

**TENYÉSZTÉSEN ALAPULÓ ÉS TENYÉSZTÉSTŐL FÜGGETLEN
MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI DIVERZITÁS VIZSGÁLATOK A
GÖMÖR-TORNAI KARSZT TALAJAINAK BAKTÉRIUMKÖZÖS-
SÉGEIN**

KNÁB MÓNIKA^{1,3} – BÜKI GABRIELLA¹ – SZILI-KOVÁCS TIBOR³ –
MÁRIALIGETI KÁROLY¹ – MÓGA JÁNOS² – BORSODI ANDREA¹

¹ELTE Mikrobiológiai Tanszék, ²ELTE Természetföldrajzi Tanszék,
1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C

³MTA ATK Talajtani és Agrokémiai Intézet
1022 Budapest, Herman Ottó út 15.
moniknab@gmail.com

Abstract: As a new chapter of Hungarian karst research, microbiological investigations have begun in the recent years that aim at the exploration of bacterial community structure of Hungarian karst soils based on cultivation-based and cultivation-independent, molecular methods. The goal of our research was the comparative microbiological examination of soil samples taken from the Gömör-Torna-karst. Samples collected in autumn 2010 were plated onto three different media, and colonies with various morphology were isolated. After isolating community DNA from the soil samples, clone libraries were constructed. The phylogenetic identification of the bacterial strains and molecular clones was based on the 16S rRNA gene sequence analysis. The bacterial strains were identified as species of the phyla Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria and Bacteroidetes. The cloning method showed more diverse communities: beyond the taxons observed by cultivation, members of the phyla Chloroflexi, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes and the class Deltaproteobacteria were also present in the studied soils. Most of the molecular clones were similar to clone sequences deriving from soil and rhizosphere samples.

1. Bevezetés

A karsztkutatás új fejezeteként az utóbbi években hazánk különböző karszterületeinek talajaiban előforduló baktériumközösségek szerkezetét feltáró mikrobiológiai vizsgálatok kezdődtek tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával. A mikrobiológiai vizsgálatok Magyarország két jelentős karsztos táján, a Gömör-Tornai-, valamint a Tapolcai-karszt területén folytak egy olyan interdiszciplináris kutatás részeként, melyben más tudományágak képviselői (geológusok, geográfusok, ökológusok) is részt vettek e karszterületek megismerése céljából (MÓGA *et al.* 2010, 2011, SZABÓ *et al.* 2010).

A Gömör-Tornai-karszt talajainak mikrobaközösségeit már korábban is vizsgálták, azonban azok a kutatások elsősorban a talajmikrobák karszt-korróziós hatásának megismerésére irányultak (DARABOS 1997, ZÁMBÓ

1998). A 2009 őszén kezdődött összehasonlító mikrobiológiai vizsgálatok során a fent említett két karszterületről származó összesen 17 talajminta baktériumközösségének strukturális és funkcionális diverzitás vizsgálatára került sor. Az egyes talajok alapvető fizikai és kémiai paramétereinek meghatározása mellett megbecsültük a mikrobiális biomassza értékeket, valamint mértük a talajok biogén eredetű CO₂-termelését, továbbá talajmonolitok segítségével esőszimulációs kísérleteket folytattunk a talajminták karsztkorróziós hatásának laboratóriumi vizsgálata céljából (KNÁB *et al.* 2010). Eredményeink arra utaltak, hogy a felszíni és felszín közeli talajmintákban nagyobb mikrobiális biomassza, talajrespiráció és szubsztrát indukált respiráció volt jellemző, mint a mélyebb rétegekből származó talajmintákban. A legmagasabb biomassza és talajrespiráció értékeket minden esetben az Aggteleki fekete rendzina talaj esetében mutattuk ki. A talajmélységgel tehát csökkent a mikrobák száma és aktivitása is. A talajminták baktériumközösségeit jellemző DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis) sávmintázatok elsősorban a talajok eltérő fizikai-kémiai sajátosságainak megfelelően váltak szét egymástól, és csak kisebb mértékben különböztek a talajmélység szerint. Az esőszimulációs kísérletekben a talajmonolitokon átszűrődött vízminták baktériumközösségeinek DGGE sávmintázata szintén talajtípusok szerinti csoportokba (rendzinák és vörösagyagok) rendeződést eredményezett. A talajok baktériumközösségeiben bekövetkező időbeni változások nyomon követése érdekében a mikrobiális biomassza, a talajrespiráció és a DGGE vizsgálatokat 9 talajmintára szűkítve 2010 tavaszán és őszén megismételtük (KNÁB *et al.* 2012). Eredményeink megerősítették a biomassza, valamint respiráció mélységtől való függését és a baktériumközösségek mintavételi hely (egyéb talajjellemzők) szerinti DGGE csoportosulását, egyértelmű évszakos változásokat azonban nem tudtunk kimutatni.

