

A balatoni busák béltartalmában és a tóvízben előforduló baktériumközösségek mennyiségi viszonyainak és szerkezetének összehasonlítása

Borsodi Andrea¹, Krett Gergely¹, László Kristóf¹, Jáger Katalin¹, Mozsár Attila², Vitál Zoltán²,
Specziár András², Boros Gergely²

¹ELTE Mikrobiológiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C

²MTA ÖK Balatoni Limnológiai Intézet, 8237 Tihany, Klebelsberg Kuno utca 3

Kivonat: A Balatonban élő busák táplálkozási szokásainak megismerésére irányuló kutatások keretében 2011-ben kezdődtek bakteriológiai vizsgálatok az állatok béltartalmában található baktériumközösségek feltérképezésére. E vizsgálatok folytatásaként 2013-ban tavasztól őszi 5 alkalommal történt mintavétel hibrid jellegű busa egyedek elő- és utóbéléből, valamint a Balaton vizéből. A mintákból tenyésztésen alapuló módszerrel csíraszám becslést végeztünk. A baktériumközösségek genomi szerkezetét a 16S rRNS génszakaszok denaturáló gradiens gélelektroforézissel (DGGE) nyert sávmintázatainak elemzésével hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján a vízmintákból tenyésztéssel meghatározott átlagos baktérium csíraszám értékek közel egy nagyságrenddel kisebbek voltak, mint a busa bélszakaszokból detektált értékek. A DGGE mintázatok alapján valamennyi mintavételi időpontban a vízminták baktériumközösségei mutatták egymással a legnagyobb hasonlóságot, és minden esetben elkülönültek a busa béltartalom minták baktériumközösségeitől. Az egyes busa egyedek előbél és utóbél szakaszából származó minták baktériumközösségei egymástól többnyire szintén jól elkülönülő csoportokat képeztek. A busa egyedek neme vagy testmérete és a tápcsatorna szakaszok baktériumközösségeinek szerkezete között nem találtunk összefüggést.

Kulcsszavak: busa, bélmikrobióta, diverzitás, DGGE.

Bevezetés

A Balatonban élő hibrid (fehér busa – *Hypophthalmichthys molitrix* x pettyes busa - *H. nobilis*) dominanciájú busaállomány táplálékbázisát elsősorban zooplankton és detritusz képezi. A balatoni busák táplálkozási szokásaira jellemző, hogy nagy mennyiségű szervesanyagot fogyasztanak, melynek száraz tömegre vonatkoztatott részaránya esetenként a béltartalom 80 %-át is elérheti (Vitál és mtsai, 2014). A busák táplálkozásában emellett az egyes bélszakaszokban előforduló fajgazdag és változatos anyagcsere tulajdonságokkal rendelkező baktériumközösségeknek is jelentős szerepe lehet, amire a 2011-ben tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független mikrobiológiai módszerekkel végzett kutatási eredmények is rámutattak (László és mtsai, 2014).

Jelen összehasonlító vizsgálatunk célja az volt, hogy tavasztól őszi nyomon kövessük a balatoni busák elő- és utóbél szakaszaira, valamint a tóvízre jellemző baktériumközösségek mennyiségi viszonyainak és genetikai sokféleségének alakulását.

Vizsgálati anyagok és módszerek

A bakteriológiai vizsgálatokhoz a Balatonból 2013 áprilisában (1304), májusában (1305), júniusában (1306), szeptemberében (1309) és októberében (1310) méretszelektív kopoltyúháló fogásból véletlenszerűen gyűjtött busa egyedekből steril körülmények között preparált elő- és utóbél tartalmat, valamint az egyidejűleg merítéssel vett tóvíz mintát használtuk fel.

A vizsgálatba vont összesen 34 hibrid jellegű busa egyed testhossza 91 és 119 cm, testtömege 11,2 és 25,1 kg, életkora 8 és 13 év között változott.

