



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

Válasz Prof. Dr. Posta Katalin bírálatára

Tisztelt Bíráló!

Nagyon köszönöm, hogy elvállalta dolgozatom részletes átolvasását, értékelését, és hogy javaslataival, megjegyzéseivel segíti későbbi munkámat, azokat a későbbiekre vonatkozóan megszívlelem. Külön köszönöm a pozitív visszajelzését az elvégzett kutatómunka kapcsán.

A dolgozat valóban több szálon fut, fő célom az volt, hogy az általunk körüljárt, pályázatokkal és vállalkozási szerződésekkel megtámogatott ökológiai és alkalmazott mikrobiológiai kutatások során "előkerült" (táptalajról izolált és leírt), a tudományra nézve új baktériumtaxonok egy részét bemutassam. Ehhez elengedhetetlen volt, hogy nem részletekbe menően, de leírjam azokat a kísérleteket is, amelyek az új taxonok felfedezéséhez vezettek. Lehet, hogy célszerűbb, és mindenképpen könnyebb, talán áttekinthetőbb lett volna egy, esetleg néhány ökológiai vagy alkalmazott kutatásra fókuszálni, azonban ebben az esetben nem nyílt volna lehetőség a prokarióta taxonómiában néha ugrásszerű módszertani fejlődést saját kutatási eredményeken keresztül bemutatni - ezt pedig nagyon fontosnak tartottam.

Egyetemi oktatóként vallom, hogy az előadások során néha érdemes a tömény adatokat kicsit közvetlenebb stílussal, a hallgatósághoz szóló kérdésekkel megszakítani, így fenntartani a figyelmet az esetenként hosszú elemzések kapcsán. Ezért került a dolgozatba néhány olyan mondat, pl. hogy "Ahogy kezdődött, a birkák között...". Sajnálom, hogy bírálóm szerint az ilyen kifejezések a dolgozat szakmaiságának rovására mentek, egészen biztosan nem ez volt a szándékom. A dolgozatban szereplő elütésekért elnézést kérek.

Egyetérték bírálómmal abban, hogy a célkitűzéseket valóban helyesebb lett volna konkrétan, lényegre törőbben megadni.

Az Anyag és módszer fejezetnek nem volt célja, hogy újonnan kidolgozott módszereket adjon meg, nem is így szerepelnek: az említett 4.1.1.3. fejezetben tárgyalt pur-habos dúsítási eljárást természetesen nem mi fejlesztettük ki, ezért szerepel ebben az alfejezetben irodalmi hivatkozásként Yasumoto-Hirose és mtsai. (2005) munkája. Ebben a fejezetben egyetlen valódi fejlesztés/optimalizálás található, ami pedig a közösségi kemotaxonómiai módszereket érinti (ezt az adott résznél jelöltem).

Bírálóm szerint a saját kutatásokat tartalmazó 5. fejezet címe nem megfelelő, hosszú, amivel egyetértek, valóban lehetett volna rövidebb címet adni ennek a fontos fejezetnek. Azonban véleményem szerint az adott kutatási területeken született publikációk a fejezetek elején mindig jól beazonosíthatóak, az 5. fejezet második mondata így szól: **“A dolgozathoz szorosan kapcsolódó publikációkat döntve, vastagítva, aláhúzással emelem ki, az egyéb, dolgozattal összefüggő publikációkat csak döntéssel jelzem”**. Ezután minden alfejezet azzal kezdődik, hogy ezeket az említett módon megadom, külön kiemelve az adott témához tartozó taxonómiai leírásokat, pl. 5. 3. fejezet, PARTI SZŰRÉSŰ IVÓVÍZ VIZSGÁLATA, a *dolgozathoz kapcsolódó publikációk: Homonnay és mtsai, 2008, 2014; Taxonómiai leírások: Makk és mtsai, 2011; Tóth és mtsai, 2011; Makk és mtsai, 2015.*

A dolgozatban az eltérő betűméretek minden esetben a fejezetek tagolását szolgálták segíteni, ehhez címsorokat állítottam be: a főfejezeteket vastagított, 14 pontos nagybetűvel, az első tagolási szintet nagybetűvel, de 12 pontos betűmérettel, a 3. tagolási szintet 12 pontos betűmérettel, és mondatkezdő nagybetűk szerint állítottam be. Ez biztosan nem okozott gondot a hosszabb fejezeteknél és leírásoknál, az eredmények fejezetben, ahol időnként rövid fejezetek is vannak, esetleg zavaró lehetett, ezért elnézést kérek.

