



Eötvös Loránd Tudományegyetem
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK
Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C.
H-1117
E-mail: MIKROBI@ELTE.HU

Válasz Prof. Dr. Ördög Vince bírálataira

Tisztelt Bíráló!

Nagyon köszönöm, hogy elvállalta dolgozatom részletes bírálatát és hogy javaslataival, megjegyzéseivel segíti későbbi munkámat. Külön köszönöm a pozitív visszajelzéseket az elvégzett kutatómunkára vonatkozóan.

A formai megjegyzéseket jogosnak tartom, köszönöm őket: a rövidítések jegyzékének a dolgozatban mindenképpen helyet kellett volna kapnia, illetve a dolgozat valóban tartalmaz elütéseket, ez utóbbit felettébb sajnálom. El kell mondanom azonban, hogy a dolgozat nyomtatása 2020 tavaszán történt, a Covid pandémia kezdetén, amikor Magyarországon szigorú lezárások valósultak meg a szolgáltatások terén is. Így történt, hogy bár a céggel lebeszéltem a dolgozat nyomtatását, egy email-ben hirtelen jelezték, hogy amennyiben 24 órán belül nem küldöm el a nyomtatandó file-okat, úgy nem áll módjukban vállalni a nyomtatást és kötetést - így egy utolsó átnézés sajnos elmaradt, amit hihetetlenül sajnálok magam is. Ez természetesen nem mentség számomra, csupán egy információ, amit meg kívántam osztani.

Természetesen bírálóm alkalmazott kutatásokra vonatkozó észrevételeit is elfogadom. Az alkalmazott kutatások részletes bemutatásának hiánya abban keresendő, hogy „A BIOLÓGIAITUDOMÁNYOK OSZTÁLYA DOKTORI ÜGYEKRE IRÁNYADÓ ELJÁRÁSRENDJE” (Biológiai Tudományok Osztálya) a tudományos bizottság eljárásával kapcsolatban az alábbiakat tartalmazza (D. Sz.II. fejezet 14. §, 17- 19. §, 21.§, III. fejezet 33. §):

(5) A bizottság az előterjesztéseket érdemben tárgyalja,

„Ennek során a tudományos bizottság a benyújtott értekezés érdemi részletes vizsgálatát mellőzi; az értekezés tartalmával annyiban foglalkozik, hogy az elbírálásra formailag alkalmas vagy alkalmatlan-e **(ennek keretében nyilatkozik arról, hogy a benyújtott értekezés nem ugyanazon dolgozat-e, amelynek alapján a pályázó korábban PhD- vagy kandidátusi tudományos fokozatát, illetve habilitációs címét szerezte)**”.

Én a habilitációs eljárás keretei között 2012-ben elsősorban az alkalmazott kutatások anyagait tárgyaltam mindössze néhány taxonómiai vonatkozással, tehát a jelen MTA doktori dolgozatban az alkalmazott kutatásokat nem részleteztem. Annak problémáit és eredményeit annyiban vettem fel, amennyiben az adott taxonómiai leírások/taxonómiai munkák ezt megkövetelték: a probléma felvetése, amely az adott új taxon felfedezéséhez/leírásához vezetett, esetenként az izolálás menetének, helyének megadása, stb. A jelen dolgozatban az új baktériumok leírására fókuszáltam, a dolgozat céljaként a taxonómiai kutatásaink

eredményeinek összegzését tűztem ki, az utóbbi két évtizedben a vizsgálati módszerekben történő ugrásokat nyomonkövetve.

Legutóbbi ökológiai kutatásaink eredményei 2020-ban, a dolgozat beadásakor még csak magyar nyelven jelentek meg, az angol nyelvű cikkeink épp revízió alatt voltak, így csak néhány magyar nyelvű publikáció anyaga kerülhetett ezzel kapcsolatban a jelen dolgozatba, amelyek természetesen csak előzetes eredményeket tartalmaztak. Ugyanakkor ezen kutatásokból származtak legújabb taxonómiai leírásaink is, ezért ezen kutatásokról is említést kellett tennem.

Az azóta eltelt időszakban az említett angol nyelvű publikációink rangos folyóiratokban megjelentek: Szuróczki és mtsai., 2020, valamint Lippai és mtsai., 2020.