A tenyésztésen alapuló csíraszám becsléshez a béltartalom és a vízminták felhasználásával készített tízes léptékű hígítási sorozatokból nutrient (DSM-1) és R2A (DSM-830) táptalajokra (www.dsmz.de) szélesztettünk, majd a kifejlődött telepeket a 22°C-on végzett két hetes inkubációt követően számoltuk meg.

A baktériumközösségek genetikai diverzitásának összehasonlításához egy tenyésztéstől független, molekuláris biológiai ujjlenyomat módszert, a Denaturáló Gradiens Gél Elektroforézist (DGGE) alkalmaztuk (Muyzer és Smalla, 1998). A kb. 500 mg-nyi béltartalomból és a szűréssel tömörített vízmintákból izolált teljes genomi DNS-ből először Bacteria specifikus primer pár (27F és

1401R) segítségével a 16S riboszomális RNS-t kódoló gén egy nagyobb szakaszát szaporítottuk fel. Az így kapott DNS szakaszokból egy következő PCR reakció során 27F-GC és 519R, illetve a ciano-baktériumok esetében CYA359F-GC és CYA781R primer pár felhasználásával hoztuk létre a DGGE futtatáshoz használt GC-kapocsal rendelkező, kb. 400-500 bázispár hosszúságú terméket. Az elektroforetikus futtatásokhoz 40–60 % közötti denaturáló koncentrációjú ureát és formamidot tartalmazó 7 %-os, illetve a cianobaktériumok esetében 8 %-os poliakrilamid gélt használtunk. A minták futtatása INGENY phor U készülékben 1%-os TAE pufferben 60°C-on, 120 V feszültség értéken 14–15 órán át tartott. A kialakult sávmintázatot etidium-bromidos festéssel, UV gerjesztéssel tettük láthatóvá, majd TotalLab (TL 120) v2006 szoftverrel értékeltük ki. A gélből kivágott, tisztított DNS-t a Sanger-féle módszer automatizált változatával szekvenáltuk, majd a kapott bázissorrendeket az NCBI GenBank internetes adatbázis segítségével értékeltük ki.

Eredmények és értékelésük

Az egyes állatok előbél és utóbél szakaszainak csíraszám értékei a 2011-ben meghatározott átlagos csíraszám értékekhez (László és mtsai, 2014) hasonlók voltak.

A busa előbél és utóbél szakaszokból 2013-ban tenyésztéssel közel két nagyságrendnyi átlagos baktérium csíraszám érték (TKE, telepkepző egység) különbséget detektáltunk (1. táblázat). A becslött csíraszám értékek maximumát ($2,60 \times 10^8$ TKE g^{-1}) az áprilisi előbél mintákból nutrient táptalajon, míg a minimumát ($4,07 \times 10^6$ TKE/g) a májusi utóbél mintákból R2A táptalajon határoztuk meg. A tenyésztéses vizsgálati időpontokban (áprilisban, májusban és szeptemberben) az előbélből átlagosan $2,73 \times 10^8$, $1,48 \times 10^8$ és $7,13 \times 10^6$, míg az utóbélből átlagosan $5,04 \times 10^7$, $1,15 \times 10^7$ és $1,50 \times 10^7$ TKE g^{-1} csíraszám értéket számoltunk. Ennek alapján a busa előbél szakaszokban az átlagos baktérium csíraszám értékek között nagyobb időbeni eltérések mutatkoztak, mint az utóbél szakaszokban.

