időszakban, majd a termofil közösség stabilizálódásával a markerdiverzitás lecsökkent (összhangban a mezofil-termofil összevetés



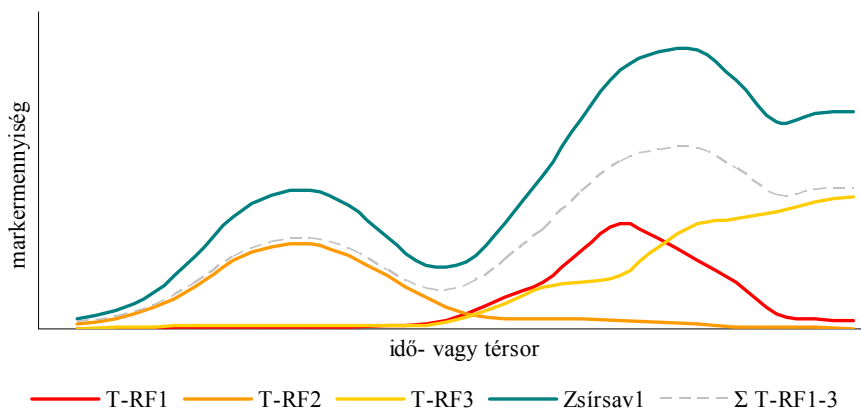
4. ábra. A három markertípus (TR-F, foszfolipid-zsír-sav és respiratórikus kinon) alapján végzett főkomponens-analízis konszenzus-eredménye a felfűtéses kísérletben. A kék kör a mezofil kiindulási állapotot, a piros a kísérlet végi termofil állapotot jelöli. A barna nyilak a 4-es reaktor (hirtelen felfűtés), a zöldek a 6-os reaktor (fokozatos felfűtés) közösségének szukcessziós útját követik.

eredményeivel). Ugyanez a tendencia mutatkozik meg enyhén a kinondiverzitásban. A zsírsavakból számolt diverzitásértékek nem mutatnak tendenciózus változást a hőmérsékletemeléssel. A klónok a Chloroflexi, Betaproteobacteria, Clostridia, Synergistetes, Thermotogae és Bacteroidetes phylumokba sorolhatók, egyet fajszinten is sikerült azonosítani

(*Defluviitoga tunisiensis*). A klónszekvenciákhoz a táblázatban bemutatott leírt fajokon kívül számos igen hasonló szekvencia adódott az adatbázis alapján: eddig nem tenyésztett környezeti klónok szekvenciái. Többségük anaerob iszapokból, biofilmekből vagy biogáz-reaktorokból került elő. Főkomponens-analízist végeztünk a három fő markertípus adatai alapján külön-külön, és az egyesített adatsorok alapján is. Mindhárom markertípus alapján kiválóan kirajzolódnak a jellegzetes szukcessziós útvonalak, és ez mondható el a konszenzus-ábráról is (4. ábra). A szukcesszió hirtelen felfűtés esetén „kaotikusabb” útvonalon halad, ám így is célba ér.

