

**MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ,
ÉPÜLETEKBE
BEÉPÍTETT FAANYAGOKAT KÁRÓSÍTÓ
GOMBÁK
VIZSGÁLATA ÉS AZONOSÍTÁSA
DNS DIAGNOSZTIKÁVAL**



**Magyar Mérnöki Kamara
Kiadványsorozata 36.**

**MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ, ÉPÜLETEKBE
BEÉPÍTETT FAANYAGOKAT KÁRÓSÍTÓ GOMBÁK
VIZSGÁLATA ÉS AZONOSÍTÁSA DNS
DIAGNOSZTIKÁVAL**

**MMK FAP azonosító:
107/2019-EFAT**

Budapest, 2019. szeptember

A sorozat szerkesztője:

NAGY GYULA

a Magyar Mérnöki Kamara elnöke

Készült a Magyar Mérnöki Kamara Erdőmérnöki, Faipari és Agrárműszaki Tagozatának gondozásában, a 2019. évi Feladat Alapú Pályázatok pénzügyi keretéből.

A kiadvány a Magyar Mérnöki Kamara tulajdona. Másolása, teljes terjedelmében való közzététele csak a Kamara engedélyével lehetséges. Minden jog fenntartva.

Szerzők:

Varró Beáta

Dr. Kis András

Lektorálta:

Dr. Dalmadi Ágnes

Dr. Király Béla

Kiadó:

Magyar Mérnöki Kamara
1094 Budapest, Angyal u. 1-3.
info@mmk.hu, www.mmk.hu

TARTALOMJEGYZÉK

1. Vezetői összefoglaló	5
2. Bevezető.....	8
3. A szakmai anyag tagolt kifejtése	10
3.1. A munka célkitűzése	10
3.2. Anyag és módszer	11
3.2.1. DNS izolálás	11
3.2.2. ITS PCR	11
3.2.3. DNS klónozás, baktérium transzformáció	11
3.2.4. Baktérium kolónia PCR	12
3.2.5. DNS szekvenálás és feldolgozása	12
4. Eredmények és kiértékelésük.....	14
5. Mellékletek.....	18
6. Irodalomjegyzék.....	41

1. Vezetői összefoglaló

A farontó gombák diagnosztizálásakor sokszor nehézségekbe ütköznek a szakemberek, mivel nem minden esetben áll rendelkezésre pontos fajmeghatározást lehetővé tevő minta a makro- és mikroszkópos vizsgálatok során. Tekintve, hogy egy adott gomba jelenléte akár bontás elrendelését is jelentheti az épületre vonatkozóan, meglehetősen nagy gazdasági jelentőséggel bír a pontos fajmeghatározás.

A DNS vizsgálatok fejlődésével a korábban egy fajnak tartott élőlények, jelen esetünkben gombák egyedei között kimutatható különbségek az adott faj/fajok új, pontosabb rendszertani besorolását tették lehetővé. Az eddig egy fajhoz tartozónak vélt, makro és mikroszkóposan nagy hasonlóságot mutató egyedek között a DNS vizsgálatokkal gyakran több eltérő faj jelenlétét is sikerült kimutatni és újabb, eddig ismeretlen fajok beazonosítása/felismerése is lehetővé vált.

Jelen kísérletünkben az általunk épületekből gyűjtött, nem egyértelműen meghatározható minták esetén különböző DNS analitikai módszerek alkalmazásával kívántuk pontosítani a fajmeghatározást, ezzel hozzásegítve a gyakorlati szakembereket a pontosabb diagnózishoz és a kármentesítés során megfelelő eljárás kiválasztásához.

A faj szinten magas DNS-szekvencia konzerválódottságot mutató riboszómális ITS régiót elterjedten használják fajdiagnosztizálásra az élővilágban. A bioinformatika fejlődése és elterjedése által számos, ismert eredetű gomba genomi vagy ITS szekvenciája áll rendelkezésünkre különböző internetes adatbázisokban. Korábbi eredményeinkre támaszkodva elmondhatjuk, hogy White et al. (1990) publikációja alapján sikeresen azonosítottunk be terepről begyűjtött, makroszkóposan beazonosított, vagy ismeretlen fajhoz tartozó gomba mintákat (micélium, termőtest, stb.). Sok esetben azonban a mintából készített PCR termékek nem voltak alkalmasak közvetlen DNS szekvenálásra, mivel a mintán jelenlévő más gombafajok ITS régióját is felszaporítottuk és a minta kevertsége miatt értékelhetetlenek voltak a szekvenálási adatok.

A munka során célul tűztük ki, hogy ezekből a kevert mintákból nyert ITS PCR termékeket bakteriális, plazmid DNS-be történő klónozással mintegy elválasszuk egymástól és ezzel lehetővé tegyük a különböző fajokból származó DNS amplifikátumok egyenként történő megszekvenálását. Mindemellett a gomba mintákból kivont DNS-eket nagy áteresztő képességű, Újgenerációs szekvenálásnak is alávetjük, amely képes egy reakcióban egyszerre az összes jelenlévő gomba (vagy egyéb élőlény) 18S riboszóma génjének és ITS régiójának megszekvenálására.

Az épületek legjelentősebb károsítójának tartott *Serpula lacrymans* németországi mintáinak DNS vizsgálatai az irodalmi adatok szerint igazolták, hogy a korábban egy fajnak vélt, makroszkópiusan hasonló megjelenésű minták nem egy fajhoz, adott esetben külön nemzetséghez tartoznak. A *Serpula lacrymans*-hoz megjelenésében és genetikai állományában leginkább hasonló faj a *Serpula himantioides*, amely genetikai állománya 96%-os egyezést mutat a *S. lacrymans*-sal, de az ITS szekvencia alapján jól elkülöníthető. A *S. lacrymans*-hoz szintén hasonló megjelenésű, néhány évtizeddel ezelőtt a *Serpula* fajoktól még nem elkülöníthető *Leucogyrophana* fajok mára már jól különválaszthatóvá váltak. A *Leucogyrophana* fajok közül a *Leucogyrophana romellii* 93%, a *Leucogyrophana pinastri* 84%, a *Leucogyrophana arizonica*, a *Leucogyrophana olivascens* és a *Leucogyrophana mollusca* 80%, a *Leucaena pulverulenta*-nak pedig csak egy nagyon kis része illik rá a *S. lacrymans* ITS-ére, így ezek a fajok egymástól DNS vizsgálatokkal jól elkülöníthetők [2].

A vizsgálatok kezdetén reméltük, hogy az említett fajok közül az alkalmazott DNS analitikai módszerekkel sikerül kimutatni néhányat a fent említett fajok közül is.

A jelen kísérletben, 15 vizsgált mintából 10 esetben sikerült a minta fenotípusával összeegyeztethető fajt diagnosztizálnunk a beklónozott ITS PCR termékek megszekvenálásával. Ezek közül három mintánál az előzetes makrovizsgálatok is alátámasztották az eredményt. A 15 vizsgált minta közül egy minta esetében más gombafajt (penészgomba) sikerült azonosítanunk, két mintánál pedig nem találtunk az ITS szekvenciákkal teljesen egyező szekvenciákat az adatbázisokban. További két minta pedig nem volt alkalmas a belőlük történő DNS felszaporításra.

Újgenerációs szekvenálással 3 mintát vizsgáltunk meg. Az egyik esetében, ahol a hagyományos ITS szekvenálással nem tudtuk kimutatni a feltételezett faj DNS-ét, az Újgenerációs szekvenálással, bár alacsony szinten, de sikerült igazolni, hogy jelen van. Mellette pedig több kártékony gombafaj jelenlétét is bizonyítottuk. Egy másik mintánál pedig sikerült azonosítanunk az ITS szekvenálás során is azonosított fajt, szintén több farontó gomba jelenlétében.

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a DNS diagnosztikai módszerek önmagukban semmiképp sem helyettesíthetik a terepi szakértők vizsgálatait, az épületekből vett, károsított faanyagok laboratóriumi vizsgálata önmagában nem hoz kellő eredményt, ugyanakkor adott minták esetében nagy segítséget adhatnak a szakértők számára a fajmeghatározáshoz.

A módszer gyakorlati hasznát nagy értékű épületszerkezetek, műemlékek, műtárgyak károsítóinak meghatározásakor, esetleg vitás bírósági ügyekben a szakértői vélemények további alátámasztásában látjuk.

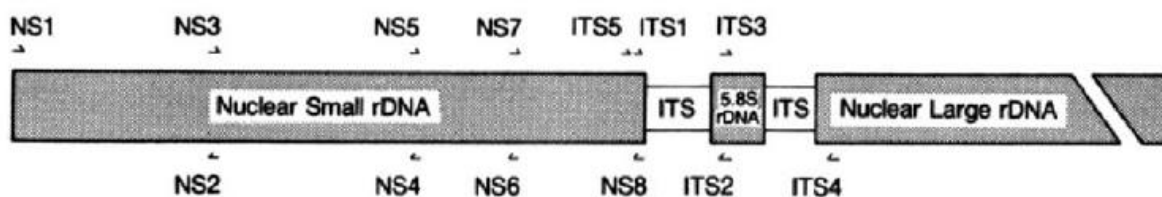
Az ITS alapú PCR termékek szekvenálása előtt mindenképp javasoljuk a PCR termékek plazmidba klónozását és a baktérium kolónia PCR-ekkel történő szeparációját. Az Újgenerációs szekvenálási eljárások nagy áteresztőképességük miatt számos faj jelenlétét igazolhatják, amik a beküldött mintákon jelenlévő egyéb élőlények DNS nyomainak (spóra, pollen, szövetdarabok, stb.) köszönhető. Ezért, ha lehetséges, javasoljuk a minták előzetes felületi fertőtlenítését, majd oltófülkében történő, a minta belsejéből vett gombaszövedék, vagy termőtest rész kiemelését és a DNS kivonáshoz, a szennyezett területek elkerülésével történő mintavételezést. A DNS alapú diagnosztikai rendszerek hatékonyságát nagyban befolyásolhatja a beküldött minta kora. Idősebb, nem élő minták esetében a felülfertőzöttség esélye megnő, illetve a benne lévő DNS minősége csökken, mindezek hatására nehezebbé válik a mintához rendelhető faj(ok) meghatározása, ezért a nagy gondossággal kivitelezett, terepen történő mintavételezés és a minták megfelelő, steril tárolása kiemelt fontossággal bír.

Az Újgenerációs szekvenálási rendszerek használata jelentősen költségesebb (25-30 x) a hagyományos Sanger szekvenáláshoz képest, ami a technológia elterjedésével és fejlődésével mérséklődhet, ugyanakkor nagy áteresztő képességük miatt ezek a módszerek sokkal versenyképesebbek a fajok diagnosztizálásában.

2. Bevezető

Az elvégzett munkánk alapját White et al. (1990) publikációja szolgáltatja, amelyben a szerzők univerzális (az egyes gombafajok között konzerválódott DNS szekvenciákra tervezett) ITS (internal transcribed spacer) PCR (polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció) indítószekvenciákat közölnek le, melyek lehetőséget kínálnak ismeretlen gombafajok DNS-alapon történő azonosítására.