Ez utóbbi már tartalmazza azokat a gyógyfürdőkkel kapcsolatos gyakorlati hasznosulásokat, amiket bírálóm hiányolt. Kimutattuk, hogy a Magyarországon működő töltő-ürítő fürdőmedencék nagyobb potenciális veszélyt jelentenek a fürdőzőkre nézve, mint a vízforgatással (és ezzel együtt fertőtlenítő szerekkel) működtetett társaik. A tenyésztéses alapú higiénés vizsgálatok alapján a töltő-ürítő rendszerrel üzemelő medencék néhány paraméter vonatkozásában kifogásoltnak bizonyultak. Ezt sikerült molekuláris módszerekkel is igazolnunk (taxonspecifikus PCR és újgenerációs szekvenálás). A kutatás során a medencékből kimutattunk néhány fakultatív kórokozó szervezetet (pl. *Pseudomonas stutzeri*, *P. alcaligenes*, *Acinetobacter johnsonii*, *A. baumannii*, *Moraxella osloensis*, *Microbacterium paraoxydans*, *Brevundimonas nasdae*, *Cloacibacterium*, *Legionella* nemzetség tagjai), amelyek szintén a töltő-ürítő medencékben fordultak elő nagyobb számban. Mindezek mellett megállapítottuk, hogy szerencsére nem ezek a baktériumok a medencevizekben megtalálható baktériumközösségek fő képviselői – a medencéket tápláló „zavartalan” forrásvizek mikrobiális közösségeit a medencékben is megtaláltuk. Javasoltuk, hogy a fürdőmedencék megfelelő mikrobiológiai minőségének érdekében célszerű minden medencét vízforgatással üzemeltetni, akár alternatív fertőtlenítőszer alkalmazásával a gyógyhatású komponensek védelme érdekében.

Emellett a Fertőből időközben további két új baktériumtaxon is leírásra került: *Fertoeibacter niger* gen. nov., sp. nov. és *Szabonella alba* gen. nov. sp. nov. (Szuróczki és mtsai. 2021a, 2021b).

Az előbb említett okok miatt az alkalmazott mikrobiológiai és ökológiai kutatások eredményeinek alapos megvitatása tehát nem került a dolgozatba, a taxonómiai leírások pedig nem igényelnek hosszas kiértékeléseket. Ezért tűnhettek egyes alfejezetek bírálóm számára szűkszavúnak, bár meggyőződésem, hogy a taxonómiai anyagok kellő részletességgel kerültek kidolgozásra, még ha a dolgozatban a prokarióta taxonok gyakorlati alkalmazása valóban nem is kapott helyet.

Ugyanakkor a célkitűzéseket valóban helyesebb lett volna precízebben megfogalmazni, lényegre törőbben megadni.

A miázisos sebek vizsgálati eredményei sem kerültek a dolgozatba, a beillesztett légycsapdázásos kísérlet egy kidolgozott módszert hivatott bemutatni. Köszönöm bírálómnak,

hogy ennek kapcsán felhívta a figyelmem arra a tényre, hogy a cianobaktériumok között is alkalmas fajokat lehetne erre vonatkozóan találni.

A biogázmérésre szolgáló, általunk kidolgozott „buborékszámológó” módszer valóban műszaki megoldást jelent, azonban mivel a biogáz termelése mikrobiológiai folyamat, ezért kerülhetett a dolgozatba ennek leírása is.

Az általunk vizsgált erőmű megnevezését azért mellőztem a dolgozathoz (a kapcsolódó cikkek sem tartalmazzák ezt – Bohus és mtsai., 2010; Kéki és mtsai., 2020), mert a vizsgálatok egy olyan magyarországi erőműhöz kapcsolódtak, amelyet vállalkozási szerződés szerint nem nevezhettünk meg. Azonban az erőmű kapcsán végzett mikrobiológiai vizsgálatok táptalajfejlesztéseket eredményeztek, ami több új baktériumtaxon leírását vonta maga után, így ennek mindenképpen helyet kellett kapnia a dolgozatban.

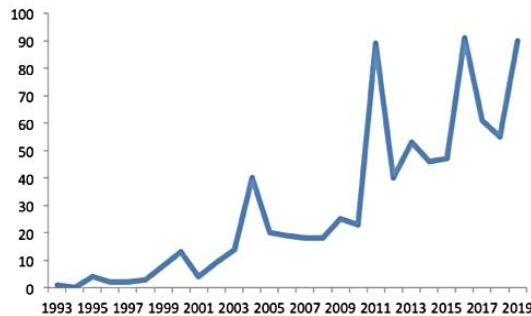
Ebben az esetben arra szerettem volna felhívni a figyelmet, hogy még az igen alacsony tápanyagkoncentrációjú közegekben, jelen esetben az erőmű által alkalmazott ultratiszta vízben is számos baktérium jelen lehet, és korróziós problémákat okozhat. A baktériumok tenyésztési nehézségei miatt kimutatásukhoz elengedhetetlen, hogy többféle módszert alkalmazzunk.

