

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Baktériumközösségek diverzitása és
foszforforgalmi szerepe a Balaton és kiskunsági
szikes vízterek üledékében**

**Diversity of sediment bacterial communities and
their role in the phosphorus cycle in Lake
Balaton and soda lakes of Kiskunság**

Szabó Gitta

Témavezetők:

Dr. Borsodi Andrea és Prof. Dr. Dévai György
egyetemi docens professzor emeritus



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2011

1. Bevezetés és célkitűzések

A szikes vizek a világ legproduktívabb vizes élőhelyei közé tartoznak (Duckworth et al., 1996; Jones et al., 1998; Doronina et al., 2003). Ezeket a különleges, alkalikus és magas sótartalommal jellemezhető élőhelyeket, túlnyomórészt alkalofil és halofil prokarióta szervezetek népesítik be (Grant, 1992; Sorokin et al., 2003; Ma et al., 2004). A Kárpát-medence szikes vizei kiemelkedő jelentőségű természeti értéket képviselnek egyedülálló geológiai, hidrológiai, botanikai és zoológiai tulajdonságaiknak köszönhetően. A nagy nyíltvízi felülettel és állandó vízborítottsággal jellemezhető Fertő és Velencei-tó mellett különleges szikes vizek a kiskunsági „székek”, melyek igen sekély, nyár végén gyakran teljesen kiszáradó, hipertróf, enyhén sós vizek (Dévai et al., 2001; Boros és Vörös, 2010; Váradi és Fehér, 2010).

A Balaton Közép-Európa legnagyobb vízfelületű sekély tava, és hazánk egyedülálló természeti kincse (Istvánovics et al., 2007). A tó vízminőségi állapotában az elmúlt évtizedekben jelentős változások következtek be. A megnövekedett külső tápanyag-terhelés következtében eutrofizációja felgyorsult, és a Keszthelyi-medence a 1970-es évekre hipertrof állapotúvá vált (Herodek, 1984). A tó életét és idegenforgalmi hasznosítását egyaránt veszélyeztető folyamatok megállítása és megfordítása érdekében 1983-ban átfogó programot indítottak a Balatonba jutó tápanyagok mennyiségének csökkentésére (Papp, 2004; Somlyódy és Honti, 2005; Tátrai et al., 2008). Ennek köszönhetően mára ismét eutróf és mezotrof állapotok jellemzik a Balatont, de az intézkedések után csak mintegy tíz év elteltével javult vízminőség, az üledékből a víztestbe kerülő foszfát mennyisége ugyanis még évekig fenntartotta a kedvezőtlen trofikus állapotot (Padisák és Reynolds, 1998; Istvánovics et al., 2007).

A sekély vízű ökoszisztémákban az üledék mikrobaközösségei összetételüktől és aktivitásuktól függően nagymértékben befolyásolják az elsődleges termelők számára hozzáférhető tápanyagok mennyiségét (Nealson, 1997; Spring et al., 2000). A Balaton példája is jól szemlélteti, hogy a külső terhelés csökkentése után az oligotrofizálásra irányuló törekvések sikerét illetően is kiemelten fontos a belső foszforterhelés eredetének és nagyságának ismerete (Jeppessen et al., 2005, Maassen et al., 2005, Tátrai et al., 2008). A foszforforgalomban központi jelentősége van a szerves foszforvegyületek mikrobiális lebontásának, amelynek során ortofoszfát szabadul fel (Jansson et al., 1988; Barik et al., 2001). Ugyanakkor az üledék baktériumközösségei a belső terhelés nagyságát annak jelentős mértékű visszatartásán keresztül is befolyásolhatják, mert egyes szervezetek nagy mennyiségben képesek a tápelemet

polifoszfát formájában felhalmozni (Uhlmann és Bauer 1988; Gächter és Meyer 1993; Khoshmanesh et al., 2002).

Világszerte számos mikrobiális vizsgálat irányult a bentikus baktériumközösségek egyes funkcionális csoportjainak megismerésére, de az üledékfelszín aerob kemoorganotróf baktériumközösségeinek összetételéről és szezonális dinamikájáról még ma is kevés információval rendelkezünk (Spring et al., 2000; Tamaki et al., 2005). Keveset tudunk továbbá arról is, hogy a víztest trofikus állapota hatással van-e a bakteriális biomassza nagyságára és a baktériumközösségek aktivitására és szerkezetére az üledékben (Maasen et al., 2003; Wobus et al., 2003). Természetes vízi ökoszisztémákban az üledéklakó polifoszfátot felhalmozó szervezetek diverzitásának vizsgálatát tudomásunk szerint eddig összesen két kutatás célozta meg (Gloess et al., 2007, 2008), és a polifoszfátraktárak fiziológiai és ökológiai jelentőségével kapcsolatosan is hiányosak még az ismereteink (Gächter és Meyer 1993; Waara et al., 1993; Hupfer et al., 2007).

Mindezek alapján két kiskunsági szikes kistóban (a Kelemen-szék és a Böddi-szék), valamint a Balaton Siófoki- és Keszthelyi-medencében az üledék felső rétegének mikrobaközösségeire irányuló munkám céljával tűztem ki:

1. az üledék felső rétegében élő aerob, kemoorganotróf baktériumok csíraszámának vizsgálatát;
2. az üledékfelszíni mikrobiális közösségek anyagcsere mintázatainak tér- és időbeli összehasonlítását BIOLOG szénforrás értékesítési vizsgálatokkal;
3. a baktériumközösségek szerkezetében bekövetkező tér-, időbeli változások vizsgálatát tenyésztéstől független molekuláris módszer (denaturáló gradiens gélelektroforézis) alkalmazásával;
4. az üledékben található aerob, kemoorganotróf baktériumok faji hovatartozásának és metabolikus tulajdonságainak feltérképezését tenyésztésen alapuló módszerekkel;
5. a tenyésztethető üledéklakó baktériumok polifoszfátot felhalmozó képességének, és a polifoszfátraktárak fiziológiai szerepének vizsgálatát.

