

# Szakmai jelentés

*Green Arsenal 2021-01 minta molekuláris biológiai analízise*

**Megrendelő: IMSYS Mérnöki Szolgáltató Kft.**  
1033 Budapest, Mozaik u. 14a

**Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft.**

**Biotechnológiai Divízió**

*Alkalmazott Mikrobiológiai Osztály*

**2021**

## ELŐZMÉNYEK

Megbízást kaptunk az IMSYS Kft.-től a Green Arsenal 2021-01 minta molekuláris biológiai vizsgálatára.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### AEROB/ANAEROB ÖSSZCSÍRASZÁM MEGHATÁROZÁS

A mikroorganizmus tartalmú mintából tíz, illetve ezerszeres hígításban 100 µl-t komplett komponenseket tartalmazó táptalajra szélesztettük (DSM-FV). A mintákat 25 °C-on inkubáltuk aerob/anaerob körülmények között, majd 48/72 óra múlva leolvastuk a sejtszámokat.

### DENITRIFIKÁCIÓRA KÉPES MIKROORGANIZMUSOK ARÁNYÁNAK MEGADÁSA

Az anaerob, denitrifikációra képes mikroorganizmusok számát fenolvörös indikátort tartalmazó táptalajon (DSM-FV) határoztuk meg anaerob körülmények között. A teszt lényege, hogy a nitrát tartalmú táptalajon a nitrát és nitrit redukációjára képes mikroorganizmusok körül eltérő színű gyűrűk jelennek meg.

### DSM-FP TÁPTALAJ ÖSSZETÉTELE:

DSM-(FP)	
Pepton	5 g
Yeast extract	1,5 g
Meat extrakt	10 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
Fenolvörös indikátor	0,05 g
Agar	15 g
Desztillált víz	1 000 ml

### DNS IZOLÁLÁS

A DNS vizsgálathoz 50 ml talajvíz mintát 5 500 rpm-en, 30 percig, 25 °C-on összecentrifugáltunk, majd a kapott üledékből Mo Bio PowerSoil® DNA Isolation kittel DNS-t izoláltunk. A preparálás során a gyártó előírásai szerint jártunk el.

Az izolált DNS-ek koncentrációját Qubit 2.0 Fluorimeterrel (Invitrogen) határoztuk meg a gyártói útmutatások szerint.

A PCR reakciók elvégzéséig minden DNS mintát -20 °C-on tároltunk.

## ÖSSZ EUBAKTÉRIUM KÓPIASZÁMMEGHATÁROZÁSA KVANTITATÍV PCR REAKCIÓVAL

A preparált DNS-ről 16S qPCR reakciót végeztünk, melyhez a kalibrációt ismert kópiaszámú baktérium DNS-en elvégzett reakciók adják.

Az alkalmazott primerek:

**338F** 5' - ACT CCT ACG GGA GGC AGC A - 3'

**515R** 5' - A TTA CCG CGG CTG CTG G - 3'.

A reakció során Taq (*Thermus aquaticus*) polimerázt használunk a gyártó utasítása szerint (Fast Start Essential DNA Green Master, Roche). Az alkalmazott program: 95 °C 10', (95 °C 10", 55 °C 10", 72 °C 15") 45 ciklus, a készülék: Light Cycler 96 (Roche). A reakciót 20 µl térfogatban mértük össze.

## MIKROBIÁLIS ÖSSZETÉTEL VIZSGÁLAT GENOMSZEKVENÁLÁSSAL

A talajmintában élő baktériumok össz-genomi DNS-ét, az ún. metagenomot DNeasy PowerSoil (Qiagen) DNS tisztító kit felhasználásával tisztítottuk a gyártó útmutatásai szerint. A tisztított DNS mennyiségét Qubit® dsDNA HS Assay Kittel (Invitrogen) mértük meg.

A minták mikrobiális összetételének jellemzéséhez az eubaktériumok 16S riboszomális RNS génjének V1-V3 variabilis régióit PCR segítségével amplifikáltuk. Ehhez a 28F és 519R primereket használtuk. Az elkészült poolozott, minőségellenőrzött és qPCR-rel kvantifikált könyvtárak szekvenálása Illumina MiSeq genomszekvenáló platformon történt. Átlagos paired-end reads szám 200 000/minta. A nyersreadek szűrés, trimmelés után Illumina referencia adatbázishoz hasonlítva kerültek kiértékelésre.

## EREDMÉNYEK

### KÓPIASZÁM - CSÍRASZÁM

Az intézetünkbe beérkező minta összcsíraszámát kvantitatív PCR módszerrel (16S rDNS kópiaszám) határoztuk meg. A minta kópiaszáma  $2,24 \times 10^8$  kópia/ml volt. A 16S rDNS gén legtöbbször több példányban (kópiában) található meg az egyes baktériumok genomjában, mellyel kalkulálva a minta sejtszáma  $3-7 \times 10^7$  baktériumsejt/ml között lehet.

