KARSZTFEJLŐDÉS XVI.
Szombathely, 2011. pp. 143-155

ÖSSZEHASONLÍTÓ DIVERZITÁS VIZSGÁLATOK A TAPOLCAI KARSZT TALAJAINAK BAKTÉRIUMKÖZÖSSÉGEIN

BÜKI GABRIELLA[1] – KNÁB MÓNIKA[1] – MÁRIALIGETI KÁROLY[1] – MÓGA JÁNOS[2] – BORSODI ANDREA[1]

[1]ELTE Mikrobiológiai Tanszék, [2]ELTE Természetföldrajzi Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, pipacs55@hotmail.com

Abstract: The Tapolca karst is one of the karstic areas of Hungary that are most sensitive to anthropogenic impact. The karst water that fills the cave system lying 10-15 m underneath the surface can easily be contaminated through infiltration. Microorganisms play an important role among the factors that determine the characteristics of soils. The goal of our research was therefore the comparative microbiological examination of soil samples taken from a native (T1) and acontaminated (T2) area of the Tapolca karst based on cultivation and non-cultivation methods. Samples collected in the autumn of 2010 were plated onto different media, and colonies showed different morphology were isolated. After isolating community DNA from the soil samples, clone libraries were created. The phylogenetic identification of the bacterial strains and molecular clones was based on the 16S rRNA gene sequence analysis. The PCR products derived from the strains and clones were grouped on the basis of their ARDRA patterns, and the dye-termination sequencing method was used for determining the sequences of the group representatives. The phylogenetic identity of the sequences was verified using the NCBI and the EzTaxon online databases. The bacterial strains were identified as species of the phyla Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria and Bacteroidetes. The distribution of the species within the phyla was very distinct between the sample sites. Results of the cultivation showed that the bacterial community of the contaminated area was more diverse. Most of the processed molecular clones were similar to clone sequences deriving from soil and rhizosphere samples. Examined by the cloning method, the communities proved to be more diverse in that twice as many high-level taxonomic groups (phyla or classes) were represented in the samples as observed after cultivation. Besides the taxons observed by cultivation, members of the phyla Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes and Verrucomicrobia, and the class δ-Proteobacteria were present in the samples

Bevezetés

Hazánk karsztos területei fontos nemzeti értéket képviselnek nemcsak egyedülálló táji jellemzőik, természeti kincseik, de tájgazdálkodási jelentőségük miatt is. A karsztos kőzetek kiváló víztározó és vízelvezető képességük révén jelentős felszín alatti vízbázisnak adnak otthont, így számos település vízbázisát szolgáltatják. Emellett fontos erdészeti és legelőterületek is. Ugyanakkor e területek nyitott hidrogeológiai rendszerük és háromdimenziós hatásfelületük révén fokozottan sérülékenyek. A karsztok sajátos ökoszisztémájában végbemenő folyamatok kutatása tehát több okból is kiemelkedően fontos feladat.

A karsztrendszerek fejlődésében, működésében különös jelentőséggel bír a felszínnel közvetlen kapcsolatban álló, komplex fizikai, kémiai és biológiai folyamatokkal jellemezhető epikarszt zóna, mivel a természetes és

antropogén hatások ezen keresztül, ráadásul a gyors beszivárgás miatt igen gyorsan érik el a karsztrendszert. Valamennyi talajtípus, így az epikarszt talajok tulajdonságait meghatározó tényezők között is fontos szerepet töltenek be az ott élő mikroorganizmusok. Enzimeik és anyagcseretermékeik révén meghatározó szerepet játszhatnak a talajban végbemenő folyamatok, az anyagforgalom, energiaáramlás katalizálásában, s ezek révén a karsztos kőzetek képződési- és oldódási folyamataiban.

A Gömör-Tornai-karszt talajait korábban több alkalommal vizsgálták, a talajmikrobák karsztkorróziós hatásának és a különböző talajtípusokban élő baktériumközösségek strukturális és funkcionális diverzitásának feltárása szempontjából (*KEVEI-ZÁMBÓ* 1986, *DARABOS* 1997, *ZÁMBÓ* 1998, *KNÁB et al.* 2010). A Tapolcai-karszt hazánk egyik antropogén hatásokra legérzékenyebb karsztos területe, azonban az ottani talajokban előforduló baktérium közösségek filogenetikai diverzitásának megismerésére eddig még nem folytak vizsgálatok.

Kutatásunk célja éppen ezért a Tapolcai-karszt egy zavarásmentes és egy fokozottan szennyezett területéről származó talajminta összehasonlító mikrobiológiai vizsgálata volt a talajban élő baktériumközösségek filogenetikai diverzitásának feltárása révén. A vizsgálatok során egymással párhuzamosan alkalmaztunk tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszereket, így alkalmunk nyílt a különböző módszerek hatékonyságának és érzékenységének összehasonlítására is.