2. Alkalmazott módszerek

A Balatonban a Siófoki- és Keszthelyi-medencében, Tihany és Keszthely térségében (N 46°55' E 17°53'; N 46°45' E 17°15'), 2-2,5 illetve 1,5-2 m mély vízből, a Kiskunsági Nemzeti Park (KNP) területén a sekély (< 0,5 m) Kelemen-székben (N 46°47' E 19°11') és a Böddi-székben (N 46°46' E 19°08') gyűjtöttünk víz- és

üledékmintákat. A mintavételi időpontokat és az elvégzett vizsgálatokat az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat A víz-és üledékminták vételének helye és ideje valamint az üledékmintákkal végzett mikrobiológiai vizsgálatok módszerei: BIOLOG közösségi szénforrás értékesítési vizsgálat, a baktériumközösségének molekuláris vizsgálata denaturáló gradiens gélelektroforézissel (DGGE), a baktériumközösségek tenyésztésen alapuló vizsgálata (Az adott üledékminta esetében alkalmazott módszert X jelöli.)

Mintavételi hely	Mintavételi időpont	BIOLOG	DGGE	Tenyésztés
Balaton, Siófoki- (46°55' E 17°53') és Keszthelyi-medence (N 46°45' E 17°15')	2004. november 17.			X
	2005. május 27.	X	X	X
	2005. augusztus 30.	X	X	X
	2005. november 11.	X	X	
Kelemen-szék (N 46°47' E 19°11') és Böddi-szék (N 46°46' E 19°08')	2004. október 22.			X
	2005. május. 13.	X	X	X
	2005. július 18.	X	X	
	2005. augusztus 25.			X
	2005. november 10.	X	X	

A víz és az üledék intersticiális vizének oldott reaktív foszfor, összes oldott foszfor és a vízminták összes foszfor koncentrációját kolorimetriás méréssel határoztuk meg. A párhuzamos üledékmagok felső, 0-3 cm-es rétegeiből, egységnyi térfogatok felhasználásával homogenizált almintákat készítettünk elő a mikrobiológiai vizsgálatokhoz. A bentikus mikrobiális közösségek szénforrás értékesítési mintázatát BIOLOG GN2 (BIOLOG Inc.) lemezekkel vizsgáltuk, amelyhez standardizált sűrűségű üledéksuszpenziókat használtunk fel. Az üledékfelszíni baktériumközösségek diverzitását egy tenyésztéstől független molekuláris módszer, a denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) segítségével hasonlítottuk össze. Ehhez közvetlenül az üledékmintákból genomiális DNS-t izoláltunk, és a 16S rDNS egy rövid szakaszát szaporítottuk fel polimeráz láncreakció segítségével. Tenyésztéses vizsgálatainkhoz összesen hatféle táptalajt használtunk. A lemezeken kifejlődő telepek száma alapján csíraszámbecslést végeztünk, majd a különálló telepeket véletlenszerűen a lemezekkel azonos összetételű ferde agarra izoláltuk. A baktériumtörzseket a 16S rDNS régió hasítási mintázata (ARDRA- amplified ribosomal DNA restriction analysis) alapján csoportosítottuk. A pontos faji meghatározás érdekében valamennyi egyedi hasítási mintázattal rendelkező törzs esetén a 16S rDNS mintegy 500 bázispárnyi szakaszán bázissorrend elemzést végeztünk. A 16S rDNS bázissorrend adatokat három internetes adatbázisban megtalálható bázissorrend adatokkal hasonlítottuk össze. Valamennyi baktériumtörzset részletes kulturális- és sejtmorfológiai, és hagyományos biokémiai-élettani vizsgálatoknak vetettük alá. A törzsek foszfatázaktivitását nátrium-fenoltalein-

foszfát tartalmú tápagon, a polifoszfátot felhalmozó képességüket Neisser-festéssel vizsgáltuk. A foszformérés és csíraszámbeclés eredményeinek esetében egy szempontú (one-way) variancia analízissel (ANOVA- Analysis of variance) vizsgáltuk, hogy a mintavételi helyek között milyen eltérések voltak jellemzőek. A foszforkoncentrációk és csíraszám értékek szezonális különbségeit Tukey post-hoc analízissel hasonlítottuk össze. A bentikus mikrobiális közösségek szénforrás értékesítési mintázatát a BIOLOG eredmények főkomponens analízisének segítségével, valamint a mikrobiális összaktivitás és az értékesített szénforrások száma alapján értékeltük. A DGGE sávmintázatokat, UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) algoritmussal elemeztük hasonlósági mátrix és dendrogram készítésével. Az egyes törzscsoportok fenotípusos tulajdonságait főkomponens analízissel hasonlítottuk össze az egyes fenotípusos vizsgálatokban pozitív eredményt adó törzsek százalékos aránya alapján.

3. Eredmények és értékelésük

1. A hipertróf szikes kistavak üledékében az aerob kemoorganotróf baktériumok csíraszám értékei nagyságrendileg nagyobbak voltak, mint a Balaton eutróf és mezotróf medencéjében. Eredményeink és irodalmi adatok alapján a sekély kiskunsági székek üledékének felső rétegében kapott a csíraszám értékek (10^5 - 10^6 TKE g^{-1}) nagyságrendileg a szikes tavak vizében jellemző csíraszám értékeknek feleltek meg. A közösségi szénforrás hasznosítási és molekuláris diverzitás vizsgálatok eredményeitől eltérően, a Kelemen-székben és a Böddi-székben az üledékfelszíni aerob csíraszám értékek nem korreláltak sem a víz hőmérséklettel, sem a vezetőképességgel, a tenyésztendő baktériumszám szezonálisan kevésbé változott. A mezotróf Siófoki- és az eutróf Keszthelyi medence üledékében a kemoorganotróf baktériumok csíraszámja jelentősen különbözött egymástól. A kemoorganotróf baktériumok telepszáma nagyobb volt az eutróf (10^5 nagyságrendű TKE g^{-1} értékek), mint a mezotróf (10^3 - 10^5 TKE g^{-1}) medencében. Ősszel Keszthely és Tihany térségében is lényegesen kisebb telepszámokat kaptunk, nagy valószínűséggel a hőmérséklet csökkenése miatt.

