

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

MISETA ROLAND

A HARKÁNYI GYÓGYFÜRDŐ TERMELŐKÚTJAINAK KÉNES
KARSZTVIZÉBEN ELŐFORDULÓ BAKTÉRIUMKÖZÖSSÉGEK
FILOGENETIKAI DIVERZITÁSA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI



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. Bevezetés

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 világszámhoz (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. Hazánkban a 30°C -ot meghaladó hőmérsékletű kifolyó víz termálvíznek (hévíznek) tekinthető. 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 ivókúraként az emésztőrendszer funkciójának javítására alkalmasak. Ilyen gyógyhatású víz a Harkányban található magas kéntartalmú langyos- és termálvíz, melynek az elsősorban reumás mozgásszervi megbetegedésekre gyakorolt kedvező hatása a vízben oldott redukált kénvegyületekkel hozható összefüggésbe.

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

2. Célkitűzések

Munkánk egyik célja volt a Harkányi Gyógyfürdőt szolgáló karsztvízbázisokra telepített termelőkutak vizében előforduló baktériumok jellegzetes morfológiai típusainak és az abioszeszton alkotóinak fény- és elektronmikroszkópos vizsgálata.

A jelen munka másik célja a baktériumközösségek összetételének, a közösségek filogenetikai diverzitásának, különös tekintettel a gyógyvíz kémiai összetételének alakításában is résztvevő kénbaktériumoknak a feltárása volt.

További célként tűztük ki, hogy tavaszi, nyári és őszi évszakos mintavételeket követően a geológiai és áramlási viszonyok ismeretében feltérképezzük a baktériumközösségek szerkezetében bekövetkező esetleges térbeli és időbeli változásokat.

Célul tűztük ki továbbá, hogy a feltárt baktériumközösségeken összehasonlító elemzést végezzünk statisztikai módszerek alkalmazásával.

3. Anyag és módszer

A kitűzött célok eléréséhez a Harkányi Gyógyfürdő négy termelőkútjából (Büdöstopolca I-es kút, Büdöstopolca II-es kút, Matty-kút, Termál VI-os kút) 2006 és 2008 között gyűjtöttünk vízmintákat (1. táblázat).

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

	Büdöstopolca I-es kút		Büdöstopolca II-es kút		Matty-kút		Termál-VI-os kút	
	DGGE	Klónozás	DGGE	Klónozás	DGGE	Klónozás	DGGE	Klónozás
2006. 11.	-	X	-	X	-	-	-	-
2007. 04.	X	X	X	X	-	-	X	-
2007. 06.	X	-	X	-	X	-	X	-
2007. 08.	X	-	X	-	-	-	X	-
2008. 04.	X	-	X	-	X	X	X	-
2008. 08.	X	-	X	-	X	-	X	-
2008. 11.	X	-	X	-	X	-	X	X

A vízmintákból tömörítéssel nyert biomasszák formált szerkezetét fáziskontraszt mikroszkóppal és pásztázó elektronmikroszkóppal tanulmányoztuk.

A baktériumközösségek szerkezetének részletes feltárását a 16S RNS génjének vizsgálatán alapuló molekuláris klónozás módszerével végeztük. Az egyes kutakra jellemző baktériumközösségek összetételét a molekuláris klónok bázissorrend elemzése révén tártuk fel. A baktériumközösségek filogenetikai diverzitásának térbeli eltéréseit és időbeli változását egy molekuláris ujjlenyomat módszer, a denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) alkalmazásával követtük nyomon. A közösségek változását a DGGE-mintázatok összehasonlításával, továbbá a kivágott DGGE-csíkokból nyert 16S rDNS szekvenciák azonosítása alapján végeztük el.

A klónkönyvtárak közti különbségek megállapításához *Bray-Curtis* hasonlósági indexet számoltunk, a fajgazdagság becslésére fajtelítődési görbét állítottunk fel.

