

Talajbiológiai- és biokémiai osztály

Fiatal kutatói beszámoló

Gazdag Orsolya

tudományos segédmunkatárs

Témavezető: Dr. Ködöböcz László

2013.12.03.

- **Témacím:** „Különböző gazdálkodási módok hatása a talaj baktérium-közösségeinek diverzitására”
- **Projekt háttér:**
- „A talajmikrobiota diverzitása organikus és intenzív gazdálkodási módoknál” című posztdoktori kutatási téma (ÖMKi), témavezető: Dr. Ködöböcz László (2011-2013)
- „Talaj mikrobiális közösség változása só- és vízstressz, növényzeti típus és művelés hatására” OTKA pályázat K108572, témavezető: Szili-Kovács Tibor (2013-2017)

Célkitűzés

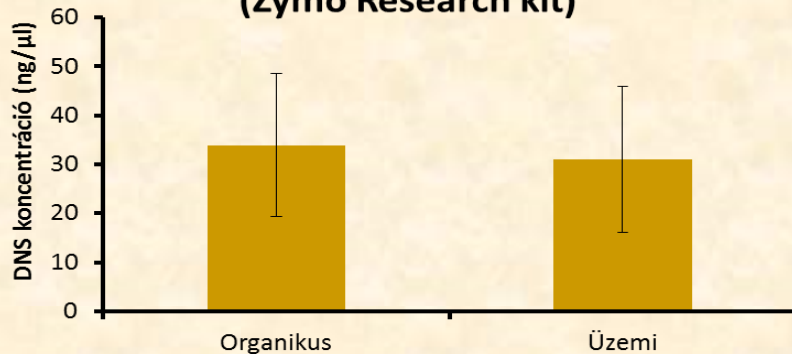
- Organikus és üzemi mezőgazdasági művelés hatásának tanulmányozása a talaj baktérium-közösségeire
- A talaj baktérium diverzitás vizsgálata a hagyományos és modern molekuláris módszerekkel
- A talaj baktérium-közösségek elemzéséhez szükséges molekuláris módszerek adaptációja és fejlesztése

Anyag és módszer

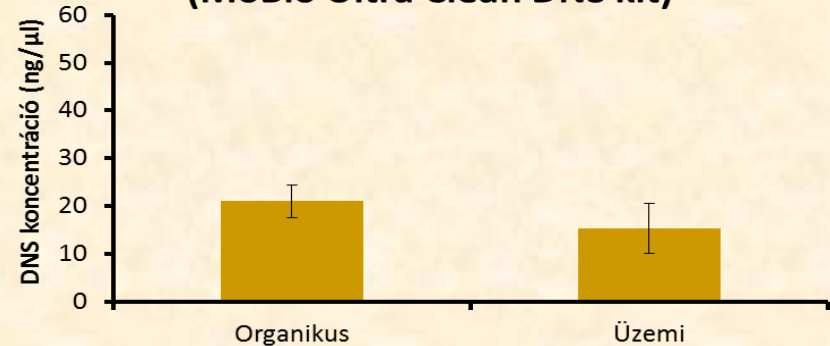
- Mintavételi területek (organikus és üzemi): Martonvásár (vályog), Karcag (agyag), Nyíregyháza (homok).
- DNS kivonás talajmintákból:
- 3-féle kit: **Zymo** Research DNA Kit
MoBio Ultra Clean DNA Kit
Qiagen DNA Kit
- Szabvány: **ISO 11063** sz.

