

**Új prokarióta taxonok leírása és
módszerfejlesztések alkalmazott mikrobiológiai
és mikrobiális ökológiai kutatások során**

Dr. TÓTH ERIKA

**Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar, Biológiai Intézet
Mikrobiológiai Tanszék
Budapest, 2020**

***„A természet csupán az oroszlán farkát mutatja meg nekünk.
Viszont nincs kétségem a felől, hogy oroszlán is tartozik hozzá,
még ha nem tudja magát azonnal leleplezni roppant métrete miatt.”***

(Albert Einstein)

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	7
2. CÉLKITÚZÉS	8
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
3.1 TAXONÓMIAI ALAPELVEK, A TAXONÓMIA ÉS FILOGENETIKA JELENTŐS MÉRFÖLDKÖVEI, A PROKARIÓTÁK ELHELYEZÉSE AZ „ÉLET FÁJÁN”	9
3.2 PROKARIÓTA TAXONÓMIA ALAPJAI	19
3.2.1 A prokarióta taxonómia kezdetei és fejlődése napjainkig	19
3.2.2 A prokarióta fajfogalom/fajdefiníció problematikája.....	27
3.2.3 A leírt prokarióta taxonok számának változása napjainkig	31
3.2.4 Prokarióta taxonok jelenleg használt, általános vizsgálati módszerei	32
3.2.4.1 Morfológiai, fiziológiai és anyagcsere sajátosságok	32
3.2.4.2 Fiziológiai és ökológiai vizsgálatok	32
3.2.4.3 Az anyagcsere vizsgálatok, gyorsdiagnosztikai eljárások	33
3.2.4.4 Kemotaxonómiai vizsgálatok.....	33
3.2.4.5 Genetikai analízis.....	34
3.2.5 Prokarióta taxonok leírásának módszertana és annak fejlődése 2010-től napjainkig..	37
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	44
4.1 KÖRNYEZETMIKROBIOLÓGIAI/KÖRNYEZET DIAGNOSZTIKAI VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ÉS ELEMZÉSEK	44
4.1.1 Tenyésztéses módszerek	44
4.1.1.1 „Hagyományos” tenyésztés.....	44
4.1.1.2 „Egyszerű” dúsítás	45
4.1.1.3 Pur-habos dúsítás	45
4.1.2 Tenyésztéstől független módszerek.....	46
4.1.2.1 Minták mikroszkópos sejtszámának meghatározása	46

4.1.2.2	Baktériumközösségek elektronmikroszkópos vizsgálata	46
4.1.2.3	T-RFLP vizsgálatok	46
4.1.2.4	DGGE vizsgálatok.....	47
4.1.2.5	Klónkönyvtárak létrehozása	47
4.1.2.6	Közösségi kemotaxonómiai vizsgálatok	48
4.2	TAXONÓMIAI LEÍRÁSOK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK.....	50
4.2.1	Baktériumtörzsek tenyésztése	50
4.2.2	Morfológiai vizsgálatok	50
4.2.3	Ökológiai és fiziológiai tolerancia vizsgálata	51
4.2.4	Hagyományos biokémiai tesztek	51
4.2.5	Gyorsdiagnosztikai eljárások	51
4.2.6	Kemotaxonómiai vizsgálatok.....	52
4.2.6.1	Baktériumok citoplazma membránjának zsírsav elemzése.....	52
4.2.6.2	Baktériumok légzési kinonjainak vizsgálata	53
4.2.6.3	Baktériumok poláris lipidjeinek analízise	53
4.2.6.4	Baktériumok sejtfalának tipizálása.....	53
4.2.6.5	Teljes-sejt MALDI-TOF MS vizsgálat	53
4.2.7	Genetikai vizsgálatok.....	54
4.2.7.1	Baktériumtörzsek 16S rRNS génjének bázis sorrend elemzése.....	54
4.2.7.2	Baktériumtörzsek G+C arányának meghatározása.....	54
4.2.7.3	Baktériumtörzsek közötti DNS-DNS hibridizáció vizsgálata	54
4.2.7.4	RiboPrint analízis	55
4.2.7.5	Teljes genom analízis.....	55
5.	SAJÁT KUTATÁSOK, AMELYEKBE TAXONÓMIAI EREDMÉNYEINKET KÜLÖNBÖZŐ PROBLÉMÁK MEGOLDÁSÁRA, ILLETVE KÜLÖNBÖZŐ KÖRNYEZETEK BAKTERIOLÓGIAI DIVERZITÁSÁNAK LEÍRÁSÁRA HASZNÁLTUK FEL.....	56
5.1	AHOGY KEZDŐDÖTT: A BIRKÁK KÖZÖTT....	56

5.1.1	Munka elméleti háttere.....	56
5.1.2	Alkalmazott módszerek, módszerfejlesztés, eredmények	57
5.2	SZENNYVÍZISZAP VIZSGÁLATOK.....	60
5.2.1	Munka elméleti háttere.....	60
5.2.2	Alkalmazott módszerek, módszerfejlesztés, eredmények	61
5.2.2.1	Iszaprothasztó(k) mikrobiális közösségeinek általános vizsgálata kemotaxonómiai módszerrel.....	61
5.2.2.2	Modellrendszer építése, „buborékszámológó módszer” kidolgozása.....	62
5.3	PARTI SZŰRÉSŰ IVÓVÍZ VIZSGÁLATA.....	65
5.3.1	A munka elméleti háttere.....	65
5.3.2	Alkalmazott módszerek, eredmények.....	65
5.4	EGY MAGYARORSZÁGI ERŐMŰ VÍZTISZTÍTÓ RENDSZERÉNEK VIZSGÁLATA.....	66
5.4.1	A munka elméleti háttere.....	66
5.4.1	Alkalmazott módszerek, táptalajfejlesztés, eredmények.....	67
5.5	FÜRDŐ- ÉS TERMÉSZETES VIZEK VIZSGÁLATA.....	72
5.5.1	A munka elméleti háttere.....	72
5.5.2	Alkalmazott módszerek, eredmények.....	72
6.	A TAXONÓMIAI KUTATÁSOK RÉSZLETES EREDMÉNYEI.....	74
6.1	<i>Schineria larvae</i> gen. nov. sp. nov., nevezéktani revíziója - <i>Ignatzschineria larvae</i> (Tóth és mtsai, 2007.).....	76
6.2	<i>Wohlfahrtiimonas chitinoclastica</i> gen. nov. sp. nov. (Tóth és mtsai., 2008).....	77
6.3	<i>Nocardioides hungaricus</i> sp. nov. (Tóth és mtsai., 2011).....	82
6.4	<i>Aquipuribacter hungaricus</i> gen. nov. sp. nov. (Tóth és mtsai., 2012).....	88
6.5	<i>Gellertiella hungarica</i> gen. nov. sp. nov. (Tóth és mtsai, 2017).....	96
6.6	<i>Phragmitibacter flavus</i> gen. nov. sp. nov. (Szuróczi és mtsai., 2020)	103
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	108
8.	SUMMARY.....	109

9. FELHASZNÁLT IRODALOM	110
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	123

1. BEVEZETÉS

Környezetünkben alig akad hely, melyet ne népesítenének be mikrobák milliói, a maguk kb. $4-6 \times 10^{30}$ becsült számukkal a prokarióta szervezetek a legnagyobb sejtszámmal jelenlévő élőlények Földünkön (Whitman és mtsai., 1998). Legtöbbjüket ezidáig tenyésztésbe vonni azonban nem sikerült, a prokarióta szervezeteknek mindössze kb. 0,001-15%-a tenyészthető: általános tapasztalat, hogy a környezeti minták mikroszkópos sejtszáma mindig jóval nagyobb, mint ahány baktériumot telepképző egységekben (TKE) meg tudunk figyelni, függetlenül az alkalmazott táptalajtól. A nem tenyésztetőség számos okra vezethető vissza: 1., a baktériumok egy része egyszerűen életképes, de mégsem vonható tenyésztésbe, ún. VBNC (Viable But Non Cultivable) állapotban van, amit pl. számos környezeti tényező is indukálhat, 2., mivel nem ismertek az adott környezetben élő mikrobák pontos tápanyag/ökológiai igényei, ezért lehet, hogy az alkalmazott táptalaj nem megfelelő számukra, 3., esetleg a baktériumok az életciklusuk nyugalmi szakaszát valamiért nem tudják megszakítani, 4., előfordulhat az is, hogy az adott baktérium csak szintróf partner jelenlétében képes szaporodni.

Az utóbbi évtized(ek) kutatásai lehetővé tették azonban a mikroorganizmusok széles körű megismerését genetikai anyagaikon keresztül, a metagenom elemzések és egy-sejt szekvenálások segítségével molekuláris alapon számos képviselőjüket sikerült kimutatni (Castelle és mtsai., 2018), annak ellenére, hogy nem tenyésztett képviselőik nem ismertek.

Ez természetesen a prokarióta taxonómia tudományára is nagy hatással van, hiszen a rejtett diverzitás feltárása közelebb visz minket az eddig ismeretlen taxonok felfedezéséhez, a teljes genom szekvenálási módszerek segítségével feltérképezhetőek ezen szervezetek potenciális képességei, a transzkriptomika és proteomika fejlődése pedig az adott szervezetek funkcióinak jobb megismerését teszi lehetővé az adott közösségeken belül.

2. CÉLKITŰZÉS

A baktériumok sajátos helyet képviselnek az élővilág körében. Bár a jelenleg rendelkezésre álló molekuláris technikák világossá teszik, hogy hatalmas a prokarióták rejtett diverzitása, a baktériumok tenyésztése nagyon sok nehézségbe ütközik. Az új taxonok pontos megismerésének és leírásának ez viszont jelenleg még nagyon fontos alapfeltétele.

Dolgozatomban célul tűztem ki, hogy áttekintést adjak a prokarióta taxonómia kialakulásáról és fejlődéséről napjainkig, szem előtt tartva a módszertanban bekövetkező ugrásokat. Ugyanakkor számtalanszor éri vád a bakteriális taxonómusokat, hogy ez „csupán” alapkutató, a bakteriális taxonómia felhasználása csak korlátozott lehetőségeket biztosít. Ennek cáfolatára a továbbiakban, a laboratóriumomban napjainkig is folyó alkalmazott és mikrobiális ökológiai kutatásokat bemutatni a teljesség igénye nélkül, amikor is nagyon fontos válaszokat sikerült megadni a mikrobiális ökológiában gyakran feltett kérdésekre: „Ki van ott?; „Mit csinál ott?”; „Mi lehet a szerepe?”; „Van-e megoldás az adott problémára?” a taxonómiai kutatások tükrében.

Végül pedig saját taxonómiai kutatásaink mérföldköveit veszem számba: a bemutatott taxonómiai leírások nem csak kronológiai sorrendet követnek, hanem bennük vizionáljuk a prokarióta taxonómiában alkalmazott módszerek fejlődését, a taxonómiai leírások mérföldköveit az elmúlt 20 évben.

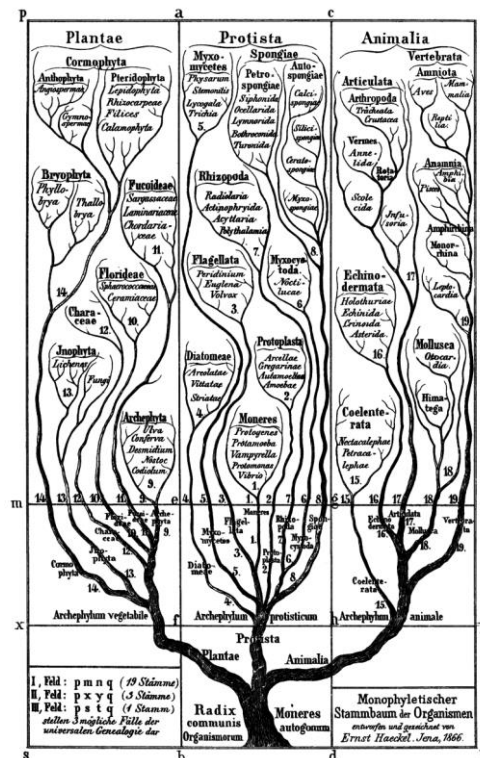
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 TAXONÓMIAI ALAPELVEK, A TAXONÓMIA ÉS FILOGENETIKA JELENTŐS MÉRFÖLDKÖVEI, A PROKARIÓTÁK ELHELYEZÉSE AZ „ÉLET FÁJÁN”

A taxonómia az élőlények csoportokba sorolásának tudománya, ami során azokat rendszertani csoportokba, úgynevezett taxonokba soroljuk be.