2. A BIOLOG szénforrás hasznosítási vizsgálat eredményei alapján a kiskunsági szikes kistavakban a mikrobaközösségek metabolikus aktivitását a csökkenő hőmérséklet és a növekvő szalinitás is negatívan befolyásolta. Kelemen-székben és a Böddi-székben az üledékfelszíni mikrobaközösségek többnyire az alacsonyabb összaktivitással jellemezhető állapotok során is a szénforrások közel azonos hányadát hasznosították, tehát az üledékben a mikrobaközösségek metabolikus potenciálja nem, hanem a különböző szénforrások hasznosításának mértéke változott. A Siófoki- és

Keszthelyi-medence bentikus mikrobaközösségei szénforrás hasznosítási vizsgálat során a mintavételi időpontok szerint csoportosultak. Az őszi minták mikrobiális aktivitása nem csökkent a tavaszi mintákéhoz képest, ennek hátterében az állt, hogy az őszi közösségek a polimereket nagyobb arányban értékesítették, mint a többi mikrobaközösség. Ez alapján feltehetően a szerves anyagok minősége is jelentősen befolyásolhatja a mikrobaközösségek aktivitását. Az eutróf medence bentikus mikrobaközösségei ősszel és nyáron nagyobb összaktivitás mutattak és több szénforrást hasznosítottak, mint a mezotróf medence mikrobaközösségei, míg tavasszal – amikor a csíraszám értékekben a legkisebb a különbség a két medence között – e szempontok szerint a két mintavételi hely hasonló volt. Ezek alapján a mikrobiális aktivitás nagyságát a szerves anyagok mellett feltehetően a baktériumszám is befolyásolja.

3. Annak ellenére, hogy a kiskunsági és a balatoni mintavételi helyek alapvetően különböznek egymástól, mégis rendelkeznek néhány hasonló tulajdonsággal. Szezonális mintavételeink alapján megállapíthatjuk, hogy a csökkenő környezeti hőmérséklet a kiskunsági szikes kistavakban és a Balatonban is erőteljesen befolyásolta az üledék felső rétegében élő baktériumközösségek szerkezetét. Ősszel a Kelemen-szék és a Böddi-szék, valamint a Siófoki- és a Keszthelyi-medence üledékfelszíni baktériumközösségei is hasonlóvá váltak a filogenetikai szerkezetük alapján. Tavasszal és nyáron a mintavételi területeket jellemző eltérő környezeti feltételek – a szikes vizekben elsősorban a sótartalom, a Balatonban az eltérő trofitás – hatása jobban érvényesült, ezáltal az üledékfelszíni mikrobaközösségek szerkezete elkülönült egymástól. Szezonálisan nem a közösségek összetétele, hanem a közösségalkotó szervezetek aránya változott.

4. A kiskunsági üledékminták felső rétegéből összesen 279, a Balatonból 216 tiszta tenyészetet vizsgáltunk. A baktériumtörzseket a Firmicutes (KNP: 78 %, Balaton: 58 %); az Actinobacteria (KNP: 13 %, Balaton: 11.5 %); a Bacteroidetes (KNP: 1 %, Balaton: 2 %); az Alphaproteobacteria (KNP: 4 %, Balaton: 4 %) és a Gammaproteobacteria (KNP: 5 %, Balaton: 24 %) csoportok tagjaiként azonosítottuk. A Betaproteobacteria osztályt egyetlen keszthelyi tenyészet képviselte.

A kiskunsági kistavak üledékéből főként sós szikes élőhelyekre jellemző alkalofil vagy alkalitoleráns és halotoleráns vagy halofil fajokkal rokon szervezetek (*Bacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Planococcus*, *Sporosarcina*, *Microbacterium*, *Nesterenkonia*, *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Belliella*, *Paracoccus*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Halomonas* és *Arsukibacterium* sp.) jelenléte igazoltuk. A Balaton üledékéből főleg édesvízi ökoszisztémákban gyakori, neutrofil fajokat mutattunk ki (*Bacillus*, *Sporosarcina*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Leucobacter*, *Plantibacter*, *Williamsia*,

Flavobacterium, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*, *Mycoplana*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Shewanella*, *Pseudoxanthomonas*, *Serratia*, *Lysobacter* sp.). Egyetlen minta kivételével, valamennyi üledékminta esetén a *Bacillus* nemzetség képviselői voltak jelen legnagyobb arányban a tenyészetek között. A Siófoki-medencében tavasszal az *Aeromonas* nemzetség képviselőit szerepelték legnagyobb számban a tenyészetek között. A szikes kistavak és a Balaton üledékében található baktériumközösségekben egyaránt kimutattuk a *Pseudomonas*, a *Sporosarcina*, a *Microbacterium*, az *Arthrobacter* és az *Agrobacterium* nemzetségek képviselőit. Az eltérő fiziko-kémiai sajátosságokkal jellemezhető mintavételi területekről származó minták faji összetétele csekély mértékű átfedést (*Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. drentesis*, *Pseudomonas peli*, *Kocuria rosea*, *Microbacterium kitamiense*) mutatott. A Balaton üledékéből közel kétszer annyi (összesen 63) fajt/nemzetséget mutattunk ki, mint a Kelemen-szék és a Böddi-szék üledékéből (összesen 35). Ez az eredmény összhangban áll azon vizsgálatok eredményeivel, amelyek eltérő kémhatású és sókoncentrációjú természetes környezetek bakteriális diverzitását hasonlították össze, és azt tapasztalták, hogy a kémhatás és a sótartalom emelkedésével párhuzamosan a baktériumközösségek sokfélesége csökken és az édes és sós vizes élőhelyek diverzitása között kismértékű átfedés van (Crump et al., 2004; Fierer and Jackson, 2006; Wu et al., 2006; Pagaling et al., 2009). Mindkét élőhelyről több a tudomány számára feltehetően új baktériumfajok képviselőjét sikerült tenyésztésbe vonnunk.