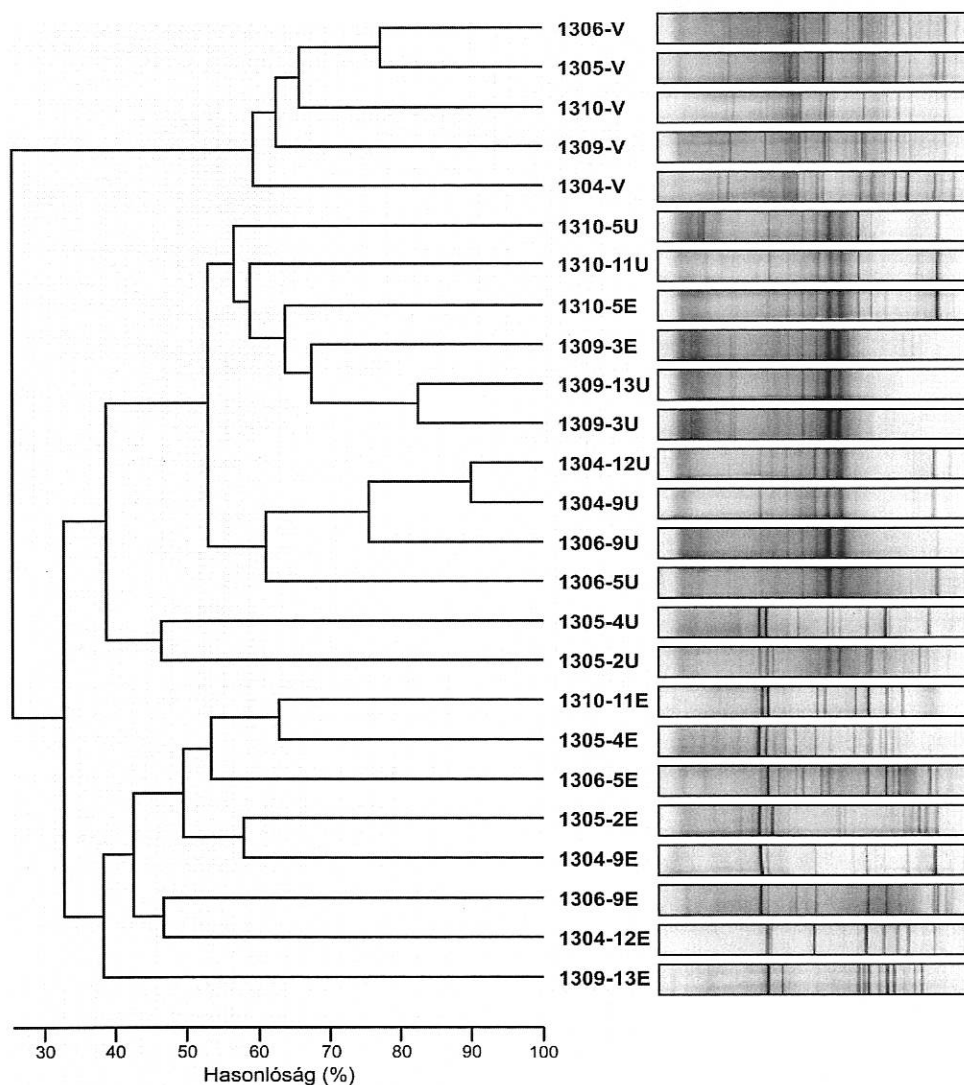
A vízmintákból tenyésztéssel meghatározott átlagos baktérium csíraszám értékek csaknem minden esetben közel egy nagyságrenddel kisebbek voltak, mint a busa bélszakaszokból detektált értékek (1. táblázat). A víz-

mintákból a nutrient táptalajon átlagosan $6,26 \times 10^6$, az R2A táptalajon $1,00 \times 10^6$ TKE ml⁻¹ csíraszám értéket határoztunk meg. Az egyes időpontokban becsült átlagos csíraszám értékek $2,24 \times 10^6$, $7,22 \times 10^6$ és $1,43 \times 10^6$ TKE ml⁻¹ voltak, vagyis a vízminták csíraszám értékei között sem a táptalajok, sem a vizsgálati időpontok szerint nem voltak jelentős különbségek.

A vizsgálatba vont busák közül valamennyi mintavételi időpontban véletlenszerűen választott 2-2 egyed elő- és utóbél tartalom mintáiból, valamint az 5 vízmintából származó bakteriális 16S rRNS génszakaszok DGGE vizsgálata során nyert sávmintázatok összehasonlító elemzésének eredménye az **1. ábrán** látható.