A bíráló kérdéseire adott válaszaim:

1. Az értekezés szerint új taxonok leírásának a változásáról 2020 végén várható döntés. Mi lett a döntés eredménye és mi volt a benyomása az egyeztetéseken a jövőről?

A típus (genetikai) anyag fogalmát 2020 őszén hosszas vita után az ICSP az elutasította. Ebben a diskusszióban megszólaltak az egyes prokarióta törzsgyűjtemények képviselői is (DSMZ, ATCC, CCM, stb.), felhívva a figyelmet arra, hogy amennyiben a genomszekvencia, mint „típus anyag” elfogadásra kerül, akkor a baktériumok tenyésztése méginkább háttérbe szorul, hatalmas káosz keletkezhet a tenyésztett és nem tenyésztendő, ún. Candidatus taxonok kapcsán. Ráadásul ehhez a Bakteriológiai Kódot is módosítani szükséges – így valóban egyre nagyobb lesz a rés a fajoként definiálható (tisztá tenyészetten alapuló), leírt taxonok és a valid névvel rendelkező, de nem tenyésztendő baktériumok között.

Az egyeztetés azóta is tart a Candidatus-ok körül, hiszen az elmúlt években a metagenom szekvenálások eredményeképpen a nem tenyésztendő prokarióta taxonok felfedezésében drámai növekedés tapasztalható (ld. 1. ábra).

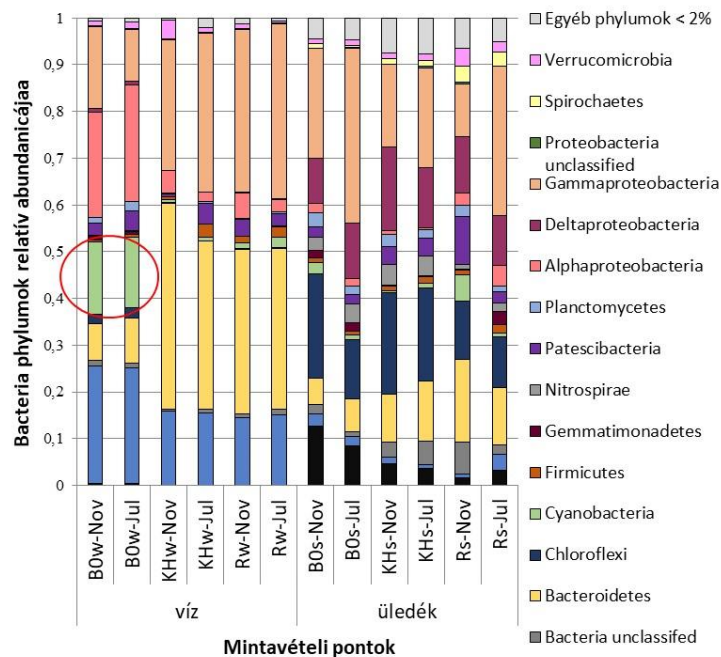


1. ábra. A publikált Candidatus fajnevek mennyiségének alakulása 1993-2019 között (Pallen, 2021)

Véleményem szerint a molekuláris technikák virágkorát éljük, egyre nagyobb nyomás nehezedik a klasszikus taxonómusokra: méginkább előtérbe kerülnek a genomelemzések, hiszen a genomi szekvenciából sok tulajdonság becsülhető, így számos, régebben rutinszerűen alkalmazott vizsgálat elkerülhető vagy leegyszerűsíthető (pl. számos fenotípusos teszt). A kemotaxonomiai vizsgálatok is lassan feleslegessé válnak (Hugenholtz és mtsai, 2021; Vandamme és Sutcliffe, 2021). Bár bizonyítottan tekintik, hogy a klasszikus (azaz 16S rRNS gén-, DDH- és kemotaxonomia alapú) és a genom alapú osztályozás között nagyfokú egyezés van (Thompson és mtsai., 2013), véleményem szerint a genomi szekvencia nem ad választ minden kérdésre, gyakran csak feltételezéseink vannak bizonyos anyagcsere-képességekre/folyamatokra vonatkozóan. Amíg nem vizsgáljuk a kérdéses tulajdonságot, addig az *in silico* eredmények csak feltételezések maradnak. Emellett az adatbázisokban elhelyezett genomi szekvenciák minősége nem mindig megfelelő. A legrosszabb esetben elképzelhetőnek, bár szomorúnak tartom, hogy a taxonómia mint tudományág a bioinformatika ágává degradálódik...