Carl von Linné (1707-1778) svéd orvos-botanikus fektette le a rendszerezés alapelveit, az élőlények körében bevezette a kettős latin nevezéktant és sok szempontból az Ő alapelveit követik ma is. A *Sytema Naturae* (első kiadás: 1735) című munkájában megpróbálta rendszerbe sorolni az élőlényeket, amelynek 10. kiadása (1758) már 7700 növény- és 4235 állatfajt tartalmazott. A növények és állatok királysága mellett az ásványokat is megemlíti.

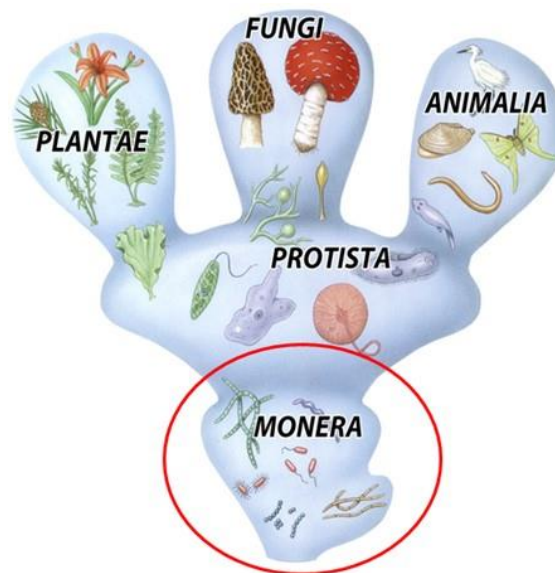
Ernst Haeckel (1834-1919) német zoológus (és filozófus) az élet fájára már „berajzolta” az állatok és növények mellé az egysejtűeket (1. ábra), evolúciós elmélete és nézetei saját korában is elismerést arattak, az eugenika (filozófiai tudományág, amely azon behatásokkal foglalkozik, amik egy adott faj veleszületett tulajdonságait javítják) úttörőjének tekinthető (Zigman, 2007). Ő kísérte meg először, hogy az addig ismert összes élőlény leszármazási viszonyait egyetlen törzsfában mutassa be (1. ábra).



1. ábra. Az élet fája (Haeckel), forrás: Ernst Haeckel 1866-os *Generelle Morphologie der Organismen* című műve

Nagy előrelépésnek számított a prokarióta és az eukarióta szerveződési szint felismerése és elkülönítése a francia E. Chatton (1883–1947) munkásságában (Podani, 2007). Az amerikai H. F. Copeland (1902–1968) a prokariótákat már teljesen elkülöníti, az eukariótákon belül pedig megtartja a Protista birodalmat, tehát négy királyság létezését valószínűsíti az élőlények között.

Robert Whittaker (1920-1980) 1969-ben az alapvető táplálkozási formák, szaporodási típus és sejtszerveződés alapján létrehozta az élővilág „5 királyság”-os rendszerét, amelyben elkülöníti a gombákat is, mint „abszorpcióval táplálkozók” csoportját (2. ábra).



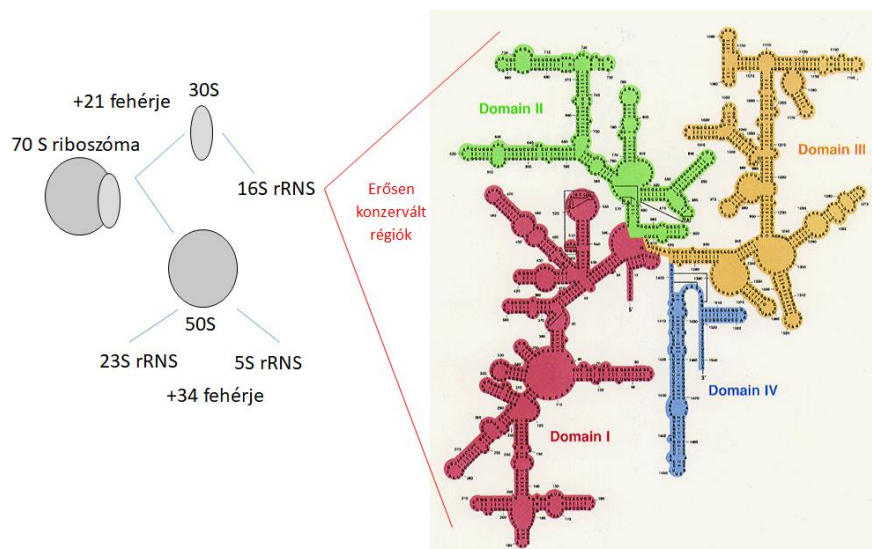
2. ábra. Az élet fája. Whittaker (1969) nyomán

Rendszerében elkülönülnek az állatok, a növények, a gombák, az egysejtűek és az ún. monera-k, amelyekhez a prokarióta szervezeteket sorolja. Ez a rendszer ugyan a maga nemében egyedülálló, de nem biztosítja a taxonok teljes „átfedésmentes” besorolását, hiszen csak fenotípusos bélyegekre alapozza a nagyobb taxonómiai egységek elkülönítését. Lynn Margulis evolúcióbiológus szintén 5 királyság létezését feltételezi, azonban ő a növények közé csak a szárazföldi növényeket illeszti be (Embryophyta) (Margulis, 1970).

Ezután számos próbálkozás történt arra, hogy egy átfedésmentes, jól alkalmazható, hierarchikus taxonómiai rendszert hozzanak létre. Számos molekuláris markert próbáltak tanulmányozni, amellyel egy egységes rendszert lehetne alkotni, és amellyel a pro-és eukariótákat azonos módon lehetne vizsgálni: pl. tejsav dehidrogenáz enzim, különböző

elongációs faktorok, citokróm c, stb., de ezek egyike sem univerzális az élővilágban, ezért nem voltak alkalmasak egy valós filogenetikai rendszer létrehozására.

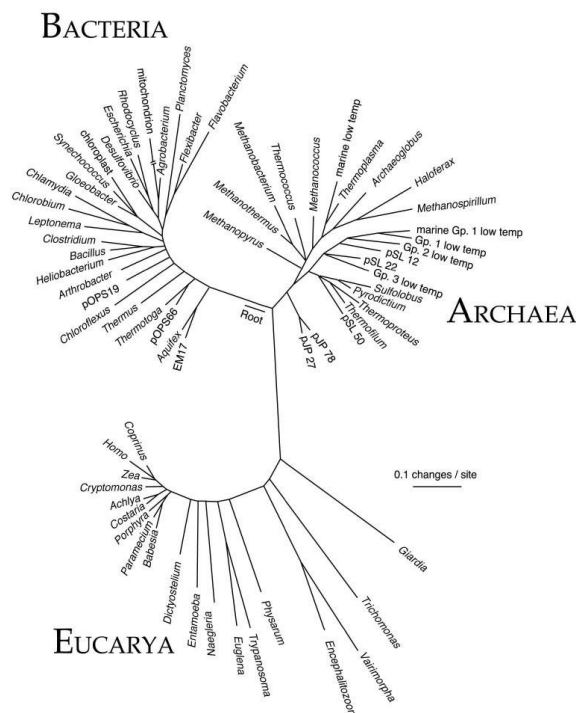
Végül a 16S (eukariótáknál 18S) rRNS gének vizsgálata kulcsot adott ahhoz, hogy az összes élő szervezetet azonos módon vizsgálva lehessen az élőnylényeket rendszerezni: immáron nem csak a fenotípusos és bizonyos molekuláris bélyegek alapján (legyenek azok bármilyenek) lehessen a szervezeteket csoportokba sorolni. A riboszomális rRNS molekulákat az alábbi tulajdonságok teszik jó filogenetikai markernek: 1., univerzális előfordulású - esszenciális minden élő szervezet számára (a riboszómák nem tudnak mRNS-sé írni semely szekvenciát riboszomális RNS nélkül); 2., erősen konzerváltak, nagyobb mutációs lépések ezen génben valószínűleg letálisak voltak, tehát az evolúció során csak kevésbé változhatott (így molekuláris óraként - kronométerként - is használható). 3., mivel konzerváltak, ez lehetővé teszi, hogy többé-kevésbé univerzális primer-t tervezzenek hozzá, így szinte bármely baktériumból felszaporítható ez a szakasz. A molekula elsődleges és másodlagos szerkezetét *E. coli* baktériumnál a 3. ábra mutatja be.



3. ábra. Az *E. coli* 16S rRNS molekulájának (elsődleges és másodlagos) szerkezete Grisham és Garrett (1995) nyomán

Így aztán hatalmas áttörést jelentett a módszertani fejlődések nyomán 1977-ben létrejött filogenetikai értékelés/rendszerezés, amely a 16S rRNS gén bázissorrendjét vizsgálva bebizonyítja, hogy a prokarióták korántsem alkotnak egységes rendszert, hanem két külön leszármazási vonalat képeznek az eukarióták mellett (Woese, 1994; Woese és mtsai, 1990, Pace, 1997). Woese 3 doménes rendszere (Bacteria, Archaea, Eukarya) ráadásul

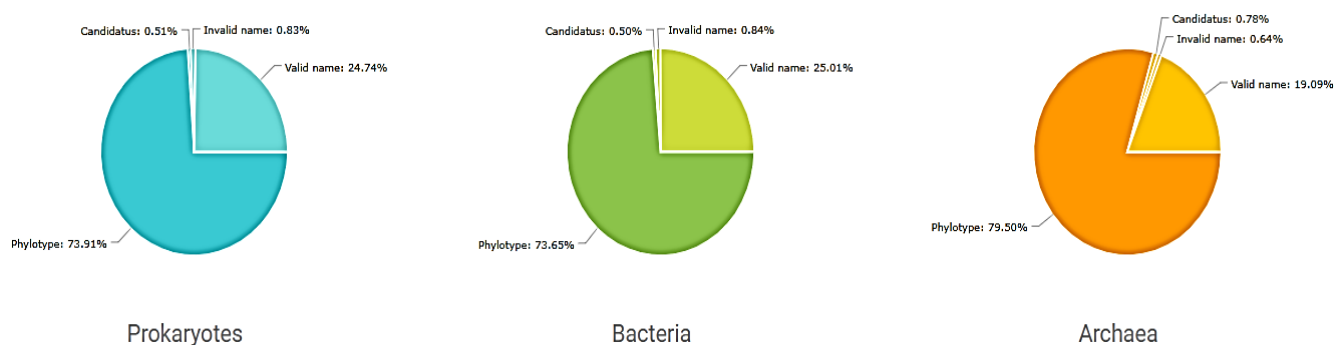
megállapítja, hogy az ősbaktériumoknak nevezett csoport (Archaea) filogenetikailag közelebb áll az eukarióták leszármazási vonalához, mint a másik prokarióta csoporthoz (4. ábra).