A fenti vizsgálatokat követően, 2010-ben a Tapolcai-, valamint a Gömör-Tornai-karszton gyűjtött mintákat vizsgáltunk a talajban élő baktériumközösségek filogenetikai diverzitásának feltárása és összehasonlítása céljából. A Tapolcai-karszton végzett kutatások eredményeiről egy korábbi tanulmányban számoltunk be (BŰKI *et al.* 2011). Jelen munka a Gömör-Tornai-karszt talajmintáin az előbbivel egy időben és megegyező tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris mikrobiológiai módszerekkel végzett kutatások eredményeit foglalja össze.

2. Vizsgálati anyag és módszerek

A mintavételi helyek adatait és a talajminták jelöléseit valamint legfőbb jellemzőit az *I. táblázat* tartalmazza. A mintavételi helyek részletesebb leírását és a talajok alapvető fizikai-kémiai tulajdonságait egy korábbi tanulmányunkban közöltük (KNÁB et al. 2010). A talajmintákat 2010 októberében a felszíni 15 cm-es rétegből vettük fűrőmag-mintavevővel, az anyaközet eléréséig, a minták vastagsága minden esetben átérté ezt a legfelső, 15 cm-es réteget. A mintavételek időben gyorsan követték egymást a két karszterületen, közel azonos időjárási viszonyok mellett (KNÁB et al. 2012). A talajmintákból megközelítőleg 500 g-nyi mennyiséget gyűjtöttünk steril edényekbe. A laboratóriumi vizsgálatok megkezdése előtt az egyes talajmintákat alaposan összekevertük, a látható gyökereket és egyéb növényi maradványokat eltávolítottuk.

I. táblázat
Table I

Mintavételi helyek a Gömör-Tornai-karszton, mintajelölések és a talajminták legfőbb jellemzői
Sampling sites on Gömör-Torna-karst, signs of soil samples and the main characteristics of soil samples

Mintavételi hely	Földrajzi koordináták		Minta jelölése	Talajtípus	Talajmélység
	É szélesség	K hosszúság			
Aggteleki-tó melletti ördögszántás	+48°28'13.3593"	+20°30'40.8554"	A1	rendzina	0-15 cm
Vörös-tó melletti töbör	+48°28'19.3972"	+20°32'33.0294"	V3	vörösapagy	0-15 cm

A tenyésztéshez a talajmintákból tízes léptékű hígítási sort készítettünk, majd ennek minden tagjából háromféle (nutrient, R2A és keményítő-kazein) tápagar 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 baktériumtörzsek genotípusos vizsgálata során a törzsek tiszta tenyészetéből DNS-t izoláltunk steril üveggyöngyös fizikai feltárással, majd PCR készülékben 5 percig 99°C-on denaturáltuk. Az izolált DNS-ből a 16S rDNS régiót 27f és 1387r primerekkel polimeráz láncreakció (PCR) segítségével szaporítottuk fel. Ezután a 16S rDNS PCR termékeket *MspI* és *BsuRI* restrikciós endonukleáz enzimekkel hasítottuk, és így létrehoztuk az egyes törzsekre jellemző ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) mintázatot. Az egyedi hasítási mintázattal rendelkező (reprezentatív) törzsek faji szintű azonosítását a 16S rDNS bázissorrend-elemzésére alapozva, 27f primer felhasználásával, a jelölt terminátorú ciklikus szekvenálás módszerével végeztük el. A szekvenciák filogenetikai hovatartozását a GenBank internetes adatbázis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), illetve a már leírt, tenyésztésbe vont típus-törzseket tartalmazó