Vizsgálati anyag és módszerek

Az összehasonlító mikrobiológiai vizsgálatok céljából 2010. 09. 30-án a Tapolcai-karszton kijelölt két mintavételi helyen fúrómag-mintavevővel (kb. 200-300 g) talajmintát gyűjtöttünk steril üvegekbe. A talajmintákat a 24 órán belül végzett laboratóriumi feldolgozásig 6-8˚C-on tároltuk.

A mintavételi helyek néhány fontosabb jellemzőjét az *I. táblázat*ban foglaltuk össze.

I. táblázat
Table I

Mintavételi helyek és a talajminták jelölései
Sampling sites and signs of soil samples

Mintavétel helye Tapolcai-karszt	Földrajzi koordináták		Minta jelzése	Talajszint	Talajtípus
	É szélesség	K hosszúság			
Alsó-Cser-tó melletti lapos tetőszint	+ 46°54'26.7710''	+ 17° 28'52.9156''	**T1**	0-15 cm	fekete rendzina
Zalahaláp környéki illegális szemétlerakó	+ 46°55'2.1195''	+ 17°28'49.5853''	**T2**	0-15 cm	barna rendzina

Kutatásunk szempontjából előnyös volt az őszi mintavételi időpont, mert a mérsékelt égövi talajokban a mikrobiális biomassza mennyisége évszakos fluktuációt mutat, és a csúcsértékek tavasszal, valamint ősszel figyelhetők meg (*DÍAZ-RAVIÑA et al.* 1994).

A tenyésztéshez a talajmintákból steril víz felhasználásával tízes léptékű hígítási sort készítettünk, majd ennek minden tagjából háromféle tápagar (nutrient, R2A, keményítő-kazein) lemez felszínére szélesztettünk. Tíznapos, 28°C-os inkubációt követően csíraszám becslést végeztünk. A kifejlődött különálló telepeket morfológiai diverzitásuk szerint a táplemezekkel azonos összetételű ferde agarra izoláltuk. A T1-es jelű mintából így 70, a T2-es mintából pedig 82 törzset különítettünk el.

A baktériumtörzsek genotípusos vizsgálata során a törzsek tiszta tenyészeteiből elsőként DNS-t izoláltunk steril üveggyöngyös fizikai feltárással. A telepekről származó biomasszát steril üveggyönggyel és steril HPLC minőségű desztillált vízzel elszuszpendáltunk, majd Mixer Mill MM301 típusú sejtmalommal tártuk fel a sejteket. Az elegyet centrifugálás után PCR készülékben 5 percig 99°C-on denaturáltuk. Vortexelés és újabb centrifugálás után a mintákat -22°C-on tároltuk. A templát DNS jelenlétét gélelektroforézissel ellenőriztük 1%-os agaróz gélben, 100V feszültség értéken, 20 perc futamidővel.

Az izolált DNS-ből a 16S rDNS régiót polimeráz láncreakció (PCR) segítségével szaporítottuk fel 27f és 1387r primereket használva. Ezután a 16S rDNS PCR termékeknek az *Msp*I és a *Bsu*RI restrikciós endonukleáz enzimekkel végzett hasításával hoztuk létre azok ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) mintázatát. Az egyedi hasítási mintázattal rendelkező törzsek PCR termékét EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit (Bio Basic Inc.) segítségével tisztítottuk meg.

A reprezentatív törzsek faji szintű azonosítását a 16S rDNS bázissorrend-elemzésre alapozva, 27f primer felhasználásával a jelölt terminátorú ciklikus szekvenálás módszerével végeztük. A szekvenciák filogenetikai hovatartozását a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritmussal (*ALTSCHUL et al.* 1990) a GenBank internetes DNS-adatbázisban (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), illetve a már leírt, tenyésztésbe vont típustörzseket tartalmazó EzTaxon server (http://www.eztaxon.org/; *CHUN et al.* 2007) segítségével ellenőriztük.

A tenyésztéstől független vizsgálatokhoz a 0,5-1 g-nyi talajmintából DNS izoláló kit segítségével (Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit, Mo-Bio), kémiai és mechanikus sejtfeltárást alkalmazva, a protokollnak megfelelően kivontuk a közösségi DNS-t.

A DNS izolátumokból klónkönyvtárat hoztunk létre a kék-fehér szelekción (*SAMBROOK & RUSSELL* 2001) alapuló módszerrel, a klónkönyvtárak feldolgozását *KRETT et al.* (2010) szerint végeztük, 27f és 1401r primerek alkalmazásával. A reprezentatív klónszekvenciák filogenetikai azonosítását ugyancsak a 16S rDNS bázissorrend-elemzésre alapozva végeztük, a fentiekben már leírtak szerint.