A baktériumtörzsek a nagymolekulájú szerves vegyületek hasznosításának kivételével az alkalmazott biokémiai tesztekben általában inaktívak voltak. Például a *Bacillus* fajok extracelluláris enzimeikkel mindkét élőhelyen fontos szerepet töltenek be a nagymolekulájú szerves anyagok lebontásában, a legnagyobb arányban a fehérjéket értékesítették. A fajok kis hányadánál figyeltünk meg fakultatív anaerob anyagcserét, fermentációt (pl. *Bacillus*, *Aeromonas* spp.) vagy nitrátredukciót (pl. *Pseudomonas* sp.).

5. A kiskunsági és a balatoni üledéklakó baktériumok foszforforgalomban betöltött szerepe különbözött. A hipertróf szikes vizezrekből származó tenyészetek a szerves foszforvegyületeket kisebb arányban értékesítették, mint a foszfor limitált balatoni szervezetek. Mindkét mintavételi területen a baktériumtörzsek többsége polifoszfátot halmozott fel, tehát a polifoszfát raktározása az édesvízű és a szikes vizes élőhelyeken is verseny előnyt jelenthet az üledékfelszíni baktériumok számára. A polifoszfátraktárak fiziológiai szerepe azonban feltehetően eltérő, míg a szikes kistavakban a különleges környezeti feltételekhez (pH és sótartalom) való alkalmazkodást segítheti, a balatoni szervezetek számára elsősorban foszforraktárként szolgál. A polifoszfát-felhalmozás képessége a különböző filogenetikai csoportokba (Firmicutes, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria) tartozó

baktériumtörzsekre egyaránt jellemző volt. Nemzetségeken belül, az egyes baktériumfajokba tartozó szervezetek polifoszfátot felhalmozó képessége különbözhet, ezt például a *Bacillus* fajok esetében tapasztaltuk, melyek (egyéb fenotípusos vizsgálatokban is) jelentős különbségeket mutattak.

Diversity of sediment bacterial communities and their role in the phosphorus cycle in Lake Balaton and soda lakes of Kiskunság

1. Introduction and main objectives

Soda lakes are saline and alkaline aquatic environments, which are of great importance all over the world due to their unique geological, hydrological and ecological characteristics (Grant, 1992; Sorokin et al., 2003; Ma et al., 2004). Soda lakes belong to the most productive natural habitats on Earth and contain dense populations of aerobic chemo-organotrophic alkaliphilic and halophilic bacteria (Duckworth et al., 1996; Jones et al., 1998; Doronina et al., 2003). Comparing to soda lakes situated elsewhere, such environments of the Carpathian basin can be characterized by relatively low salt content and high pH values. Kelemen-szék and Böddi-szék located in Kiskunság National Park (KNP) are hypetrophic, particularly shallow, astatic alkaline environments (Dévai et al., 2001; Boros és Vörös, 2010; Váradi és Fehér, 2010).

Lake Balaton is the largest (surface area: 600 km²) shallow (mean depth: 3.2 m) lake in Central Europe, and is internationally recognized for its ecological and recreational value, as well as for the success of efforts to halt and reverse its eutrophication (Malmaleus & Håkanson, 2004; Jeppessen et al., 2005). The unique morphometry, flow regime, and uneven nutrient loading of the lake led to the development of a sharp gradient in trophic conditions along its longitudinal axis, with nutrient concentrations decreasing from west to east (Herodek, 1984). Today, as a result of restoration efforts ongoing since the early 1980s, the physico-chemical and biotic gradients are less extreme, though they still exist (Padisák & Reynolds, 1998; V-Balogh et al., 2003; Tátrai et al., 2008). At the time of our samplings, the conditions in the western basin were eutrophic, whereas those in the eastern basin were mesotrophic.

Although a strong coupling between the deposition of organic material and bacterial production has been shown for lake sediments in laboratory experiments (Sander & Kalff, 1993; Törnblom & Rydin, 1997), little is known about how the trophic state of the overlying water affects the activity, density and composition of sediment bacterial communities in aquatic environments (Maasen et al., 2003; Wobus et al., 2003).

Microbially-mediated biogeochemical transformations at the sediment-water interface influence largely the nutrient availability in the overlying waters (Nealson, 1997; Spring et al., 2000; Tamaki et al., 2005). Sediment-derived phosphorus loading following reduction of external nutrient loading often replenishes the phosphorus pool

in the water and delays lake re-oligotrophication. This is also well indicated by the fact that after the drastic decrease of external nutrient loading from the 1980's, the annual mean biomass of algae decreased significantly only after about one decade delay in Lake Balaton (Padisák és Reynolds, 1998; Istvánovics et al., 2007).