EzTaxon server (<http://www.eztaxon.org/>; CHUN *et al.* 2007) segítségével ellenőriztük.

A tenyésztéstől független vizsgálatokhoz a 0,5-1,0 g-nyi talajmintákból 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 talajmintákból nyert DNS-ekből a kék-fehér szelekción (*SAMBROOK – RUSSELL* 2001) alapuló módszerrel klónkönyvtárakat hoztunk létre. A módszerrel könnyen ellenőrizhető a célszekvencia beépülésének sikeressége. A vektor plazmidon megtalálható az ampicillin rezisztencia génje, valamint klónozó helye a β -galaktozidáz enzim N-terminális részét tartalmazza. Így a plazmid baktériumsejtbe történt transzformációjával a β -galaktozidáz gén inaktiválódik. A transzformált sejteket egy mesterséges cukrot, az X-gal-t tartalmazó táptalajra szélesztve az inzerttel nem rendelkező sejtekben létrejövő aktív β -galaktozidáz (IPTG) hatására galaktóz keletkezik és a baktériumtelep kékre színeződik. A klónkönyvtárak létrehozásakor azokkal a telepekkel dolgozunk tovább, amelyek növekednek ampicillin tartalmú táptalajon (azaz vektorral transzformáltak), és X-gal jelenlétében fehér színű telepeket képeznek (azaz tartalmazzák az inzert DNS-t). Jelen vizsgálataink során a klónkönyvtárak készítéséhez a pGem-T Vector System (Promega, WI, USA) klónozó rendszert alkalmaztuk, a gyártó utasításait követve, 27f és 1401r primerek felhasználásával. A reprezentatív klónszekvenciák filogenetikai azonosítását a baktériumtörzseknél leírtak szerint a 16S rDNS bázissorrend-elemzésére alapozva végeztük.

3. Eredmények és értékelésük

A talajmintákban átlagosan 10^6 - 10^7 TKE/g (TKE = telepképző egység) csíraszám értékeket határoztunk meg a talajmintától és az alkalmazott táptalajtípustól függetlenül. A V3 minta esetében becsültük a legmagasabb csíraszám értéket keményítő-kazein táptalajon ($2,0 \cdot 10^7$ TKE/g) (II. táblázat). A legalacsonyabb értéket az A1 minta esetében nutrient táptalajon kaptuk ($8,1 \times 10^6$ TKE/g).

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

Talajminta	Csíraszám értékek a különböző táptalajokon (TKE/g)		
	Nutrient	R2A	Keményítő-kazein
A1	$8,1 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^7$	$9,4 \cdot 10^6$
V3	$9,1 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$

A Gömör-Tornai-karsztról származó talajmintákból izolált 75-75 baktériumtörzs közül összesen 100-at (A1: 50, V3: 50) sikerült tiszta tenyészetben fenntartani. A DNS kinyerést követően ARDRA csoportosítás után elvégeztük a tiszta tenyészetek csoportrepresentánsainak 16S rDNS-re alapozott részleges bázissorrend elemzését. A Bacteria doménen belül a 45 csoportrepresentáns törzset (A1: 19, V3: 26) 4 filogenetikai törzs 27 nemzetségének képviselőjeként azonosítottuk (III. táblázat).