4. Eredmények és értékelésük

A langyos vizű kutakból származó minták biomasszájában a fénymikroszkópos vizsgálatok során *Thiothrix*-szerű fonalakat, illetve fonalak által alkotott fűcsomó-szerű trichómákat találtunk. A sejtfonalakban eltérő fénytörésű és fényáteresztő képességű kénszemcsék sejten belüli felhalmozódását figyeltük meg. A pásztázó elektronmikroszkópos felvételek során a biomassza abiotikus alkotóelemeként 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 anyagcserejű baktériumokkal álltak a legközelebbi filogenetikai kapcsolatban. Emellett a DGGE vizsgálatok során nyert szekvenciák elemzésével további két (Gram-pozitív) törzs taxonjait is kimutattuk.

A 2006 novemberéből a bűdöstapolcai termelőkutakból származó kompozitminta (BTK) 76 klónszekvenciából állt, melyek 9 különböző filotípust képviseltek. A BTK egyben a legnépesebb klónkönyvtár volt, melynek közösségét legnagyobb arányban a Gamma- és Epsilonproteobacteria osztályba tartozó szulfid-, illetve kénoxidáló kemolitotróf baktériumok képviselői, valamint szulfátredukáló deltaproteobaktériumokkal rokon klónok alkották. Emellett egyéb, kénredukáló deltaproteobaktériumokkal rokon- és kemolitotróf kénoxidáló bétaproteobaktériumokkal 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* doménon belül fejlődéstanilag az egyik legújabb, ugyanakkor a legtöbb ismert nemzetséget és fajt magába foglaló baktériumtörzs.

A BT1 klónkönyvtárból származó 46 klón 10 filotípust képviselt, melyek egy klón kivételével a Proteobacteria törzs tagjai voltak. A legnagyobb számban (35 klón) képviselt Epsilonproteobacteria-klónok anaerob kénoxidáló kemolitotróf fajokkal mutattak rokoni kapcsolatot. Emellett a BT1 közösségben viszonylag nagyobb arányban különböző mikroaerofil, kénoxidáló kemolitotróf bétaproteobaktériumok képviselői is előfordultak, ugyanakkor a kemolitotróf gammaproteobaktériumokkal és szulfátredukálókkal rokon