Sediment bacteria play a key role in organic phosphorus mineralization and the release of P from the sediment, both directly and indirectly (Gächter & Meyer, 1993; Nealson, 1997). It has been shown that several aerobic chemo-organotrophic bacteria take up P in great amounts and accumulate it within the cell as polyphosphate (Jørgensen & Pauli, 1995; Kawaharasaki et al., 1999; Seviour et al., 2003). Polyphosphate accumulating organisms can use polyphosphate as an energy source under anaerobic conditions, coupled with the release of orthophosphate (Mino et al., 1998; Jenkins & Tandoi, 1991). Polyphosphate accumulates can also serve as P reserve for bacteria readily available when inorganic nutrients become limiting (McDignum et al., 2005; Eixler et al., 2006). It is thought that fluctuations in redox conditions at the sediment–water interface may favor polyphosphate storing heterotrophic bacteria, and that bacterial polyphosphate accumulation may significantly affect the nutrient availability in the water column (Uhlmann & Bauer, 1988; Gächter et al., 1988; Davelaar, 1993). However, information on the phylogeny, abundance and ecological role of polyphosphate accumulating bacteria in natural sediments remains scarce (Waara et al., 1993; Hupfer et al., 2007).

On the basis of these, I focused my research on sediment microbial communities of two soda lakes located in Kiskunság National Park (Kelemen-szék és Böddi-szék) and two basins of Lake Balaton with contrasting trophic regimes and I assigned the following main objectives:

1. to assess the spatial and temporal differences in colony counts of aerobic chemo-organotrophic bacteria;
2. to characterize the temporal variability of microbial carbon source utilization patterns using BIOLOG GN microplates in four sites with contrasting trophic regimes;
3. to characterize the seasonal and temporal changes in the structure of benthic bacterial communities using cultivation independent method (Denaturing Gradient Gelelectrophoresis, DGGE);
4. to indentify the cultivable aerobic chemo-organotrophic bacteria and to assess their metabolic features,
5. to identify the cultivable polyphosphate accumulating organisms and to assess the physiological role of bacterial polyphosphate storage in the

sediment with parallel characterization of the phosphatase activity of bacterial strains.

2. Methods

Three parallel water samples and sediment cores were taken with overlying water, from the shallow (<0,5m) Kelemen-szék (N 46°47' E 19°11') and Böddi-szék (N 46°46' E 19°08') located in Kiskunság National Park (KNP) and from the open water region of Siófoki- (Siófok basin, N 46°55' E 17°53') and Keszthely-basins (Keszthely basin, N 46°45' E 17°15') at water depths 2-2.5 m and 1.5-2 m, respectively. The dates of samplings are listed in table 1.

Table 1. Sampling sites, sampling dates and the applied methods: BIOLOG metabolic profiling, investigation of bacterial diversity using denaturing gradient gelelectrophoresis (DGGE), cultivation based investigations (X signs the applied method.)

Sampling site	Sampling date	BIOLOG	DGGE	Cultivation
Balaton, Siófoki- (46°55' E 17°53') and Keszthelyi-basin (N 46°45' E 17°15')	17 November 2004..			X
	27 May 2005.	X	X	X
	30 August 2005.	X	X	X
	11 November 2005.	X	X	
Kelemen-szék (N 46°47' E 19°11') and Böddi-szék (N 46°46' E 19°08')	22 October 2004.			X
	13 May 2005.	X	X	X
	18 July 2005.	X	X	
	25 August 2005.			X
	10. November 2005.	X	X	

Concentrations of soluble reactive phosphorus (SRP) and total dissolved phosphorus in the water and interstitial water and total phosphorus (TP) in the water were measured spectrophotometrically. Equal amounts of the uppermost 0-3 cm layer of three sediment cores from each sampling were pooled and mixed with a sterile spatula to form composite samples, which were used for microbiological analyses. Microbial carbon source utilization patterns were investigated using BIOLOG GN microplates. Prior to analysis sediment suspensions were made using a density standard. Spatial and temporal variability in the diversity of surface bacterial communities were investigated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Community DNA was extracted from the sediment and partial small subunit rDNA was amplified for the DGGE investigations. Serial dilutions of samples were plated onto six types of media containing different carbon sources for estimation of CFU g⁻¹ and isolation and cultivation of bacterial strains. All bacterial strains were subjected to amplified

ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Representatives from each unique ARDRA fingerprint group were chosen and subjected to partial sequencing of small subunit rDNA. The sequences were aligned against the sequences in public databases. All isolates were subjected to detailed phenotypic investigations using traditional biochemical and physiological tests. The presence of polyphosphate accumulates was tested using Neisser staining, and phosphatase activity was investigated on organic phosphorus compound. The original data sets were used in the statistical analyses. One-way analyses of variance (ANOVA) was used to test the null hypothesis that each set of data of P concentrations as well as colony counts of aerobic bacteria from sediments are not different. Tukey's multiple post-hoc test was used to compare the difference between each pair of means (seasonal variability). The results of BIOLOG investigations were analysed by principal component analysis. The sum of microbial activity and numbers of the carbon sources utilized were also compared. DGGE band distribution patterns were analyzed using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) algorithm and similarity dendrograms were created. Phenotypic features of bacterial strain groups were compared using principal component analysis on the basis of percental positive result given for each tests.

3. Results and discussion

1. Our results showed that the abundance of cultivable aerobic chemo-organotrophic bacteria differ between sites exhibiting different trophic conditions, with the highest numbers in the hypertrophic soda lakes and the lowest in the mesotrophic Siófok-basin. Viable counts in sediment of soda lakes were comparable with colony counts in the water of soda lakes located elsewhere. Seasonal changes in colony counts were not characteristic in soda lakes. The bacterial abundance did not correlate with the temperature and the conductivity. Abundance of cultivable aerobic chemo-organotrophic bacteria significantly differed between two basins exhibiting different trophic conditions in Lake Balaton in each season. The lowest viable counts were observed in autumn and the highest in spring and summer months in both basins, which showed that decreasing temperature had strong effect on benthic bacterial abundance in Lake Balaton.