4. ábra Az élővilág univerzális törzsfája Woese nyomán(Pace, 1997)

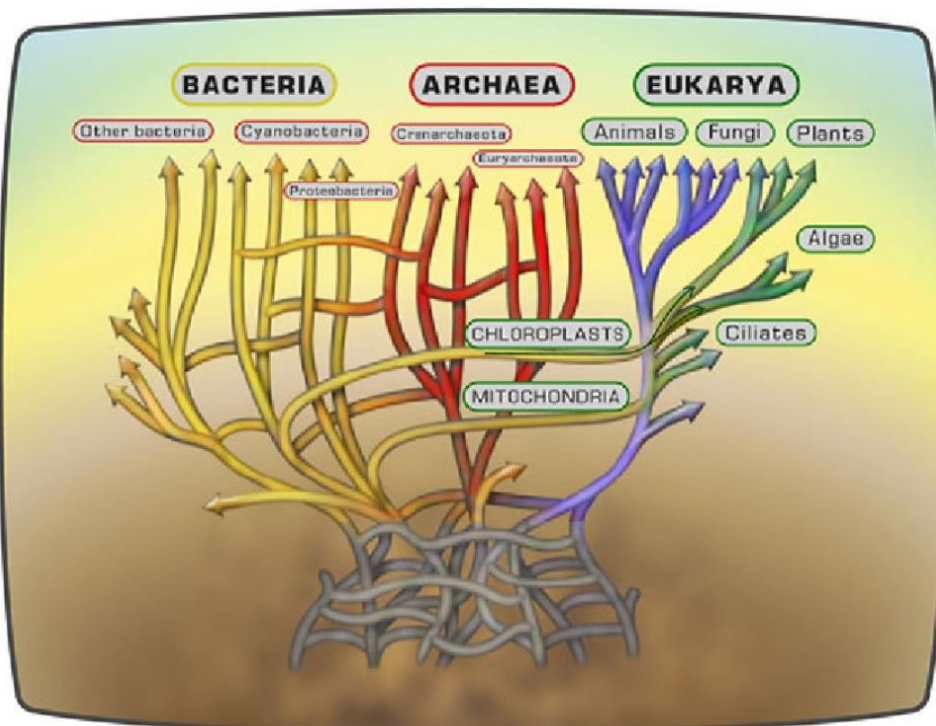
Ezután még több próbálkozás látott napvilágot az élőlények rendszerbe sorolására: pl. Cavalier-Smith rendszere, amelyben 2 birodalmon (eukarióta és prokarióta) belül 6, később 7 királyságot különít el (Cavalier-Smith, 1998; Ruggiero és mtsai., 2015), néhányan a vírusok elhelyezését is támogatják az élővilág rendszerében (Hedge és mtsai., 2009). Ennek ellenére a Woese és mtsai által felvetett 3 doménes rendszer terjedt el leginkább.

A 16S rRNS gén szekvenciákra több adatbázis is kiépült azóta: RDPII (Ribosomal Database Project-II) (Cole és mtsai., 2009); ARB (Ludwig és mtsai., 2004); SILVA (Pruesse és mtsai., 2007), de az EzBioCloud adatbázisának is ez az alapja (Yoon és mtsai., 2017). Ez utóbbi adatbázis a valid fajok típustörzseinek ellenőrzött szekvenciáit is tartalmazza, 2019. augusztusában a prokarióta taxonok megoszlását az 5. ábra mutatja (<https://www.ezbiocloud.net/dashboard>). Látszik, hogy az ún. filotípusok (a mikrobiológiában a filotípus egy környezeti DNS-szekvencia vagy szekvenciák csoportja, a legszélesebb körben alkalmazott marker a 16S rRNS gén – gyakran operációs taxonómiai egységként – OTU hivatkoznak rá) száma igen magas mind a Bacteria, mind az Archaea csoportban.



5. ábra. A prokarióta taxonok ismert szekvenciáinak megoszlása az egyes domének között forrás: EzBioCloud, (2019)

De ez utóbbival már nagyon előregrottunk, hiszen történetileg még csak a 90-es évek végén jártunk: Doolittle 1999-es Science-ben megjelent cikkében a konszenzus élet fáját az alábbiakban ábrázolja (6. ábra).



6. ábra. Az élet fája Doolittle nyomán (1999)

A fán Doolittle a Bacteria domén-nak és az eukariótáknak csak néhány képviselőjét mutatja, viszont az alsóbb nyilakkal utal a mitokondrium és a kloroplasztisz valószínű eredetére. Az endoszimbíozissal létrejött eukarióta sejtek eredete nem új keletű ötlet, hiszen erre már Merezskovszkij (1885-1921) és Wallin (1883-1969) is felhívta a figyelmet, Lynn Margulis

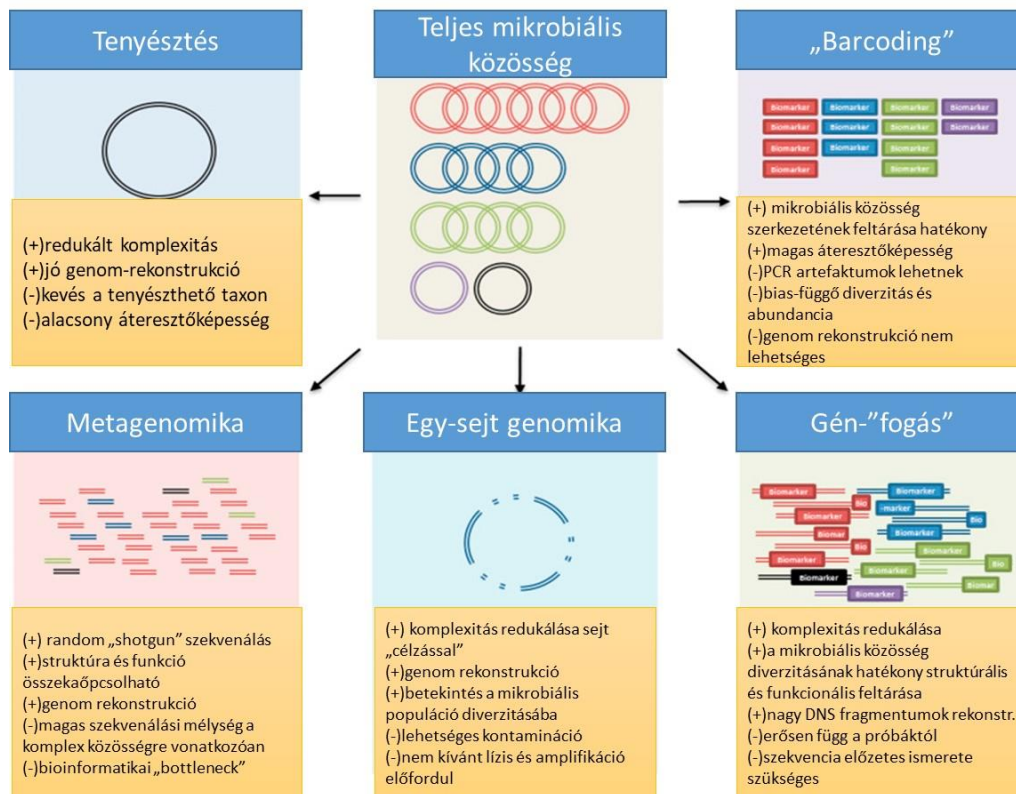
munkássága nyomán pedig a biológusok által széles körben is elfogadottá vált. Doolittle az Archaea királyságon belül már elkülöníti az Euryarchaeota és Crenarchaeota vonalakat.

A következő áttörést a polimeráz láncreakció (PCR) feltalálása és alkalmazása jelentette (Mullis és mtsai., 1986; Kary B. Mullis, Nobel-díj, 1993). Innentől kezdve a molekuláris módszerek fejlődése hatalmas ugrásokat tett lehetővé az élet eredetének kutatásában és a taxonómia fejlődésében mind az eukarióták, mind a prokarióta szervezetek vonatkozásában. A technika lehetővé tette, hogy megfelelő primert alkalmazva egy tetszőleges DNS szakaszt felszaporítani lehessen – ezzel a bázissorrend elemzések hihetetlenül felgyorsultak, egyre több szervezet örökítő anyaga vált molekulárisan feltérképezhetővé - és ez természetesen a molekuláris ökológiában is jelentős fejlődést eredményezett.

Az azóta elterjedt újgenerációs szekvenálások (NGS) kifejlesztése hatalmas jelentőségű,- és bár a technika részleteinek leírása a dolgozatnak nem célja, az alábbiakat mindenképp érdemes megemlíteni: 1., ezek a szekvenálási módszerek gyorsak (gyorsabbak, mint a Sanger-féle módszer), 2., PCR-alapú technikák 3., a leolvasás rövid szakaszokban történik 4., a kapott információs adathalmazt nagy teljesítményű számítógép segítségével dolgozzák fel. A technikának taxonómiai szempontból első sorban a szervezetek teljes genomjának elemzésében, és a belőlük kinyerhető hatalmas információ tartalomban van.

Ugyanakkor tudni kell azt is, hogy az új generációs szekvenálási módszerek közösségi szinten is nagy mennyiségű, jól definiált eredményekhez juttatnak minket az élőlényközösségekről pl. metagenom analízisek kivitelezésével. Ezen elemzések a mikrobiológiában is különösen fontosak, hiszen mint korábban már említettem, a baktériumok legnagyobb része nem tenyésztethető, így tiszta tenyészetük sem áll rendelkezésre a vizsgálatokhoz.

A legújabb metagenom elemzések és egysejt-szekvenálások (7. ábra) szerint is bebizonyosodott, hogy a Földön a prokarióták a legnagyobb számban és diverzitásban fellelhető szervezetek (Gasc és mtsai., 2015), annak ellenére, hogy többségüket csupán indirekt, molekuláris módszerrel lehet „láthatóvá” tenni.



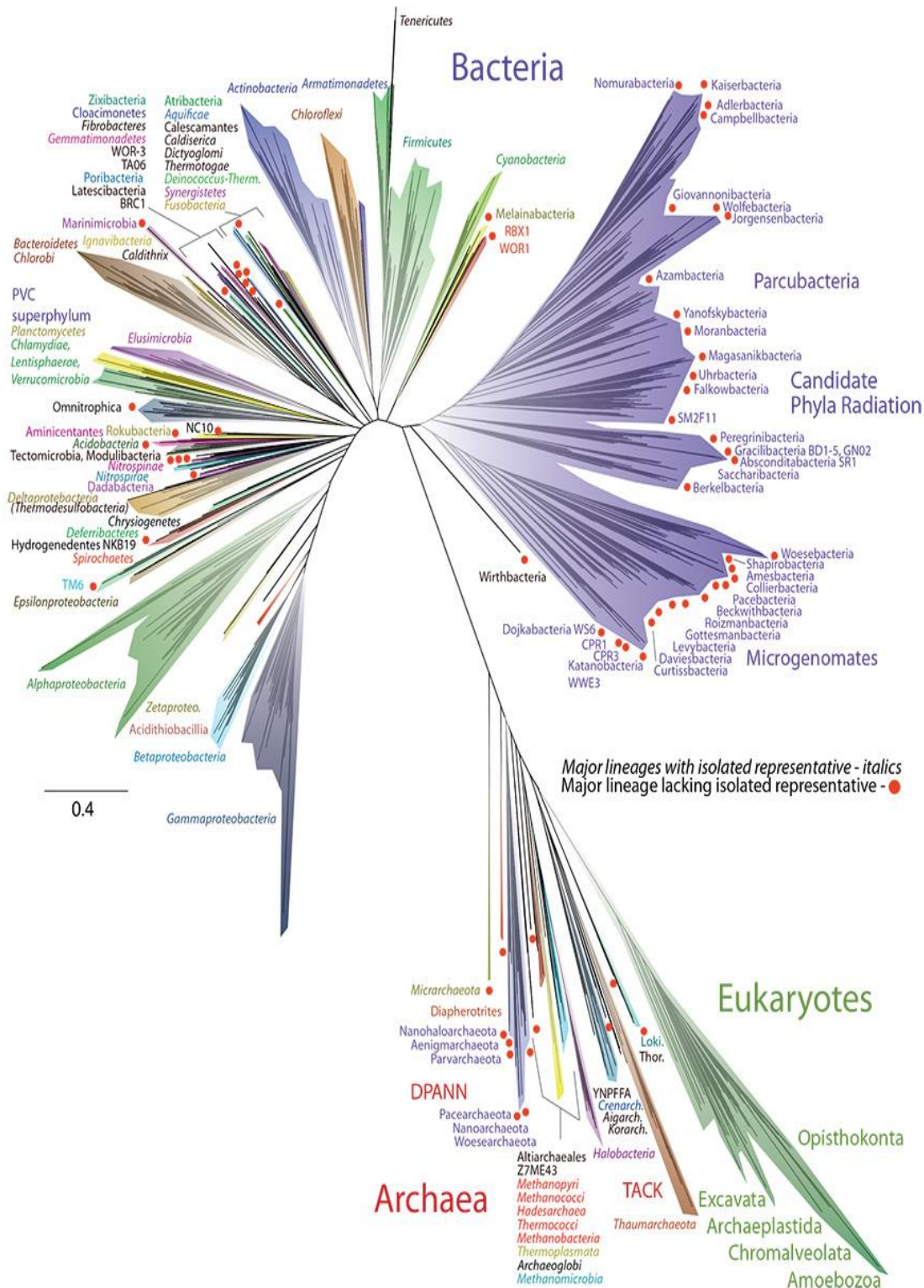
7. ábra. Az újgenerációs módszerekkel kinyerhető információk egy teljes mikrobiális közösségre vonatkozóan Gasc és mtsai (2015) nyomán