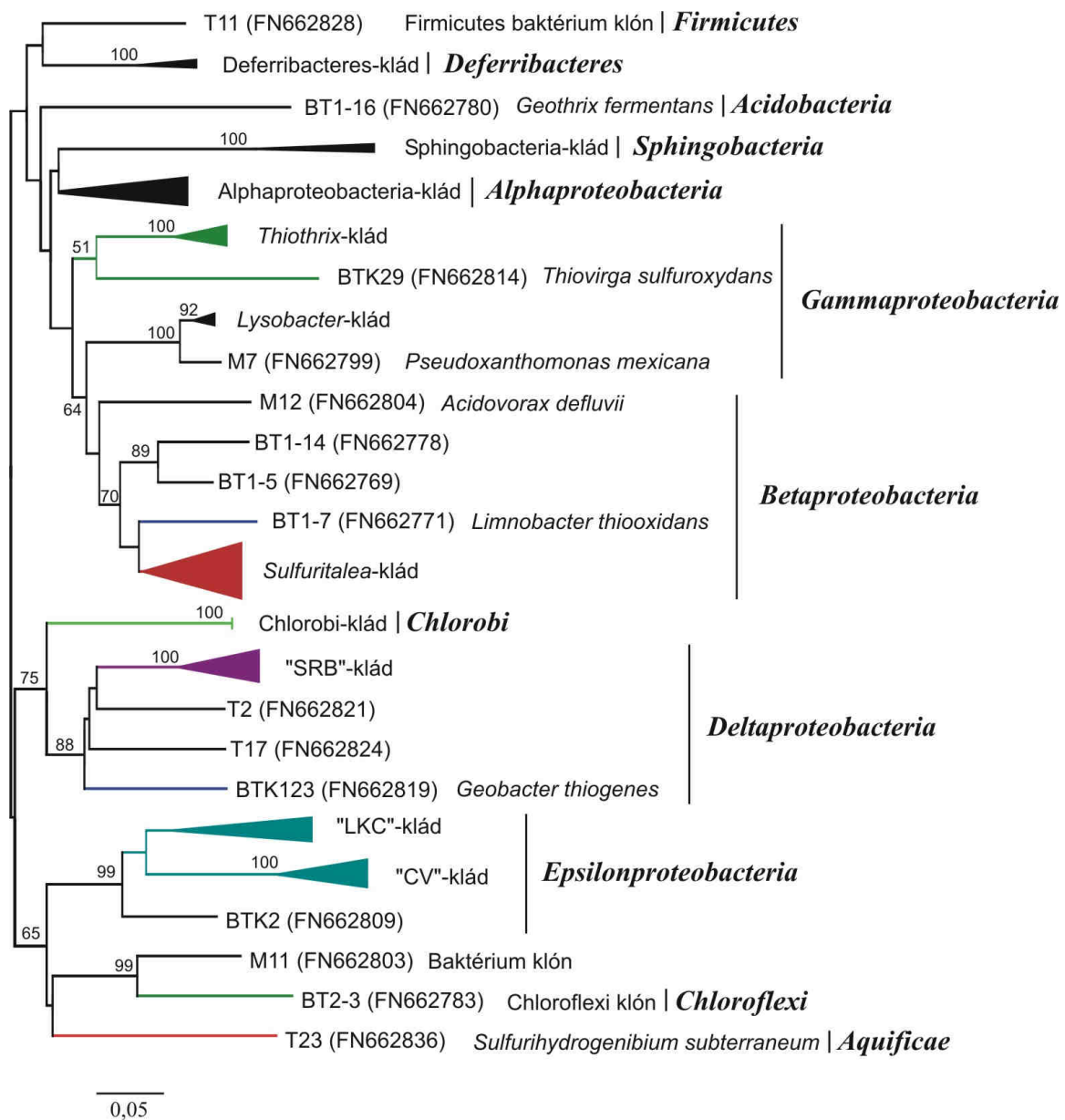
szekvenciákat ebben a klónkönyvtárban nem tudtunk kimutatni. Csupán egy anaerob kénredukáló fajjal rokon klónt sikerült azonosítanunk, amely a kén-redukációs folyamatokban játszhat szerepet.

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 kénoxidáló baktériumokkal rokon BTK klónokkal megegyező szekvenciákat a BT2 könyvtár is tartalmazott.

A mattyi karsztvízbázis áramlástanai szempontból kevert genetikájú, ami a baktériumközösség-összetételében is tükröződött, hiszen a mattyi klónkönyvtár csak részben hasonlított a bűdöstapolcai klónkönyvtárakhoz. A bűdöstapolcai 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 is azonosítottunk. A 18 klón alkotta klónkönyvtár tagjai 13 különböző filogenetikai csoport között egyenletesen oszlottak el, emiatt valódi dominancia viszonyokat itt sem tudtunk megállapítani.

A négy termelőkútból származó vízminta fizikai-kémiai profiljának összehasonlítása során a legnagyobb mértékű eltérést a termálkútból származó víz mutatta, különösképpen a vízhőmérséklet, valamint a szulfid-koncentráció tekintetében. Ez a különbség a klónkönyvtárak összetételében is megmutatkozott, hiszen a T6 klónkönyvtárban az epszilonproteobaktériumok és szulfátredukálók, valamint a fonalas *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, redukzív, anoxikus élettereknek. Az ősi jelleg nemcsak a termálkút kifolyó vizének fizikai-kémiai