Előzetes eredmények - összes talaj DNS kivonás és tisztítás

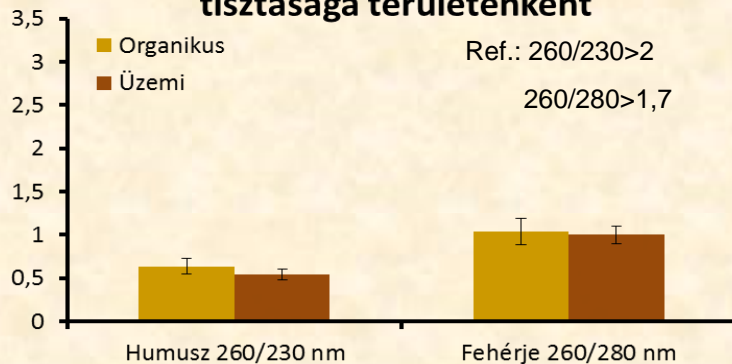
A talajból kivont DNS mennyisége
(Zymo Research kit)



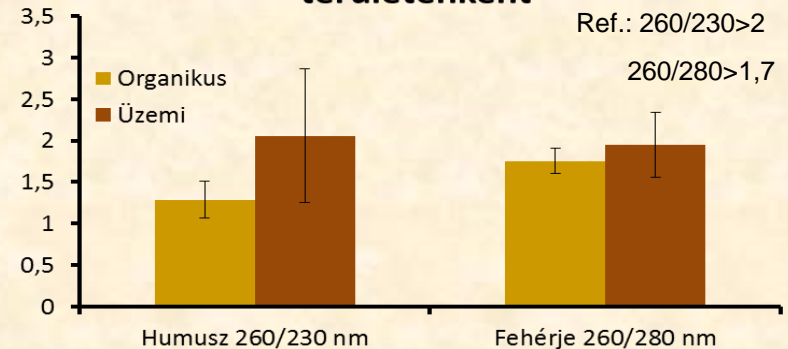
A talajból kivont DNS mennyisége
(MoBio Ultra Clean DNS kit)



A Zymo Research kittel kivont DNS tisztasága területenként



A MoBio kittel kivont DNS tisztasága területenként



Zymo Research Kit:

(30 ng/μl)

alacsony tisztasági mutatók

MoBio Kit:

(20 ng/μl)

magas tisztasági mutatók

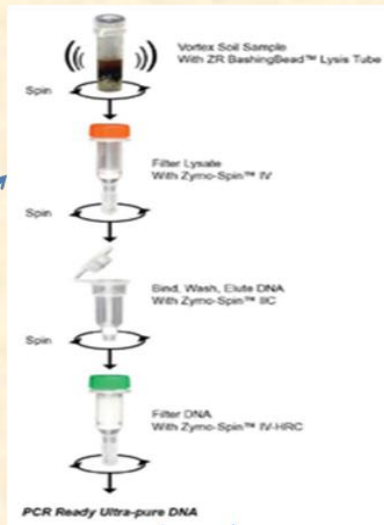
A talaj DNS kivonás módszertani fejlesztése



Mini-Beadbeater
(1, 3, 5 perc)



Fast-Prep-24
(1, 3, 5 perc)



Vortex (1, 5, 10 perc)



Pulsing Vortex Mixer
(1, 5, 10 perc)



NanoDrop 1000
(Thermo Scientific)



Tray Cell (Hellma)

+



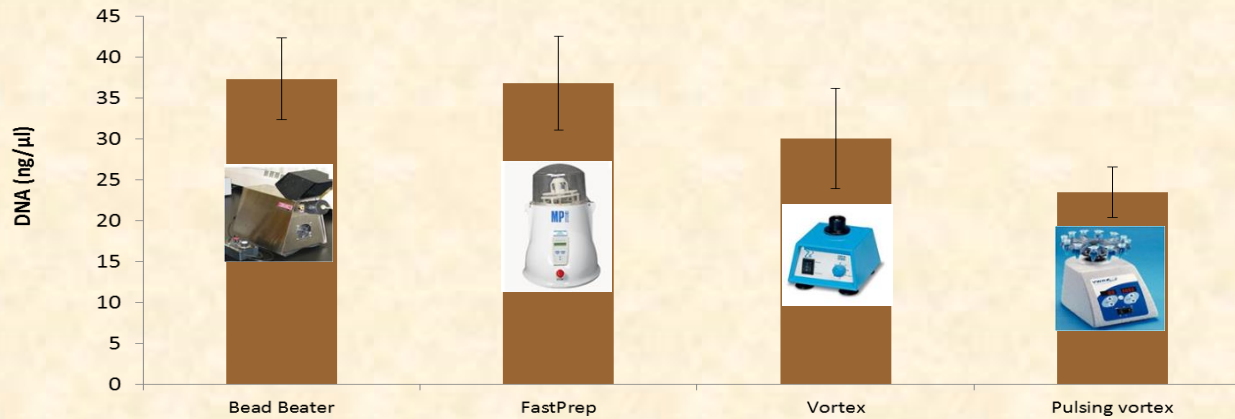
Helios Beta
spektrofotométer (Thermo
Spectronic)