A riboszómális RNS-eket kódoló gének (18S - kisalegység, 28S – nagy alegység) egymás mellett helyezkednek el a genomon. A közöttük lévő nem kódoló, RNS-sé át nem íródó részt nevezik ITS (internal transcribed spacer) régiónak, amely fajon belül meglehetősen konzervált (azonos), a különböző fajok között pedig számos mutációt (bázis pontmutáció, inszerció - beépülés, deléció - kiesés) tartalmaz. A DNS felszaporítására végzett reakció (PCR) során az univerzális indító DNS szekvenciák (ITS1 és ITS4, 1. ábra) a legtöbb gombánál teljesen megegyeznek (számos gombafaj DNS-ének összehasonlítása eredményeként), tehát használatukkal bármely gombafaj ITS régiója felszaporítható.



1. ábra: A fajdiagnosztizálásra használt PCR indítószekvenciák helyzetének sematikus ábrája (ITS1-5) [1].

A PCR során nem csak felszaporítjuk, de mintegy izoláljuk, elválasztjuk a vizsgálni kívánt DNS szakaszt. A reakciót követően az izolált DNS-t felépítő bázisok (adenin - A, guanin - G, citozin - C, timin - T) sorrendje Sanger-féle szekvenálási reakció során meghatározható. Az így kapott bázissorrend DNS adatbázisokba feltöltött, ismert eredetű szekvenciákkal összehasonlítható és a kérdéses faj megállapítható.

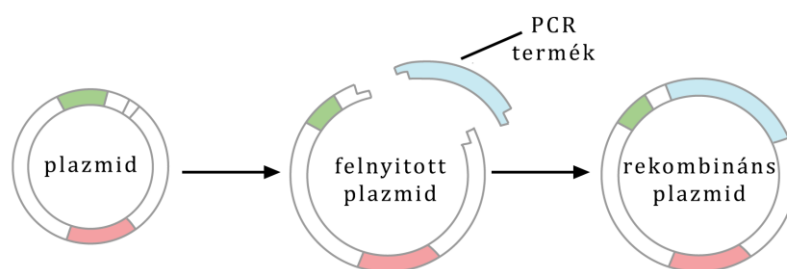
A White et al. (1990) által leírt rendszer alkalmas lehet faanyagokat károsító gombafajok diagnosztizálására is. A rendszer előnye egyben hátránya is, hiszen, a PCR indítószekvenciák minden gombára általánosan specifikusak, ezért a beküldött farontógomba mintákon (termőtest, fonal, spóra, stb.) lévő, más fajhoz tartozó gomba szennyeződések (penészgombák, spórák, stb.) miatt sok esetben többféle szekvenciájú és méretű PCR terméket kapunk. Ezek a termékek DNS gélelektroforézissel méret alapján szétválaszthatók egymástól. A gélelektroforézis során a DNS oldatot egy gél lapka egyik felén lévő zsebbe helyezük, majd egy

elektromos teret biztosító puffer oldatban a gél lapka másik felének irányába vándoroltatjuk. Erre a DNS negatív töltése ad lehetőséget. A műveletet addig végezzük, amíg a különböző méretű (tömegű) DNS szálak szét nem válnak egymástól, mivel a kisebb DNS darabok gyorsabban haladnak az elektromos térben. Ezt követően az egyes DNS darabok egy festék segítségével UV-fényben vizualizálhatók és a gélből kivághatók, kitisztíthatók és alávethetők a DNS szekvenálásnak. Sok esetben azonban az egyes gombafajok ITS PCR termékei között méretüket tekintve nagyon kis különbségek lehetnek, melyek megnehezítik a visszaizolálásukat. A Sanger szekvenálás során pedig az egy reakcióban jelenlévő több, különböző szekvenciájú DNS értékelhetetlen, „kevert” szekvenálást eredményez.

3. A szakmai anyag tagolt kifejtése

3.1. A munka célkitűzése

Az előbbiekben leírt módszer tökéletesítésére célul tűztük ki az ITS PCR termékek bakteriális plazmidba (baktériumokban másolódni képes, extrakromoszómális cirkuláris DNS) történő beépítését, klónozását. A klónozás során a kevert, több gomba ITS régióját tartalmazó PCR terméket összekeverjük egy felnyitott plazmidokat tartalmazó oldattal, majd DNS ligáz enzim segítségével integráljuk őket a plazmidba (2. ábra).



2. ábra: A DNS klónozás lépései

Az így létrehozott rekombináns plazmid halmaz baktériumsejtekbe juttatható, mely sejtek táptalajon felneveszthetők. A módszer lényege, hogy minden egyes plazmidba csak egyféle gomba ITS DNS kerülhet és a táptalajon felövő baktérium telepek mindegyike csak egy féle rekombináns plazmidot tartalmazhat. Ezt követően az egyedi baktérium kolóniákból végzett ITS PCR során már csak azonos szekvenciájú terméket fogunk kapni, ami Sanger szekvenálásra küldhető.

A kevert PCR termékek közvetlen megszekvenálására is lehetőség nyílik úgynevezett Újgenerációs szekvenálási platformokkal. Ezek a módszerek lehetővé teszik, hogy a különböző DNS szálakat molekulánként elemezzük, megállapítsuk a bázissorrendjüket és mennyiségi arányokat is meghatározzunk az egyes molekulák között. Ezek a technikák meglehetősen drágák, ami a fejlődésük és elterjedésük növekedésével mérséklődhet, ezért mindenképp fontosnak tartottuk, hogy néhány mintán leteszteljük hatékonyságukat.

3.2. Anyag és módszer

3.2.1. DNS izolálás

A DNS izolálást „direkt kivonó” kit-tel végeztük el. Erre a Sigma Extraction (Sigma, E7526) és Dilution Solution (Sigma, D5688) oldatait használtuk. A terepről beszerzett mintákból egy maximum 5 x 5 mm-es darabot folyékony nitrogénben dörzsöltünk el dörzsmozsarakban. 100 µl Extraction solution-t raktunk egy 1,5 ml-es eppendorf csőbe, amibe előtte egy 2,5 mm-es átmérőjű csapágygolyót helyeztünk el. A körülbelül 10 µl mennyiségű elporított mintát az Extraction oldatba raktuk, majd a csöveket labormalomba helyeztük és a golyók segítségével az oldatban tovább homogenizáltuk a mintákat. Ezt követően a csöveket 95 °C-os termosztátban inkubáltuk 12 percig, majd jégen lehűtöttük és hozzáadtuk a 100 µl Dilution puffert. Amennyiben az oldat túl sötét volt, csak 10 µl-t raktunk belőle 100 µl Dilution oldathoz. Az oldatot alaposan összekevertük vortex segítségével. A mintát 30 másodpercig lecentrifugáltuk, majd a DNS-t tartalmazó felülúszó folyadékból 100 µl-t új csövekbe raktuk.

Az Újgenerációs szekvenálásra küldött gomba DNS mintákat QIAGEN's DNeasy® Plant Mini Kit segítségével vontuk ki egy korábban leírt protokollt követve [3].

3.2.2. ITS PCR

A PCR-eket Phusion Hot Start II polimerázzal (Thermo, F549L) készítettük el. Az 50 µl-es reakciók 1 µl templátot (direct kivonás) tartalmaztak. Indító szekvenciaként az ITS_forward (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3') és az ITS_reverz (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') univerzális oligókat használtuk. A PCR-eket az alábbi programon végeztük el: 95 °C 5 perc, (95 °C, 30 sec; 55 °C, 30 sec; 72 °C, 20 sec) x 35 ciklus, 72 °C, 10 perc; 4°C. A PCR ~600 nukleotidos termékeket eredményezett.

A PCR termékeket 1,2% agaróz TBE gélben választottuk szét (120 V feszültségen) méret szerint. A szekvenálást megelőzően a PCR termékeket GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo, K0692) segítségével tisztítottuk meg a reakció elegytől.

3.2.3. DNS klónozás, baktérium transzformáció

A PCR termékek klónozásához CloneJet kitet (Thermo Fisher, K1231) használtunk, a DNS ligálását a gyártó által leírt protokoll szerint végeztük, annyi eltéréssel, hogy az összetevőket csak fele mennyiségben használtuk. A ligáláshoz 2-4 µl tisztítatlan PCR terméket használtunk fel.

A ligálási termékből 5 µl mennyiséget használtunk fel a bakteriális transzformációhoz, amelyhez 100 µl DH5α *Escherichia coli* kompetens sejtsuszpenziót alkalmaztunk.

3.2.4. Baktérium kolónia PCR

A szilárd táptalajra juttatott baktérium szuszpenzióból felnőtt, egy sejtből kiinduló telepek közül 6-6 db-ot választottunk ki ligálási reakciónként (mintánként). A kolónia PCR-ek esetében *Taq* polimerázt (EP0402, Thermo Fisher) használtunk, mivel ezt követően már PCR terméket fogunk megszekvenálni, a „proof-reading” aktivitás általi előnynek már nincs akkora jelentősége. A kolónia PCR-eket a plazmidra specifikus gyári PCR oligókkal (forward: 5’ – CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC – 3’; reverz: 5’ – AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG – 3’) végeztük el, az előbbieken leírt PCR programot használva. A reakciót 25 µl-re mértük össze a gyártó által leírt protokollt alkalmazva. A templát plazmidokat tartalmazó baktériumokat steril fa pálcikával szedtük fel a táptalajról és mostuk bele a PCR reakció elegybe. A PCR termékeket gélben szétválasztottuk, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy csak egy méretű terméket eredményezett a reakció. A mintánként 6-6 db PCR közül 2-3, lehetőség szerint méretben különböző terméket tisztítottunk ki (GeneJET Gel Extraction Kit, K0692, Thermo Fisher) és adtunk le szekvenálásra (Mix2seq kit, Eurofins Genomics). A szekvenálást az ITS_forward oligóval végeztettük el.

3.2.5. DNS szekvenálás és feldolgozása

Az ITS PCR termékek szekvenálását az Eurofins céggel végeztettük el. A cégtől kapott szekvenciák leolvasási kromatogramját leellenőriztük minőségi szempontból. Megfelelő minőség esetén a szekvenciák végéről eltávolítottuk a ~100 nukleotid hosszúságú plazmid eredetű részt. Az így nyert szekvenciákat az internetes NCBI adatbázis DNS szekvencia összehasonlító alkalmazásába (blastn, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) vittük be, melynek során az alapbeállításokat alkalmaztuk. Az összehasonlító elemzés során megkaptuk, hogy a beadott szekvencia milyen arányban illik rá az adatbázisban található hasonló szekvenciákra (3. ábra, Query score oszlop), illetve hogy ez a rész milyen arányban mutat vele azonosságot szekvencia szinten (3. ábra, Per. Ident oszlop). Egy adott gombát 95%-os, vagy afölötti szekvencia ráilleszthetőség és egyezés esetén soroltuk a kapott szekvenciához rendelt fajhoz.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