Az úgynevezett felszín alatti környezetek („subsurface environments”) tanulmányozása eleinte sok nehézségbe ütközött annak ellenére, hogy ezen környezetek a Föld jelentős hányadát képviselik: nehézkes a mintavételezésük, zömében anaerob környezetek és gyakran egészen alacsony tápanyag koncentrációval jellemezhetőek. Előzetes eredmények alapján korábban is úgy gondolták, hogy ezen természetes környezetek esetleg menedéket jelenthetnek azon szervezeteknek, amelyek az ősi, primitív életformák korai leágazásaihoz tartoznak vagy esnek közel. A nukleinsav alapú technikák további fejlődésével ezen környezetek is széles körűben tanulmányozhatóvá váltak, a metagenomikai módszerekkel történő mikrobiológiai feltárások egészen elképesztő eredményeket hoztak.

Már 2002-ben megtalálták az Archaea-k egy egészen különleges csoportját, amelyek csak gazdaszervezetükkel (*Ignicoccus*) együtt képesek élni, kicsiny méretük (genomjuk) alapján *Nanoarchaeum equitans*-nak nevezték el.

Tenyésztéstől független módszerekkel 2012-2016 között már új, phylum-szintű leágazásokat találtak: 2015-ben Brown és mtsai leírták a CPR (Candidate Phyla Radiation) csoportot, Hug és mtsai 2016-ban metagenomikai eredményekre támaszkodva újra rajzolták az élet fáját.

2017-ben Williams és mtsai leírták az Archaea-k DPANN leágazását (Diapherotites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota, Nanohaloarchaeota), majd további eredményekkel kiegészítve 2018-ban a Cell közli le a legújabb eredményeket (Castelle és Banfield) (8. ábra).



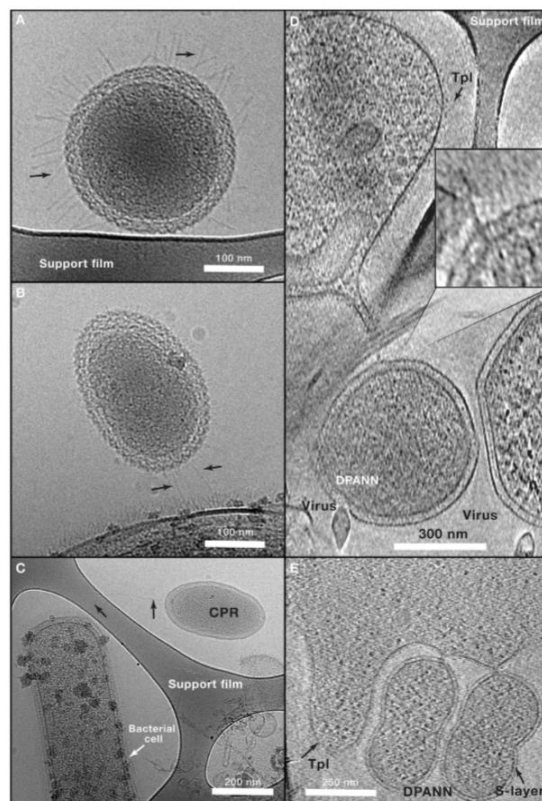
8. ábra Az élet fája Castelle és Benfield (2018) nyomán

A „új” élet fáján látható, hogy a legújabban felfedezett mély leágazások szinte egyetlen tenyésztethető prokarióta képviselőt sem tartalmaznak (az ábrán piros körök jelzik őket).

A CPR és DPANN leágazásokra extrém kicsi genom jellemző, így önálló sejtes életre nem képesek, *de novo* nem tudnak nukleotidokat sem szintetizálni, szimbionta életstílushoz adaptálódtak: minimális az aminosav és kofaktorok bioszintéziséért felelős génjeik száma, mindezidáig nem sikerült a genomokban olyan géneket találni, amelyek a membrán lipidek bioszintéziséért felelősek. Mind a CPR mind a DPANN leágazások képviselői eukariótákkal vagy más prokariótákkal szorosan asszociáltak élnek. Néhányan alternatív genetikai kódot is használnak - az UGA stop kodon náluk pl. glicin molekulát kódol. A CPR csoporthoz Brown és mtsai (2015) 35 phylum-jelöltet soroltak, ma 70 fölére becsülik számukat (1. kép).

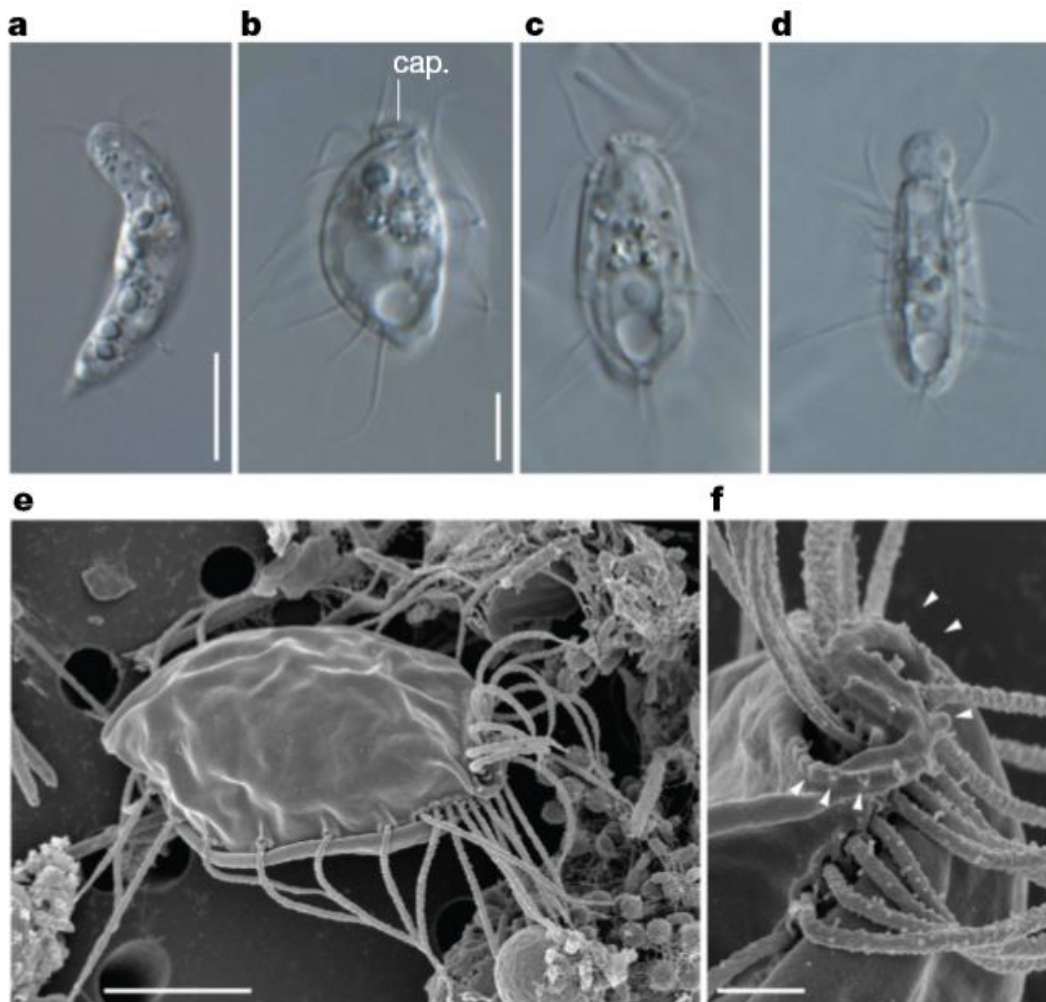
Elgondolkodtató, hogyan alakulhattak ki ezek a leágazások – egyáltalán kérdésként merült fel korábban, nem-e artefaktumok ezen csoportok/csoportosulások...

Tény, hogy mindkét csoport viszonylag „korai” evolúciós csoportokból eredeztethető (8. ábra). Az továbbra is kérdés - vajon hogyan alakulhattak ki? A gyors evolúció esetleg genom-redukcióhoz vezetett?



1. kép. Cryo-TEM (TEM=Transzmissziós Elektron Mikroszkóp) képek a CPR és DPANN képviselőiről, amint más sejtekkel asszociáltak helyezkednek el (képek: Luef és mtsai., 2015; Baker és mtsai., 2010)

Az élet fája ugyanakkor eukarióta taxonokkal is folyamatosan bővül: a kutatók pl. nemrégiben egy egészen különleges eukarióta mikrobacsoportot fedeztek fel újskóciai talajokban. Először a 19. században figyelték meg ezen szervezeteket, mint szabadon élő, ragadozó egysejtűeket, amelyek 2 sor flagellummal rendelkeznek. DNS elemzésük során kiderült, hogy sem az eddig ismert állati, sem növényi vagy egysejtű csoportokhoz nem tartoznak, az eukarióták eddig leírt nagyobb leágazásain mindenképp kívül esnek. Ezen szervezetek az első képviselője egy új „szuper-királyság”-nak, amely valószínűleg billió évekkel ezelőtt ágazott le az élet fájáról (2. kép). A csoportot Hemimastigota-knak nevezték el (Lax és mtsai., 2018).