Eredmények és értékelésük

A kiválasztott mintavételi helyekről származó mintákban átlagosan 10^6 TKE/g (TKE = telepképző egység) értékeket határoztunk meg a mintától és a felhasznált táptalaj típusától függetlenül (*II. táblázat*). A legmagasabb csíraszám értékeket a T2-es (a Zalahaláp melletti illegális szemétlerakó környékéről származó) mintából nutrient és R2A táptalajon becsültük (9 x 10^6 illetve 7,2 x 10^6 TKE/g). A legalacsonyabb értékeket a T1-es (az Alsó-Cser-tó melletti lapos tetőszintről származó) mintából nutrient és keményítő-kazein táptalajokon (4,1 x 10^6 illetve 4,7 x 10^6 TKE/g) határoztuk meg.

II. táblázat
Table II

A talajminták csíraszám értékei (TKE/g) az alkalmazott táptalajok szerint
Germ count numbers(CFU/g) of soil samples according to the media used

	Tapolcai-karszt/ T1 minta	**Tapolcai-karszt/T2 minta**
Nutrient	**$4,1 * 10^6$**	**$9,0 * 10^6$**
R2A	**$6,0 * 10^6$**	**$7,2 * 10^6$**
Keményítő-kazein	**$4,7 * 10^6$**	**$5,5 * 10^6$**

Az összesen 154 (T1: 70; T2: 84) tiszta tenyészetből izolált DNS 16S rRNS-t kódoló régiójának restrikciós mintázata alapján 85 különböző ARDRA csoportot (T1: 38; T2: 54) különítettünk el. 57 reprezentáns törzs (TRS: 25; TRW: 31) bázissorrend elemzését és illesztését végeztük el. Az azonosított törzsek 18%-ának bázissorrendje kevesebb, mint 97%-ban egyezett meg az EzTaxon adatbázisban szereplő fajokéval. Ezekkel az izolátumokkal ezért érdemes lehet további, részletesebb taxonómiai vizsgálatokat végezni, mert az alacsony szekvencia hasonlóság alapján feltételezhető, hogy ezek még ismeretlen fajok képviselői lehetnek.

A Tapolcai-karszt talajmintáiból diverz közösségeket tártunk fel tenyésztésen alapuló vizsgálataink során (*III. táblázat*). A filogenetikai törzsek szintjén a két mintavételi terület között a leglényegesebb különbség az

volt, hogy a T1-es mintában a Proteobacteria törzs Gammaproteobacteria osztályának képviselői voltak túlnyomó többségben (40%), míg a T2-es mintában az Actinobacteria törzs képviselőit találtuk meg a legnagyobb arányban (41%).

III. táblázat
Table III

A baktérium törzsek és klónok filogenetikai megoszlása
The phylogenetic distribution of bacterial strains and clones

	T1 minta		T2 minta			T1 minta		T2 minta	
	törzsek	klónok	törzsek	klónok		törzsek	klónok	törzsek	klónok
Filogenetikai csoport	**száma (%)**		**száma (%)**		**Filogenetikai csoport**	**száma (%)**		**száma (%)**	
Acidobacteria					**Deltaproteobacteria**				
Candidatus		6 (12)		3 (6)	*Byssovorax*		1 (2)		
Edaphobacter		1 (2)			*Desulfuromonas*				2 (4)
Holophaga		2 (4)		2 (4)	*Haliangium*		2 (4)		
Chloroflexi					*Smithella*		1 (2)		
Levilinea		2 (4)			*Sorangium*				2 (4)
Cyanobacteria					**Firmicutes**				
Crocosphaera				4 (7)	*Bacillus*	11 (21)		2 (5)	
Gloeobacter		1 (2)			*Paenibacillus*	1 (2)			
Alphaproteobacteria					*Paenisporosarcina*	1 (2)		1 (2)	
Bradyrhizobium				1 (2)	*Thermolithobacter*				1 (2)
Brevundimonas			1 (2,5)		**Actinobacteria**				
Caulobacter	1 (2)		1 (2,5)		*Acidimicrobium*		2 (4)		
Mesorhizobium		2 (4)	1 (2,5)	1 (2)	*Aciditerrimonas*		1 (2)		
Ochrobactrum		1 (2)			*Acidothermus*				1 (2)
Paracoccus			1 (2,5)		*Aeromicrobium*			1 (2)	
Pedomicrobium				1 (2)	*Agromyces*			2 (5)	
Phaeovibrio		2 (4)			*Arthrobacter*	3 (6)			1 (2)
Phyllobacterium			2 (4,5)		*Iamia*				2 (4)
Pseudolabrys		2 (4)			*Lentzea*	1 (2)			
Reyranella		1 (2)			*Ilumatobacter*				2 (4)
Sphingomonas	3 (6)		2 (4,5)		*Micrococcus*	1 (2)		3 (7)	
Rhodoplanes		4 (8)			*Mycobacterium*		1 (2)		
Betaproteobacteria					*Nocardioides*			1 (2)	
Azonexus		2 (4)			*Patulibacter*		3 (6)		6 (11)
Cupriavidus				1 (2)	*Planomonospora*				1 (2)
Derxia		1 (2)			*Rhodococcus*			1 (2)	
Duganella			1 (2)		*Rubrobacter*		2 (4)		
Massilia	1 (2)				*Solirubrobacter*		1 (2)		2 (4)
Pelomonas		1 (2)			*Streptomyces*	4 (8)	1 (2)	9 (22)	1 (2)
Piscinibacter				4 (7)	*Thermoleophilum*				1 (2)
Ramlibacter		1 (2)			**Bacteroidetes**				
Variovorax	1 (2)		1 (2)		*Pedobacter*			2 (5)	
Vitreoscilla				4 (7)	*Flavobacterium*	4 (8)		2 (5)	
Gammaproteobacteria					*Verrucomicrobia*				
Alkanibacter				1 (2)	*Candidatus*		1 (2)		
Ectothiorhodospira				1 (2)	*Chthoniobacter*		1 (2)		
Luteimonas				5 (10)	*Verrucomicrobium*				1 (2)
Lysobacter	5 (10)	1 (2)	2 (4,5)	1 (2)	**Gemmatimonadetes**				
Pseudomonas	15 (28)		5 (12)		*Gemmatimonas*		3 (6)		
Pseudoxanthomonas	1 (2)								
Saccharospirillum		1 (2)							
Shigella				1 (2)					