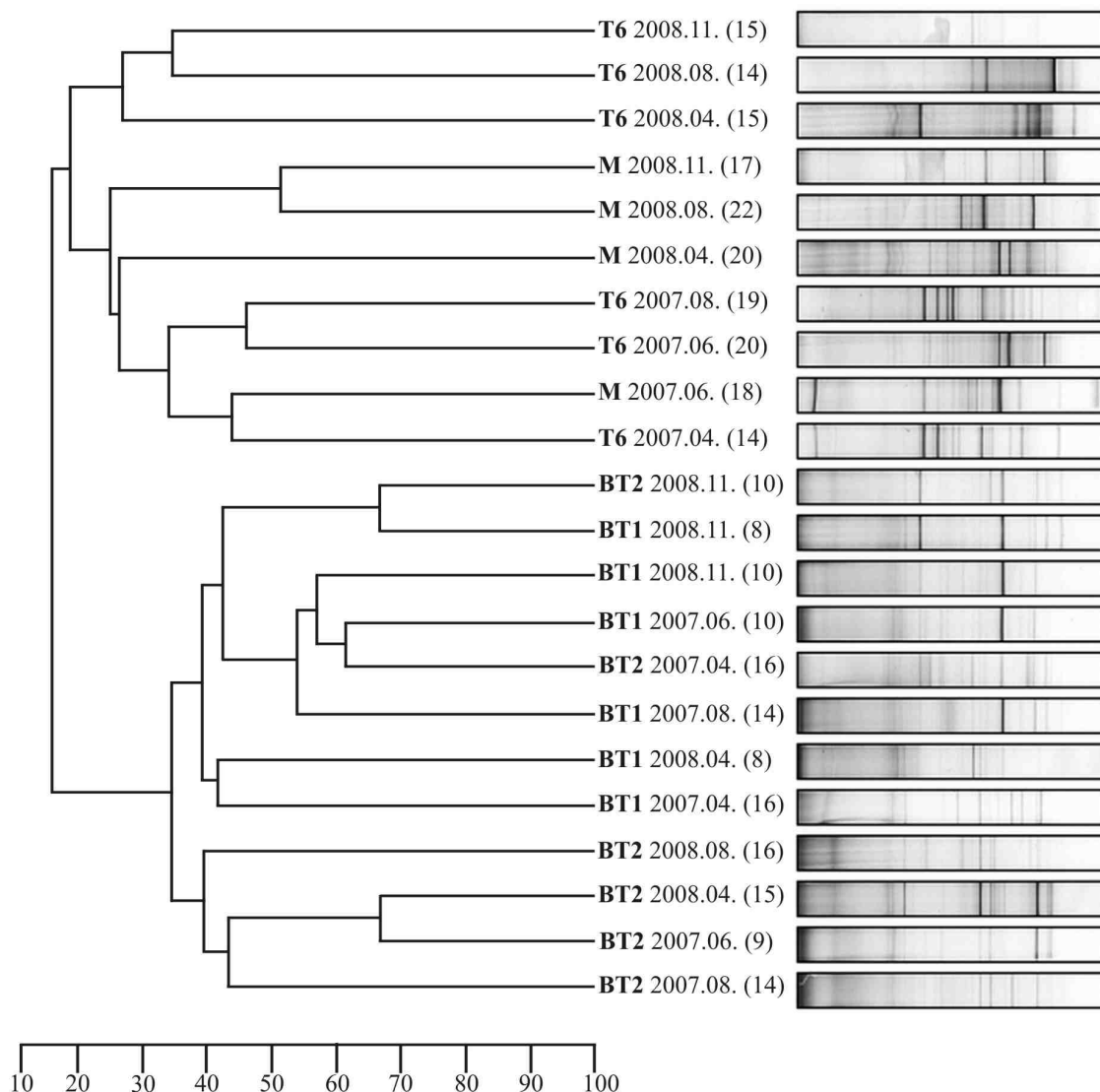
paramétereiben, hanem részben a baktériumközösség összetételében is megmutatkozott. A T6 klónkönyvtár elemzése során 48 klónt azonosítottunk, melyek 9 filotípust képviseltek. A legmeghatározóbb közösségalkotó csoportot (34 klón) egy anaerob kénoxidáló kemolitotróf fajjal kládot alkotó bétaproteobaktérium-klóncsoport képviselte, melyet a langyosvizű bűdöstapolcai és mattyi mintákban is megtaláltunk. Emellett a szulfid- és kénoxidációs folyamatokban a Proteobacteria törzstől távoli leágazású ősi típusú anaerob kemolitotrófok (*Aquificae*) és anaerob fototróf baktériumok (*Chlorobi*) is részt vettek, amelyeket a termálkútból származó klónkönyvtárból tudtunk kimutatni.