Az egyes fejezeteknél fontosnak tartottam megemlíteni azon PhD hallgatókat, akik az adott kutatási témában velem együtt dolgoztak, még ha így a szöveg személyesebbnek is tűnik.

A szennyvíziszap vizsgálata során a digitális képfelismerésen alapuló, volumetriás buborékszámológó módszer kidolgozása lehetséges, hogy mérnöki munkának tűnik, azonban Tauber Tamás PhD munkájának egy jelentős részét ez fedte le, a módszer fejlesztése az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén történt az említett PhD hallgató és egy informatikus MSc hallgató közreműködésével. Tauber Tamás PhD munkájának tézisei az alábbi linken érhetők el: http://teo.elte.hu/minosites/tezis2013/tauber_t.pdf. A kapcsolódó, és doktori dolgozatomba illesztett ábrák Tauber és mtsai. (2011) által közölt cikk ábráinak magyar nyelvű változatai, azokat az Applied Microbiology and Biotechnology c. folyóirat elfogadta.

A bíráló kérdéseire adott válaszaim:

1. Véleménye szerint miért vált követelménnyé 2018 óta a fajleírásoknál a teljes genom szekvencia meghatározása?

A fajleírások 2018 előtt a fenotípusos (beleértve a kemotaxonómiai tulajdonságokat is) és bizonyos genotípusos jellemzők alapján készültek, figyelembe véve az adott taxonómiai csoportra vonatkozó “Minimal standard”-eket. A taxonómiai leírásokhoz mindenképpen “polifázikus” megközelítést alkalmaztunk (alkalmazunk ma is), azaz minél több, különböző módon vizsgált karakter kerül leírásra. A genotípusos jellemzők közül a 16S rRNS gén szekvencia analízise és a DNS-DNS hibridizációs (DDH) vizsgálatok (“gold standard”) játszottak döntő szerepet, néhány csoportra emellett speciális funkciógén vizsgálatát javasolták. Úgy tűnt, hogy az említett két genomikai jellemző jól illeszkedik a klasszikus kemotaxonómiai és fiziológiai jellemzők szerinti osztályozáshoz.

Ismert, hogy a 16S rRNS gén szekvencia különleges jelentőséggel bír, hiszen ez a gén a prokarióták között univerzális előfordulása, erősen konzervatív régiókat tartalmaz,

ugyanakkor variabilis és hipervariabilis régiói faji és magasabb taxonómiai szinteken is használhatóak az elkülönítésre. Fontos megemlíteni, hogy ma már e génre vonatkozóan hatalmas (bár nem mindig "tiszta" szekvenciákat tartalmazó) szekvencia adatbázisok állnak rendelkezésünkre. A DDH a baktériumfajok pontosabb identifikációját/klasszifikációját szolgálta (Stackebrandt és Goebel, 1994; Stackebrandt és Ebers, 2006), azonban a hibridizációs értékek meghatározása igencsak laborintenzív eljárást és nagy szaktudást igényel.

Emellett a 16S rRNS gén nem minden csoporton belül ad jó felbontást az identifikációhoz (pl. *Psychrobacter* nemzetségen belül a *P. marincola* és *P. submarinus* egymással 99.9% szekvencia hasonlóságot mutatnak, vagy pl. a *Streptomyces* nemzetségen belül a *S. bobili*, a *S. flavovariabilis* és a *S. phaeoluteigriseus* 16S rRNS gén alapján megállapított hasonlósága 98,8-99,2% közé esik, de számos példát lehetne a *Pseudomonas* nemzetségből is megadni). Ez vezetett a MLSA (Multi Locus Sequence Analysis = multilókusz szekvencia analízis) elemzések térhódításához, mivel a teljes genomok meghatározása és összehasonlítása a 90-es években még messze meghaladta a bakteriális szisztematikával foglalkozó laboratóriumok technikai és pénzügyi lehetőségeit.

A DNS szekvenálás és a hozzá kapcsolódó bioinformatikai eszközök/programok gyors fejlődésének és automatizálásának köszönhetően az elmúlt évtizedben egyre gyorsabbá és megfizethetőbbé vált a genomszekvenálás, így a genomális adatbázisok gyorsan növekedtek. A genomika megjelenése és elterjedése lehetővé tette a genomszekvenciákban található, evolúciós információkon alapuló, független taxonómiai indexek létrehozását, ilyen pl. az ANI (Average Nucleotide Identity = átlagos nukleotid azonosság), az AAI (Average Amino Acid Identity = átlagos aminosav azonosság), az OGRI (Overall Genome Related Index = átlagos genom hasonlósági index) vagy pl. a GGDH (*in silico* Genom-to-Genome Distance Hybridization = *in silico* DNS-DNS hibridizáció érték) meghatározása. Tehát a teljes genomok ismeretében a DDH és az MLSA elemzés is ma már *in silico* végrehajtható, Thomson és mtsai. (2013) szerint az élőlények fiziológiai képességei megjósolhatók a megfelelő gének jelenléte/hiánya alapján.