2. In Kelemen-szék and Böddi-szék, carbon sources utilization patterns of sediment microbial communities were similar in autumn and distinct in spring and summer months. Microbial activity was affected negatively by declining temperature and increasing conductivity in soda lakes. In most cases similar numbers of carbon sources were utilized by sediment microbial communities in all season, but the intensity of utilization changed. On the basis of their metabolic profile microbial communities of

Siófoki- and Keszthely-basin grouped according to the sampling dates. The sum of microbial activities did not decrease in autumn, and utilization of different types of carbon sources varied remarkably seasonally. Microbial activity was probably affected by quality of organic carbon and the colony counts of benthic bacteria in Lake Balaton, but further investigations are needed to prove these correlations.

3. The DGGE profiles revealed that sediment bacterial communities of the two soda lakes and the two basins of Lake Balaton are similar in autumn and could be distinguished in spring and summer months. Thus the temperature had strong effect on sediment bacterial diversity and site specific environmental factors – like contrasting conductivity and trophic – resulted distinctive community structure in warm periods. In most cases, similar band richness suggested similarly diverse community composition in all the samples and seasonally not the composition of the communities rather than the abundance of different genotypes changed.

4. A total of 279 and 216 bacterial strains were investigated from soda lakes and Lake Balaton, respectively. The isolates were affiliated with six major bacterial lineages: Firmicutes (KNP: 78 %, Lake Balaton: 58 %); Actinobacteria (KNP: 13 %, Lake Balaton: 11.5 %); Bacteroidetes (KNP: 1 %, Lake Balaton: 2 %); Alpha- (KNP: 4 %, Lake Balaton: 4 %), Beta- (Lake Balaton: 0.5 %) and Gammaproteobacteria (KNP: 5 %, Lake Balaton: 24 %). Betaproteobacteria was represented by a single strain isolated from the Keszthely-basin. Strains related to *Bacillus* sp. were most abundant in all but one sample. Isolates affiliated with *Aeromonas* sp. prevailed in the sample taken from the Siófok-basin in spring. Altogether 35 and 63 taxa were identified from the sediment of soda lakes and Lake Balaton, respectively. Candidates of possibly new bacterial species were also isolated. Presence of aerobic, chemo-organotrophic species adapted to saline and/or alkaline habitats (alkalitolerant or alkaliphilic and halotolerant or halophilic species) was proven with cultivation dependent methods of the soda lakes (in genera *Bacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Planococcus*, *Sporosarcina*, *Microbacterium*, *Nesterenkonia*, *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Belliella*, *Paracoccus*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Halomonas* and *Arsukibacterium*). Most of the strains isolated from Lake Balaton were identified as closest relatives of neutrophilic species (in genera *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Leucobacter*, *Plantibacter*, *Williamsia*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*, *Mycoplana*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Shewanella*, *Pseudoxanthomonas*, *Serratia*, *Lysobacter*). Among the taxa represented by at least three isolates, only a few were cultivated exclusively from one soda lake or one basin of lake Balaton. Several members of potentially new species were also isolated. *Pseudomonas*, *Sporosarcina*,

Microbacterium, *Kocuria*, *Arthrobacter* and *Agrobacterium* spp. were cultivated from the soda lakes as well as Lake Balaton. Only a few species were identified from KNP and well as from Lake Balaton (*Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. drentesis*, *Pseudomonas peli*, *Kocuria rosea*, *Microbacterium kitamiense*).

The isolates were fairly inactive in most of the conventional biochemical and physiological probes. Several strains were able to decompose large organic compounds, especially the proteinase activity was widespread; e.g. *Bacillus* species play important role in the degradation of polymers. Facultative anaerobe activity, like fermentation (e.g. *Aeromonas* sp.) and nitrate reduction (e.g. *Pseudomonas* sp.) were observed only on few isolates.

5. The presence of polyphosphate accumulates was tested using Neisser staining, and phosphatase activity was investigated on organic phosphorus compound. The majority of the strains from each samples (KNP: 56 %, Lake Balaton: 66 %) showed excess polyphosphate accumulation. There was no clear association between the Neisser staining and phosphatase activity test results in the case of soda lakes isolates. Polyphosphate probably helps in the adaption of sediment bacteria to the special environmental conditions (pH and salinity) featuring the soda lakes. Characteristically lower rates of strains hydrolyzed the organic phosphorus compound in the case of the hypertrophic soda lakes than in the case of Lake Balaton. Association of Neisser staining and phosphatase activity test results suggested that excess polyphosphate accumulation serves as phosphorus storage for sediment bacteria in Lake Balaton. Our results indicate that excess polyphosphate storage can provide a selective advantage as phosphorus reserve for benthic bacteria in the well-aerated sediment, thus bacterial polyphosphate probably acts primarily as a sink for the nutrient and not significantly contributes to the internal phosphorus load in Lake Balaton. Our study implied that polyphosphate accumulation is widespread among the members of Firmicutes, Actinobacteria, Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria. Phosphorus metabolism of species related to a single genus can vary remarkably, e.g. we experienced remarkable differences in polyphosphate accumulating potential of *Bacillus* species.