III. táblázat
Table III

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

Filogenetikai csoport	A1 minta		V3 minta	
	törzsek	klónok	törzsek	klónok
CHLOROFLEXI	0 (%)	2 (%)	0 (%)	0 (%)
unclassified Chloroflexi bacterium		1		
ALPHAPROTEOBACTERIA	8 (%)	4 (%)	6 (%)	21 (%)
<i>Bradyrhizobium</i>				2
<i>Brevundimonas</i>			1	
<i>Caulobacter</i>	1		1	
<i>Devosia</i>				7
<i>Mesorhizobium</i>				2
<i>Paracoccus</i>				
<i>Phyllobacterium</i>	3			
<i>Rhizobium</i>			1	
<i>Rhodoplanes</i>				
<i>Sphingomonas</i>				
unclassified Alphaproteobacteria bacterium		2		3
BETAPROTEOBACTERIA	4 (%)	4 (%)	12 (%)	9 (%)
<i>Achromobacter</i>			1	
<i>Duganella</i>				
<i>Massilia</i>			3	
<i>Mitsuaria</i>			1	
<i>Ramlibacter</i>		1		
<i>Variovorax</i>		1	1	
<i>Xenophilus</i>	2			
unclassified Betaproteobacteria bacterium				6
GAMMAPROTEOBACTERIA	2 (%)	0 (%)	16 (%)	1 (%)
<i>Luteimonas</i>				
<i>Lysobacter</i>				
<i>Pseudomonas</i>	1		7	
<i>Pseudoxanthomonas</i>				
<i>Shigella</i>				
<i>Xanthomonas</i>			1	
unclassified Gammaproteobacteria bacterium				1
DELTAPROTEOBACTERIA	0 (%)	13 (%)	0 (%)	13 (%)
unclassified Deltaproteobacteria bacterium		6		9

III. táblázat (folytatás)
Table III (continued)

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

Filogenetikai csoport	A1 minta		V3 minta	
	törzsek	klónok	törzsek	klónok
FIRMICUTES	38 (%)	0 (%)	12 (%)	1 (%)
<i>Bacillus</i>	17		5	
<i>Cohnella</i>	1			
<i>Paenibacillus</i>	1		1	
<i>Paenisporosarcina</i>				
unclassified Firmicutes bacterium				1
ACTINOBACTERIA	40 (%)	51 (%)	42 (%)	12 (%)
<i>Actinomadura</i>				1
<i>Aeromicrobium</i>				
<i>Agromyces</i>	6		1	
<i>Amycolatopsis</i>			1	
<i>Arthrobacter</i>	1		4	
<i>Brevibacterium</i>			1	
<i>Gaiella</i>				1
<i>Kribbella</i>	1		4	
<i>Leifsonia</i>	2		1	
<i>Lentzea</i>				
<i>Marmoricola</i>		1		
<i>Microbacterium</i>	1		3	
<i>Micrococcus</i>				
<i>Nocardioides</i>	1			
<i>Rhodococcus</i>				
<i>Streptomyces</i>	8		6	
unclassified Actinobacteria bacterium		23		6
ACIDOBACTERIA	0 (%)	19 (%)	0 (%)	28 (%)
unclassified Acidobacteria bacterium		9		19
BACTEROIDETES	8 (%)	0 (%)	12 (%)	1 (%)
<i>Flavobacterium</i>	1		1	1
<i>Pedobacter</i>			1	
<i>Solitalea</i>	3		3	
unclassified Bacteroidetes bacterium			1	
VERRUCOMICROBIA	0 (%)	2 (%)	0 (%)	7 (%)
<i>Chthoniobacter</i>		1		
unclassified Verrucomicrobia bacterium				5
GEMMATIMONADETES	0 (%)	4 (%)	0 (%)	6 (%)
unclassified Gemmatimonadetes bacterium		2		4

A vizsgált talajmintákban egyértelműen az Actinobacteria törzs tagjai fordultak elő legnagyobb arányban. Az A1 mintában a Firmicutes törzs, míg a V3 mintában a Proteobacteria törzs bizonyult a második legnépesebb csoportnak. A legtöbb általunk izolált baktériumtörzs a *Bacillus*, *Streptomy-*

ces, *Pseudomonas* és *Agromyces* nemzetségekbe tartozott. E nemzetségek többségének képviselői nagy tűrőképességű, széleskörű metabolikus potenciállal bíró szervezetek, melyek feltételezhetően domináns előfordulásúak az általunk vizsgált talajokban, könnyen tenyészthetőek, kedvezőtlen környezeti feltételek mellett is képesek életben maradni.

