

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

MISETA ROLAND

A HARKÁNYI GYÓGYFÜRDŐ TERMELŐKÚTJAINAK KÉNES
KARSZTVIZÉBEN ELŐFORDULÓ BAKTÉRIUMKÖZÖSSÉGEK
FILOGENETIKAI DIVERZITÁSA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS



ELTE BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
ISKOLAVEZETŐ: PROF. DR. ERDEI ANNA

ZOOTAXONÓMIA, ÁLLATÖKOLÓGIA, HIDROBIOLÓGIA DOKTORI PROGRAM
PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. TÖRÖK JÁNOS

TÉMAVEZETŐ: DR. BORSODI ANDREA
PH.D., EGYETEMI DOCENS

BUDAPEST
2012.

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	1
2. Rövidítések jegyzéke	3
3. Bevezetés	4
4. Irodalmi áttekintés	6
4.1. Termál- és karsztvíztározók Magyarországon	6
4.2. A Villányi-hegység déli előterének hidrogeológiája	8
4.3. A Harkányi Gyógyfürdő termelőkútjainak műszaki adatai és a karsztvizek fizikai-kémiai jellemzői	11
4.4. A kénbaktériumok jellemzése	12
4.5. A biológiai kénkörforgalom	15
4.6. A kénes karszt- és termálvizek baktériumközösségei	16
5. Célkitűzések	22
6. Anyag és módszer	23
6.1. Minta vétel és minta-előkészítés	23
6.2. A minták mikroszkópos vizsgálata	25
6.2.1. Minta-előkészítés az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz	26
6.3. A közösségi DNS kinyerése és felszaporítása	26
6.3.1. A DNS kinyerése és tisztítása	26
6.3.2. A DNS detektálása agaróz gélelektroforézissel	27
6.3.3. A 16S rDNS szakasz felszaporítása polimeráz láncreakcióval (PCR)	28
6.4. Klónkönyvtár létrehozása és feldolgozása	29
6.4.1. A 16S rDNS PCR-rel kapott termékek tisztítása	30
6.4.2. A PCR termékek ligálása plazmidba	30
6.4.3. Transzformálás E. coli sejtekbe	31
6.4.4. Tenyésztés szelektív táptalajon	31
6.4.5. Az inszert-plazmidok kinyerése az E. coli sejtekből	32
6.4.6. Vektor specifikus PCR	33
6.4.7. Nested PCR	34
6.4.8. A PCR termékek restriktációs emésztése	35
6.4.9. Az emésztett DNS termékek detektálása és ARDRA-csoportosítása	36
6.4.10. Szekvenáló reakció	36
6.4.11. A szekvenáló reakció-termékek etanolos tisztítása	37
6.4.12. A szekvenáló reakció-termékek futtatása	38
6.4.13. Szekvenancia-elemzés	38
6.5. A klónkönyvtárak összehasonlítása és jellemzése ökológiai indexek alapján	38
6.5.1. Hasonlósági index	38
6.5.2. Diverzitás-index	39
6.5.3. Fajgazdagság-becslés	39
6.5.4. Fajtelítődési görbe	39
6.6. Denaturáló gradiens gélelektroforézis	40
6.6.1. GC-kapcsos semi-nested PCR	41
6.6.2. A poliakrilamid gél készítése DGGE-hez	42

6.6.3. A PCR termékek futtatása poliakrilamid gélben	43
6.6.4. A DGGE csíkok festése és dokumentálása	44
6.6.5. A DGGE csíkok kivágása, és az elválasztott 16S rDNS szakaszok szekvenancia-analízise	44
6.6.6. A 16S rDNS szakaszok felszaporítása PCR-rel	44
6.6.7. A PCR termékek tisztítása	45
6.6.8. Szekvenáló reakció	46
7. Eredmények és értékelésük	47
7.1. A termelőkutakból gyűjtött vízminták fizikai-kémiai vizsgálatának eredményei	47
7.2. A mikroszkópos vizsgálatok eredményei	48
7.3. A klónkönyvtárak feldolgozásának eredményei	51
7.3.1. A BTK-klónkönyvtár elemzése	53
7.3.2. A BT1-klónkönyvtár elemzése	57
7.3.3. A BT2-klónkönyvtár elemzése	61
7.3.4. A mattyi-klónkönyvtár elemzése	64
7.3.5. A T6-klónkönyvtár elemzése	68
7.4. A DGGE vizsgálatok eredményei	71
7.5. A molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeinek összehasonlító értékelése	77
7.5.1. A klónkönyvtárak eredményeinek összehasonlítása	77
7.5.2. A klónozással és DGGE-vel kimutatott baktériumközösségek összehasonlítása	79
7.5.3. A klónkönyvtárak eredményeinek statisztikai elemzése	82
7.5.4. A fizikai-kémiai paraméterek hatása a baktériumközösségek szerkezetére	86
8. Összefoglalás	87
9. Kivonat	92
10. Abstract	93
11. Felhasznált irodalom	94
12. Köszönetnyilvánítás	109
13. Függelék	110

2. Rövidítések jegyzéke

Általános rövidítések	
CFU	Colony Forming Unit
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
PCR	Polimerase Chain Reaction
BLAST	Basic Local Alignment and Search Tool
IPTG	Izopropil-béta-D-tio-galakto-piranozid
X-gal	5-bróm-4-klór-3-indolil-béta-D- galakto-piranozid
PAA	Poliakrilamid
APS	Ammónium-perszulfát
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilén-diamin
DEPC	Dietil-pirokarbonát
sp	species
bp	bázispár
Minták származásának rövidítései	
BTK	Büdöstapolca I-es és Büdöstapolca II-es termelőktől vízéből létrehozott kompozit minta
BT1	Büdöstapolca I-es termelőktől vízéből származó minta
BT2	Büdöstapolca II-es termelőktől vízéből származó minta
M	Matty-termelőktől vízéből származó minta
T6	Termál-VI-os termelőktől vízéből származó minta

3. Bevezetés

A monda szerint élt egyszer Nagyharsányban egy özvegyasszony, és annak egy világszép lánya. A lányt úgy hívták: Harka. Az Ördög szemet vetett rá, és megkérte feleségül. Az öregasszony nem akarta adni a lányát, de ellenkezni sem mert az Ördöggel, így hát teljesíthetetlen feltételhez kötötte a házasságot. Ha egy éjjel az Ördög kakasszóig felszántja a falu feletti kőhegyet, övé a lány. Ráállt az Ördög; befogott az ekébe hat pár fekete macskát, és esti harangszókor szántani kezdett. Kiment éjjel az öregasszony, és látta, hogy halad ám az Ördög. Majdnem az egész hegyet felszántotta már. Megijedt az öregasszony! Hanem eszébe jutott az egyezés. Maga kezdett el kukorékolni, mire felébredt az összes kakas, és azok is kukorékolni kezdtek. Az Ördög meg haragra gerjedt, hogy nem tudta megszerezni a lányt, elhajította az ekéjét (abból lett a beremendi hegy); kirázta a földet a bocskoraiból (abból lett a Göntér- és a Siklósi-hegy); majd nagyot ugrott és bebújt a földbe. Ahol eltűnt, ma is kénés forrás fakad, amelyet a "Harka" nevű lány után úgy hívnak: Harkány. A felszántott hegy ma is ott maradt, még a macskák körme nyoma is ott látható a sziklákon (Pesti, 2002).

Már a római kori Pannóniában is divatos volt a fürdőkultusz, melyet a régészeti feltárások során előkerült katonai és magánfürdők is bizonyítanak. *Aquincum* illír eredetű név, jelentése *bő víz*. A másfél évszázados török hódoltság idején számos, máig létező török fürdő létesült Magyarországon. Ez nem meglepő, hiszen a Korán a fürdözést előírja, ami az egészséget és a gyógyítást szolgálja. Egy korabeli török útleírás (1660 körül) kilenc budai és két pesti fürdőről számol be. A törökök Budán kívül építettek fürdőt Székesfehérváron, Hatvanban és Egerben is. A tudományos balneológia alapját a 18. században feléledő víz-elemzések jelentették. Friedrich Hoffmann (1660-1738) az egyes ásványvizeket az alábbi felosztásban csoportosította: hévizek, alkálivizek, konyhasós, glaubersós, keserűsós, vasas és szénsavas vizek. Az első részletesebb hazai elemzést Stocker Lőrinc Buda város orvosdoktora készítette 1721-ben a budai fürdőről "*Thermographia Budensis*" címmel, melyben a budai főforrásokat és termálvizeket, valamint azok orvosi felhasználását mutatja be. Mária Terézia parancsára Heinrich Johann Crantz bécsi kémikus professzor 1772-ben megvizsgálta az osztrák monarchia egészségügyi szempontból számba vehető forrásvizeit. Eredményeit magyarul 1783-ban adták ki "*A magyarországi orvóvizekről és a betegségekben azokkal való élésnek szabott módjáról*" címmel. A 18. század végéig a fürdők ellátása főként egészségügyi jellegű volt, amelyben különböző céhes mesterségek ötvözödtek, mint borbély-sebész-fürdős. Az első, egyetemi szintű vízanalitikai kutatómunkák Winterl József Jakab és Oesterreicher Manes József nevéhez fűződnek, akik a Pázmány Péter alapította nagyszombati egyetem

kémiai-botanikai tanszékén végezték magyarországi fürdővizek kémiai elemzését. Oesterreicher 1785-től Balatonfüred fürdőorvosa lett, nagy érdeme a füredi savanyúvíz elemzése. Kitaibel Pál (1757-1817) Winterl tanítványa új korszakot nyitott az analitikában: a víz fizikai-kémiai sajátosságait összefüggésbe hozta a fürdővíz környezetének földrajzi, közzetani tulajdonságaival, és együtt vizsgálta azokat. Kitaibel ismerte fel először tehát a balneológia, kémia, geológia szoros egységét. Erre az új komplex tudományos szemléletmódra épültek a 19. századi sikeres artézi kútúrások. Zsigmondy Vilmos (1821-1888) bányamérnök ezen a téren nagyszerű eredményeket ért el. Első sikeres kútúrását 1860-ban Harkányban végezte, majd a harkányi sikereket követően a hőforrások feltárásának és hasznosításának elméletével a Kiegyezés alatti Magyarország területén számos artézi kutat és hőforrást létesített, mellyel megalapozta sok mai gyógyfürdő kiépítését. 1865-ben közre adja "*Bányatan*" című könyvét, melyben többek között ismerteti az artézi kutak úrásával kapcsolatos tapasztalatait. 1868-ban kezdő, és 1878-ban fejező be az akkoriban rekord mélységűnek számított 970 m mély városligeti kút úrását, mely 74°C-os hévizet szolgáltat, és később erre a vízbázisra épült a Széchenyi fürdő. Than Károly (1834-1908) kémikus nevéhez fűződik a mai vegyérték kifejezés, ami pontosabb kémiai analíziseket tett lehetővé. A harkányi gyógyvíz-kutakban felfedezte a karbonil-szulfidot, amely a mélyben, nyomás alatt képződött kénvegyület, és a felszínre jutva belőle kén-hidrogén képződik. A 19. században egyre inkább elterjedt mélyúrési technikák lehetővé tették a korábbiaknál jóval nagyobb vízhozamú ásvány-és gyógyvízkutak kiépítését, amelyekből egyre nagyobb mennyiségű vizet tudtak nyerni, ezáltal a fürdők kapacitása is megnövekedett. Így a korábbi családi hangulatú közfürdők igazi népfürdőkké alakultak. A századfordulón megindult szénhidrogén-kutatás fellendítette az ország egész területére kiterjedő fürdőkultúrát. Pávai Vajna Ferenc Hajdúszoboszlón 1090 m mélyről jódos, sós vizet nyert kőolaj helyett, amire később a híres gyógyfürdő épült, majd 1932-ben szintén kőolaj-kutatás eredményeként gyógyvizet tártak fel Debrecenben is. A második világháborútól napjainkig Magyarországon számtalan, máig fontos gyógy-és ásványvíz-forrást tártak fel, melyek a mai fürdőkultúrát meghatározzák (Borszéki, 1979).

Mára hazánkban nagyszámú termál- és gyógyfürdőt tarthatunk számon, melyek rendkívül változatos összetételüknek köszönhetően különböző gyógyhatással bírnak. Különböző típusú gyógyvizeink többek között a konyhasós vizek (pl. Igal, Zalakaros, Gyula), jódos, brómos vizek (pl. Hajdúszoboszló, Győr), kénes, szulfidos vizek (pl. Harkány, Balf), szénsavas vizek (pl. Kapuvár), radonos vizek (pl. Hévíz, Eger, Rudas-fürdő, Gellért-fürdő).

4. Irodalmi áttekintés

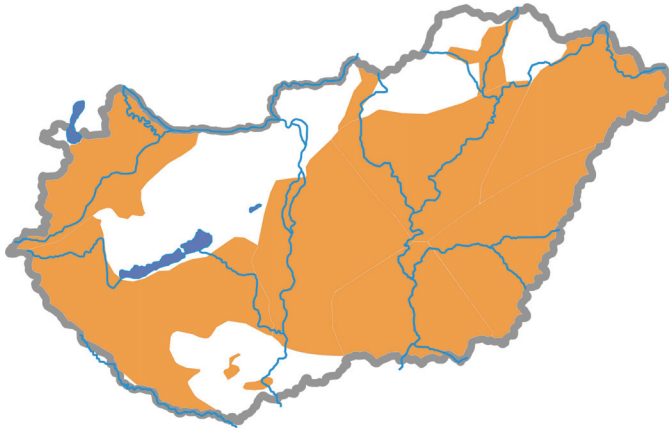
4.1. Termál- és karsztváltározók Magyarországon

A Kárpát-medencében a földkéreg vastagsága 24-26 km, mintegy 10 km-rel vékonyabb, mint Európa többi területén. Ez a tényező nagymértékben hozzájárul ahhoz, hogy a Föld magjából eredő hőlépcső, azaz a geotermikus gradiens értéke is magasabb ($5^{\circ}\text{C}/100\text{ m}$) a világátlaghoz (kb. $3^{\circ}\text{C}/100\text{ m}$) képest. A geotermikus hőlépcső Magyarországon belül is eltérő értékű: az Alföldön és a Dél-Dunántúlon nagyobb, a Kisalföldön és a hegyvidékeken kisebb (Liebe, 2006). Hazánkban a 30°C -ot meghaladó hőmérsékletű kifolyó víz termálvíznek (hévíznek) tekinthető (Liebe, 2006). Termálvíz az ország területének mintegy 70-80 %-án feltárható különböző, egymásra rétegződő, illetve egymásba ékelődő vízadó képződményekből. Gazdag termálvízkészletünk tehát – a vékony litoszférának és a fedőképződmények jó hőszigetelő képességéből adódóan – a kedvező geotermikus hőmérsékleti lépcsőnek köszönhető. A langyos vizű ($18\text{-}30^{\circ}\text{C}$) és termálvíz-forrásaink közül számos gyógyvíz minőségű, azaz kémiai összetételük révén bizonyítottan gyógyhatással rendelkeznek. Gyógyhatású vizek hazánkban elsősorban mozgásszervi és bőr megbetegedések, nőgyógyászati panaszok és keringési betegségek enyhítésére, illetve ivókúráként az emésztőrendszer funkciójának javítására alkalmasak (Szilágyi, 2006). Ilyen gyógyhatású víz a Harkányban található magas kén tartalmú langyos- és termálvíz, melynek az elsősorban reumás mozgásszervi megbetegedésekre gyakorolt kedvező hatása a vízben oldott redukált kénvegyületekkel hozható összefüggésbe.

A fent felsorolt természeti adottságok miatt hazánk termál- és gyógyvizekben kiemelkedően gazdag számtalan gyógy- és termálfürdőjével. Legnagyobb fürdőtelepüléseink a főváros és a Balaton mellett a legvonzóbb turisztikai célpontok közé tartoznak: Hévíz, Hajdúszoboszló, Bük, Zalakaros, Sárospatak, Debrecen, Harkány, Gyula, stb. Így elmondható, hogy felszínalatti gyógy- és hévizeink a gyógyturizmust meghatározó iparággá tették, és Magyarország méltán viseli a "Fürdőnagyhatalom" címet.

Magyarország területén két nagy jelentőségű és kiterjedésű termálvíz-tároló rendszer különíthető el. Az egyik a repedezett, viszonylag rövid idő alatt utánpótlódó mészkő-dolomitos felszínalatti termálkarszt víztestek rendszere, mely hidraulikailag döntően fedetlen karbonátos kőzetekhez kapcsolható, így ezen víztartók vize a felszínről leszívargó hideg vízzel keveredhet. A másik fő víztározó-típus a porózus termál felszín alatti víztestek-rendszere, azaz a Kárpát-medence felső, pannóniai-negyedidőszaki törmelékes összlete

(Liebe, 2001). Hazánkban a felszín alatti víztározók felszín alatti víztestek szerinti feltérképezését a regionális Környezetvédelmi és Vízügyi Igazgatóságok végezték el (1-2. ábra). Az EU Vízkormányozási Rendszer (WFD) fogalom meghatározását követve a "felszín alatti víztest" a felszín alatti víznek egy víztartón vagy víztartókon belül lehatárolható részét jelenti, melynek felső határa a terepfelszínhez legközelebb található vízfelszín, alsó határa a már vizet nem tároló kőzetek, illetve medence aljzat képezi. (A termálkarszt és porózus termál felszínalatti víztestek listáját, illetve a víztározók ösztérületének összehasonlítását a Függelék 1. táblázata tartalmazza).



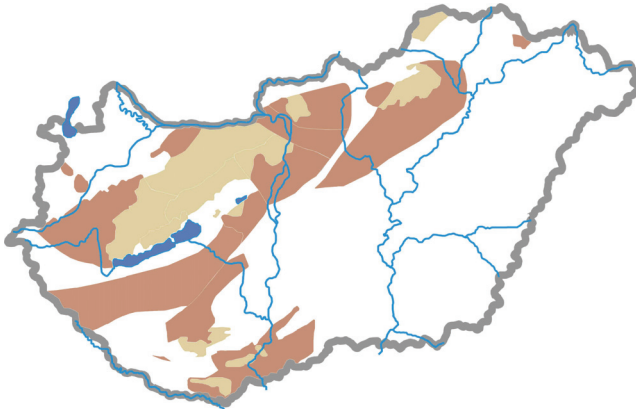
1. ábra Porózus víztározók Magyarországon

Forrás: EU VKI, 2007 (Narancssárga területek: porózus víztározók)

A harmad- és negyedidőszakbeli, főként homokos kőzetrétegekből felépülő porózus, törmelékes, nagy kiterjedésű hévíztározók elsősorban a Kisalföld és az Alföld térségére jellemzőek. Ezek a rétegek néhol agyagos-márgás vízzáró rétegekkel keverednek. A pannóniai-üledékes hévíztározók vize jellemzően magas nátrium-, kálium- és hidrogénkarbonát-tartalmúak, amelyben az összes oldott sótartalom elérheti vagy meg is haladhatja a 10000 mg l^{-1} értéket is. Ezen kívül a mélyebb rétegekben különböző szénhidrogének felhalmozódása is megfigyelhető, ezek főként metángáz, fenol vagy olaj formájában vannak jelen a kutak vizében (EU VKI, 2007).

Karsztos termálvíztározókból fakadó hévizeket elsősorban a mezozoós mészkő- és dolomithegységeink peremén találunk (Hévíz, Buda, Eger), melyek a vízzáró fedőrétegek alatt, több száz illetve ezer méter mélységben, nyomás alatt áramlanak a karsztos közettömegek repedésrendszereiben a felszín felé. Vízvezető- és tároló karsztos kőzetek a

hegyvidékektől távolabbi vidékeken a vízfogó medenceüledékek (elsősorban agyagos-agyagmárgás képződmények) alatt is megtalálhatók, melyek egymással hidraulikailag minimális kapcsolatban állnak (Liebe, 2006). A karsztvizek kémiai összetételét a víz felszíni vagy mélységi eredete, illetve azok a karbonátos kőzettömegek határozzák meg, amelyek repedésein, hézagain átáramlik a víz. A felülről beszivárgó szén-dioxid-tartalmú víz, illetve a mélységű eredetű vizek szén-dioxid tartalma oldja a karbonátos kőzeteket, ettől hidrogén-karbonátos jellegű vizekké válnak (pl. Hévíz, Harkány). A mélységi feláramló hévíz útja során különböző ásványokkal érintkezik, amelyek végső soron nagymértékben meghatározhatják a feltörekvő víz további kémiai jellegét. Így a mélységi átalakult és mélykarsztos kőzetekből származó szulfid-ásványokból szulfid oldódhat a vízbe, mely a felsőbb rétegekben tovább oxidálódhat szulfáttá, aminek következtében a karsztvizek szulfát-, illetve szulfid-tartalma jelentősen megnőhet (Goldscheider és mtsai, 2010; Szilágyi, 2006).



2. ábra Karsztvíztározók Magyarországon

Forrás: EU VKI, 2007 (Világosbarna területek: hideg karsztvíztározók, sötétbarna területek: termál karsztvíztározók)

4.2. A Villányi-hegység déli előterének hidrogeológiája

A Villányi-hegység a Dunántúl és egyben Magyarország legdélebbi fekvésű hegysége. Északi-déli kiterjedési maximuma 7 km, míg kelet-nyugati irányban mintegy 30 km hosszan terül el. Területe 50 km², átlagos magassága 230-270 m, legmagasabb pontja a 442 m magas Szársomlyó, más néven Nagyharsányi-hegy. A hegység déli előterének lankáin a Dráva-síkon három város fekszik: Harkány, Siklós és Villány. A Villányi-hegység szigetként emelkedik ki a Dél-Dunántúl alacsonyabb tájaiból. A hegység fő tömegét alkotó üledékes kőzetek a késő-

karbontól a kréta időszakig (300-140 millió éve) rakódtak le. A hegység déli előterét alkotó Dráva-sík kitöltésében harmadidőszaki (5-20 millió éves) miocén üledékrétegek, alapvetően vízfogó és hőszigetelő tulajdonságú, vastag agyagos-márgás pannóniai rétegek és negyedidőszaki homokos üledékrétegek vesznek részt, mely utóbbiak a felszíni képződményeket alkotják. A Dráva-medence síkját alkotó üledékrétegek a Horvátországban található mintegy 950 m magas Papuk-hegység lábáig húzódnak. A hegység fő tömegét alkotó eredetileg vízszintes rétegek a hegységképző mozgások során észak-északnyugat felé zsindeyszerűen egymásra torlódtak, hét, déli irányba dőlő "pikkelyt" kialakítva, melynek nagy részét mészkő alkotja. A mészkő a talajon átszivárgó, szénsavval dúsuló víz hatására könnyen oldódik. A kalciumban gazdag vízből az ásványi anyagok könnyen kiválnak, így a kőzetek felszínén és belsejében kialakult oldásformák következtében a terület változatos karsztjelenségekben bővelkedik. Ilyen karsztjelenségek a Villányi-hegység egy részén a fedetlen mészkő felszíni kibukkanásai: a karrok, barlangok, hasadékok és gömbfülkék, valamint a barlangok falát borító kalcit anyagú kiválások, úgy, mint cseppkövek és borsókövek (Dezső és mtsai, 2004).

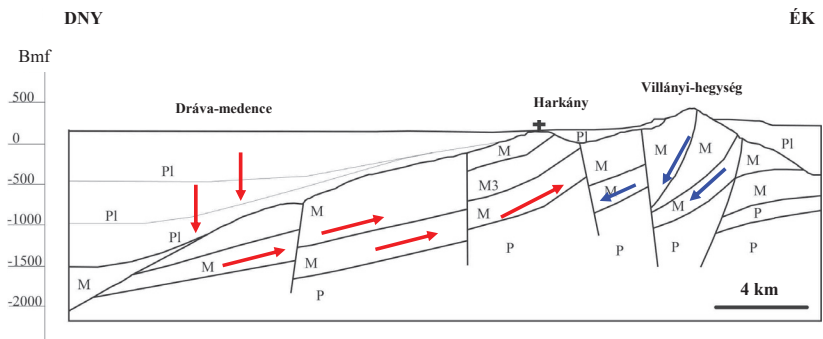
A villányi térség hidrogeológiájának megismeréséhez elsősorban Lorberer Árpád és Liebe Pál korábbi méréseire és tanulmányaira támaszkodhatunk, akik az 1980-as években Magyarországon elsőként tanulmányozták mélyrehatóan a baranyai termál karsztvízrendszerek hidrogeológiai és termális jellemzőit.

A Villányi-hegység és déli előterén előforduló kőzetek vízföldtani tulajdonságait tekintve három képződménycsoportra oszthatók (3. ábra):

- Az alapkőzetet metamorf vagy átalakult kristályos pala összlet (csillámpala, gneisz), valamint az erre települő perm-alsó triász homokkő, helyenként metamorf kvarcporfir összlet adja, amelyek együttesen vízfogó képződmények;
- Az erre települő, a hegység fő tömegét alkotó mezozoós mészkő-dolomit összlet, melynek csupán kis része van felszín felett, viszont nagy szerepet játszik a dinamikus vízkészletek utánpótlásában. A mészkő rétegsor üledékekkel fedett lesüllyedt részei (1500-2000 m) nyomás alatti termálkarszt-tározóként működnek;
- A karsztra települő, déli irányban egyre vastagodó harmad-negyedidőszaki homokos-agyagos pannóniai üledék rétegzett víztároló rendszert képez.

A korábbi geológiai kutatások (Rakusz és Strausz, 1953) és a 2007-2008-ban végzett hidraulikai vizsgálatokba bevont közel 30 termelő és monitoring kút mérési eredményei arra utalnak, hogy a karsztosodott összetelt déli irányból a metamorf aljzatra rátelepül, majd északi irányba a Villányi-hegység peremén felhajolva a felszín közelébe, illetve a felszínre emelkedik. A villányi termálkarszt utánpótlódása feltételezhetően zömmel délről, a Dráva-medence túlnyomós mélyzónájából a metamorf alapkőzet és mészkő határvonaláról származik. Ezen termálvizek átalakult metamorf kőzetek vizeivel való rokonságát, mélységi eredetét a magas (11 mg l^{-1}) szulfid- és szénhidrogén-tartalom is igazolja. A metamorf alapkőzetet takaró mészkő repedései és törései áramlási pályaként szolgálnak a feláramló termálvíz számára. Mivel Harkány egy mészkőrög tetején fekszik, ezért itt a karsztvíztározó már 50 m mélységben is tartalmaz termálvizet. Északi irányból a Villányi-hegység felszíni karszt területéről beszivárgás útján a hideg karsztvíz egy része karsztforrásokon lép ki és távozik a rendszerből, jelentős hányada viszont a karszt áramlási pályáin lefelé áramlik a karsztvíztározókba, miközben mérsékelten felmelegszik. Így a langyos karsztvíz és a feláramló termálvíz különböző mértékű keveredése adja a karsztvíztározókból különböző pontokon vett vízminták fizikai és kémiai heterogenitását (Harkányi Gyógyfürdő Zrt., 2008).

A mélységi eredetű feltörő meleg vizek és a hideg karsztvizek vízkor radiokarbon (^{14}C) kormeghatározási módszerrel meghatározott korkülönbsége is az eltérő eredetre utal. A legidősebb vízkorok a harkányi termálkutakra (31400-32600 év) voltak jellemzők. A Matty-kút vize 26500 éves, míg a büdöstopolcai kutak vízkorában nagy különbségek mutatkoztak: a Büdöstopolca II-es kút vize 4900 évesre, míg a I-es kút vize 590 évesre volt becsülhető (Harkányi Gyógyfürdő Zrt., 2008).



3. ábra A Villányi-hegység és déli előterének földtani szelvénye és hidrodinamikai modellje

Forrás: Harkányi Gyógyfürdő Zrt., 2008. Bmf: Balti magassági fok méterben megadva [Piros nyíl: termálvíz feltételezett áramlási pályája, Kék nyíl: hideg karsztvíz feltételezett áramlási pályája, PI-pleisztocén, pannóniai kőzet, M-mezozoós mészkő, P-perm, metamorf alapkőzet (gneisz, csillámpala)]

Mind a földtani szelvények vizsgálata, mind a hidraulikai vizsgálatok alapján felállított hidrodinamikai modell szerint tehát két fő utánpótlódási irány valószínűsíthető (3. ábra). Az alapvetően a Villányi-hegység fedetlen karszt-területéről származó hideg karsztvíz keveredik a Dráva-medencéből a metamorf kőzet és a mészkőtakaró felől származó és a fedett karsztban feláramló termálvízzel, ami eltérő összetételű és eltérő hőmérsékletű vizeket eredményez.

4.3. A Harkányi Gyógyfürdő termelőkútjainak műszaki adatai és a karsztvizek fizikai-kémiai jellemzői

A Harkány Gyógyfürdő Zrt. négy, 60°C körüli kifolyó vízhőmérsékletű termálkutat (Termál III-, IV-, V-, VI-os kutak), ezen kívül két langyos vizű (18-23°C) gyógyvíz kutat (Büdöstopolca I-es, II-es kutak), valamint egy langyos vizű (25-26°C) ásványvizes kutat (Matty-kút) üzemeltet. A négy pozitív termálkút, köztük a vizsgálatba vont Termál VI-os kút a gyógyfürdő területén található, és egymás közvetlen szomszédságában állnak. A termálkutat vízadó képződménye 47-52 m mélységű dolomitos mészkörteg, a бүдöstopolcai kutaké 50-80 m mély dolomitos mészkörteg, a Matty-kút vízadója pedig 72-91 m mélységben húzódo szürke mészkő (Függelék 2. táblázat).

A termális kútvek nagyobb szulfid-, nátrium- és klorid-tartalmúak, emellett magasabb vízkor jellemzi őket, ami részben a mélységi fedettkarszt, illetve szénhidrogén-tartó metamorf kőzetek határzónájából való származásra utal. Ezzel szemben a langyosvizű бүдöstopolcai kutak a termális kútvekhez képest alacsonyabb szulfid-tartalmúak, viszont nagyobb kalcium- és magnézium-tartalmúak, ami a Villányi-hegységi fedetlen karszt hasadékos víztárolókból való származásra utal. A Matty-kút vize mind a vízhőmérséklet, mind az egyéb fizikai és kémiai tulajdonságok tekintetében kevert genetikájú, azaz a mélységi termálkarszt és a leszivárgó hidegkarszt vizek tulajdonságai keverednek benne (Függelék 3. táblázat). [A ^{14}C -vízkor meghatározás eredményeiből is feltételezhető, hogy a harkányi gyógyfürdő vizsgált termelőkútjai különböző vízadó képződményekben mélyültek. A fedetlen karszt intenzív vízáramlási zónáiban a vízkicserélődés viszonylag gyors, így a hidegebb vizű бүдöstopolcai kutak vízkora nagyságrendekkel kisebb, mint az elsődlegesen a Dráva-medencéből a fedett karsztból feláramló mélységi vizeké. A feláramló vizek a helyenként hozzájuk keveredő friss felszíni karsztvízzel összességében azonban kevert genetikájú és eltérő korú vizeket adnak (Harkányi Gyógyfürdő Zrt., 2008).] A termelőkutat anoxikus vízének magas szulfid-tartalma a mélységi zónából, feltehetőleg a fedett karszt szulfid-

ásványaiból származik, amelyekből magas hőmérsékleten és nyomáson a hévíz a kén-tartalmú ásványt oldja, így oldott redukált kénformák szabadulnak fel.

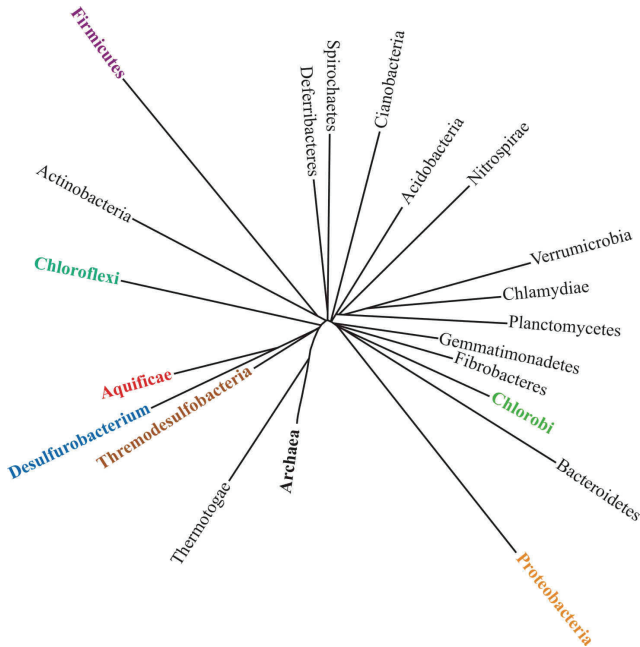
4.4. A kénbaktériumok jellemzése

A "kénbaktérium" elnevezés meglehetősen tág gyűjtőfogalom, melybe mind filogenetikailag, mind anyagcseréjükét tekintve változatos baktériumok tartoznak. Közös tulajdonságuk abban rejlik, hogy a sejteik szerves szénvegyületeinek beépítéséhez szükséges energiát vagy a környezetből vett redukált kénformák oxidálása vagy az oxidált kénformák redukálása révén nyerik. Anyagcseréjükét tekintve négy nagyobb csoportba sorolhatjuk őket:

Kemolitotróf kénbaktériumok (kénoxidálók) elektron-transzport rendszerében a S^{2-} , S^0 vagy $S_2O_3^{2-}$ szolgál elektron-donorként, végső elektron akceptoruk legtöbbször az oxigén. Szénforrásuk a vízben oldott CO_2 vagy a karbonát, illetve a hidrokarbonát-ion. Aerob képviselői zömmel a Beta- és Gammaproteobacteria osztály különféle nemzetségeibe (pl. *Beggiatoa*, *Thiobacillus*, *Thiothrix*, *Thiovirga*) tartoznak. Az anaerob kénoxidálók változatos elektrontranszport rendszere lehetővé teszi számukra a változó életkörülményekhez, és változó erőforrásokhoz való alkalmazkodást. Így számos fajuk (pl. *Sulfurospirillum deleyianum*) elektrondonorként hidrogént és szulfidot, elektronakceptorként pedig nitrátot használnak. Ugyanakkor ezek a baktériumok szerves szénforrás jelenlétében szulfidot használnak energiaforrásként (Eisenmann és mtsai, 1995). Ez a csoport elsősorban az Epsilonproteobacteria osztályba sorolt nemzetségek (pl. *Sulfurospirillum*, *Sulfurovum*, *Sulfuricurcum*, *Sulfurimonas*) fajait tartalmazza. A kemolitotrófok legősibb képviselői azonban az Aquificae törzsbe tartozó extremofil, anaerob kénoxidálók (pl. *Sulfurihydrogenibium*) (4. ábra), melyek a *Bacteria* domén egyik legkorábbi leágazását képviselik (Zinder és Dworkin, 2006;).

A szulfátredukálók a szulfátot szulfiddá redukáló anaerob baktériumok gyűjtőneve. Elektrondonorként hidrogént, szerves savakat vagy alkoholokat, végső elektronakceptorként pedig a SO_4^{2-} -ot használják, azaz az anaerob légzés során az oxigén helyett szulfáttal "lélegeznek". A SO_4^{2-} redukciója során végül H_2S -ot képeznek (Rabus és mtsai, 2006). A legtöbb szulfátredukáló baktérium ugyanakkor képes más, oxidált szerves kénformákat (SO_3^- , $S_2O_3^{2-}$, S^0) is redukálni. Autotróf és heterotróf életmóda is képesek. Autotrófia során a H_2 elektrondonor, szénforrásként pedig CO_2 -ot használnak. Filogenetikailag diverz közösséget képviselnek. A legtöbb szulfátredukáló baktérium Gram-negatív, mezofil deltaproteobaktérium (pl. *Desulfocapsa*, *Desulfopila*, *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*,

Desulfotalea, *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfobulbus*), ugyanakkor a Gram-pozitív endospóra-képző szervezeteket magába foglaló Firmicutes törzs (pl. *Desulfotomaculum*), illetve az ősi típusú, termofil, *Thermodesulfobacteria* törzs (pl. *Thermodesulfobacterium*) is tartalmaz szulfátredukáló baktériumokat (Rabus és mtsai, 2006).



4. ábra A Bacteria doménbe tartozó törzsek 16S rRNS gén alapú filogenetikai fája a kén körforgalomban résztvevő szervezetek kiemelésével
(A fán nincs feltüntetve a domén összes törzse.)

A leágazások hossza a filogenetikai távolsággal nem arányos. Forrás: Handelsman, 2004.)

A kénredukáló baktériumok kizárólag az elemi kén redukációjára képes anaerob heterotróf baktériumok, melyek elektrononorként szerves molekulákat (pl. etanol, tejsav, ecetsav), elektronakceptorként elemi ként használnak, és annak redukálásával H_2S -t képeznek. Szénforrásként szerves vegyületeket használnak. Tagjai a Proteobacteria törzs Delta-, illetve az Epsilonproteobacteria osztályba tartoznak (pl. *Desulfuromonas*, *Campylobacter*). Az anoxikus, kéntartalmú hévizes élőhelyekeken a kénredukáló baktériumok gyakran az ősi életformát képviselő anaerob, termofil kénredukáló *Archaea*-nemzetségekkel (pl. *Pyrodictium*, *Pyrolobus*) együtt fordulnak elő (Rabus és mtsai, 2006).