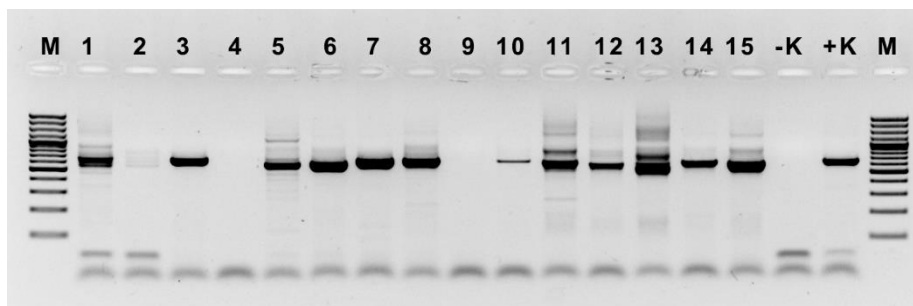
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Auricularia auricula-judae voucher SH1219 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	935	935	100%	0.0	99.61%	K0921135.1
<input type="checkbox"/>	Auricularia auricula-judae voucher JT 14 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	935	935	100%	0.0	99.61%	KT152101.1
<input type="checkbox"/>	Auricularia auricula-judae voucher JT 06 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	935	935	100%	0.0	99.61%	KT152100.1
<input type="checkbox"/>	Auricularia auricula-judae voucher JT 04 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	935	935	100%	0.0	99.61%	KT152099.1
<input type="checkbox"/>	Auricularia auricula-judae AFTOL ID 1681 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	935	935	100%	0.0	99.61%	DQ520099.1
<input type="checkbox"/>	Auricularia auricula-judae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	935	935	100%	0.0	99.61%	AF281268.1
<input type="checkbox"/>	Auricularia auricula-judae voucher JT01 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	931	931	100%	0.0	99.42%	K0921136.1
<input type="checkbox"/>	Auricularia auricula-judae voucher LYBR 5404 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	99%	0.0	99.41%	KP776003.1

3. ábra: Egy NCBI blastn elemzés eredménytáblázata (részlet)

Az Újgenerációs szekvenálások elvégzésére a BIOMI céget (NAIK-MBK, Gödöllő) bízta meg, akik LoopSeq™ kit-et (Loop Genomics) alkalmazva Illumina Myseq szekvenátoron hajtották végre a protokollt. Az eljárás során a gomba genom 18S riboszóma DNS-ét és a közvetlen mellette található ITS régiót specifikus DNS oligókkal feljelölik, izolálják, majd megszekvenálják. Az eljárás sokkal pontosabb fajmeghatározást tesz lehetővé, mivel a vizsgált DNS szakasz (~2400 nukleotid) nem csak az ITS régiót (~600 nukleotid) foglalja magába, hanem a 18S riboszóma DNS-t is.

4. Eredmények és kiértékelésük

A munka során 15 db terepről begyűjtött mintát (*1. sz. melléklet*) dolgoztunk fel. Az ITS oligókkal végzett PCR során 13 esetben kaptunk PCR terméket (4. ábra), melyek közül a legtöbb már a gélkép alapján is kevertnek bizonyult, mivel több eltérő méretű terméket kaptunk.



4. ábra: A gomba DNS-ekből készített ITS PCR termékek gélelektroforézise (M: DNS méret marker, 100 bp plus, Thermo Fisher; 1-15: gomba DNS minták; -K: DNS nélküli technikai kontroll; +K *Serpula lacrymans* gombaspóra DNS)

A PCR termékek plazmidba klónozását és azok baktériumba juttatását követően 6-6 baktérium telepről végeztünk kolónia PCR-t (*2. sz. melléklet*). Amennyiben találtunk és sikerült visszaizolálnunk különböző méretű termékeket azokat egyenként leadtuk szekvenálásra (a, b, c).

A 13 plazmidba klónozott ITS szekvenciából 11 esetben (2, 3, 6, 7, 8, 10-15) került sor fajmeghatározásra megfelelő megbízhatósággal (>95% szekvencia egyezés) (*1. Táblázat*). Ezek közül csak egy esetben kaptunk olyan fajt (2. minta), amely nem összeegyeztethető a beküldött minta makroszkópos képével. Két esetben (1, 5) pedig a szekvenálás során kapott szekvencia csak részben volt felilleszthető más, az adatbázisban található szekvenciára.

Az Újgenerációs szekvenálás során 3 mintából (1, 5, 13) vontunk ki DNS-t, melyeket a BIOMI (NAIK-MBK, Gödöllő) céggel megszekvenáltattunk. A minta kiválasztása során a korábbi ITS PCR eredményeket vettük alapul és olyanokat választottunk, melyek kevert PCR terméket eredményeztek. Az Újgenerációs szekvenálás eredményeként megkaptuk a mintában lévő valamennyi gombafaj és több esetben magasabb rendű élőlény (állat, növény) 18S RNS és ITS szekvencia adatait, melyek a mintában jelen voltak. A vizsgálatok során lényegesen nagyobb fajszaót kaptunk a vizsgált mintákra, mint amire a kísérlet kezdetén számítottunk.

1. Táblázat: A DNS szekvenálások eredményének összefoglaló táblázata

Sorszám	Feltételezett faj	Illesztett szekvencia hossza (bp)	Fajhatározás eredménye (NCBI)	A szekvencia ráilleszthetősége (Query cover)	A szekvencia egyezése (Ident)
1.	<i>Serpula lacrymans</i>	475	<i>Coprinellus micaceus</i>	66%	98,19%
2.	<i>Serpula lacrymans</i>	624	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	100%	100%
3.	<i>Poria sp.</i>	a: 565, b: 553	a,b: <i>Amyloporia xantha</i>	a,b: 100%	a, b: 100%
4.	<i>Poria sp.</i>	n.a.	n.a.		
5.	<i>Poria sp.</i>	a: 509, b: 355, c: 486	a: <i>Priceomyces medius</i> , b: <i>Mertensia ovum</i> , c: <i>Ascomycota sp.</i>	a: 66%, b: 44%, c: 69%	a: 93,79, b: 85,89, c: 85, 71%
6.	<i>Auricularia auricula-judae</i>	a: 512, b: 506	a,b: <i>Auricularia auricula-judae</i> ,	a,b: 100%	a: 99,42%, b: 99,61%
7.	?	a: 560, b: 565	a,b: <i>Lentinus arcularius</i>	a,b: 99%	a,b: 100%
8.	?	a: 552, b: 552	a,b: <i>Porostereum spadiceum</i>	a,b: 100%	a,b: 100%
9.	?	n.a.	n.a.		
10.	?	a: 535, b: 539	a: <i>Peniophora lycii</i> , b: <i>Peniophora cinerea</i>	a,b: 100%	a: 99,63, b: 98,14%
11.	?	a: 545, b: 509	a: <i>Trichoderma harzianum</i> , b: <i>Orbilia eucalypti</i>	a,b: 100%	a: 100%, b: 96,67%
12.	<i>Exidia glandulosa</i>	b: 495	b: <i>Exidia glandulosa voucher</i>	b: 100%	b: 100%
13.	?	a: 520, b: 452	a: <i>Trametes versicolor</i> , b: <i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	a,b: 100%	a,b: 100%
14.	?	550	<i>Meruliopsis corium</i> vagy <i>Byssomerulius corium</i>	100%	100%
15.	?	a: 523, b: 520	a: <i>Trametes versicolor</i>	a,b: 100%	a,b: 100%

Az általunk feltételezett néhány valószínűsíthető faj helyett egy-egy esetben akár több száz faj jelenléte is kimutatható volt. Az 1-es minta esetében 219, a 2-esnél 58, a harmasnál 500 különböző egyedi szekvenciát kaptunk, különböző leolvasási számokkal. A fajok döntő része alacsonyabb rendű gombákhoz tartozott, melyet jól szemléltet a 3. sz. melléklet ábrái is, ezért a munka szempontjából nem fontos fajokat kiszűrtük a vizsgálatból és csak a magasabb rendű gombafajokra (aszköspórás és bazidiospórás) koncentráltunk.

A 2. Táblázat-ban láthatóak a szekvenálások során megtalált fontosabb fajok mintáinként, feltüntetve az adott fajra kapott DNS leolvasások számát. Az 1-es minta esetében az előzetes szakértői vizsgálatok *Serpula lacrymans* fajt határoztak meg, amit nagyon alacsony szinten (1 leolvasás) ki is mutattunk. A mintában azonban számos más farontó gomba DNS-ét is igazoltuk. Az 5-ös minta esetében csak egy olyan fajt (*Grosmannia clavigera*) találtunk, amely esetlegesen összeegyeztethető a kapott minta makroszkópos képével. A 13-as minta eredménye pedig megerősítette a hagyományos ITS szekvenálás során diagnosztizált fajt (*Trametes versicolor*), amely ebben az esetben is összeegyeztethető a makroszkópos képpel.

A teljes kísérletsorozat kezdete óta a 21 épületből vett mintánál összesen 6 esetben volt igazolható az épületek beépített faanyagainak legveszélyesebb károsítója a *Serpula lacrymans* jelenléte. A *S. Lacrymans*-ra negatív eredményeket tovább vizsgálva az Újgenerációs módszerrel még egy esetben igazolható volt annak jelenléte.

A vizsgálatok során az épületek beépített faanyagainak jelentős – a *Serpula lacrymans*-sal makroszkóposan könnyen összetéveszthető – károsítók közül, egyik DNS analitikai módszerrel sem tudtuk kimutatni a *Leucogyrophana* fajokat vagy a *Serpula himantoides*-t a begyűjtött mintákból, bár ezek jelenlétére számítottunk. Sikertelenül azonban igazolni a *Cystidiodontia sp.*, az *Antrodia xantha*, a *Coriolopsis trogii*, a *Xylobolus subpileatus* fajokat és a pincegombák közül a *Coniophora olivaceae* és *Coniophora hymantoides* jelenlétét a kérdéses esetekben, amikor a makroszkópos vizsgálatok nem adtak kellő támpontot.

2. Táblázat: Az Újgenerációs szekvenálások során kapott fontosabb fajok kivonata

1-es minta (29194 leolvasás)		5-ös minta (746 leolvasás)		13-as minta (23255 leolvasás)	
Leolvasás (db)	Faj	Leolvasás (db)	Faj	Leolvasás (db)	Faj
984	<i>Trametes sp.</i>	10	<i>Grosmannia clavigera</i>	66	<i>Trametes versicolor</i>
922	<i>Lentinus arcularius</i>	1	<i>Trichoderma citrinum</i>	17	<i>Tremella sp.</i>
116	<i>Auricularia auricula-judae</i>			12	<i>Trichoderma hamatum</i>
116	<i>Ganoderma australe</i>			6	<i>Trametes hirsuta</i>
19	<i>Antrodia albida</i>			3	<i>Lentinus sp.</i>
19	<i>Coriolopsis byrsina</i>				
2	<i>Antrodia heteromorpha</i>				
1	<i>Serpula lacrymans</i>				

Az eredmények alapján leszűrhető, hogy a DNS diagnosztikának döntő szerepe lehet az épületek faanyagait károsító gombák pontos beazonosításában. A jövőben mindenképpen fontosnak tartjuk – amennyiben lehetőség van rá –, a minták előzetes felületi fertőtlenítését, illetve felhívjuk a terepen dolgozó szakemberek figyelmét, a lehetőség szerint élő, szennyeződésektől mentes minták begyűjtésére, hogy ezzel is lecsökkenthessük más, a mintával nem azonosítható gombák kimutatását.

A molekuláris genetikai módszerek hasznos kiegészítői lehetnek a faanyagvédelmi szakértők munkájának. A PCR technika érzékenysége kombinálva a bakteriális klónozással sok esetben lehetővé teszi egy adott mintából akár több gombafaj pontos kimutatását, illetve kis mennyiségben jelen lévő gombák, vagy kissé bomlott minták esetén is a diagnosztizálást. Természetesen a gondos mintavételezéssel a PCR reakció kivitelezése is hatékonyabb és pontosabb eredményt ad. Az eljárás viszonylag költséghatékonyan végezhető el. Hátránya lehet, hogy a különböző fajok előfordulásának mértékét a mintában nem képes meghatározni. Ezzel szemben az Újgenerációs szekvenálás egy adott mintán belül az előforduló fajok megoszlásáról is képet ad, viszont jóval nagyobb költségű eljárás.