A baktériumközösségek tenyésztéstől független vizsgálata során összesen 115 molekuláris klón (A1: 47; V3: 68) 72 csoportreprezentánsának (A1: 33; V3: 39) bázissorrend elemzését végeztük el. Az általunk kapott klónszekvenciákat az EzTaxon adatbázissal összevetve azt találtuk, hogy összesen 51%-uk tartozott azon 4 filogenetikai törzs valamelyikébe, melyeket a tenyésztéses vizsgálataink során is kimutattunk. A klónszekvenciák filogenetikai csoportonkénti megoszlása eltért a tenyésztés során kapott eredményektől. Klónozásos eljárással számos olyan filogenetikai csoport (*Chloroflexi*, *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* és *Gemmatimonadetes*) képviselőit sikerült kimutatnunk, melyeket nem tudtunk tenyésztésbe vonni (*III. táblázat*).

A klónok néhány kivételtől eltekintve 97% alatti szekvencia hasonlóságot mutattak már leírt baktériumfajok szekvenciáival, ezért ezek az adatok a faji szintű azonosítást nem tették lehetővé. Az NCBI adatbázis használatával kapott eredményeket figyelembe véve a klónszekvenciák túlnyomó többsége a legnagyobb szekvencia egyezést (94-99%) eddig tenyésztésbe még nem vont környezeti klónokkal mutatta. Utóbbiak legnagyobb részét különböző talajmintákból, főleg rizoszféra talajokból izolálták (*ELSHAHED et al. 2008*, *JANGID et al. 2010, 2011*, *UPCHURCH et al. 2008*), de akadtak köztük hulladéklerakók környékéről, állati ürülékből, valamint nitrogénkötő szervezetekből származóak is (*MILITON et al. 2010*, *WUST et al. 2011*, *ALEXANDRE et al. 2009*). Az eredményeket figyelembe véve a klónkönyvtár-analízissel a tenyésztéses módszernél szélesebb filogenetikai diverzitást tudtunk feltárni, hiszen az általunk vizsgálatba vont baktériumtörzsek és molekuláris klónok száma megközelítőleg azonos volt. Hasonló megállapításokra jutottunk a Tapolcai-karszt talajmintáinak mikrobiológiai vizsgálata során is (*BÜKI et al. 2011*).

A Gömör-Tornai- és a Tapolcai-karszt (*BÜKI et al. 2011*) talajmintáin végzett mikrobiológiai vizsgálatok eredményeit összevetve megállapítható, hogy mindkét területen az *Actinobacteria* törzs tagjai voltak jelen számottevő mennyiségben (a Gömör-Tornai-karsztról származó talajokból összesen 41 baktériumtörzs és 32 klónszekvencia). A legtöbb törzs a *Streptomyces* nemzetség tagja volt, a két karszterületről nagyjából azonos arányban. Jelentős számban fordultak még elő az *Agromyces* és *Arthrobacter* nemzetségek képviselői, melyek közül a Gömör-Tornai-

karsztról több törzs került elő, mint a Tapolcai-karsztról. A *Kribbella*, *Leifsonia* és *Microbacterium* nemzetségekbe tartozó törzseket csak a Gömör-Tornai-karszt talajmintáiból izoláltunk, egyéb nemzetségek csupán egy vagy két törzssel képviseltették magukat (III. táblázat). Az Actinobacteria törzssel legközelebbi rokon klónszekvenciák szintén nagyjából egyenlő arányban kerültek elő mindkét karsztról. Ezek közül két reprezentáns klónszekvenciát a V3 talajmintából nemzetség szinten (*Actinomadura* és *Gaiella*), egy további klónt az A1 mintából faji szinten (*Marmoricola aequoreus*) sikerült azonosítani. Utóbbi egy sárga színű aktinobaktérium, melyet tengerparti homokos üledékből izoláltak először (LEE 2007).