Minta típusa	N	R	Mértékegység
1304/ E	$2,60 \times 10^8$	$2,86 \times 10^8$	TKE g ⁻¹
1304/ U	$6,75 \times 10^7$	$3,33 \times 10^7$	TKE g ⁻¹
1304/ V	$2,14 \times 10^6$	$2,35 \times 10^6$	TKE ml ⁻¹
1305/ E	$2,17 \times 10^7$	$2,75 \times 10^7$	TKE g ⁻¹
1305/ U	$1,90 \times 10^7$	$4,07 \times 10^6$	TKE g ⁻¹
1305/ V	$1,43 \times 10^7$	$1,45 \times 10^5$	TKE ml ⁻¹
1309/ E	$4,43 \times 10^6$	$9,83 \times 10^6$	TKE g ⁻¹
1309/ U	$1,98 \times 10^7$	$1,02 \times 10^7$	TKE g ⁻¹
1309/ V	$2,35 \times 10^6$	$5,15 \times 10^5$	TKE ml ⁻¹

1. táblázat A balatoni busák elő- (E) és utóbél (U) tartalom, valamint a tóvíz (V) átlagos telepképző egység (TKE) értékei Nutrient (N) és R2A (R) táptalajon



1. ábra. A különböző mintavételi időpontokból származó balatoni busa egyedek elő- (E) és utóbél (U) tartalmára, valamint a tóvíz mintákra (V) jellemző bakteriális közösségek DGGE sávmintázata alapján szerkesztett UPGMA hasonlósági dendrogram

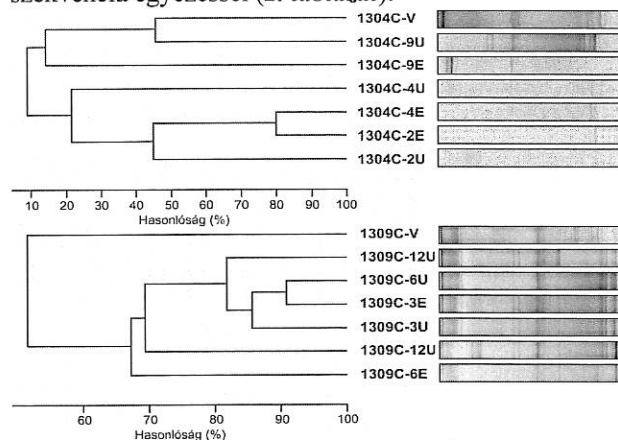
Az egyes mintáknak megfelelő gélcsíkokban lévő csíkok száma és elhelyezkedése alapján a vízmintákban előforduló bakteriális közösségek külön csoportot képeztek és minden mintavételi időpontban egyértelműen elkülönültek a busa béltartalom minták bakteriális közösségeitől (**1. ábra**). Ez utóbbiak néhány minta (pl. 1309-3 E; 1310-5E) kivételével a busa egyedek eltérő tápcsator-

na szakaszai szerint további két (előbél és utóbél) csoportra váltak szét. A DGGE vizsgálatok alapján a busa béltartalom minták teljes bakteriális közösségére jellemző domináns taxonok (legerősebben festődő csíkok) előfordulásában időbeni eltéréseket elsősorban az utóbél minták esetében lehetett megfigyelni.

Az áprilisi (1304) és a szeptemberi (1309) mintákkal cianobaktérium specifikus primerek felhasználásával végzett DGGE vizsgálatok eredményei alapján a busa egyedek tápcsatorna szakaszai közötti különbségek egyik időpontban sem voltak jellemzőek (2. ábra). A vízmintának a busa béltartalom minták cianobaktérium közösségeitől való egyértelmű elkülönülését csak a szeptemberi minta esetében lehetett megfigyelni. A busa egyedek neve vagy testmérete és a tápcsatorna szakaszok baktériumközösségeinek szerkezete között egyik DGGE vizsgálat során sem találtunk összefüggést.