2. A Fertő-tó prokarióta vizsgálata magában foglalja a cianobaktériumok vizsgálatát is, csupán nem része az értekezésnek?

A Fertő mikrobiális közösségeinek vizsgálata során bebizonyítottuk, hogy a nádas borítottság jelentősen befolyásolja a jelenlévő prokarióta közösségének diverzitását, összetételét és aktivitását (Szuróczki és mtsai., 2021). Ennek háttérében valószínűleg a nád bomlásából származó magasabb oldott szervesanyag tartalom áll. Cianobaktériumokkal a Fertő vizsgálatát célzó ökológiai kutatások során külön nem foglalkoztunk, azonban a prokariótákra (Bacteria és Archaea) vonatkozó amplikon szekvenálás során sikerült őket kimutatnunk. A Fertő nyílt vizében arányuk magasabb volt, mint a Kis-Herlakni-tó vagy a nádas vizében (2. ábra). Az ábrán jól megfigyelhető, hogy a cianobaktériumok nyáron és ősszel is inkább a nyílvízi területre voltak jellemzőek. A *Synechococcus* nemzetség tagjai mellett a nyílt vízből kimutattuk a *Cyanobium gracile* pikocianobaktériumot is, az amplikon szekvenálás emellett számos ezigaddig tenyésztésbe nem vont cianobaktériumot jelzett.



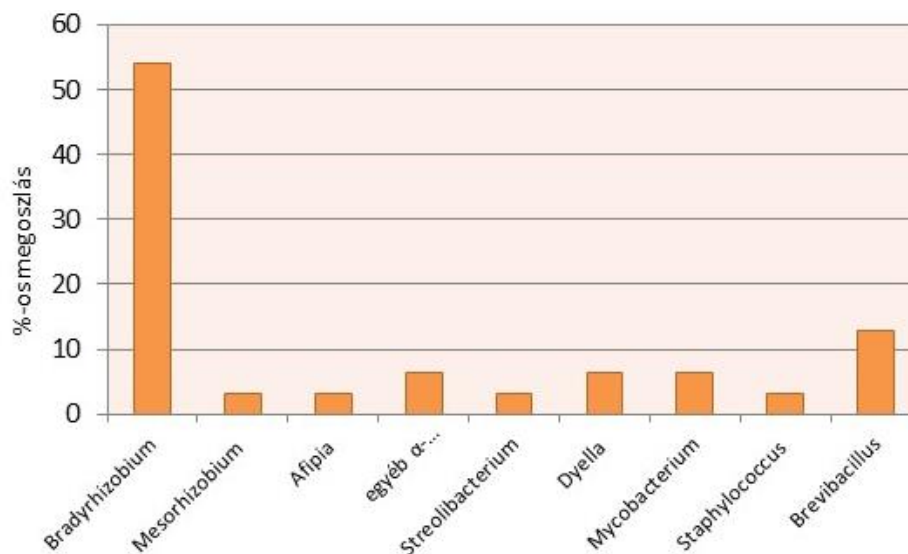
2. ábra. A Fertőből amplikon szekvenálással kimutatott Bacteria phylumok relatív abundanciája (Szuróczki és mtsai., 2020). A piros kör a Cyanobacteria phylum képviselőit mutatja. (Jelzések: B0 - nyílt víz, vízminta, KHw Kis-Herlakni-tó, vízminta; Rw – nádas, vízminta; B0s – nyílt víz, üledék minta; KHs – Kis-Herlakni-tó, üledék minta; Rs - nád, üledék minta; Jul – július; Nov – november).