A Gömör-Tornai-karszt talajmintáiban a Firmicutes filogenetikai törzs 25 baktériumtörzssel és 1 klónszekvenciával képviseltette magát. A törzsek többsége a *Bacillus* nemzetségbe tartozott, akárcsak a Tapolcai minták esetében (BÜKI et al. 2011).

A Proteobacteria törzs Alpha-, Beta-, és Gammaproteobacteria osztályainak tagjait mind tenyésztéssel, mind klónozással kimutattuk, míg a Deltaproteobacteria osztály rokonságába tartozókat csak klónkönyvtár-analízissel sikerült azonosítanunk. Körülbelül azonos számú törzset izoláltunk az Alpha-, Beta- és Gamma osztályokból (rendre 7, 8, 9), a Tapolcai-karszt esetén ezek az arányok jelentősen eltértek, a Gammaproteobacteria osztály javára (BÜKI et al. 2011). A *Pseudomonas* nemzetség tagjai bizonyultak a leggyakoribb előfordulásúnak, ezen kívül előkerültek még egynél nagyobb számban a *Caulobacter*, *Phyllobacterium*, *Massilia* és *Xenophilus* rokonságába tartozó törzsek. A klónkönyvtárak Gram-negatív dominanciáját jelezte, hogy 40 klónszekvencia tartozott a Proteobacteria filogenetikai törzsbe, közel kétszerese az e csoportba tartozó baktériumtörzseknek. A klónszekvenciák megoszlása az egyes osztályok között nem volt olyan egyenletes, mint a törzsek esetében. Az Alpha- és Deltaproteobacteria osztályokkal közel azonos számú (16, illetve 15) klón mutatott rokonságot, a Betaproteobacteria osztályba feleannyi (8) szekvencia, a gammaproteobaktériumok közé pedig mindössze egyetlen klón tartozott. A Tapolcai-karsztról származó talajokban jóval nagyobb arányban fordultak elő a gammaproteobaktériumok (BÜKI et al. 2011). MILITON et al. (2010) megfigyelései szerint egy alifás szénhidrogénnel szennyezett ipari területen folytatott aerob bioremediáció során a szerves szennyezőanyagok mennyiségének csökkenésével párhuzamosan jelentősen változott a baktériumközösség összetétele. A szénhidrogénnel szennyezett talajokra a gammaproteobaktériumok arányának növekedése volt jellemző, amit a kutatók „gamma-eltolódás”-nak neveztek el. A Gömör-Tornai-karszt talajaihoz

képest a Tapolcai-karszt talajaiban tapasztalt nagyobb arányú Gammaproteobacteria előfordulás egyik lehetséges oka szintén lehetett antropogén eredetű szennyezés. Az Alphaproteobacteria osztályból olyan nemzetségekkel rokon szekvenciákat is kimutattunk, melyeket nem sikerült tenyésztésbe vonni, így a *Bradyrhizobium* és *Devosia* nemzetségek tagjait. Az egyik klónszekvencia 99%-os hasonlóságot mutatott a *VINUESA et al.* (2005) által leírt *Bradyrhizobium canariense* fajjal, mely egy savtűrő endoszymbionta, ami a Kanári-szigeteken honos rekettye-féle hüvelyes növényekben (Papilionoideae: Genisteae) képez gümőt. Ugyancsak faji szinten azonosítottuk a *Variovorax ginsengisoli*-t, egy Gram-negatív, aerob vagy fakultatív anaerob, spórát nem képző, mozgásképes, pálcika alakú denitrifikáló baktériumot, melyet egy dél-koreai ginzengföld talajából izoláltak (*IM et al.* 2010).