- Talajminta: Martonvásár organikus terület
- 0,25 g talaj
- **DNS kivonás: kit (Zymo Research)**
- **Kritikus lépés: fizikai sejtfeltárás**
- **4-féle rázatási módszer tesztelése**

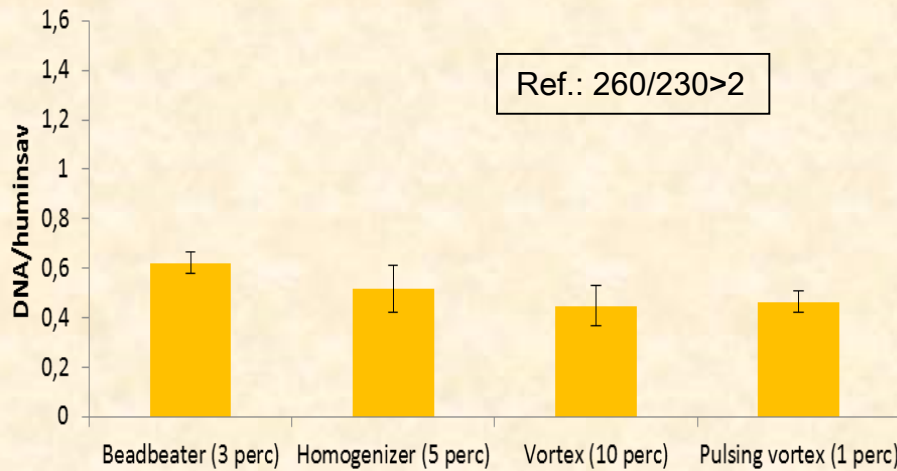
- DNS mennyiségi és minőségi meghatározása:
- **2-féle spektrofotométer:**
 - NanoDrop
 - Mikro-küvetta
- Nukleinsav tisztaság: huminsav, fehérje szennyeződés