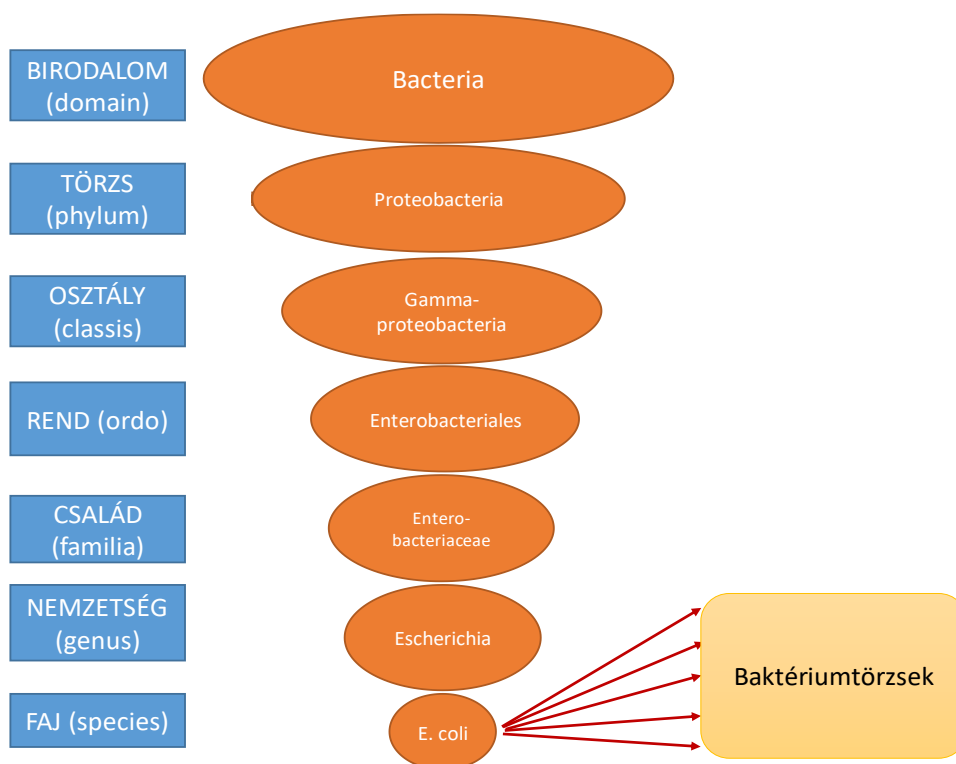
2. kép. Hemimastigota-król készült fotók. a., *Spironema cf. multiciliatum*; b-f., *H. kukwesjiki* sejtek; Mérték: 10 μm (a); 5 μm (b-e); 1 μm (f), Lax és mtsai., 2018 nyomán.

3.2 PROKARIÓTA TAXONÓMIA ALAPJAI

3.2.1 A prokarióta taxonómia kezdetei és fejlődése napjainkig

A mikroorganizmusokat Antonie van Leeuwenhoek, holland természettudós (eredetileg zoológus, 1632-1723) óta látjuk, hiszen az általa készített első mikroszkópok már felhívták a figyelmet létezésükre. Lencsési lehetővé tették nem csak a nagyobb méretű eukarióta sejtek megfigyelését, hanem láttani engedett bizonyos nagyobb méretű baktériumokat is (pl. szájszájnyálkahártyáról, széna ázalékában, stb.) (<https://www.britannica.com/biography/Antonie-van-Leeuwenhoek>).

A prokarióta taxonómia alapelvei a taxonómusok általános elveit követik: klasszifikáció (osztályozás), amely során az élőlényeket - jelen esetben baktériumokat nem átfedő csoportokba sorolják. Alapvető egysége a „faj”, illetve a prokariótáknál a fajoknak megfelelő törzscsoportok és OTU(k) (ld. később). Miután meghatároztunk egy vagy több fajt, nagyobb csoportok is definiálhatóvá válnak különböző fenotípusos, genetikai és filogenetikai tulajdonságaik alapján. Például egy nemzetség egy vagy több fajból áll (Megjegyzendő, hogy a prokarióta taxonómiában a „faj” definíciója sem egységes - ld. később); egy család egy vagy több nemzetséget tartalmaz, végül eljuthatunk a természetben létező baktériumtörzsek csoportjainak hierarchikus rendszerének felépítéséhez (9. ábra).



9. ábra. A prokarióták hierarchikus klasszifikációs rendszere, példákcal

Az adott taxonok evolúciós szempontból rokon élőlényeket tartalmaznak, ideális esetben a törzsfa egy monofiletikus (azonos leszármazási vonalhoz tartozó) csoportját képviselik. Ugyanakkor a bakteriológiában faj alatti kategóriákat is megkülönböztetünk:

- **alfaj:** hasonló tulajdonságokkal jellemezhető baktériumtörzsek csoportja azonos fajon belül.
- **baktériumtörzs:** közös (ismert) eredetű, azonos szám és betűjelzéssel ellátott, folyamatos átvitelrel fenntartott tiszta tenyészet. Ezek közül egyet kiválasztanak (általában egy, a legkorábban leírtak közül), ezt törzsgyűjtemény(ek)ben fenntartják, a későbbiekben a fajmeghatározás alapját képezi, **típustörzsnek** nevezik.
- **ökotípus:** hasonló ökológiai toleranciával jellemezhető baktériumtörzsek összessége.
- **szerotípus:** hasonló szerológiai tulajdonságokkal jellemezhető baktériumtörzsek összessége.
- **morfortípus:** hasonló morfológiai tulajdonságokkal jellemezhető baktériumtörzsek összessége.
- **biotípus:** hasonló biokémiai, fiziológiai tulajdonságokkal jellemezhető baktériumtörzsek összessége.
- **patotípus:** hasonló kórokozó tulajdonságokkal jellemezhető baktériumtörzsek összessége (azonos gazdára vonatkoztatva).

A klasszifikáció nem választható el az identifikációtól: identifikáció (azonosítás) során az újonnan izolált baktériumtörzseket különféle módszerekkel ismert taxonokhoz lehet hozzárendelni. Ha nem tudjuk besorolni az adott baktériumtörzset semelyik létező taxonhoz, akkor azt nem azonosíthatóként lehet definiálni és új taxonként lehet megkísérelni a leírását (ld. később).

A legkorábbi mikrobiológiai klasszifikációra irányuló próbálkozások csupán a baktériumok morfológiai jellemzőire hagytak, így a XVII-XVIII. században a tudósok csak úgy beszéltek a prokariótákról, mint egyetlen fajról, mely nagyfokú morfológiai változatosságot mutat (Rosselló-Mora és Amann, 2001).

A mikrobiológia fejlődésének egyik legfontosabb lépése volt a baktériumok tiszta tenyészeinek előállítása annak ellenére, hogy mind a mai napig a prokarióta szervezetek jelentős hányadát nem sikerült tenyésztésbe vonni (Amann és mtsai., 1995; Overmann és mtsai, 2017). Az 1800-as évek végétől egyre több olyan festési eljárást dolgoztak ki (pl. Gram festés, C. Gram, 1884; saválló festés, R. Koch, 1882), amely valamely sejtkalkotó segítségével a baktériumok bizonyos csoportjainak elkülönítését tette lehetővé. Közben számos biokémiai

tesztet és eljárást is sikerült kifejleszteni a baktériumok fiziológiai tulajdonságainak megismerésére, így végül mindezek lehetővé tették a mikrobák elkülönítését, fenotípusos jellemzőinek leírását. A 70-es évektől megjelennek a gyors identifikációs rendszerek is, amelyek szintén fenotípusos bélyegek vizsgálatán alapulnak, ezeket a taxonómiai leírásoknál mai napig alkalmazzuk (1. táblázat).

Gyártó	Teszt	Felhasználás	Tesztek száma
Biolog	Biolog test	Általános teszt (tetrazólium sók redukcióján alapul, annak hatására, amikor egy törzs oxidálja az adott szubsztrátot)	95
bioMérieux	API 20E	Enterális Gram negatív pálcák	20
	API 20 Strep	Streptococcus, Enterococcus	20
	API 50 CH	Általános használat (savképzésen alapul)	49
	API Staph	Staphylococcus	10
	API ZYM	Általános teszt, enzimvizsgálaton alapul	19
	Vitek GP I	Gram-pozitív kokkus, korineform baktériumok	30
	API Coryne	Korineform pálcák	20
BD Diagnostic systems	Crystal Gram-Positive ID	Aerob Gram pozitív baktériumok	29
	Enterotube II	Enterobacteriaceae	15

1. táblázat. Példák jelenleg használatban lévő gyorsdiagnosztikai tesztekre (a teljesség igénye nélkül)

A fenotípusos vizsgálatok lehetővé tették egyfajta osztályozást, de csupán fenotípusos bélyegekre alapozva nehéznek bizonyult egy prokarióta klasszifikációs rendszer felállítása. Hamarosan a sok, eltérő fenotípusos módszer egyre nehezebbé tette a taxonómusok számára, hogy objektív módon közelíthessék meg az osztályozás problémakörét. Ráadásul, az egyre több fenotípusos tulajdonság vizsgálatokba vonása egyre kezelhetlenebb adattömeget eredményezett - a határozó könyvek a baktériumok pontos meghatározást csupán fenotípusos bélyegekre alapozva nem tették lehetővé, bár a mikrobiológusok szisztematikusan meghatározták és definiálták a baktériumfajokat fenotípusos karaktereik felsorolása alapján, elsősorban a növekedési paramétereikhez kapcsolódóan. A Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1923, (David Bergey és mtsai.) és ennek bővített

kiadása is csupán fenotípusos bélyegeken alapult, sőt az 1984-ben megjelent bővített kiadás is - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - ugyanezt teszi.

A számítógépek és az informatika fejlődésével jött létre a numerikus analízis (Sneath és Sokal, 1962). A numerikus taxonómiai vizsgálatok során számos tulajdonság összevetésére kerül sor, mindegyik esetében azonos súlyozással. Az elemzés összeveti a vizsgált tulajdonságok minél szélesebb skálájának meglétét, illetve hiányát az adott élőlénycsoportok esetében. Az adatok felvételét követően számítógép segítségével minden baktériumtörzset minden másikkal páronként és tulajdonságonként összehasonlítanak, majd megadnak egy jellemző hasonlósági indexet. Az indexek maguk is többféleképpen kalkulálhatók, a mikrobiológiában leginkább a SM (Simple Matching) vagy a Jaccard koefficienszt használták. Értelemszerűen a sok hasonlóságot mutató élőlények azonos csoportba kerülnek, annak ellenére, hogy nem súlyozódnak az egyes tulajdonságok. A numerikus analízis eredménye egy dendrogram, ahol a közösen csoportosított törzsek összességét fenonoknak hívjuk. Ha az analízis során az ismeretlen baktériumtörzseket autentikus baktériumokkal együttesen vizsgáljuk és velük azonos fenonokba soroljuk, az adott baktériumot meghatározottnak tekintik. Sok tenyészthető baktérium azonban még így sem volt ismert csoportokba sorolható, illetve a csak morfológiai, biokémiai és fiziológiai kulcsbélyegeken alapuló meghatározás többször téves identifikációhoz vezetett. Mindemellett a leírt baktérium taxonok mennyisége egyre növekedett.

Ráadásul a baktériumok elnevezésével is adódtak gondok. A nomenklatúra (nevezéktan) a taxonómiának az az ága, amely során a korábban ismeretlen taxonnak kettős latin nevet adnak.

Ha történeti sorrendbe szeretnénk rakni az élővilág, köztük a prokarióták nevezéktanral foglalkozó tudományágát, az alábbi haladási vonalat látjuk:

- A növények nemzetközi nevezéktani könyvében (International Code of Botanical Nomenclature – ICBN (1905), a prokarióták növények közé sorolódtak.
- 1948-ban jelenik meg az első, már kifejezetten baktériumokkal foglalkozó nevezéktani tanulmány - International Code of Nomenclature of Bacteria – ICNB, itt a baktériumok már külön csoportban, külön nevesítve találhatóak.
- International Code of Nomenclature for Cultivated Plants – ICNCP (1953, in: Brickell és mtsai., 2009), a tenyésztett növényeket
- International Code of Zoological Nomenclature – ICZN (1961, in: Ride és mtsai., 1999) az állatokat

- az International Code of Nomenclature and Taxonomy of Viruses – ICNTV (1971 in: King és mtsai., 2011) a vírusokat próbálja rendszerezni.

Az 1970-es évekre már olyan nagy mennyiségű szinonim baktériumnév létezett, - közel 30000 fajnév került publikálásra, melynek bizonyosan csak töredéke volt valóban létező fajhoz kapcsolható - hogy az 1976-ban, Jeruzsálemben a Juicial Comission of ICSB (International Committee on Systematics of Bacteriology) bizottsága az addig létező baktériumnevek revideálását tűzte ki célul, kiadták a baktériumnevek jóváhagyó listájának első verzióját (Approved List of Bacterial Names). Ezt Skermann és mtsai fejlesztik tovább (1980). A lista meghatározta az érvényes baktériumneveket, valamint védetté - meg nem változtathatóvá tette azokat. Az addig 30 ezres fajlista ezzel 1800 körüli értékre lecsökkent.