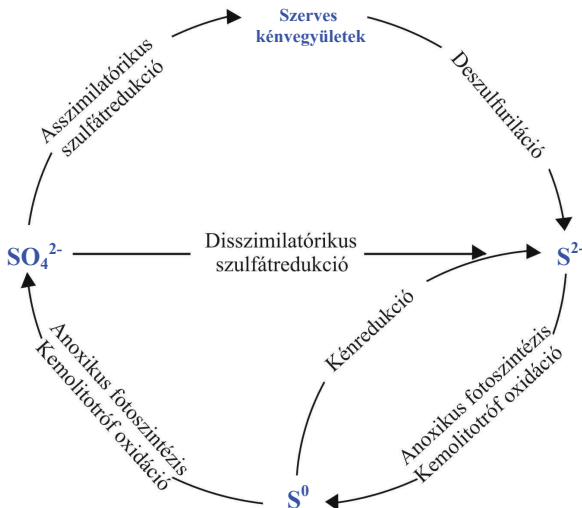
A fotoszintetizáló kénbaktériumok a vizes környezetek mélyebb, anaerob zónáiban élnek, a fényenergia hasznosítására képesek, és autotróf vagy heterotróf anyagcserével rendelkeznek. Jellemző színanyaguk a bakterioklorofill-a és a különféle karotinoid-típusú pigmentek, amikkel a vizek mélyebb zónába is lejutó nagy hullámhosszú és kis intenzitású vörös fényt képesek hasznosítani fotoszintézisükhöz. Ezek a színanyagok vagy a sejtek membrán-betüremkedéseiben (kromatofórákban) diffúzan oszlanak el, vagy a sejtmembránhoz kapcsolódó kloroszómákban koncentrálnak. A NADH vagy NADPH képzéséhez szükséges elektront redukált kénformák (H_2S , a S^{2-} , a S^0 , vagy $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) oxidációja során nyerik, így elemi ként vagy szulfátot hoznak létre. Szénforrásuk általában a vízben oldott CO_2 vagy a karbonát illetve a hidrokarbonát-ion. Az anoxikus fotoszintetizáló baktériumok közé tartoznak a bíbor kénbaktériumok, a bíbor nem-kénbaktériumok, a zöld kénbaktériumok, valamint a zöld nem-kénbaktériumok. A bíbor kénbaktériumok a Beta- és Gammaproteobacteria osztályok tagjai (pl. *Chromatium*, *Thiocapsa*, *Thiopedium*), az elemi ként sejten belül deponálják. A bíbor nem-kénbaktériumok kemoheterotróf/fotoheterotróf szervezetek, melyek anoxikus körülmények között, szerves vegyületek hiányában fotoautotróf növekedésre is képesek. Ekkor szervesetlen elektronforrásokat (hidrogént, szulfidot) használnak, szénforrásuk pedig a vízben oldott CO_2 . Képviselőik az Alpha- és Betaproteobacteria osztályba tartoznak (pl. *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*). A zöld kénbaktériumok a Chlorobi törzs (pl. *Chlorobium*) képviselői, melyek extracelluláris kénfelhalmozásra képesek. A zöld nem-kénbaktériumok fonalas szerveződésű kemoheterotróf/fotoheterotróf baktériumok, melyek hasonlóan a többi színes anaerob kénbaktériumhoz, elektronforrásként a környezetében lévő szulfidot oxidálja szulfáttá. Ezt a fotoszintetizáló baktériumcsoportot a Chloroflexi törzs tagjai (pl. *Chloroflexus*) képviselik (Overmann és Garcia-Pichel, 2006). A zöld nem-kénbaktériumok tekinthetők a legősibb fototróf élőlényeknek, mivel a törzsfajlás során a fotoszintézisre képes élőlények közül ők képeztek legkorábban leágazó önálló filogenetikai csoportot (4. ábra). A fotoszintetizáló kénbaktériumok és a szulfátredukáló baktériumok között szoros anyagcsere-kapcsolat is kialakulhat, hiszen a fototróf kénbaktériumok számára szükséges szulfidot, mint elektronforrást gyakran a szulfátredukáló baktériumok biztosítják azáltal, hogy a szulfátot, mint végső elektronakceptor, szulfiddá redukálják (Schink és Stams, 2006).

4.5. A biológiai kénkörforgalom

A természetben zajló biológiai kén-körforgalom összetett, sok lépésből álló rendszer, mivel a kén számos oxidációs formában (S^{2-} , S^0 , SO_3^- , SO_4^{2-} , $S_2O_3^{2-}$) fordulhat elő. A kén különböző külső forrásokból (holt szerves anyagokból, a légkörből, antropogén tevékenységek, kőzetek oldása, vulkanikus tevékenységek során) juthat a biológiai kénciklusba.

A *deszulfurizáció* folyamatában a holt szerves anyagok kéntartalmú összetevőiből (pl. aminosavak, proteinek) a mikroorganizmusok H_2S -t szabadítanak fel (5. ábra).

A *szulfidoxidáció* során a szulfid rendszerint szulfiton keresztül szulfáttá oxidálódik. A folyamatot aerob vagy anaerob körülmények között a kemolitotróf kénbaktériumok (pl. *Thiobacillus*, *Thiothrix*, *Sulfurospirillum*), illetve az anoxikus fotoszintetizáló baktériumok (pl. *Chlorobium*, *Chloroflexi*, *Chromatium*, *Thiopedia*, *Rhodobacter*) végzik (Kelly és Wood, 2006; Overmann és Garcia-Pichel, 2006). Az oxidáció során az oldhatatlan elemi kén, mint oxidációs köztes termék energiaraktárként funkcionál, és sejten belül raktározódik (pl. *Thiothrix*), vagy az extracelluláris térbe ürül (pl. *Chlorobium*). Ezek a baktériumok a kénhidrogén oxidálásával egyben az élő vizek toxicitását is csökkentik.



5. ábra A biológiai kénkörforgalom fontosabb folyamatai

A *szulfátredukció* két eltérő (asszimilatórikus, disszimilatórikus) úton mehet végbe. Az asszimilatórikus szulfátredukció folyamatában a baktériumok mellett a növények is igen fontos szerepet játszanak, hiszen a szulfát a növények számára felvehető egyik legfontosabb kénforrás. A redukció során keletkező szulfid szerves molekulák SH-csoportjaként (pl. aminosavakban) épül be a növényi szövetekbe vagy a baktériumsejtekbe. Az asszimilatórikus útvonaltól eltérően, a disszimilatórikus szulfátredukció folyamatában a szulfátredukáló baktériumok a szulfátot elektronakceptoroként hasznosítják, azaz energiát nyernek vele, és a keletkező szulfidot a környezetükbe választják ki. Anaerob környezetben a szulfátredukáló baktériumok (pl. *Desulfocapsa*, *Desulfopila*, *Desulfobacter*) a szulfátot hidrogén vagy szerves molekulájú elektron donorok segítségével redukálják szulfiddá (Rabus és mtsai, 2006). A kén körforgalomban az elemi kén nemcsak oxidáció, hanem redukció útján is oldatba juthat.

A *kénredukció* folyamatában az anaerob kénredukáló baktériumok (pl. *Desulfuromonas*), illetve számos hipertermofil *Archaea* az elemi ként használja elektronakceptoroként, így kén-hidrogént állít elő (Pfennig és Biebl, 1976).

A kén-ciklusban a kén köztes formái egyes kénbaktériumok (pl. *Desulfovibrio*) által *diszproporcionálódhatnak*, azaz a kénvegyületek mikrobiológiai úton egy oxidáltabb, és egy redukáltabb formává (pl. $S_2O_3^{2-} \rightarrow S^{2-} + SO_4^{2-}$) alakulhatnak át (Jørgensen, 1990; Jørgensen és Bak, 1991).

4.6. A kénes karszt- és termálvizek baktériumközösségei

Kénes élőhelyek a világ számos területén, a legkülönbözőbb és legtávolabbi pontokon előfordulnak, és ezek az élőhelyek sokszor szélsőséges környezeti tényezőkkel (nagy hidrosztatikai nyomással, extrém magas hőmérséklettel, alacsony oxigén-tartalommal) párosulnak. Ilyen habitatok jellemzően az édesvízi és tengeri üledékek, felszínalatti vízbázisok, mélytengeri hirtotermális kúrtók, hévforrások, vulkanikus tájak. A kénes környezetek baktériumközösségeit többnyire az eltérő anyagcsere-típusú kénbaktériumok együttese jellemzi, melyek anyagcsere-köztes-, illetve végtermékeikkel együttesen hatással vannak az adott környezet kémiai sajátosságaira (Engel és mtsai, 2004; Macalady és mtsai, 2006). Sőt, ezek a mikróbaközösségek képesek geológiai környezetüket is formálni azáltal, hogy a kőzetekben található ásványi kénformákat oldatba viszik, vagy a szulfidot oldott vas jelenlétében biológiai úton ásványosítják (Jäger, 2011; Popa és mtsai, 2004). A fentebb említett kénes élőhelyek mikrobiotájában az ősi életformát képviselő, és a *Bacteria*-doméntól távoli leszármazású *Archaea*-k is fontos ökológiai szerepet játszanak, hiszen számos halofil és

hipertermofil képviselőjük (*Halobacterium*, *Haloferax*, *Thermosphaera*, *Sulfophobococcus*), az elemi ként használják elektronakceptorok. Így kénredukáló képességeik révén a kemolitotróf kénbaktériumokkal és szulfátredukáló baktériumokkal a biológiai kénkörforgalom szabályozásában, illetve biomineralizációs folyamatokban együtt vehetnek részt (Amend és mtsai, 2009; Briée és mtsai, 2007; Elshahed és mtsai 2004, Huber és mtsai 1998; Nakagawa és Fukui, 2003; Takai és Horikoshi, 1999).

A nemzetközi szakirodalomban számos tanulmány született a változatos geológiai környezetben (pl. barlangokban, barlangrendszerekben, mélységi karsztvíztározók vizeiben, hidegvízű forrásokban, geotermális hévforrásokban) előforduló, oligotróf kénes karsztvizes és termálvizes élőhelyek baktériumközösségeiről. A karsztvízbázisok kén-tartalma származhat mélységi magmás, vagy átalakult kőzetekbe zárt, kén-tartalmú ásványok (pl. pirit, gipsz) kioldásából általában ott, ahol magas hőmérséklet és nagy nyomás uralkodik. A mélységi kőzetekből általában anoxikus környezetben kioldódó redukált kén (S^{2-}) áramlási kényszerpályákon jut felszín közeli magasságokba, ahol már mikrobákkal is találkozunk, és ily módon létrejöhet a kénformák és a baktériumok kapcsolata. Ennek során a mikrobiális anyagcsere-köztes vagy végtermékeként további oxidált kénformák, elemi kén (S^0), tioszulfát ($S_2O_3^{2-}$), illetve szulfát (SO_4^{2-}) kerülhet a vizekbe. Sőt egyes kénbaktériumok kemolitotróf anyagcsere-folyamataik által maguk is elősegítik a kőzetek oldását, így a porózus felületek kialakítását, és kénvegyületek felszabadulását a vizekbe (Porter és Engel, 2008).

Napjainkban a tenyésztésen alapuló, valamint a tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerek (pl. DNS-feltárás, PCR, klónozás, fluoreszcens in situ hibridizáció, denaturáló gradiens gélelektroforézis, stb.) folyamatos fejlődésének köszönhetően a baktériumközösségek vizsgálata egyre részletesebbé válik; mind az *Arcahea*, mind a *Bacteria* domén világán belül egyre több új faj vagy nemzetség kerül felfedezésre (Moissl és mtsai, 2002; Rudolph és mtsai, 2001). A szintelen kénbaktériumok csoportján belül a közelmúltban leírt új fajokkal (pl. *Sulfuritalea hydrogenivorans*; Kojima és Fukui, 2011), valamint a régebben leírt fajok filogenetikai újracsoportosításával is találkozhatunk. Ez utóbbira példa a *Thiobacillus* nemzetség (Betaproteobacteria osztály) felosztása, mely 1996-ig egységes taxonómiai kategóriaként szerepelt, jelenleg azonban a korábban *Thiobacillus* nemzetségbe tartozó fajok mintegy három-negyedét a DNS-alapú filogenetikai analízis alapján új rendszertani kategóriákba (különböző osztályokba és nemzetségekbe) sorolták (Hiraishi és mtsai, 1998; Katayama és mtsai, 1995; Kelly és Wood, 2000; Moreira és Amils, 1997).

A modern DNS-alapú közösségfeltáró módszerek mellett, hogy egyre részletesebb képet adnak a vizsgált területek baktérium- és *Arcaea*-közösségeiről, számos ismeretlen

közösségalkotót is felfednek. Ezek gyakran kénes környezetekből származó, tenyésztésbe eddig nem vont környezeti klónok, melyek pontosabb filogenetikai azonosítása az ismert fajokkal való rokoni kapcsolatok hiánya miatt máig nem történt meg, mégis fontos viszonyítási alapként szerepelnek más kutatásokban az újonnan leírt környezeti klónok taxonómiai azonosításában (Brière és mtsai, 2007; Engel és mtsai, 2003; Porter és Engel, 2008).

A villányi térségtől földrajzilag távoli, de hasonló geológiai környezetből kimutatott mikrobióta összetételéről számos nemzetközi kutatási eredmény áll rendelkezésünkre. Magyarország gazdag termálvízkészlettel és számos termál- és gyógyfürdővel rendelkezik, ennek ellenére a kénes termálvizek mikrobiotájáról mindaddig kevés ismerettel rendelkezünk.

Említésre méltó Zenke (2002) munkája, melyben az egerszalóki hévízkutak közvetlen környékén kialakult biofilm baktérium- és *Archaea*-közösséget vizsgálta molekuláris klónozással. A kénes, karbonátos hévforrások dolomit padjain kialakult mikrobaközösségekből cianobaktériumok és ősi termofil baktériumok (*Chloroflexi*, *Thermodesulfobacteria*, *Aquificae*) képviselőit azonosította, viszont az *Archaea*-domén tagjait nem sikerült kimutatnia.

Borsodi és mtsai (2012) a Budai Termálkarszt-rendszerhez tartozó Molnár János barlang "MJB", illetve a Rudas-Török forrásbarlang "RTB" baktériumközösségeit vizsgálták molekuláris klónozással. A jellemzően karbonátos, szulfátos, mérsékelten melegvizű (27-30°C-os) barlangi környezetből származó biofilmek bakteriális közösségszerkezete eltért egymástól. Az "MJB" klónkönyvtárat zömmel termofil aerob és anaerob Firmicutes baktériumokkal rokon klónok alkották, emellett kisebb arányban kimutattak kénoxidáló- illetve kénredukáló baktériumokkal (*Aquificae*, *Thermodesulfobacteria*, *Chloroflexi*, *Chlorobi*, *Deltaproteobacteria*) és aerob vasoxidálókkal (*Acidithiobacillus ferrooxidans*), illetve anaerob vasredukálókkal (*Geothermobacterium ferrireducens*) rokon szekvenciákat is. Az "RTB" minta dominanciáját kén- és szulfátredukáló deltaproteobaktériumok képviselői (*Geobacter*, *Desulfatibacillum*, *Desulfuromonas*, *Geothermobacter*) adták. Ezen kívül viszonylag magas arányban megjelentek egyéb kénbaktériumokkal (*Thiothrix*, *Thermodesulfobacteria*, *Chloroflexi*), valamint a vasredukáló *Geothermobacterium ferrireducens*-szel rokon szekvenciák.

A Lower Kane Cave barlang (Wyoming, USA) langyos vizű (22°C), szulfidos (1 mg l^{-1}) vizeinek baktériumközösségeit Engel és mtsai 2003-ban vizsgálták molekuláris közösségfeltáró módszerekkel. Ezt követően további vizsgálatokat folytattak a területről gyűjtött különböző biofilm-mintákból (Engel és mtsai, 2004, Porter és Engel, 2008).

Eredményeik szerint a vizsgált közösségeket Epsilonproteobacteria dominancia jellemezte. Ezek a domináns epsziloproteobaktérium klónok ("LKC"-klóncsoport) anaerob kemolitotróf kénoxidáló *Sulfuricurvum* és *Sulfurospirillum* fajokkal álltak legközelebbi rokoni kapcsolatban. Emellett a Proteobacteria törzs további képviselőit (pl. *Thiothrix unzii*, *Thiothrix fructosivorans*, *Thiobacillus aquaesulis*, *Desulfocapsa* sp.) is kimutatták, melyek a biológiai kénkörforgalomban játszanak szerepet. A hálózatos szerkezetű biofilmeket fonalas epsziloproteobaktériumok, és a Gammaproteobacteria osztályba tartozó *Thiothrix* fonalas kénbaktériumok alkották (Engel és mtsai, 2003; Rosetti és mtsai, 2003).

Briée és mtsai (2007) a hidegvízű (9-10°C), alacsony oxigén-koncentrációjú, kénhidrogénes Charca Verde-tó (Franciaország) nyílt vízi- és üledékminta *Archaea*- és baktériumközösségét vizsgálták molekuláris klónozással. A baktériumközösségeket zömmel a Proteobacteria törzsbe tartozó, a kén-körforgalomban részt vevő kemolitotróf kénbaktériumok képviselői (*Thiobacillus*-, *Sulfuritalea*-, *Thiothrix*-rokon klónok), a szulfátredukáló *Desulfocapsa* nemzetség képviselői, illetve eddig ismeretlen epsziloproteobaktériumok-klónok ("CV"-klónok) jellemezték. Ez utóbbi közösségek alkotók a *Sulfurimonas* és *Sulfurospirillum*, tengeri üledék oxikus/anoxikus zóna határfelületén élő kénoxidáló baktériumokkal álltak filogenetikai rokonságban. Ezen kívül kisebb arányban anaerob fototróf szulfidoxidáló baktériumok (Chlorobi, Chloroflexi) képviselői is jelen voltak. Az alacsony hőmérséklet ellenére mind az üledékminták, mind a nyíltvízi minták *Archaea*-közösségét hipertermofil, acidofil, anaerob kénoxidáló Thermoplasmatales-rokon klónok és metanogén (metántermelő) Methanomicrobiales-rokon klónok képviselték.

Macalady és mtsai (2006) a Frasassi barlangrendszer (Olaszország) szulfidos (6,7 mg l⁻¹), szulfátos (120 mg l⁻¹), hideg vízi (13°C) környezetéből származó különböző biofilmek baktérium-közösségeit szintén molekuláris klónozással vizsgálták. A biofilmek baktériumközösségeit a Proteobacteria törzsbe tartozó szintelen kénbaktériumok alkották. A klónok legnagyobb részét a gammaproteobaktériumokhoz tartozó szulfidoxidáló, fonalas *Thiothrix*-nemzetség képviselői adták. Emellett a szulfátredukáló deltaproteobaktériumok fordultak még elő, melyek zömmel a *Desulfocapsa*, *Desulforhabdus* és *Desulfobacter* nemzetségekkel álltak rokoni kapcsolatban. A biofilm-képzésben résztvevő jelentős számú epsziloproteobaktérium klónszekvenciák nagyrészt más, távoli vidékekről, de geológiai szempontból hasonló környezetekből származó környezeti klóncsoportokkal (Angert és mtsai, 1998; Engel és mtsai, 2003) alkottak közös kládot, és az ismert kemolitotróf Epsilonproteobacteria fajok közül az anaerob kénoxidáló *Sulfurospirillum deleyianum*-mal (Sikorski és mtsai, 2010) álltak filogenetikai kapcsolatban. A proteobaktériumok törzséből

legkisebb arányban a bétaproteobaktériumokhoz tartozó kénoxidáló *Thiomonas* és *Thiobacillus*-nemzetségek képviseltették magukat. A biofilm-minták fáziskontraszt mikroszkópius felvételei intracelluláris kéngranulumokat felhalmozó *Beggiatoa*- és *Thiothrix*-szerű filamentumokat mutattak. A kutatások eredményei alapján Macalady és mtsai (2006) feltételezték, hogy a kén-körforgalomban szerepet játszó kénoxidáló kénbaktériumok anyagszereplésük során képesek alakítani a geológiai környezetüket, így a biológiai szulfid-oxidáció során keletkező kénsav révén a baktériumok fontos szerepet játszhatnak a karsztközetek felszínén lejátszódó intenzív korróziós folyamatokban.

Rudolph és mtsai (2004) összehasonlító ökológiai tanulmányt végeztek az egymástól földrajzilag távol eső dél-németországi hidegvízü (10-11°C), szulfidos (0,5-4 mg l⁻¹) Sippenauer Moor és Islinger Mühlbach források biofilmjein. Fluoreszcens in situ hibridizáción és 16S rDNS bázissorrend elemzésen alapuló vizsgálataik alapján megállapították, hogy az eltérő oxigén-tartalmú környezetekben más-más baktériumok domináns előfordulása volt jellemző. A viszonylag nagyobb (1,4 mg l⁻¹) oldott oxigén-tartalmú minta biofilmjében *Thiothrix*-rokon szekvenciák, míg a mintegy 10-szer kisebb oxigén-tartalmú (0,13 mg l⁻¹) közel anoxikus mintákban az "LKC" klónsoporttal (Engel és mtsai, 2003) közel-rokon epszilonproteobaktériumok dominanciáját mutatták ki. Az eltérő környezetekből származó biofilmek fáziskontraszt-mikroszkópos vizsgálata szintén különböző képet mutatott: az oxigénben dúsabb biofilmet zömmel fonalas, rozettaképző, granulumokat felhalmozó (*Thiothrix*) baktériumtelepek alkották, míg az oxigénben szegényebb biofilm többnyire enyhén hajlott, sejthárak nélküli fonalakkal állt. Az oldott oxigénszint tehát nagymértékben meghatározta a hasonló fizikai-kémiai tulajdonságú környezetben kialakult közösségeken belüli szulfid- és kénoxidáló baktériumok dominancia-viszonyait, hiszen a nagyobb oxigén-koncentráció a *Thiothrix*-eknek, míg a mikroaerofil miliő az epszilonproteobaktériumoknak kedvezett.

Japán két egymáshoz közeli kénes, 72-80°C hőmérsékletű, magas szulfid-tartalmú (3-20 mg l⁻¹) hévforrásának (Yumata és Nakabusa hévforrás) baktérium- és *Archaea*-közösségeit Nakagawa és Fukui (2003) vizsgálták DGGE-vel. A domináns DGGE csíkokból származó bakteriális 16S rRNS gén szekvenciák *Sulfurihydrogenibium*-, illetve *Thermodesulfobacteria*-rokon szekvenciákkal mutatták a legnagyobb mértékű hasonlóságot. Az Aquificae törzsbe tartozó *Sulfurihydrogenibium* nemzetségbe (Takai és mtsai, 2003), fakultatív anaerob, termofil, szulfid-, kén- és tiosulfát-oxidáló kemolitotróf baktériumok tartoznak. A típusfajok képviselőit kénes hévforrásokból izolálták szerte a világon: *Sulfurihydrogenibium subterraneum* (Takai és mtsai, 2003), *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* (Nakagawa és

mtsai, 2005), *Sulfurihydrogenibium azorense* (Aguiar és mtsai, 2004), *Sulfurihydrogenibium rodmanii* (O'Neill és mtsai, 2008), *Sulfurihydrogenibium kristjanssonii* (Flores és mtsai, 2008). A hévforrásokból a termofil kénoxidálók mellett a hipertermofil *Archaeák* csoportjába tartozó, anaerob, kénredukáló *Staphylothermus* és *Sulfophobococcus* nemzetség képviselőit sikerült azonosítani DGGE-PCR alapján.

Thevenieau és mtsai (2007) a kolumbiai Andok magashegységi vidékén 53°C-os geotermális hévforrás (Escuela La Playa) vizét vizsgálták, melyből egy új termofil, szulfátredukáló baktériumot, a *Desulfomicrobium thermophilum* fajt izoláltak. Ez a faj a *D. baculatum*-mal állt legközelebbi (94%-os szekvencia hasonlóság) filogenetikai rokonságban, melyek az anaerob szulfátredukáló *Desulfovibrio* fajokkal együtt közös őstől származtak.

Popa és mtsai (2004) összefüggést találtak a Fekete-tenger romániai partvidékén (Mangalia) fekvő karsztos területek kénes, felszínalatti víztározóiból kimutatott mikrobaközösség és a pirit (FeS_2) ásvány szemcsék mennyisége közt. A karbonátos közhadsadékokban lévő, langyos vízű (18-20°C), anoxikus, alacsonyabb ($6,5 \text{ mg l}^{-1}$) szulfid- és szulfát-tartalmú (57 mg l^{-1}) felszínközeli rétegben szemcsézett felületű, gömbszerű frambooid-szemcséket, illetve a magasabb ($8,3 \text{ mg l}^{-1}$) szulfid- és szulfát-koncentrációjú (90 mg l^{-1}) aljzaton sima felületű, gömb formájú szferoid-szemcséket találtak. Feltételezésük szerint a pirit-ásványok létrejöttében, majd frambooid és szferoid-szemcsékké aggregálódásának folyamatában biomineralizációs folyamatok játszanak szerepet. Az ún. biogén piritizáció alapjául a szulfátredukálók anyagcsereje szolgál, melyek energiatermelésük során szulfidot képeznek. A megnövekedett szulfid-tartalmú anoxikus közegben a redukált (Fe^{2+}) vas a keletkező szulfiddal reagálva 10-20 μm átmérőjű vas-szulfid-szferoid szemcsék, illetve pirit-frambooid szemcsék képződését eredményezi.

5. Célkitűzések

Magyarország jelentős felszínalatti termásvíz készlete a hazai gyógyturizmust fontos iparággá tette. Hazánkban a gyógyfürdőzésnek, mint a közösségi szabadidő eltöltés egyik formájának, évszázados hagyománya van. A különböző gyógyhatással rendelkező termál- és gyógyvizeink kémiai összetétele igen változatos, melyet a mélyben zajló kémiai és mikrobiológiai folyamatok együttesen alakítanak ki.

Kutatómunkám során az alábbi célokat tűztem ki:

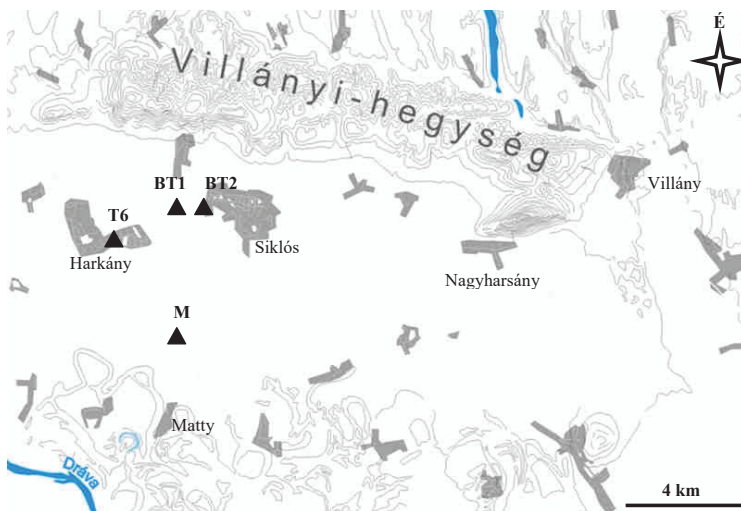
- a Harkányi Gyógyfürdőt szolgáló karsztvízbázisokra telepített termelőkutak vizében előforduló baktériumok jellegzetes morfológiai típusainak fény- és elektronmikroszkópos tanulmányozása, továbbá az abioszeszton alkotóinak vizsgálata;
- a baktériumközösségek összetételének, a közösségek filogenetikai diverzitásának, különös tekintettel a gyógyvíz kémiai összetételének alakításában is résztvevő kénbaktériumok feltárása;
- a tavaszi, nyári és őszi évszakos mintavételeket követően a geológiai és áramlási viszonyok ismeretében a baktériumközösségek szerkezetében bekövetkező esetleges térbeli és időbeli változások feltérképezése;
- a feltárt baktériumközösségek összehasonlító elemzése statisztikai módszerek alkalmazásával, valamint összefüggések keresése a baktériumközösségek összetétele és a kutak vizének fiziko-kémiai sajátosságai között.

A kitűzött célok eléréséhez a Harkányi Gyógyfürdő négy termelőkútjából (Büdöstpoltca I-es kút, Büdöstpoltca II-es kút, Matty-kút, Termál VI-os kút) 2006 és 2008 között gyűjtöttünk vízmintákat. A baktériumközösségek feltárását molekuláris klónozással végeztük. A termelőkutakból származó baktériumközösségek genetikai diverzitását, területi különbségeit és szezonális dinamikáját denaturáló gradiens gélelektroforézis segítségével tanulmányoztuk.

6. Anyag és módszer

6.1. Mintavétel és minta-előkészítés

A Termál VI-os kút (É: 45,850, K: 18,237) (7. ábra) a vizsgálatba nem vont III-as, IV-es és V-ös termálkutak mellett a fürdő elkerített területén belül helyezkedik el. A Büdöstapolca I-es (É: 45,862, K: 18,276) és II-es (É: 45,860, K: 18,279) kutak egymástól mintegy 100 méterre, Harkánytól 4 km-re keletre, Siklós határában találhatók. A büdöstapolcai kutak környezetében mezőgazdasági tevékenységet folytatnak. A Matty-kút (É: 45,823, K: 18,257) Harkánytól 5,5 km-re délre, erdővel körbevett területen található (6. ábra). A kutakból 2006 novemberében, valamint 2007-ben áprilisban, júniusban és augusztusban, továbbá 2008-ban áprilisban, augusztusban és novemberben vettünk vízmintákat. (A mintavételi időpontokat és az elvégzett vizsgálatokat az 1. táblázatban foglaltuk össze).



6. ábra A Villányi-hegység és déli előterének térképe a mintavételi helyekkel
(A mintázott kutak háromszög jelzi; T6: Termál VI-os kút, BT1: Büdöstapolcai I-es kút,
BT2: Büdöstapolca II-es kút, M: Matty-kút)

A langyos vízü kutakból üzemeltetés közben, a mintavételi csapok 10 perces folytatása után vettünk mintát (7. ábra). A kifolyó víz hőmérsékletét, a pH-t és a fajlagos

vezetőképességet WTW Cond 3310 típusú kézi-digitális mérőeszkővel (Geotech Environmental Equipment, Inc., USA) a helyszínen mértük. A többi kémiai adatot a Harkányi Gyógyfürdő Zrt. szolgáltatta (Függelék 3. táblázat). Mikrobiológiai vizsgálatok céljára 5-5 l vízmintát, míg a Termál-VI-os kútból 25 l vízmintát gyűjtöttünk előzőleg fertőtlenített, csavaros kupakkal zárható 25 literes műanyag kannákba. (A kannákat a mintavétel előtt steril desztillált vízzel átöblítettük, majd a kannákba a csírátlanításhoz 3 %-os formaldehid-oldattal átitatott vattadugót helyeztünk. A kannákat 48 órán keresztül zárva tartottuk. A mintavétel előtt a vattákat steril csipesszel eltávolítottuk, majd a kannákat visszazártuk.)

1. táblázat Az egyes mintavételi helyeken végzett mintavételek időpontjai és a mintákból végzett vizsgálatok jelölése

Mintavételi hely	Mintavétel időpontja	DGGE	Molekuláris klónozás
Büdöstapolca I-es kút	2006. 11.		X
	2007. 04.	X	X
	2007. 06.	X	
	2007. 08.	X	
	2008. 04.	X	
	2008. 08.	X	
	2008. 11.	X	
Büdöstapolca II-es kút	2006. 11.		X
	2007. 04.	X	X
	2007. 06.	X	
	2007. 08.	X	
	2008. 04.	X	
	2008. 08.	X	
	2008. 11.	X	
Matty-kút	2007. 04.		
	2007. 06.	X	
	2007. 08.		
	2008. 04.	X	X
	2008. 08.	X	
	2008. 11.	X	
Termál-VI-os kút	2007. 04.	X	
	2007. 06.	X	
	2007. 08.	X	
	2008. 04.	X	
	2008. 08.	X	
	2008. 08.	X	
	2008. 11.	X	X

A vízminták szűrését és a biomassza-kinyerését az ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézete Vízmikrobiológiai Laboratóriumában végeztük. A mintákat 3 fejes Millipore MIAC 03P01-típusú membránszűrő-berendezéssel 0,45 µm pórusméretű 47 mm átmérőjű Millipore EZ-Pak EZHAWG 474-típusú membránszűrőn szűrtük át. A membránszűrőn összegyűlt biomasszát sejtkaparóval 10-10 ml eredeti vízmintába mostuk, majd Eppendorf 5804 R-típusú centrifugában tömörítettük 3200 rpm rotációs sebességgel 10 percig. A felülúszót elöntöttük,

majd a molekuláris biológiai vizsgálatokhoz 1000-1500 μl , a mikroszkópos vizsgálatokhoz 550-600 μl mintát mértünk 1,5 ml-es steril Eppendorf-csővekbe. A molekuláris biológiai vizsgálatokra, valamint a pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokra szánt mintákat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, és úgy szállítottuk az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszékére.



7. ábra A Harkányi Gyógyfürdő Zrt. területén elhelyezkedő Termál-VI-os kút
(A nyíl a mintavételi csonkot jelöli.)

6.2. A minták mikroszkópos vizsgálata

Közvetlenül a vízminták tömörítése után a fáziskontraszt-mikroszkópos vizsgálathoz 40-40 μl friss natív, festetlen mintát pipettáztunk tárgylemezre. 20-szoros PL 0,40 és 40-szeres PL 0,55 fázisobjektíveket, valamint 10-szeres okulárt használva vizsgáltuk a biomasszát Olympus BX51 TF-típusú fázis-kontraszt trinokuláris mikroszkópban. A sejtméret meghatározáshoz 24 x 1,5 mm vízszintes beosztású, beépített okulármikrométert használtunk. A fáziskontraszt-eljárással kapott kép igen kontrasztos és színes, ezért jól megfigyelhetők a sejten belüli (sejtmag, zárványok) és sejtfelszíni struktúrák (flagellumok, hüvely, sejtfelszíni leakódások), melyek néhány esetben morfológiai határozóbélyegként szolgálnak.

A pásztázó elektronmikroszkópia jól alkalmazható a biofilmet alkotó mikroorganizmusok térbeli szerkezetének tanulmányozásához. A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz 500-500 µl mintát használtunk. A minta-előkészítés kémiai rögzítéses és fagyaszttva szárításos technikával történt (Makk és mtsai, 2003).

6.2.1. Minta-előkészítés az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz

A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a szűrővel tömörített mintát 3 órán keresztül 5%-os glutaraldehyd oldatban rögzítettük. A rögzítést követően a mintákat 2-szer mostuk 10 percig 0,1 M-os foszfát pufferrel. A minták kiszárítása liofilizálással történt. A fixált mintákat először cseppfolyós nitrogénbe merítettük (előfagyasztás). A lefagyasztott mintákat ezt követően liofilizáló készülékbe (Edwards) helyeztük. A szárítási idő 6 óráig tartott (2×10^{-2} mbar, -60°C). Az eljárás során a lefagyasztott mintákból a jeget vákuumban elszublimáltattuk. A teljesen kiszáradt mintákat fémgözlő műszerben (0,05 Pa, 40 mV) vékony aranyfilmmel vontuk be. A mintákat HITACHI S-2600N pásztázó elektronmikroszkópban vizsgáltuk.

6.3. A közösségi DNS kinyerése és felszaporítása

A taxonómiai azonosítás és a filogenetikai kapcsolatok feltárásának egyik széleskörben alkalmazott módszere a prokarióta genom bizonyos kiválasztott szakaszainak bázissorrend meghatározása és azok összehasonlító elemzése. A filogenetikai törzsfa-készítés alapjául szolgáló egyik leggyakrabban használt genom-szakasz a bakteriális 16S rRNS génje, amely minden baktériumban általánosan előforduló és evolúciósan erősen konzervált génszakasz, ugyanakkor fajspecifikus régiókat is tartalmaz.

6.3.1. A DNS kinyerése és tisztítása

A mintákból a közösségi DNS izolálást a fizikai sejteltávolítást követően Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, USA) használatával végeztünk (a gyártó útmutatásának megfelelően), melynek során a sejtet elemeket és a DNS-t elválasztottuk a minta abiotikus elemeitől, illetve a közösségi DNS-t megtisztítottuk a kisebb nukleinsav töredékektől és egyéb PCR-gátló anyagoktól.

- A teljes (1000-1500 µl-nyi) mintamennyiséget 2 ml-es Bead Solution csőbe mértük, majd kémcsőrázóval 4-5 másodpercig intenzíven összeráztuk.
- Hozzáadtunk 60 µl S1 oldatot, majd ismét összeráztuk.
- Hozzáadtunk 200 µl Inhibitor Removal Solutiont (IRS).
- A sejteket sejtmalomban 2 percig 1/25 Hz frekvencián roncoltuk.
- A mintát 13000 rpm-en 30 másodpercig centrifugáltuk.
- A felülúszót átpipettáztuk új 1,5 ml-es centrifugacsövekbe.
- A mintához 250 µl S2 oldatot adtunk, majd 4-5 másodpercig kémcsőrázóval összeráztuk.
- Ezután 5 percig 4°C-on inkubáltuk.
- Centrifugáltunk 13000 rpm-en 1 percig.
- A felülúszót átpipettáztuk egy új 2 ml-es MO BIO Kit csőbe.
- Hozzáadtunk 1,3 ml S3-oldatot, majd röviden összeráztuk.
- A 2 ml-es MO BIO Kit centrifugacsőbe spin filtert helyeztünk, majd a filterre 700 µl mintát töltöttünk.
- Ezután 13000 rpm-en 1 percig centrifugáltunk.
- Centrifugálás után elöntöttük a szűrletet, majd a filterre újabb 700 µl mintát töltöttünk, és a műveletet megismételtük. Így a teljes mennyiségű genomiális DNS a filterre kötött.
- Ezt követően 300 µl S4-oldatot pipettáztunk a filterre, majd 13000 rpm-en 30 másodpercig centrifugáltunk.
- A szűrletet elöntöttük, majd a filtert újra centrifugáltuk 13000 rpm-en 1 percig.
- A spin filter-betétsövet egy új 2 ml-es MO BIO Kit centrifugacsőbe helyeztük, majd a filter közepére orientálva 50 µl S5 eluálószeret pipettáztunk.
- A DNS-t a filterről eluáltuk, majd a csöveket 13000 rpm-en 30 másodpercig centrifugáltunk.
- Az izolált DNS-t további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

6.3.2. A DNS detektálása agaróz gélelektroforézissel

1%-os agaróz gélt készítettünk: 20 ml 5 x TBE pufferhez hozzáadtunk 80 ml desztillált vizet, majd összeráztuk. 1 g agarózhoz hozzáadtunk 100 ml 1 x TBE puffert, majd

forráspontig melegítettük. A körülbelül 60°C-ra visszahűtött gélhez 5 µl etidium-bromidot adtunk.

A gélt futatókádba öntöttük, majd a gél megszilárdulása után a zsebekbe 5-5 µl mintát és 3-3 µl töltőpuffert (30 % glicerin + 0,25 mM brómfenolkék) töltöttünk. Az egyik zsebbe 3 µl DNS III-as markert (Fermentas, Litvánia) töltöttünk (λ-fág restrikciós enzimekkel hasított DNS-e, 24 nevezetes bázispár-hosszúságú DNS-fragmentet tartalmaz, melyek jól detektálhatóak a gélben), ezáltal megbecsülhettük a DNS hosszát.

Az elektroforézis 100 V feszültségen 20 percig történt, majd a DNS-t UV fényben detektáltuk.