Különböző sejteltérési eljárások hatékonysága

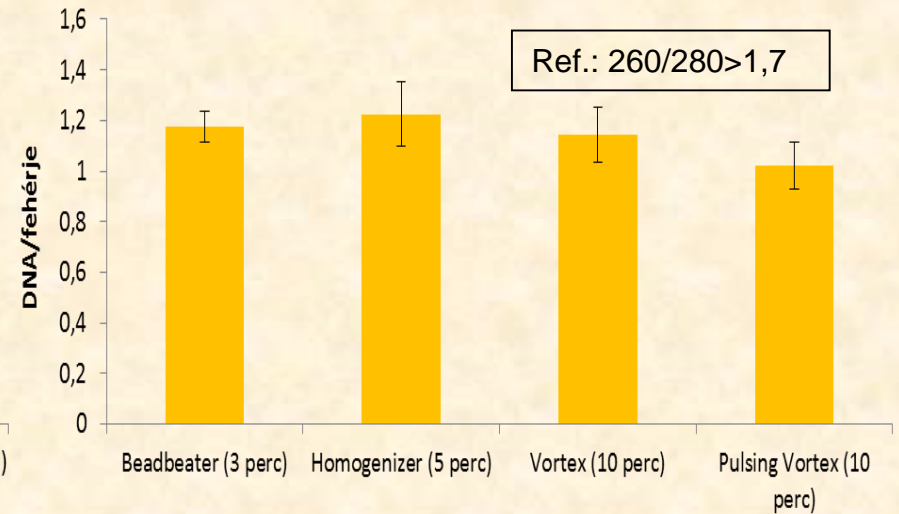
Kivont talaj DNS mennyiségek



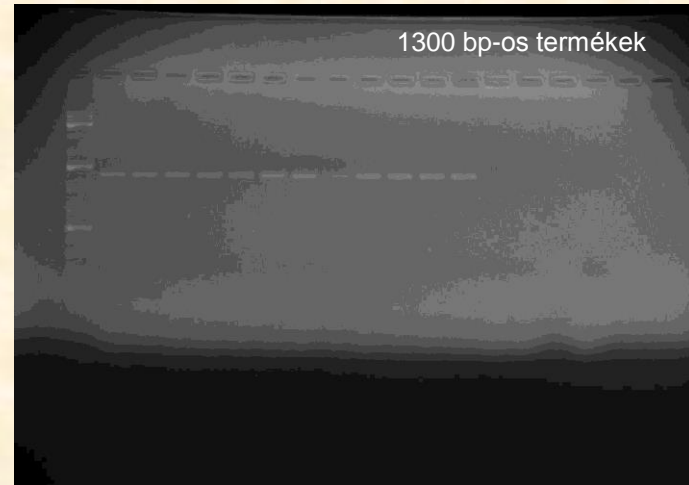
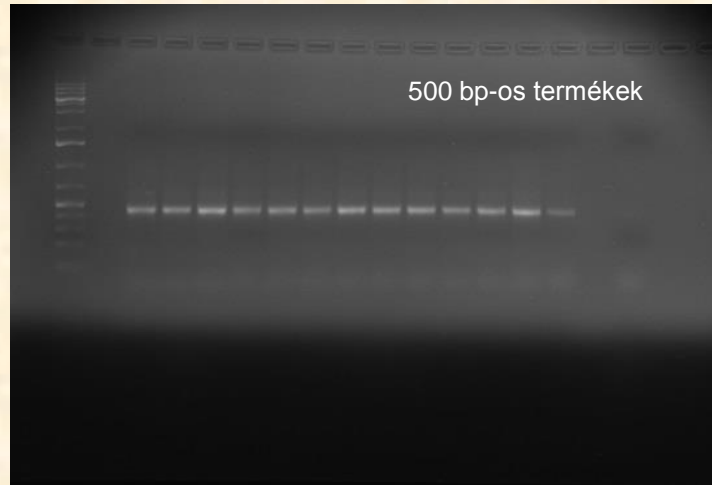
Huminsav szennyeződés (Zymo Research) - NanoDrop



Fehérje szennyeződés (Zymo Research) - NanoDrop



Mikroba közösségek molekuláris vizsgálata



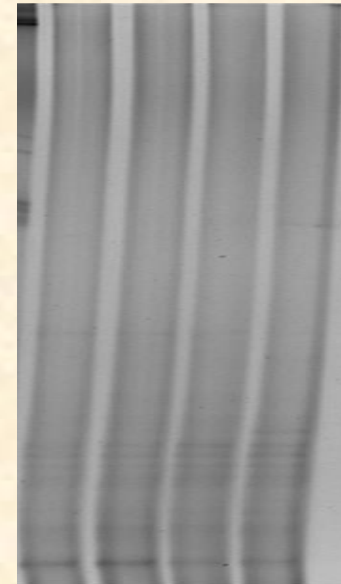
- Martonvásári üzemi területről származó talaj DNS minták **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*) termékei (baktériumokra univerzális- és alfa-proteobaktériumokra specifikus primerpár)
- Martonvásár, Karcag, Nyíregyháza (organikus és üzemi) mintákon két különböző primerrel elvégezve

Mikroba közösségek diverzitás vizsgálata

- Folyamatban lévő kutatás:
- Az univerzális és csoport specifikus primerpárokkal felszaporított DNS minták szétválasztása TGGE Maxi System segítségével, optimalizáció
- Elve: duplaszálú DNS denaturáció, (**G**uanin/**C**itozin mintázat)



TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) Maxi System készülék
Hőmérséklet különbségen alapuló szétválasztás



DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)
mintázat (martonvásári minták)