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

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 kapcsolatuk szerint kládokba rendeztük, és a kládok filogenetikai kapcsolatait törzsfán ábrázoltuk (1. ábra).

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 (2. ábra).



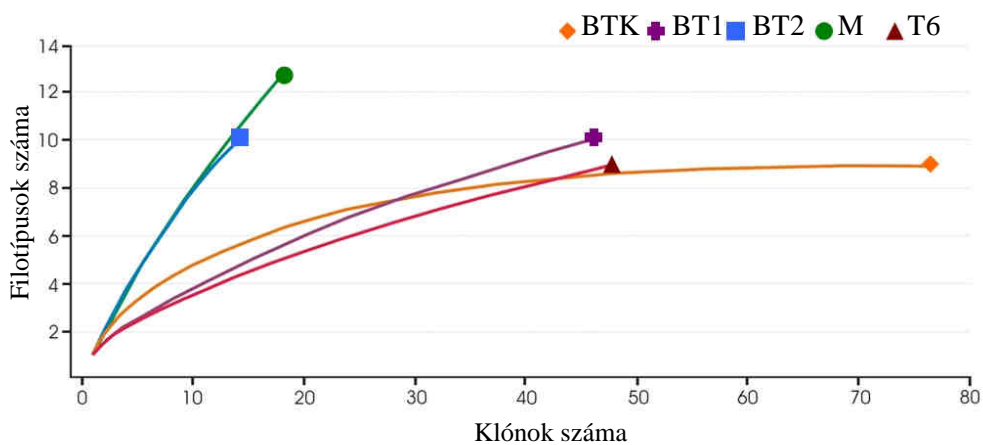
2. ábra A Harkányi Gyógyfürdő vizsgált termelőkútjainak vizéből származó baktériumközösségek DGGE sávmintázatai alapján készült UPGMA dendrogram

(Zárójelben a DGGE sávok darabszáma szerepel. Skála: a sávmintázatok hasonlósági értéke százalékban megadva. 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)

A Büdöstopolca I-es, Büdöstopolca 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 *Bray-Curtis* hasonlósági indexek szerint a legkisebb különbség a BTK és BT1 könyvtárak között mutatkozott. A középtartományba eső értékeket 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. 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. A legmagasabb *BC*-index-értéket a T6 és M klónkönyvtárak mutatták, tehát ezen klónkönyvtárak közösség szerkezete 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 közösség szerkezete különbözött a legnagyobb mértékben a többi közösségtől is. A T6 könyvtár nagymértékű eltérésének hátterében feltehetően a Termál VI.-os kút vizének a többi termelő kút vizétől lényegesen eltérő fizikai-kémiai profilja áll, amelyhez a langyos vizű kutakból származó közösségektől eltérő mikrobaközösség tudott adaptálódni.

Az egyes klónközösségek egymástól eltérő lefutású fajtelítődési görbékkel voltak jellemezhetők (3. ábra).