A DGGE módszer előnye, hogy a gélsávokban lévő különálló csíkokból kivágott és visszanyert DNS szakaszok bázissorrendjének elemzésével a mintákban jelenlévő domináns szervezetekről taxonómiai információ nyerhető. A busa egyedek tápcsatornájából így módon 5 filogenetikai törzs (Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria) 14 baktériumfajának, míg a vízmintákból a Proteobacteria és az Actinobacteria törzsek két eddig tenyésztésbe még nem vont, ún. „Candidatus” fájának képviselőit azonosítottuk 97-100 %-os szekvencia egyezéssel (2. táblázat).

didatus” fájának képviselőit azonosítottuk 97-100 %-os szekvencia egyezéssel (2. táblázat).



2. ábra. Az áprilisi és a szeptemberi busa béltartalom és balatoni vízminták cianobaktérium közösségeinek DGGE sávmin-tázata alapján szerkesztett UPGMA dendrogram

Filogenetikai törzs/osztály	Legközelebbi rokon baktériumfaj (BLAST)	Mintavételi időpont	Minta típus
Cyanobacteria	<i>Microcoleus</i> sp. (JQ687332)	1304	U
	<i>Microcystis aeruginosa</i> (KJ746519)	1304; 1309	E; U
	<i>Synechococcus</i> sp. (FJ763782)	1304; 1309	E; U
Alphaproteobacteria	<i>Candidatus Pelagibacter</i> sp. (JN941972)	1304; 1305	V
	<i>Phenylobacterium falsum</i> (NR 042277)	1306	E
Betaproteobacteria	<i>Herbaspirillum huttiense</i> (AB681762)	1304; 1305; 1306; 1309; 1310	E
	<i>Pelomonas aquatica</i> (JQ659664)	1304; 1305; 1306	E
	<i>Burkholderia cepacia</i> (JN800445)	1304	E
Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas sobria</i> (JX501708)	1304; 1305; 1306	E; U
	<i>Aeromonas veronii</i> (KC210784)	1304; 1305	E; U
	<i>Shewanella putrefaciens</i> (KC607503)	1310	U
Firmicutes	<i>Clostridium gasigenes</i> (AF143692)	1304	U
	<i>Clostridium bartlettii</i> (NR 027573)	1306	U
Actinobacteria	<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> (FJ428831)	1304; 1305; 1306; 1309; 1310	V
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i> sp. (JQ317227)	1310	U
Fusobacteria	<i>Cetobacterium somerae</i> (AB353124)	1304	U

2. táblázat A busa elő- (E) és utóbél (U) tartalom mintákból és a vízmintákból (V) származó DGGE csíkok taxonómiai meghatározásának eredménye a 16S rRNS gén vizsgálata alapján

A fakultatív anaerob anyagcserével jellemezhető *Aeromonas* nemzetség két fájának (*A. sobria*, *A. veronii*) a képviselői a busa egyedek mindkét tápcsatorna szakaszában és szinte minden tavaszi mintavételi időpontban jellemzők voltak. Az *Aeromonas* nemzetség fajtái széles körben elterjedtek édesvizekben (Langó és mtsai, 2002), jelenlétüket különböző meleg- és hidegvérű vízi állatokból (pl. halakból) is leírták, ahol esetenként súlyos megbetegedéseket is előidézhetnek (Sugita és mtsai, 1995). Az *Aeromonas* nemzetség képviselőinek a busa tápcsatornában való előfordulását a 2011-es tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független DGGE vizsgálatok során is igazoltuk (László és mtsai, 2014).

A *Herbaspirillum huttiense* (Dobritsa és mtsai, 2010) baktériumfajt a busa egyedek előbél szakaszában valamennyi mintavételi időpontban előforduló, domináns szervezetként határoztuk meg (2. táblázat). Ennek az elsősorban növény asszociált és nitrogén-fixációra képes aerob respiratórikus anyagcserét folytató szervezetnek a halakban való előfordulásáról ez idáig még nincsenek adatok. A busa egyedek előbél mintáiból további két a Proteobacteria törzsbe tartozó baktériumfaj, a *Pelomonas*

aquatica (Gomila és mtsai, 2007) és a *Burkholderia cepacia* jelenlétét igazoltuk. A *Pelomonas* nemzetségbe tartozó baktériumok jelenlétét DGGE módszerrel járványos héjbetegségben szenvedő amerikai homár (*Homarus americanus*) hemolimfájából is kimutatták már (Quinn és mtsai, 2013). A *Burkholderia cepacia* baktériumfaj domináns előfordulását korábban pl. a nilusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) utóbél szakaszából írták le (Molinari és mtsai, 2003).