A T1-es mintában a Firmicutes, a T2-es mintában az Alphaproteobacteria csoportba sorolt törzsek aránya közel háromszorosa volt a másik mintából ugyanezen csoportokba tartozó törzsekének. A

Bacteroidetes és a Betaproteobacteria csoportokba sorolt törzsek aránya mindkét mintában közel azonos volt.

A T1-es minta legnépesebb képviselői a *Pseudomonas* (28%), a *Bacillus* (21%) és a *Lysobacter* (9%) genuszok voltak, ugyanakkor a T2-es mintában legnagyobb számban a *Streptomyces* (22%), a *Pseudomonas* (28%), a *Bacillus* (21%) és a *Lysobacter* (9%) genuszok voltak, ugyanakkor a T2-es mintában legnagyobb számban a *Streptomyces* (22%), a *Pseudomonas* (12%) és a *Micrococcus* (7%) nemzetségek fajai voltak jelen a legnagyobb arányban. E nemzetségek többségének képviselői nagy tűrőképességűek, előnytelen körülmények között is fennmaradnak, valamint metabolikus potenciáljuk széleskörű.

Egyes nemzetségek képviselői (*Bacillus, Caulobacter, Flavobacterium, Lysobacter, Micrococcus, Paenisporosarcina, Pseudomonas, Sphingomonas, Streptomyces, Variovorax*) mindkét mintavételi helyről előkerültek, így feltételezhető, hogy ezek a területen domináns előfordulású és nem túl specifikus igényű, könnyen tenyészthető szervezetek képviselői. Számos nemzetség tagjait azonban csak az egyik vagy a másik területről azonosítottuk. A T2-es, azaz az illegális hulladéklerakóhelyről származó mintából kétszer annyi csak arra a területre jellemző nemzetség (*Aeromicrobium, Agromyces, Brevundimonas, Duganella, Mesorhizobium, Nocardioides, Paracoccus, Pedobacter, Phyllobacterium, Rhodococcus*) került elő, mint a T1-es mintából (*Arthrobacter, Lentzea, Massilia, Paenibacillus, Pseudoxanthomonas*).

Az illegális hulladéklerakóhelyről származó mintánkból több olyan fajt (*Mesorhizobium metallidurans, Rhodococcus quinshengii, Streptomyces plumbiresistens, Variovorax paradoxus*) vontunk tenyésztésbe, amelyekről leírták, hogy tolerálják nehézfémek, szintetikus szennyezőanyagok jelenlétét, utóbbiakat esetleg degradálják is.

A tenyésztéstől független közösségszerkezeti vizsgálatok során 96 tagú klónkönyvtárat hoztunk létre. Feldolgozásuk során a T1 mintát 68, a T2 mintát pedig 69 ARDRA csoportba soroltuk. Eddig 80 reprezentáns klón (TRC: 42; TWC: 38) bázissorrend elemzését és illesztését végeztük el a törzseknél is alkalmazott módon.

A nagyobb filogenetikai csoportok megoszlását a 3. táblázatban mutatjuk be. A klónszekvenciák összesen 66%-a (T1: 58%, T2: 74%) tartozott valamelyik, a tenyésztéses módszerrel is kimutatott öt filogenetikai törzs valamelyikébe. Az így nyert csoportok aránya azonban a törzsek esetében megfigyelt arányokhoz képest némileg eltérő volt.