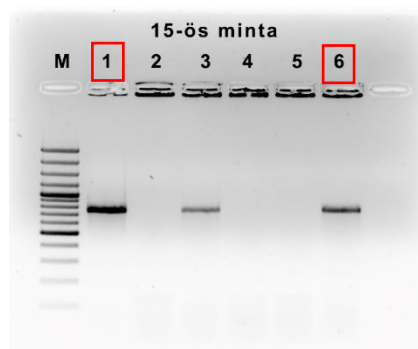
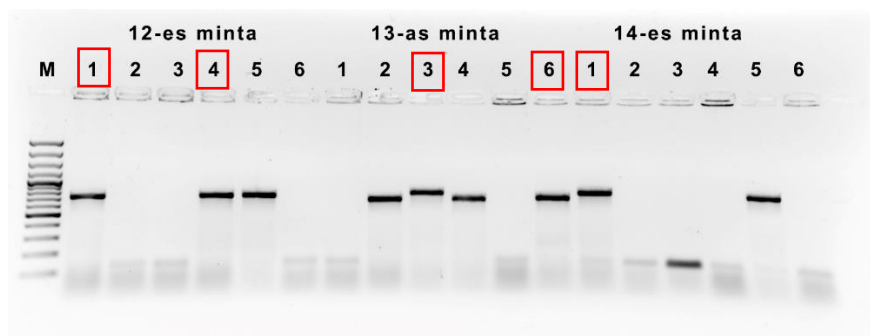
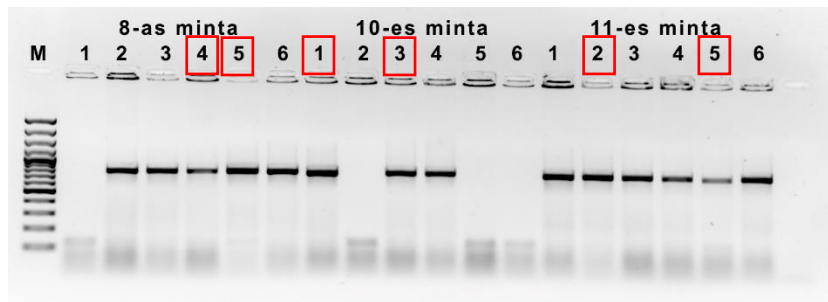
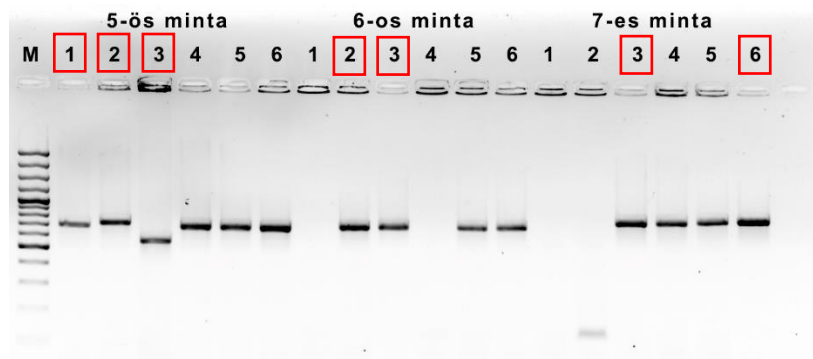
5. Mellékletek

1. sz. melléklet: A terepről begyűjtött minták fotója

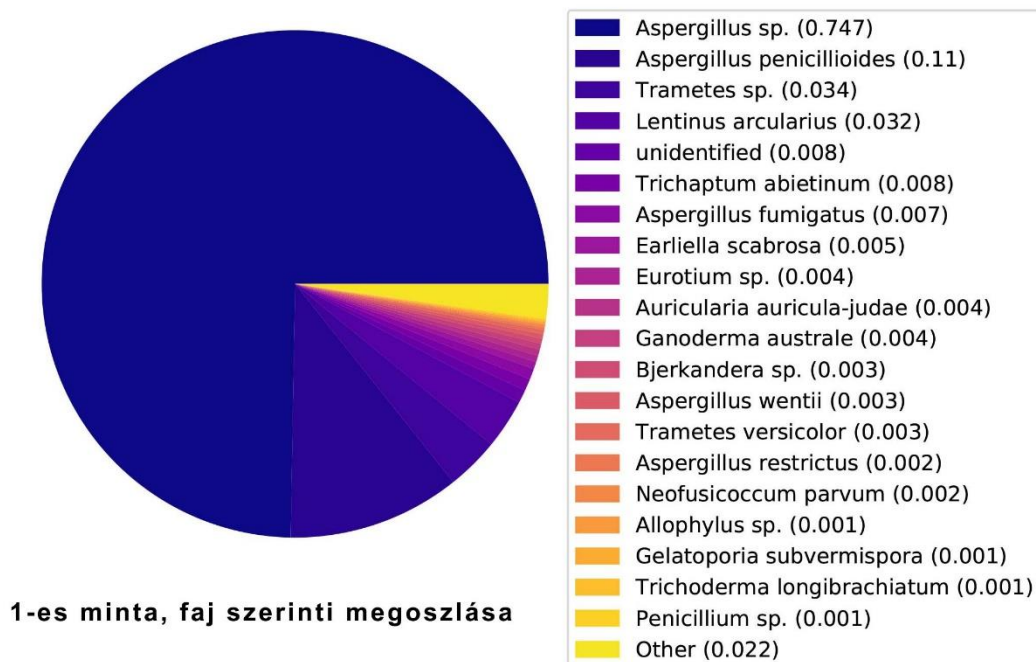
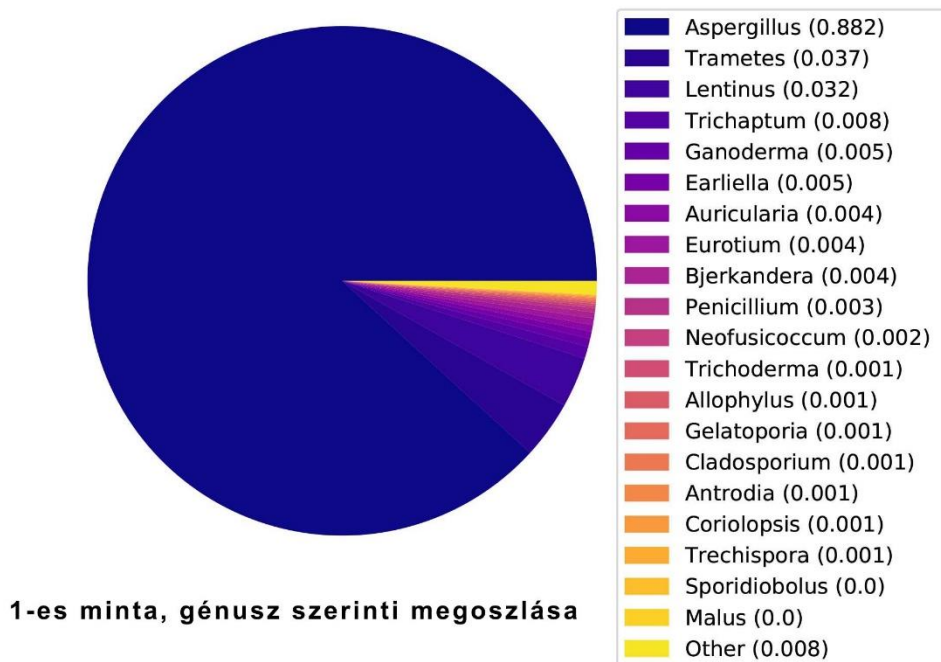


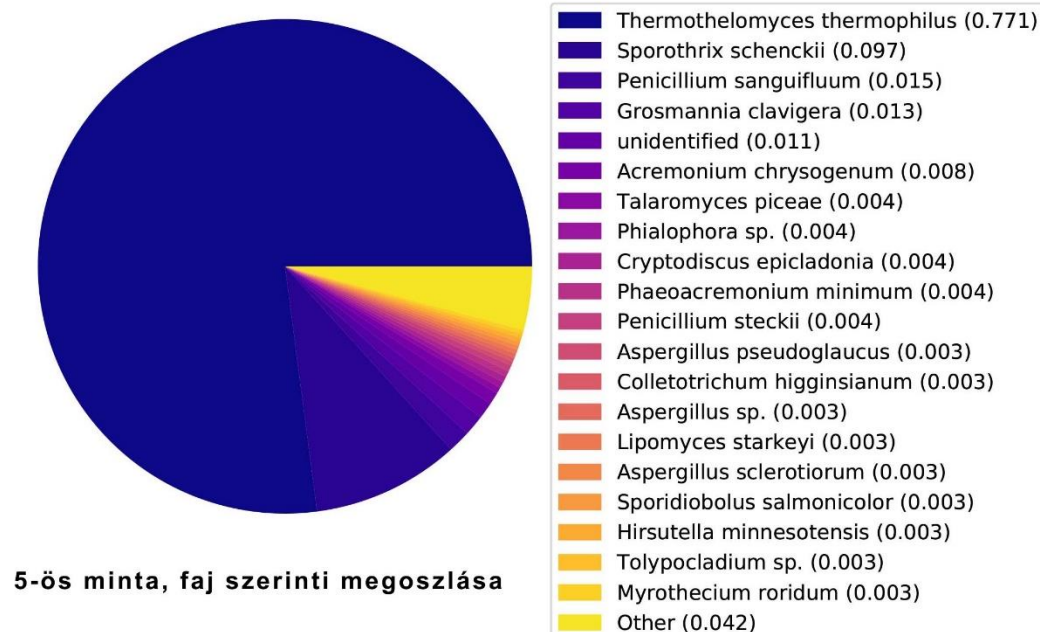
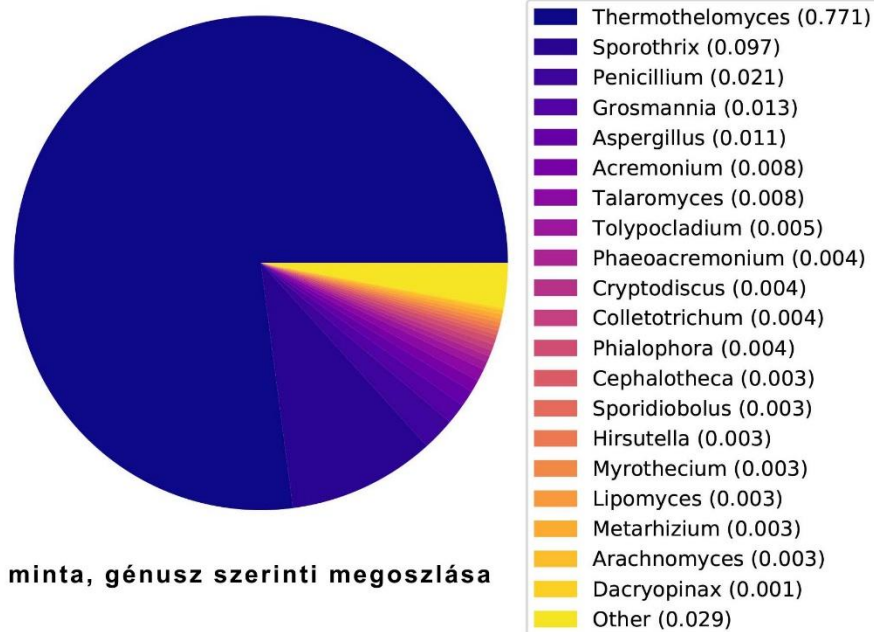
2. sz. melléklet: A baktérium kolóniákból (6-6 db) végzett PCR termékek gélelektroforézise. M: DNS molekulásúly marker (100 bp plus, Thermo Fisher), Piros négyzet: a szekvenálásra leadott minták