3. ábra Fajtelítődési görbék a 16S rDNS szekvencián alapuló klónkönyvtárak összetétele alapján

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

A BTK, BT1 és T6 közösségek megközelítették a telítődési pontot (a várható fajszámot), tehát ezekről a baktériumközösségekről megközelítően valós képet kaptunk, míg a BT2 és M klónkönyvtárak görbéi meredeken értek véget, azaz a klónkönyvtárak mérete nem volt elegendően nagy ahhoz, hogy a valóshoz közeli közösség-szerkezeti képet kapjunk.

A vizsgált termelőkutak kifolyó vizéből származó klónkönyvtárak közösségszerkezete sok hasonlóságot mutatott számos más, földrajzilag távoli, de hasonló geológiájú és fizikokémiai tulajdonságokkal jellemezhető környezetekből (karsztos területekről, anoxikus üledékekből, kénes hévforrásokból, felszínalatti szulfidos víztározókból) származó baktériumközösségekkel.

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 célravezetők, mert a molekuláris klónozáshoz kinyert biomasszamenyiség 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 nagyobb klónszámú klónkönyvtárat, és részletesebb közösségi képet eredményezhet, így lehetőség nyílhat a kis létszámú rejtőzködő taxonok kimutatására is.

Archaea-domén specifikus primerek alkalmazásával új 16S rRNS gén-alapú klónkönyvtárakat állíthatunk fel, így fény derülhet az ősbaktériumok 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.

5. A tézis alapjául szolgáló közlemények

Referált tudományos folyóiratokban megjelent cikkek:

Miseta, R., Palatinszky, M., Makk, J., K., Borsodi, A, Márialigeti, K. (2012): Phylogenetic diversity of bacterial communities associated with sulfurous karstic well waters of a Hungarian spa. *Geomicrobiology Journal*, 29, 101-113.

(doi: 10.1080/01490451.2011.558563) IMP: 2.017

Miseta, R., Palatinszky, M., Márialigeti, K., Borsodi, A. (2009): Molecular biological investigations on the bacterial communities of curative well waters of Harkány Spa. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56 (4), 357-368.

(doi:10.1556/AMicr.56.2009.4.5)

Miseta, R., Palatinszky, M., Márialigeti, K., Borsodi, A. (2010): A Harkányi Gyógyfürdőhöz tartozó karsztút-vizek baktériumközösségeinek filogenetikai diverzitása. *Hidrológiai Közlöny*, 90 (6), 103-105.

Miseta, R., Palatinszky, M., Márialigeti, K., Borsodi, A. (2009): Molekuláris biológiai vizsgálatok a harkányfürdői kutak gyógyvizének baktériumközösségein. *Hidrológiai Közlöny*, 89 (6), 152-155.

Miseta, R., Palatinszky, M., Márialigeti, K., Borsodi, A. (2008): A Harkány környéki termál karsztvizek baktériumközösségei. *Hidrológiai Közlöny*, 88 (6), 133-137.

Konferencia részvétel:

Miseta, R., Nardai Ilona, Palatinszky, M., Márialigeti, K., Borsodi, A. (2008): A harkányfürdői gyógyvízbázisok baktériumközösségeinek molekuláris biológiai vizsgálata és szerepe a gyógyászatban. (előadás) Magyar Balneológiai Egyesület 2008. évi Nagygyűlése, Zalakaros, 2008. 11. 14-16.

Miseta, R., Palatinszky, M., Márialigeti, K., Borsodi, A. (2008): Molekuláris biológiai vizsgálatok a harkányfürdői kutak gyógyvizének baktériumközösségein. (előadás; kivonat: MMT 2008. évi Nagygyűlése és XI. Fermentációs Kollokvium Absztraktfüzet p.55) Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése, Keszthely, 2008. 10. 15-17.

Miseta, R., Palatinszky, M., Márialigeti, K., Borsodi, A. (2007): Bacterial communities of thermal karstic wells of South Transdanubium. (poszter; kivonat: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54, p.85) Magyar Mikrobiológiai Társaság XV. Nemzetközi Konferenciája, Budapest, 2007. 07. 18-20.