Eredmények

- A 4-féle DNS extrakció közül 2 **kit-alapú módszer** (*Zymo, MoBio*) alkalmas talaj **DNS kivonásra magas humusztartalmú talajokból**. ISO 11063 szabvány alkalmazása nem volt sikeres, de kit-alapú eljárásokkal kombinálva javíthatja a kivonás hatékonyságát. A Qiagen kit használatakor sikertelen volt a nukleinsav kivonás, mert a talajminta eltömítette az oszlopot.
- A különböző időtartamokkal és rázatási módokkal végzett nukleinsav extrakciókat összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a **sejtmalom** (Beadbeater) **a leghatékonyabb**, ami megfelelő tisztaságú talaj DNS-t eredményezett.
- Sikerült a három mintavételi területről vett 72 db mintából **PCR tisztaságú közösségi DNS-t** kinyerni.
- **Sikerült felszaporítanunk** a kivont **nukleinsavat** az általunk optimalizált PCR-beállításokkal és az univerzális illetve csoport-specifikus primerekkel.

Publikációk, konferencia részvételek

- **Konferenciakiadványokban megjelent teljes közlemény: Magyar nyelvű:**
- Ködöböcz L., **Gazdag O.**, Füzy A., Murányi A., Takács T. 2013. Szimbionta mikrobák jellemzése és diverzitása organikus és nagyüzemi talajművelési módoknál. "Velünk Élő Tudomány", II. ATK Tudományos Nap, 2013. november 8., Martonvásár. Előadások összefoglalói. p. 278-281.
- **Előadások és poszterek összefoglalói: Nemzetközi rendezvényeken:**
- Ködöböcz L., **Gazdag O.**, Füzy A., Murányi A., Takács T. 2013. Diversity of microbial symbionts under organic and conventional agricultural systems. 4th International Conference on Organic Agriculture Sciences. 9-13th October 2013 Budapest-Eger, Hungary. Abstracts, p. 85.
- **O. Gazdag**, A. Murányi, L. Ködöböcz. 2013. Comparison of different mechanical lysis methods for the isolation of soil community DNA. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. (60) p. 142-143.

- **Poszterek:**
- ***Hazai tudományos rendezvényeken:***
- Ködöböcz L., **Gazdag O.**, Füzy A., Murányi A., Takács T. 2013. Szimbionta mikrobák jellemzése és diverzitása organikus és nagyüzemi talajművelési módoknál. "Velünk Élő Tudomány", II. ATK Tudományos Nap, 2013. november 8., Martonvásár.
- ***Nemzetközi Tudományos Rendezvényeken:***
- Ködöböcz L., **Gazdag O.**, Füzy A., Murányi A., Takács T. Diversity of microbial symbionts under organic and conventional agricultural systems. 4th International Conference on Organic Agriculture Sciences (ICOAS). 9-13th October 2013, Budapest-Eger, Hungary
- **Orsolya Gazdag**, László Ködöböcz. 2013. Comparison of different mechanical lysis methods for the extraction of microbial community DNA from soil. 4th Central European Forum for Microbiology. October 16-18, 2013, Keszthely, Hungary

Folyamatban lévő publikációk, tagság

- **Folyamatban lévő publikációk:**
- László Ködöböcz, **Orsolya Gazdag**, Mihály L. Kecskés: Sensibility of a Hungarian soybean variety (*Glycine max* L., Kurca) on different *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Applied Soil Ecology*. 2013. december
- **Orsolya Gazdag**, Attila Murányi, László Ködöböcz. Dependency of soil metagenome extraction efficiency on soil parameters. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2014 március
- Anita Szegő, Natalya Enünlü, Hongmei Sun, **Orsolya Gazdag**, Veronika Pós, Éva Hunyadi-Gulyás, Katalin Medzihradszky, Thomas Kühne and Noémi Lukács: Molecular characterization of Beet cryptic virus 2. *Archives of Virology*
- **Tagság:** 2013-tól Magyar Mikrobiológiai Társaság (MMT) rendes tagja



Köszönöm a megtisztelő figyelmet!