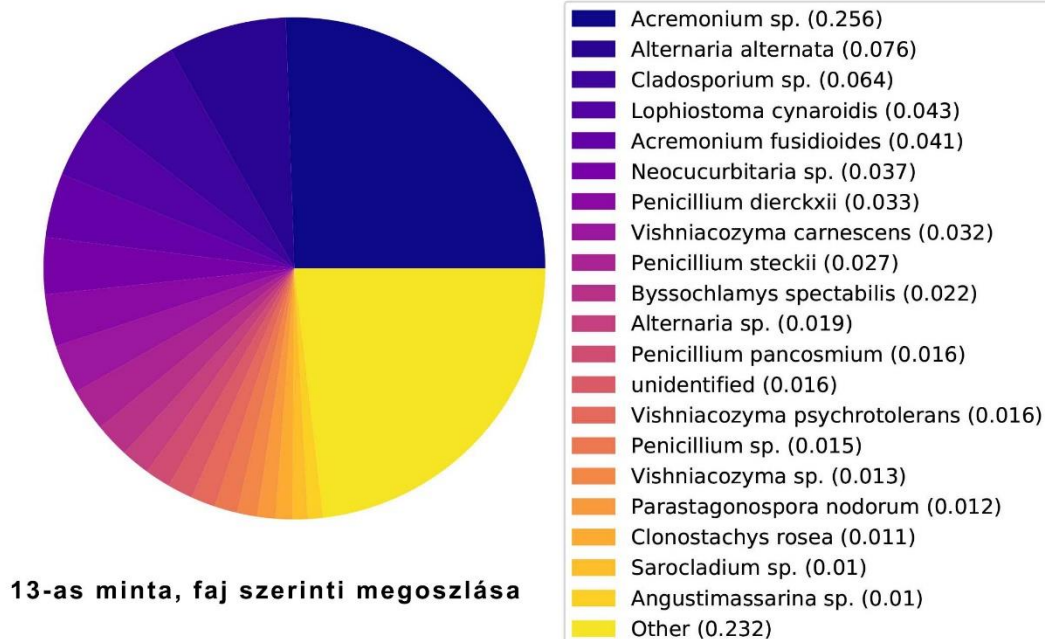
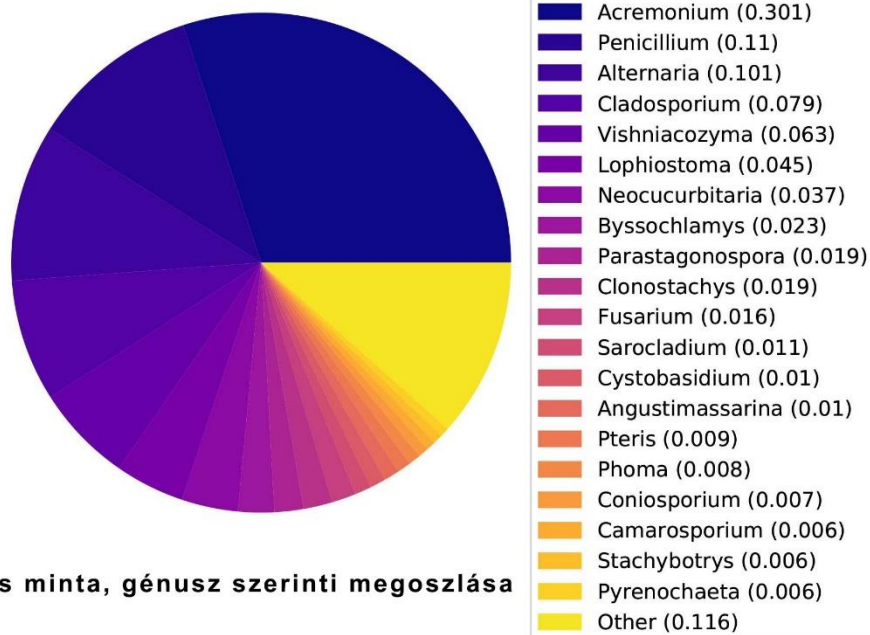




3. sz. melléklet: Az Újgenerációs szekvenálás során kapott fajok megoszlása a leolvasási szám alapján kalkulált abundancia szerint génusz és faj szinten







**4. sz. melléklet: Az Újgenerációs szekvenálás során kapott fajok listája a
leolvasások száma szerint rendezve**

1-es minta:

Faj	Leolvasás	Abundancia
Aspergillus sp.	21814	0,747
Aspergillus penicillioides	3215	0,11
Trametes sp.	984	0,034
Lentinus arcularius	922	0,032
unidentified	226	0,008
Trichaptum abietinum	221	0,008
Aspergillus fumigatus	202	0,007
Earliella scabrosa	132	0,005
Eurotium sp.	121	0,004
Auricularia auricula-judae	116	0,004
Ganoderma australe	116	0,004
Bjerkandera sp.	92	0,003
Aspergillus wentii	82	0,003
Trametes versicolor	81	0,003
Aspergillus restrictus	44	0,002
Neofusicoccum parvum	44	0,002
Allophylus sp.	32	0,001
Gelatoporia subvermispora	31	0,001
Trichoderma longibrachiatum	29	0,001
Penicillium sp.	28	0,001
Ganoderma lucidum	27	0,001
Aspergillus steynii	23	0,001
Antrodia albida	19	0,001
Coriolopsis byrsina	19	0,001
Trechispora stellulata	19	0,001
Bjerkandera adusta	18	0,001
Cladosporium sp.	18	0,001
Aspergillus oryzae	16	0,001
Aspergillus cristatus	12	0
Aspergillus glaucus	12	0
Aspergillus udagawae	12	0
Lentinus tigrinus	12	0
Penicillium corylophilum	11	0
Sporidiobolus salmonicolor	11	0
Aspergillus aculeatus	10	0
Ganoderma carnosum	10	0
Aspergillus pseudoglaucus	9	0
Byssomerulius corium	9	0
Dichomitus squalens	9	0
Paramicrosporidium sp.	9	0
Penicillium capsulatum	9	0
Incertae sp.	7	0

Phanerochaete sp.	7	0
Aspergillus carbonarius	6	0
Aspergillus cvjetkovicii	6	0
Aspergillus ruber	6	0
Aspergillus terreus	6	0
Crataegus pinnatifida	6	0
Malus domestica	6	0
Neurospora tetrasperma	6	0
Thermothelomyces thermophilus	6	0
Thielavia sp.	6	0
unidentified	6	0
Amorphotheca resinae	5	0
Aspergillus flavipes	5	0
Aspergillus luchuensis	5	0
Aspergillus novofumigatus	5	0
Gongronella sp.	5	0
Hexagonia hirta	5	0
Hypochnicium albostramineum	5	0
Malus micromalus	5	0
Papiliotrema flavescens	5	0
Penicillium brasilianum	5	0
Rubus allegheniensis	5	0
Aspergillus niger	4	0
Basidiobolus heterosporus	4	0
Blastomyces gilchristii	4	0
Cinereomyces lindbladii	4	0
Hypochniciellum cremeoisabellinum	4	0
Trichoderma citrinoviride	4	0
Valsa mali	4	0
Aspergillus baarnensis	3	0
Aspergillus flavus	3	0
Aspergillus jensenii	3	0
Aspergillus nidulans	3	0
Aspergillus sclerotiorum	3	0
Aureobasidium pullulans	3	0
Auricularia cornea	3	0
Auricularia sp.	3	0
Cladosporium cladosporioides	3	0
Dioscorea alata	3	0
Heterobasidion irregulare	3	0
Magnoliophyta sp.	3	0
Malbranchea gypsea	3	0
Parastagonospora nodorum	3	0
Penicillium commune	3	0
Pyrus x	3	0
Trichoderma guizhouense	3	0
unidentified	3	0

unidentified	3	0
<i>Alternaria</i> sp.	2	0
<i>Antrodia heteromorpha</i>	2	0
<i>Aspergillus alliaceus</i>	2	0
<i>Aspergillus chevalieri</i>	2	0
<i>Aspergillus conicus</i>	2	0
<i>Aspergillus fischeri</i>	2	0
<i>Aureobasidium</i> sp.	2	0
<i>Cladosporium halotolerans</i>	2	0
<i>Coriopsis gallica</i>	2	0
<i>Cryptovalsa ampelina</i>	2	0
<i>Epicoccum nigrum</i>	2	0
<i>Hortaea werneckii</i>	2	0
<i>Metarhizium rileyi</i>	2	0
<i>Parastagonospora</i> sp.	2	0
<i>Penicillium consobrinum</i>	2	0
<i>Penicillium flavigenum</i>	2	0
<i>Penicillium janthinellum</i>	2	0
<i>Penicillium nalgiovense</i>	2	0
<i>Penicillium solitum</i>	2	0
<i>Polyporus</i> sp.	2	0
<i>Porostereum spadiceum</i>	2	0
<i>Postia placenta</i>	2	0
<i>Toxicocladosporium</i> sp.	2	0
<i>Trametes cinnabarina</i>	2	0
<i>Trichoderma reesei</i>	2	0
<i>Acanthotrema</i> sp.	1	0
<i>Acremonium</i> sp.	1	0
<i>Agarum</i> sp.	1	0
<i>Angustimassarina</i> sp.	1	0
<i>Antrodia juniperina</i>	1	0
<i>Arachnomyces kanei</i>	1	0
<i>Arthrimum malaysianum</i>	1	0
<i>Arthrocatena</i> sp.	1	0
<i>Aspergillus amstelodami</i>	1	0
<i>Aspergillus campestris</i>	1	0
<i>Aspergillus creber</i>	1	0
<i>Aspergillus cremeus</i>	1	0
<i>Aspergillus neoflavipes</i>	1	0
<i>Aspergillus sojae</i>	1	0
<i>Aspergillus sydowii</i>	1	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	0
<i>Asteromassaria olivaceohirta</i>	1	0
<i>Cephalotheca foveolata</i>	1	0
<i>Chaetomium globosum</i>	1	0
<i>Cladosporium bruhnei</i>	1	0
<i>Cladosporium langeronii</i>	1	0
<i>Coniochaeta mutabilis</i>	1	0

Coniophora puteana	1	0
Corynespora cassicola	1	0
Cystobasidium laryngis	1	0
Cystobasidium sp.	1	0
Diplodia seriata	1	0
Elodea nuttallii	1	0
Endoconidioma populi	1	0
Eriobotrya japonica	1	0
Eupatorium sp.	1	0
Exidiaceae sp.	1	0
Filobasidium sp.	1	0
Filobasidium wieringae	1	0
Ganoderma sp.	1	0
Gymnoascus reesii	1	0
Gymnoascus sp.	1	0
Hemianax sp.	1	0
Hygrocybe punicea	1	0
Leucosporidium scottii	1	0
Lignicola laevis	1	0
Lignosus rhinocerotis	1	0
LKM11 sp.	1	0
Lycium ruthenicum	1	0
Metarhizium album	1	0
Microbotryum lychnidis-dioicae	1	0
Mucor mucedo	1	0
Neocucurbitaria sp.	1	0
Orbilia sp.	1	0
Paracoccidioides brasiliensis	1	0
Paraphaeosphaeria sp.	1	0
Paratrichodorus allius	1	0
Penicillium expansum	1	0
Penicillium glabrum	1	0
Penicillium kewense	1	0
Penicillium paradoxum	1	0
Penicillium simplicissimum	1	0
Penicillium steckii	1	0
Peniophora lycii	1	0
Perenniporia subacida	1	0
Periconia sp.	1	0
Phaeosphaeria sp.	1	0
Phellinus tuberculosus	1	0
Phlebiopsis gigantea	1	0
Phoma sp.	1	0
Phomatospora sp.	1	0
Pluteus salicinus	1	0
Polyporales sp.	1	0
Polytolypa hystricis	1	0
Pseudogymnoascus destructans	1	0