Irodalom / References

- Barik, S. K., Purushothaman, C. S., Mohanty, A. N. (2001): Phosphatase activity with reference to bacteria and phosphorus in tropical freshwater aquaculture pond systems. *Aquaculture Research* 32: 819-832.
- Boros, E., Vörös, L. (2010): A magyarországi szikes tavak sótartalma és ionösszetétele. *Acta Biologica Debrecina* 22: 37-52.
- Dévai Gy. Nagy S., Wittner I., Aradi Cs., Csabai Z., Tóth A. (2001): A vízi és a vizes élőhelyek sajátosságai és tipológiája. In: Böhm A. - Szabó M. (szerk.): *Vizes élőhelyek: a természeti és a*

- társadalmi környezet kapcsolata. Tanulmányok Magyarország és az Európai Unió természetvédelméről. - ELTE-TTK & SZIE-KGI & KöM-TvH, Budapest, p. 11-74.
- Doronina, N., Darmaeva, T., Trotsenko, Y. (2003): *Methylophaga natronica* sp. nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylotrophic bacterium from soda lake of the Southern Transbaikial Region. Systematic and Applied Microbiology 26: 382-389.
- Duckworth, A. W., Grant, S., Grant, W. D., Jones, B. E., Meijer, D. (1998): *Dietzia natronolimnaios* sp. nov., a new member of the genus *Dietzia* isolated from an east African soda lake. Extremophiles 2: 359-366.
- Gächter, R., Meyer, J. S. (1993): The role of microorganisms in mobilization and fixation of phosphorus in sediments. Hydrobiologia 253: 103-121.
- Gloess, S., Grossart, H., Allgaier, M., Ratering, S., Hupfer, M. (2008): Use of laser microdissection for phylogenetic characterization of polyphosphate-accumulating bacteria. Appl. Environ. Microbiol. AEM.02545-07.
- Gloess, S., Hupfer, M., Ratering, S., Grossart, H.-P. (2007): Detection and phylogenetic characterization of polyphosphate accumulating bacteria in lake sediments. Berichte der JGB 24: 77-88.
- Herodek, S., (1984): The eutrophication of Lake Balaton: Measurements, modelling and management. Verh. int. Ver. Limnol. 22: 1087-1091.
- Hupfer, M., S. Gloess & H. Grossart P. (2007): Polyphosphate-accumulating microorganisms in aquatic sediments. Aquatic Microbial Ecology 47: 299-311.
- Istvánovics, V., Clement, A., Somlyódy, L., Specziár, A., G.-Tóth, L., Padisák, J. (2007): Updating water quality targets for shallow Lake Balaton (Hungary), recovering from eutrophication. Hydrobiologia 581: 305-318.
- Jansson, M., Olsson, H., Pettersson, K. (1988): Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. Hydrobiologia 170: 157-175-175.
- Jeppesen, E., Søndergaard, M., Jensen, J. P., Havens, K. E., Anneville, O., Carvalho, L., Coveney, M. F., Deneke, R., Dokulil, M. T., Foy, B., Gerdeaux, D., Hampton, S. E., Hilt, S., Kangur, K., Köhler, J., Lammens, E. H., Lauridsen, T. L., Manca, M., Miracle, M. R., Moss, B., Nöges, P., Persson, G., Phillips, G., Portielje, R., Romo, S., Schelske, C. L., Straile, D., Tatrai, I., Willén, E., Winder, M. (2005): Lake responses to reduced nutrient loading - an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. Freshwater Biology 50: 1747-1771.
- Jones B.E., Grant W.D., Duckworth A.W., Owenson G. (1998): Microbial diversity of soda lakes. Extremophiles 2: 191-200.
- Khoshmanesh, A., Hart, B. T., Duncan, A., Beckett, R. (2002): Luxury uptake of phosphorus by sediment bacteria. Water Research 36: 774-778.
- Ma Y., Zhang W., Xue Y., Zhou P., Ventosa A., Grant W.D. (2004): Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lake as revealed by 16S rRNA gene sequence analyses. Extremophiles 8: 45-51.
- Maassen, S., Röske, I., Uhlmann, D. (2003): Chemical and microbial composition of sediments in reservoirs with different trophic state. International Review of Hydrobiology 88: 508-518.
- Nealson, K. H. (1997): Sediment Bacteria: Who's There, What Are They Doing, and What's New?. Annu. Rev. Earth. Planet. Sci. 25: 403-434.
- Padisák, J., Reynolds, C. S. (1998): Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. Hydrobiologia 384: 41-53.
- Somlyódy, L., Honti, M. (2005): A Balaton vízutánpótlása: lehetünk-e elég elővigyázatosak? Magyar Tudomány 5: 570
- Spring, S., Schulze, R., Overmann, J., Schleifer, K. (2000): Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. FEMS Microbiology Reviews 24: 573-590.
- Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M., Kamagata, Y. (2005): Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2162-2169.
- Tatrai, I., Istvánovics, V., Tóth, L., Kóbor, I. (2008): Management measures and long-term water quality changes in Lake Balaton (Hungary). Fund. App. Lim. 172: 1-11.
- Uhlmann, D., Bauer, H. (1988): A remark on microorganisms in lake sediments with emphasis on polyphosphate-accumulating bacteria. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie 73: 703-708.

- Váradi, Z., Fehér G. (2010): Kiskunsági szikes tavak kémiai vizsgálata. *Acta Biologica Debrecina* 22: 53-74.
- Waara, T., Jansson, M., Pettersson, K. (1993): Phosphorus composition and release in sediment bacteria of the genus *Pseudomonas* during aerobic and anaerobic conditions, *Hydrobiologia* 253: 131-140.
- Wobus, A., Bleul, C., Maassen, S., Scheerer, C., Schuppler, M., Jacobs, E., Röske, I. (2003): Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state. *FEMS Microbiology Ecology* 46: 331-347.

Tudományos tevékenység jegyzéke/ Scientific activity

Az értekezés témakörében, impakt faktoralal rendelkező folyóiratban megjelent publikációk jegyzéke:

- Borsodi, A. K., Márialigeti, K., Szabó, G., Palatinszky, M., Pollák, B., Kéki, Z., Kovács, A. L., Schumann, P., Toth, E. M. (2008): *Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 845-851.
- Szabó, G., Khayer, B., Rusznyák, A., Tátrai, I., Dévai, G., Márialigeti, K., Borsodi, A. (2010) Seasonal and spatial variability of sediment bacterial communities inhabiting the large shallow Lake Balaton. *Hydrobiologia*, DOI: 10.1007/s10750-010-0574-3.