Közben szabályozták az akkoriban érvényes fajleírás feltételeit is. 1976 január 1. óta csak az számít érvényes fajleírásnak, amelyet az International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB) tudományos folyóiratban tesznek közzé (ma: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, IJSEM); vagy a fajnév megjelent az IJSB/IJSEM validációs listájában, amely azokat az érvényes fajneveket, fajleírásokat sorolja fel, amelyeket más folyóiratokban szabályszerűen publikáltak. Kimondták, hogy érvényes fajleírás csak baktériumtörzsekre alapozva lehetséges (tenyésztetőség), a típustörzset, mint névhordozót nemzeti és nemzetközi törzsgyűjteményekben kell elhelyezni (Skerman és mtsai., 1980).

A 80-as években a fenotípusos taxonómiai leírások problémáit a kemotaxonómia és a modern biokémiai analitika (elsősorban kromatográfiával, gél-elektroforézissel történő elválasztási technikák, specifikus kémiai alkotóelemek, mint aminosavak, cukrok, lipidek elválasztása) fejlődése látszott feloldani. A kemotaxonómiai markerek (első sorban a baktériumok sejtfalában és citoplazma membránjában) felhasználása a baktériumtaxonok meghatározásban és elkülönítésében ily módon nagy segítséget jelentett, hiszen ezen markerek legtöbbje tenyésztéstől függetlenül általában stabilak és az evolúció során is csekély változásokon mentek (Lemmer és Kroppensted, 1984).

Az 1975-ben leírt (O'Farrell) kétdimenziós fehérjégél elektroforézis módszer a proteomika alapjait teremti meg.

Sasser és munkatársai (1990) pedig kidolgozták a membrán lipidek biokémiai elemzésének módszerét – ezzel megalapozva citoplazma zsírsavainak feltérképezésén alapuló taxonómiát, a MIDI rendszer kifejlesztését.

Azonban nagyon sok taxonómiai probléma feloldására a kemotaxonómiai markerek analízise sem volt megfelelő, bár a kémiai technikák fejlődésével egyre szélesebb körben vált alkalmazhatóvá a mikrobiológiában is. Gondot jelent azonban:

- a markerek felbontása sok esetben csak bizonyos taxonómiai csoportokon belül alkalmas jó elkülönítésre (pl. mikolsavak analízise bizonyos Actinobacteria taxonokon belül)
- fajokra jellemző bélyegek szinte nem léteznek, a kemotaxonómiai markerek inkább nemzetségekre jellemzőek (bár bizonyos taxonokon belül ugyanazon markerek mennyiségi arányai már fajra jellemző tulajdonságok is lehetnek, pl. citoplazma membrán zsírsavai esetén).
- sok marker az élővilág egészében univerzális előfordulású, így taxonómiai jeletőségük kicsiny (pl. C_{14:0}, C_{16:0} zsírsavak)
- bizonyos markerek csak bizonyos csoportokban léteznek, nem univerzális előfordulásúak (pl. bakteriális kinonok csak a légző szervezetekben vannak).

A probléma végső megoldását a molekuláris biológia szolgáltatta. A pontosabb baktériumidentifikációs módszerek forradalmának időszakában először az ismert fajok filogenetikai érvényű taxonómiai jellemzését végezték el. A legelső vizsgálatok a DNS G+C bázis mólarányának (mol%) meghatározására terjedtek ki, valamint ezzel párhuzamosan nukleinsav-hibridizációs (DNS-DNS, DNS-RNS) technikák elterjedése (Wajne és mtsai., 1987). A DNS-DNS hibridizációt (DDH) kb. 50 évig a fajhatárok megállapításához szükséges genomiális „gold standard”-nek nevezték. Kb. ugyanekkor derült fény a riboszómális RNS-eket kódoló gének konzervált jellegére és esetleges filogenetikai célú hasznosíthatóságára is (erről korábban már szóltam, Woese, 1994). A nagy áttörést a nukleinsavak szekvencia analízisének kidolgozása jelentette a 70-es évek elején. A gyors RNS és DNS szekvenálási módszerek elterjedésével elegendő információ állt rendelkezésre egy átfogó bakteriális filogenetikai rendszer felvázolásához, valamint az egyes taxonómiai csoportok elkülönítését további módszerek fejlesztésével igyekeztek megoldani. Stackebrandt és Groebel (1994) javasolták, hogy a DDH (DNS-DNS hibridizációs) módszereket egyszerűen váltsák fel a 16S rRNS génjének bázissorrend elemzésével. A 70%-os teljes genomra vonatkozó hibridizációs

értéket ekkor kb. 97%-os 16S rRNS gén azonossággal párosították és ez a határérték sokáig így is maradt használatban, bár 2005 után az értéket 98,2-99,0%-ra módosították (Stackebrandt és Ebers, 2006).

Tehát a bakteriális taxonómiában a 16S rRNS gén szekvencia elemzésének kitüntetett szerepe van: ismerete nagyon fontos, azonban nem elégséges feltétele egy faj definiálásának. A „97%-os szabály” csupán azt állapítja meg, hogy ennél alacsonyabb szekvencia hasonlóság esetében biztosan külön fajba tartozik a vizsgált 2 baktérium. Viszont a 97% feletti 16S rRNS gén szekvencia homológia nem jelenti feltétlenül az azonos fajba tartozást (Stackebrandt és Goebel, 1994). A nemzetség és annál magasabb taxonómiai kategóriákba soroláshoz a 16S rRNS gén megfelelő felbontással rendelkezik, illetve elemzése fontos annak eldöntéséhez, hogy a kérdéses taxon(ok) az adott típus törzs DNS-DNS hibridizáción alapuló összehasonlítását el kell-e végezni - Tindall szerint (2010) teljes genomra vonatkoztatva a 70% feletti hasonlósági érték azonos fajhoz tartozást jelent. Innentől kezdve két baktériumot azonos fajhoz tartozónak tekintettek, ha 16S rRNS génjük legalább 97%-os szekvencia hasonlóságot (vagy afölötti értéket) mutatott és a teljes genomra vonatkoztatott DNS-DNS hibridizációs értékük pedig legalább 70 mol% volt.

A multilókuszos bázissorrend meghatározások és ezen az alapon történő összehasonlítások újabb löketet adtak a taxonómusok számára (Glaeser és Kämpfer, 2015). A családon belüli nemzetségek vagy adott nemzetségeken belül a fajok filogenetikai kapcsolatának nagyobb felbontásának elérése érdekében a multilókuszos szekvencia-analízis (MLSA) jelenleg is széles körben alkalmazott módszer. Ezen vizsgálatoknál általában konzervált funkciójú fehérjék génjeit (ún. háztartási géneket) használják filogenetikai elemzésekhez. Az MLSA elemzéseket a prokarióta taxonómiában széles körben alkalmazzák, de ezen vizsgálatokhoz nincs egységesen elfogadott szabály: különböző csoportoknál különböző géneket célszerű vizsgálni, a vizsgált gének száma és a szekvenciák hossza is eltérő lehet a különböző prokarióta csoportoknál. Egyetértés született azonban abban, hogy sokszor a hibridizációs eljárások ezzel kiválthatóak és azokban a prokarióta csoportokban ezen eljárás elengedhetetlen, ahol a 16S rRNS gén vizsgálata nem ad elegendő felbontást az adott taxon(ok) elkülönítéséhez.

Fleischmann és mtsai (1995) publikálják a *Haemophilus influenzae* teljes genom szekvenálásának módszerét és analizését, Fodor és mtsai (1993) az mRNS szint mérésére vállalkozott sikeresen a sejtekben.

Azóta számos baktérium teljes genetikai állományának szekvenciája hozzáférhető, a típustörzsek genomszekvenálása újabb lehetőséget nyújt, és szinte átformálja a prokarióta taxonómiát azáltal, hogy a fajok azonosítását sokkal biztosabbá teszi, rávilágíthat a taxonómiai csoportok funkcionális sajátosságaira is és a magasabb rendű taxonok filogenezisének tisztázásához is hozzájárul. Úgy tűnik, sok nem tenyésztett, esetleg szimbiózisban élő szervezetről is jelentős információhoz juthatunk (meta)genom elemzések által (Whitman, 2015).

Kim és mtsai az azonos fajhoz tartozásra vonatkozó határértéket teljes genom elemzések során 98.65%-ban állapítják meg és a vizsgálatokat ANI (Average Nucleotide Identity) értékekkel javasolják kiegészíteni (2014).

Tény, hogy a modern mikrobiális szisztematika/taxonómia számos módszert követel a mikroorganizmusok átfogó jellemzésére, osztályozására és azonosítására: a teljes genom elemzések biztosítják a végső referenciát a pontos taxonómiai azonosításra és a filogenetikai hovatartozás leírására, a kiválasztott biomarker-alapú stratégiák pedig továbbra is biztosítják az eszközöket az alacsonyabb taxonómiai csoportokon belüli elkülönítésekhez. A proteomika, a gének expresszióját, valamint a kapott fehérjék szerkezetét és funkciójának vizsgálva kiegészíti a genom szekvenciaadatok által kapott információkat. Nem hagyható ugyanakkor figyelmen kívül, hogy a tömegspektrometriai fejlesztések szintén sokat lendítettek a baktériumok azonosítási problémáin. Különösen klinikai izolátumok esetén megbízhatóak MALDI-TOF MS vizsgálatok: sejt felszíni fehérjék vizsgálatán át közelít a mikrobák azonosításához – bár megjegyzendő, hogy felhasználhatósága a taxonómiában adatbázisok hiányában csak bizonyos taxonómiai csoportoknál célszerű (Schumann és Maier, 2014).

A tandem tömegspektrometria módszereivel lehetséges akár több száz expresszált mikrobiális törzsmarkert azonosítani. A proteomikán alapuló megközelítések a mikroorganizmusok jellemzésére szolgáló hagyományos módszerek kiegészítését jelentik, alkalmazhatóak a mikroorganizmusok jellemzésére szinte bármely taxonómiai szinten (Karlsson és mtsai, 2015).

Mindemellett a fenotípusos bélyegek vizsgálata továbbra sem elhanyagolható a tenyésztett baktériumok esetében. 2009-ben jelent meg egy átfogó közlemény a szükséges (és talán elégséges) fenotípusos vizsgálatokról ennek kapcsán (Bocher, 2009).

3.2.2 A prokarióta fajfogalom/fajdefiníció problematikája

Megjegyzés/kiegészítés: a baktériumok tenyésztése továbbra is kihívás!

Hatékony, gyors és általánosan alkalmazható tenyésztési és izolálási technika kidolgozására régóta nagy igény mutatkozik a mikrobiológiában. Manapság már sokféle táptalajt alkalmaznak mikrobák tenyésztésére, de sajnálatos módon ezek a tenyészközegek még így is csak egy adott mintában fellelhető baktériumszám töredékének képesek a növekedéshez szükséges feltételeket biztosítani, nincs olyan összetett médium, melyen minden létező baktérium szaporodna (Amann és mtsai., 1995; Overmann, 2014). A tenyésztési eljárások során alkalmazott táptalajok vagy dúsító közegek mindig szelektívek és sosem tudják visszaadni az eredeti mikrobaközösségek teljes összetételét - a hagyományos tenyésztési módszerek gyakran különösen szelektívek, és inkább a gyorsabb növekedésű, domináns taxonoknak kedveznek. Minél több táptalaj használata, minél több környezeti faktor figyelembe vétele, alacsony tápanyag-koncentrációk (oligotróf tápközegek), szövet és sejttenyészetek, stb. alkalmazása azonban egyre több olyan baktérium vizsgálatát és leírását teszi lehetővé, melyek a filogenetikai törzsfá egy-egy új ágát képviselik. Számos új technikát próbálnak alkalmazni: csökkentik az inokulum méretét (Davis és mtsai., 2005), alternatív szilárdító ágensek használnak (Kamagata és Tamaki, 2005), grádiens kamra tenyésztés (Emerson és mtsai., 1994), Ichip-ek alkalmazása (Nichols és mtsai., 2010), a PWPCR (Plate-wash PCR) (Stevenson és mtsai., 2004) vagy az egysejt izolálás (Ishii és mtsai., 2010) mind azt célozzák meg, hogy korábban tenyésztésbe nem vonható szervezeteket valamilyen technika segítségével táptalajon fenn tudjanak tartani.