<i>Puccinia striiformis</i>	1	0
<i>Pyrus pyrifolia</i>	1	0
<i>Rhizoctonia solani</i>	1	0
<i>Rosa chinensis</i>	1	0
<i>Sarcinomyces</i> sp.	1	0

5-ös minta:

Faj	Leolvasás	Abundancia
<i>Thermothelomyces thermophilus</i>	575	0,771
<i>Sporothrix schenckii</i>	72	0,097
<i>Penicillium sanguifluum</i>	11	0,015
<i>Grosmannia clavigera</i>	10	0,013
<i>Acremonium chrysogenum</i>	6	0,008
<i>Cryptodiscus epicladonia</i>	3	0,004
<i>Penicillium steckii</i>	3	0,004
<i>Phaeoacremonium minimum</i>	3	0,004
<i>Phialophora</i> sp.	3	0,004
<i>Talaromyces piceae</i>	3	0,004
<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	2	0,003
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	2	0,003
<i>Aspergillus</i> sp.	2	0,003
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	2	0,003
<i>Hirsutella minnesotensis</i>	2	0,003
<i>Lipomyces starkeyi</i>	2	0,003
<i>Myrothecium roridum</i>	2	0,003
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	2	0,003
<i>Tolypocladium</i> sp.	2	0,003
67-14 sp.	1	0,001
<i>Achroiostachys humicola</i>	1	0,001
<i>Apinisia graminicola</i>	1	0,001
<i>Arachnomyces glareosus</i>	1	0,001
<i>Arachnomyces</i> sp.	1	0,001
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	0,001
<i>Aspergillus penicillioides</i>	1	0,001
<i>Basidiobolus meristosporus</i>	1	0,001
unidentified	1	0,001
<i>Caudospora</i> sp.	1	0,001
<i>Cephalotheca foveolata</i>	1	0,001
<i>Cephalotheca reniformis</i>	1	0,001
unidentified	1	0,001
<i>Colletotrichum lupini</i>	1	0,001
<i>Colpodida</i> sp.	1	0,001
unidentified	1	0,001
<i>Elaphomyces granulatus</i>	1	0,001
<i>Leohumicola verrucosa</i>	1	0,001
<i>Mangifera indica</i>	1	0,001

Metarhizium brunneum	1	0,001
Metarhizium rileyi	1	0,001
Microascus cirrosus	1	0,001
Nectria cinnabarina	1	0,001
Neofusicoccum parvum	1	0,001
unidentified	1	0,001
Penicillium sp.	1	0,001
unidentified	1	0,001
Priceomyces haplophilus	1	0,001
unidentified	1	0,001
Pteris vittata	1	0,001
Stachybotrys sp.	1	0,001
Talaromyces radicus	1	0,001
Talaromyces sp.	1	0,001
unidentified	1	0,001
Tetracladium sp.	1	0,001
Thielavia terrestris	1	0,001
Tolypocladium ophioglossoides	1	0,001
unidentified	1	0,001
Trichoderma citrinum	1	0,001

13-as minta:

Faj	Leolvasás	Abundancia
Acremonium sp.	5942	0,256
Alternaria alternata	1777	0,076
Cladosporium sp.	1481	0,064
Lophiostoma cynaroidis	1004	0,043
Acremonium fusidioides	962	0,041
Neocucurbitaria sp.	849	0,037
Penicillium dierckxii	779	0,033
Vishniacozyma carnescent	738	0,032
Penicillium steckii	634	0,027
Byssochlamys spectabilis	519	0,022
Alternaria sp.	433	0,019
Penicillium pancosmium	381	0,016
Vishniacozyma psychrotolerans	367	0,016
Penicillium sp.	342	0,015
Vishniacozyma sp.	302	0,013
Parastagonospora nodorum	271	0,012
Clonostachys rosea	249	0,011
unidentified	238	0,01
Angustimassarina sp.	229	0,01
Sarocladium sp.	229	0,01
Pteris vittata	208	0,009
Cladosporium cladosporioides	188	0,008
Cystobasidium laryngis	187	0,008

Parastagonospora sp.	165	0,007
Coniosporium sp.	155	0,007
Camarosporium brabeji	145	0,006
Stachybotrys sp.	141	0,006
Penicillium brevicompactum	135	0,006
Devriesia pseudoamericana	125	0,005
Lophiotrema rubi	125	0,005
Clonostachys sp.	113	0,005
Penicillium citreonigrum	107	0,005
Phoma herbarum	107	0,005
Fusarium sp.	90	0,004
Lycium ruthenicum	86	0,004
Pyrenochaeta lycopersici	83	0,004
Alternaria infectoria	82	0,004
Clonostachys pityrodes	74	0,003
Phoma sp.	70	0,003
Trametes versicolor	66	0,003
Trametes sp.	64	0,003
Bipolaris sp.	61	0,003
Ulospora bilgramii	58	0,002
Microascus cirrosus	57	0,002
Acremonium hansfordii	52	0,002
Capronia sp.	50	0,002
Claviceps purpurea	48	0,002
Exophiala sp.	48	0,002
Cladosporium allicinum	46	0,002
Penicillium citrinum	44	0,002
Alternaria daucifolii	43	0,002
Epicoccum nigrum	42	0,002
Gibellulopsis nigrescens	41	0,002
Cucurbitaria berberidis	40	0,002
Lophiostoma sp.	40	0,002
Pleosporales sp.	40	0,002
Extremaceae sp.	39	0,002
Pyrenochaeta cava	34	0,001
Cladosporium iridis	33	0,001
Cladosporium langeronii	32	0,001
Holtermanniella sp.	32	0,001
Leptosphaeria sp.	31	0,001
Vishniacozyma victoriae	30	0,001
Gibberella intricans	29	0,001
unidentified	29	0,001
unidentified	29	0,001
Aureobasidium pullulans	27	0,001
Lepidosphaeria nicotiae	26	0,001
Volutella ciliata	26	0,001
Heterobasidion irregulare	23	0,001
Asteromassaria olivaceohirta	22	0,001

Cladophialophora sp.	22	0,001
Phialophora verrucosa	22	0,001
Stilbella fimetaria	22	0,001
Bipolaris maydis	21	0,001
Holtermanniella takashimae	21	0,001
Phaeosphaeria sp.	21	0,001
Cladophialophora carrionii	20	0,001
Cystobasidium lysinophilum	20	0,001
Acremonium gamsii	19	0,001
Cladosporium bruhnei	19	0,001
unidentified	19	0,001
Occultifur externus	19	0,001
Didymella macrostoma	18	0,001
Fibulobasidium murrhardtense	18	0,001
Zymoseptoria tritici	18	0,001
Capnobotryella sp.	17	0,001
Citrus reticulata	17	0,001
Geosmithia microcorthyli	17	0,001
Paracamarosporium fagi	17	0,001
Penicillium brasilianum	17	0,001
Trebouxia sp.	17	0,001
Tremella sp.	17	0,001
Cladosporium subuliforme	16	0,001
Cystobasidium sp.	16	0,001
Paracamarosporium hawaiiense	16	0,001
Penicillium solitum	16	0,001
Plectosphaerella cucumerina	16	0,001
Pyrenochaeta nobilis	16	0,001
Stephanonectria keithii	16	0,001
Vishniacozyma dimennae	16	0,001
Vishniacozyma tephrensii	16	0,001
Cystobasidium ritchiei	15	0,001
Ramularia collo-cygni	15	0,001
Rhodotorula graminis	15	0,001
Stachys benthamiana	15	0,001
unidentified	14	0,001
Fusarium fujikuroi	14	0,001
Coniothyrium carteri	13	0,001
Paecilomyces formosa	13	0,001
Capronia kleinmondensis	12	0,001
Neotestudina rosatii	12	0,001
Penicillium citreosulfuratum	12	0,001
Trichoderma hamatum	12	0,001
Cryptococcus neoformans	11	0
Didymosphaeriaceae sp.	11	0
Penicillium capsulatum	11	0
Pseudopithomyces chartarum	11	0
Symmetrospora sp.	11	0

Trebouxiophyceae sp.	11	0
Arthopyrenia salicis	10	0
Byssochlamys fulva	10	0
unidentified	10	0
Cyphellophora laciniata	10	0
Dioscorea polystachya	10	0
Epicoccum sp.	10	0
Fusarium oxysporum	10	0
Gibellulopsis sp.	10	0
Leptosphaeria maculans	10	0
Myrothecium roridum	10	0
Paraphaeosphaeria sp.orulosa	10	0
Penicillium janthinellum	10	0
Polycephalomyces sinensis	10	0
Tremella aurantia	10	0
Acremonium chrysogenum	9	0
Bipolaris sorokiniana	9	0
Byssochlamys sp.ectabilis	9	0
Corynespora cassicola	9	0
Metarhizium brunneum	9	0
Rhinoctadiella atrovirens	9	0
Sarocladium strictum	9	0
Alternaria citri	8	0
Capronia pulcherrima	8	0
unidentified	8	0
Cryptococcus sp.	8	0
Geosmithia eupagioceri	8	0
Hannaella kunmingensis	8	0
Ophiosphaerella korrae	8	0
Penicillium oxalicum	8	0
Plectosphaerella sp.	8	0
Pseudotremella moriformis	8	0
Pyrenochaeta sp.	8	0
Alternaria rosae	7	0
Biatrispora sp.	7	0
Filobasidium floriforme	7	0
Fonsecaea monophora	7	0
Hirsutella minnesotensis	7	0
Hypocreales sp.	7	0
Leptosphaeria biglobosa	7	0
Lessonia variegata	7	0
Metarhizium marquandii	7	0
Metarhizium rileyi	7	0
Myrothecium cinctum	7	0
Pseudoscopulariopsis hibernica	7	0
Pyrenochaetopsis leptospora	7	0
Rhodotorula glutinis	7	0
Sarocladium bactrocephalum	7	0

Basidiobolus meristosporus	6	0
Cladophialophora boppii	6	0
Cladosporium sphaerospermum	6	0
Clavicipitaceae sp.	6	0
Geosmithia putterillii	6	0
Lipomyces starkeyi	6	0
Microdiplodia sp.	6	0
Neophaeosphaeria sp.	6	0
Ophiocordyceps sinensis	6	0
Penicillium bialowiezense	6	0
Sporidiobolus salmonicolor	6	0
Tetracladium sp.	6	0
Trametes hirsuta	6	0
Articulospora sp.	5	0
Aspergillus fumigatus	5	0
Aspergillus sp.	5	0
Buckleyzyma sp.	5	0
Cladosporium herbarum	5	0
Cladosporium ramotenellum	5	0
Curvularia papendorfii	5	0
Dematiopleospora sp.	5	0
Exophiala halophila	5	0
unidentified	5	0
Fusarium virguliforme	5	0
Herpotrichiellaceae sp.	5	0
Knufia sp.	5	0
Leptosphaeria microscopica	5	0
Lophiotrema sp.	5	0
Metarhizium album	5	0
Nothophoma quercina	5	0
unidentified	5	0
Papiliotrema flavescens	5	0
Paramicrosporidium sp.	5	0
Paraphaeosphaeria neglecta	5	0
Paraphaeosphaeria sp.	5	0
Polycephalomyces tomentosus	5	0
Pseudocamarosporium brabeji	5	0
Rhodotorula sp.	5	0
Rubus allegheniensis	5	0
Sclerostagonospora cycadis	5	0
Sclerotinia borealis	5	0
Trebouxia impressa	5	0
Verticillium dahliae	5	0
Acremonium sclerotigenum	4	0
unidentified	4	0
Byssochlamys nivea	4	0
Colacogloea cycloclastica	4	0
Crataegus pinnatifida	4	0