Az értekezés témakörében, referált folyóiratban megjelent publikációk jegyzéke:

- Borsodi, A., Vladár, P., Rusznyák, A., Szabó, G., Sipos, R. & Márialigeti, K. (2005): Tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai vizsgálatok a Kiskunsági NP szikes tavainak baktériumközösségein. *Hidrológiai Közlöny* 85: 23-25.
- Borsodi, A., Szabó, G., Rusznyák, A., Vladár, P., Pollák, B., Makk, J., Márialigeti, K. (2010): Kiskunsági székek baktériumközösségeinek filogenetikai diverzitása. *Acta Biologica Debrecina* 22: 87-98.
- Szabó, G., Borsodi, A., Vladár, P., Cech, G., Tóth, E., Boros, E., Márialigeti, K. (2004): Kiskunsági Nemzeti Park szikes tavainak bakteriológiai vizsgálata. *Hidrológiai Közlöny* 84 (5-6): 147-150
- Szabó, G., Borsodi, A., Márialigeti, K., Tátrai, I., Dévai, Gy. (2006): Foszfátáz aktívást mutató és polifoszfátot felhalmozó baktériumfajok vizsgálata sekély vizekben. *Hidrológiai Közlöny*. 86: 116-119

Egyéb megjelent publikációk jegyzéke

- Rusznyák, A., Szabó, G., Pollák, B., Vágány, V., Palatinszky, M. (2008): Diversity of reed (*Phragmites australis*) stem biofilm bacterial communities in two Hungarian soda lakes. *Acta Microbiol. Immun. Hung.* 54:339-352.
- Rusznyák, A., Vladár, P., Szabó, G., Márialigeti, K., Borsodi, A. (2008): Phylogenetic and metabolic bacterial diversity of *Phragmites australis* periphyton communities in two Hungarian soda ponds. *Extremophiles* 12: 763-773.
- Tátrai, I., Mátyás, K., Korponai, J., Szabó, G., Pomogyi, P., Héri, J. (2005): Response of nutrients, plankton communities and macrophytes to fish manipulation in a small eutrophic wetland lake. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 90: 511-522.

Az értekezés témakörében elhangzott előadások jegyzéke:

- Borsodi A. K., Vladár P., Rusznyák A., Szabó G., Sipos R., Márialigeti, K.: A Kiskunsági Nemzeti Park szikes tavai baktériumközösségeinek tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése, 2004. október 7-9.

Borsodi A. K., Vladár P., Rusznyák A., Szabó G., Sipos R., Márialigeti, K.: Tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai vizsgálatok a Kiskunsági Nemzeti Park szikes tavainak baktériumközösségein. XLVI. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2005. október 6-8.

Szabó, G., Borsodi, A., Márialigeti, K., Tátrai, I., Dévai, Gy.: Foszfátáz aktivitást mutató és polifoszfátot felhalmozó baktériumfajok sekélyvizű tavakban. XLVII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2005. október 5-7.

Az értekezés témakörében készült poszterelőadások jegyzéke:

- Borsodi A. K., Szabó G., Vladár P., Cech G., Boros E., Márialigeti K.: Comparison of the alkaliphilic bacterial communities isolated from two hungarian soda lakes of Kiskunság National Park 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary, 7-9 October, 2003.
- Borsodi A. K., Vladár P., Rusznyák A., Szabó G., Sipos R., Márialigeti, K.: Diversity of bacterial communities in Hungarian soda lakes as revealed by cultivation-based and cultivation-independent approaches. (abstract, p.95.). XXIX International Congress of Limnology (SIL), Lahti, Finland, 8-14 August, 2004.
- Borsodi A. K., Rusznyák A., Szabó G., Pollák B., Palatinszky M., Márialigeti K., Tóth E. M.: Bacterial species diversity in a Kiskunság soda lake (Hungary) evaluated by a polyphasic approach. (poster, abstract Acta Microbiol. Immun. Hung. Supplement 52:18). 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, 26-28 October 2005.
- Borsodi A. K., Szabó G., Pollák B., Tóth E. M., Rusznyák A., Révész S., Márialigeti K.: Bacterial diversity in a soda lake of Kiskunság National Park (Hungary) evaluated by cultivation based and cultivation independent methods. 2nd FEMS Congress, Madrid, Spain, 4-8 July 2006.
- Borsodi A. K., Pollák B., Rusznyák A., Szabó G., Palatinszky M., Tóth E. M., Márialigeti K.: Bacterial species diversity in soda lakes of Kiskunság National Park (Hungary) compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. 11th International Symposium on Microbial Ecology, Wien, Austria, 20-25 August 2006.
- Khayer B., Szabó G., Márialigeti K., Borsodi A. K.: Studies on bacterial polyphosphate accumulation and phosphatase activity in three Hungarian shallow lakes. (abstract, Acta Microbiol. Immun. Hung. Supplement 53: 292). Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, 18-20. October 2006.
- Khayer B., Szabó G., Borsodi A. K., Márialigeti K.: Cultivation based bacterial diversity of the sediment of Lake Balaton (abstract, Acta Microbiol. Immun. Hung. Supplement 54: 60) 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 18-20 July 2007.
- Szabó G., Márialigeti K., Tátrai I., Dévai Gy., Borsodi A. K.: Bacterial species with phosphatase activity and/or polyphosphate reserve in three Hungarian shallow lakes. (abstract, Acta Microbiol. Immun. Hung. Supplement 52: 146). 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, 26-28. October 2005.
- Szabó, G., Borsodi, A., Vladár, P., Cech, G., Boros, E., Márialigeti, K.: A Kiskunsági Nemzeti Park szikes tavainak bakteriológiai vizsgálata. XLV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2003. október 1-3.