IV. C. A markerek korrelációs megfeleltetési stratégiájának kidolgozása

Amikor valaki közösségi ujjlenyomat-mintázatokat vet össze, tulajdonképpen nem tesz mást, mint a vizsgált markereknek egy idő-, tér- vagy állapotsor mentén való viselkedését veszi szemügyre, és ebből igyekszik információt nyerni a közösség történetéről. Erős markeregyüttmozgás esetén ilyenkor is közös termelőre kezd gyanakodni az elemző. Ha egy marker egy másik típusú markerrel mennyiségileg következetesen korrelál idő-vagy térsorokban, az közös termelő szervezet létét valószínűsíti. Arra azonban, hogy ne bakteriális markercsoporton belül, hanem különböző markercsoportok között végezzünk célirányos statisztikai felderítést termelősztintú összetartozások kimutatására (vagyis hogy időbeli együttmozgásokból kikövetkeztessük, hogy pl. mely kinon és T-RF származik a mintában ugyanattól a baktériumtól), tudomásunk szerint még nem volt példa a közösségmikrobiológiában. Az elsőre talán nem is komplikálnak tűnő feladat megfelelő kivitelezéséhez azonban különböző problémákkal kell szembenéznünk. Rögtön szembesülnünk kell a taxonómiai relevanciájukat tekintve átfedő markerek problémájával. Két baktérium, amelyek T-RF-eik alapján elkülöníthetők, könnyen lehet, hogy ugyanazt a zsírsavat termelik nagy mennyiségben ami ahhoz vezet, hogy a zsírsavmarker külön-külön egyik termelőjének T-RF-markerével sem korrelál különösebben jól, hanem azok mindenkori (mintákon belüli) összegével fog korrelálni. Az 5. ábrán mutatott esetben nem fogunk szemmel látható markeregyüttmozgást észrevenni egyszerű diagramokon (különösen ha sok egyéb marker adatai uralják az összképet), holott az információ mégis ott rejlik az adatokban! Kár volna lemondani róla, ha kinyerhető. A valóságban persze nem tudjuk, mely változókat kell összeadnunk az egyik markercsoportban, hogy aztán ez az összeg korreláljon a másik csoport valamely változójával. Maradt tehát a modern számítástechnika számítási kapacitását kihasználó „nyers erő” módszere: kombinatorikusan adjuk össze a változóink mennyiségeit mintánként, majd az így nyert *származtatott összegváltozók* között keressük azokat, amelyek kiugróan jó korrelációt mutatnak más változókkal.



5. ábra. Egy egyszerű, elképzelt mikrobaközösség markereinek változása idő vagy térsoron. A közösséget alkotó három faj elkülönül T-RF markerei alapján (T-RF1, T-RF2, T-RF3), miközben mindhárman ugyanazt a zsírsvav (Zsírsvav1) termelik. A termelt zsírsvav (hibátlan kimutatásokat feltételezve) egyik T-RF-fel sem korrelál jól külön-külön, ugyanakkor láthatóan nagyon jól korrelál a három T-RF mindenkori mennyiség-összegével (szaggatott vonal).

Egy erre alkalmas szoftver megírása önmagában nem nehéz, ugyanakkor különféle optimalizációkat kellett bevezetnünk, hogy alkalmas módszerhez jussunk:

- Marker csoportok közti összevetésben csak abszolút mennyiségi adatok használhatók.
- Több tagú összegek esetén a képződő összegváltozókat szűrni kell.
- Az eltérő nagyságrendben termelt markerek esetén kombinatorikus úton kell egy arányosító szorzótényezőt is találnunk az összegváltozók két tagjához, amellyel a változópár időbeli korrelációja maximális lesz a vizsgált külső változóval.

Szimulált adatsorok vizsgálati tapasztalatai alapján kidolgozott szoftverünk a felfűtéses kísérlet adatsorain kipróbálva jól értelmezhető találatokat adott. Így a domináns $C_{18:0}$ zsírsvav jó korrelációt mutat az $(Alu236-37+0.3644*Alu243)$ összegváltozóval ($r=0.9464$), amelyben a két T-RF-marker épp a mintáinkban is domináns *Levilinea saccharolitica* illetve a *Longilinea arvorisae* rokonfajok azonosított markerei. A *Defluviitoga tunisiensis* esetében várható kinonmarker megjelenése, mivel kénlégző szervezetről van szó, s T-RF-markere egy másik szervezetével összegezve jól korrelál az MK6(H4) kinon mennyiségének időbeli alakulásával.

V. A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- Tauber T., Berta B., Székely A. J., Gyarmati I., Kékesi K., Márialigeti K., Tóth E. (2006) Characterisation of community structure of bacteria in parallel mesophilic and thermophilic pilot scale anaerobe sludge digesters. Acta. Microbiol. Immun. Hung. 54 (1): 47-55
- Tauber T., Berta B., Szabó Z., Kovács J., Márialigeti K., Tóth E. M. (2011) A simple and novel volumetric method to metre low gas flows from laboratory-scale bioreactors and its application on laboratory sludge digesters. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90(4): 1453-1461
- Tauber T., Wirth B., Nikolausz M., Palatinszky M., Schumann P., Márialigeti K., Tóth M. E. (2013) The effect of easily degradable substrate feeding on the community structure of laboratory-scale wastewater sludge digesters. Acta Microbiol. Imm. H. 60(3): in press.