6.3.3. A 16S rDNS szakasz felszaporítása polimeráz láncreakcióval (PCR)

A bakteriális közösségi genom 16S rDNS szakaszát a 27-es és 1492-es nukleotidok pozíciója között parciálisan felszaporítottuk. Mintánként és reakciónként 48 µl premix oldatot mértünk össze 200 µl-es PCR csövekbe az alábbiak szerint:

- 5 µl 10 x *Taq* puffer (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM KCl, Fermentas)
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 10 µl dNTP (1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, Fermentas)
- 0,5 µl 27 forward primer (0,5 µg/ml, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', IDT, IA, USA; Lane, 1991)
- 0,5 µl 1492 reverse primer (0,5 µg/ml) (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', IDT; Lane, 1991)
- 28 µl steril dH₂O

Az összemért premixeket enyhén homogenizáltuk, majd hozzáadtunk 1-1 µl-nyi templát DNS-t. Az elegyet összeráztuk, majd 4-5 másodpercig centrifugáltuk 3000 rpm-en. A mintákat Whatman Biometra Tpersonal PCR készülékbe helyeztük, majd az alábbi PCR hőprofil beállításával elindítottuk a reakciót:

16S "Hot start" PCR	
1. Kezdeti denaturáció	98°C 5 perc
2. <i>Taq</i> polimeráz bemérése	84°C 10 perc
3. Denaturáció	94°C 30 mp
4. Anelláció	52°C 30 mp
5. Extenzió	72°C 1 perc
6. PCR ciklus (3-5. lépések)	32 x
7. Végső extenzió	72°C 30 perc
8. Hűtés	4°C

- A kezdeti denaturációt követően 84°C-on a mintákba 1-1 µl *Taq* polimeráz enzimet (LC low concentration *Taq*, 1U/µl, Fermentas) mértünk be, majd folytattuk a PCR reakciót.

A 16S rDNS PCR-rel kapott termékek detektálása a 6.3.2. alpontonál leírtakkal megegyező módon történt. A templátok hosszának ellenőrzéséhez 3 µl VIII-as markert (Fermentas) használtunk.

6.4. Klónkönyvtár létrehozása és feldolgozása

A molekuláris klónozás egyike azon rutin alkalmazásban levő DNS-alapú molekuláris módszereknek, amely lehetővé teszi a különösen nehezen tenyészthető mikroorganizmusok (mint pl. kemolitotróf kénbaktériumok) által alkotott közösségek vizsgálatát. A klónozás során a teljes bakteriális DNS-ből parciális 16S rDNS polimeráz láncreakcióval kapott terméket klónozó vektorba illetve *Escherichia coli* sejtekben szaporítjuk fel. (Környezeti minták baktériumközösségének vizsgálata céljára klónozó vektorként általában erre a célra kifejlesztett plazmidot alkalmaznak.) A környezeti 16S rDNS szakaszt tartalmazó klónozó vektor (inszert plazmid) a hordozó *E. coli* DNS-étől függetlenül, rövid idő alatt nagy példányszámban tud replikálódni. Táptalajon felületi szélesztéssel izolált sejtenyészetek létrehozásával és a rekombináns klónsejt-tenyészetek (mivel egy *E. coli* sejtbe csupán egy klónozó vektor jut, így az egyes izolált *E. coli* sejtenyészetek egy-egy felszaporított környezeti 16S rDNS PCR terméket hordoznak elkülönülten) kék/fehér szelekcióval (Sambrook és Russel, 2001) történő azonosításával klónkönyvtárakat hozhatunk létre.

6.4.1. A 16S rDNS PCR-rel kapott termékek tisztítása

A teljes DNS-ből 16S rDNS polimeráz láncreakcióval kapott termékek tisztítása Viogene PCR-M Clean Up System (Tajvan) segítségével történt az alábbi metodika szerint, melynek során a 16S rDNS molekulákat a premix-alkotóelemektől megtisztítottuk:

- A PCR termékeket (50 µl) 1,5 ml-es centrifugacsövekbe (Viogene) töltöttük.
- Hozzáadtunk 0,5 ml PX puffert, majd kécsórázóval összeráztuk.
- A PCR-M filtert (Viogene) 2 ml-es centrifugacsöbe (Viogene) helyeztünk, majd a teljes mintamennyiséget rátöltöttük.
- Centrifugáltunk 13000 rpm-en 1 percre, majd a szűrletet elöntöttük.
- A filtert átmostuk 0,5 ml WF pufferrel, majd 13000 rpm-en 1 percig centrifugáltuk, és a szűrletet elöntöttük.
- A filtert átmostuk 0,7 ml WS pufferrel, majd 13000 rpm-en 1 percig centrifugáltuk, és a szűrletet elöntöttük.
- Újra centrifugáltunk 13000 rpm-en 3 percre, hogy a maradék etanol is eltávozzon a filterről.
- A filtert egy új 1,5 ml-es centrifugacsöbe helyeztük, majd a filter közepére orientálva 50 µl eluálószeret pipettáztunk.
- Végül 13000 rpm-en 3 percig centrifugáltunk, így a tisztított PCR-termék a cső alján gyűlt össze.
- A tisztított PCR termékeket további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

6.4.2. A PCR termékek ligálása plazmidba

A ligálás célja, a közösségi 16S PCR termék elkülönítése, és egyedenkénti felszaporítása volt. Ezt úgy értük el, hogy az egyes 16S PCR termékeket egy-egy klónozó vektorba kapcsolatuk, majd az így létrehozott rekombináns (inszert) plazmidokat egymástól elkülönülten sejten belül felszaporítottuk.

Az 16S "Hot start" PCR során a *Taq* polimeráz templát independens terminális transzferáz aktivitását használtuk ki. Ezen aktivitás során a PCR termékek 3' végeihez egy túlnyúló adenzinből álló rész kapcsolódik. A pCR-TOPO vektor 4 kilobázis hosszúságú, melynek polylinker régiója úgy hasított, hogy a cirkuláris DNS elhasadásánál túlnyúló timidin

régió van. Ezért alkalmas a templát megkötésére topoizomeráz enzim segítségével, így inszert-plazmidok jöhetnek létre. A kitben a Topoisomerase I enzim a vektorhoz kovalensen kötött. A klónozó vektor az ampicillin-rezisztencia génjét (*Amp*), valamint β -D-galaktozidáz enzim génjét (*Gal*) hordozza, amely utóbbi az inszerció következtében inaktívvá válik.

Ligáló reakciót a TOPO Cloning Kit (Invitrogen, USA) alkalmazásával az alábbiak szerint végeztünk:

- 4 μ l tisztított PCR terméket mértünk 200 μ l-es PCR csőbe.
- Hozzáadtunk 1 μ l sóoldatot (1,2M NaCl+0,06M MgCl₂)
- Hozzáadtunk 1 μ l TOPO vektort
- Óvatosan elegyítettük, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

6.4.3. Transzformálás *E. coli* sejtekbe

Az inszert-plazmidokat a továbbiakban *E. coli* baktériumsejtekben szaporítottuk fel, majd a rekombináns sejtenyészetekből klónkönyvtárakat hoztunk létre.

Az inszert-plazmidok *E. coli* sejtekbe történő transzformálását hősokkal végeztük az alább leírt módon:

- 2 μ l TOPO reakcióelegyet 1,5 ml-es centrifugacsőbe mértünk.
- Hozzáadtunk 50 μ l sejtuszpenziót (*E. coli* JM109 kompetens sejtek), majd jégen 5 percig inkubáltuk.
- A sejteket 42°C-os vízfürdőben 30 másodpercig hősokk alá vetettük, majd visszatettük a csöveket a vízfürdőbe további 2 percig.
- Hozzáadtunk 250 μ l SOC oldatot (Invitrogen, USA), majd 1 óráig 37°C-on 150 rpm forgási sebességgel rázótermosztátban inkubáltunk.

6.4.4. Tenyésztés szelektív táptalajon

Az inszert-plazmidok beépülését kék/fehér szelekcióval ellenőriztük (Sambrook és Russell, 2001). Ennek alapja a vektorban lévő (*Amp*) kifejeződése, valamint a (*Gal*) inaktivációja. A templátok megfelelő inzerciója során ugyanis a (*Gal*) gén inaktíválódik, míg az (*Amp*) enzim tovább öröklődik a sejtenyészetekben. Az *E. coli* kompetens sejtek

tenyésztését ezért LB-ampicillin-IPTG-Xgal- agaron végeztük, mely X-galaktózt és ampicillint tartalmazott. A tenyésztés során így ampicillin-rezisztenciára szelektív és kromogén *E. coli* telepeket kaptunk, melyek a *Gal* enzim inaktivációja miatt fehér színnel elkülönültek az inszert-plazmiddal nem rendelkező kék (X-galaktózt bontó) telepektől.

A táptalajkészítés lépései:

- 10 g triptonhoz mértünk 5 g élesztőkivonatot, valamint 5 g NaCl-ot, majd
- feltöltöttük steril desztillált vízzel 1000 ml-re. A pH-t 7,0-ra állítottuk be.
- 1 liter LB-táptalajhoz mértünk 15 g agart, majd 120°C-on 20 percig autoklávoztuk.
- Az 50°C-ra visszahűlt táptalajba 100 g ampicillint mértünk, majd homogenizáltuk.
- Petri-csészékbe lemezeket öntöttünk.
- A megdermedt LB-ampicillin- agar teljes felületére 20-20 µl (50 mg/ml) X-galaktózt, valamint 100-100 µl IPTG-t (100 mM) szélesztettünk.
- A lemezeket szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, hogy a diffúzió egyenletesen végbemenjen.

Négy párhuzamos szélesztést végeztünk 50-100-100-150 µl sejtszuszpenzióval LB-ampicillin-IPTG-Xgal- agar lemezek felületére, majd a tenyészeteket 37°C-on 24 órán át inkubáltuk.

6.4.5. Az inszert-plazmidok kinyerése az *E. coli* sejtekből

Mintánként külön, 96 férőhelyes PCR mikrotiter lemezeket (CLP-Neptune, USA) használtunk. A mikrotiter lemezek zsebeibe 30-30 µl DEPC vizet mértünk, majd minden egyes mikroplate mintahelyre szuszpendáltunk 1-1 baktérium-telepet, ezt követően a lemezeket védőfóliával lezártuk. Az intracellulárisan felszaporított inszert-plazmidokat fizikai sejtroncsolással és hősokkal extraháltuk az *E. coli* sejtekből az alábbi módon:

- A mikrotiter lemezeket óvatosan összeráztuk, majd PCR készülékben 98°C-on 7 percig hevítettük.
- Centrifugáltunk 5000 rpm-en 5 percig mikrotiter lemez centrifugában (Jouan CR422), így a sejtes elemek elkülönültek a felülúszóban lévő DNS molekuláktól.

6.4.6. Vektor specifikus PCR

Az inszert plazmidokból vektor specifikus PCR során a bekötődő DNS szakaszt (inszert-szakaszt) szaporítottuk fel M13 vektor specifikus primerek segítségével. Ezek a specifikus primerek felismerik a vektorba kötődés helyeit, így az M13 PCR a két kötődési pont közötti inszert-szakaszt amplifikálja. [Mivel az M13 polimeráz láncreakció során az M13 specifikus forward és reverse primerek nem közvetlenül az inszertálódási pontok mellé, hanem azoktól kissé távolabb, a vektorhoz kötődnek, minden M13 PCR-termék tartalmaz vektor-szekvenciákat a kezdeti és terminális szakaszokon egyaránt. Ezen kívül a parciális 16S rDNS szakaszok kétféle orientációban (5'→3', illetve 3'→5') is beköthetnek a klónozó vektorba. Ennek következtében egy inszert-szakasz M13 polimeráz láncreakciója során változatos szekvenciájú, az eredeti inszert szekvenciáknál hosszabb M13 PCR-termékek keletkeznek.]

A vektor specifikus PCR-hez az alábbi összetételű elegyet mértük 1 µl templát DNS-re vonatkoztatva:

- 5 µl 10 x *Taq* puffer (Fermentas) (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM KCl)
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 10 µl dNTP (Fermentas) (1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP)
- 0,5 µl M13 forward primer (0,5 µg/ml, 5'-TGTAACAACGACGCCAGT-3', Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- 0,5 µl M13 reverse primer (0,5 µg/ml, 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3', Stratagene)
- 28 µl steril dH₂O
- 1 µl *Taq* polimeráz (LC low concentration *Taq*, 1U/µl, Fermentas)
- 1 µl templát DNS

Az elegyet kécsőrázóval ráztuk, majd röviden centrifugáltuk 3000 rpm-en. Mintánként külön, 96 férőhelyes PCR mikrotiter lemezeket (CLP-Neptune) használtunk. Az M13 polimeráz láncreakcióhoz az alábbi hőprofil állítottuk be:

M13 PCR	
1. Kezdeti denaturáció	96°C 3 perc
2. Denaturáció	94°C 30 mp
3. Anelláció	52°C 30 mp
4. Extenzió	72°C 1 perc
5. PCR ciklus (2-4. lépések)	32 x
6. Végső extenzió	72°C 10 perc
7. Hűtés	4°C

A kapott PCR termékek ellenőrzését a 6.3.2. alpontnál leírtakkal megegyező módon végeztük. A templátok hosszának ellenőrzéséhez 3 µl VIII-as markert (Fermentas) használtunk.

6.4.7. Nested PCR

Nested (köztes) PCR alkalmazásával az M13-as templátok 5', valamint 3', variábilis végeit kihagyva, a közbülső szekvenciákat erősítettük fel. Ehhez az első parciális 16S rDNS polimeráz láncreakció során alkalmazott primerpárt (27f, 1492r) használtuk, aminek eredményeként visszanyertük az eredeti inszert-szekvenciákat.

Az alábbi összetételű elegyet mértük 1 µl templát DNS-re vonatkoztatva:

- 5 µl 10 x *Taq* puffer (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM KCl, Fermentas)
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 10 µl dNTP (1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, Fermentas)
- 0,5 µl 27 forward primer (0,5 µg/ml, 5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3', IDT)
- 0,5 µl 1492 rev. primer (0,5 µg/ml, 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', IDT)
- 28 µl steril dH₂O
- 1 µl *Taq* polimeráz (LC low concentration *Taq*, 1U/µl, Fermentas)
- 1 µl templát DNS

Az elegyet összeráztuk, majd 4-5 másodpercig centrifugáltuk 3000 rpm-en. Mintánként külön, 96 férőhelyes PCR mikrotiter lemezeket (CLP-Neptune) használtunk. A nested PCR az alábbi módon zajlott:

Nested PCR	
1. Kezdeti denaturáció	96°C 3 perc
2. Denaturáció	94°C 30 mp
3. Anelláció	52°C 30 mp
4. Extenzió	72°C 1 perc
5. PCR ciklus (2-4. lépések)	32 x
6. Végső extenzió	72°C 10 perc
7. Hűtés	4°C

A PCR termékeket a 6.3.2. alpontnál leírtak szerint VIII-as markerrel ellenőriztük.

6.4.8. A PCR termékek restrikciós emésztése

A nested PCR során felszaporított PCR termékek taxonómiai csoportosítását az ARDRA (Amplifikált Riboszomális DNS Restrikciós Analízis) módszerével végeztük (Massol-Deya és mtsai, 1995). Ehhez a nested PCR-termékek restrikciós emésztését *Hin6I* és *BsuRI* restrikciós enzimekkel (Fermentas) végeztük. [A restrikciós enzimek adott szekvenciáknál hasítják a DNS-szálat, így taxon specifikus hasítási mintázatok (ARDRA mintázatok) jönnek létre. *Hin6I* hasítási pont: 5'-G, CGC-3'; *BsuRI* hasítási pont: 5'-GG, CC-3']. A kétféle emésztéshez kétféle premixet készítettünk, és az emésztéseket mintánként két-két 96 férőhelyes PCR mikrotitër lemezekon végeztük párhuzamosan.

Az alábbi összetételű elegyet mértük össze 8 µl templát DNS-re vonatkoztatva:

<i>Hin6I</i> emésztés	<i>BsuRI</i> emésztés
2,5 µl Y ⁺ / Tango puffer (Fermentas)	2,5 µl Y ⁺ / Tango puffer (Fermentas)
14,2 µl dH ₂ O	14,2 µl dH ₂ O
0,3 µl enzim (<i>Hin6I</i>)	0,3 µl enzim (<i>BsuRI</i>)
8 µl templát DNS	8 µl templát DNS

Az összemért reakció-elegyeket 37°C-os vízfürdőben inkubáltuk másnapig.

6.4.9. Az emésztett DNS termékek detektálása és ARDRA-csoportosítása

A restrikciósan hasított DNS-termékeket 2%-os agaróz gélben futtattuk.

A 2%-os agaróz gél készítése:

- 20 ml 5 x TBE pufferhez hozzáadtunk 80 ml desztillált vizet, majd összeráztuk.
- 2 g agarózhoz hozzáadtunk 100 ml 1 x TBE puffert, majd forraltuk 3-7 percig.
- Az 50°C-ra visszahűtött gélhez adtunk 5 µl etídium-bromidot.

A gélt futtatókádba öntöttük, majd megszilárdulása után a zsebekbe 30-30 µl mintát és 3-3 µl töltőpuffert (30 %-os glicerín + 0,25 mM brómfenolkék) töltöttünk. A gél felső sorába *Hin6I*-emésztett termékek, az alsó sorába pedig a *Bst*RI-emésztett termékek kerültek. Az felső és alsó sor egyik zsebébe 3 µl DNS VIII-as markert (Fermentas) töltöttünk.

Az elektroforézis 80 V feszültségen 70 percig zajlott, majd a kapott géleképeket UV fény alatt rögzítettük.

Ezt követően a géleképek alapján csoportosítottuk a hasítási sávminiatúrákat (ARDRA-miniatúrákat), és a bázissorrend elemzéshez csoportonként egy-egy klón reprezentánst választottunk.

6.4.10. Szekvenáló reakció

A csoport reprezentáns nested PCR termékeket Viogene PCR-M Clean Up System segítségével tisztítottuk a 6.4.1. alponban leírtak szerint, majd a tisztított termékek bázissorrend elemzését a jelölt terminátorú ciklikus szekvenálás (Dye Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems, USA) módszerével és ABI PRISM 310 automata szekvenátorral (Applied Biosystems) végeztük. Az eljárás Frederick Sanger "di-dezoxiláncterminációs" módszerén alapszik, melynek során a denaturált templát DNS-lánc meghosszabbodása alatt fluorescens festékkel jelölt di-dezoxi-nukleotidok (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) terminálisan kapcsolódnak. Ekkor leáll a reakció. A nagy számok törvénye alapján a *Taq* polimeráz minden egyes nukleotid hosszúságú PCR-termékben terminális pozícióba beépít egy ddNTP-t. A szekvenátor végül a méret szerint elválasztott szakaszok fluorescens jelzetét azonosítja.

200 µl-es PCR csőbe az alábbi összetételű elegyet mértük:

- 3 µl 5 x hígító puffer (Applied Biosystems)
- 2 µl Big Dye Terminator Ready Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- 6 µl dH₂O
- 1 µl 519 reverse primer (0,5µg/ml, 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', IDT)
- 8 µl templát DNS

Ezt követően elindítottuk a reakciót:

Szekvenáló reakció	
1. Denaturáció	96°C 10 mp
2. Anelláció	50°C 5 mp
3. Extenzió	60°C 4 perc
4. PCR ciklus (1-3. lépések)	32 x
5. Hűtés	4°C

6.4.11. A szekvenáló reakció-termékek etanolos tisztítása

A szekvenáló reakció-termékeket a szekvenciák leolvasásakor zavaró PCR-premix-anyagoktól az alábbi metodika szerint tisztítottuk meg:

- 600 µl-es centrifugacsőbe pipettáztunk 62,5 µl 95 %-os etil-alkoholt, majd hozzáadtunk 3 µl 3 M Na-acetátot, valamint 14,5 µl dH₂O-t.
- A reakcióelegyhez hozzáadtunk 20 µl szekvenáló reakció-terméket.
- Az elegyet rövid ideig összeráztuk, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.
- Hűtőcentrifugában (Hermle Z233 MK2) centrifugáltunk 10000 rpm-en 20 percig 4°C-on.
- A centrifugacsővekből a felülúszót leszívtuk, majd hozzáadtunk 250 µl 70 %-os etil-alkoholt.
- Röviden összeráztuk, majd újra centrifugáltunk 10000 rpm-en 10 percig 4°C-on.
- A centrifugacsővekből a felülúszót leszívtuk, majd nyitott tetővel beszárítottuk a mintákat vákuum centrifugában (Jouan RC 1009) 2000 rpm-en 30 percig.

6.4.12. A szekvenáló reakció-termékek futtatása

- A beszárított szekvenáló reakció-termékeket 20 µl formamidban oldottuk fel, röviden összeráztuk és centrifugáltuk.
- Ezután a mintákat szekvenátor-csővekbe (Applied Biosystems) átpipettáztuk.
- A DNS-t PCR készülékben 95°C-on 3 percig denaturáltuk, majd átvittük ABI PRISM 310 automata szekvenátorba (Applied Biosystems).

6.4.13. Szekvencia-elemzés

- A kapott szekvenciák kromatogramjait CHROMAS LITE ver. 2.01 programmal (www.techelysium.com.au) ellenőriztük.
- A szekvencia-hasonlóság alapján listázott filogenetikai rokonsági viszonyok felállításához az NCBI internetes adatbázist használtuk. Az adatbázisban szereplő legközelebbi rokon szekvenciákat BLAST programmal (Altschul és mtsai, 1997), a legközelebbi rokon típusörzseket EzTaxon ver. 2.1 programmal (Chun és mtsai, 2007) kerestük meg.
- A szekvencia-illesztéseket MEGA ver. 4.1 programcsomaggal (Kumar és mtsai, 2008) végeztük, majd az evolúciós távolságok számítására Kimura 2 modellel került sor (Kimura, 1980). A filogenetikai dendrogramokat Neighbour-joining módszerrel (Saitou és Nei, 1987) szerkesztettünk.

6.5. A klónkönyvtárak összehasonlítása és jellemzése ökológiai indexek alapján

6.5.1. Hasonlósági index

A klónkönyvtárak egymás közti különbségének megállapításához *Bray-Curtis* hasonlósági indexet (BC_{12}) számoltunk. A *Bray-Curtis*-index az egyes minták közti különbözőség fokát jelöli, melynek értéke [0-1] intervallumba esik (Bray és Curtis, 1957). A 0 érték jelöli a klónkönyvtárak teljes azonosságát, míg az 1-es érték esetén a klónkönyvtárak teljes mértékben különböznek egymástól.

A klónkönyvtárak szerkezeti eltérésének megállapításához a magasabb rendű filogenetikai csoportokat (törzs, osztály) és a hozzájuk rendelt klónok számát vettük alapul.

$$BC_{12} = \frac{\sum |n_{1i} - n_{2i}|}{\sum (n_{1i} + n_{2i})}$$

, ahol n_{1i} az "1" klónkönyvtárban található i -edik filogenetikai csoporthoz tartozó klónok száma, n_{2i} a "2" klónkönyvtárban található i -edik filogenetikai csoporthoz tartozó klónok száma.

6.5.2. Diverzitás-index

A klónkönyvtárak ökológiai jellemzését a *FastGroup II online calculator* segítségével végeztük el (Yu és mtsai, 2006). A klónkönyvtárak diverzitásának meghatározására *Shannon-Wiener*-diverzitás indexet (H') számoltunk, amely a filotípusok számát és a hozzájuk tartozó klónszámot, valamint a klónok eloszlásának egyenletességét vette alapul.

$$H' = -\sum [P_i (\ln P_i)]$$

, ahol P_i az i -edik filotípusoz tartozó klónok száma (a filotípusok relatív abundanciája).

6.5.3. Fajgazdagság-becslés

A fajgazdagság becslésére (S_{chaol}) *Chao1* összefüggést alkalmaztunk, amely a klónkönyvtárakban kimutatott összes filotípusok számát, valamint az egy klónnal és két klónnal képviselt taxonok számát vette alapul, és extrapolációval becslést végzett a filotípusok várható értékére.

$$S_{\text{chaol}} = \frac{S_{\text{obs}} + m^2}{(2n_2)}$$

, ahol S_{obs} a klónkönyvtárakban megfigyelt filotípusok száma, m az egy klónnal képviselt filotípusok száma, n_2 a két klónnal képviselt filotípusok száma.

6.5.4. Fajtelítődési görbe

Az egyes klónkönyvtárak fajgazdagság becslésének grafikus megjelenítéséhez a *FastGroup II online calculator* segítségével fajtelítődési görbékét szerkesztettünk. A fajtelítődési görbék logaritmikus lefutásúak és telítődési ponthoz (aszimptotához) közelítenek. A fajtelítődési görbe megmutatja, hogy egy klónkönyvtár mekkora mértékben

közelíti meg a matematikai becslés szerinti valódi fajgazdagságot, illetve a várható maximális filotípusok számát. Ezen kívül becslést ad arra a klónkönyvtár-méretre, amely pontosan reprezentálja a kutatott területet.

6.6. Denaturáló gradiens gélelektroforézis

A denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) módszerrel a közel azonos hosszúságú, de eltérő szekvenciájú DNS szakaszok választhatók szét egymástól (Muyzer és mtsai, 1993). Az elektroforézis során a gélben a lineárisan növekvő denaturáló (urea és formamid) gradiens adott koncentrációjánál a dupla szálú DNS részlegesen denaturálódik, így a gélben vándorlása megszűnik. A DNS-fragmentumok olvadáspontját részben a szekvenciájuk, részben a guanin (G) + citozin (C) százalékos aránya határozza meg. A G+C arány (azaz a hármas hidrogén-kötések arányának) növekedésével az olvadáspont nő, így amikor a DGGE során az alacsonyabb olvadáspontú szakaszok elérik a megfelelő denaturáló koncentrációt, szétválnak, míg a magasabb olvadáspontú DNS-szakaszok még tovább vándorolnak a gélben. A részlegesen denaturálódott DNS-szálak mobilitása egy adott „taxon specifikus” helyen szűnik meg a gélben. Az egyes elkülönülő elektroforetikus csíkok ezután DNS festési eljárással láthatóvá tehető, és az adott minta DGGE mintázata diverzitás vizsgálatokra használható. A gélben az elektroforézis során az elkülönült csíkok általában egy-egy taxont képviselnek, ezért a gélből az erős denzitású csíkok kivágásával azok bázisrendje meghatározható. Ily módon a DGGE a közösségi mintázatok összehasonlítása mellett lehetőséget ad a domináns közösségalkotók faji vagy magasabb szintű taxonómiai azonosítására is.

A DGGE eljárás első lépéseként a 2007-ben és 2008-ban vett mintákból a 6.3.1. alpont szerint teljes bakteriális genomi DNS-t izoláltunk. A genomi DNS-t a 6.3.2. alpont szerint agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, majd ezt követően a 6.3.3. alpontban leírtak szerint a bakteriális 16S rDNS szakaszt 27 forward és 1492 reverse primer párral felszaporítottuk. Mivel az ilyen hosszú (1400-1500 bp) szekvenciák nem alkalmasak a minták DGGE ujjlenyomatainak vizsgálatára, rövidebb szakaszokat hoztunk létre. Ennek érdekében a 16S rDNS PCR-termékek közbülső szakaszát "GC-kapcsos" semi-nested PCR alkalmazásával dúsítottuk tovább. Ehhez GC 27 forward primert és egy közbülső, 519 reverse primert alkalmaztunk. A forward primer guaninban és citozinban gazdag szekvenciát tartalmazott. Ez a két nukleotid egymással erős, hármas hidrogén-kötést létesít, így még magas denaturáló koncentráció esetén is összetartja a két DNS szálát. Ennek következtében a két szál egyben

marad, és jól elkülönülő elektroforetikus csíkot ad a gélben, miután a denaturáló ágens hatására a DNS mobilitása megszűnik.

6.6.1. GC-kapcsos semi-nested PCR

200 µl-es PCR csőbe az alábbi összetételű elegyet mértük:

- 5 µl 10 x *Taq* puffer (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM KCl, Fermentas)
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 10 µl dNTP (1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, Fermentas)
- 0,5 µl GC 27 forward primer
(0,5 µg/ml, 5'-GC clamp-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', IDT)
- 0,5 µl 519 reverse primer (0,5 µg/ml, 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', IDT)
- 28 µl steril dH₂O
- 1 µl *Taq* polimeráz (LC low concentration *Taq*, 1U/µl, Fermentas)
- 1 µl templát DNS

Az elegyet összeráztuk, majd röviden centrifugáltuk 3000 rpm-en. Az alábbi hőprofil beállításával elindítottuk a reakciót:

GC-kapcsos semi-nested PCR	
1. Kezdeti denaturáció	96°C 3 perc
2. Denaturáció	94°C 30 mp
3. Anelláció	52°C 30 mp
4. Extenzió	72°C 30 mp
5. PCR ciklus (2-4. lépések)	32 x
6. Végső extenzió	72°C 10 perc
7. Hűtés	4°C

A PCR termékeket a 6.3.2. alpontnál leírtak szerint VIII-as markerrel ellenőriztük.

6.6.2. A poliakrilamid gél készítése DGGE-hez

A kapott kb. 490 bázispár hosszúságú nested PCR termékek szétválasztása poliakrilamid gélben 40%-60% denaturáló koncentrációk között történt az alábbiak szerint:

Poliakrilamid gél készítése:

Négy törzsoldatot készítettünk, melyek megfelelő arányú keveréséből 8%-os 40-60% denaturáló gardiensű poliakrilamid gélt állítottunk elő. A DGGE törzsoldatok összeállítására vonatkozó adatokat a 2. táblázat tartalmazza.

Felhasznált reagensek:

- 40%-os poliakrilamid oldat (akrilamid - biszakrilamid: 37,5 - 1, (Bio-Rad, USA)
- 50 x TAE puffer (2 M Tris, 1M ecetsav, 0,5 M EDTA, pH 8 (Bio-Rad)
- Urea (Bio-Rad)
- Formamid (Bio-Rad)
- TEMED (Bio-Rad)
- 10%-os ammónium-perszulfát oldat (APS) (Bio-Rad)
- dH₂O
- Gél töltőpuffer (70%-os glicerin, 0,05%-os brómfenolkék, 0,05%-os xilén-cianol, Bio-Rad)

2. táblázat DGGE törzsoldatok összeállítása

Reagensek	Törzsoldatok			
	6%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció	6%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció	10%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció	10%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció
40%-os akrilamid-oldat	15 ml	15 ml	25 ml	25 ml
50 x TAE puffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Urea	-	42 g	-	42 g
Formamid	-	40 ml	-	40 ml
dH ₂ O	100 ml végtérfogatra	100 ml végtérfogatra	100 ml végtérfogatra	100 ml végtérfogatra

A törzsoldatok elkészítése után a gradiens gél öntése a két különböző (40%-os és 60% -os) denaturáló koncentrációjú oldatból gradiens pumpa segítségével Ingeny PhorU (Ingeny, Hollandia) vertikális gélöntő rendszerben történt.

A 40%-os illetve 60%-os oldatok elkészítésének módját a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A 8%-os PAA és 40-60%-os vertikális koncentráció gradiensű oldat összeállítása

Reagens	8%-os PAA gél		
	40%-os denaturáló koncentráció	60%-os denaturáló koncentráció	Töltőgél
6%-os PAA	6,5 ml	4,3 ml	3 ml
0%-os denaturáló konc.			
6%-os PAA	4,3 ml	6,5 ml	-
100%-os denaturáló konc.			
10%-os PAA	6,5 ml	4,3 ml	3 ml
0%-os denaturáló konc.			
10%-os PAA	4,3 ml	6,5 ml	-
100%-os denaturáló konc.			
polimerizáló TEMED	18 µl	18 µl	6 µl
polimerizáló APS	90 µl	90 µl	27 µl

6.6.3. A PCR termékek futtatása poliakrilamid gélben

A polimerizációt megindító APS-t közvetlenül a gélöntés előtt adtuk az oldatokhoz. A gél öntését követően a gél tetejére körülbelül 6 ml töltőgél rétegeztünk, amely denaturáló szert nem tartalmazott, ezzel segítve a PCR termékek egyenletes bejutását minden zsebből a poliakrilamid gél teljes szélességébe. Ezt követően a PCR termékekhez 9 µl töltőpuffert (6 x loading dye, Fermentas) pipettáztunk, majd a mintákat 50 µl -es Hamilton fecskendővel a gél-zsebekbe töltöttük.

A denaturáló gradiens gélelektroforézis 1 x TAE pufferben 60°C-hőmérsékleten történt, melynek első szakasza 200 V feszültségen 5 percig zajlott, mialatt a minták a zsebekből bejutottak a poliakrilamid gélbe. Ezután a gélben a teljes futtatást 120 V-on végeztük 15 órán keresztül.

6.6.4. A DGGE csíkok festése és dokumentálása

Az elektroforézist követően a poliakrilamid gélt 20 percig etídium-bromidban festettük, majd kétszer 15 percig mostuk 0,5 x TAE pufferben. Az elektroforézis során elválasztott PCR-termékek a DGGE gélben UV fény alatt sávmintázatként jelentek meg.

A géleképekről digitális fotót készítettünk, majd a gélképet a TotalLab (TL 120) v2006 szoftverrel értékeltük ki.

6.6.5. A DGGE csíkok kivágása, és az elválasztott 16S rDNS szakaszok szekvencia-analízise

A gélből UV fény alatt kiválogattuk, és steril szikével kivágtuk a jól elkülönülő és nagy intenzitású csíkokat. Az egyes gél-darabkákat külön Eppendorf-csővekbe gyűjtöttük, majd 30-30 µl steril dH₂O hozzáadása után 4°C-on inkubáltuk másnap reggelig. Ezt követően az Eppendorf-csőveket kécsőrázóval összeráztuk, majd 4-5 másodpercig centrifugáltuk 3000 rpm-en. A felülúszót átpipettáztuk egy-egy új Eppendorf csőbe, majd 16S PCR-t állítottunk össze:

6.6.6. A 16S rDNS szakaszok felszaporítása PCR-rel

A kivágott DGGE csíkokból a nested PCR-termékeket teljes szekvencia hosszukban (a 27-es és 519-es nukleotidok pozíciója között) felszaporítottuk.

Mintánként és reakciónként 48 µl premix oldatot és 3 µl templátot mértünk össze 200 µl-es PCR csővekbe az alábbiak szerint:

- 5 µl 10 X Taq puffer (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM KCl, Fermentas)
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 10 µl dNTP (1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, Fermentas)
- 0,5 µl 27 forward primer (0,5 µg/ml, 5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3', IDT)
- 0,5 µl 519 reverse primer (0,5µg/ml, 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', IDT)
- 27 µl steril dH₂O

Az összemért premixeket enyhén homogenizáltuk, majd hozzáadtunk 1-1 µl templát DNS-t. Az elegyet összeráztuk, majd 4-5 másodpercig centrifugáltuk 3000 rpm-en.

A mintákat Whatman Biometra Tpersonal PCR készülékbe helyeztük, majd az alábbi PCR hőprofil beállításával elindítottuk a reakciót:

16S PCR	
1. Kezdeti denaturáció	95°C 3 perc
2. Denaturáció	94°C 30 mp
3. Anelláció	52°C 30 mp
4. Extenzió	72°C 30 mp
5. PCR ciklus (2-4. lépések)	25 x
6. Végső extenzió	72°C 10 perc
7. Hűtés	4°C

A PCR termékeket a 6.3.2. alpontnál leírtak szerint VIII-as markerrel ellenőriztük.

6.6.7. A PCR termékek tisztítása

A PCR-termékek tisztításához PCR Quick-spin purification-kitet (Intron Biotechnology Inc.) használtunk:

- 2 ml-es gyűjtőcsőbe filtert helyeztünk, majd 500 µl Binding puffert és 50 µl PCR-terméket töltöttünk rá. 11000 rpm-en 1 percig centrifugáltuk.
- A szűrletet elöntöttük, majd 700 µl Washing puffert töltöttünk a filterre. 11000 rpm-en 1 percig centrifugáltuk.
- A szűrletet elöntöttük, majd a csöveket ismét centrifugáltuk 11000 rpm-en 3 percig.
- A filtereket új, 1,6 ml-es centrifugacsövekbe helyeztük, majd 50-50 µl Elution puffert töltöttünk a filterek közepére. Inkubáltuk 1 percig szobahőmérsékleten, majd centrifugáltuk 11000 rpm-en 1 percig.
- A filtert kidobtuk, az 50 µl tisztított PCR-termék a cső alján gyűlt össze.

6.6.8. Szekvenáló reakció

Az alábbi szekvenáló reakciót állítottuk össze a PCR-termékekre:

- 1,5 µl 5 X hígító puffer (Applied Biosystems)
- 1 µl Big Dye Terminator Ready Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- 4 µl dH₂O
- 0,5 µl 27 forward primer (0,5 µg/ml, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', IDT)
- 3 µl templát DNS

Az alábbi hőprofil beállításával elindítottuk a reakciót:

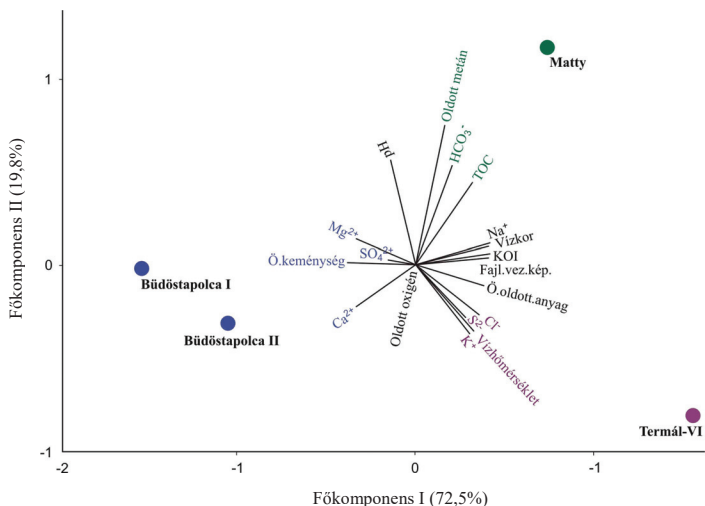
Szekvenáló reakció	
1. Denaturáció	96°C 10 mp
2. Anelláció	50°C 5 mp
3. Extenzió	60°C 4 perc
4. PCR ciklus (1-3. lépések)	28 x
5. Hűtés	4°C

A szekvenáló reakció-termékek etanos tisztítása érdekében a 6.4.11. alpont szerint jártunk el. A szekvenciák futtatását és elemzését a 6.4.12. illetve 6.4.13. alpontok alapján végeztük.