Dioszegia zsołtii	4	0
Hannaella oryzae	4	0
Hymenostilbe odonatae	4	0
Lecanicillium sp.	4	0
Leptosphaerulina sp.	4	0
Massarina sp.	4	0
Paecilomyces sp.	4	0
Penicillium atosanguineum	4	0
Pleospora herbarum	4	0
Ramularia grevilleana	4	0
unidentified	4	0
Aspergillus luchuensis	3	0
Aspergillus penicillioides	3	0
Atrocalyx asturiensis	3	0
Aureobasidium sp.	3	0
Cadophora sp.	3	0
Coniochaeta velutina	3	0
Cyphellophora sp.	3	0
Didymosphaeria variabile	3	0
Hannaella luteola	3	0
Isaria fumosorosea	3	0
Keissleriella rosarum	3	0
Lentinus arcularius	3	0
Mariannaea pinicola	3	0
Monascus fuliginosus	3	0
Monocillium sp.	3	0
Neophaeosphaeria filamentosa	3	0
Papiliotrema bandonii	3	0
Paraconiothyrium sp.	3	0
Penicillioptosis clavariiformis	3	0
Penicillium corylophilum	3	0
Phaeosphaeriopsis sp.	3	0
Phaeotremella pseudofoliacea	3	0
Phialophora sp.	3	0
Phoma aliena	3	0
Ramularia hydrangeae- macrophyllae	3	0
Ramularia sp.	3	0
Sarocladium oryzae	3	0
Stemphylium sp.	3	0
Trichoderma atroviride	3	0
unidentified	3	0
Uwebraunia commune	3	0
Valsa mali	3	0
Vishniacozyma heimaeyensis	3	0
Allophylus sp.	2	0
Arthrocatena sp.	2	0
Ascochyta medicaginicola	2	0

Ascochyta pisi	2	0
Ascochyta rabiei	2	0
Blastomyces gilchristii	2	0
Boeremia sp.	2	0
Botrytis cinerea	2	0
Chaetothyriales sp.	2	0
Cladophialophora chaetospira	2	0
Cryptodiscus microstomus	2	0
Curreya pityophila	2	0
Diplodia juglandis	2	0
Earliella scabrosa	2	0
Engyodontium album	2	0
Erysiphe pulchra	2	0
Eurotium sp.	2	0
Exophiala sideris	2	0
Fusarium proliferatum	2	0
Hannaella sp.	2	0
unidentified	2	0
Malus domestica	2	0
Mollisia sp.	2	0
Monocillium tenue	2	0
Myrothecium verrucaria	2	0
Neosetophoma sp.	2	0
Occultifur sp.	2	0
Paraconiothyrium brasiliense	2	0
Paraphoma fimeti	2	0
Penicillium camemberti	2	0
Penicillium decumbens	2	0
Penicillium glabrum	2	0
Penicillium simplicissimum	2	0
Penicillium tropicum	2	0
Phaeodothis sp.	2	0
Phaeodothis winteri	2	0
Phaeotremella sp.	2	0
Phylliscum sp.	2	0
Pleurophoma sp.	2	0
Psathyrella candolleana	2	0
Rhodotorula toruloides	2	0
Sampaiozyma sp.	2	0
Truncatella angustata	2	0
Acidomyces acidothermus	1	0
Acremonium breve	1	0
Acremonium radiatum	1	0
Alternaria caespitosa	1	0
Alternaria eichhorniae	1	0
Alternaria maritima	1	0
Ampelomyces sp.	1	0
Amphisphaeria sp.	1	0

Apatococcus lobatus	1	0
Apatococcus sp.	1	0
Arthrinium malaysianum	1	0
Arthrinium phaeospermum	1	0
Aspergillus campestris	1	0
Aspergillus carbonarius	1	0
Aspergillus cristatus	1	0
Aspergillus flavus	1	0
Aspergillus niger	1	0
Aspergillus novofumigatus	1	0
Aspergillus oryzae	1	0
Aspergillus salwaensis	1	0
Aspergillus sclerotiorum	1	0
Aspergillus steynii	1	0
Auricularia auricula-judae	1	0
Bannoa syzygii	1	0
Beauveria bassiana	1	0
Boeremia exigua	1	0
Botryosphaeria dothidea	1	0
Bradomyces sp.	1	0
Buckleyzyma aurantiaca	1	0
Bullera alba	1	0
Bullera melastomae	1	0
Bullera sp.	1	0
Bullera unica	1	0
Calycellinopsis xishuangbanna	1	0
Ceratocystis fimbriata	1	0
Cercospora sojae	1	0
Chimonocalamus pallens	1	0
Chloroidium sp.	1	0
Cladosporium aphidis	1	0
Cladosporium limoniforme	1	0
Cladosporium velox	1	0
Cladosporium xanthochromaticum	1	0
Colletotrichum higginsianum	1	0
Coniosporium apollinis	1	0
Coprinellus micaceus	1	0
Coprinopsis strossmayeri	1	0
Coprinus comatus	1	0
Cordyceps confragosa	1	0
Curvibasidium pallidicorallinum	1	0
Curvularia lunata	1	0
Curvularia sp.	1	0
Cyphellophora reptans	1	0
Cystobasidium minutum	1	0
Cystobasidium psychroaquaticum	1	0
Devriesia americana	1	0
Devriesia sp.	1	0

Diadegma fenestrale	1	0
Didymella glomerata	1	0
Didymella sp.	1	0
Dioszegia crocea	1	0
Diplodia corticola	1	0
Elaphomyces granulatus	1	0
unidentified	1	0
Emericellopsis alkalina	1	0
Endoconidioma populi	1	0
Ephelis japonica	1	0
Epichloe festucae	1	0
Erythrobasidium hasegawianum	1	0
Eurotiomycetes sp.	1	0
Exochorda racemosa	1	0
Exophiala alcalophila	1	0
Exophiala angulospora	1	0
Exophiala aquamarina	1	0
Exosporium sp.	1	0
Exserohilum turcicum	1	0
Extremus sp.	1	0
Fonsecaea sp.	1	0
Fusarium graminearum	1	0
Fusarium meridionale	1	0
Fusarium nygamai	1	0
Fusarium poae	1	0
Ganoderma australe	1	0
Ganoderma carnosum	1	0
Gelatoporia subvermispora	1	0
Gibberella zeae	1	0
Golovinomyces sordidus	1	0
Hexagonia hirta	1	0
Hyaloscypha variabilis	1	0
Incertae sp.	1	0
Kabatiella microsticta	1	0
Knufia cryptophialidica	1	0
Lasiosphaeria sp.	1	0
Leucosporidium scottii	1	0
unidentified	1	0
Lupinus angustifolius	1	0
Malaysiasca phaii	1	0
Malus micromalus	1	0
Microascaceae sp.	1	0
Microascus chartarum	1	0
unidentified	1	0
Microsporomyces pini	1	0
Monascus purpureus	1	0
Montagnula sp.	1	0
Myrothecium sp.	1	0

Naematelia encephala	1	0
unidentified	1	0
Naganishia albida	1	0
Nectria cinnabarina	1	0
Neodevriesia capensis	1	0
unidentified	1	0
Neophaeococomyces catenatus	1	0
Neophaeosphaeria conglomerata	1	0
Ochrocladosporium elatum	1	0
Ochrocladosporium frigidarii	1	0
Ophiobolus sp.	1	0
Ophiocordyceps formicarum	1	0
Ophiosphaerella herpotricha	1	0
Paracoccidioides brasiliensis	1	0
Penicillium chrysogenum	1	0
Penicillium expansum	1	0
Penicillium flavigenum	1	0
Penicillium limosum	1	0
Periconia macrospinoso	1	0
Periconia sp.	1	0
Phaeoacremonium angustius	1	0
Phaeoacremonium minimum	1	0
Phaeoacremonium sp.	1	0
Phaeococomyces sp.	1	0
Phaeohelotium sp.	1	0
Phanerochaete sordida	1	0
Phialemonium sp.	1	0
unidentified	1	0
Phyllosticta capitalensis	1	0
Phyllosticta elongata	1	0
Pleiochaeta setosa	1	0
Preussia sp.	1	0
Prunus sp.	1	0
Pseudocamarosporium sp.	1	0
Pseudochaetosphaeronema larense	1	0
Pseudogymnoascus destructans	1	0
Pseudomonas graminis	1	0
Pseudomonas lutea	1	0
Puccinia striiformis	1	0
Purpureocillium lilacinum	1	0
unidentified	1	0
Pyrenochaeta protearum	1	0
Pyrenochaetopsis microspora	1	0
Pyrus pyrifolia	1	0
Rachicladosporium inconspicuum	1	0
Rachicladosporium pini	1	0
Ramularia pratensis	1	0
Rhinochadiella sp.	1	0

Rhizophagus irregularis	1	0
Rhodotorula mucilaginosa	1	0
Rhodotorula zsoitii	1	0
Rhopalophora clavispora	1	0
Roussoella intermedia	1	0
unidentified	1	0
Sakaguchia lamellibrachiae	1	0
Sarocladium kiliense	1	0
Scleroconidioma sp.hagnicola	1	0
Sclerotinia sclerotiorum	1	0
Scopulariopsis brumptii	1	0
Scopulariopsis candida	1	0
Scytalidium lignicola	1	0
Shiraia bambusicola	1	0
Shiraia sp.	1	0
Simplicillium lamellicola	1	0
Sporothrix insectorum	1	0
Sporothrix schenckii	1	0
Stachybotrys chartarum	1	0
Stemphylium vesicarium	1	0
Stilbella sp.	1	0
Symmetrospora gracilis	1	0
Synchytrium macrosporum	1	0
unidentified	1	0
Tintelnotia destructans	1	0
unidentified	1	0
Trametes cinnabarina	1	0
Trebouxia arboricola	1	0
Trebouxia jamesii	1	0
Trematophoma sp.	1	0
Tremella indecorata	1	0
Tremellales sp.	1	0
Truncatella sp.	1	0
Tubifex tubifex	1	0
Umbilicaria grisea	1	0
Urtica dioica	1	0
Ustilaginoidea virens	1	0
Valsaria rudis	1	0
Vermiconia foris	1	0
Verrucaria latebrosa	1	0
Vishniacozyma globospora	1	0
Warcupiella spinulosa	1	0
Westerdykella angulata	1	0
Westerdykella cylindrica	1	0
Xeromyces bisporus	1	0
Zymoseptoria sp.	1	0

5. sz. mellékelt: Korábbi terepi vizsgálat során gyűjtött minták fotói és a DNS analízis alapján beazonosított fajnevek