A klasszikus és a genom alapú osztályozás közötti nagyfokú hasonlóság bizonyítása (Thomson és mtsai., 2013) és a genomális adatok különböző taxonómiai szinteken történő felhasználásához tartozó minimális standard-ek létrehozása (Chun és mtsai, 2018) után az IJSEM és más, taxonómiai cikket publikáló folyóiratok a genomszekvencia-elemzést a fajleírások kötelező követelményévé emelték. A baktériumfaj definíciója manapság genomikai kritériumokat is tartalmaz: az azonos fajhoz tartozó baktériumtörzsek esetén a többszörös illesztésen alapuló AAI és ANI értékek >95% azonosságot kell, hogy mutassanak, az *in silico* GGDH értéknek is >70% kell lennie.

Így mára a genomika ígéretes módszertanná vált: számos, egyébként munkaigényes vizsgálat szükségtelen lett alkalmazásával (pl. DDH, G+C arány meghatározása), emellett jól reprodukálható, megbízható adatokat szolgáltat, amelyek a prokarióták körében elég híven tükrözik a filogenetikai rokonsági viszonyokat (ez a természetes osztályozás alapja). Összehangzó vélemények szerint (ICSP diszkusszió 2020 márciusa és októbere között) a típustörzsek genomszekvenálása forradalmasítani tudja a prokarióta szisztematikát azáltal, hogy nagymértékben javítja a fajok azonosítását, tisztázza a taxonómiai csoportok funkcionális tulajdonságait, és feloldja a magasabb taxonok evolúciós származásának számos problematikáját. Emellett javasolt a jelenlévő/hiányzó génekből előrejelzett élettani jellemzők laboratóriumi megerősítése, valamint a differenciáló kemotaxonómiai jellemzők még mindig fontos összetevői az új taxonok, főleg az új nemzetségek leírásának. A közelmúltban publikált

eredmények szerint érvek szólnak amellett, hogy a kemotaxonómiai jellemzőket (is) kizárják a fajleírások követelményei alól.

Vandamme és Sutcliffe legutóbbi publikációjukban (2021) azzal érvelnek, hogy a kemotaxonómiai módszerek rutinszerű alkalmazása szükségtelen egy olyan korszakban, amikor a genomikai adatok rendelkezésre állnak és elegendőek a fajok azonosításához, csoportokba való besorolásához. Javaslatuk szerint a kemotaxonómiai módszereket csak bizonyos esetekben, speciális laboratóriumokban kellene elvégezni, ahol már továbbfejlesztett analitikai módszerek alkalmazására van lehetőség.

Ez utóbbiak jelenleg javaslatok, a fajleírások ma még többnyire polifázikus vizsgálatok segítségével, tenyésztett baktériumtörzsek vizsgálatai alapján történnek.

2. Véleménye szerint a ki nem tenyésztett és csak DNS alapon "azonosított" fajok integrálhatók-e, és ha igen, akkor milyen módon a hagyományos fajazonosítási eljárásba?

Bírálóm kérdése összetett, nem válaszolható meg egyszerűen, hiszen a prokarióta taxonómusok sem egységesek az adott kérdés vonatkozásában, ezt bizonyítják a 2018 óta folyamatos konzultációk az ICSP-n belül is.

A nem tenyésztett baktériumok genomiális taxonómiájának kérdése és a kizárólag genom alapú rendszer integrálása a hagyományos, többfázisú osztályozási rendszerbe továbbra is viták tárgyát képezi a taxonómiai bizottságokon belül. A két rendszer nem könnyen kombinálható, valószínűleg legalább egy ideig párhuzamosan kell létezniük. Igaz, hogy a genomikai elemzés a hagyományos, érvényesen elnevezett, tenyésztett típus-törzsek esetében is elvégezhető (Konstantinidis és mtsai., 2017), hiszen ez esetben a típus-törzs hozzáférhető valamelyik törzsgyűjteményben.