A T1-es mintában legnagyobb részük (23%) nem a Gamma-, hanem az Alphaproteobacteria rokonsági körébe tartozott. Kiemelkedő adat, hogy a

gammaproteobaktériumok tizedannyian képviseltették magukat a klónok között (4%), mint a tenyészetekben (40%). A tenyésztéses vizsgálatok során kapott második leggyakoribb filogenetikai törzs, a Firmicutes képviselői itt egyáltalán nem voltak jelen, helyükre az aktinobaktériumok kerültek(21%). Nagy arányban voltak még jelen a klónok között a tenyésztéssel ki sem mutatható Acidobacteria törzs képviselői (18%).

A T2-es mintában a legnagyobb létszámban az Actinobacteria törzs tagjait azonosítottuk (32%), ez nagyjából megfelel a tenyésztés során kapott eredménynek, ahol 41%-kal szintén ez a taxon volt a leggyakoribb. A Gammaproteobacteria osztály fajai azonos arányban (17%) voltak jelen, mint a tenyészetekben, továbbá ugyanilyen gyakoriak voltak a Betaproteobacteria osztály képviselői. A törzsek között számottevő arányban azonosított Bacteroidetes törzs képviselői a klónkönyvtárakban nem voltak jelen. Kimutattunk azonban a klónozással olyan nagyobb filogenetikai csoportok képviselőit, amelyeket a tenyésztés során nem tudtunk azonosítani. Ilyenek voltak a mindkét mintában jelen lévő Deltaproteobacteria osztály, az Acidobacteria, Cyanobacteria és Verrucomicrobia törzsek, ezeken kívül pedig a T1-es mintában a Gemmatimonadetes és a Chloroflexi törzsek tagjai.

Az NCBI adatbázis illesztési eredményei szerint a meghatározott klónszekvenciák túlnyomó része eddig tenyésztésbe nem vont, molekuláris biológiai, nukleinsav-alapú módszerek alkalmazásával környezeti mintákból azonosított klónokkal mutatta a legnagyobb szekvencia hasonlóságot. E klónokat túlnyomó többségben talajokból (főként növények rizoszférájából) izolálták, de előfordulnak köztük hóban, háziporban, mikrobiális biofilmben, állati ürülékben, illetve nitrogénfixáló fajok esetében a gazdafaj gyökérgümőiben azonosított baktériumok szekvenciái is. Az EzTaxon adatbázis alapján megkerestük a klónjainkkal legnagyobb szekvencia egyezést mutató baktériumfajokat is. A szekvencia egyezés azonban a legtöbb esetben nem érte el a 97%-ot, így ezek az adatok faji szinten nem megbízhatóak. Az NCBI és az EzTaxon adatbázisok adattartalma egymástól jelentősen különbözött, emiatt egyazon klónszekvenciára gyakran különféle besorolást kaptunk.

Figyelemre méltó, hogy a klónokból létrehozott ARDRA csoportok a baktériumtörzsek csoportjaihoz képest igen kis létszámúak voltak. Mivel a kiindulási törzs illetve klón számok nagyjából megegyeztek, ez arra utalt, hogy a tenyésztéssel nyert eredményekhez képest a klónozással szélesebb filogenetikai diverzitást tártunk fel.

A T1-es minta klónszekvenciáinak legnépesebb (23%) csoportját 8 csoporttal és 12 klónnal az Alphaproteobacteria (*Mesorhizobium,*

Occhrobactrum, Phaeovibrio, Pseudolabrys, Reyranella, Rhodoplanes) osztály képviselte. Faji szinten azonosítottuk a *Mesorhizobium amorphae* nevű nitrogénfixáló baktériumot. A faj típustörzsét kínai gyalogakácok gyökérgümőiből izolálták először (Wang *et al.*, 1999). Az Actinobacterium (*Acidimicrobium, Aciditerrimonas, Mycobacterium, Patulibacter, Rubrobacter, Solirubrobacter, Streptomyces*) törzs tagjai voltak a második leggyakoribbak (21%) 9 csoporttal és 11 klónnal. A fenti két törzsétől alig marad el a klónjaink által képviselt acidobacteriumok (*Chloracidobacterium, Edaphobacter, Holophaga, Koribacter, Solibacter*) aránya (18%). Emellett a Betaproteobacteria (*Azonexus, Derxia, Pelomonas, Ramlibacter*) és a Deltaproteobacteria (*Byssovorax, Haliangium, Smithella*) osztályok, valamint a Gemmatimonadetes (*Gemmatimonas*) törzsekhez tartozó klónszekvenciákat találtunk viszonylag nagyobb gyakorisággal. Kisebb számban (1-2 csoport 1-2 klónja) voltak jelen a Gammaproteobacteria (*Lysobacter, Saccharospirillum*) osztály, a Verrucomicrobia (*Chthoniobacter, Xiphinematobcter*), a Chloroflexi (*Levilinea*) és a Cyanobacteria (*Gloeobacter*) törzsek képviselői. A Gammaproteobacteria osztály klónjai között megtalálható volt egy szekvencia, amely faji szintű hasonlóságot mutatott a korábban már ismertetett, dél-koreai uborkatermesztő üvegházak talajából izolált *Lysobacter niabensis* (*WEON et al.*, 2007) típustörzsének szekvenciájával.