### 16S POPULÁCIÓÖSSZETÉTEL VIZSGÁLAT

A továbbiakban elvégeztük a minta metagenom analízisét, melynek kivonatos táblázatát jelen jegyzőkönyv, míg az összetettebb, interaktív ábráját tartalmazó formáját a csatolt .html fájl tartalmazza.

A kapott adatok alapján elmondható, hogy a minta bakteriális összetétele nemcsak egy mesterséges mintához, de akár egy talajvízhez képest is komplexnek tekinthető. A vizsgálat 2680 különböző baktérium 16S rDNS szekvenciáját tudta elkülöníteni, melyek közül 1332 fordult elő legalább öt példányban (kópiában). A mintában nem található olyan baktériumtörzs, amely kiugróan magas egyedszámmal képviseltetné magát, a legabundánsabb baktérium részaránya is csak 4,67%. Több olyan baktérium nemzetség

is jelentős mennyiségben megtalálható a mintában, melyek tagjait mindezidáig laboratóriumban nem sikerült fenntartani, így a róluk szóló ismeretanyag mindösszesen a metagenom analízisekből kinyert DNS információtartalmára vonatkozik. Ezeknek a mikroorganizmusoknak a valós tulajdonságaikat csak feltételezhetjük a génjeikből származó információk által. Meglepő azonban, hogy mindezek ellenére a tenyészhető csíraszám csak egy nagyságrenddel marad el a 16S rDNS kópiaszámon alapuló csíraszámbecsléstől.

Minta	Aerob	Anaerob	Denitrifikáló
	összcsíraszám	összcsíraszám	csíraszám
	Élőcsíra/ml		
<b>Green Arsenal 2021-01</b>	9,4 x 10 <sup>6</sup>	8,6 x 10 <sup>6</sup>	8,4 x 10 <sup>6</sup>

A következő táblázatokban egy-egy rövid jellemzéssel bemutatjuk a mintában található leggyakoribb találatokat ([OTUs](#): operational taxonomy units), baktérium nemenként összevonva. (Nem – Genus: faj feletti rendszertani kategória. A 16S vizsgálatok során ez az a legkisebb rendszertani kategória, ami még általában pontosan megállapítható.)

Szeged, 2021.05.10.

Dr. Fehér Balázs  
Osztályvezető

Rendszertani besorolás		Arány a metagenomban (%)	Taxonomiai egységek (OTUk/fajok száma)	Rövid jellemzés
Törzs	Parcubacteria	10,996	19	A parclubaktériumok törzsébe tartozó baktériumokat mindezidáig laboratóriumban nem sikerült egyedi kultúrában növeszteni, így lehetséges tulajdonságaikat csak a genomjuk alapján ismerjük. A feltételezések szerint endoszimbionta baktériumok, melyeket eddig leggyakrabban a talajok gyökérszónájából izolálták.
Osztály	Ismeretlen			
Rend	Ismeretlen			
Család	Ismeretlen			
Nem	<i>Parcubacteria</i>			
Törzs	Proteobacteria	5,895	79	Az adott szekvencia csak rend szintig volt meghatározható. A Rhizobiales rendbe jelenleg 14 baktériumcsalád tartozik, de genetikai adatok alapján még további 11 valószínűsíthető. A családok közül négybe tartoznak a növények gyökerével szimbiózisban élő nitrogénfixáló baktériumok, illetve a növénypatogén <i>Agrobacteriumok</i> is. A további családok között egyaránt megtalálhatóak metanotrófok és humán patogének ( <i>Brucella</i> ).
Osztály	Alphaproteobacteria			
Rend	Rhizobiales			
Család	Ismeretlen			
Nem	Ismeretlen			
Törzs	Acidobacteria	3,373	28	Az Acidobaktériumok az egyik legelterjedtebb baktériumtörzs a Földön. A talajok mikroflórájának kb. 20%-át adják az ebbe a törzsbe tartozó baktériumok. Azonban laboratóriumi tenyésztésük nehézsége miatt, csak 1991-ben izolálták a legelső ide tartozó fajt. Azóta is elsősorban genetikai információk alapján ismerjük meg az új fajokat. A legtöbbjük aerob/mikroaerob/fakultatív anaerob, továbbá sokuk savtűrő/savkedvelő. A GP6 alcsoport talajokban a leggyakoribb.
Osztály	Acidobacteria_Gp6			
Rend	Unclassified			
Család	Unclassified			
Nem	<i>Gp6</i>			
Törzs	Bacteroidetes	2,560	2	Aerob heterotróf baktériumok, eddig 11 fajukat azonosították, leginkább tengervízből, tengeri üledékből, tengeri csigából, de legalább egy fajt talajból is.
Osztály	Sphingobacteriia			
Rend	Sphingobacteriales			
Család	Saprospiraceae			
Nem	<i>Lewinella</i>			
Törzs	Proteobacteria	2,282	3	Fakultatív anaerob baktériumok. Ezek a mikroorganizmusok leggyakrabban édesvíztározókban, talajban és mezőgazdasági termékekben találhatóak meg. de halak, hullók, kételtűek és magasabb gerincesek gyomor-bélrendszeri tartalmából is izolálták már ezeket a mikrobákat. Dokumentáltan részt vesznek mind a bél-, mind az extraintesztinális emberi fertőzésekben.
Osztály	Gammaproteobacteria			
Rend	Aeromonadales			
Család	Aeromonadaceae			
Nem	<i>Aeromonas</i>			