Mindazonáltal még mindig nem állnak rendelkezésre genomszekvenciák az összes tenyésztett baktérium típus-törzsére vonatkozóan, hiszen 2018 előtt egy leírt baktérium genomjának szekvenálása nem volt feltétele a taxonómiai leírásoknak. A két eltérő szemléletmód az osztályozási rendszer kapcsán, esetleg a két klasszifikációs rendszer együtt létezése esetén fennáll annak a veszélye, hogy nem veszik tudomásul a különböző rendszerek alatt leírt és elnevezett, de egy és ugyanazon baktérium azonosságát ("dupla" leírások szülehetnek). Az ilyen zavarok elkerülése érdekében Konstantinidis és mtsai. (2017) a következő követelményeket beiktatását javasolták:

(i) az ICNP (International Code of Nomenclature of Prokaryotes) ismerje el a tenyésztésbe nem vont, de genetikai alapon ismert taxonok (Candidatus taxonok) nevének elsőbbségét.

(ii) a DNS genomszekvenciát fogadják el a nem tenyésztett taxonok típusanyagaként.

A genomszekvenciák típusanyag státusszá való emelését azonban a taxonómusok többsége nem támogatta, 2020 második felében az erre vonatkozó szavazás ezt a javaslatot elutasította. Az elutasítás valójában érthetőnek tűnik, mivel egy genomszekvencia pl. egy adatbázis sérülése során akár örökre elveszhet. Az a követelmény, hogy a taxonómiai leírás során típus-törzseket különböző törzsgyűjteményekben el kell helyezni, fenntartja az adott taxonok esetén a lehetőséget a fenotípusos és genotípusos jellemzőik jövőbeni (újra)vizsgálására.

A probléma nehezen oldható fel, én is csupán saját véleményemet oszthatom meg a témában. Tény, hogy a nem tenyésztett törzsek genomszekvenciáit a Digital Object Identifiers segítségével el lehet helyezni megfelelő adatbázis(ok)ban, a Candidatus taxonoknak nevet is lehet adni, az erre vonatkozó szabályokat egyértelműen lefektették (Chun és mtsai., 2018), minimális standard-et állítottak össze a genomi adatok taxonómiában való felhasználására. Tehát jelenleg a genomszekvenciák, és a típustörzsek lerakása IS kötelező minden taxonómiai leíráshoz. Így megvalósítható lenne a nem tenyésztett baktériumok genomszekvenciáit tartalmazó adatbázisok szűrése az azonos találatok előfordulása szempontjából. Ha a szekvencia-adatbázis szűrése kötelező előfeltételként nyilvánítható egy új taxon leírása előtt, akkor elkerülhető lenne az a probléma, hogy nem szereznek tudomást az azonos, de idáig tenyésztésbe nem vont baktériumokról, illetve azok szekvenciáiról. A szűrés során az újonnan tenyésztésbe vont baktériumok genomszekvenciáik alapján tehát "fedésbe hozhatók" a korábban elhelyezett genomiális szekvenciákkal, így a duplikációk elkerülhetők lennének. Ugyanakkor az idáig tenyésztésbe nem vont mikroorganizmusok izolálására irányuló intenzív erőfeszítések hozzájárulhatnak a genomszekvenciákból korábban megjósolt fenotípusos jellemzőik megerősítéséhez, átfogó leírásukhoz és végül a törzsgyűjteményekben való érvényes elnevezésű típustörzsként való elhelyezésükhöz.

Felhasznált irodalom:

- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, DR., da Costa, M., Rooney, AP., Yi, H., Xu, XW., Meyer, S., Trujillo, M. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 461-466.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, DR., da Costa, M., Rooney, AP., Yi, H., Xu, XW., Meyer, S., Trujillo, M. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 461-466.
- Konstantinidis, KT., Roselló-Mora, R., Amann, R. (2017). Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *Int J Microbiol Ecol* 11, 2399-2406.
- Konstantinidis, KT., Roselló-Mora, R., Amann, R. (2017). Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *Int J Microbiol Ecol* 11, 2399-2406.
- Saygin, H., Ay, H., Guven, K., Cetin, D., Sahin, N. (2020). *Streptomyces cahuitamycinicus* sp. nov., isolated from desert soil and reclassification of *Streptomyces galilaeus* as a later heterotypic synonym of *Streptomyces bobili*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70, 2750-2759.
- Stackebrandt, E., Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33, 152-155.
- Stackebrandt, E., Goebel, BM. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J of Syst Bacteriol* 44, 846-849.
- Tauber, T., Berta, B., Szabó, Zs., Kovács, J., Márialigeti, K., Tóth, EM. (2011). A simple and novel volumetric method to metre low gas flows from laboratory-scale bioreactors and its application on laboratory sludge digesters. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 1453-1461.

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 71:005127

Mégegyszer nagyon köszönöm bírálóm gondos munkáját és részletes, építő észrevételeit.

Budapest, 2021. 12. 15.



Dr. Tóth Erika