Valamely taxon leírásának alapvető feltétele jelenleg ugyanis, hogy a vizsgálni kívánt baktérium laboratóriumi körülmények között tenyészthető legyen. Igaz, hogy létezik a „Candidatus” fogalom, amely általában azon baktériumokat foglalja magába, amelyek vagy nem vonhatók tenyésztésbe, de ismerjk őket vagy a vizsgálatukhoz szükséges biomasza előállítására nehézségekbe ütközik: ugyanakkor ezen szervezetek egyértelmű azonosítása mégiscsak lehetséges genetikai, morfológiai, ökológiai és néhány anyagcsere tulajdonságuk alapján. A Candidatus státuszt a legújabb metagenomikai felfedezések kapcsán igyekeznek kibővíteni, hiszen a modern szekvenálási technikák lehetővé teszik a DNS-szekvenciák diszkrét populációinak felismerését adott környezeti mintákban, amelyeket a még le nem írt fajok tagjaiként lehet azonosítani (Konstantinidis és Rosello-Mora, 2015).

A prokarióta fajfogalom a laboratóriumi technikák fejlődésével párhuzamosan változott, formálódott. A baktériumokkal foglalkozó taxonómusok általában megegyeznek abban, hogy

egy jól használható, általánosan alkalmazható, prokariótákra érvényes fajfogalom kialakítása feltétlenül szükséges lenne. Az eukarióta élőlényekre is többféle fajfogalom él, melyek közül a legáltalánosabb az egymással ivaros szaporodásra képes és más élőlénycsoportoktól reprodukcióval izolált egyedek összességét fejezi ki (Mayr, 1942). Ám ez a prokarióták nagy részére nem igaz, hiszen a baktériumok körében számos, akár nemzetségeket érintő horizontális géntranszferrel találkozhatunk. Sokáig nem született egységes fajfogalom/faj definíció, mely a prokariótákra alkalmazható lenne, több, különböző meghatározással is találkozhattunk:

- A faj olyan mikrobatorzsek összessége, melyek számos tulajdonságukban mutatnak hasonlóságot egymással, és szignifikánsan eltérnek más mikrobatorzsek csoportjaitól.
- Az ún. filo-fenetikus fajfogalom szerint a fajokat úgy írhatjuk le, mint egy monofiletikus, genetikailag összetartozó egyedek csoportját, melyek nagyfokú hasonlóságot mutatnak számos egymástól független tulajdonságban és fenotípusos jellemzőik alapján meghatározhatók (Rosselló-Mora és Amann, 2001). Úgy vélik, hogy ez utóbbi megfogalmazás sokkal gyakorlatiasabb, mint az eukarióta fajokra használatos definíciók.
- A „genetikai” alapon meghatározott fajfogalom szerint korábban akkor tekinthettünk két mikrobatorzset azonos fajhoz tartozónak, ha 16S rRNS génjüknek teljes szekvencia analízise alapján 97% vagy annál nagyobb hasonlóságot mutatnak, továbbá a teljes genom DNS-DNS hibridizációjuk értéke 70% vagy annál nagyobb hasonlósági értéket mutat (Stackebrandt és Goebel, 1994).

Ma, a genomika korában azonban, amikor a DDH (DNS hibridizáció) technika is lassan feleslegessé vált, két genom között az átlagos nukleotid azonosság (ANI= Average Nucleotide Identity) meghatározása tűnt a legalkalmasabbnak a genomi fajhatárokat megállapítására, ezt 95-96%-os ANI értéknél állapították meg. Az ANI értékek meghatározásához gyakran nem szükséges a teljes genom összetételének pontos ismerete elegendő a genom kb. 20%-ának random szekvenálását elvégezni, az érték már abból is kalkulálható (Richter és Rosello-Mora, 2009).

A DNS szekvenálási technológiák és a bioinformatika fejlődésével ugyanakkor lehetőség van az adott prokarióta szervezet teljes genomjának analízisére, amely számos lehetőséget rejt magában. Chun és mtsai 2018-ban azt javasolták, hogy a DDH értékeket minden esetben helyettesítsék az teljes genom rokonsági index-szel (OGRI=Overall Genome Related Index).

Ennek értéke azt mutatja meg, hogy két genomszekvencia mekkora hasonlóságot mutat egymással.

Ugyanakkor az aktuális fajdefiníciót az is „befolyásolta”, hogy éppen mely tudományágban alkalmazták:

- Az orvosi gyakorlatban a meghatározásban egyedi törzsekre alapozva, csupán néhány fenotípusos karakterben való különbségre alapozzák a fajmeghatározást.
- A környezeti mikrobiológiában a fajfogalom populációkkal, törzskollekciókkal dolgozik és filogenetikai információkat keres módszereivel.
- Korábban, a numerikus taxonómiai elemzés két különböző baktériumot egy fajba tartozónak tekint, ha az SM (Simple Matching) koefficienssel kalkulált hasonlóság érték 80-90% vagy a fölötti, Jaccard koefficiens használatakor pedig legalább 90-95%.

Ezért mind a legutóbbi időkig a prokarióták körében a taxonómiai leírások esetén a polifázikus eljárásokat javasolták: mind fenotípusos (klasszikus fenotípusos tesztek, ökológiai vizsgálatok, gyorsdiagnosztikai eljárások, kemotaxonómiai analízisek), mind genetikai analízissel vizsgálni egy adott (lehetséges új) taxonómiai csoportot.

De mivel is egészül ki pontosan napjainkban, a teljes genom analízisek korában a prokarióta fajdefiníció?

A baktériumfajt egy típustörzssel szükséges definiálni, amely tehát egy ÉLŐ mikroba, és amely baktériumtörzs törzsgyűjteményekből bárki számára elérhető (legalább 2 törzsgyűjteményben deponálni kell a taxon leírásakor azt). Tehát valódi faj „fogalom” alapja ma is még a tenyésztetőség... (legalábbis 2020 márciusáig biztosan, magyarázat ld. később) Ugyanakkor a „modern” fajfogalom a genomikát is bevonja a gyakorlatba. Különböző bioinformatikai algoritmusokat hoztak létre (pl. Chun, 2014), amellyel két genom közötti hasonlóságot vizsgálni lehet: mint korábban említettük, 95-96%-os ANI értéknél tekintenek 2 szekvenciát azonos fajhoz tartozónak. Egy 2018-ban közzétett publikáció alapján (Chun és mtsai) a jelenlegi fajleírások már megkövetelik a típustörzs teljes genomjának szekvencia analízisét és legalább a nyers genom adatainak közzétételét.

A genomszekvenálások eredményeként a fajhatárt jelző 16S rRNS gén hasonlóságot azonos fajoknál 98,7%-ra emelték, ennél alacsonyabb értéknél nem tekintik a 2 baktériumot azonos fajhoz tartozónak. Ha ez az érték ennél magasabb, akkor a sors fintoraként vagy azonos

fajhoz tartoznak - vagy nem, ennek eldöntése további vizsgálatokat szükséges végezni, pl. az ANI értékek kalkulálása ebben az esetben is elengedhetetlen (Chun és mtsai., 2018).

Mindemellett a mikrobiom kutatások előretörésével jelenleg további fogalmakat is definiálnak. Mivel a metagenom elemzés eredményei nem tenyésztett mikroorganizmusokból származnak, ezért az OTU (operatív taxonómiai egység) fogalmát használják ennek vonatkozásában, a faj és az OTU kifejezéseket gyakran szinonimaként használják, habár ez nem teljesen helytálló:

- Faj: alapvető taxonómiai egység, a klasszikus Linnae-i taxonómia szerint, tenyésztett baktériumtörzsön alapul.
- OTU: Operatív taxonómiai egység. Szekvenciák vagy élőlények csoportja, amelyeket pusztán a DNS vonalkód-molekulák szekvencia-hasonlósága határoz meg. Bakteriális mikrobiom vizsgálatokban az OTU meghatározása a 16S szekvenciák csoportja, 97% -os szekvencia hasonlósággal. Az OTU ilyen típusát molekuláris OTU-nak is hívják. Egy OTU ugyanakkor több fajt is tartalmazhat (hiszen a 97%-os hasonlóság önmagában nem fajhatár).

További fogalmak:

- **Faj, érvényes fajnévvel:** Ez a standard fajfogalom – fajleírást tesznek róla közzé, a faj típus törzsét egy vagy több törzsgyűjteményben elhelyezik. Ha a fajleírás nem az IJSEM hasábjain jelenik meg, akkor az adott faj nevét érvényesíteni szükséges (validálás).
- **Faj, nem érvényes névvel:** az érvénytelen névvel rendelkező faj fogalma hasonló az érvényes névhez tartozó fajokhoz, azzal a különbséggel, hogy neve nem szerepel a jóváhagyott listán (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN), ezért azt validálni kell.
- **Candidatus:** A Candidatus fogalmát először Murray és Stackebrandt (1995) vezette be. A Candidatus-elnevezéseket általában azoknak a faj-jelölteknek adják, amelyek tiszta tenyészetei nem elérhetőek.
- **Filotípus:** sok esetben ismert, hogy a faj létezik, azonban nincs elég adat, amivel alá lehetne támasztani a valid elnevezést. Ide tartozik pl. a „genomospecies”, amely „faj” létezését genomikai adatok támasztják alá (pl. ANI érték).

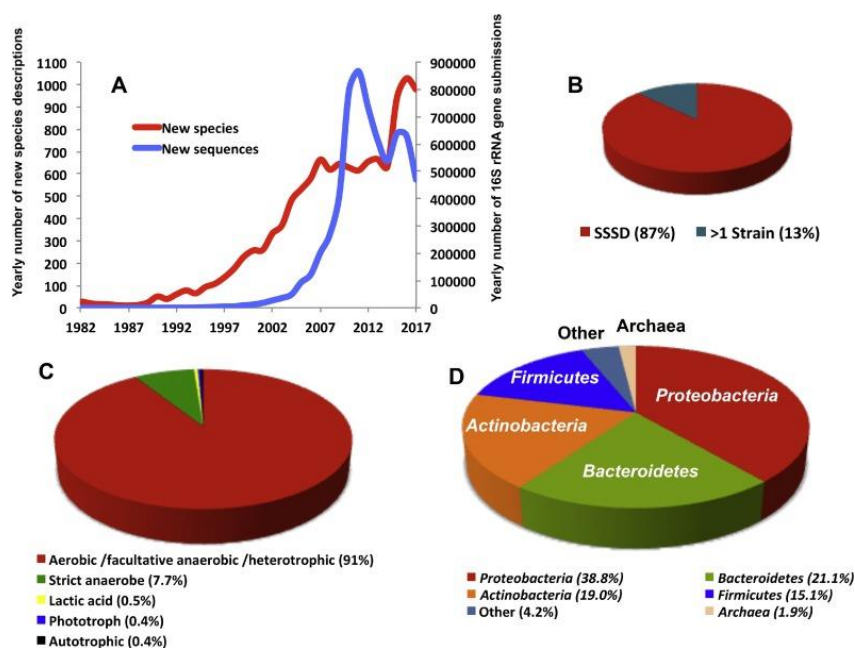
A baktériumok elnevezését a Prokarióta Kód határozza meg (International Code of Nomenclature of Prokaryotes), legutóbbi verziója 2019-ben jelent meg (Parker és mtsai), kiadásáért a mindenkori ICSP EB (Executive Board of the International Committee on Systematic of Prokaryotes) felelős. A kód a baktériumok elnevezésével foglalkozik, az aktuális taxon klasszifikációjára viszont nem ad útmutatást.