A Gömör-Tornai-karszt talajmintáiból 10 baktériumtörzs és mindössze 1 klónszekvencia tartozott a Bacteroidetes filogenetikai törzsbe. Közülük nemzetség szinten tudtuk azonosítani a talajokban gyakori előfordulású *Flavobacterium*, *Solitalea* és *Pedobacter* genuszokat.

A klónozás során nagy számban kerültek elő az Acidobacteria törzssel rokon szekvenciák, mely csoportba tartozó baktériumok tenyésztéssel csak nehezen mutathatók ki speciális tápanyagigényeik miatt. Ezen kívül azonosítottunk még a Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes és Chloroflexi törzsekbe tartozó klónokat is.

4. Összefoglalás

A Gömör-Tornai-karszt két mintavételi pontján, 2010 őszén gyűjtött talajmintákon végeztünk tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris mikrobiológiai vizsgálatokat. A tenyésztéses vizsgálatok során a baktériumtörzseket az Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria és Bacteroidetes filogenetikai törzsek fajaiként azonosítottuk, melyek közül az Actinobacteria törzs tagjai fordultak elő a legnagyobb arányban. Tenyésztéssel a talajok baktériumközösségeiben Gram-pozitív dominanciát tapasztaltunk, és elsősorban az aerob, kemoorganotróf heterotróf anyagcserét folytató, talajokban gyakori előfordulású, nagy tűrőképességű és széleskörű anyagcsere-potenciállal bíró szervezeteket tudtuk kimutatni. Klónkönyvtár elemzéssel a talaj-baktériumközösségek szélesebb körű diverzitását tártuk fel. A tenyésztéssel kimutatott taxonokon kívül a Chloroflexi, Acidobacteria, Verrucomicrobia és Gemmatimonadetes törzsek, valamint a Deltaproteobacteria osztály képviselői is előkerültek, vagyis számos sajátos tenyésztési igényű, illetve más anyagcserével jellemezhető szervezet, me-

lyek szintén fontos szerepet játszhatnak a talajok közösségi anyagcseréjében.

A Gömör-Tornai karsztról származó talajok baktériumközösségeit a tenyésztéses vizsgálatok eredményei alapján összehasonlítva megfigyelhető volt, hogy míg az Aggteleki-tó melletti mintában az aktinobaktériumok után a Firmicutes törzs bizonyult a második legnépesebb csoportnak, addig a Vörös-tó melletti mintában a Proteobacteria törzs tagjai fordultak elő legnagyobb arányban. Klónozásos eljárással az aktinobaktériumokkal szemben szintén a Proteobacteria törzs nagyobb arányú előfordulását tudtuk kimutatni a Vörös-tó melletti mintában.

A kutatások az OTKA T79135 sz. pályázatának támogatásával folytak.

IRODALOM

- ALEXANDRE, A. – RIGIDO, C. – LARANJO, M. – RODRIGUES, S. – OLIVEIRA, S. (2009): Survey of Chickpea Rhizobia diversity in Portugal reveals the predominance of species distinct from *Mesorhizobium ciceri* and *Mesorhizobium mediterraneum*. – *Microb. Ecol.* 58 pp. 930–941.
- BÜKI G. – KNÁB M. – MÁRIALIGETI K. – MÓGA J. – BORSODI A. (2011): Összehasonlító diverzitás vizsgálatok a Tapolcai karszt talajainak baktériumközösségein. – *Karsztfejlődés XVI.*, Szombathely, pp. 143–155.
- 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 pp. 2259–2261.
- DARABOS G. (1997): Mikroorganizmus-közösségek karsztkorróziós szerepének laboratóriumi vizsgálata az Aggteleki-karszt talajain. – Kandidátusi értekezés, ELTE, Budapest, Kézirat.
- ELSHAHED, M.S. – YOUSSEF, N.H. – SPAIN, A.M. – SHEIK, C. – NAJAR, F.Z. – SUKHARNIKOV, L.O. – ROE, B.A. – DAVIS, J.P. – SCHLOSS, P.D. – BAILEY, V.L. – KRUMHOLZ, L.R. (2008): Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. – *Appl Environ Microbiol.* 74 pp. 5422–5428.
- IM, W.T. – LIU, Q.M. – LEE, K.J. – KIM, S.Y. – LEE, S.T. – YI, T.H. (2010): *Variovorax ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 pp. 1565–1569.
- JANGID, K. – WILLIAMS, M.A. – FRANZLUEBBERS, A.J. – BLAIR, J.M. – COLEMAN, D.C. – WHITMAN, W.B. (2010): Development of soil