7. Eredmények és értékelésük

7.1. A termelőkutakból gyűjtött vízminták fizikai-kémiai vizsgálatának eredményei

A mért fizikai-kémiai paraméterek felhasználásával (Függelék 3. táblázat) főkomponens analízist végeztünk annak érdekében, hogy a mintázott kutak vizére jellemző változókat összehasonlíthassuk. A főkomponens elemzéshez a PAST (Paleontological Statistics V.2.08) szoftvert használtuk (Hammer és mtsai, 2001), és azokat a változókat (fizikai-kémiai paramétereket) vettük számításba, amelyek szignifikánsan korreláltak egymással. Az ordinációs diagramon látható, hogy a mintázott kutak az első főkomponens mentén (melyet többek között a vízhőmérséklet, szulfid-és alkálifém tartalom, valamint a vízkor határozott meg) jól elkülönültek egymástól (8. ábra).



8. ábra A Harkányi Gyógyfürdő vizsgált termelőkútjainak ordinációja a vízmintákban mért fizikai-kémiai adatok alapján

A két főkomponens a minták összvarianciájának mintegy 92,3%-át magyarázza. Ezen eredményekből megállapítható, hogy a fizikai-kémiai jellemzőik alapján legjobban a Büdöstopolca I-es és II-es kutak hasonlítottak egymásra. A büdöstopolcai termelőkutak jellemzően langyosvizűek (18,3-23,2°C) voltak, a kifolyó vizeket viszonylag magas kalcium

(86-106 mg l⁻¹)- és alacsony szulfid-koncentráció (1,7-6,7 mg l⁻¹), valamint egymáshoz képest alacsony vízkor (560-4900 év) jellemezte. A leginkább elkülönülő Termál-VI-os kút kifolyó vizére ezzel ellentétben magas hőmérséklet (61,8°C), viszonylag nagy nátrium (190 mg l⁻¹)- és szulfid-tartalom (11,1 mg l⁻¹), valamint magas vízkor (32000 év) volt jellemző. A Matty-kút kifolyó vízének fizikai-kémiai profilja mind a bűdöstopolcai kutaktól, mind a termálkúttól különbözött. A vizsgált paraméterek alapján egyszerre tükröződött benne a felszín felől leáramló hidegkarszt és a mélységi termálkarszt eredet. A kút kifolyó vízhőmérséklete (26,4°C), szulfid-tartalma (5,7 mg l⁻¹) és a vízkora (26500 év) a bűdöstopolcai és a termálkút mért értékei között helyezkedtek el (Függelék 3. táblázat).

A bűdöstopolcai kutak földrajzi közelsége ellenére a siklói karsztvíztározóban a villányi hidegkarszt és mélységi termálkarszt között már kismértékű keveredés jöhetett létre, hiszen a Bűdöstopolca II-es kút vízprofilján a mélységi vizek jellemzői jobban megjelentek, mint a Bűdöstopolca I-es kút esetében. Ez a különбözőség a két bűdöstopolcai kút kifolyó vize között elsősorban az eltérő vízhőmérsékletben, szulfid- és alkálifém-tartalomban, valamint a vízkorban nyilvánult meg. A bűdöstopolcai kutaktól távolabb, a harkányi karsztrögbe csövezett Termál-VI-os kút vízprofilja mélységi fedett karszt eredetre utalt, míg a Matty kút vize erősen kevert genetikájú volt.

Összességében elmondható, hogy a kutatásba bevont termelőkutak kifolyó vizében a legjelentősebb eltérés a vízhőmérsékletben, illetve a szulfid-koncentrációban mutatkozott, és ez a két változó egyenes összefüggést mutatott, hiszen a magasabb hőmérséklet általában magasabb szulfid-koncentrációval társult. Ugyanakkor fontos megemlítenünk, hogy a termelőkutak kifolyó vizéből oldott oxigén-tartalmat nem tudtunk kimutatni (<0,1 mg l⁻¹), ami a kutak és közvetve a karsztvíztározók anoxikus jellegére utal.

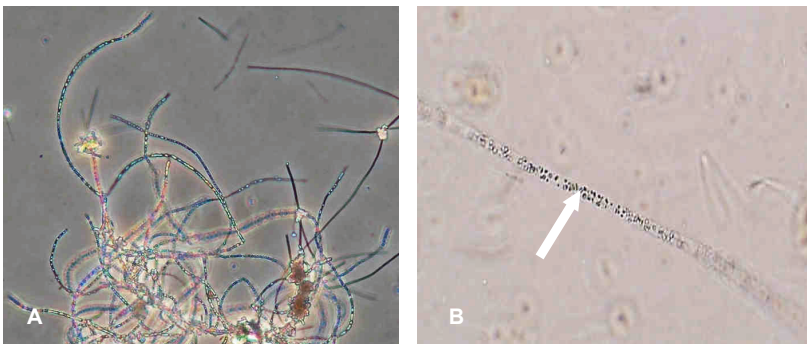
7.2. A mikroszkópos vizsgálatok eredményei

A centrifugálással tömörített BTK, BT2 és mattyi vízmintákban mind a fáziskontraszt-mikroszkópos, mind a pásztázó-elektronmikroszkópos vizsgálatok során *Thiothrix*-szerű fonalas baktériumokat és azok sejtaggregátumait figyeltük meg. Rövidebb (50-100 µm hosszú) és hosszabb (400-500 µm hosszú) szintelen filamentumokat különböztettünk meg, melyekben a fáziskontraszt mikroszkóp segítségével a sejteket elválasztó válaszfalakat, illetve a fonalaktól eltérő fénytörésű granulumok felhalmozódását észleltünk (9. ábra). Ezek a granulumok feltehetően elemi kénszemcsék, melyek a biológiai szulfidoxidáció köztermékeiként halmozódtak fel. A sejtfonalak nem ágaztak el, egyenesek vagy enyhén

hajlottak voltak, hurkot nem képeztek, és kötegekbe sem rendeződtek. Alapi részüknél egy ponton rögzültek, amittől jellegzetes fűcsomó-szerű elrendeződést mutattak. Az alapi rögzülés minden esetben szilárd felületre, általában valamilyen ásványi szemcsére (mangán-oxid vagy vas-hidroxid) történt. Egyes filamentumok a csúcsi végeken elvékonyodtak, ahol némely esetben gonídium-szerű szaporító képletek voltak megfigyelhetők. A sejtfonalak átlátszó baktériumhüvelyt képeztek. Csúszó mozgást és egyéb, hely- vagy helyzetváltoztató mozgást egyik esetben sem észleltünk.

A fonalak felületére és a fonalak közé különböző morfológiájú ásványi szemcsék, illetve baktériumok rögzültek. Ezek a bakteriális csoportosulások leginkább a rozetták alapi részénél voltak megfigyelhetők, ahová feltehetően kezdetben ásványi szemcsék rakódtak, majd fokozatosan szabadon úszó és lebegő baktériumok halmozódtak fel, és kolonizálódtak (10. ábra).

Vízes környezetekben szilárd felületre való tapadás igen gyakori életstratégia, amely megtalálható a legkülönfélébb természetes vagy mesterséges ökoszisztémákban (pl. folyókban, patakokban, tengerparti hullámmazónáknál, vízhálózatokban). A felületre tapadó baktériumok alapi részüknél letapadó sejtfonalakat, fonalak alkotta rozettákat, biofilmet képezve fordulhatnak elő (Schlegel és Jannasch, 2006), ahogyan az *Thiothrix*-fonalas telepek esetén megfigyelhető volt. Ez alapján feltételezzük, hogy a *Thiothrix* kénbaktériumok a karsztvíztározók kőzetfelületeire vagy a termelőktak belső felületére tapadva fordulnak elő.



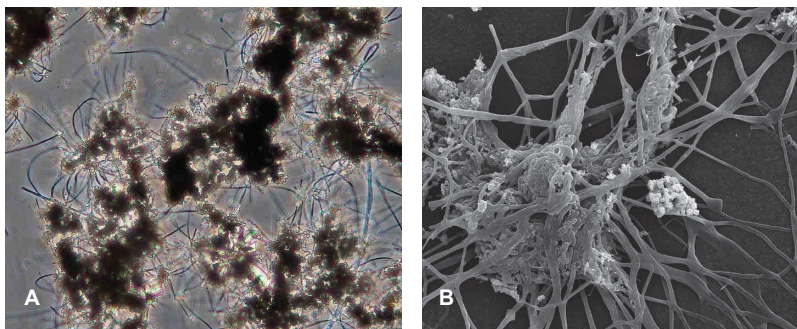
9. ábra A Büdöstapoca II-es kútból származó vízmintában előforduló baktériumokról készült fénymikroszkópos felvételek

(A: *Thiothrix*-fonaltelep 200-szoros nagyítású fáziskontraszt mikroszkópos képe;

B: *Thiothrix*-sejtfonal és intracelluláris kéngranulumok 600-szoros nagyítású fénymikroszkópos képe.

A nyíl a sejten belüli kéngelhalmozódást jelöli)

A fonalas baktériumok mellett a langyos vizű termelőkutakból származó mintákban – a redukált kén egy igen jellegzetes megjelenési formáját – az 5-15 μm átmérőjű gömbszerű pirit-framboidokat figyeltük meg, melyek rendszerint anoxikus, redukált kén- és vastartalmú közegben alakulnak ki (11. ábra). Framboid szemcséket változatos környezetekből, karsztos barlangi vizek anoxikus üledékrétegéből és vízfelszíni biofilmjéből, vulkanikus területekről, tengeri üledékből és sós tavak üledékéből is kimutattak (de Koff és mtsai, 2008; Popa és mtsai, 2004; Sweeney és Kaplan, 1973). A szabályos oktaéder kristályszerkezetű pirit-ásványok jellemzően gömbszimmetrikus formába csoportosulnak, amelyben az egyes ásvány-szemcséket feltehetően a szemcsék közötti ragasztófunkcióval rendelkező szerves anyagok, valamint mágneses vonzerő tartja össze.

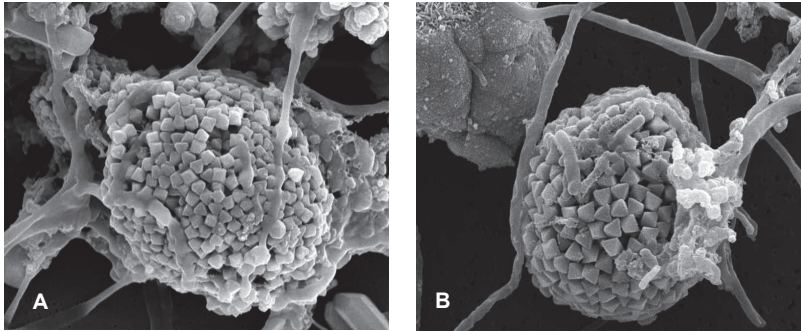


10. ábra A Matty-kút vizéből származó *Thiothrix*-szerű fonalak rögzülése ásványi szemcsés-mikrobiális konglomerátumra

(A: 400-szoros nagyítású fáziskontraszt-mikroszkópos fotó;
B: 2000-szeres nagyítású pásztázó elektronmikroszkópos fotó; Makk J. felvétele)

A framboidok közvetett és közvetlen kialakulásában a szulfátredukáló és vasredukáló baktériumok szintén szerepet játszhatnak azáltal, hogy a szulfátredukálók az oldott szulfátot elektronakceptoroként felhasználva szulfiddá redukálják. A szulfid a redukált vassal egyesül, majd bakteriális aktivitás következtében a vas-szulfid elemi kénnel asszociál (Beveridge és mtsai, 1983), így biogén úton pirit-kristályok keletkeznek, amelyek anoxikus körülmények között framboid szemcsékké tömörülnek: $\text{H}_2\text{S} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{FeS} + \text{H}_2$; $\text{FeS} + \text{S}^0 \rightarrow \text{FeS}_2$.

Popa és mtsai (2004) kimutatták, hogy vízben lebegő vagy felületi biofilmben a pirit-framboidok mennyisége szignifikánsan nagyobb volt, mint a baktérium-mentes mintákban, így a pirit-framboid az anoxikus vas-kén-tartalmú ökoszisztémákban biomarker szerepet tölthet be.



11. ábra A Büdöstopolca II-es termelőkút vizéből származó pirít-framboidokról készült pásztázó elektronmikroszkópos felvételek

(A: 4000-szeres és B: 6000-szeres nagyítású fotókon jól láthatók a gömbszimmetrikus framboid aggregátumokat felépítő oktaéder kristályszerkezetű piritszemcsék, Makk J. felvételei)

Mivel elektronmikroszkópos vizsgálatokat a termőkút mintákból nem végeztünk, így nem tudtuk megállapítani, hogy a langyos vízi kutak mintáiban megfigyelt framboidok mélységi abiotikus eredetűek-e, vagy a hidegkarszttal kevert víztározókban kén- és szulfátredukáló baktériumokban gazdag környezetben biogén úton alakultak-e ki.

7.3. A klónkönyvtárak feldolgozásának eredményei

A 2006. évi vizsgálatok során a Büdöstopolca I-es (BT1)- és a Büdöstopolca II-es (BT2) termelőkutakból származó minták elegyítésével létrehozott kompozit mintával (BTK) dolgoztunk. Ezt követően a büdöstopolcai kutakból 2007 áprilisában gyűjtöttünk mintákat, és azokat már külön vizsgáltuk. A Matty-kútból 2008 áprilisában, végül a Termál-VI-os (T6) termelőkútból 2008 novemberében gyűjtöttünk mintát molekuláris klónozás céljára. Az ARDRA mintázatonként csoportosított klónok reprezentánsait szekvenálás során azonosítottuk, majd a reprezentánsok filogenetikai rokonságát a Neighbor-joining módszerrel készített dendrogramokon (12-16. ábra) ábráztuk.

Az öt klónkönyvtárból összesen 202 klónt csoportosítottunk hasítási mintázatok alapján, melynek eredményeképpen 72 különböző ARDRA-csoportot kaptunk. A klónok 86%-a obligát vagy fakultatív kén-, illetve szulfidoxidáló, illetve szulfát/tioszulfátredukáló proteobaktériumokkal mutatott legnagyobb (94-99%-os) szekvencia hasonlóságot. Emellett a klónok 3%-a a Proteobacteria törzstől távoli anaerob kén-, illetve szulfidoxidáló Aquificae, Chlorobi, és Chloroflexi törzsek tagjaival álltak (96-98%-os szekvencia egyezéssel) filogenetikai rokonságban. Ezen felül a baktériumközösségeket egyéb mezofil és termofil

heterotróf baktériumok képviselői alkották. A klónkönyvtárak elemzése során csupán egyetlen, a T6 mintából származó klónt sikerült a Gram-pozitív baktériumok (Firmicutes) köréből kimutatnunk.

A Gram-pozitív mikroorganizmusok hiányát, vagy csekély mértékű közösségalkotó szerepét számos tanulmányban megfigyelték, amelyekben a harkányi kutatási területhez hasonló geológiai környezetből tenyésztéstől független módszerekkel tartak fel baktériumközösségeket. Engel és mtsai (2004), illetve Macalady és mtsai (2006) korábban említett tanulmányukban, egymástól földrajzilag távoli karsztosodott területek kénes vizeiből származó baktériumközösségeket molekuláris klónozással vizsgáltak, és közösségalkotó Gram-pozitív taxonokat nem tudtak kimutatni. Elshahed és mtsai (2003) egy oklahomai szulfidos artézi kútból származó biofilm baktériumközösségében a Proteobacteria törzsbe tartozó kénbaktérium, Chloroflexi, illetve Cyanobacteria dominanciát fedeztek fel. Gram-pozitív közösségalkotókat (Firmicutes, Actinobacteria) csupán 5%-alatti mennyiségben találtak. Ugyanakkor Borsodi és mtsai (2012) a Budai Termálkarszthoz tartozó "MJB" mintában a kénbaktériumok mellett nagy arányban (40%) Firmicutes-közösségalkotókat találtak, az "RTB" mintákban a Firmicutes képviselők száma azonban elenyésző volt.

Mivel a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok sejtfal-struktúrája eltérő, ezért az alkalmazott DNS feltérési protokollok preferenciális torzító hatások érvényesülését már korábbi kutatásokban is kimutatták (von Wintzingerode és mtsai, 1997, Frostegård és mtsai, 1999). Ennek következtében előfordulhat, hogy a különböző tenyésztéstől független, illetve tenyésztésen alapuló módszerek egyes baktériumcsoportokat eltérő arányban mutatnak ki egy adott mintában. Környezeti mintákból származó bakteriális közösségek molekuláris klónozással történő vizsgálatok számolnunk kell továbbá a PCR-t kedvezőtlenül befolyásoló tényezőkkel is, melyek végül szintén közösség-torzító hatást válthatnak ki. Sipos és mtsai (2007) tanulmányukban kifejtik, hogy a preferenciális amplifikáció problematikája többek között a kedvezőtlen annealációs hőmérséklet megválasztására vezethető vissza. Ennek megfelelően univerzális bakteriális primerek alkalmazása során a PCR optimalizálásával (alacsonyabb annealációs hőmérséklet megválasztásával, valamint a PCR-ciklusok számának mérséklésével) a preferenciális amplifikáció mértéke nagyban csökkenthető. A környezeti minták közösségi DNS-eiből kiinduló klónozásos technikák közösség-torzító hatásaival kapcsolatban Palatinszky és mtsai (2011) kimutatták, hogy a különböző klónozó kitek alkalmazása során preferenciális ligálás léphet fel, amelynek okai a vektorok eltérő inszertóssz-szelektivitásában rejlenek. Ezen torzítás mértékét a ligáló reakció idejének és hőmérsékletének helyes megválasztása csökkentheti. Az általunk tapasztalt jelenség tehát a

preferenciális DNS feltáródás, ligálás vagy amplifikáció torzító hatásának eredményére is visszavezethető.

Az alábbiakban az egyes klónkönyvtárak összetételét részletesen elemeztük, a közösségalkotókat magasabb taxonómiai szinteken (törzs, osztály) csoportosítottuk, és az egyes taxoncsoportokat a Bergey's Manual of Systematic Bacteriology rendszere szerint állítottuk sorrendbe (Noel és mtsai, 2010).

7.3.1. A BTK-klónkönyvtár elemzése

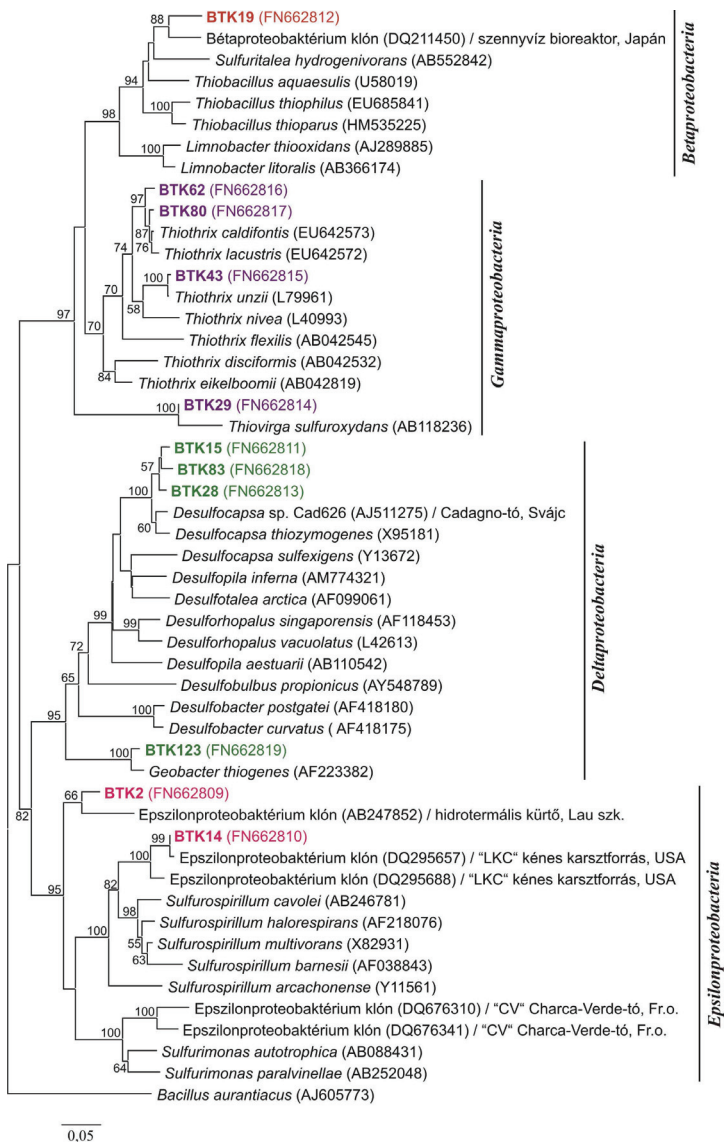
A 2006 novemberéből a bűdöstapolcai termelőkutakból származó kompozitmintá (BTK) 76 klónszekvenciából állt, melyek 9 különböző filotípust képviseltek. A BTK egyben a legnépesebb klónkönyvtár volt (Függelék 4. táblázat), melynek közösségét legnagyobb arányban a Gamma-és Epsilonproteobacteria osztályba tartozó szulfid-, illetve kénoxidáló kemolitotrófok képviselői, valamint szulfátredukáló deltaproteobaktériumokkal "SRB" rokon klónok alkották. Emellett egyéb, kénredukáló deltaproteobaktériumokkal rokon- és kemolitotróf kénoxidáló betaproteobaktériumokkal rokon szekvenciákat is azonosítottunk kisebb arányban. Az öt klónkönyvtár közül a BTK volt az egyetlen, amelyet kizárólag a Proteobacteria törzsbe tartozó kénbaktériumokkal rokon szekvenciák alkottak. A Proteobacteria a *Bacteria* doménen belül fejlődéstanilag az egyik legújabb, ugyanakkor a legtöbb ismert nemzetséget és fajt magába foglaló baktériumtörzs (4. ábra).

Phylum XII Proteobacteria / Class II Betaproteobacteria

A Betaproteobacteria osztályból a BTK19 egy szennyvíz bioreaktorból kimutatott környezeti klónnal mutatott legnagyobb mértékű (95%-os) szekvencia hasonlóságot (Niu és mtsai, 2006), és a *Thiobacillus*-kládba ágazott (12. ábra). A kládon belül a reprezentáns pedig a fakultatív anaerob, kén- és tioszulfát-oxidáló mezofil *Sulfuritalea hydrogenivorans* újonnan leírt baktériummal állt legközelebbi rokonságban, amelyet először Kojima és Fukui (2011) izoláltak egy japán édesvízi tó üledékből. A *Thiobacillus* nemzetség változatos anyagcserét folytató kemolitotróf kénoxidáló baktériumok csoportjából áll, állandó közösségalkotói kén-tartalmú édesvízi, tengervízi vagy felszín alatti élőhelyeknek (Kelly és Wood, 2000).

Phylum XII Proteobacteria / Class III Gammaproteobacteria

A Gammaproteobacteria osztályba tartozó klónszekvenciákat faji szinten sikerült azonosítani, melyek a *Thiothrix caldifontis* és *Thiothrix unzii* fajokkal, valamint a szulfid- és kénoxidáló *Thiovirga sulfuroxydans* fajjal álltak legközelebbi rokonságban. A BTK62 és BTK80 jelzésű klón a *Thiothrix caldifontis* fajjal mutatott 97%-os szekvencia-egyeztést,



12. ábra A Harkányi Gyógyfürdőhöz tartozó Büdöstapolca I-es és II-es termelőkutak vizéből származó kompozitminták molekuláris klónjainak Neighbor-joining módszerrel készült filogenetikai dendrogramja (Méterarány: 5% nukleotid különbség; Az ágakra írt számok a bootstrap analízis követően az elágazások százalékos valószínűségét jelzik. Az 50%-nál kisebb valószínűségű elágazásokat nem tüntettük fel.)

melyet több észak-kaukázusi szulfidos forrás biofilm-bevonatából izoláltak (Chernousova és mtsai, 2009). A *Thiothrix unzii* fajt (Howarth és mtsai, 1999) pedig a BTK43 klón képviselte 99%-os szekvencia hasonlósággal. A *Thiothrix* nemzetség tagjai nagyméretű, fonalás kénbaktériumok, melyek energianyeréshez elektrondonorként szulfidot hasznosítanak. A szulfid oxidációja során sejteiken belül elemi ként halmozhatnak fel (Howarth és mtsai, 1999; Moissl és mtsai, 2002). A *Thiothrix* kénbaktériumok széles körben elterjedt kemolitoheterotróf mikroorganizmusok, melyek megtalálhatók kénes oligotróf forrásokban, karsztvíztározókban, hideg és hévforrások vizében, valamint szennyvíztelepek műtárgyaiban egyaránt (Brigmon és mtsai, 1995). A BTK, BT2 és a mattyi vízmintákból származó biomasszában a fénymikroszkópos vizsgálatok során *Thiothrix*-fonalakat és fonalak alkotta telepeket találtunk. A BTK29 a *Thiovirga sulfuroxydans* rokonsági körébe tartozott (97%), amelyet először 2004-ben izoláltak szennyvíztelepi biofilmről (Ito és mtsai, 2005). Ez a baktérium kemolitotróf anyagserét folytat, mikroaerofil környezetben képes a kén, valamint az oldott szulfid- és tioszulfát oxidációjára, miközben szulfátot képez. A fent említett szintelen kemolitotrófok így tehát feltehetően fontos képviselői a bűdöstopolcai tározókban zajló biogén kén-ciklusnak.

Phylum XII Proteobacteria / Class IV Deltaproteobacteria

A BTK klónszekvenciák zöme (32 klón) a Deltaproteobacteria osztályba tartozott (Függelék 4. táblázat). A BTK15, BTK28 és BTK83 jelű klón reprezentánsok összesen 28 klónt képviseltek, melyek a svájci Cadagno-tó vizéből izolált *Desulfocapsa* sp. Cad626 baktériummal álltak (96-97% szekvencia hasonlósággal) rokonságban (Peduzzi és mtsai, 2003; Tonolla és mtsai, 2000), és a nemzetségen belül a legközelebbi (95-97%-os hasonlóság) ismert rokonuk a *Desulfocapsa thiozymogenes* (Janssen és mtsai, 1996) volt. A *Desulfocapsa* nemzetség tagjai anaerob szulfátredukáló baktériumok, melyek energiatermelő folyamataikban hidrogént vagy szerves vegyületeket használnak elektrondonorként és oxidált kénvegyületeket (szulfátot és szulfitot) elektronakceptorként. A szulfát és szulfit redukciója során ezek a baktériumok szulfidot állítanak elő (Peduzzi és mtsai, 2003). A négy klónt képviselő BTK123 az anaerob vas- és kénredukáló *Geobacter thiogenes* (*Trichlorobacter thiogenes*) baktériummal 97%-os szekvencia hasonlóságot mutatott, és elkülönült kládot alkotott a szulfátredukáló deltaproteobaktériumoktól. [A BTK123 reprezentáns a *Geobacter* nemzetség többi tagjával, és más vasredukáló talajbaktériummal (*Geovibrio*) bizonytalan filogenetikai pozícióban állt, ezért ezeket a leszármazási kapcsolatokat a törzsfán nem ábrázoltuk.] A *Geobacter thiogenes*-t De Wever és mtsai (2000) izolálták egy talaj anaerob zónájából. A nemzetség tagjai elektrondonorként szerves vegyületeket (ecetsavat, aromás

szénvegyületeket, szerves bomlástermékeket) hasznosítanak, végső elektron akceptoruk pedig a Fe^{3+} vagy az elemi kén (Lonergan és mtsai, 1996). *Geobacter* fajokat korábbi kutatások eredményeként különböző tengeri, folyótorkolati, forrásvízi élőhelyek üledék-zónájából izoláltak, tehát feltehetően általános szereplői az üledékekben, biofilmekben lezajló vastartalmú vegyületek redukációs folyamatainak (Coates és mtsai, 1996). Mivel a vas a természetben gyakori elem, a vasredukáló baktériumok (*Geobacter*, *Geovibrio*) gyakoriak talajokban, felszínalatti vizekben. A *Geobacter* fajok energia-termelésük során növelik a környezetet redukált vas koncentrációját, ezáltal elősegíthetik a biogén pirít képződését.

Phylum XII Proteobacteria / Class V Epsilonproteobacteria

A BTK2 és BTK14 jelzésű klónok eddig még tenyésztésbe nem vont környezeti epszilonteobaktérium klónokkal álltak legközelebbi (89%-os és 99%-os szekvencia hasonlóság, egyenként) rokonságban. A domináns BTK14 (25 klón képviselésében) a Lower Kane Cave karsztosodott barlangrendszer szulfidos vizeiből származó "LKC" környezeti epszilonteobaktérium klónok (Porter és Engel, 2008) szekvenciáival mutatott legnagyobb (99%-os) hasonlóságot, és a *Sulfurospirillum* nemzetség tagjaival képezett egy kládot a törzsfán. A *Sulfurospirillum*-ok változatos anyagcseréjű baktériumok: a *S. cavolei*, *S. halorespirans*, *S. multivorans*, *S. barnesii* fajokat változatos környezetekből izolált anaerob kénoxidálók (Kodama és mtsai, 2007; Luijten és mtsai, 2003; Scholz-Muramatsu és mtsai, 1995; Stolz és mtsai, 1999), míg a *S. arcachonense* mikroaerofil heterotróf kénredukáló baktérium, melyet Finster és mtsai (1997) francia partvidéki óceánfenéki üledékből izoláltak. A BTK2 klón legközelebbi rokona egy a polinéz szigetvilághoz tartozó Lau-szigeteki hidrotermális kúrtóból származó környezeti klón volt. Ez a klón csoport a törzsfán az "LKC" klónoktól és a *Sulfurospirillum* kládtól egyaránt távoli leágazást mutatott.

A felszíni, felszín közeli édesvízi kénes területek mellett napjainkban egyre több új epszilonteobaktériumot (pl. *Sulfurimonas*, *Caminiabacter*, *Nautilia*, *Alvinella*) izolálnak nehezen megközelíthető mélytengeri környezetekből, üledékmintákból, mélytengeri hasadékok hidrotermális kúrtóból, illetve aljzaton élő alsóbbrendű állatokból is, melyek ott domináns közösségalkotó szerepet töltenek be (Inagaki és mtsai, 2003; Takai és mtsai, 2006). Annak ellenére, hogy az epszilonteobaktériumok dominanciáját a közelmúlt kutatásaiban különböző édesvízi és tenger-mélytengeri környezetből is igazolták (Briée és mtsai, 2007; Engel és mtsai, 2004; Porter és Engel, 2008), az adatbázisokban fellelhető szekvenciák nagy része ez ideig tenyésztésbe még nem vont környezeti klónokat tartalmaz. Így a bűdöstopolcai kutak vizéből származó epszilonteobaktérium-klónszekvenciák legközelebbi ismert fajokkal való evolúciós távolsága a dendrogramon nagy volt. Az epszilonteobaktérium

proteobaktériumoknak fontos szerepük van a geológiai környezet formálásában is, hiszen kemolitotróf anyagcseréjük által közreműködnek kőzetek oldásában és a porózus felületek kialakításában egyaránt (Engel és mtsai, 2004).

7.3.2. A BT1-klónkönyvtár elemzése

A BT1 klónkönyvtárból származó 46 klón 10 filotípust képviselt, melyek egy klón kivételével a Proteobacteria törzs tagjai voltak (Függelék 5. táblázat). A legnagyobb számban (35 klón) képviselt Epsilonproteobacteria-klónok anaerob kénoxidáló kemolitotróf fajokkal mutattak (90-99%-os szekvencia hasonlósággal) rokon kapcsolatot. Emellett a BT1 közösségben viszonylag nagyobb arányban különböző mikroaerofil, kénoxidáló kemolitotróf bétaproteobaktériumok képviselői is előfordultak, ugyanakkor a kemolitotróf gammaproteobaktériumokkal és szulfátredukálókkal rokon szekvenciákat ebben a klónkönyvtárban nem tudunk kimutatni. Csupán egy anaerob kénredukáló fajjal rokon klónt sikerült azonosítanunk, amely a kén-redukációs folyamatokban szerepet játszhat.

Phylum XII Proteobacteria / Class I Alphaproteobacteria

A BT1-4 közeli rokona (97%-os szekvencia hasonlósággal) a bíbor nem-kénbaktériumok csoportjába tartozó *Rhodobacter vinaykumarii* fajnak, melyet az Indiai-óceán tengerparti övezetéből izoláltak (Srinivas és mtsai, 2007). Jellemzően fotoheterotróf vagy kemoheterotróf módon él. Mivel a *Rhodobacter* nemzetség tagjai rendelkeznek a fény megkötésére fotoszintetikus pigmentekkel (bakterioklorofill-a, karotinoidek), így anoxikus környezetben szerves vegyületek hiányában fotoautotróf anyagcserére is képesek. Fotoautotrófia során hidrogént vagy kis mennyiségben szulfidot használnak elektron-donorként. A nemzetségen belül a *Rhodobacter vinaykumarii* az egyetlen faj, melyet tengervízből izoláltak, míg a többi fajt édesvízi környezetből írták le (Hansen és Imhoff, 1985; Hiraishi és mtsai, 1995; Imhoff, és mtsai, 1984). A nemzetség korábbi jellemzése a *Rhodobacter vinaykumarii* leírásával módosult, miszerint a *Rhodobacter* nemzetség legtöbb faja édesvízi baktérium, életműködésükhöz só nem szükséges, azonban néhány faj sós, tengeri környezethez adaptálódott (Srinivas és mtsai, 2007). A BT1 klónkönyvtár feldolgozása során kapott filogenetikai dendrogramon jól látható, hogy a bíbor nem-kénbaktérium kládba tartozó típusfajok olyan monofiletikus csoportot képeznek, amelyben a *Rhodobacter* fajok közös leszármazási vonala a *Rhodovulum* nemzetség felé mutat (13. ábra). Ez részben alátámasztja a Srinivas és mtsai, (2007) által leírtakat, azaz a *Rhodobacter* baktériumok ősei tengeri fajok lehettek, melyek később adaptálódtak az édesvízi környezethez.

Phylum XII Proteobacteria / Class II Betaproteobacteria

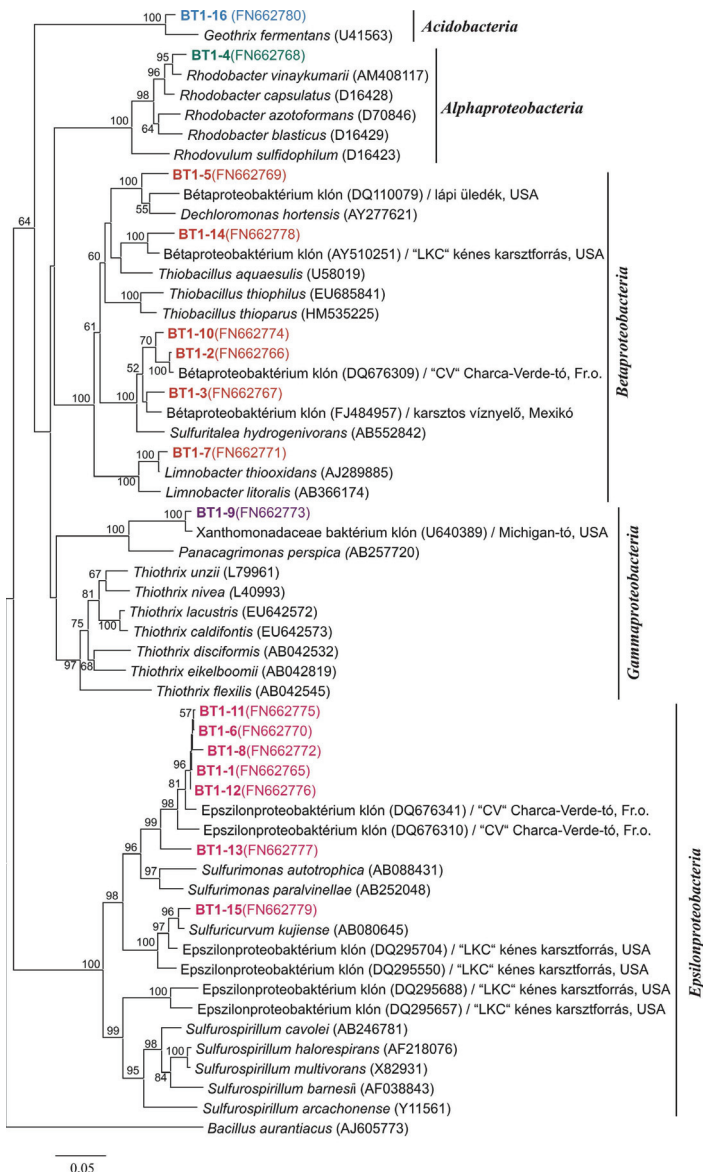
A Betaproteobacteria osztályt 6 reprezentáns klón képviselte. Ezek közül a BT1-7 jelzésűt sikerült faj szinten azonosítani, amely a *Limnobacter thiooxidans* fajjal mutatott legnagyobb (98%-os) szekvencia hasonlóságot. Ezt a kemolito-heterotróf baktériumot egy édesvízi tó üledékének felső, mikroaerofil rétegéből izolálták. A tioszulfátot használja elektronforrásként, így a tioszulfát oxidációjával és szulfát-képzéssel a biológiai kénkörforgalom részese (Spring és mtsai, 2001). A BT1-2 és BT1-10 jelzésű klónok a franciaországi Charca-Verde tavi "CV" mintából (Briée és mtsai, 2007) származó környezeti klónnal, a BT1-3 pedig egy mexikói karsztos víznyelő (El Zacatón) környezeti klónjával mutatta a legnagyobb (97%) szekvencia hasonlóságot. Ezek a bétaproteobaktérium klónok a *Sulfuritalea* nemzetség ez idáig egyetlen ismert képviselőjével, a fakultatív anaerob kén- és tioszulfát-oxidáló *Sulfuritalea hydrogenivorans* fajjal (Kojima és Fukui, 2011) alkotnak közös kládot. A BT1-14 klón egy Lower Kane Cave biofilm-mintából származó *Thiobacillus* klónnal (Engel és mtsai, 2004) mutatott legnagyobb (96%-os) szekvencia hasonlóságot, és legközelebbi ismert rokona a *Thiobacillus aquaesulis* kemolitotróf, kénoxidáló baktérium (McDonald és mtsai, 1996) volt. A BT1-5 klón egy eddig tenyésztésbe nem vont lápi üledékből származó környezeti klónt képviselt (Weber és mtsai, 2006), amely a *Dechloromonas hortensis* fajjal mutatott távolabbi (95%-os szekvencia hasonlóság) rokonságot. Ez az édesvízi üledékekben élő anaerob vasredukáló baktérium – közvetlen környezetében a többi vasbaktériummal együtt – biomineralizációs tevékenységet folytat (Wolterink és mtsai, 2005).