A busa utóbél mintákból nem tudunk azonosítani valamennyi mintavételi időpontra jellemző domináns baktérium taxont, de a 2011-es vizsgálati eredményekkel megegyezően (László és mtsai, 2014) egyes 2013-as mintavételi időpontokban is jellemző szervezetként határoztuk meg a fakultatív anaerob anyagcserére képes *Shewanella* és a mikroaerotoleráns *Cetobacterium* nemzetségek képviselőit. A busa egyedek utóbél szakaszából is kimutatott Firmicutes, Bacteroidetes és Fusobacterium törzsekbe tartozó és szigorúan anaerob anyagcserét folytató (pl. *Clostridium* és *Bacteroides*) baktériumfajoknak különböző édesvízi halak tápcsatornájában való általános előfordulásáról már korábban is beszámoltak (*Fidopias-*

tis és mtsai, 2006; Geovanny és Balcázar, 2008; Karibi és mtsai, 2013; Silva és mtsai, 2005; Tsuchiya és mtsai, 2008).

A Cyanobacteria specifikus primerekkel végzett DGGE vizsgálatok során az áprilisi és az októberi busa bél-tartalom mintákból is a Chroococcales rend *Synechococcus* és *Microcystis* nemzetségeinek képviselőit azonosítottuk 99-100 %-os szekvencia egyezéssel. A *M. aeruginosa* fajként azonosított DNS csíkok mindkét mintavételi időpontban minden busa egyed előbél és utóbél szakaszában domináns előfordulásának bizonyultak. E faj microcistin termelésének változását egyes halfajok, pl. a *Hypophthalmichthys molitrix* esetében már vizsgálták (Jang és mtsai, 2004). A tavaszi mintákból ezeken kívül még az Oscillatoriales rend *Microcoleus* nemzetségének domináns előfordulását is kimutattuk.

A valamennyi mintavétel alkalmával, de kizárólag a tóvízből domináns előfordulásuként azonosított „Candidatus” *Planktophila limnetica* fajt az édesvízi bakterioplankton egyik leggyakoribb aktinobaktérium taxonjait tartalmazó számon (Jezbera és mtsai, 2009).

Összefoglalás

A balatoni busák tápcsatornájának baktériumközösségei valamennyi mintavételi időpontban mind mennyiségi viszonyaikban, mind összetételükben különböztek a tóvíz baktériumközösségeitől. A busák elő- és utóbél szakaszainak baktériumközössége jelenősen különbözött egymástól, bár egyes cianobaktériumok és a fakultatív anaerob anyagcserét folytató *Aeromonas* fajok jelenléte mindkét tápcsatorna szakaszra jellemző volt. Az előbél szakaszokból főként aerob, míg utóbél szakaszokból anaerob kemoorganotróf anyagcseréjű baktériumfajok domináns előfordulását mutattuk ki.

Köszönetnyilvánítás

Kutatásunkat az OTKA K83893 pályázat támogatásával végeztük.

Irodalom

Dobritsa, A.P., Reddy, M.C.S., Samadpour, M. (2010) Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. international Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60, 1418–1426.

Fidopiastis, P.M., Bezdek, D.J., Horn, M.H., Kandel, J.S. (2006) Characterizing the resident, fermentative microbial consortium in the hindgut of the temperate-zone herbivorous fish, *Hermosilla azurea* (Teleostei: Kyphosidae). Marine Biology 148, 631–642.