A T2-es mintából létrehozott klónkönyvtár vizsgálata alapján a különböző baktériumcsoportok képviselőiként azonosított szekvenciák többsége (32%) az Actinobacteria (*Acidothermus, Arthrobacter, Iamia, Ilumatobacter, Patulibacter, Planomonospora, Solirubrobacter, Streptomyces, Thermoleophilum*) törzsbe nyert besorolást. Faji szintű szekvencia egyezést egy klón mutatott a *Streptomyces zaomyceticus* nevű fajjal. Az antibiotikumot (zaomycin) termelő baktériumot *FERNANDEZ-CORTES et al.* 2011-ben egy dél-spanyolországi, karsztos területen elhelyezkedő, paleolit kori barlangrajzokkal teli barlangból is kimutatták.

Az actinobacteriumok után az egyik legnagyobb taglétszámmal a γ-Proteobacteria osztály (*Alkanibacter, Ectothiorhodospira, Luteimonas, Lysobacter, Shigella*) képviselői fordultak elő, 7 csoport összesen 9 klónját foglalták magukba. Egy klón szekvenciája 99%-ban megegyezett a *Shigella flexneri* faj típustörzsének szekvenciájával. A faj egyike a shigellózis nevű akut hasmenéses betegség kórokozóinak, ami a fejlődő országok gyermekhalálozásainak egyik legfőbb tényezője (*WANG et al.* 2009), de rövidebb ideig talajokban is fennmarad (*LEONARDOPOULOS et al.* 1980). A Betaproteobacteria osztály (*Alcanibacter, Ectothiorhodospira, Ilumatobacter, Luteimonas, Lysobacter, Shigella*) 5 csoport 9 tagjával volt jelen. Előfordultak még a mintában az Acidobacteria törzs (*Chloracidobacterium,*

Holophaga, Koribacter), a Deltaproteobacteria osztály (*Desulfuromonas, Sorangium*), illetve kisebb arányban a Cyanobacteria törzs (*Crocosphaera*), az alfaproteobaktériumok (*Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Pedomicrobium*), illetve 1-1 klónnal a Firmicutes (*Thermolithobacter*) és a Verrucomicrobia (*Verrucomicrobium*) törzsek képviselői. Az alfaproteobaktériumok klónjai között faji szinten azonosítottuk a *Bradyrhizobium jicamae* és a *Mesorhizobium albiziae* nevű nitrogénfixáló fajokat. E fajok típustörzseit a jícama (mexikói fehérrépa) és a szubtrópusi elterjedésű *Albizia kalkora* nevű mimózafa gyökérgümőiből írták le (*RAMÍREZ-BAHENA et al.* 2009, *WANG et al.* 2007).

A T2-es, azaz az illegális hulladéklerakóhely környékéről származó mintánkban igen nagy számban fordultak elő olyan klónszekvenciák, amelyeknek legközelebbi rokonai egy alifás szénhidrogénekkel szennyezett ipari területen folytatott aerob bioremediáció során kimutatott, ez idáig még tenyésztésbe nem vont baktériumklónok voltak (*MILITON et al.* 2010). A kutatócsoport megfigyelései szerint a 2 évig tartó levegőztetés során folyamatosan csökkent a szerves szennyezőanyagok mennyisége, ezzel párhuzamosan pedig változott a helyi baktériumközösség összetétele. A kutatási beszámolóban foglaltak szerint a szennyezőanyagoktól mentes talajok leggyakoribb képviselői az alfaproteobaktériumok, míg legritkább képviselői a gammaproteobaktériumok körébe tartoznak. Ez igaz a T1-es, azaz az érintetlen talajból származó mintánkra is, mint ahogyan az is elmondható a hulladéklerakóból származó T2-es mintánkról, amit a kutatók „*gamma-eltolódás*”-nak neveznek. Eszerint a szénhidrogénnel szennyezett talajokra jellemző a gammaproteobaktériumok arányának növekedése. A mi mintáink esetében ezek aránya az érintetlen talajban 4%, a szennyezett talajban pedig 17% volt. A kutatás során a szennyezett talajból kimutatták még a Gemmatimonadetes és a Chloroflexi törzsek tagjait: ezek a mi mintánkban is jelen voltak. A bioremediáció során tapasztaltak szerint a kezelés végén a teljes közösséget továbbra is a proteobaktériumok dominálták, az rRNS-klónok révén megismert aktív közösségben azonban az Actinobacteria törzs aránya a korábbi 30%-ról csaknem 80%-ra nőtt. Ebből e törzs bioremediációs folyamatokban való részvételére következtettek (*MILITON et al.* 2010). Érdekes lenne megfigyelni, hogy vajon a tapolcai hulladéklerakó területén végzett bioremediáció során is megnövekedne-e az aktinobaktériumok szintén 30%-hoz közeli aránya.