Phylum XII Proteobacteria / Class III Gammaproteobacteria

A Gammaproteobacteria osztályt a BT1-9 jelzésű klón képviselte, amely egy a Michigan-tavi bakterioplanktonból kimutatott Xanthomonadaceae környezeti klónnal mutatott legnagyobb (98%-os) szekvencia hasonlóságot (Müller-Spitz és mtsai, 2009). A BT1-9, mint a Gammaproteobacteria egyetlen képviselője a *Thiothrix*-kládtól távoli leágazást mutatott, és a legközelebbi ismert rokonával, a *Panacogrimonas perspica* talajbaktériummal (Im és mtsai, 2010) is csupán távoli (90%-os szekvencia hasonlóság) filogenetikai kapcsolatban állt.

Phylum XII Proteobacteria / Class V Epsilonproteobacteria

A domináns klóncsoport (35 klón) a kompozit könyvtár összetételéhez hasonlóan az Epsilonproteobacteria osztályba tartozott. Azonban ezek a klónok (BT1-1, BT1-6, BT1-8, BT1-11, BT1-12, BT1-13) a "CV" környezetből származó epsilonproteobaktérium klónokkal mutattak (90-91%-os hasonlósági ráta) rokonságot (Briée és mtsai, 2007), és az anaerob kemolitotróf kénoxidáló *Sulfurimonas* nemzetség két tagjával, a *Sulfurimonas paravinellae*,



13. ábra A Harkányi Gyógyfürdőhöz tartozó Büdöstopolca I-es termelőkút vizéből származó molekuláris klónok Neighbor-joining módszerrel készült filogenetikai dendrogramja

(Méteratány: 5% nukleotid különbség. Az ágakra írt számok a bootstrap analízist követően az elágazások 50%-nál nagyobb valószínűségét jelzik. Az 50%-nál kisebb valószínűségű elágazásokat nem tüntettük fel.)

illetve a *Sulfurimonas autotrophica* fajokkal alkottak közös kládot. Az *Sulfurimonas autotrophica* aerob-mikroaerofil, szulfid-, kén- és tioszulfát-oxidáló kemolitotróf szervezet, melyet Inagaki és mtsai (2003) izoláltak egy 1500 m mélységében lévő mélytengeri hidrotermális hasadék üledékéből. Az *Sulfurimonas paravinellae* fajt szintén tengeri hidrotermális környezetből izolálták Japánban, mely a tengeri *Paravinella* kolóniák (soksertéjű férgek) endoszymbióntája (Takai és mtsai, 2006). További 3 klónt a BT1-15 képviselt, amelyet a 99%-os szekvencia-hasonlóság alapján *Sulfuricurvum kujiense*-ként azonosítottunk. Ezt az anaerob, kemolitotróf, szulfid- és kénoxidáló baktériumot először Kodama és Watanabe (2003) írták le egy kőolajtározóból, mely a Lower Cane Cave egyes környezeti klónjaival (Porter és Engel, 2008) közös kládot alkotott. A BT1 klónkönyvtár epszilonproteobaktérium klónjai azonban a BTK epszilonproteobaktérium klónokkal ellentétben a *Sulfurispirillum* kláddal csak távoli leszármazási kapcsolatban álltak.

Phylum XX Acidobacteria

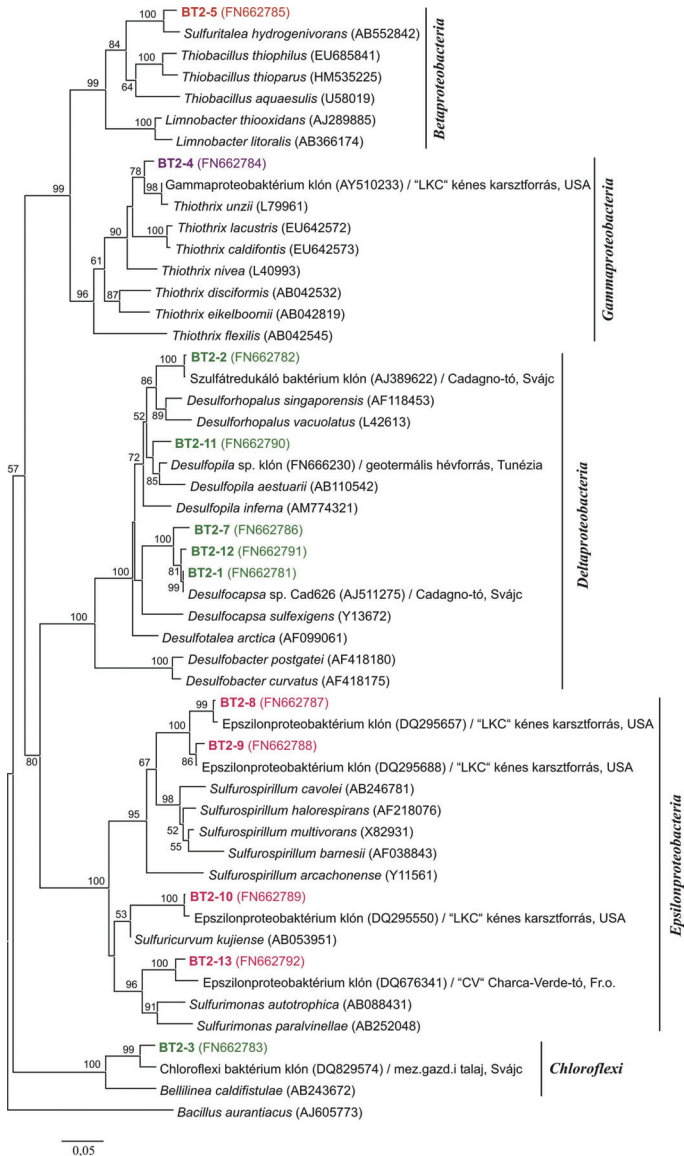
A BT1-16 jelzésű klón legközelebbi rokona (97%-os szekvencia-hasonlósággal) a *Geothrix fermentans* faj volt, mely a filogenetikai fában külön kládot alkotott. Az Acidobacteria törzsbe tartozó *Geothrix* nemzetség egyetlen eddig leírt képviselőjét Coates és mtsai (1999) izolálták szénhidrogén-tartalmú víztározókból. A *Geothrix fermentans* anaerob vasredukáló baktérium, különböző szerves savakat, zsírsavakat képes oxidálni, miközben a Fe^{3+} -at használja elektronakceptorként. A fajt számos anaerob üledékből írták le, amely más vasredukáló baktériumokkal, főként *Geobacter* fajokkal együtt szerves vegyületek oxidálásában és a Fe^{3+} redukciójában vesz részt (Loneragan és mtsai, 1996). A vasredukáló baktériumok (pl. *Geobacter*, *Geothrix*, *Dechloromonas*) és a szulfátredukáló baktériumok (pl. *Desulfocapsa*, *Desulfopila*) biomineralizációs kapcsolatára közvetve tudunk utalni, azáltal, hogy eredményeink szerint a szulfátredukálók a vasredukáló baktériumokkal a bűdöstopolcai karsztban egy közösséget alkottak (bár a BT2 klónkönyvtárból vasredukálókat nem tudtunk kimutatni), és ugyanott az üledékmintákban framboid-szemcséket is meg tudtunk figyelni. A két baktériumcsoport együttes jelenléte tehát a biogén piritizációs folyamatokat igazolhatja, hiszen ezek a közösségek, anoxikus körülmények között biztosítják a framboid-képzés alapanyagaként szolgáló redukált kén és vasat. Mindemellett feltételezhető, hogy a vas- és szulfátredukálók szoros metabolikus kapcsolata a hasonló karakterisztikájú geokémiai környezetekben általános, hiszen ezen baktériumok együttes előfordulását Borsodi és mtsai (2012) a Budai Termál Karszt mintákból származó klónkönyvtárakból is igazolták.

7.3.3. A BT2-klónkönyvtár elemzése

A BT2 klónkönyvtár feldolgozása során csupán 14 reprezentatív klónt tudtunk bázissorrend elemzés során azonosítani, melyek 10 különböző filotípust képviseltek, és egy kivétellel mind a Proteobacteria törzsbe tartoztak. A BT2 klónkönyvtár alacsony klónszáma miatt valódi dominanciaviszonyokat nem tudtunk megállapítani, azonban a klónkönyvtár taxonómiai összetétele nagymértékben hasonlított a BTK könyvtár összetételéhez. Az Epsilonproteobacteria képviselői ugyanazon anaerob, kemolitotróf kénoxidálókkal álltak legközelebbi filogenetikai rokonságban, mint a BTK és BT1 közösségben talált epszilonproteobaktérium-klónok. A BT2 könyvtárban kimutatott szulfátredukáló deltaproteobaktériumokkal rokon klónok pedig a BTK klónkönyvtárban talált "SRB" klónokkal mutattak szekvencia-egyeztést. Továbbá, a Beta- és Gammaproteobacteria törzsbe tartozó kemolitotróf szulfid- és kénoxidálókkal rokon BTK klónokkal megegyező szekvenciákat a BT2 könyvtár is tartalmazott.

Phylum VI Chloroflexi

A BT1 klónkönyvtár mellett a BT2 klónkönyvtárból is sikerült színes fototróf baktériumok képviselőit kimutatnunk. Míg a Bűdöstopolcai I-es kútból származó vízmintából bíbor nem-kénbaktériumok, addig a Bűdöstopolca II-es kútból gyűjtött vízmintából zöld nem-kénbaktériumok jelenlétét igazoltuk a BT2-3 jelzésű klón képviselőjében. Ez a reprezentáns egy mezőgazdasági művelés alatt álló talaj mikrobaközösségéből származó *Chloroflexi* környezeti klónnal (Hartmann és Widmer, 2006) állt legközelebbi (96%-os szekvencia hasonlóság) rokonságban, és a *Bellinea caldifistulae* fonalas zöld nem-kénbaktérium távoli (90%-os hasonlóság) képviselője volt (14. ábra), melyet egy termofil, anaerob rothasztóból izoláltak (Yamada és mtsai, 2007). A *Chloroflexi* törzs tagjai jellemzően termofil, anaerob, mixotróf (fényben fotoheterotróf, sötétben kemoheterotróf) anyagcseréjű baktériumok. Fotoheterotróf életmód során hidrogént vagy szulfidot használnak elektrononorként. A *Chloroflexi* baktériumok jelenléte a bűdöstopolcai klónkönyvtárban nem meglepő, hiszen a törzs tagjait rendkívül változatos élőhelyekről (többek között talajból, tavak üledékéből, szennyvíziszapokból, hévforrásokból) kimutatták (Hugenholtz és mtsai, 1998). Ezen felül, a *Chloroflexi* törzsbe tartozó zöld nem-kénbaktériumok jelenlétét több magyarországi termál karsztforrás (egerszalóki hévforrás, budai termálkarszt) baktériumközösségéből is kimutatták, amelyekben a *Chloroflexi* képviselői többek között ősi termofil baktériumokkal (Aquificae, Thermodesulfobacteria), illetve cianobaktériumokkal alkottak közösséget (Zenke, 2002; Borsodi és mtsai, 2012).



14. ábra A Harkányi Gyógyfürdőhöz tartozó Büdöstopolca II-es termelőkút vizéből származó molekuláris klónok Neighbor-joining módszerrel készült filogenetikai dendrogramja (Méretarány: 5% nukleotid különbség. Az ágakra irt számok a bootstrap analízis követően az elágazások százalékos valószínűségét jelzik. Az 50%-nál kisebb valószínűségű elágazásokat nem tüntettük fel.)

Mivel ezek a fonalas baktériumok felülethez rögzült életmódot folytatnak, feltételezhető, hogy a zöld nem-kénbaktériumok a fonalas *Thiothrix* kénbaktériumokkal együtt a termelőkutak belső falán kialakult biofilm közösségek alkotói, mintsem a fedett karszt víztározójában élő szervezetek.

Phylum XII Proteobacteria / Class II Betaproteobacteria

Hasonlóan a BTK és BT1 könyvtárakhoz, a BT2-ben is kimutathatók voltak kis mennyiségben kénoxidáló bétaproteobaktériumokkal rokon klónok. A BT2-5 jelzésű klón a *Thiobacillus* kládba ágazott, és a *Sulfuritalea hydrogenivorans* fajjal (Kojima és Fukui, 2011) mutatott legközelebbi (97%-os) rokonságot. Így feltételezhető, hogy az epszilonproteobaktériumok mellett a *Sulfuritalea hydrogenivorans* mindhárom bűdöstopolcai klónkönyvtár univerzálisan jelen lévő közösségalkotója.

Phylum XII Proteobacteria / Class III Gammaproteobacteria

A Gammaproteobacteria osztályt és azon belül a *Thiothrix* nemzetséget a BT2-4 jelzésű klón képviselte, amely a Lower Kane Cave környezet biofilmjéből származó klónokkal (Engel és mtsai, 2004) mutatott legnagyobb (98%-os) genetikai hasonlóságot. Ezen analógia alapján és a *Thiothrix* fajok életstratégiájának ismeretében feltételezzük, hogy a bűdöstopolcai kutak vízmintáiból kimutatott *Thiothrix* fonalas kénbaktériumok feltehetően biofilmalkotók, és biofilmet (más fonalas és egyéb baktériumokkal konzorciumot alkotva) a termelőkutak csővezetékeinek belső felületén alakítanak ki.

Phylum XII Proteobacteria / Class IV Deltaproteobacteria

Míg a Bűdöstopolca I-es termelőkút mintából a szulfátredukáló deltaproteobaktériumok teljesen hiányoztak, addig a BT2 vízmintából származó klónkönyvtárban számos képviselőjüket ki tudtuk mutatni: a BT2-7, BT2-12, BT2-1 reprezentánsok (hasonlóan a BTK klónkönyvtár deltaproteobaktérium klónjaihoz) a svájci kénés Cadagno-tó vizéből izolált anaerob szulfátredukáló *Desulfocapsa* sp. Cad626- jelű tenyésztéssel álltak legközelebbi (96-99%-os) rokonságban, amely bíbor kénbaktérium-klóniákkal (*Lamprocystis*) együtt bakteriális asszociációt képezett (Peduzzi és mtsai, 2003). Továbbá, a BT2-2 jelzésű klón szintén a svájci Cadagno-tó üledékéből származó szulfátredukáló baktérium klónnal mutatott legközelebbi rokonságot, mely a *Desulforhopalus* nemzetség tagjaival képezett közös kládot a törzsfán. A BT2-11 pedig egy tunéziai geotermális hévforrásból kimutatott *Desulfopila*-klónnal (Sayeh és mtsai, 2010) mutatott legnagyobb (96%-os) szekvencia hasonlóságot, melynek legközelebbi rokona a *Desulfopila aestuarii* baktérium volt (Suzuki és mtsai, 2007).

Phylum XII Proteobacteria / Class V Epsilonproteobacteria

Az BT2 klónkönyvtárból származó epszilonteobaktérium klónok (hasonlóan a BTK és BT1 közösségekből kimutatott klónokkal) szintén a Charca Verde-tó, illetve a Lower Kane Cave karsztforrás környezeti klónjaival mutattak legközelebbi (95-99%) filogenetikai rokonságot, bár ez esetben a klónkönyvtár alacsony klónszáma miatt közösségi dominanciát nem tudunk megállapítani. A BT2-8 és BT2-9 jelzésű klónok az "LKC" epszilonteobaktérium csoport tagjaival mutattak közeli (99%-os) rokonságot, melyek a *Sulfurospirillum* baktériumokkal alkottak közös kládot. A BT2-10 jelzésű klón szintén egy "LKC" epszilonteobaktérium klónnal volt rokonságban, bár ezek a klónok filogenetikailag távolabb álltak az előbb említett "LKC" környezeti klónoktól, és a *Sulfuricurvum kujiense* kénoxidáló baktériummal is csupán távol-rokoni kapcsolatot mutattak (Kodama és Watanabe, 2003). Végül, a BT2-13 reprezentáns klón egy "CV" epszilonteobaktérium klónnal mutatott legnagyobb (95%-os) szekvencia hasonlóságot, melyek *Sulfurimonas* baktériumokkal álltak távol-rokoni viszonyban.

7.3.4. A mattyi-klónkönyvtár elemzése

A mattyi karsztvízbázis áramlási szempontból kevert genetikájú, ami a baktériumközösség-összetételében is tükröződött, hiszen a mattyi klónkönyvtár csak részben hasonlított a bűdöstopolcai klónkönyvtárakhoz. A bűdöstopolcai baktériumközösségekre jellemző kemolitotróf Beta-, Gamma- és Epsilonproteobacteria képviselői a mattyi klónkönyvtárban is megjelentek, ugyanakkor a Deltaproteobacteria és ezzel együtt a szulfátredukálók, valamint egyéb kénredukáló baktériumok képviselői hiányoztak. Mindemellett az eddigi klónkönyvtárakkal ellentétben itt számos heterotróf talajbaktérium képviselőjét azonosítottunk (Függelék 7. táblázat). A 18 klón alkotta klónkönyvtár tagjai 13 különböző filogenetikai csoport között egyenletesen oszlottak el, emiatt valódi dominancia viszonyokat itt sem tudunk megállapítani.

Phylum XII Proteobacteria / Class I Alphaproteobacteria

Az M2 és M16 jelzésű klónok az alfaproteobaktériumok osztályán belül egy új nemzetséget, a *Sphingopyxis* génuszt képviselték, melyet korábban a *Sphingomonas* nemzetségtől választottak le (Takeuchi és mtsai, 2001). Az M2 jelzésű klón egy skandináviai tisztított ivóvízmintából izolált *Sphingopyxis* sp. aerob, heterotróf baktériummal állt legszorosabb (99%) filogenetikai rokonságban (Berg és mtsai, 2009), és legközelebbi ismert rokona egy természetes ásványvízből izolált *Sphingopyxis taejonensis* heterotróf baktérium

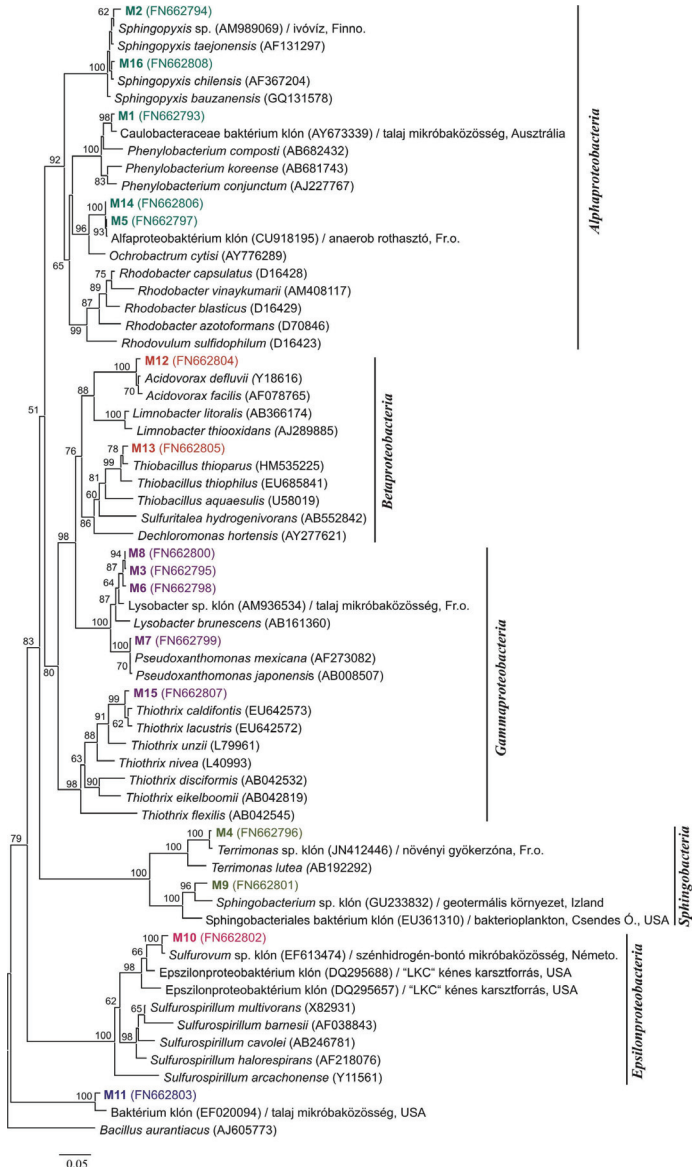
volt (Lee és mtsai, 2001). Az M16 jelzésű klón pedig a *Sphingopyxis chilensis*-t (Godoy és mtsai, 2003) képviselte (15. ábra). Az M1 jelzésű klón a *Phenylobacterium* nemzetség képviselői által alkotott kládba tartozott, és egy Caulobacteraceae környezeti klónnal mutatott legnagyobb (98%-os) szekvencia-egyezést (Davis és mtsai, 2005). A nemzetség tagjai tipikusan a kis szerves anyag tartalmú vizes közegeket kedvelik, és a sejtek rögzülésre alkalmas nyelet (ún. prostheca) képeznek, amivel az egyes sejtek egymással kolóniát vagy sejtfontalat alkotnak, és a kolóniák felszínhez rögzülnek (Abraham és mtsai, 2008; Schlegel és Jannasch, 2006). Aljzathoz rögzülő életmódjukat tekintve így feltételezhető, hogy a fonalas, *Thiothrix* baktériumokkal együtt a *Phenylobacterium*-ok szintén a kútszővek belső falain kialakult biofilmréteg közösségalkotói. Az M5 és a M14 jelzésű klónok egy szennyvíztelepi anaerob rothasztó mikrobaközösségből kimutatott ismeretlen klónnal mutattak legnagyobb szekvencia-hasonlóságot (Riviére és mtsai, 2009), és filogenetikailag az *Ochrobactrum cytisi* heterotróf talajbaktériumhoz (Zurdo-Piñeiro és mtsai, 2007) álltak legközelebb.

Phylum XII Proteobacteria / Class II Betaproteobacteria

Az M13 klón a *Thiobacillus* kládba került a törzsfán, és az aerob, kemolitotróf szulfid- és tioszulfát-oxidáló *Thiobacillus thioeparus* fajjal mutatott legnagyobb (99%-os) szekvencia-hasonlóságot, melynek típus törzsét karsztos, kénes barlangi környezetből (Movile-barlang) izolálták Délkelet-Romániában (Vlasceanu és mtsai, 1997). Az M12 reprezentáns klón a *Thiobacillus* kládtól távol, az *Acidovorax* talajbaktériumok kládjába illeszkedett, és 100%-os szekvencia-egyezéssel a nitrát-redukáló *Acidovorax defluvii* fajt képviselte (Schulze és mtsai, 1999).

Phylum XII Proteobacteria / Class III Gammaproteobacteria

A Gammaproteobacteria osztályba tartozó M15 jelzésű klón a *Thiothrix* kládba került, és a bűdöstapolcai kompozitmintából is kimutatott szulfidoxidáló *Thiothrix caldifontis* fonalas baktériummal (Chernousova és mtsai, 2009) állt legközelebbi (99,7%-os) kapcsolatban. Az M3, M8, M6 klóncsoport tagjai eddig tenyésztésbe nem vont *Lysobacter* környezeti klónnal mutattak legközelebbi (98%-os szekvencia-hasonlóság) rokonságot, melyet olajjal szennyezett talajból mutattak ki (Militon és mtsai, 2010), és az anaerob heterotróf *Lysobacter brunescens*-hez álltak legközelebb (Christensen és Cook, 1978). A *Lysobacter* nemzetség tagjai (Xanthomonadaceae család) széles körben elterjedt mezofil, fakultatív anaerob, heterotróf szervezetek, melyek jellemzően talajban, talajvízes környezetben, szennyvíziszapban, valamint növénytermesztés során a táptalajok gyökérszónáiban fordulnak elő (Bae és mtsai, 2005; Lee és mtsai, 2006; Park és mtsai, 2008; Weon és mtsai, 2006). Számos fajuk (például *L. brunescens*, *L. gummosus*, *L. antibioticus*, *L. capsici*, *L. enzymogenes*) a rizoszférában fejti



15. ábra A Harkányi Gyógyfürdőhöz tartozó Matty-termelőkút vizéből származó molekuláris klónok

Neighbor-joining módszerrel készült filogenetikai dendrogramja

(Méteratány: 5% nukleotid különbség. Az ágakra irt számok a bootstrap analízist követően az elágazások százalékos valószínűségét jelzik. Az 50%-nál kisebb valószínűségű elágazásokat nem tüntettük fel.)

ki antimikrobiális hatását azáltal, hogy növénypatogén baktérium- és gombafajok elleni hatóanyagokat – lysoamidázt, kitinázt, zselatinázt, lipázt – termelnek. Így védik a növényt a kórokozókkal szemben (Christensen és Cook, 1978; Folman és mtsai, 2004; Park és mtsai, 2008; Sullivan és mtsai, 2003). A *Lysobacter* nemzetség tagjainak, mint talajbaktériumoknak a mattyi termelőkútban való megjelenése feltehetően a karsztvizek talajvizekkel való érintkezésével, talajszennyezésével magyarázható. Az M7 jelzésű klón a szintén a Xanthomonadaceae családba tartozó anaerob, mezofil, nitrit-redukáló, heterotróf *Pseudoxanthomonas mexicana* baktérium fajjal állt legközelebbi (99,3%-os) filogenetikai kapcsolatban, melynek típusfaját élelmiszeripari szennyvízből izolálták (Thierry és mtsai, 2004). A *Pseudoxanthomonas* nemzetség fajai szintén ubikvisták, mezofil vagy termofil nitrit-redukáló baktériumok, melyeket változatos élőhelyekről, talajokból és hévforrásokból is izoláltak (Chen és mtsai, 2002; Thierry és mtsai, 2004).

Phylum XII Proteobacteria / Class V Epsilonproteobacteria

Az Epsilonproteobacteria osztályt csupán egyetlen klón, az M10 képviselte, amely egy szénhidrogén-bontó mikrobiális konzorciumból kimutatott *Sulfurovum* klónnal (Kleinstüber és mtsai, 2008) mutatott legnagyobb (98%-os) szekvencia-hasonlóságot. A klón azonban távol-rokon kapcsolatban állt a bűdöstapocai klónkönyvtárakban előforduló "LKC" epsilonproteobaktérium klónokkal (Porter és Engel, 2008), és ismert fajjal nem tudunk rokoni kapcsolatot feltárni.

Az Epsilonproteobacteria osztályon belül a 16S rDNS klónszekvencia-adatbázisok zömmel környezeti klónokat tartalmaznak. A taxonómiai viszonyítási pontként szolgáló anaerob kénoxidáló típusfajok hiánya (pl. *Sulfurovum*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*) (Inagaki és mtsai, 2003; 2004; Kodama és Watanabe, 2003) és az egyre bővülő környezeti klónszekvencia-adatbázis következtében a klónkönyvtárainkban azonosított epsilonproteobaktérium klónok filogenetikai pozíciói bizonytalanok. A nemzetközi szakirodalomban gyakran hivatkozott környezeti klóncsoportok (pl. "LKC"-, "CV"-klónok) azonban biztos hivatkozási pontként szolgálhatnak a klónok taxonómiai azonosításában.

Phylum XXI Bacteroidetes / Class III Sphingobacteria

A Sphingobacteria osztályt két klón képviselte, melyek az osztályon belül távol-rokon kapcsolatban álltak. Az M4 jelzésű klón egy növényi gyökérszónából származó *Terrimonas* környezeti klón szekvenciájával mutatott 99%-os egyezést, és a *Terrimonas lutea* talajbaktériummal (Xie és Yokota, 2006) alkotott kládot a törzsfán. Az M9 jelzésű klón pedig csupán két, egymástól távoli eredetű környezeti klónnal, egy izlandi geotermális környezetből származó *Sphingobacterium* klónnal (Tobler és Benning, 2011), valamint egy csendes óceáni

bakterioplankton mintából kimutatott Sphingobacteriales klónnal (Pham és mtsai, 2008) mutatott legnagyobb (92-96%) szekvencia hasonlóságot. Azonban a reprezentáns a *Sphingobacterium* nemzetség ismert, tenyésztett tagjainak parciális 16S rDNS szekvenciáihoz rosszul illeszkedett, így az M9 filogenetikai pozíciója bizonytalan.

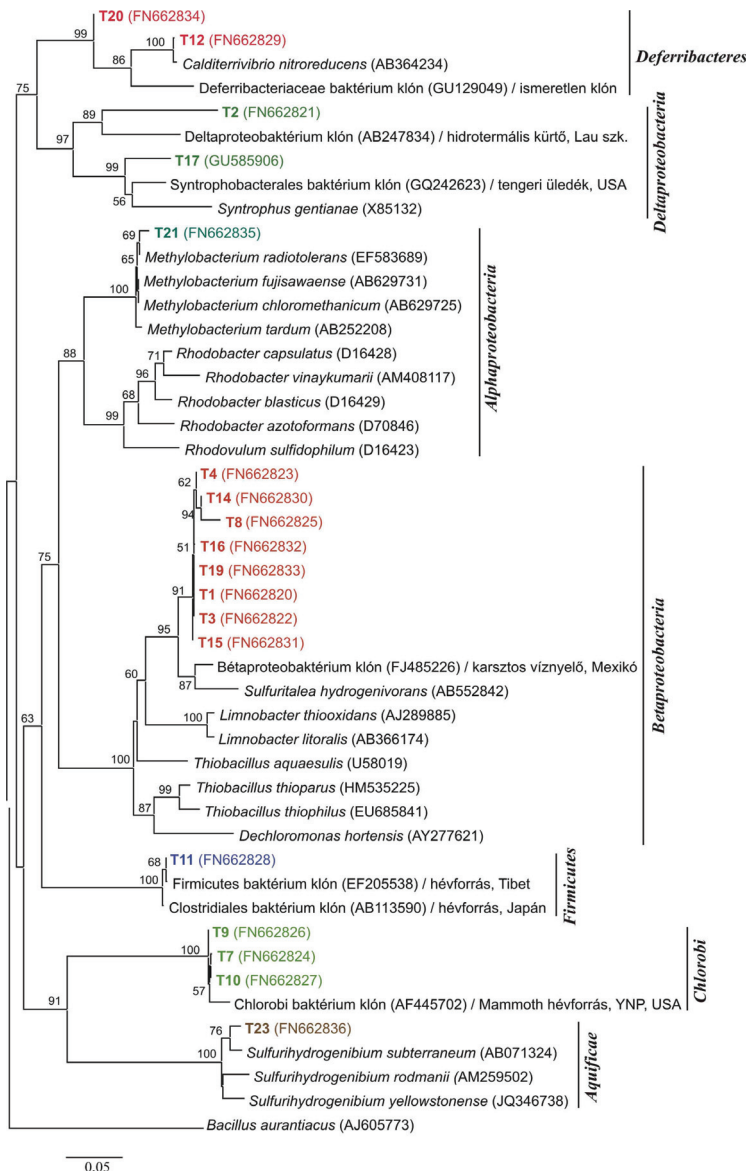
Végül az M11 klónt csupán egy talajmintából származó ismeretlen környezeti klón (Lesaulnier és mtsai, 2008) szekvenciájával tudtuk azonosítani.

7.3.5. A T6-klónkönyvtár elemzése

A négy termelőkútból származó vízminta fizikai-kémiai profiljának összehasonlítása során a legnagyobb mértékű eltérést a termálkútból származó víz mutatta, különösképpen a víz hőmérséklet, valamint a szulfid-koncentráció tekintetében (8. ábra). Ez a különbözőség a klónkönyvtárak összetételében is megmutatkozott, hiszen a T6 klónkönyvtárban az epsilonproteobaktériumok és szulfátredukálók, valamint a fonális *Thiothrix*-ek képviselői itt nem jelentek meg. Összességében a legnagyobb mértékű eltérést a mattyi és a T6 klónkönyvtár között tapasztaltuk, hiszen a két könyvtárban csupán egyetlen közös taxont (*Sulfuritalea*) találtunk. Ez a környezet egyben jó modellje az ősi típusú, termális, redukív, anoxikus élettereknek. Az ősi jelleg nemcsak a termálkút kifolyó vizének fizikai-kémiai paramétereiben, hanem részben a baktériumközösség összetételében is megmutatkozott. A T6 klónkönyvtár elemzése során 48 klónt azonosítottunk, melyek 9 filotípust képviseltek (Függelék 8. táblázat). A legmeghatározóbb közösségalkotó csoportot (34 klón) egy anaerob kénoxidáló kemolitotróf fajjal kládot alkotó betaproteobaktérium-klóncsoport képviselte, melyet a langyosvízi bűdöstapocai és mattyi mintákban is megtaláltunk. Emellett a szulfid- és kénoxidációs folyamatokban a Proteobacteria törzstől távoli leágazású ősi típusú anaerob kemolitotrófok (Aquificae) és anaerob fototrófok (Chlorobi) is részt vettek, amelyeket csupán a termálkútból származó klónkönyvtárból tudunk kimutatni.

Phylum I Aquificae / Class Aquificae

A T6 klónkönyvtárba tartozó nem proteobaktérium-rokon klónok, kis létszámú csoportokat alkottak. A T23 jelzésű klón a *Sulfurihydrogenibium subterraneum* kénoxidáló baktériummal mutatott legnagyobb (98%-os) szekvencia-hasonlóságot (16. ábra), melyet egy japán bányaterületen lévő felszínalatti hévíztározóból izoláltak (Takai és mtsai, 2002). Az Aquificae osztály tagjai az extrém magas hőmérsékletű, anoxikus, kénes környezetet (felszínalatti hévízforrások, mélytengeri kürtők) kedvelik (Nakagawa és mtsai, 2003; Reysenbach és mtsai, 2009), melyek képviselői az egerszalóki hévízforrásban és a Budai



16. ábra A Harkányi Gyógyfürdő területén található Termál-VI-os termelőkút vizéből származó molekuláris klónok Neighbor-joining módszerrel készült filogenetikai dendrogramja (Méterarány: 5 % nukleotid különbség. Az ágakra irt számok a bootstrap analízist követően az elágazások százalékos valószínűségét jelzik. Az 50%- nál kisebb valószínűségű elágazásokat nem tüntettük fel.)

Termálkarszt baktériumközösségeiben is megjelentek (Zenke, 2002; Borsodi és mtsai, 2012).

Phylum IX Deferribacteres

A Deferribacteres osztályon belül a T12 jelzésű klón (99,5%-os szekvencia egyezéssel) a termofil, nitrát-redukáló *Calditerrivibrio nitroreducens* fajt képviselte, melyet egy felszíni hévízforrásból izoláltak Japánban (Iino és mtsai, 2008), a T20 jelzésű klón pedig egy ismeretlen környezeti klónnal mutatott távol-rokoni kapcsolatot.

Phylum XI Chlorobi

A zöld kénbaktériumokat a T7, T9, és T10 jelzésű klónok képviselték, melyek a Mammoth-hévízforrásból származó Chlorobi baktérium-klónnal (Yellowstone Nemzeti Park, USA) álltak legközelebbi (98%-os szekvencia hasonlósággal) rokonságban. A zöld kénbaktériumok anaerob fotoautotróf szulfidoxidáló szervezetek. A H₂S-t fényenergia segítségével elektrononorként hasznosítják, a képződött elemi ként pedig a sejten kívül halmozzák fel. Bakteriális konzorciumot képesek létesíteni más heterotróf baktériumokkal, így szimbiotikus kapcsolat alakul ki a fajok között. A *Chlorobium* sejtek fotoszintetikus pigmenteket tartalmazó kloroszómákkal rendelkeznek, ami igen hatékony fénymegkötő képességet biztosít. A kloroszómák, valamint a szimbiotikus képesség révén az anoxikus mélyvizekben és a fénytől elzárt környezetekben egyaránt képesek élni (Zinder és Dworkin, 2006).

Phylum XII Proteobacteria / Class I Alphaproteobacteria

A T21 jelzésű klón a metilotróf *Methylobacterium* kládba ágazott és a *Methylobacterium radiotolerans* fajjal állt legközelebbi (99%-os szekvencia hasonlóság) rokonságban, melyet *in vitro* növényi szövet-tenyészetből írtak le (Podolich és mtsai, 2009). A metilotrófok széleskörben elterjedt aerob, mezofil és termofil baktériumok, melyek jellemző élőhelyei az anoxikus, metán-képző (talaj, felszínalatti vizek tavi és tengeri üledékek, mocsaras vidékek, mezőgazdasági művelés alatti) és az ezek felett húzódo aerob élőhelyek határfületei. Ökológiai jelentőségük abban rejlik, hogy az élőlények számára mérgező metánt és metánszármazékokat (pl. metil-alkoholt, szén-monoxidot, metil-kloridot, stb.) lebontják azáltal, hogy energia-forrásként és szénforrásként hasznosítják. A metánszármazékok elektrononorként való hasznosítása (oxidációja) során formaldehid, majd végső soron CO₂ képződik. A formaldehidet és/vagy a CO₂-ot különböző asszimilációs útvonalakon beépítik saját szervezetükbe (Green és Bousfield, 1983). A *Methylobacterium radiotolerans* feltehetően a bűdöstapolcai- és a termál-karsztban is fellelt, mélységi eredetű metánt hasznosíthatja, bár ezt a baktériumot a langyos vízű kutakból ezidáig még nem sikerült kimutatnunk.

Phylum XII Proteobacteria / Class II Betaproteobacteria

A klónkönyvtár-alkotók mintegy 70%-a egyetlen betaproteobaktérium klóncsoportba tömörült. A klóncsoport tagjai (hasonlóan a BT1-3 jelzésű klónhoz) az El Zacatón karsztos víznyeléből (Mexikó) származó környezeti klónnal álltak legközelebbi (94-96%-os hasonlóság) rokonságban, ugyanakkor a *Sulfuritalea hydrogenivorans* fajhoz (Kojima és Fukui, 2011) ágaztak.