Az aerob fotoszintetizáló prokariótákkal egyébként részletesen Somogyi és mtsai. (2010) foglalkoztak a Fertő pikocianobaktériumait vizsgálva. Eredményeik szerint a Fertő nyílt vizének fitoplankton közösségét a vegetációs periódusban főként pikocianobaktériumok és meroplaktonikus kovamoszatok alkotják. A cianobaktériumok közül dominánsnak a *Cyanobium gracile* fajt találták. Eredményeik szerint a Fertő nyílt vizében a pikocianobaktériumok magas, esetenként több mint 80%-át tették ki a fitoplankton biomasszájának. Véleményük szerint ez annak köszönhető, hogy a Fertőben a vízszlop turbiditásának növekedésével a pikoalgák maximális abundanciája, illetve a fitoplankton biomasszából való részesedése növekszik. Mi is ezt láttuk igazolódni, a *Cyanobium* nemzetséget csak elhanyagolható arányban (0-1%) mutattuk ki a Kis-Herlakni-tó és a nádas területén, ahol a lebegőanyag koncentrációja alacsony, a víz Secchi-átlátszósága pedig magas volt.

3. A meg nem nevezett erőmű víztisztító rendszeréből gyűjtött mintákkal végeztek metagenomikai vizsgálatokat? Az izolált 534 vízből és 117 biofilmből izolált baktériumtörzs mindegyike szaporítható volt a kifejlesztett táptalajon?

A magyarországi erőmű vízellátó rendszerének vizsgálatakor molekuláris és tenyésztéses vizsgálatokat egyaránt végeztünk, a munka két szakaszban zajlott. 2010 előtt a vízrendszerben található mikrobák diverzitását teszteltük, ekkoriban nem volt lehetőség metagenomikai elemzésekre, a tenyésztés mellett molekuláris klónozást, illetve T-RFLP (Terminális Restriktív Fragmenthossz Polimorfizmus) teszteléseket végeztünk a teljes víztisztító rendszerben. A T-

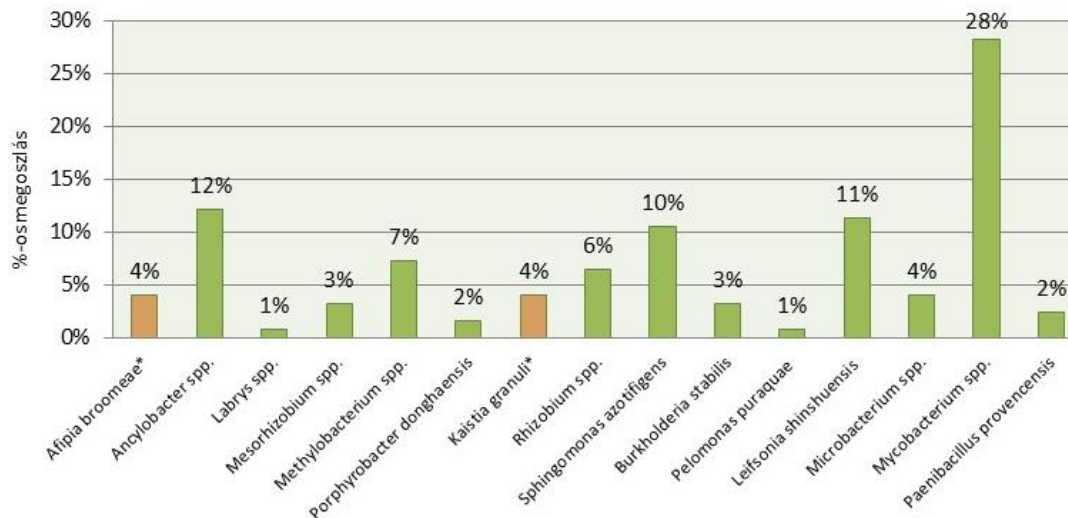
RFLP analízis során kapott csúcsokat első sorban molekuláris klónozás, esetenként *in silico* adatbázisokkal történt összevetéssel határoztuk meg. Később, amikor a rendszer kritikus pontját kerestük, nem volt szükség részletes molekuláris vizsgálatokra, a cég a kritikus pont megkeresésére és a mikrobák eliminálására fókuszált, amikor is elegendő volt a rendszerben a mikroszkópos sejtszámokat megállapítani, illetve a diverzitást egy másik ujjlenyomat módszerrel (DGGE: Denaturáló Grádiens Gél Elektroforézis) segítségével vizsgálni. A cél a mikrobák legalább részleges eliminálása volt a rendszerből, ehhez volt szükséges egy részletes tenyésztési vizsgálat is. Mivel a hagyományos, alacsony tápanyag tartalmú táptalajokon viszonylag kevés baktérium bizonyult tenyészhetőnek (3. ábra), ezért láttuk szükségesnek a táptalajfejlesztéseket.