Geovanny, D.G., Balcázar, J.L. (2008) A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Immunology and Medical Microbiology 52, 145–154.

Gomila, M., Bowien, B., Falsen, E., Moore, E.R.B., Lalucat, J. (2007) Description of *Pelomonas aquatica* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and haemodialysis water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57, 2629–2635.

Jang, M.H., Ha, K., Luca, M.C., Joo, G.J., Takamura, N. (2004) Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. Aquatic Toxicology 68, 51–59.

Jezbera, J., Sharma, A.K., Brandt, U., Doolittle, W.F., Hahn, M.W. (2009) 'Candidatus *Planktophila limnetica*', an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59, 2864–2869.

Karibi, L., Alum, A., Rock, C., McLain, J.E., Abbaszadegan, M. (2013) Isolation of Bacteroides from fish and human fecal samples for identification of unique molecular markers. Canadian Journal of Microbiology 59, 771–777.

Langó, Zs., Borsodi, A.K., Micsinai, A. (2002) Comparative studies on *Aeromonas* strains isolated from lakes Balaton (Hungary) and Fertő/Neusiedlersee (Hungary). Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 49, 37–45.

László, K., Jáger, K., Krett, G., Boros, G., Specziár, A., Borsodi, A. (2014) Adatok a Balatonban élő busa fajok bél-tartalmának baktériumközösségeiről. Hidrológiai Közlemény (in press)

Molinari, L.M., de Oliveira Scoaris, D., Bocchi Pedroso, R., de Lucas Rodrigues Bittencourt, N., Nakamura, C.V., Ueda-Nakamura, T., de Abreu Filho, B.A., Prado Dias Filho, B. (2003) Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. Acta Scientiarum. Biological Sciences 25, 267–271.

Muyzer, G., Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek. 73, 127–141.

Quinn, R.A., Smolowitz, R., Chistoserdov, A.Y. (2013) Culture-independent analysis of bacterial communities in hemolymph of American lobsters with epizootic shell disease. Diseases of Aquatic Organisms 103, 141–148.

Silva, F.C.P., Brito, M.F.G., Farias, L.M., Nicoli, J.R. (2005) Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. Journal of Fish Biology 67, 1686–1698.

Sugita, H., Tanaka, K., Yoshinami, M., Deguchi, Y. (1995) Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. Applied and Environmental Microbiology 61, 4128–4130.

Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugita, H. (2008) Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. Letters in Applied Microbiology 46, 43–48.

Vitál, Z., Mozsár, A., Józsa, V., Borsodi, A., Jáger, K., László, K., Specziár, A. (2014) A hibrid dominanciájú busa állomány táplálkozása, növekedése és szaporodása a Balatonban. Hidrológiai Közlemény 94, .

Comparison of quantitative relationships and genetic structures of bacterial communities inhabiting the intestinal tracts of the Asian carps living in Lake Balaton and the lake water

A. Borsodi, G. Krett, Kristóf L., K. Jáger, G. Boros, A. Mozsár, Z. Vitál, A. Specziár

Abstract: Bacteriological examinations on the intestinal tracts of the Asian carps living in Lake Balaton began in 2011 within the framework of a research work aimed to explore the nutritional habits of these animals. As a continuation of these studies, from spring to autumn in 2013, samplings were done five times from the fore- and hindgut-sections of the intestinal contents of carps and the water of the lake. Plate count estimations were performed to determine the CFU numbers. The genomic structures of bacterial communities were compared according to the patterns of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) obtained from the analysis of the 16S rRNA gene. CFU values of the water samples were nearly an order of magnitude smaller than those detected from the carp intestine samples. Based on the DGGE patterns, the bacterial communities of the water samples showed the greatest similarity to each other in each sampling time and separated from the bacterial communities of the intestinal tracts. The bacterial communities of the foregut and hindgut sections usually also formed distinct groups. No correlations between the gender or body size of carp individuals and the structure of bacterial communities inhabiting the intestinal tracts was revealed.

Keywords: Asian carp, microbial community of the intestinal tract, diversity, DGGE