Phylum XII Proteobacteria / Class IV Deltaproteobacteria

A deltaproteobaktériumokat a T2, valamint a T17 jelzésű klón képviselte, melyek környezeti klónokkal mutattak távoli rokonságot. A T2 jelzésű klón alacsony (85%-os) szekvencia-illeszkedése a legközelebbi klónszekvenciákhoz (hidrotermális kürtő, Lau szigetek, Polinézia) bizonytalan filogenetikai pozíciót eredményezett, ezért távoli elágazást mutatott a fán. A T17 klón szekvenciája egy tengeri üledékből származó Syntrophobacterales baktérium klón szekvenciájához hasonlított (93%) leginkább (Edmonds és mtsai, 2009).

Phylum XIII Firmicutes

Bár a T11 jelzésű klón (a klónkönyvtárakban előforduló egyetlen Gram-pozitív baktériumokkal rokon klón) szekvenciához nem találtunk hasonló szekvenciájú ismert fajt, mégis két olyan Firmicutes-környezeti klónnal állt legközelebbi (100% szekvencia egyezés) filogenetikai rokonságban, melyeket hasonló geotermális környezetből (japán és tibeti hévforrásokból) mutattak ki (Hirayama és mtsai, 2005; Lau és mtsai, 2009).

Mivel az alkalmazott bakteriális DNS-feltárási metodikák, a PCR-technikák és klónozó kitek a Gram-pozitív baktériumokra erősen szelektív hatást gyakorolnak, ezek a baktériumok a klónkönyvtárakból majdnem teljes mértékben hiányoztak. Ennek tükrében feltételezzük, hogy a Gram-pozitív baktériumoknak a harkányi langyos vízű- és termálkarszt baktériumközösségeiben betöltött szerepe jóval nagyobb lehet, mint azt a klónkönyvtár-elemzés mutatta. A baktériumközösségek megismerése, legyen az bármilyen élőhelyről való, tehát csak akkor válhat pontossá (pontosabbá), ha ismerve a közösségtorzító hatásokat, egyidejűleg többféle közösségfeltárási technikát is alkalmazunk.

7.4. A DGGE vizsgálatok eredményei

A molekuláris ujjlenyomat módszerek közül a DGGE-t korábban már más kéntartalmú környezeti minták elemzése során is sikerrel alkalmazták a kén-körforgalomban szerepet játszó különböző taxoncsoportok dominanciaviszonyainak és a különböző környezeti tényezők (fény, oxigénszint, vízhőmérséklet) összefüggéseinek a megismerésére.

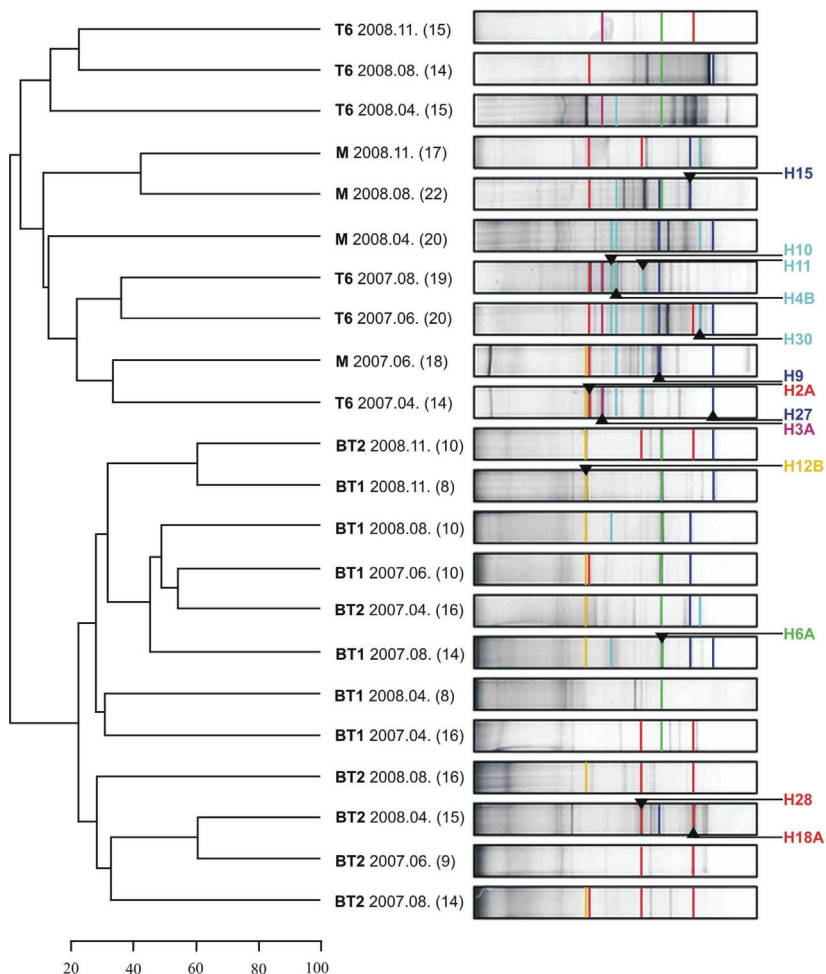
Casamayor és mtsai (2000) kutatásuk során két egymáshoz közeli szulfidos tó különböző mélységéből vett vízmintáinak baktériumközösségeit vizsgálták hasonló metodikával. A DGGE-ből kivágott csíkok 16S rDNS bázissorrend elemzése alapján megállapították, hogy a közösségeket elsősorban különböző fototróf kénbaktériumok, a Gammaproteobacteria osztályba tartozó bíbor kénbaktériumok (pl. *Thiocystis*, *Chromatium*), valamint zöld kénbaktériumok (*Chlorobium*) alkotják. A fototróf kénbaktériumok mellett heterotróf alfa- és bétaproteobaktériumokat, illetve különböző Gram-pozitív baktériumokat is kimutattak, ugyanakkor a szulfátredukálók teljes mértékben hiányoztak.

Nakagawa és mtsai (2003) ugyancsak DGGE módszerrel vizsgálták egy 72-80°C-os kénes hévforrás baktériumközösségét. A domináns DGGE-csíkok *Thermodesulfobacteria* és *Aquificae* törzsekbe tartozó termofil baktériumokat képviseltek. Az *Aquificae*-törzsen belül az általunk is kimutatott *Sulfurohydrogenibium subterraneum* és egyéb termofil *Aquifex* fajok szekvenciáit azonosították, melyek között feltételezhetően biológiai kén-körforgalom zajlik.

Jelen kutatásaink során, a Büdöstopolca I-es (BT1), Büdöstopolca II-es (BT2) termelőkutak, a Matty-kút (M), valamint a Termál-VI-os (T6) termelőkút vízmintáiból származó baktériumközösségek DGGE "ujjlenyomatai" alapján szerkesztett hasonlósági viszonyokat a 17. ábrán látható dendrogram segítségével mutatjuk be.

A szezonális minták DGGE gélképeit 64 csík pozíciója alapján hasonlítottuk össze. A kapott sávmintázatok alapján két csoportot lehetett egymástól elkülöníteni: a BT1 és BT2 mintázatok egyértelműen elkülönültek a mattyi és T6 sávmintázatoktól. Ezen kívül a csoportokon belül külön ágakat képeztek 2008-as T6 minták, valamint a 2007 nyári és 2008 tavaszi BT2 minták. A minták közti legnagyobb mértékű hasonlóságot a büdöstopolcai csoporton belül figyelhettünk meg a BT1 és BT2 2008 novemberi minták, valamint a BT2 2007 nyári és 2008 tavaszi minták között 65-65%-os egyezéssel. A BT1 és BT2 2008 novemberi baktériumközösségek hozzávetőleg 62%-os egyezést mutattak. A "Matty-T6" csoporton belül a legnagyobb hasonlóságot a 2008-as nyári és őszi mattyi minták mutatták 52%-os hasonlósággal.

Az észlelt csíkok száma alapján a büdöstopolcai csoport mintái kisebb diverzitással voltak jellemezhetők, mint a "Matty-T6" csoport mintái (17. ábra). A büdöstopolcai csoporton belül a BT1 baktériumközösségei alacsonyabb genetikai diverzitást mutattak, mint a BT2 minták. A DGGE csíkok száma a BT2 2007 áprilisi, 2008 augusztusi, valamint a BT1 2007 áprilisi mintákban volt a legtöbb (16-16 csík). A "Matty-T6" csoporton belüli legnagyobb diverzitás a 2008 áprilisi és augusztusi mattyi minták, valamint a 2007 nyári T6 mintákra volt jellemző (19-22 csík). A "Matty-T6" csoporton belül a kisebb diverzitású 2008-as



17. ábra A Harkányi Gyógyfürdő vizsgált termelőkútjainak vizéből származó baktériumközösségek DGGE sávmintázatai alapján készült UPGMA dendrogram, valamint az azonosított csíkok jelzése és gélbeli pozíciója

(Zárójelben a DGGE sávok darabszáma szerepel. Skála: a sávmintázatok hasonlósági értéke százalékban megadva. Csík felirat: kivágott csík gélbeli pozíciója, világoskék: Alphaproteobacteria, piros: Betaproteobacteria, zöld: Gammaproteobacteria, sárga: Epsilonproteobacteria, lila: Firmicutes, sötétkék: Actinobacteria. BT1: Büdöstapolca I-es kútból származó minta, BT2: Büdöstapolca II-es kútból származó minta, M: Matty-kútból származó minta, T6: Termál VI-os kútból származó minta)

T6 minták a csoport többi tagjától külön csoportot képeztek. A csíkok száma, valamint helyzetének időbeli változásai alapján megállapítható, hogy a mattyi- és a termálkút minták

baktériumközösségei nagyobb diverzitást és nagyobb szezonális változást mutattak, míg a BT1 és BT2 baktériumközösségei nagyobb mértékben hasonlítottak egymásra, és a szezonális kevésbé volt kifejezett.

A gélből filogenetikai azonosítás céljából összesen 41 nagy intenzitású csíkot vágunk ki, és szekvenáltunk. A kromatogram-elemzés során 28 szekvencia kevert vagy túl rövid volt, így azok taxonómiai információ szerzésére alkalmatlanok voltak. A többi 13 csík-szekvenciája átlagosan 210-346 bázispár hosszúságú volt, és a legközelebbi ismert taxonokkal 85-97%-os bázispár-illeszkedést mutatott. A kivágott csík-szekvenciák legközelebbi rokon taxonokkal való filogenetikai viszonyát a Függelék 9. táblázatában gyűjtöttük össze.

Bár a viszonylag rövid szekvenciák és az alacsony szekvencia-hasonlóság nem tette lehetővé a faji szintű azonosítást, mégis a klónkönyvtárakkal ellentétben a DGGE-gélből kivágott csíkok bázissorrend elemzése alapján több Gram-pozitív taxont sikerült kimutatnunk (18. ábra). Ezen kívül számos, olyan kemolitotróf kénbaktériumokkal rokon szekvenciát is azonosítottunk, melyek a klónkönyvtárakban is jelen voltak.

Phylum XII Proteobacteria / Class I Alphaproteobacteria

Az Alphaproteobacteria osztályba tartozó H10, H11, H4B és H30 jelzésű szekvenált, és az azokkal azonosnak minősített csíkok jellemzően a mattyi és a termál kút mintákban fordultak elő (17. ábra). A H10, H11 és H4B szekvenciák a *Sphingobium* nemzetséghez tartozó környezeti klónnal álltak legközelebbi (91-94%) filogenetikai rokonságban (18. ábra). A H30 viszont egy metán-oxidáló baktérium klón rokona volt 92%-os szekvencia hasonlósággal, melyet metángázzal kezelt növények rizoszférájából mutattak ki (Stralis-Pavese és mtsai, 2006). A H30 csík szekvenciához legközelebbi (92%) rokon baktériumfaj a *Methylocystis rosea* metanotróf baktérium volt, melyet arktikus talajból izoláltak Norvégiában (Wartiainen és mtsai, 2006). A *Methylocystis* baktériumok filogenetikai rokonságban állnak a szintén metanotróf/metilitróf *Methylobacterium* nemzetség képviselőivel, melyeket a T6 klónkönyvtárból sikerült kimutatnunk.

Phylum XII Proteobacteria / Class II Betaproteobacteria

A piros színnel jelzett Betaproteobacteria csík-szekvenciák a szezonális mintákban ugyan mindenütt előfordultak, a heterotróf taxonokkal és a kemolitotróf kénoxidáló taxonokkal rokon szekvenciák területi megoszlása mégis nagyfokú eltérést mutatott. A H2A jelű csík, amely a heterotróf *Ralstonia* nemzetséggel állt legközelebbi (97%) rokonságban, elsősorban a mattyi és a T6 mintákra volt jellemző, de ritkán megtalálható volt a bűdöstopolcai mintákban is (17. ábra). A H2A a *Ralstonia pickettii* típusfajjal 96,3%-os szekvencia-hasonlóságot mutatott, melyet vízből, talajból, eleveniszapból, sőt humán klinikai

mintából is izoláltak (Coenye és mtsai, 2003). Ezzel szemben a H18A és a H28 által reprezentált, németországi forrásvízből származó *Thiobacillus*-rokon szekvenciákat zömmel a bűdöstapolcai mintákban találtuk meg, melyek a kén-tioszulfát oxidáló *Thiobacillus aquaesulis* baktériummal (McDonald és mtsai, 1996) alkottak közös kládot (18. ábra). Érdekes, hogy a mezofil *Thiobacillus* nemzetséget képviselő H18A jelzetű csíkot két szezonális T6 minta DGGE gélképéből is kimutattuk.

Phylum XII Proteobacteria / Class III Gammaproteobacteria

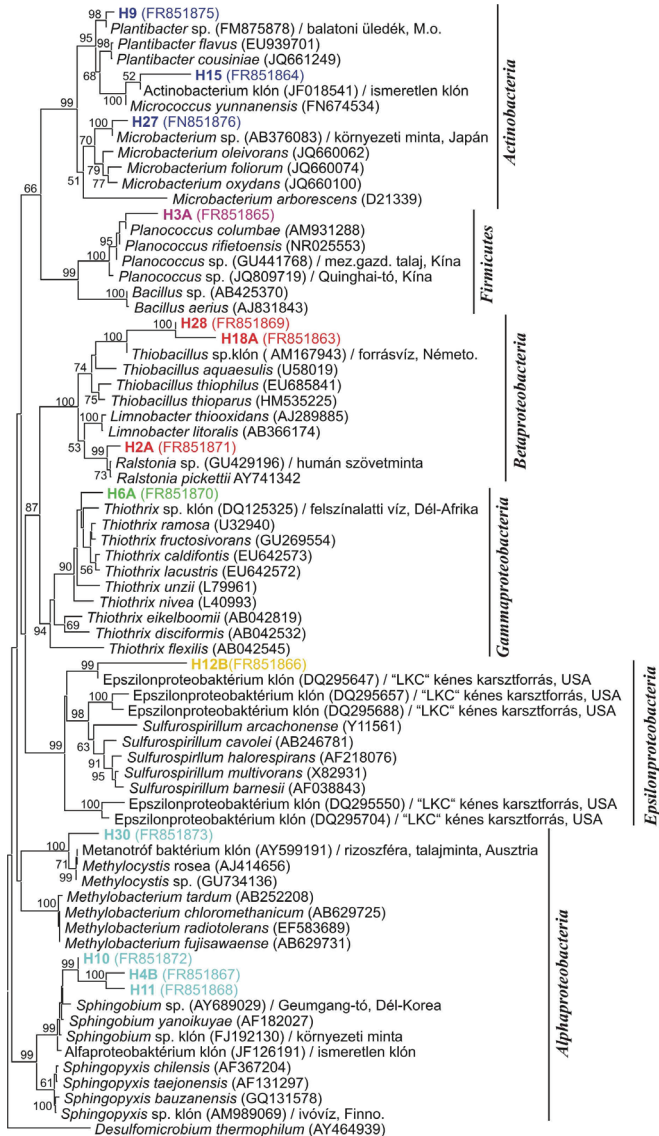
A H6A csík szekvenciája egy afrikai felszínalatti vízmintából származó, tenyésztésbe nem vont *Thiothrix*-kénbaktérium klónnal mutatott legközelebbi (95%-os) rokonságot, és az ismert szulfidoxidáló *Thiothrix* fajokkal közös leszármazási kapcsolatot mutatott (18. ábra). A *Thiothrix* nemzetséget képviselő H6A jelzésű csíkot és a vele azonos pozícióban lévő DGGE csíkokat leggyakrabban a BT1 és BT2 mintákban találtuk meg, ritkán azonban a mattyi és T6 sávmintázatokban is előfordultak.

Phylum XII Proteobacteria / Class V Epsilonproteobacteria

Bár a H12B az "LKC" epsilonproteobaktérium-klóncsoport tagjaival (Porter és Engel, 2008) itt csupán távol-rokon kapcsolatot mutatott (85%-os szekvencia-hasonlósággal), az említett klóncsoport azonban jelentős közösségalkotóként szerepelt a bűdöstapolcai klónkönyvtárakban (17. ábra). A H12B az anaerob kénoxidáló *Sulfurospirillum* nemzetség tagjaival mutatott közös leszármazási kapcsolatot, és zömmel a bűdöstapolcai DGGE mintákban fordult elő, de szórványosan megtalálható volt egy-egy mattyi és termál-kút szezonális mintában is.

Phylum XIII Firmicutes

A H3A a Firmicutes törzsbe tartozó, mezőgazdasági talajból kimutatott *Planococcus* baktériummal mutatott 95%-os szekvencia egyezést. Ezt a DGGE csík-szekvenciát kizárólag a szezonális T6 mintákból sikerült kimutatnunk. A *Planococcus* nemzetséget széles körben elterjedt mikroorganizmusok csoportja alkotja, melyeket különböző környezetekből, többek között tengerből (Yoon és mtsai, 2003), cianobaktériumok alkotta biofilmből (Reddy és mtsai, 2002; Alam és mtsai, 2003), kénes forrás algabevonatából (Romano és mtsai, 2003), de sós tavak üledékéből és madarak székletéből (Suresh és mtsai, 2007) is izoláltak. Ezen felül extrémofil képviselőik is előfordulnak, mint például a *Planococcus stackebrandtii*, amelyet a Himalája hideg, sivatagjából izoláltak (Mayilraj és mtsai, 2005).



18. ábra A Harkányi Gyógyfürdő vizgált termelőkútjainak vizéből származó DGGE csíkok parciális 16S rDNS szekvenciái alapján készült Neighbor-joining filogenetikai dendrogram (Méretarány: 5% nukleotid különbség. Az ágakra irt számok a bootstrap analízist követően az elágazások százalékos valószínűségét jelzik. Az 50%- nál kisebb valószínűségű elágazásokat nem tüntettük fel.)

Phylum XIV Actinobacteria

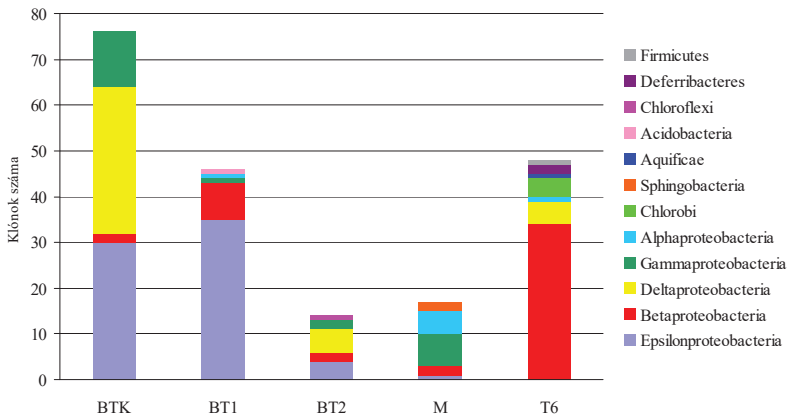
A H27 és H9 jelzésű csíkok az Actinobacteria törzsbe tartozó *Microbacterium* és *Plantibacter* nemzetség képviselőivel álltak legközelebbi rokonságban (96%-97%-os szekvencia hasonlóság), melyek széles körben elterjedt talajbaktériumok. Több típusfajukat (pl. *Plantibacter flavus*, *Microbacterium arborescens*) mezőgazdasági területeken vett mintákból izolálták (Behrendt és mtsai, 2002; Takeuchi és Yokota, 1994; Ueda és mtsai, 2008), de *Plantibacter* baktériumokat hazai kutatók is kitenyésztettek balatoni üledékből (Szabó és mtsai, 2011). Végül, a H15 egy Actinobacteria törzsbe tartozó környezeti klónnal mutatott 94%-os szekvencia-hasonlóságot, melynek legközelebbi ismert képviselői *Micrococcus* baktériumok voltak (18. ábra). Bár az Actinobacteria törzs képviselői mind a négy termelő kút sávmintázataiban megjelentek, a szezonális bűdöstapocai minták közel felében jelenlétüket nem tudtuk kimutatni (17. ábra).

7.5. A molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeinek összehasonlító értékelése

7.5.1. A klónkönyvtárak eredményeinek összehasonlítása

Az 5 klónkönyvtár szerkezetének összehasonlítását a 19. ábrával szemléltettük. Ezen az ábrán az egyes könyvtárakhoz tartozó nagyobb filogenetikai csoportok (törzsek, illetve a Proteobacteria törzs esetén az osztályok) relatív abundanciáját ábrázoltuk. A legnépesebb BTK klónkönyvtár összesen 76 klónt tartalmazott, és ezek mindegyike a Proteobacteria törzset képviselte. A második legnépesebb a T6 klónkönyvtár volt, amely 48 klónt tartalmazott. A T6 klónok 7 különböző, közülük több nem-Proteobacteria csoportot képviseltek. A BT1 klónkönyvtárat 46 klón alkotta, míg a kisméretű BT2 és mattyi könyvtárakban csupán 14 és 18 klónt sikerült azonosítani, melyek szintén tartalmaztak a proteobaktériumoktól távoli leszármazású filogenetikai csoportok képviselőit. Az oszlopdiaagramon jól látható az anaerob kénoxidálókkal távol rokon "LKC" és "CV" epszilonproteobaktérium-klónok domináns jelenléte a BTK és BT1 közösségekben (egyenként 39%-os és 77%-os részvételi arányban). Az Epsilonproteobacteria közösségalkotó szerepe a BT1 és mattyi közösségben viszont nem volt számottevő, ezen kívül ez a taxoncsoport a termálkút-közösségben teljes mértékben hiányzott. Bár a BTK kompozitkönyvtár és a BT2 könyvtár taxonómiai összetétele nagyban hasonlított egymáshoz, a dominancia-viszonyok és legfőképp a könyvtárak mérete eltért egymástól. Ugyanakkor a BTK és BT2 klónközösségekben jelen lévő szulfátredukáló deltaproteobaktériumok és

kemolitotróf gammaproteobaktériumok képviselői a BT1 közösségből hiányoztak. A mattyi klónkönyvtár összetétele alapján a mattyi baktériumközösséget zömmel heterotróf proteobaktériumok alkották (Függelék 7. táblázat). Bár előfordultak kénbaktériumokkal (*Thiothrix*, *Thiobacillus*, *Sulfurovum*) rokon klónok is, ezek relatív abundanciája a klónközösségben viszonylag kicsi (16,6%) volt. Ezen kívül a többi könyvtárban előforduló kén-és tioszulfát-oxidáló *Sulfuritalea*-rokon klónok ebben a közösségben teljes mértékben hiányoztak. A T6 klónkönyvtárban találtuk a legtöbb nem-Proteobacteria közösségalkotót, ugyanakkor itt fordult elő, hogy csupán egyetlen klóncsoport (a Betaproteobacteria osztályba tartozó *Sulfuritalea*-val távol rokon klónok) a közösség közel három-negyedét (72%-át) alkotta.



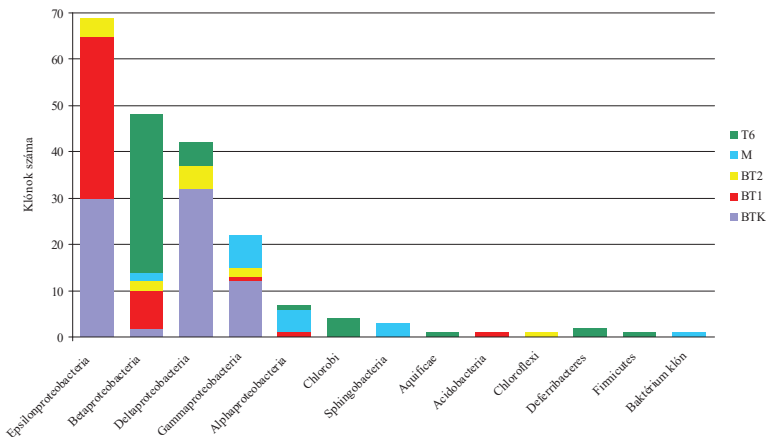
19. ábra A Harkányi Gyógyfürdő vizsgált termelőkútjainak vizéből származó klónkönyvtárak közösségszerkezete a nagyobb filogenetikai csoportok (törzs, osztály) jelölésével (BTK: Büdöstapolca I-és II-kút kompozitminta; BT1: Büdöstapolca I-kút vízminta; BT2: Büdöstapolca II-kút vízminta; M: Matty-kút vízminta; T6: Termál VI-os kút vízminta)

A 19. ábrán jól megfigyelhető, hogy a taxonómiai összetétel és dominancia-viszonyok alapján leginkább a BTK és BT1 közösségszerkezete hasonlított egymáshoz. Emellett a kisméretű BT2 klónkönyvtár jobban hasonlított a BTK és BT1 összetételéhez, mint a mattyi és a T6 közösséghez. A mattyi és a T6 klónkönyvtárak szerkezetükben mind egymástól, mind a büdöstapolcai klónkönyvtáraktól nagyfokú eltérést mutattak.

7.5.2. A klónozással és DGGE-vel kimutatott baktériumközösségek összehasonlítása

A Harkányi Gyógyfürdő kútvízeinek baktériumközösségeiről molekuláris klónozással, illetve denaturáló grádiens gélelektroforézissel részben eltérő képet kaptunk. Ennek oka többérté lehet. Egyrészt a Palatinszky és mtsai (2011) által kimutatott különböző molekuláris klónozó kitek közösségtorzító hatásai magyarázattal szolgálhatnak arra a tényre, hogy klónkönyvtárainkból szinte teljes mértékben hiányoztak a Gram-pozitív baktériumok. Másrészt a nagyarányú kevert DGGE csík-szekvenciáink miatt sok domináns taxonról nem sikerült filogenetikai információt nyerni, emellett a kivágott DGGE csíkokból származó rövid PCR-termékek az alacsony szekvencia-hasonlóság miatt az egyes közösségalkotók taxonómiai meghatározását csupán törzs vagy osztály szintig tették lehetővé.

Összességében megállapítható, hogy a klónkönyvtárak elemzésével részletesebb közösségszerkezeti képet kaptunk, hiszen míg a DGGE csíkok elemzésével csupán 6, addig a klónkönyvtárak elemzése során 12 különböző törzs-, illetve osztály-szintű taxoncsoportot tudunk elkülöníteni (20-21. ábra).

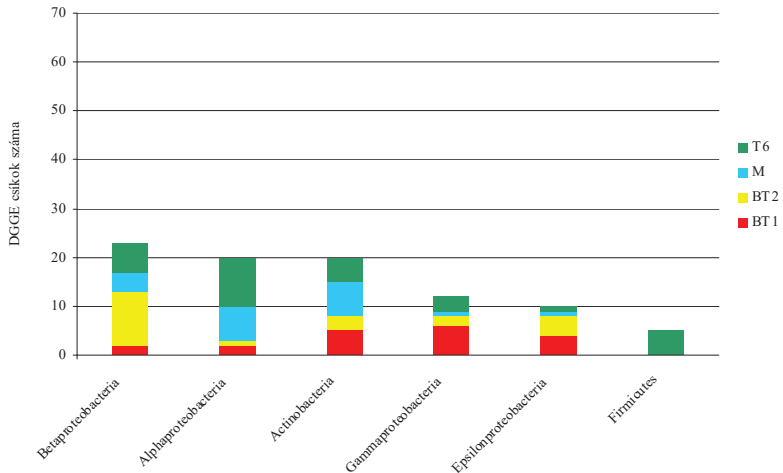


20. ábra A Harkányi Gyógyfürdő vizsgált termelőkútjainak vízből származó molekuláris klónok baktériumcsoportok szerinti megoszlása az egyes kutak klónkönyvtáraiban (BTK: Büdöstapolca I-és II-kút kompozitminta; BT1: Büdöstapolca I-kút vízminta; BT2: Büdöstapolca II-kút vízminta; M: Matty-kút vízminta; T6: Termál VI-os kút vízminta)

A kétféle molekuláris módszerrel feltérképezett baktériumközösségek közt az egyik legszembetűnőbb különbség a Gram-pozitív baktériumok kimutathatóságában mutatkozott. A DGGE-csíkok kivágásával és elemzésével mind a négy vizsgált kútból ki tudtuk mutatni a

Gram-pozitív Actinobacteria törzs képviselőit (21. ábra). Ugyanakkor a DGGE módszerrel egyetlen deltaproteobaktériumot sem tudtunk detektálni, annak ellenére, hogy a BTK és BT2 klónkönyvtárak közösségében nagy részvételi arányban számos kén-és szulfátredukáló nemzetség jelenlétét igazoltuk (*Desulfocapsa*, *Geobacter*, *Desulfopila*, *Desulforhopalus*).

Mivel a DGGE gélből csupán a nagy intenzitású csíkokat vágtuk ki, és azoknak is csak egy részéből sikerült filogenetikai információt nyerni, így a klónkönyvtár-elemzés szerint a kén-körforgalomban szerepet játszó rejtőzködő, illetve ritka taxonokat (Chloroflexi, Chlorobi, Aquificae) ezzel a módszerrel nem tudtuk kimutatni.



21. ábra A Harkányi Gyógyfürdő vizsgált termelőkútjainak vizéből származó, azonosított DGGE csíkok (szekvenált és a gélbeli pozíció alapján a szekvenálttal azonosnak minősített) baktériumcsoportok szerinti megoszlása az egyes kutak szezonális mintáiban

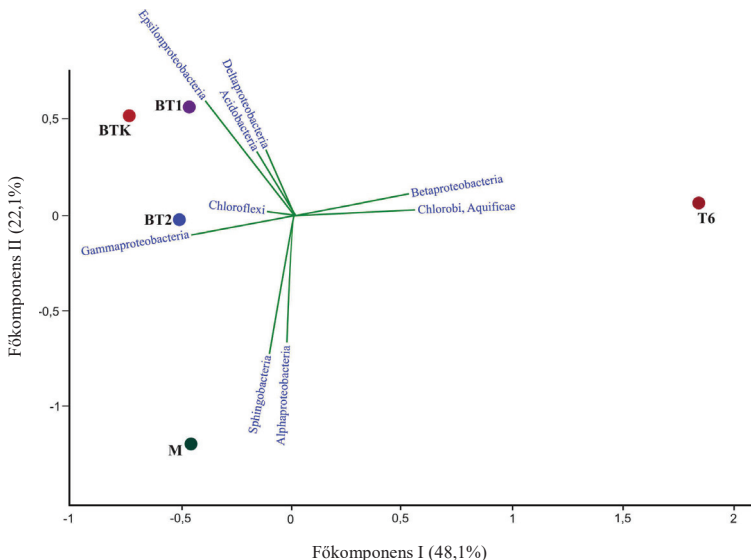
(BTK: Büdöstapolca I-és II-kút kompozitmintá; BT1: Büdöstapolca I-kút vízminta; BT2: Büdöstapolca II-kút vízminta; M: Matty-kút vízminta; T6: Termál VI-os kút vízminta)

A DGGE- és a klónkönyvtár-elemzés módszerével három közös taxon genetikai nyomait találtuk meg a mintáinkban. Ezek "LKC" epsilonproteobaktérium klónszekvenciák, továbbá *Thiothrix*, illetve *Thiobacillus* kénbaktériumokkal rokon szekvenciák voltak. A Lower Kane Cave karsztos környezetből származó epsilonproteobaktériumokkal rokon szekvenciákat (Porter és Engel, 2008) mindkét módszerrel a büdöstapolcai mintákból mutattuk ki. A *Thiobacillus* és a *Thiothrix* nemzetség tagjai jellemzően a büdöstapolcai és a mattyi klónkönyvtárak, illetve a büdöstapolcai és a mattyi DGGE-mintázatok közösségalkotói

voltak, sőt a DGGE-módszerrel ezen a kénoxidálókat a termálkútból származó néhány szezonális mintában is megtaláltuk (17. ábra).

A kétféle módszerrel további közös, bár távol-rokon taxonokat is azonosítani tudtunk. A *Sphingomonadaceae* családba tartozó *Sphingopyxis* nemzetséget a mattyi klónkönyvtárból, *Sphingobium* nemzetséget DGGE esetén pedig a mattyi és T6 szezonális mintákban találtunk meg. A metilotróf baktériumok jelenlétének közvetett kimutatása a mélységi karsztból származó vízben oldott metán mikrobiális hasznosítását jelzi. Klónkönyvtár-elemzéssel a T6 klónkönyvtárból sikerült egy *Methylobacterium*-klónt azonosítani, DGGE-vel viszont a Büdöstopolca I-es, a Matty-, illetve a Termál VI-os kutakból is kimutattunk *Methylocystis* nemzetséggel rokon szekvenciákat (17. ábra).

A klónkönyvtárak szerkezetének összehasonlítását főkomponens analízissel is elvégeztük. A főkomponens analízis során a különböző mintavételi helyekről származó öt (BTK, BT1, BT2, M, T6) minta szolgált objektumként, a közösségalkotó filogenetikai csoportok pedig változókként (22. ábra). A diagram két tengelyén megjelenített első két főkomponens az összvariancia 70,2%-át magyarázta.



22. ábra A klónkönyvtárak ordinációja a közösségeket alkotó különböző filogenetikai csoportok klónszáma alapján

(BTK: Büdöstopolca I-és II-kút kompozitmintá; BT1: Büdöstopolca I-kút vízminta; BT2: Büdöstopolca II-kút vízminta; M: Matty-kút vízminta; T6: Termál VI-os kút vízminta)

A minták az első főkomponens mentén nagyobb elkülönülést mutattak, melyet elsősorban a Gamma- és Betaproteobacteria, valamint anaerob szulfidoxidáló taxonok jelöltek ki. A bűdöstopolcai kutakból származó klónkönyvtárak (BTK, BT1, BT2) hasonló közösségszerkezettel rendelkeztek, és ezen csoporton belül a BTK, BT1 klónkönyvtárak összetétele egységesebbnek bizonyult. A T6 klónkönyvtár az első ordinációs tengelyen magas főkomponens értékkel volt jellemezhető, míg a mattyi klónkönyvtár a diagram mindkét tengelyén negatív tartományban helyezkedett el. Az ordinációs diagram szerint a T6 minta mutatta a legnagyobb közösségszerkezeti eltérést a többi mintától, és a diagramon legtávolabb a mattyi mintától helyezkedett el. A főkomponens analízis eredményei ezzel alátámasztották a hasonlósági indexek eredményeiből levont következtetéseinket (11. táblázat).

A szezonális DGGE minták közösségszerkezetének összehasonlítását főkomponens analízissel is elvégeztük. A négy termelőkútból vett tavaszi, nyári és őszi minták hasonlóságát az egyes DGGE csíkok eloszlásának függvényében ábrázoltuk (23. ábra).

Az első két főkomponens a minták varianciájának csupán 29,1%-át magyarázta. A diagramon jól látható, hogy az egyes minták földrajzi szempontból jobban elkülönültek, míg szezonális elülönülést nem tapasztaltunk. A bűdöstopolcai minták időszaktól függetlenül egy csoportot képeztek, míg a mattyi és T6 minták mindkét főtengely mentén viszonylag nagymértékű szórást mutattak. A BT1 és BT2 szezonális mintákat elsősorban a kemolitotróf kénbaktériumokkal rokon szekvenciák jellemezték, míg a mattyi és T6 minták pozícióit a heterotróf közösségalkotók jelölték ki. Legkevesebb közösségszerkezeti információt a 2008. augusztusi és novemberi mattyi mintákból kaptunk, így ez a két minta tért el leginkább a többi mintától.

A DGGE minták főkomponens analízise által kapott eredményeink a bűdöstopolcai minták markáns elkülönülését mutatták a mattyi és T6 mintáktól, ami megegyezett a klónkönyvtárak főkomponens analízis eredményeivel.

7.5.3. A klónkönyvtárak eredményeinek statisztikai elemzése

A *Bray-Curtis* hasonlósági indexek szerint a legkisebb különbség (0,46) a BTK és BT1 könyvtárak között mutatkozott (11. táblázat). A középtartományba eső értékeket (0,68 – 0,78) a BTK/BT2, BTK/M, BT1/BT2, BT2/M, illetve BT2/T6 klónkönyvtárak összehasonlítása adta. Érdekes, hogy a BT2/M közösségek összehasonlításakor kaptuk a második legalacsonyabb index-értéket (0,68).

Ezt a viszonylag nagyfokú hasonlóságot sem a klónkönyvtár-elemzés, sem a DGGE hasonlósági dendrogram eredményei nem igazolták. Feltételezzük, hogy a *Bray-Curtis* modell által számított anomáliát a BT2 és M könyvtárak kis méretének közösség-torzító hatása okozta.

11. táblázat A baktériumközösségek *Bray-Curtis*-hasonlósági indexe a 16S rDNS szekvencián alapuló klónkönyvtárak összetétele alapján

(BTK: Büdöstapolca I-és II-kút kompozitmintá; BT1: Büdöstapolca I-kút vízminta; BT2: Büdöstapolca II-kút vízminta; M: Matty-kút vízminta; T6: Termál VI-os kút vízminta)

Klónkönyvtár	BTK	BT1	BT2	M
BT1	0,46			
BT2	0,71	0,76		
M	0,78	0,84	0,68	
T6	0,88	0,81	0,76	0,91

A legmagasabb *BC*-index-értéket (0,91) a T6 és M klónkönyvtárak mutatták, tehát ezen klónkönyvtárak közösségszerkezete különbözött legnagyobb mértékben egymástól. A T6 könyvtárhoz tartozó *BC*-indexek általában magasabbak voltak, mint a többi klónkönyvtárhoz rendelt értékek. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Termál VI-os kút vizéből származó klónkönyvtár közösségszerkezete különbözött a legnagyobb mértékben a többi közösségtől. A T6 könyvtár nagymértékű eltéréseinek hátterében feltehetően a Termál VI-os kút vizének a többi termelő kút vizétől lényegesen eltérő fizikai-kémiai profilja áll (8. ábra), amelyhez a langyosvízű kutakból származó közösségektől eltérő mikrobaközösség tudott adaptálódni. A T6 közösségszerkezeti eltérése a mezofil, kemolitotróf gamma- és epsilonproteobaktériumok, valamint a szulfátredukáló deltaproteobaktériumok teljes hiányában, a termofil baktériumok (Aquificae) és anaerob fototróf szulfidoxidálók (Chlorobi) jelenlétében, illetve az anaerob *Sulfuritalea* dominanciájában nyilvánult meg (16. ábra).