A törzsként nemrégiben leírt Verrucomicrobia filogenetikai ág tagjainak jelenléte a szennyezett T2-es mintában feltehetően kimagasló tűrőképességükkel, megváltozott körülményekhez való alkalmazkodási képességükkel lehet magyarázható. E csoport tagjait vízi közösségekből mutatták ki

először, de ma már sok más élőhelyről is ismerjük őket, előfordulnak eutróf vagy erősen szennyezett, extrém hideg vagy forró, illetve szulfidban gazdag és szikes környezetekben is (*SCHLESNER et al.* 2006).

A klónok vizsgálata alapján a Tapolcai-karszt baktériumközösségei Gram-negatív dominanciával voltak jellemezhetők. Klónszekvenciáink között a Gram-pozitív baktériumokkal nagyfokú hasonlóságot mutatók csak az Actinobacteria és a Firmicutes törzsek klónjai voltak. A Gram-pozitív klónok aránya (20-30%) azonban nem maradt el túlzottan a tenyésztésen alapuló módszerrel nyert eredményektől (40-50%). A kétféle módszerrel nyert eredmények kismértékű eltérése mögött feltehetően az alkalmazott anyagok és technikák (a felhasznált táptalajok, a DNS izolálás és a PCR reakciók) eltérő szelektivitása áll. A klónkönyvtárból kimutatott egyes taxonok az általunk alkalmazottól eltérő, sajátos tenyésztési igényekkel vagy feltételekkel rendelkeznek. Míg tenyésztéses vizsgálatainkkal elsősorban a Tapolcai-karszt aerob, kemoorganotróf heterotróf baktériumközösségeit tudtuk vizsgálni, a klónozással kimutattunk számos más metabolizmussal jellemezhető szervezetet is, melyek feltehetően fontos szerepet játszanak a talaj közösségi anyagcseréjében. Ilyenek voltak például a fotoautotróf Chloroflexi és Cyanobacteria törzsek.

Összefoglalás

A Tapolcai-karszt hazánk egyik antropogén hatásokra legérzékenyebb karsztos területe. A felszín alatt 10-15 m mélyen húzódó barlangrendszert kitöltő karsztvíz a beszivárgás révén könnyen elszennyeződhet. A talajok tulajdonságait meghatározó tényezők között fontos szerepet töltenek be az ott élő mikroorganizmusok. Kutatásunk célja ezért a Tapolcai-karszt egy zavarásmentes (T1) és egy emberi hatás alatt álló (T2) területéről származó talajminta tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független módszerekkel végzett összehasonlító mikrobiológiai vizsgálata volt.

A 2010 őszén gyűjtött talajmintákból nutrient, R2A és keményítő-kazein táptalajokra szélesztettünk, és az eltérő telepmorfológiai tulajdonságokat mutató telepeket izoláltuk. A talajmintákból a közösségi DNS izolálását követően klónkönyvtárakat hoztunk létre. A baktériumtörzsek és a molekuláris klónok filogenetikai azonosítását a 16S rRNS gén bázissorrendelemzésére alapozva végeztük el. A kiválasztott mintavételi helyekről származó mintákban átlagosan 10^6 TKE/g (TKE = telepképző egység) értékeket határoztunk meg a mintától és a felhasznált táptalaj típusától függetlenül. A mintákból összesen 154 baktériumtörzset izoláltunk. ARDRA mintázatuk alapján a T1 törzseket 38, a T2 törzseket 54 csoportba soroltuk. A baktéri-

umtörzseket az Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria és Bacteroidetes filogenetikai törzsek fajaiként azonosítottuk. A legtöbb tenyésztésbe vont törzs a *Bacillus, Lysobacter, Pseudomonas* és *Streptomyces* nemzetségek képviselőivel mutatta a legnagyobb hasonlóságot. Mintavételi helyenként jelentősen eltérő volt az egyes fajok filogenetikai törzseken belüli megoszlása. A tenyésztéses módszer eredményei alapján az antropogén hatás alatt álló terület bakteriális közössége diverzebbnek mutatkozott.

A 80 feldolgozott molekuláris klón (T1: 42, T2: 38) a már leírt baktériumfajokkal nagyon alacsony szekvencia egyezést mutatott, többségük a legnagyobb mértékben talaj- és rizoszféra mintákból származó klónszekvenciákhoz hasonlított. A klónozásos módszerrel vizsgálva a közösségek diverzebbnek tűntek, amennyiben kétszer annyi magasabb szintű taxonómiai csoport (törzs vagy osztály) volt jelen a mintákban, mint a tenyésztéses vizsgálatok eredményei alapján. A tenyésztéssel is kimutatható taxonokon kívül az Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes és Verrucomicrobia törzsek, valamint a Deltaproteobacteria osztály képviselői is jelen voltak a mintákban.