Rendszertani besorolás		Arány a metagenomban (%)	Taxonomiai egységek (OTUk/fajok száma)	Rövid jellemzés
Törzs	Ismeretlen	2,228	1	Az adott szekvencia nem mutatott rokonságot semmilyen az adatbázisban tárolt szekvenciával, ezért még törzs szinten sem lehetett beazonosítani.
Osztály	Ismeretlen			
Rend	Ismeretlen			
Család	Ismeretlen			
Nem	Ismeretlen			
Törzs	Gemmatimonadetes	1,952	4	A taxon beletartozik a kilenc leggyakoribb talajban előforduló baktériumtörzsbe. Átlagosan a talaj mikrobiom 2%-át teszik ki az ide tartozó baktériumok. Laboratóriumban nehezen tenyészthetők, mindezidáig mindösszesen 6 izolátumot írtak le. A talajon kívül édesvízből és édesvízi üledékből mutatták ki őket nagyobb számban. Aerobok, vagy fakultatív anaerobok, legalább egy fajuk fotoheterotróf, vagyis fotoszintézisre is képes.
Osztály	Gemmatimonadetes			
Rend	Gemmatimonadales			
Család	Gemmatimonadaceae			
Nem	<i>Gemmatimonas</i>			
Törzs	Bacteroidetes	1,488	14	Aerob, heterotróf baktériumok. Több mint 50 nem tartozik ebbe a családba, igen változatos tulajdonságokkal. Fontos szerepük van a szervesanyagok (pl. komplex poliszaharidok) lebontásában. Gyakran találhatóak hideg környezetben, pl. sarkvidéki tengerekben.
Osztály	Flavobacteriia			
Rend	Flavobacteriales			
Család	Flavobacteriaceae			
Nem	Ismeretlen			
Törzs	Actinobacteria	1,480	4	Nagyon gyakori aerob talajlakó baktériumok. Változatos szubsztrátkört képesek lebontani, egyes fajoknak bioremediációs jelentősége is meghatározó.
Osztály	Actinobacteria			
Rend	Actinomycetales			
Család	Micrococcaceae			
Nem	<i>Arthrobacter</i>			
Törzs	Verrucomicrobia	1,476	7	Heterotróf, fakultatív anaerob baktériumok, melyeket elsősorban (eutróf) tavakból izoláltak.
Osztály	Subdivision3			
Rend	Unclassified			
Család	Unclassified			
Nem	<i>Verrucomicrobium</i>			

Rendszertani besorolás		Arány a metagenomban (%)	Taxonomiai egységek (fajok száma)	Rövid jellemzés
Törzs	Proteobacteria	1,259	12	Nagyon gyakori baktériumnem a legtöbbjük laboratóriumban is jól szaporítható, csaknem 200 faj tartozik ide. Változatos élőhelyeken találhatóak meg, nagyon széleskörű lebontó kapacitással rendelkeznek.
Osztály	Gammaproteobacteria			
Rend	Pseudomonadales			
Család	Pseudomonadaceae			
Nem	<i>Pseudomonas</i>			
Törzs	Proteobacteria	1,229	3	Többségében talajból izolált aerob baktériumok.
Osztály	Betaproteobacteria			
Rend	Burkholderiales			
Család	Comamonadaceae			
Nem	<i>Ramlibacter</i>			
Törzs	Planctomycetes	1,127	1	Aerob heterotróf baktériumok, melyeket eddig édesvízből, szennyvíztelepről és talajból izoláltak.
Osztály	Planctomycetia			
Rend	Planctomycetales			
Család	Planctomycetaceae			
Nem	<i>Gemmata</i>			
Törzs	Chlamydiae	0,924	1	Az egyetlen ebbe a nembe tartozó faj a <i>Simkania negevensis</i> , mely egy intracelluláris patogén organizmus.
Osztály	Chlamydia			
Rend	Chlamydiales			
Család	Simkaniaceae			
Nem	<i>Simkania</i>			
Törzs	Firmicutes	0,919	1	Anaerob baktériumok talajban viszonylag gyakoriak. Ez a rend változatos: fotoheterotróf baktériumok és több ismert humán patogén is megtalálható közöttük. Sokféle komplex növényi poliszaharid lebontására képesek.
Osztály	Clostridia			
Rend	Clostridiales			
Család	Ismeretlen			
Nem	Ismeretlen			