Az 5 klónkönyvtár statisztikai eredményei szerint a legnagyobb diverzitást a mattyi klónkönyvtár mutatott 2,36-os *Shannon-Wiener*-index értékkel, majd ezt követte a BT2 2,2 diverzitás-értékkel (12. táblázat).

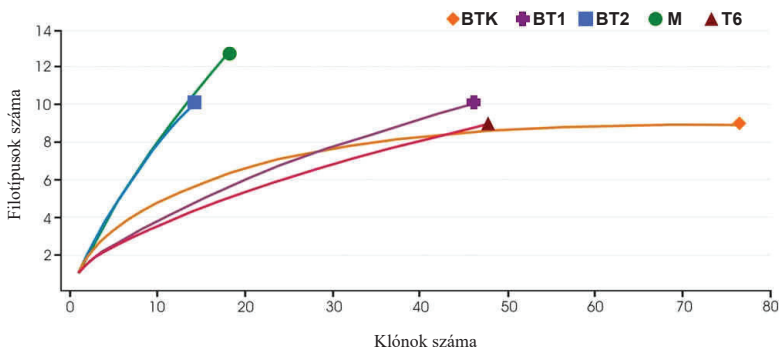
12. táblázat A baktériumközösségek diverzitása és fajgazdagsága a 16S rDNS szekvencián alapuló klónkönyvtárak összetétele alapján

(BTK: Büdöstapolca I-és II-kút kompozitmintá; BT1: Büdöstapolca I-kút vízminta; BT2: Büdöstapolca II-kút vízminta; M: Matty-kút vízminta; T6: Termál VI-os kút vízminta)

Klónkönyvtár	Diverzitás-index (<i>Shannon-Wiener</i>)	Fajgazdagság (<i>Chao1</i>)	Klónok száma
BTK	1,74	9	76
BT1	1,24	28	46
BT2	2,20	22	14
M	2,36	18	18
T6	1,11	16	48

A nagyobb klónszámú BTK, BT1 és T6 klónkönyvtárak diverzitás-indexei az [1,1 - 1,74] intervallumba estek. A kisméretű (M, BT2) klónkönyvtárak magas diverzitás-index értékei azt mutatják, hogy az azonosított klónszekvenciák számos filotípust reprezentáltak, míg a nagyobb klónszámú klónkönyvtárakban viszonylag kevesebb filotípust tudunk azonosítani, ami alacsony klón-diverzitást eredményezett.

A klónkönyvtárak fajtelitődési görbéi közül a BTK könyvtár görbéje közelítette meg leginkább a telítődési értéket, melyet a becsült fajgazdagság, azaz a várható maximális filotípusok száma jelölt ki (24. ábra). A BT1 és a T6 könyvtárak görbéi lassú emelkedést mutattak, és közelítettek a telítődési érték felé, míg a kislétszámú M és BT2 könyvtárak görbéi a kezdeti meredeken emelkedő fázisban véget értek. A különböző lefutású görbék azt mutatják, hogy az egyes könyvtárak mérete, diverzitása és becsült fajgazdagsága különböző volt egymástól.



24. ábra Fajtelitődési görbék a 16S rDNS szekvencián alapuló klónkönyvtárak összetétele alapján

(BTK: Büdöstapolca I-és II-kút kompozitmintá; BT1: Büdöstapolca I-kút vízminta; BT2: Büdöstapolca II-kút vízminta; M: Matty-kút vízminta; T6: Termál VI-os kút vízminta)

A BTK klónkönyvtár mérete elegendően nagyknak bizonyult ahhoz, hogy a kompozitmintában lévő baktériumközösség valós diverzitását feltárjuk. A BT1 és T6 megközelítette a telítődési pontot, a BT2 és M klónkönyvtárak azonban kevés filogenetikai adattal szolgáltak ahhoz, hogy a baktériumközösségek valós diverzitását fel tudjuk tárni. A telítődési értéke, azaz a becsült fajgazdagságot (12. táblázat) ezekben a klónkönyvtárakban csak jóval nagyobb számú klón filogenetikai azonosítása esetén érték volna el.

7.5.4. A fizikai-kémiai paraméterek hatása a baktériumközösségek szerkezetére

Vizsgáltuk a termelőkutakból (Büdöstapolcai I-es, Büdöstapolca II-es, Matty-, Termál VI-os kút) kifolyó vizek mért fizikai és kémiai jellemzőinek lehetséges hatásait a baktériumközösségekre. A vizsgált paraméterek közül a klónozással kimutatott baktériumközösségeket jellemzően mezofil és termofil baktériumok (aerob, mikroaerofil és anaerob kemolitotrófok, anaerob szulfátredukálók, valamint anaerob fotoszintetizálók és egyéb heterotrófok) alkották, ezért feltételezzük, hogy a legfontosabb közösség-alakító tényezők a vízhőmérséklet, oldott oxigénszint, valamint a különböző kénformák koncentrációi voltak (Függelék 3. táblázat). Mind a négy termelőkút anoxikus jellegű volt, és az egyes kutak vízhőmérsékletének emelkedésével a szulfid-koncentráció is emelkedő tendenciát mutatott. Ugyanakkor a szulfát-koncentrációra és a hőmérséklet-, illetve szulfid-koncentráció változása nem volt hatással (8. ábra).

A molekuláris klónozással kimutatott baktériumközösségekben a kemolitotróf kénbaktériumok körébe tartozó Gammaproteobacteria-klónokkal rokon szekvenciák, valamint a szulfátredukáló Deltaproteobacteria-szekvenciák mennyisége és az egyes kutak fizikai-kémiai paramétereinek változása függvényében nem találtunk összefüggést. Az epszilonproteobaktérium-klónok száma az egyes kutak vízhőmérsékletének (és egyben a szulfid-koncentráció) emelkedésével csökkenő tendenciát mutatott (19. ábra). Ugyanakkor *Sulfuritalea*-rokon klónok száma a langyosvízű büdöstapolcai és mattyi klónkönyvtárakhoz képest kiugróan magas volt a T6 klónkönyvtárban. Emellett az ősi jelleget hordozó extremofil szulfidoxidáló Aquificae képviselője kizárólag a legmelegebb és legnagyobb szulfid-koncentrációjú termálkút vizéből származó közösségben jelent meg.

A DGGE közösségi profilok esetében a mezofil, kemolitotróf proteobaktériumokkal rokon szekvenciák (*Thiobacillus*, *Thiothrix*, és epszilonproteobaktérium-klónok) a langyosvízű büdöstapolcai mintákra voltak leginkább jellemzőek, míg a mattyi és T6 mintákban inkább heterotróf baktériumokkal rokon szekvenciákat tudunk kimutatni (20. ábra).

Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a vizsgált termelőkutakból kimutatott aerob és anaerob kemolitotrófokra (*Thiobacillus*, *Thiothrix*, epszilonproteobaktériumok), és szulfátredukálókra (*Desulfocapsa*, *Desulfopila*) a vízhőmérséklet és a szulfid-koncentráció növekedése kedvezőtlen hatással volt, míg az anaerob, kénoxidáló *Sulfuritalea*, valamint az ősi típusú *Sulfurihydrogenibium* képviselői a magasabb hőmérsékletet és szulfid-koncentrációt részesítették előnyben.

8. Összefoglalás

Munkánk célja az volt, hogy megismerjük a Harkányi Gyógyfürdő termelőkútjainak kifolyó kénes vízében előforduló baktériumközösségek összetételét, különösképpen a kén-körforgalomban szerepet játszó kénbaktériumok filogenetikai diverzitását. Ehhez a Harkányi Gyógyfürdő hét termelőkútjából négyet (Büdöstapolca I-kút, Büdöstapolca II-kút, Matty-kút, Termál VI-kút) vontunk vizsgálat alá 2006 és 2008 között.

A vízmintákból tömörítéssel nyert biomassa szerkezetét fáziskontraszt mikroszkóppal és pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A baktériumközösségek szerkezetének részletes feltárását molekuláris klónozás módszerével végeztük. Emellett egy molekuláris ujjlenyomat módszer (a DGGE) alkalmazásával tanulmányoztuk a baktériumközösségek filogenetikai diverzitásának térbeli eltérését és időbeli változását. Az egyes baktériumközösségek struktúráját a molekuláris klónozás révén kapott klónok 16S rDNS bázissorrend elemzése révén tártuk fel. A közösségek változását a DGGE-mintázatok összehasonlításával, továbbá a kivágott DGGE-csíkokból nyert 16S rDNS szekvenciák azonosítása alapján végeztük el.

A langyosvízü kutakból származó minták biomasszájában a fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatok során *Thiothrix*-fonalakat, illetve fonalak által alkotott fűcsomó-szerű trichómákat találtunk. A sejtfonalakban eltérő fénytöréssű és fényáteresztő képességű kénszemcsék sejten belüli felhalmozódását figyeltük meg. A pásztázó elektronmikroszkópos felvételek során a biomasszák abiotikus alkotóelemeiként vas-kén szemcséket ún. framboidokat fedeztünk fel, melyek létrejöttében az anoxikus-reduktív termális közegben lejátszódó mineralizációs folyamatok, valamint szulfátredukáló és vasredukáló baktériumok anyagcsere-folyamatai egyaránt szerepet játszhattak.

Molekuláris klónozással 72 csoport-reprezentáns molekuláris klón DNS-szekvenciáit azonosítottuk, melyek 46 különböző filotípust képviseltek. A klónok kemolitotróf kénbaktériumokkal, epszilonproteobaktérium-klónokkal, szulfátredukáló baktériumokkal, egyéb anaerob kénredukáló-baktériumokkal, illetve különböző heterotróf baktériumokkal álltak a legközelebbi filogenetikai kapcsolatban. Emellett a DGGE vizsgálatok során nyert szekvenciák elemzésével további két (Gram-pozitív) törzs taxonjait is sikerült kimutatnunk.

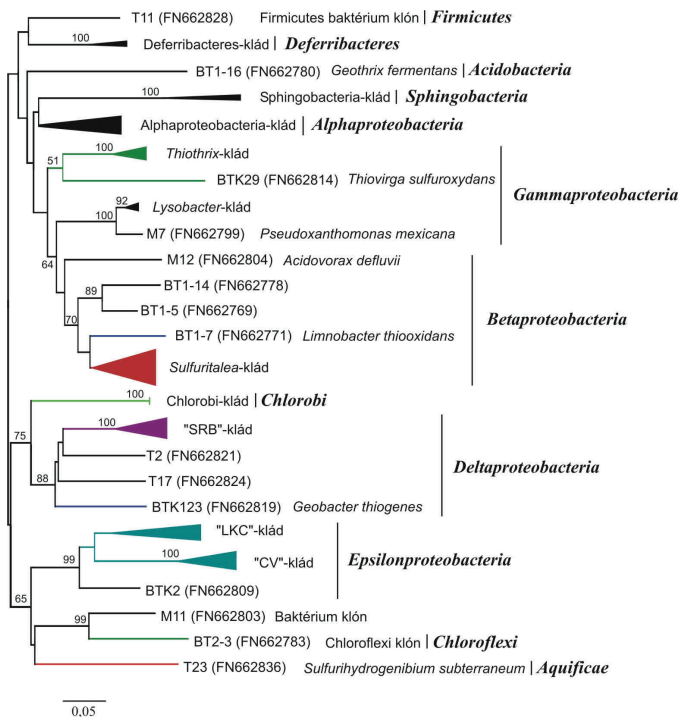
A kútvizek fizikai-kémiai tulajdonságai alapján végzett főkomponens analízis eredményei szerint leginkább a BT1 és a BT2 minták hasonlítottak leginkább egymáshoz, és a mattyi és a T6 minták eltértek a büdöstapolcai mintáktól. A legnagyobb mértékű eltérést a többi mintához képest a T6 minta fizikai-kémiai profilja mutatta. Az egyes mintavételi

helyekről származó vízminták közötti eltérés a baktériumközösségének összetételében is tükröződött. A földrajzilag egymáshoz legközelebb álló bűdöstalpai kutakból származó BTK, BT1 és BT2 minták klónkönyvtárainak tagjai csupán magasabb taxonszinten (osztály, törzs) hasonlítottak egymáshoz, alacsonyabb taxon szinteken (nemzetség, faj, környezeti klóncsoport-ökotípusok) azonban ritkán találtunk közöttük megegyező közösségalkotókat. A kifolyó víz fizikai-kémiai összetétele alapján a leginkább eltérő Termál-VI-os kút vizéből származó T6 klónkönyvtár, valamint a földrajzilag legtávolabbi Matty-kút klónkönyvtár mind egymástól, mind a bűdöstalpai kutak baktériumközösségeitől nagymértékben különbözött.

A harkányi klónkönyvtárakban általánosan előforduló, de mintavételi helyenként eltérő diverzitású közösségalkotók a kén-körforgalomban szerepet játszó környezeti epszilonproteobaktérium klónok, a szulfátredukálókkal és a szintelen kemolitotróf kénbaktériumokkal rokon klónok voltak. A közösségalkotókat leszármazási kapcsolatok szerint kládokba rendeztük, és a kládok filogenetikai kapcsolatait törzsfán ábrázoltuk (25. ábra).

Az Alphaproteobacteria osztály képviselői (BT1, M, T6 klónok) egy kládba tömörültek. A klád tagjai rendkívül változatos életmódú baktériumcsoportot képviseltek (anaerob fototróf *Rhodobacter*-t, metilotróf *Methylobacterium*-ot, egyéb heterotróf talaj- és vízbaktériumokat). Ez a baktériumcsoport nem tartalmazott olyan klónszekvenciákat, amelyek a karsztvíztározókban, illetve a kút-vizekben zajló kénkörforgalomban szerepet játszhattak.

A Betaproteobacteria osztályon belül a legnépesebb csoportot a BTK, BT1 BT2 és T6 könyvtárakba tartozó kén-és tioszulfát-oxidáló *Sulfuritalea*-rokon klónok alkották, melyek egy kládot alkottak. Az osztály további képviselői a *Sulfuritalea*-nemzetséggel távolabbi rokonságban álló, tioszulfát-oxidáló *Limnobacter thiooxidans*, a heterotróf *Acidovorax defluvii* képviselői, valamint a M és BT1 mintákból származó kén-és szulfidoxidáló *Thiobacillus* baktériumokkal rokon klónok voltak. A bétaproteobaktériumok feltehetően tehát igen fontos szerepet játszhatnak a harkányi kénes gyógyvíz összetételének kialakításában, hiszen minden vizsgálatba vont termelőkút vízmintában megjelentek a kemolitotróf kén- és szulfidoxidációban szerepet játszó bétaproteobaktériumok képviselői. Emellett az újonnan leírt *Sulfuritalea hydrogenivorans* képviselői a T6 könyvtár domináns közösségalkotói voltak, és összességében a filogenetikailag azonosított összes klónok mintegy 22%-át alkották.



25. ábra A Harkányi Gyógyfürdő vizgált termelőkútjainak vizéből származó molekuláris klónok által alkotott kládokat és a leszármazási ágakat bemutató Neighbor-joining módszerrel készült filogenetikai fa (Méretarány: 5 % nukleotid különbség. Az ágakra irt számok a bootstrap analízist követően az elágazások százalékos valószínűségét jelzik. Az 50%- nál kisebb valószínűségű elágazásokat nem tüntettük fel. A színeljelt filogenetikai csoportok kémbaktériumokat képviselnek.)

A Gammaproteobacteria osztályon belül a szulfidoxidáló *Thiothrix*-rokon klónok (BTK, BT2, M klónok) és a mattyi *Lysoacter*-rokon klónok kládokat képeztek, ezektől elkülönültek a kemolitotróf, kén-és szulfidoxidáló *Thiovirga sulfuroxydans* és a heterotróf *Pseudoxanthomonas mexicana* képviselői. A *Thiothrix* és *Thiovirga* nemzetség tagjai a bétaproteobaktériumok mellett szintén a kemolitotróf oxidációs folyamatokban játszanak szerepet, amelyek az elemi kén- és szulfát-képzéssel életteret biztosítanak a redukációs folyamatokban részt vevő egyéb kén- és szulfátredukálóknak.

A Deltaproteobacteria osztály legnépesebb (16%-os közösségi arány) klóncsoportja a szulfátredukáló baktériumokkal rokon klónok alkotta klád ("SRB"-klád) volt, melynek tagjai a BT2 és BTK közösségek *Desulfocapsa* illetve *Desulfopila* képviselői voltak. Feltehetően ezek a taxonok felelősek a biológiai kénkörforgalomban a disszimilatorikus szulfátredukációs

folyamatokért, így a szulfid biológiai úton történő előállításáért. A Deltaproteobacteria osztályba tartozott továbbá az "SRB"-kládtól távoli leágazású kénredukáló *Geobacter thiogenes* egy reprezentánsa is, amely vízből kivált elemi ként visszeredukálja szulfiddá, így ez a baktérium (a szulfátredukálókkal együtt) a szulfidoxidálók számára megújuló energiaforrást biztosítanak.

Az Epsilonproteobacteria osztály képviselői két, filogenetikailag egymástól távoli kapcsolatban álló kládba csoportosultak. Az "LKC"-kládot BTK, BT1 és mattyi klónok képviselték, melyek az anaerob kénoxidáló *Sulfurospirillum* baktériumok távoli képviselői voltak. A "CV"-kládot zömmel a BT1 klónok alkották, és ők a szintén anaerob *Sulfurimonas* kénoxidálókat képviselték. Az "LKC" és "CV"-klád tagjai együttesen az összes klónok mintegy 34%-át képviselték, így az epsilonproteobaktérium-klónok feltehetően meghatározó szerepet játszanak a redukált kénformák kemolitotróf oxidációjában.

A Proteobacteria törzstől távoli leágazású Chlorobi-klád tagjai (T6 klónok) az anoxikus fotoszintetizáló zöld kénbaktériumokat képviselték, és a Yellowstone Nemzeti Parki Mammoth hévforrásból származó, eddig tenyésztésbe nem vont környezeti klónokkal mutattak szorosabb rokoni kapcsolatot. A szulfidoxidáló Chlorobi törzs tagjai sajátos életstratégiájuk révén más heterotróf baktériumokkal alkotott konzorciumokban képesek fénymentes környezetben (pl. felszínalatti karsztvíztározokban) is élni.

Továbbá, a T6 és BT2 könyvtárakban egy-egy klón önállóan képviselt a kénkörforgalomban szintén szerepet játszó, proteobaktériumoktól filogenetikailag távoli leágazású taxonokat (Chloroflexi, Aquificae), melyek közül az anaerob fototróf Chloroflexi baktériumok az anaerob szulfidoxidációban, a *Sulfurohydrogenibium subterraneum* pedig a kemolitotróf kénoxidációban vesz részt.

A DGGE-vel végzett közösségi diverzitásvizsgálat bár jóval kisebb felbontású képet adott a közösségszerkezetekről, mégis új információval szolgált, hiszen a klónozásos vizsgálatokat kiegészítve, az addig "rejtőzködő" Gram-pozitív baktériumok egyes csoportjait (Firmicutes: *Planococcus*, Actinobacteria: *Micrococcus*, *Plantibacter*, *Microbacterium*) a DGGE csíkok bázisrendelemzésével sikerült mind a négy vizsgált kút vizéből kimutatnunk.

A korábbi földszelvény-térképezés és a közelmúltban végzett hidraulikai vizsgálatok azt mutatják, hogy a harkányi gyógyfürdő és környezetében fekvő karsztvíztározók vízei feltételezhetően két különböző irányból (a Villányi-hegységi fedetlen hidegkarsztból és a Dráva-medence alatti fedett termálkarsztból) származnak. A karsztközetek repedéseiben, és a törésvonalak mentén áramló, különböző hőmérsékletű és kémiai összetételű vizek keverednek

egymással. A DGGE vizsgálatok eredményei arra engednek következtetni, hogy az időjárás változásaiból eredő szezonális dinamika kevésbé, míg a földrajzi távolságból eredő szerkezeti különbség erőteljesebben volt kifejezett. A Büdöstapolcai I-es, Büdöstapolca II-es, Matty-, valamint a Termál VI-os kutak vizeiből nyert baktériumközösségek szerkezetében mutatkozó hasonlóságok és különbségek elsősorban a vizek fizikai-kémiai főprofil-különbségét, valamint az eltérő áramlási viszonyokat, és a különböző genetikájú vizek eltérő mértékű keveredését tükrözték.

A vizsgált termelőkutak kifolyó vizéből származó klónkönyvtárak közösségszerkezete sok hasonlóságot mutatott számos más, földrajzilag távoli, de hasonló geológiájú és fiziko-kémiai tulajdonságokkal jellemezhető környezetekből (karsztos területekről, anoxikus üledékekből, kénes hévforrásokból, felszínalatti szulfidos víztározókból) származó baktériumközösségekkel (Borsodi és mtsai, 2012; Briée és mtsai, 2007; Engel és mtsai, 2003, 2004; Macalady és mtsai, 2006; Nakagawa és Fukui, 2003; Rudolph és mtsai, 2004; Thevenieau és mtsai, 2007).

Feltételezzük, hogy a kén-alapú bakteriális anyagcsere-folyamatok befolyásolják és szabályozzák a kútvizek különböző oldott kénformáinak koncentrációit, így meghatározó szereplői lehetnek a harkányi kénes gyógyvizek összetételének kialakításában. Emellett feltételezhetően intenzív biomineralizációs folyamatok is zajlanak a vasredukáló, illetve szulfátredukáló baktériumok anyagcsere-folyamatai által, amely során az oldott kénformák ásványi kőzetekbe is épülhetnek.

Az esetünkben alkalmazott mintavételezési és bakteriális DNS kivonási technikák nem minden esetben voltak igazán célravezetőek, mert a molekuláris klónozáshoz kinyert biomassza-mennyiség különösen a BT2 és a mattyi minták esetén kevésnek bizonyult, amit a klónkönyvtárak statisztikai elemzésének eredményei is alátámasztottak. A mintavételezés hatékonyságának fejlesztésével nagyobb mennyiségű biomasszát gyűjthetünk, ami jóval magasabb klónszámú klónkönyvtárat, és részletesebb közösségi képet eredményezhet, így lehetőség nyílna a kis létszámú rejtőzködő taxonok kimutatására is.

Archaea-domén specifikus primerek alkalmazásával új 16S rRNS gén-alapú klónkönyvtárakat állíthatunk fel, így fény derülhet az ösbaktériumok filogenetikai diverzitására és lehetséges szerepére a harkányi, büdöstapolcai és mattyi termelőkutak kémiai összetételében, hiszen a langyos, illetve hévizes redukív kén-, és metántartalmú közeg, valamint a szulfátredukáló, illetve egyéb termofil kénbaktériumok jelenlétéből feltételezhető, hogy a biogeokémiai körforgalom szabályozásában egy komplex *Bacteria-Archaea*-közösség vesz részt.

9. Kivonat

Munkám során tenyésztéstől független molekuláris klónozás módszerével vizsgáltuk a Harkányi Gyógyfürdőt szolgáló langyos és termál karsztvízbázisokra telepített termelőkkutak vizeinek baktériumközösségeit. Elsősorban a kén-körforgalomban szerepet játszó baktériumok körét igyekeztük meghatározni. Emellett denaturáló gradiens gélelektroforézissel vizsgáltuk a kútvíz- minták baktériumközösségeinek szerkezetében megfigyelhető területi és szezonális különbségeket, és a DGGE sávmintázatából kivágott domináns csíkok bázisrenddel elemzésével azonosítottuk a mintákban előforduló domináns taxonokat. A kutatómunkához a Harkányi Gyógyfürdő 4 egymástól távol eső termelőkkútjának vizéből (Büdöstopolca I-es, Büdöstopolca II-es kút, Matty-kút, Termál VI-os kút) vettünk mintát 2006-2008 között.

A négy kútból, valamint egy kompozit mintából származó klónkönyvtár (BTK, BT1, BT2, M, T6) elemzése során összesen 202 klónszekvenciát csoportosítottunk restriktációs hasítási mintázatuk alapján, majd a 72 csoportreprezentáns klón bázisrenddel elemzését követően 46 különböző filotípust azonosítottunk. A klónok mintegy 86%-a a Proteobacteria törzsbe tartozó különböző mezofil vagy termofil kénbaktériumokkal állt filogenetikai rokonságban. A büdöstopolcai klónkönyvtárakból (BTK, BT1, BT2) azonosított kénbaktériumokkal rokon klónszekvenciák (*Thiothrix*, *Thiovirga*, *Sulfuritalea*, *Limnobacter*, *Thiobacillus*, *Desulfocapsa*, *Desulfopila*, *Sulfuricurvum*) mellett hasonló környezetből kimutatott epszilonproteobaktérium-klónszekvenciák voltak a leginkább jellemzőek. A kénbaktériumok mellett a langyos vízi kutak mintáiban vasredukáló baktériumok (*Geobacter*, *Geothrix*, *Dechloromonas*) képviselőt is kimutatunk, melyek együttesen a mintákban fellelt pirít-ásványok biogén képződésében feltehetően szerepet játszanak. A T6 klónkönyvtárban a kénoxidáló *Sulfuritalea hydrogenivorans*-szal távol-rokon szekvenciák alkották a baktériumközösség zömét. A többiektől eltérően a mattyi baktériumközösséget különböző heterotróf baktériumok kis létszámú klóncsoportjai képezték, bár kénbaktériumokkal rokon szekvenciák (*Thiothrix*, *Thiobacillus*, *Sulfurovum*) itt is előfordultak.

A domináns DGGE-csíkok bázisrenddel elemzése során a klónkönyvtárakkal közös taxonokat (*Thiothrix*-, *Thiobacillus*- és epszilonproteobaktérium-klónokat) sikerült kimutatnunk. Ugyanakkor nagy gyakorisággal találtunk Gram-pozitív baktérium-szekvenciákat is (*Planococcus*, *Microbacterium*, *Plantibacter*, *Micrococcus*), melyeket a klónkönyvtár-elemzés módszerével nem tudtunk kimutatni. A termelőkkutak szezonális DGGE-sávmintázatai két nagyobb csoportot alkottak. A büdöstopolcai (BT1, BT2) sávmintázatok egyértelműen elkülönültek a mattyi - és T6 sávmintázatoktól.

A klónkönyvtárak elemzésével kimutatott kemolitotróf kénoxidálók, szulfátredukálók, vasredukálók, valamint anaerob fototróf kén-, illetve nem-kénbaktériumok alkottak közösséget. Feltételezzük, hogy ezek a közösségek a felszínalatti víztározók vizeiben szabályozzák a karsztvizek különböző kénformáinak koncentrációit, így fontos szerepet játszhatnak a harkányi gyógyvizek összetételének alakításában.

A DGGE vizsgálatok eredményei szerint a vizsgált kutak vizeiből nyert baktériumközösségek szerkezetében mutatkozó hasonlóságok és különbségek elsősorban az eltérő áramlási viszonyokat és a különböző genetikájú vizek eltérő mértékű keveredését tükrözik. Az időjárás változásaiból eredő szezonális dinamika a közösségi mintázatok alapján kevésbé volt jellemző.

10. Abstract

The aim of this work was to examine the composition of bacterial communities associated with waters of one sulfurous thermal and three lukewarm wells of Harkány Spa using cultivation-independent clone library analysis targeting the 16S rRNA gene. In addition, we studied the seasonal and spatial changes of the communities using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Water samples were taken from Búdöstopolca-I, Búdöstopolca-II, Matty- and Termál-VI wells between 2006 and 2008.

Of five clone libraries (BTK, BT1, BT2, M, T6) the total number of 202 clones were grouped by their ARDRA-patterns, and 46 different phylotypes were identified by partial sequence analysis. The majority of the clones (86%) belonged to different sulfur-oxidizing or sulfur/sulfate-reducing Proteobacteria. High number of the clones retrieved from the Búdöstopolca samples belonged to unidentified Epsilonproteobacteria, which were distant relatives of sulfur-oxidizing chemolithotrophs, and moderately high number of the clones were in close relationship with the genera *Thiothrix*, *Thiovirga*, *Sulfuritalea*, *Limnobacter*, *Thiobacillus*, *Desulfocapsa*, *Desulfopila*, *Sulfuricurvum*. Minority of the clones belonging to anaerobic, iron-reducing organisms (*Geobacter*, *Geothrix*, *Dechloromonas*) were also found in the lukewarm samples along with sulfate-reducers. In conjunction, these anaerobic bacteria may play an important role in the local biogenic piritization. Majority of the clones retrieved from the Matty clone library belonged to different heterotrophs, but sulfur bacterial sequences (*Thiothrix*, *Thiobacillus*, *Sulfurovum*) were also found. The dominant clones of the thermal water were affiliated with the genus *Sulfuritalea*, a novel, thermophilic, sulfur-oxidizing chemolithotrophic bacterium. In addition, minority of the clones were affiliated to Firmicutes, Deferribacteres and Chlorobi.

On the basis of DGGE band partial sequencing, presence of *Thiothrix*, *Thiobacillus*, unidentified Epsilonproteobacteria clones and Gram-positive taxa (*Planococcus*, *Microbacterium*, *Plantibacter*, *Micrococcus*) were also detected. Most of the identified species and genera were related to bacteria with obligate or facultative chemolithotrophic sulfur metabolism, so the microbes of the curative waters may participate in the sulfur-cycle of the wells.

The comparative DGGE analysis resulted two main groups, in which the DGGE patterns of the lukewarm samples were separated from the Matty and thermal samples, showing geochemical differences and geographical distances. BT1 and BT2 samples collected at the same time (June, August 2007 and November 2008) showed the highest similarities (65 %). However, seasonal variances could not be detected in all of the Matty and the thermal sampling sites.

Presumably, the different origins of the lukewarm and thermal karstic waters and their blending in the fissures of the limestone resulted differences in physico-chemical parameters and different bacterial communities adapted to different conditions of the lukewarm and thermal aquifers.

11. Felhasznált irodalom

- A Harkányi Gyógyfürdő Zrt. tulajdonában lévő harkányi, mattyi és büdöstapolcai vízbázisok állapotértékelése és biztonságba helyezési terve. (2008) Harkányi Gyógyfürdő Zrt.
- Abraham W. R., Macedo A. J., Lünsdorf H., Fischer R., Pawelczyk .S, Smit .J, Vancanneyt M. (2008) Phylogeny by a polyphasic approach of the order Caulobacterales, proposal of *Caulobacter mirabilis* sp. nov., *Phenylobacterium haematophilum* sp. nov. and *Phenylobacterium conjunctum* sp. nov., and emendation of the genus *Phenylobacterium*. Int J Syst Evol Microbiol 58:1939-1949.
- Aguiar P., Beveridge T., J., Reysenbach A. L. (2004) *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. Int J Syst Evol. Microbiol 54:33-39.
- Alam S. I., Singh L., Dube S., Reddy G. S. N., Shivaji S. (2003) Psychrophilic *Planococcus maitriensis* sp.nov. from Antarctica. Sys Appl Microbiol 26 (4):505–510.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389-3402.
- Amend J. P., Huang C., Amann R., Bach W., Meyerdierks A., Price R. E., Schubotz F., Summons R. E., Wenzhoefer, F. (2009) Archaea, Bacteria, and sulfur-cycling in a shallow-sea hydrothermal ecosystem. American Geophysical Union, Fall Meeting 2009, abstract #B21D-05
- Angert E. R., Northup D., E., Reysenbach A., L., Peek, A., S., Goebel B., M., Pace, N., R. (1998) Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Park Cave, Kentucky. Am Mineral 83:11-12.
- Bae H-S., Im W-T, Lee S-T (2005) *Lysobacter concretionis* sp. nov., isolated from anaerobic granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. Int J Syst Evol Microbiol 55:1155-1161.
- Behrendt U., Ulrich A., Schumann D., Naumann D., Suzuki K. (2002) Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; poliphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp.nov. Int J Syst Evol Microbiol 52:1441-1454.

- Berg K. A., Lyra C., Sivonen K., Paulin L., Suomalainen S., Tuomi P., Rapala J. (2009) High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J* 3 (3): 314-325.
- Beveridge T. J., Meloche J. D., Fyfe W. S., Murray R. G. E. (1983) Diagenesis of metals chemically complexed to Bacteria: Laboratory formation of metal phosphates, sulfides, and organic condensates in artificial sediments. *Appl Environ Microbiol* 45:1094-1108.
- Borsodi A., Knáb M., Krett G., Makk J., Márialigeti K., Eröss A., Mádl-Szőnyi J. (2012) Biofilm bacterial communities inhabiting the cave walls of Buda Thermal Karst System, Hungary. *Geomicrobiol J* 29:611-627.
- Borszéli B. (1979) Ásványvizek és gyógyvizek. Mezőgazdasági Kiadó, Bp.
- Bray J. R., Curtis J. T. (1957) An ordination of upland forest communities in southern Wisconsin. *Ecol Monographs* 27:325-349.
- Briée C., Moreira D., López-García P. (2007) Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Res Microbiol* 158:213-227.
- Brigmon R. L., Bitton G., Zam S. G., O'Brien B. (1995) Development and application of a monoclonal antibody against *Thiothrix* spp. *Appl Environ Microbiol* 61:13-20.
- Casamayor E. O., Schäfer H., Bañeras L., Perdrós-Alió C., Muyzer G. (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis *Appl Environ Microbiol* 66:499-508.
- Chen M-Y., Tsay S-S., Chen K-Y., Shi Y-C., Lin Y-T., Lin G-H. (2002) *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, nitrite-producing species isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:2155-2161.
- Chernousova E., Gridneva E., Grabovich M., Dubinina G., Akimov V., Rossetti S., Kuever J. (2009) *Thiothrix caldifontis* sp. nov. and *Thiothrix lacustris* sp. nov., gamma-proteobacteria isolated from sulfide springs. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:3128-3135.
- Christensen P., Cook F. D. (1978) *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. *Int J Syst Bacteriol* 28:367-393.
- Chun J., Lee J. H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B. K., Lim Y. W. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2259-2261.

- Coates J. D., Phillips E., J., Lonergan D., J., Jenter H., Lovley D., R. (1996) Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Appl Environ Microbiol* 62:1531-1536.
- Coates J. D., Ellis J. D., Gaw C. V., Lovley D. R. (1999) *Geothrix fermentans* gen. nov. sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int J Syst Bacteriol* 49:1615-1622.
- Coenye T., Goris J., De Vos P., Vandamme P., LiPuma J. J. (2003) Classification of *Ralstonia picketti*-like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov. *J Syst Evol Microbiol* 53:1075-1080.
- Davis K. E., Joseph S. J., Janssen P. H. (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71:826-834.
- De Wever H., Cole J. R., Fettig M. R., Hogan D. A., Tiedje J. M. (2000) Reductive dehalogenation of trichloroacetic acid by *Trichlorobacter thiogenes* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 66:2297-2301.
- Dezső J., Sebe K., Horváth G. (2004) Villányi-hegység útikalauz. Wesselényi Miklós Sport Közalapítvány.
- Edmonds J. W., Weston N. B., Joye S. B., Mou X., Moran M. A. (2009) Microbial community response to seawater amendment in low-salinity tidal sediments. *Microb Ecol* 58:558-568.
- Eisenmann E., Beuerle J., Sulger K., Kroneck P.M.H., Schumacher W. (1995) Lithotrophic growth of *Sulfurospirillum deleyianum* with sulfide as electron donor coupled to respiratory reduction of nitrate to ammonia. *Arch Microbiol* 164 (3):180-185.
- Elshahed M. S., Senko J. M., Najjar F. Z., Kenton S. M., Roe B. A., Dewers T. A., Spear J. R., Krumholz L. R. (2003) Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring. *Appl Environ Microbiol* 69:5609-5621.
- Elshahed M. S., Najjar F. Z., Roe B. A., Thomas A. O., Dewers T. A., Krumholz L.R. (2004) Survey of Archaeal Diversity Reveals an Abundance of Halophilic Archaea in a Low-Salt, Sulfide- and Sulfur-Rich Spring. *Appl Environ Microbiol* 70:2230-2239.
- Engel A. S., Lee N., Porter M. L., Stern L. A., Bennett P. C., Wagner M. (2003) Filamentous "Epsilonproteobacteria" dominate microbial mats from sulfidic cave springs. *Appl Environ Microbiol* 69:5503-5511.
- Engel A. S., Porter M. L., Stern L. A., Quinlan S., Bennett P. C. (2004) Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic

- springs dominated by chemolithoautotrophic „*Epsilonproteobacteria*”. FEMS Microbiol Ecol 51:31-53.
- EU Víz-Keretirányelv hazai alkalmazása. Felszín alatti víztestek felülvizsgálata. Zárójelentés. (2007) VKKI Vízügyi és Környezetvédelmi Központi Igazgatóság.
- Finster K., Liesack W., Tindall B. J. (1997) *Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a new microaerophilic sulfur-reducing bacterium. Int J Syst Bacteriol 47:1212-1217.
- Flores G. E., Liu Y., Ferrera I., Beveridge T. J., Reysenbach A. L. (2008) *Sulfurihydrogenibium kristjanssonii* sp. nov., a hydrogen- and sulfur-oxidizing thermophile isolated from a terrestrial Icelandic hot spring. Int J Syst Evol Microbiol 58:1153-1158.
- Folman L. B., De Klein M. J., Postma J., van Veen J. A. (2004) Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Phytophthora aphanidermatum* in cucumber. Biol Control 31:145-154.
- Frostegård Å., Courtois S., Ramisse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P. (1999) Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. Appl Environ Microbiol 65:5409-5420.
- Goldscheider N., Mádl-Szőnyi J., Eröss A., Schill E. (2010) Review: Thermal water resources in carbonate rock aquifers. Hydrogeol J 18:1303-1318.
- Green P. N., Bousfield I. J. (1983) Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole, and Hanson 1976; *Methylobacterium rhodinum* (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971) comb. nov., corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. Int J Syst Bacteriol 33:875-877.
- Godoy F., Vancanneyt M., Martínez M., Steinbüchel A., Swings J., Rehm B. H. (2003) *Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53:473-477.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P. D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4: 9pp.
- Handelsman J. (2004) Metagenomics. Application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiol Mol Biol Rev 68:669-685.
- Hansen T. A., Imhoff J. F. (1985) *Rhodobacter veldkampii*, a new species of phototrophic purple nonsulfur bacteria. Int J Syst Bacteriol 35:115-116.