- microbial communities during tallgrass prairie restoration. – *Soil Biol. Biochem.* 42 pp. 302–312.
- JANGID, K. – WILLIAMS, M.A. – FRANZLUEBBERS, A.J. – SCHMIDT, T.M. – COLEMAN, D.C. – WHITMAN, W.B. (2011): Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. – *Soil Biol. Biochem.* 43 pp. 2184–2193.
- 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.*, NyME, TTK, Természetföldrajzi Tanszék, Szombathely, pp. 35–48.
- KNÁB, M. – SZILI-KOVÁCS, T. – KISS, K. – PALATINSZKY, M. – MÁRIALIGETI, K. – MÓGA, J. – BORSODI, A.K. (2012): Comparison of soil microbial communities from two distinct karst areas in Hungary. – *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 59 pp. 91–105.
- LEE, S.D. (2007): *Marmoricola aequoreus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 pp. 1391–1395.
- 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 pp. 669–681.
- MÓGA J. – KISS K. – SZABÓ M. – KÉRINÉ BORSODI A. – KÉRI A. – MARI L. – KNÁB M. – IVÁN V. (2011): Természeti és antropogén hatások vizsgálata a Tapolcai-karszt epikarsztos rendszerében. – *Karsztfejlődés XVI.*, NyME, TTK, Természetföldrajzi Tanszék, Szombathely, pp. 185–201.
- MÓGA J. – MARI L. – KISS K. – KÉRINÉ BORSODI A. – KÉRI A. – KNÁB M. – SZABÓ M. – DARABOS G. – VARJU ZS. – EGERVÁRI N. (2010): A karsztos táj változásainak (degradációjának) vizsgálata a Tapolcai-karszton. *Tájökológiai kutatások 2010. IV. Magyar Tájökológiai Konferencia MTA Földrajztudományi Kutatóintézete Budapest*, pp. 177–186.
- SAMBROOK, J. – RUSSELL, D. W. (2001): *Molecular Cloning*. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SZABÓ M. – KÉRINÉ BORSODI A. – KISS K. – KNÁB M. – KÉRI A. – HAJDUNÉ DARABOS G. – MÓGA J. (2010): Hazai karsztavak tájökológiai szemléletű állapotfelmérése. – *IV. Magyar Tájökológiai Konferencia MTA Földrajztudományi Kutatóintézete Budapest*, pp. 255–261.

- UPCHURCH, R. – CHIU, C.Y. – EVERETT, K. – DYSZYNSKI, G. – COLEMAN, D.C. – WHITMAN, W.B. (2008): Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. *Soil Biol. –Biochem.* 40 pp. 1294–1305.
- VINUESA, P. – LEÓN-BARRIOS, M. – SILVA, C. – WILLEMS, A. – JARABO-LORENZO, A. – PÉREZ-GALDONA, R. – WERNER, D. – MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2005): *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acidtolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 pp. 569–575.
- WUST, P.K. – HORN, M.A. – DRAKE, H.L. (2011): Clostridiaceae and Enterobacteriaceae as active fermenters in earthworm gut content. *ISME J* 5 pp. 92–106.
- ZÁMBÓ, L. (1998): The experimental examination of microbial origin corrosion aggressivity of karst soils. – *Acta Carsologica* XXVII/1, pp. 16-25.