IRODALOM

ALTSCHUL, S.F.-GISH, W.-MILLER, W.-MYERS, E.W.-LIPMAN, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. - J. Mol. Biol. 215: p. 403-410.

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: p. 2259-2261.

DARABOS G. (1997): Mikroorganizmus-közösségek karsztkorróziós szerepének laboratóriumi vizsgálata az Aggteleki-karszt talajain. - Kandidátusi értekezés, ELTE, Budapest, kézirat.

DÍAZ-RAVIŇA, M.-ACEA, M. J.-CARBALLAS, T. (1994): Seasonal fluctuations in microbial population and available nutrients in forest soils. Biol. Fertil. Soils 16: p. 205–210.

FERNANDEZ-CORTES, A.-CUEZVA, S.-SANCHEZ-MORAL, S.-CAÑAVERAS, J. C.-PORCA, E.-JURADO, V.-MARTIN-SANCHEZ, P. M.-SAIZ-JIMENEZ, C. (2011): Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave. - Environ. Sci. Pollult. Res. Papers in Press. Published May 7, 2011 as DOI 10.1007/s11356-011-0513-5.

KEVEI, I.-ZÁMBÓ, L. (1986): Study of relationship between bacteria activity in karstic soils and corrosion. - Annales Universitatis Scientiarium Budapestiensis de Rolando Eötvös Nominatae. 20-21: p. 325-333.

KNÁB M.-KISS K.-LEHNER Á.-SZILI-KOVÁCS T.-PALATINSZKY M.-MÁRIALIGETI K.-MÓGA J.-BORSODI A. (2010): Hazai epikarszt rendszerek talajaiban előforduló mikrobaközösségek szerkezetének és aktivitásának összehasonlító elemzése. - Karsztfejlődés XV: p. 35-48.
KRETT G.-PALATINSZKY M.-MAKK J.-JÁGER K.-CSISZÁR V.-MÁRIALIGETI K.-BORSODI A. (2010): A Hévízi forrástó üledékének összehasonlító jellegű bakteriális diverzitás vizsgálata. - Hidrológiai Közlöny 90: p. 84-87.
LEONARDOPOULOS, J.-PAPAKONSTANTINOU, A.-KOURTI, H.-PAPAVASSILIOU, J. (1980): Survival of shigellae in soil. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. - 1. Abt. Originale B, Hygiene. 10: p. 459-465.
MILITON, C.-BOUCHER, D.-VACHELARD, C.-PERCHET, G.-BARRA, V.-TROQUET, J.-PEYRETAILLADE, E.-PEYRET, P. (2010): Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. - FEMS Microbiol. Ecol. 74: p. 669-681.
RAMÍREZ-BAHENA, M. H.-PEIX, A.-RIVAS, R.-CAMACHO, M.-RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.-MATEOS, P. F.-MARTÍNEZ-MOLINA, E.-WILLEMS, A.-VELÁZQUEZ, E. (2009): *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. - Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: p. 1929–1934.
SAMBROOK, J.-RUSSELL, D. W. (2001): Molecular Cloning. - Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
SCHLESNER, H.-JENKINS, S.-STALEY, J. T. (2006): The Phylum Verrucomicrobia: A Phylogenetically Heterogeneous Bacterial Group. - *In*: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, S., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (eds.) The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Vol. 7. p. 881-899.
WANG, E. T.-VAN BERKUM, P.-SUI, X. H.-BEYENE, D.-CHEN, W. X.-MARTINEZ-ROMERO, E. (1999): Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. - Int. J. Syst. Bacteriol. 49: p. 51-65.
WANG, F. Q.-WANG, E. T.-LIU, J.-CHEN, Q.-SUI, X. H.-CHEN, W. F.-CHEN, W. X. (2007): *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. - Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: p. 1192–1199.
WANG, Y. W.-WATANABE, H.-PHUNG, D. C.-TUNG, S. K.-LEE, Y. S.-TERAJIMA, J.-LIANG, S. J.-CHIOU, C. S. (2009): Multilocus variable-numbertandem repeat analysis for molecular typing and phylogenetic analysis of *Shigella flexneri*. - *BMC Microbiology* 9: p. 278.

WEON, H. Y.-KIM, B. Y.-KIM, M. K.-YOO, S. H.-KWON, S. W.-GO, S. J.-STACKEBRANDT, E. (2007): *Lysobacter niabensis* sp. nov. and *Lysobacter niastensis* sp. nov., isolated from greenhouse soils in Korea. - Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: p. 548–551.

ZÁMBÓ L. (1998): The experimental examination of microbial origin corrosion aggressivity of karst soils. - Acta Carstologica, Ljubljana. 27/1, 16: p. 261-275.