- Hartmann M., Widmer F. (2006) Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Appl Environ Microbiol* 72:7804-7812.
- Hiraishi A., Muramatsu K., Urata K. (1995) Characterization of new denitrifying *Rhodobacter* strains isolated from photosynthetic sludge for wastewater treatment. *J Ferment Bioeng* 79:39-44.
- Hiraishi A., Nagashima K. V. P., Matsuura K., Shimada K., Takaichi S., Wakao N., Katayama Y. (1998) Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48:1389-1398.
- Hirayama H., Takai K., Inagaki F., Yamato Y., Suzuki M., Neelson K. H., Horikoshi K. (2005) Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. *Extremophiles* 9:169-184.
- Howarth R., Unz R. F., Seviour E. M., Seviour R. J., Blackall L. L., Pickup R. W., Jones J. G., Yaguchi J., Head I. M. (1999) Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater-treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomi* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:1817-1827.
- Huber R., Dyba D., Huber H., Burggraf S., Rachel R. (1998) Sulfur-inhibited *Thermosphaera aggregans* sp. nov., a new genus of hyperthermophilic archaea isolated after its prediction from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 48:31-38.
- Hugenholtz P., Goebel B. M., Pace N. R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180:4765-4774.
- Iino T., Nakagawa T., Mori K., Harayama S., Suzuki K. (2008) *Calditerrivibrio nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1675-1679.
- Im W. T., Liu Q. M., Yang J. E., Kim M. S., Kim S. Y., Lee S. T., Yi T. H. (2010) *Panacagrimonas perspica* gen. nov., sp. nov., a novel member of Gammaproteobacteria isolated from soil of a ginseng field. *J Microbiol* 48:262-266.
- Imhoff J. F., Trüper H. G., Pfennig N. (1984) Rearrangement of the species and genera of the phototrophic "Purple Nonsulfur Bacteria". *Int J Syst Bacteriol* 34:340-343.

- Inagaki F., Takai K., Nealson H. K., Horikoshi K. (2003) *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing e-proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1801-1805.
- Inagaki F., Takai K., Nealson K., H., Horikoshi K. (2004) *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1477-1482.
- Ito T., Sugita K., Yumoto I., Nodasaka Y., Okabe S. (2005) *Thiovirga sulfuroxydans* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1059-1064.
- Janssen P. H., Schuhmann A., Bak F., Liesack W. (1996) Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol* 166:184-192.
- Jáger V. (2011) Tenger alatti hévforrások és ércesedések a Mecsekben. *Természet Világa* 142. évfolyam, 1. szám.
- Jørgensen B. B., (1990) The sulfur cycle of freshwater sediments: Role of thiosulphate. *Limnol Oceanogr* 35:1329-1342.
- Jørgensen B. B., Bak F. (1991) Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Appl Environ Microbiol* 57:847-856.
- Katayama Y., Hiraishi A., Kuraishi H. (1995) *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology* 141:1469-1477.
- Kelly D., P., Wood A. P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:511-516.
- Kelly D.P., Wood A. P. (2006) The chemolithotrophic Prokaryotes. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 441-456.
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.

- Kleinsteuber S., Schleinitz K. M., Breitfeld J., Harms H., Richnow H. H., Vogt C. (2008) Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 66:143-157.
- Kodama Y., Watanabe K. (2003) Isolation and characterization of a sulfur-oxidizing chemolithotroph growing on crude oil under anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* 69: 107-112.
- Kodama Y., Ha le T., Watanabe K. (2007) *Sulfurospirillum cavolei* sp. nov., a facultatively anaerobic sulfur-reducing bacterium isolated from an underground crude oil storage cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:827-831.
- Kojima H., Fukui M. (2011) *Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a novel facultative autotroph isolated from a freshwater lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1651-1655.
- de Koff J. P., Anderson M. A., Amrhein C. (2008) Geochemistry of iron in the Salton Sea, California. *Hydrobiologia* 604:111-121.
- Kumar S., Masatoshi N., Dudley J., Koichiro T. (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 4:299-306.
- Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E, Goodfellow, M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, pp. 115–149.
- Lau M. C., Aitchison J. C., Pointing S. B. (2009) Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles* 13:139-149.
- Lee J. S., Shin Y. K., Yoon J. H., Takeuchi M., Pyun Y. R., Park Y. H. (2001) *Sphingomonas aquatilis* sp. nov., *Sphingomonas koreensis* sp. nov., and *Sphingomonas taejonensis* sp. nov., yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral water. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51:1491-1498.
- Lee J. W., Im W-T, Kim M. K., Yang D-C (2006) *Lysobacter koreensis* sp. nov., isolated from a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:231-235.
- Lesaulnier C., Papamichail D., McCorkle S., Ollivier B., Skiena S., Taghavi S., Zak D., van der Lelie D. (2008) Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. *Environ Microbiol* 10:926-941.
- Liebe P. (2001) Termálvizekészleteink, hasznosításuk és védelmük. Környezetvédelmi Minisztérium (Tájékoztató). VITUKI Kiadv
- Liebe P. (2006) Felszín alatti vizeink II. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium (Tájékoztató). VITUKI Kiadv

- Loneragan D. J., Jenter H. L., Coates J. D., Phillips E. J., Schmidt T. M., Lovley D. R. (1996) Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *J Bacteriol* 178:2402-2408.
- Luijten M. L., de Weert J., Smidt H., Boschker H.T., de Vos W. M., Schraa G., Stams A. J. (2003) Description of *Sulfurospirillum halospirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:787-793.
- Macalady J. L., Lyon E. H., Koffman B., Albertson L. K., Meyer K., Galdenzi S., Mariani S. (2006) Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Appl Environ Microbiol* 72:5596-5609.
- Makk J., Beszteri B., Ács É., Márialigeti K., Szabó K. (2003) Investigations on diatom-associated bacterial communities colonizing an artificial substratum in the River Danube. *Large Rivers* 14, *Arch Hydrobiol Suppl*: 249-265.
- Massol-Deya A. A., Odelson D. A., Hickey R. F., Tiedje J. M. (1995) Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16–23S ribosomal DNA sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 3.3.2:1–3.3.2:8.
- Mayilraj S., Prasad G. S., Suresh K., Saini H. S., Shivaji S., Chakrabarti T. (2005) *Planococcus stackebrandtii* sp. nov., isolated from a cold desert of Himalayas, India. *J Syst Evol Microbiol* 55:91-64.
- McDonald I., R., Kelly D. P., Murrell J. C., Wood A. P. (1996) Taxonomic relationships of *Thiobacillus halophilus*, *T. aquaesulis*, and other species of *Thiobacillus*, as determined using 16S rDNA sequencing. *Arch Microbiol* 166:394-398.
- Militon C., Boucher D., Vachelard C., Perchet G., Barra V., Troquet J., Peyretailade E., Peyret P. (2010) Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiol Ecol* 74:669-681.
- Moissl C., Rudolph C., Huber R. (2002) Natural communities of novel Archaea and Bacteria with a string-of-pearls-like morphology: Molecular analysis of the bacterial patterns. *Appl Environ Microbiol* 68:933-937.
- Moreira D., Amils R. (1997) Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic Thiobacilli: Proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:522-528.

- Müller-Spitz S. R., Goetz G. W., McLellan S. L. (2009) Temporal and spatial variability in nearshore bacterioplankton communities of Lake Michigan. *FEMS Microbiol Ecol* 67:511-522.
- Muyzer G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.
- Nakagawa T., Fukui M. (2003) Molecular characterization of community structures and sulfur metabolism within microbial streamers in Japanese hot springs. *Appl Environ Microbiol* 69:7044-7057.
- Nakagawa S., Shtaih Z., Banta A., Beveridge T., J., Sako Y., Reysenbach A. L. (2005) *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively heterotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from Yellowstone National Park, and emended descriptions of the genus *Sulfurihydrogenibium*, *Sulfurihydrogenibium subterraneum* and *Sulfurihydrogenibium azoreense*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2263-2268.
- Niu S. Q., Fukushima J., Jiang Y., Ishikawa Y., Ueda T., Matsumoto S. (2006) Analysis of bacterial community structure in the natural circulation system wastewater bioreactor by using a 16S rRNA gene clone library. *Microbiol Immunol* 50:937-950.
- Noel, R., Krieg, N. R., Staley, J. T., Brown D. R., Hedlund, B. P., Paster, B. J., Ward, N. L., Ludwig, W., Whitman W., B (2010) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Springer, New York.
- O'Neill A. H., Liu Y., Ferrera I., Beveridge T., J., Reysenbach A., L. (2008) *Sulfurihydrogenibium rodmanii* sp. nov., a sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from the Uzon Caldera, Kamchatka Peninsula, Russia, and emended description of the genus *Sulfurihydrogenibium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1147-1152.
- Overmann J, Garcia-Pichel F. (2006) The phototrophic way of Life. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 32-85.
- Palatinszky M., Nikolausz M., Sváb D., Márialigeti K. (2011) Preferential ligation during TA-cloning of multitemplate PCR products – a factor causing bias in microbial community structure analysis. *J Microbiol Methods* 85:131–136.
- Park J-H, Kim R., Aslam Z., Jeon C. O., Chung Y. R. (2008) *Lysobacter capsici* sp. nov., with antimicrobial activity, isolated from the rhizosphere of pepper, and emended description of the genus *Lysobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:387-392.

- Peduzzi S., Tonolla M., Hahn D. (2003) Isolation and characterization of aggregate-forming sulfate-reducing and purple sulfur bacteria from the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland. *FEMS Microbiol Ecol* 45:29-37.
- Pesti J. (2002) *Az ördögszántotta hegy. Baranyai mondák, hiedelmek és történetek.* Alexandra Kiadó
- Pfennig N., Biebl H. (1976) *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. *Arch Microbiol* 110:3-12.
- Pham V. D., Konstantinidis K. T., Palden T., DeLong E. F. (2008) Phylogenetic analyses of ribosomal DNA-containing bacterioplankton genome fragments from a 4000 m vertical profile in the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol* 10: 2313-30.
- Podolich O., Laschevskyy V., Ovcharenko L., Kozyrovska N., Pirttilä A. M. (2009) *Methylobacterium* sp. resides in unculturable state in potato tissues in vitro and becomes culturable after induction by *Pseudomonas fluorescens* IMGB163. *J Appl Microbiol* 106:728-37.
- Popa R., Kinkle B. K., Badescu A. (2004) Pyrite framboids as biomarkers for iron-sulfur systems. *Geomicrobiol J* 21:193-206.
- Porter M. L., Engel A. S. (2008) Diversity of uncultured *Epsilonproteobacteria* from terrestrial sulfidic caves and springs. *Appl Environ Microbiol* 4973-4977.
- Rabus R., Hansen T. A., Widdel F. (2006) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing Prokaryotes In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria.* Springer, New York, pp. 659-768.
- Rakusz, Gy., Strausz, L. (1953) Geology of the Villány Mountains. Annual report of the Geological Institute of Hungary 41:3-27.
- Reddy G. S. N., Matsumoto G. I., Shivaji S. (2003) *Sporosarcina macmurdoensis* sp. nov., from a cyanobacterial mat sample from a pond in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica *Int J Sys Evol Microbiol* 53:1363-1367.
- Reysenbach A. L., Hamamura N., Podar M., Griffiths E., Ferreira S., Hochstein R., Heidelberg J., Johnson J., Mead D., Pohorille A., Sarmiento M., Schweighofer K., Seshadri R., Voytek M. A. (2009) Complete and draft genome sequences of six members of the *Aquificales*. *J Bacteriol* 6:1992-1993.
- Rivière D., Desvignes V., Pelletier E., Chaussonnerie S., Guerhazi S., Weissenbach J., Li T., Camacho P., Sghir A. (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J* 6:700-714.

- Romano I, Giordano A, Lama L, Nicolaus B, Gambacorta A. (2003) *Planococcus riftetensis* sp. nov, isolated from algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy). *Syst Appl Microbiol* 26:357-366.
- Rosetti S., Blackall L. L., Levantesi C., Uccelletti D., Tandoi V. (2003) Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithotrophic *Thiothrix* strain isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1271-1276.
- Rudolph C., Wanner G., Huber R. (2001) Natural communities of novel *Archaea* and *Bacteria* growing in cold sulfurous sorings with a string-of-pearls-like morphology. *Appl Environ Microbiol* 2336-2344.
- Rudolph C., Moissl C., Henneberger R., Huber R. (2004) Ecology and microbial structures of archaeal/bacterial strings-of-pearls communities and archaeal relatives thriving in cold sulfidic springs. *FEMS Microbiol Ecol* 50:1-11.
- Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-25.
- Sambrook J., Russel D. W. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor
- Sayeh R., Birrien J. L., Alain K., Barbier G., Hamdi M., Prieur D. (2010) Microbial diversity in Tunisian geothermal springs as detected by molecular and culture-based approaches. *Extremophiles* 6:501-514.
- Schink B., Stams A. J. M. (2006) Syntrophism among Prokaryotes. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 309-335.
- Schlegel H. G., Jannasch H. W. (2006) Prokaryotes and their habitats. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 137-184.
- Scholz-Muramatsu H., Neumann A., Messmer M., Moore E., Diekert G. (1995) Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *J Arch Microbiol* 163:48-56.
- Schulze R., Spring S., Amann R., Huber I., Ludwig W., Schleifer K. H., Kämpfer P. (1999) Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 2:205-214.
- Sikorski J., Lapidus A., Copeland A., Del Rio T.G., Nolan M., Lucas S., Chen F., Tice H., Cheng J-F., Saunders E., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Ovchinnikova G., Pati A., Ivanova N., Mavromatis K., Chen A., Palaniappan K., Chain P., Land M., Hauser L.,

- Chang Y-J., Jeffries C.D., Brettin, J. Deter, Cliff Han,2,3 Manfred Rohde, Elke Lang, Stefan Spring, Markus, Göker, Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H-P. (2010) Complete genome sequence of *Sulfurospirillum deleyianum* type strain (5175T). *Stand Genomic Sci* 2:(2): 149–157.
- Sipos R., Székely A. J., Palatinszky M., Révész S., Márialigeti K., Nikolauz M. (2007) Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targetting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 60:341-350.
- Spring S., Kampfer P., Schleifer K. H. (2001) *Limnobacter thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from freshwater lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1463-1470.
- Stolz J. F., Ellis D. J., Blum J. S., Ahmann D., Lovley D. R., Oremland R. S. (1999) *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the Sulfurospirillum clade of the epsilon Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 49:1177-1180.
- Srinivas T. N. R., Kumar A. P., 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.
- Stralis-Pavese N., Bodrossy L., Reichenauer T. G., Weilharter A., Sessitsch A. (2006) 16S rRNA based T-RFLP analysis of methane oxidising bacteria-Assessment, critical evaluation of methodology performance and application for landfill site cover soils. *Appl Soil Ecol* 31:251-266.
- Sullivan R. F., Holtman M. A. Zylstra G. J., White J. F. Kobayashi D. Y. (2003) Taxonomic positioning of two biological control agents for plants diseases as *Lysobacter enzymogenes* based on phylogenetic analysis of 16S rDNA, fatty acid somposition and phenotypic characteristics. *J Appl Microbiol* 94:1079-1086.
- Suresh K., Mayilraj S., Bhattacharya A., Chakrabarti T. (2007) *Planococcus columbae* sp. nov., isolated from pigeon faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1266-1271.
- Suzuki D., Ueki A., Amaishi A., Ueki K. (2007) *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, rod-like, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:520-526.
- Sweeney R. E., Kaplan I. R. (1973) Pyrite framboid formation; Laboratory synthesis and marine sediments. *Economic Geol* 68:618-634.

- Szabó G., Khayer B., Rusznyák A., Tátrai I., Dévai G., Márialigeti K. and Borsodi A.K. (2011) Seasonal and spatial variability of sediment bacterial communities inhabiting the large shallow Lake Balaton. *Hydrobiologia* 663:217-232.
- Szilágyi Zs. (2006) Magyarország egészségturizmusa. Csorba P. szerk.: Egy szakmai életút eredményei és helyszínei - Tiszteletkötet Martonné Dr. Erdős Katalin 60. születésnapjára, Tájvédelmi és Környezetföldrajzi Tanszék, Debreceni Egyetem, pp. 273-301.
- Takai K., Horikoshi K. (1999) Genetic diversity of *Archaea* in deep-Sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, 152:1285-1297.
- Takai K., Hirayama H., Sakihama Y., Inagaki F., Yamato Y., Horikoshi K. (2002) Isolation and metabolic characteristics of previously uncultured members of the order aquificales in a subsurface gold mine. *Appl Environ Microbiol* 68:3046-3054.
- Takai K., Kobayashi H., Nealon K. H., Horikoshi K. (2003) *Sulfurihydrogenibium subterraneum* gen. nov., sp. nov., from a subsurface hot aquifer. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:823-827.
- Takai K, Suzuki M, Nakagawa S, Miyazaki M, Suzuki Y, Inagaki F, Horikoshi K. (2006) *Sulfurimonas paravinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen-and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1725-1733.
- Takeuchi M., Yokota A. (1994) Phylogenetic analysis of the genus *Microbacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 124:11-16.
- Takeuchi M., Hamana K., Hiraishi A. (2001) Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 405-1417.
- Thevenieau F., Fardeau M. L., Ollivier B., Jouliau C., Baena S. (2007) *Desulfomicrobium thermophilum* sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Colombia. *Extremophiles* 2:295-303.
- Thierry S., Macarie I. H., Iizuka T., Geißdörfer W., Assih E. A., Spanevello M., Verhe F., Thomas P., Fudou R., Monroy O., Labat M., Ouattara A.S. (2004) *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus

- Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2245-2255.
- Tobler D. J., Benning L. G. (2011) Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects. *Extremophiles* 15:473-485.
- Tonolla M, Demarta A, Peduzzi S, Hahn D, Peduzzi R. (2000) In situ analysis of sulfate-reducing bacteria related to *Desulfocapsa thiozymogenes* in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *Appl Environ Microbiol* 66:820-824.
- Ueda K., Tagami Y., Kamihara Y., Shiratori H., Takano H., Beppu T. (2008) Isolation of bacteria whose growth is dependent on high levels of CO₂ and implications of their potential diversity. *Appl Environ Microbiol* 74:4535-4538.
- Vlasceanu L., Popa R., Kinkle B. K. (1997) Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and Its Distribution in a Chemoautotrophically Based Groundwater Ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 3123-3127.
- Wartiainen I., Hestnes A. G., McDonald I. R., Svenning M. M. (2006) *Methylocystis rosea* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from Arctic wetland soil, Svalbard, Norway (78 degrees N). *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 541-547.
- Weber K. A., Urrutia M. M., Churchill P. F., Kukkadapu R. K., Roden E. E. (2006) Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Environ Microbiol* 8:100-113.
- Weon H-Y., Kim B-Y, Baek Y-K, Yoo S-H., Kwon S-W., Stackebrandt E., Go S-J. (2006) Two novel species, *Lysobacter daejonensis* sp. nov., and *Lysobacter yangpyeongensis* sp. nov., isolated from Korean greenhouse soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:947-951.
- von Wintzingerode F. V., Göbel U. B., Stackebrandt E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21:213–229.
- Wolterink A., Kim S., Muusse M., Kim I. S., Roholl P. J., van Ginkel C. G. Stams A. J., Kengen S. W. (2005) *Dechloromonas hortensis* sp. nov. and strain ASK-1, two novel (per)chlorate-reducing bacteria, and taxonomic description of strain GR-1. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:2063-2068.
- Xie C. H, Yokota A. (2006) Reclassification of [*Flavobacterium*] *ferrugineum* as *Terrimonas ferruginea* gen. nov., comb. nov., and description of *Terrimonas lutea* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1117-1121.

- Yamada T., Imachi H., Ohashi A., Harada H., Hanada S., Kamagata Y., Sekiguchi Y. (2007) *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2299-2306.
- Yoon J-H., Weiss N., Kang K. H., Oh T., Park Y-H. (2003) *Planococcus maritimus* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat in Korea. *J Syst Evol Microbiol* 53:2013-2017.
- Yu Y., Breitbart M., McNairnie P., Rohwer F. (2006) FastGroup II: A web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries. *BMC Bioinformatics* 7:57
- Zenke (2002) Molekuláris biodiverzitási vizsgálatok az Egerszalóki hóforrás ós- és cianobaktérium közösségén. Szakdolgozat, ELTE, Budapest.
- Zurdo-Piñero J. L., Rivas R., Trujillo M. E., Vizcaíno N., Carrasco J. A., Chamber M., Palomares A., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Velázquez E. (2007) *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:784-788.
- Zinder S. H., Dworkin M. (2006) Morphological and physiological diversity. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp.185-220.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom:

Márialigeti Károly tanár úrnak, aki fantáziát látott a munkámban, és kezdetektől fogva hitt abban, hogy ezzel a témával érdemes foglalkozni;

Borsodi Andreának, témavezetőmnek, aki igen lelkiismeretesen, nagy odafigyeléssel, baráti hangnemben, de maximális szakmai elvárásokkal terelgetett mindig a megfelelő irányba;

Palatinszky Mártonnak, barátomnak, aki mindvégig mellettem állt és dolgozott, így elért eredményeim az övéi is egyben;

Mádl-Szőnyi Judit tanárnőnek, a geológiai, hidrogeológiai helyreigazításokért;

Makk Juditnak, a nagyszerű elektronmikroszkópos fotókéért;

az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék hallgatóinak és dolgozóinak, akik készséges segítségére mindig számíthattam;

a Harkányi Gyógyfürdő Zrt.-nek, a mintavételezésben nyújtott segítségért és a háttér adatok közléséért;

a Baranya Megyei Kormányhivatal Népegészségügyi Szakigazgatási Szerv munkatársainak, hogy helyet és eszközt biztosítottak a minta-előkészítésekhez;

Gál Nóra Editnek, a Magyar Állami Földtani Intézet munkatársának szakmai segítségnyújtásért;

Dezső Józsefnek, aki kedvet adott ehhez a kutatáshoz;

de elsősorban Családom tagjainak végtelen türelmükért.

13. Függelék

1. táblázat Felszín alatti termál víztestek listája
(Forrás: EU VKI, 2007.)

Víztest neve	Víztest területe (km ²)
Észak-dunántúli-termálkarszt	556
Budapest környéki termálkarszt	1712,4
Visegrád-Veresegyháza-termálkarszt	1241
Nógrádi termálkarszt	1468,4
Szabadbattyányi termálkarszt	677
Közép-dunántúli-termálkarszt	4634,3
Mecseki termálkarszt	1595
Dél-Baranya, Bácska-termálkarszt	2073
Sárvári termálkarszt	132,9
Büki termálkarszt	96
Bükki termálkarszt	4286,4
Sárospataki termálkarszt	153,8
Recsk-Bükkszék-termálkarszt	291,6
Harkány és környezete-termálkarszt	515,9
Nyugat-dunántúli-termálkarszt	2885,3
Termálkarszt víztestek összterülete: 22319 km²	
Északnyugat-Dunántúl	7253,6
Nyugat-Alföld	10705,9
Dél-Alföld	7585,2
Észak-Alföld	9832,7
Délkelet-Alföld	8422
Északkelet-Alföld	8861,4
Északi-középhegység medencéi	2503,3
Délnyugat-Dunántúl	13602,2
Porózus termál felszínalatti víztestek összterülete: 68766,3 km²	

2. táblázat A Harkányi Gyógyfürdő vizsgált termelőkútjainak műszaki adatai
(Forrás: Harkányi Gyógyfürdő Zrt., 2008.)

	Büdöstapolca I-es kút	Büdöstapolca II-es kút	Matty-kút	Termál VI-os kút
Létesítés éve	1969	1969	1983	1969
Földrajzi koordináták	É: 45,862° K: 18,276°	É: 45,860° K: 18,279°	É: 45,823° K: 18,257°	É: 45,850° K: 18,237°
Talpmélység	80,0 m	80,0 m	91,0 m	52,0 m
Kifolyó víz hőfoka	18°C	23°C	25-26°C	60-62°C
Víztermelés módja	szivattyú	szivattyú	szivattyú	szabad kifolyás
Vizadó képződmény	50 – 80 m között szürkésbarna, repedezett, dolomitos mészkő (triász)	60 – 80 m között szürkésbarna, repedezett, üreges dolomitos mészkő (triász)	72 – 91 m között mikrokristályos, kalciterekkel, sűrűn átjárt, szürke mészkő (kréta)	47 – 52 m között szürkésbarna, repedezett, dolomitos mészkő (triász)
Termelt víz minősítése	gyógyvíz	gyógyvíz	ásványvíz	gyógyvíz

3. táblázat A Harkányi Gyógyfürdő vizsgált termelőkútjainak fizikai-kémiai jellemzői
2007-2008-as átlagértékekkel
(Forrás: Harkányi Gyógyfürdő Zrt., 2008.)

Vizsgált komponens	Büdöstapolca I-es kút	Büdöstapolca II-es kút	Matty-kút	Termál VI-os kút
Vizhőmérséklet (°C)	18,3	23,2	26,4	61,8
S ²⁻ (mg l ⁻¹)	1,7	6,7	5,7	11,1
SO ₄ ²⁻ (mg l ⁻¹)	44	18	24	25
Oldott oxigén (mg l ⁻¹)	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Oldott metán (l m ⁻³)	N.A.	7,9	18,7	11
Na ⁺ (mg l ⁻¹)	27	47	165	190
Cl ⁻ (mg l ⁻¹)	15	16	40	108
Ca ²⁺ (mg l ⁻¹)	106	86	59	66
Mg ²⁺ (mg l ⁻¹)	33,4	38,4	27	13
Össz.keménység (CaO mg l ⁻¹)	222	199	145	111
Fajlagos vez.kép. (µS/cm)	736	753	980	1080
TOC (mg C l ⁻¹)	0,7	0,6	2,61	1,8
KOI (mg l ⁻¹)	0,92	1,03	2,9	3,6
Össz.oldott anyag (mg l ⁻¹)	515	510	615	725
pH	7,1	7,1	7,3	6,8
Fe ²⁺ (mg l ⁻¹)	0,05	0,22	0,02	0,32
K ⁺ (mg l ⁻¹)	3,5	6,5	6	15,5
HCO ₃ ⁻ (mg l ⁻¹)	485	512	636	532
NO ₂ ⁻ (mg l ⁻¹)	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
NO ₃ ⁻ (mg l ⁻¹)	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
Vízkor (év)	560	4900	26500	32000

4. táblázat A BTK üledékmintából származó klónok ARDRA-csoportosításának, valamint a reprezentáns klónok parciális 16S rDNS szekvencia analizésén alapuló identifikációjának eredményei

Filogenetikai csoport	Klónok száma	Legközelebbi rokon taxon	Reprezentatív klón	Szekvencia hasonlóság
Gammaproteobacteria	2	<i>Thiothrix caldifontis</i> (EU642573)	BTK62 (FN662816)	97% (335/343)
	4	<i>Thiothrix caldifontis</i> (EU642573)	BTK80 (FN662817)	99% (347/348)
	2	<i>Thiothrix unzii</i> (L79961)	BTK43 (FN662815)	99% (373/375)
	4	<i>Thiovirga sulfuroxydans</i> (AB118236)	BTK29 (FN662814)	97% (376/386)
Betaproteobacteria	2	Környezeti klón (DQ211450)	BTK19 (FN662812)	95% (413/438)
Deltaproteobacteria	11	<i>Desulfocapsa</i> sp. Cad626 (AJ511275)	BTK28 (FN662813)	97% (451/468)
	14	<i>Desulfocapsa</i> sp. Cad626 (AJ511275)	BTK15 (FN662811)	96% (342/357)
	3	<i>Desulfocapsa thiozymogenes</i> (X95181)	BTK83 (FN662818)	97% (366/377)
	4	<i>Geobacter thiogenes</i> (AF223382)	BTK123 (FN662819)	97% (447/459)
Epsilonproteobacteria	5	Környezeti klón (AB247852)	BTK2 (FN662809)	89% (362/411)
	25	Környezeti klón (DQ295657)	BTK14 (FN662810)	99% (403/405)
Összesen: 76				

5. táblázat A BT1 üledékmintából származó klónok ARDRA-csoportosításának, valamint a reprezentáns klónok parciális 16S rDNS szekvencia analízisének alapuló identifikációjának eredményei

Filogenetikai csoport	Klónok száma	Legközelebbi rokon taxon	Reprezentatív klón	Szekvencia hasonlóság
Acidobacteria	1	<i>Geothrix fermentans</i> (U41563)	BT1-16 (FN662780)	97% (551/563)
Betaproteobacteria	2	Környezeti klón (FJ484957)	BT1-3 (FN662767)	97% (574/596)
	1	Környezeti klón (DQ676309)	BT1-10 (FN662774)	97% (515/529)
	2	Környezeti klón (DQ676309)	BT1-2 (FN662766)	99% (559/562)
	1	Környezeti klón (AY510251)	BT1-14 (FN662778)	96% (556/578)
	1	Környezeti klón (DQ110079)	BT1-5 (FN662769)	95% (468/490)
	1	<i>Limnobacter thiooxidans</i> (AJ289885)	BT1-7 (FN662771)	98% (570/576)
	Gammaproteobacteria	1	Tenyésztésbe nem vont Xanthomonadaceae baktérium klón (U640389)	BT1-9 (FN662773)
Alphaproteobacteria	1	<i>Rhodobacter vinaykumarii</i> (AM408117)	BT1-4 (FN662768)	97% (526/538)
Epsilonproteobacteria	4	Környezeti klón (DQ676341)	BT1-11 (FN662775)	97% (541/553)
	11	Környezeti klón (DQ676341)	BT1-6 (FN662770)	97% (574/586)
	13	Környezeti klón (DQ676341)	BT1-1 (FN662765)	98% (553/564)
	1	Környezeti klón (DQ676341)	BT1-12 (FN662776)	98% (576/586)
	1	Környezeti klón (DQ676341)	BT1-8 (FN662772)	96% (538/555)
	2	Környezeti klón (DQ676341)	BT1-13 (FN662777)	94% (491/517)
	3	<i>Sulfuricurvum kujiense</i> (AB080645)	BT1-15 (FN662779)	99% (425/427)
		Összesen: 46		

6. táblázat A BT2 üledékmintából származó klónok ARDRA-csoportosításának, valamint a reprezentáns klónok parciális 16S rDNS szekvencia analízisének alapuló identifikációjának eredményei

Filogenetikai csoport	Klónok száma	Legközelebbi rokon taxon	Reprezentatív klón	Szekvencia hasonlóság
Gammaproteobacteria	2	Környezeti klón (AY510233)	BT2-4 (FN662784)	98% (290/293)
Betaproteobacteria	2	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (AB552842)	BT2-5 (FN662785)	97% (415/426)
Deltaproteobacteria	1	<i>Desulfocapsa</i> sp. Cad626 (AJ511275)	BT2-7 (FN662786)	96% (444/461)
	1	<i>Desulfocapsa</i> sp. Cad626 (AJ511275)	BT2-12 (FN662791)	98% (457/463)
	1	<i>Desulfocapsa</i> sp. Cad626 (AJ511275)	BT2-1 (FN662781)	99% (466/467)
	1	Környezeti klón (AJ389622)	BT2-2 (FN662782)	99% (450/452)
	1	Tenyésztésbe nem vont <i>Desulfopila</i> sp. klón (FN666230)	BT2-11 (FN662790)	96% (426/433)
Epsilonproteobacteria	1	Környezeti klón (DQ295688)	BT2-9 (FN662788)	99% (406/407)
	1	Környezeti klón (DQ295657)	BT2-8 (FN662787)	99% (410/412)
	1	Környezeti klón (DQ295550)	BT2-10 (FN662789)	99% (409/413)
	1	Környezeti klón (DQ676341)	BT2-13 (FN662792)	95% (402/420)
Chloroflexi	1	Tenyésztésbe nem vont Chloroflexi baktérium klón (DQ829574)	BT2-3 (FN662783)	96% (393/406)
	Összesen: 14			

7. táblázat A mattyi üledékmintából származó klónok ARDRA-csoportosításának, valamint a reprezentáns klónok parciális 16S rDNS szekvencia analízisén alapuló identifikációjának eredményei

Filogenetikai csoport	Klónok száma	Legközelebbi rokon taxon	Reprezentatív klón	Szekvencia hasonlóság
Gammaproteobacteria	1	<i>Thiothrix caldifontis</i> (EU642573)	M15 (FN662807)	99% (353/354)
	1	<i>Lysobacter brunescens</i> (AB161360)	M3 (FN662795)	98% (429/441)
	3	<i>Lysobacter brunescens</i> (AB161360)	M8 (FN662800)	98% (435/448)
	1	<i>Lysobacter brunescens</i> (AB161360)	M6 (FN662798)	98% (434/446)
	1	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> (AF273082)	M7 (FN662799)	99% (436/439)
Betaproteobacteria	1	<i>Acidovorax defluvii</i> (Y18616)	M12 (FN662804)	100% (447/447)
	1	<i>Thiobacillus thioparus</i> (HM535225)	M13 (FN662805)	99% (428/436)
Alphaproteobacteria	1	<i>Sphingopyxis</i> sp. (AM989069)	M2 (FN662794)	99% (377/380)
	1	<i>Sphingopyxis chilensis</i> (AF367204)	M16 (FN662808)	99% (359/362)
	1	Tenyésztésbe nem vont Caulobacteraceae baktérium klón (AJ227767)	M1 (FN662793)	99% (368/372)
	1	Környezeti klón (CU918195)	M5 (FN662797)	100% (375/375)
	1	Környezeti klón (CU918195)	M14 (FN662806)	100% (375/375)
Sphingobacteria	1	Tenyésztésbe nem vont <i>Sphingobacterium</i> sp. klón (EU361310)	M9 (FN662801)	96% (378/395)
	1	Tenyésztésbe nem vont <i>Terrimonas</i> baktérium klón (JN412446)	M4 (FN662796)	99% (433/437)
Epsilonproteobacteria	1	Tenyésztésbe nem vont <i>Sulfurovum</i> sp. klón (EF613474)	M10 (FN662802)	98% (399/405)
Baktérium klón	1	Környezeti klón (EF020094)	M11 (FN662803)	97% (393/402)
Összesen: 18				

8. táblázat A T6 üledékmintából származó klónok ARDRA-csoportosításának, valamint a reprezentáns klónok parciális 16S rDNS szekvencia analízisének alapuló identifikációjának eredményei

Filogenetikai csoport	Klónok száma	Legközelebbi rokon taxon	Reprezentatív klón	Szekvencia hasonlóság
Betaproteobacteria	2	Környezeti klón (FJ485226)	T8 (FN662825)	94% (378/406)
	1	Környezeti klón (FJ485226)	T14 (FN662830)	95% (314/334)
	2	Környezeti klón (FJ485226)	T4 (FN662823)	96% (274/288)
	1	Környezeti klón (FJ485226)	T16 (FN662832)	96% (402/421)
	1	Környezeti klón (FJ485226)	T15 (FN662831)	96% (404/422)
	1	Környezeti klón (FJ485226)	T19 (FN662833)	96% (407/425)
	23	Környezeti klón (FJ485226)	T1 (FN662820)	96% (399/418)
	3	Környezeti klón (FJ485226)	T3 (FN662822)	96% (393/411)
Alphaproteobacteria	1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> (EF583689)	T21 (FN662835)	99% (400/403)
Firmicutes	1	Tenyésztésbe nem vont Firmicutes baktérium klón (EF205538)	T11 (FN662828)	100% (433/433)
Deferribacteres	1	Tenyésztésbe nem vont Deferribacteriaceae baktérium klón (GU129049)	T20 (FN662834)	97% (240/248)
	1	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i> (AB364234)	T12 (FN662829)	99% (456/458)
Deltaproteobacteria	1	Tenyésztésbe nem vont Syntrophobacterales baktérium klón (GQ242623)	T17 (GU585906)	93% (366/392)
	4	Környezeti klón (AB247834)	T2 (FN662821)	85% (300/357)
Chlorobi	2	Környezeti klón (AF445702)	T7 (FN662824)	98% (405/411)
	1	Környezeti klón (AF445702)	T9 (FN662826)	98% (429/435)
	1	Környezeti klón (AF445702)	T10 (FN662827)	98% (405/411)
Aquificae	1	<i>Sulfurihydrogenibium subterraneum</i> (AB071324)	T23 (FN662836)	98% (428/436)
	Összesen: 48			

9. táblázat A DGGE gélből kivágott band-ek parciális 16S rDNS szekvencia analizésén alapuló identifikációjának eredményei és előfordulásuk az egyes mintákban

Filogenetikai csoport	Legközelebbi rokon taxon	Band-szekvencia	Szekvencia hasonlóság
Actinobacteria	Actinobacterium klón (JF018541)	H15 (FR851864)	94% (200/211)
	<i>Plantibacter</i> sp. (FM875878)	H9 (FR851875)	97% (319/324)
	<i>Microbacterium</i> sp. (AB376083)	H27 (FR851876)	96% (334/346)
Firmicutes	<i>Planococcus</i> sp. (GU441768)	H3A (FR851865)	95% (210/220)
Alphaproteobacteria	Környezeti klón (JF126191)	H4B (FR851867)	92% (228/247)
	Tenyésztésbe nem vont <i>Sphingobium</i> sp. klón (FJ192130)	H10 (FR851872)	94% (270/287)
	<i>Sphingobium</i> sp. (AY689029)	H11 (FR851868)	91% (243/267)
	Tenyésztésbe nem vont metanotróf baktérium klón (AY599191)	H30 (FR851873)	92% (275/297)
Gammaproteobacteria	Tenyésztésbe nem vont <i>Thiothrix</i> sp. klón (DQ125325)	H6A (FR851870)	95% (263/278)
Betaproteobacteria	<i>Ralstonia</i> sp. (GU429496)	H2A (FR851871)	97% (269/277)
	Tenyésztésbe nem vont <i>Thiobacillus</i> sp. klón (AM167943)	H18A (FR851863)	90% (190/210)
	Tenyésztésbe nem vont <i>Thiobacillus</i> sp. klón (AM167943)	H28 (FR851869)	91% (245/267)
Epsilonproteobacteria	Tenyésztésbe nem vont epsilonproteobaktérium klón (DQ295647)	H12B (FR851866)	85% (191/224)