3. ábra. Az erőművi víztisztító rendszerből R2A táptalajon kitenyésztett baktérium nemzetségek. (Az „egyéb α-”, kifejezés az ábrán szórványosan előforduló alfa proteobaktériumokat jelöli)

A 3. ábrán látszik, hogy a hagyományosan oligotróf közegekre alkalmazott táptalaj bár sok nitrogénkötésre képes szervezet kitenyésztését tette lehetővé (ezen baktériumok a közeg nitrogén limitáltsága következtében nagyon fontosak minden élő szervezet szaporodásához egy ilyen tápanyagszegény környezetben), a kimutatott tenyészhető baktériumok diverzitása alacsony volt. Ezen a táptalajon új taxonokat nem sikerült tenyésztésbe vonnunk.

Az általunk kifejlesztett táptalajokon sokkal többféle baktérium vált tenyészhetővé, ráadásul a tudományra nézve új baktériumokat is sikerült izolálnunk (4. ábra), a kifejlesztett táptalajok valamelyikén minden baktérium növekedést mutatott.



4. ábra. Az erőművi víztisztító rendszerből speciális táptalajokon kitenyésztett baktériumok. Az ábrán narancssárga színnel (* - legközelebbi rokonaik) a tudományra nézve új baktériumokat jelöltük (ezek taxonómiai leírása azóta természetesen elkészült).

Mégegyszer köszönöm bírálóm munkáját és építő észrevételeit.

Felhasznált irodalom:

- Bohus,V., Tóth, EM., Székely, AJ., Makk,J., Baranyi, K.,Patek, G., Schunk, J., Márialigeti, K. (2010). Microbiological investigation of an industrial ultra pure supply water plant using cultivation-based and cultivation-independent methods. *Wat Res* 44:6124-6132.
- Hugenholtz, P., Chuvochina, M., Oren, A., Parks, DH., Soo, RM. (2021). Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data *The ISME Journal* 15, 1879-1892.
- Kéki, Zs., Makk, J., Barkács, K., Vajna, B., Palatinszky M., Márialigeti, K., Tóth, E. (2019). Critical point analysis and biocide treatment in a microbiologically contaminated water purification system of a power plant. *SN Appl Sciences* 1:820-831.
- Lippai, A., Farkas, R., Szuróczki, S., Szabó, A., Felföldi, T., Toumi, M., Tóth, E. (2020). Microbiological investigations of two thermal baths in Budapest, Hungary. Report: effect of bathing and pool operation type on water quality. *Journal of Water and Health* 18:1020-1032.
- Pallen, MJ (2021). The status Candidatus for uncultured taxa of Bacteria and Archaea: SWOT analysis).*Int J Syst Evol Microbiol* 71(9):005000.
- Somogyi B., Felföldi T., Dinka M., Vörös L. (2010). Periodic picophytoplankton predominance in a large, shallow alkaline lake (Lake Fertő, Neusiedlersee). *Annales de Limnologie-International J Limn* 46:9-19.
- Szuróczki, S., Szabó, A., Korponai, K., Felföldi, T., Somogyi, B., Márialigeti, K., Tóth, E. (2020). Prokaryotic community composition in a great shallow soda lake covered by large reed stands (Neusieller

See/Lake Fertő) as revealed by cultivation-and DNA-based analysis. FEMS Microbiology Ecology 96:10 Paper f1aa159.

Szuróczki, S., Abbaszade, G. Buni, D., Bóka, K., Schumann, P., Neumann-Schaal, M., Vajna, B., Tóth, E. (2021a) *Fertoeibacter niger* gen. nov., sp. nov. a novel alkaliphilic bacterium of the family Rhodobacteraceae). Int J Syst Evol Microbiol 71(3):0.004762.

Szuróczki, S., Abbaszade, G., Bóka, K., Schumann, P., Neumann-Schaal, M., Tóth, E. (2021b) *Szabonella alba* gen. nov., sp. nov. a novel motile alkaliphilic bacterium of the family Rhodobacteraceae isolated from a soda lake. In press.

Thompson, CC., Chimetto, L., Edwards, RA., Jean Swings, J., Stackebrandt, E., Thompson, FL. (2013). Microbial genomic taxonomy. BMC Genomics 14, 913-920.

Vandamme, P., Sutcliffe, I. (2021). Out with the old and in with the new: time to rethink twentieth century chemotaxonomic practices in bacterial taxonomy. Int J Syst Evol Microbiol 71(11):005127.

Budapest, 2021. 12. 10.



Dr. Tóth Erika