1. kép: *Coniophora merulioides* megjelenése belső nyílászárón



2. kép: *Coniophora merulioides* megjelenése belső nyílászárón



3. kép: *Coniophora puteana* – pincegomba megjelenése belső nyílászárón



4. kép: *Cystidiodontia* sp. megjelenése falburkolaton



5. kép: *Serpula lacrymans* termőtest spórával, mely a kísérletek beállításánál a kezdeti DNS mintát adta



6. kép: *Coriolopsis trogii* - fehér egyrétűtapló károsítása keményfa parkettán



7. kép: *Coriolopsis trogii* - fehér egyrétűtapló fiatal fonalai



8. kép: *Coriolopsis trogii* - fehér egyrétűtapló néhány hetes micélium szövedék



9. kép: *Agaricus iodosmus*-fenolszagú csiperke fonalai téglafalon

6. Irodalomjegyzék

- [1] White, T.J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 38, 315-322 pp.
- [2] Schmidt, O. (2006). Wood and tree fungi (pp. 119-133). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [3] Bellemare, A., John, T., & Marquetteau, S. (2018). Fungal Genomic DNA Extraction Methods for Rapid Genotyping and Genome Sequencing. In *Fungal Genomics* (pp. 11-20). Humana Press, New York, NY

A sorozat keretében eddig megjelent kiadványok

- | | | |
|-----|---|--|
| 1. | NÉMETH András, MILÁVECZ Richárd | Iparban használatos vízminőségek |
| 2. | DR. SZILÁGYI Zsombor, DR. SZUNYOG István | Mérések a gáziparban |
| 3. | DR. BARNÁ Lajos, EÖRDÖGHÉ DR. MIKLÓS Mária, DR. SZÁNTHÓ Zoltán, DR. BALLA József | A biztonságos ívóvízellátás megteremtésének tervezési eszközei |
| 4. | BORBÁS Lajos Dr. | Felépítés elvű (additív) gyártástechnológiák a gépészetben |
| 5. | BERENCSE Miklós, BERECSKY Ákos, HORVÁTH László, KOVÁCS Gergely, MIHÁLFY Krisztina | Kerékpárosbarát közlekedéstervezés |
| 6. | TÜDŐS Tibor, DR. VARJÚ György, DR. PETRI Kornél, GÁBOR András | A csillagpontkezelés legújabb külföldi és hazai eredményei (Útmutató és tervezési segédlet) |
| 7. | DR. GARBÁI László, DR. JASPER Andor, VÁRADY András | Fűtési és használati melegvíz-igények kockázati elvű méretezése példákkal |
| 8. | KÁDI Ottó, DOHÁNY Máté, JÓZSA Bálint, LÁSZLÓ Csaba Tibor, JAKKEL Ottó | A közúti vasutak (villamos) tervezésével kapcsolatos kézikönyv |
| 9. | BLAZSOVSZKY László | A gázfogyasztó készülékek égéstermék elvezetésével kapcsolatos szabályozások hiányosságai és ellentmondásai |
| 10. | CSORDÁS Szilveszter, FORGÁCS Lajos Dr., PÓLYA Endre ifj., RÉV Zoltán, UDVARDY Péter | Orvostechnológiai továbbképzés ismeretanyaga |
| 11. | NÁDASDY Tamás, EGYHÁZY Zita, KOVÁCS Ákos Sándor, SZECSŐ Dániel Géza | A közúti biztonsági audit (KBA) jelentések elkészítésének alkalmazási segédlete – A közúti infrastruktúra közlekedésbiztonsági kezeléséről szóló jogszabályhoz és ütiügyi műszaki előíráshoz kapcsolódó értelmezési, kidolgozási és elfogadtatási javaslatrendszer |
| 12. | DR. SZILÁGYI Zsombor, HORÁNSZKY Beáta | Földgáz kereskedelem (mérnöki segédlet) |
| 13. | DR. SZILÁGYI Zsombor | Az energiahordozók jövője – kőolaj, földgáz, megújulók |
| 14. | S. VÍGH Judit, DOHÁNY Máté | Magános közlekedők baleseti súlyosságának csökkentése mobil applikáció segítségével |
| 15. | DR. BALIKÓ Sándor, DR. CSÜRÖK Tibor, NOVÁK Dániel, ORBÁN Tibor, DR. ZSEBIK Albin | Ötletlapok I. – Energiahatékonyság növelő ötletek egyszerű energetikai és gazdasági számításai |
| 16. | DARABOS Zoltán, KOLTAI Henrik, SZABÓ Tamás, SZÁSZ Béla, VAJDA Sándor | Felvonók felújítása és átalakítása – Műszaki segédlet |
| 17. | TÜDŐS Tibor, KRUPPA Attila | Alapozásföldelők új tervezési elvei és kivitelezési módszerei – Tervezési segédlet és kivitelezési útmutató |
| 18. | FENYVESI Zsolt | Tűzvédelmi tervek tartalmi szabályainak átdolgozása |
| 19. | GÁBORI László Dr., BEINSCHRÓTH József Dr., NÓGRÁDI Gábor, RÁTKAY Tamás | Nagyméretű informatikai beruházásoknál (fejlesztéseknél) ajánlott szoftveroldali tervdokumentációk tartalmi elemeinek meghatározása (I. – II. kötet) |
| 20. | DR. DIVÓS Ferenc | Az élő fák stabilitása – mérnöki megközelítés – Élő fák, |

		mint teherhordó faszerkezetek
21.	DR. KARÁCSONYI Zsolt	Faanyagok tartós szilárdsága
22.	BARNA Lajos Dr., ERDEI István, JASPER Andor Dr., TAKÁCS Gyula	Segédlet épületek csatorna-berendezéseinek tervezéséhez
23.	ANTÓK Péter István, FÜZÉR Ferenc, SÁRKÖZI András	Fényvezető kábelszakaszok műszaki-minőségi ajánlás gyűjteménye
24.	JANCSÓ Béla, DR. KULCSÁR Alexandra, NÉMETH Gábor, DR. VÍMI Zoltán, DÉRI Lajos, SZIMANDEL Dezső	Vízjogi engedélyezési eljárással kapcsolatos dokumentációk és engedélyeztetéssel kapcsolatos követelmények a 2018.01.01-én hatályba lépett 41/2017. (XII.29.) BM rendelet alapján
25.	DR. TAKÁCS Bence, DR. SIKI Zoltán, DR. ÉGETŐ Csaba, BÉNYI László	Mérnökgeodéziában alkalmazott alapponthálózatok – A jó gyakorlat bemutatása mintapéldákkal
26.	DR. MÓCZÁR Balázs, LAUFER Imre, TÓTH Gergő, WOLF Ákos	Korszerű támszerkezetek tervezése
27.	HALÁSZ Györgyné Dr., CSERVENYÁK Gábor, TUCZAI Attila, VIRÁG Zoltán	Különböző funkciójú épületek klimatechnikája II.
28.	KÁDI Ottó, JÓZSA Bálint	Kerékpáros balesetek létesítmények szerinti vizsgálata
29.	GARBAI László Dr., JASPER Andor Dr., PELLER József Bendegúz	Hőteljesítménymérési tényező alkalmazása távhőrendszerek optimális szabályozásának modelljében
30.	GARBAI László Dr., SÁNTA Róber Dr., JASPER Andor Dr.	A kompresszoros hőszivattyúk optimalizálása – Tervezés és üzemeltetés
31.	LADÁNYI Gábor Dr.	Diagnosztika a karbantartásban
32.	MÉSZÁROS János, MOLNÁR Tibor, RITZL András	KIÜRÍTÉSI ÉS MENEKÜLÉSI ÚTVONALBA ÉPÍTETT AJTÓK tervezési segédlet (2018)

2019.

33.	BLAZSOVSZKY László	Földgáz elosztóvezetékek üzemeltetése
34.	DR. SZILÁGYI Zsombor	A megújuló energiahordozók jövője Magyarországon
35.	FORGÁCS Lajos Dr., HAIDEGGER Tamás Dr., PÓLYA Endre ifj.	Új fejlesztések, innovatív megoldások az orvostechnológia terén
36.	VARRÓ Beáta, DR. KIS András	Magyarországon előforduló, épületekbe beépített faanyagokat károsító gombák vizsgálata és azonosítása DNS diagnosztikával
37.	MANNINGER Marcell, SZEPESHÁZI Attila, SCHEURING Ferenc, MOLNÁR György	Munkatér határoló szerkezetek
38.	KORSÓS András, RÁDULY Zsolt	A közterületi és belterületi térfigyelő kamerarendszerek tervezési irányelvei
39.	GERGELY Edit, DR. BEZEGH András	Módszertani útmutató az üvegházhatású gázok közvetlen és közvetett kibocsátásának számítására
40.	DR. BEZEGH András, BITE Pálné Dr., GERGELY Edit	Városi környezetvédelem (Fenntartható és okos városok)
41.	GÓDOR Balázs, DR. KÁSA László, SZÉKELY Bence	Híddaruk méretezési segédlete (2019.)
42.	FÜRJES Andor Tamás, KOTSCHY András, NAGY Attila Balázs, CSOTT Róbert	Teremakusztikai méretezés gyakran előforduló szituációkban

43. DR. KARÁCSONYI Zsolt Faanyagok tartós szilárdsága
Faanyagok szilárdságának változása az idő függvényében
44. DR. BALIKÓ Sándor, ORBÁN Tibor, Ötletlapok II. – Energiahatékonyság növelő ötletek
VARGA Péter, DR. ZSEBIK Albin egyszerű energetikai és gazdasági számításai
45. PRIMUSZ Péter, PhD. Hajlékony útpályaszerkezetek méretezése
talajstabilizációk figyelembevételével
46. NÉMETH Balázs, HÁMORI Sándor, Különböző funkciójú épületek klímatechnikája III.
KOSTYÁK Attila, VÍGH Gellért Segédlet ipari épületek lég- és klímatechnikai
rendszerének tervezése
47. JANCsó Béla, KAVECZKI Gergely, Csapadékvízgazdálkodás tervezési követelményei
KÓCZÁN Gábor, LABORCZI Tamás, Hogyan tervezzünk városi csapadékelvezető rendszereket
KNOLMÁR Marcell, RAUM László
48. DOHÁNY Máté, SCHVANNER Kerékpárosok sebességének felülvizsgálata jelzőlámpás
Norbert csomópontokban
49. JÓZSA Bálint, S. VÍGH Judit Sebességcsökkentés hatásainak vizsgálata gyorsforgalmi
utakon
50. DR. ZSEBIK Albin, NOVÁK Dániel Projektlapok I. – Energiahatékonyság növelő javaslatok
projektlapjai
51. DR. MÓGA István Beruházási projektek szabályozási és szabvány
környezete, Tervezési követelmények meghatározása
52. DR. GÁBORI László, DR. Informatikai Tervező szakmai minősítő rendszere
BEINSCHRÓTH József, NÓGRÁDI (Informatikai szakmai terület illesztése a Mérnök Kamarai
Gábor, RÁTKAY Tamás működési rendbe és rendszerekbe)
I. kötet: Konceptió és modell
II. kötet: Modell illesztése
III. kötet: Tudástár
53. VIRÁG Zoltán, GYURKOVICS Zoltán, Országos Tűzvédelmi Szabályzat épületgépész értelmezése
SZAKÁL Szilárd, VIRÁG Zsolt, ORCSI a szakmai gyakorlatban
Attila Segédlet a gyakorló épületgépész mérnökök számára I.