3.2.3 A leírt prokarióta taxonok számának változása napjainkig

Az új prokarióta fajok leírásának száma a mai napig egyre növekszik: Az 1990-ben, 1995-ben, 2000-ben, 2005-ben és 2010-ben az új fajok érvényesen közzétett nevének száma 140, 217, 275, 528 és 611 volt (a www.bacterio.cict.fr-ről; lásd még: Euzéby, 1997), 2011. május 10-ig a prokarióta nevek listája (LPSN) 10 706 érvényes fajnevet tartalmazott (Rosello-Mora és Whitman, 2018), amelyek közül 1237 új kombinációt jelentett, 67-et pedig illegitimnek tartottak.

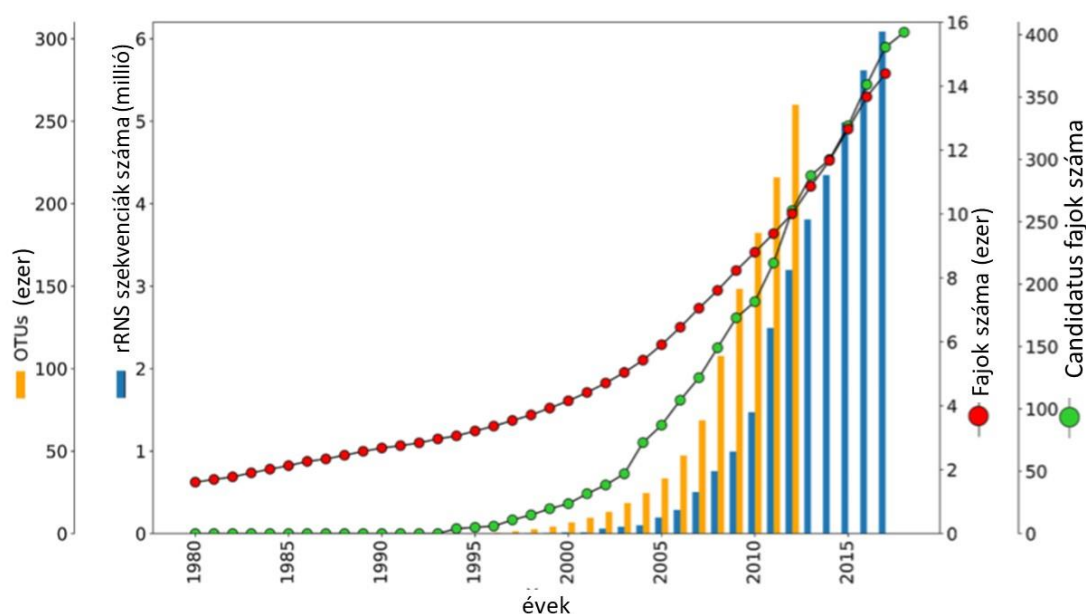
A 2011. decemberi validált baktérium lista a baktériumok számát 9184-re teszi, melynek több mint 50%-át a múlt század második felében írták le (Sutcliffe, 2012), és ez a szám folyamatosan növekszik: 2015-re a lista 2600 valid nemzetség nevet és 14800 fajnevet tartalmazott (Parte, 2018). 2017 májusára a lista 106 osztályt, 8 alosztályt, 188 rendet (egy közülük illegitim), 19 alrendet, 399 családot (6 közülük illegitim), 2854 nemzetséget és 15626 fajt tartalmazott.

A 10.a és b. ábrán ezt a folyamatot mutatja be Rosello-Mora és Whitman (2018) valamint Overmann és mtsai (2019): a fajok leírásának üteme a módszerek fejlődésével jelentősen felgyorsult. Jelenleg évente több, mint 1000 új prokarióta fajt írnak le.



10a. ábra Néhány adat az új baktérium taxonok leírásával kapcsolatban (Rosello-Mora és Whitmann, 2018 alapján). A) A nyilvános adatbázisokban elhelyezett 16S rRNS génszekvenciák számának alakulása (www.arb-silva.de). Piros jelzés: érvényes fajnévvel rendelkező új fajok; kék szín: ellenőrzött, jó minőségű szekvenciák.

B) Az egyetlen baktériumtörzs alapján készült taxonómiai leírások aránya (SSSD: single strain species descriptions) 2016 január és 2018 márciusa között. C) Az ugyanebben az időszakban leírt metabolizmus típusokat (heterotróf aerobok és fakultatív anaerobok, szigorúan anaerobok, tejsav baktériumok, D) Ugyanebben a periódusban azon publikációk száma, amelyek különböző phylumokkal foglalkoznak.



10.b. ábra Az rRNS szekvenciák (kék), a definiált OTUk (narancs), (SILVA REF 114), valamint az 1980-2017 szeptembere között leírt érvényes fajnevek (vörös) és Candidatus fajok (zöld) száma (Overmann, 2019).

3.2.4 Prokarióta taxonok jelenleg használt, általános vizsgálati módszerei

3.2.4.1 Morfológiai, fiziológiai és anyagcsere sajátosságok

Fény- és elektronmikroszkópos technikák alkalmazásával mind natív, mind festett készítményeken vizsgálható a baktériumok alakja, mérete, mozgása, spóráképzése. Differenciáló és szerkezeti festési eljárások során megfigyelhetők bizonyos sejtalkotók is. Az elektronmikroszkópos technikák sokkal jobb felbontásúak, így konkrét sejtalkotók (pl. sejtfal, citoplazma membrán, stb.) is vizsgálhatók.

3.2.4.2 Fiziológiai és ökológiai vizsgálatok

Ezen vizsgálatok során a baktériumok környezeti faktorokkal szembeni toleranciáját, optimumát vizsgáljuk (pH és sótolerancia vizsgálata, növekedési hőmérsékleti optimumok megkeresése, stb.), ennek keretein belül lehetőségünk nyílik az adott mikroba ökológiai toleranciájának feltárására, mely igen fontos tényező lehet fajleírások során. Ide tartozik az adott baktérium kapcsolatrendszereinek vizsgálata (patogenitás, mutualizmus, stb.).

3.2.4.3 Az anyagcsere vizsgálatok, gyorsdiagnosztikai eljárások

Ezen vizsgálatok közé tartoznak az energia hasznosítási mechanizmusok (fototrófia, kemotrófia) feltérképezése, elektron donorok és akceptorok felhasználásának tesztelése és a hagyományos biokémiai tesztek (pl. enzimaktivitás, polimerbontó képesség, szubsztrát hasznosítási vizsgálatok, stb.), ez utóbbiakra általában standard leírások alapján kerítünk sort. Megemlítendőek emellett az alkalmazott gyorsdiagnosztikai eljárások, pl. BIOLOG (95 különböző szénforrás egyidejű bakteriális oxidációjának vizsgálatára nyílik lehetőségünk), API (használatával szintén számos fenotípusos jellemző egyidejű vizsgálata lehetséges: különböző szubsztrátok bontása, enzimaktivitási vizsgálatok, stb). Számítógépes adatbázis felhasználásával mindkét rendszert baktériumok identifikációjára is alkalmazzák (elsősorban orvosi diagnosztikában).

3.2.4.4 Kemotaxonómiai vizsgálatok

A kemotaxonómiai vizsgálatok során az élőlények kémiai összetevőinek változatossága tanulmányozható, a bakteriális taxonok között diszkontinuus eloszlást mutató, úgynevezett kemotaxonómiai markerek analízisét végezzük el (valójában ezek is a fenotípusos bélyegek közé tartoznak). A marker vegyületek többsége a sejtet burkoló külső és belső membránban, a sejtfalban, illetve a glikokálixban helyezkedik el. Az analízisük során kapott adatokat legtöbbször más rendszertani módszer eredményeinek alátámasztásához használják, ugyanakkor előfordul, hogy főszerepet játszanak a baktériumok meghatározásában, azonosításában. Új taxonok leírásakor döntő szerep jut a vizsgált mikrobák kemotaxonómiai markereiben mutatott különbözőségeknek, bár a genomika előtérbe kerülésével ezen markerek vizsgálatának jelentősége is csökkent.

Citoplazma membrán zsírsavak analízisekor baktériumok citoplazma membránjának fontos összetevői a glicerinhez észter kötéssel kapcsolódó zsírsavakat tanulmányozzák, amelyek 14-20 (Archaeaknál akár 40) szénatomszámú vegyületei viszonylag egyszerű felépítésűek. A leggyakoribbak az egyenes láncok telített, egyszeresen telítetlen illetve egy metilcsoportot tartalmazó változatai. A szénlánc hossza, a metilcsoport elhelyezkedése (iso vagy anteiso elágazás), valamint a kettős kötés pozíciója taxonómiai jelentőséggel bír. A baktériumok foszfolipid-zsírsav összetétele nemzetségre jellemző tulajdonság, ezen belül a fajok a zsírsavak arányában térnek el, az azonos körülmények között tenyésztett baktériumtörzsek zsírsavprofiljuk alapján csoportosíthatók.

A légzési kinonok a légzési elektrontranszportláncban mint mobilis elektron- és protonszállító molekulák vesznek részt, valamint az oxidatív foszforilációban és valószínűleg az aktív transzport folyamatokban is szerepet játszhatnak. A baktériumok esetében kemotaxonómiai szempontból a menakinonoknak és ubikinonoknak van nagy jelentőségük, mivel a baktériumok ezen vegyületeket széles körben és nagy variabilitással termelik.

A **poláris lipidek** olyan molekulák heterogén csoportjait képviselik, melyekben a lipidhez kovalens kötéssel egy hidrofíli csoport kapcsolódik. Ezek a citoplazma membránok nélkülözhetetlen alkotói, valamint taxonómiai szempontból igen fontos vegyületek.

A bakteriális sejtfal összetevőinek vizsgálata. Az eubaktériumok mureinjének pontos összetétele taxonómiai szempontból igen fontos információ, legfontosabb talán a muraminsavról leelő oligopeptid láncok aminosav összetételének vizsgálata. Ha az adott láncban jelen lévő diaminosav két baktériumban nem egyezik meg, akkor azok bizonyosan különböző nemzetséghez tartoznak. Vizsgálják ezen kívül az egymáshoz kapcsolódó aminosavak sorrendjét, kapcsolódását (peptidoglikán A és B típus), mennyiségét valamint a sejtfal jellegzetes cukormolekuláit, bizonyos taxonoknál a mikolsav tartalmát.

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time off Flight-Mass Spectrometry): taxonómiai célokra leginkább az intakt-sejt elemzéseket alkalmazzák: a sejteket fém mikrolemezekre megfelelő mátrix-szal fedik le (pl. dihidro-benzoésav), majd lézerrel besugározzák. Ennek hatására a sejtfelszíni fehérje molekulák ionizálódnak, a vákuumtérbe kerülnek, azonosításuk az ionok repülési ideje alapján történik. A vizsgálat eredménye az adott baktériumra jellemző egyedi spektrum lesz, ma ennek már adatbázisai léteznek. A klinikai mikrobiológiában gyakran alkalmazott módszer a baktériumok azonosítására, hiszen meglévő eszköz esetén a módszer hihetetlenül olcsó és gyors.

3.2.4.5 Genetikai analízis

A **16S rRNS gén analízise.** Ma az ökológiai és szisztematikai vizsgálatokban a 16S rRNS-génnel foglalkoznak legintenzívebben, hiszen ez a molekula méretéből adódóan jóval több filogenetikai információt hordoz, mint az 5S rRNS géne és jól használható adatbázisok épültek rá, és több konzervatív szekvencia részletet tartalmaz, mint a 23S rRNS gén. Mellettük számos esetben van szükség egyéb gének vizsgálatára (pl. funkció gének), ezek az egyes csoportok esetén változnak.

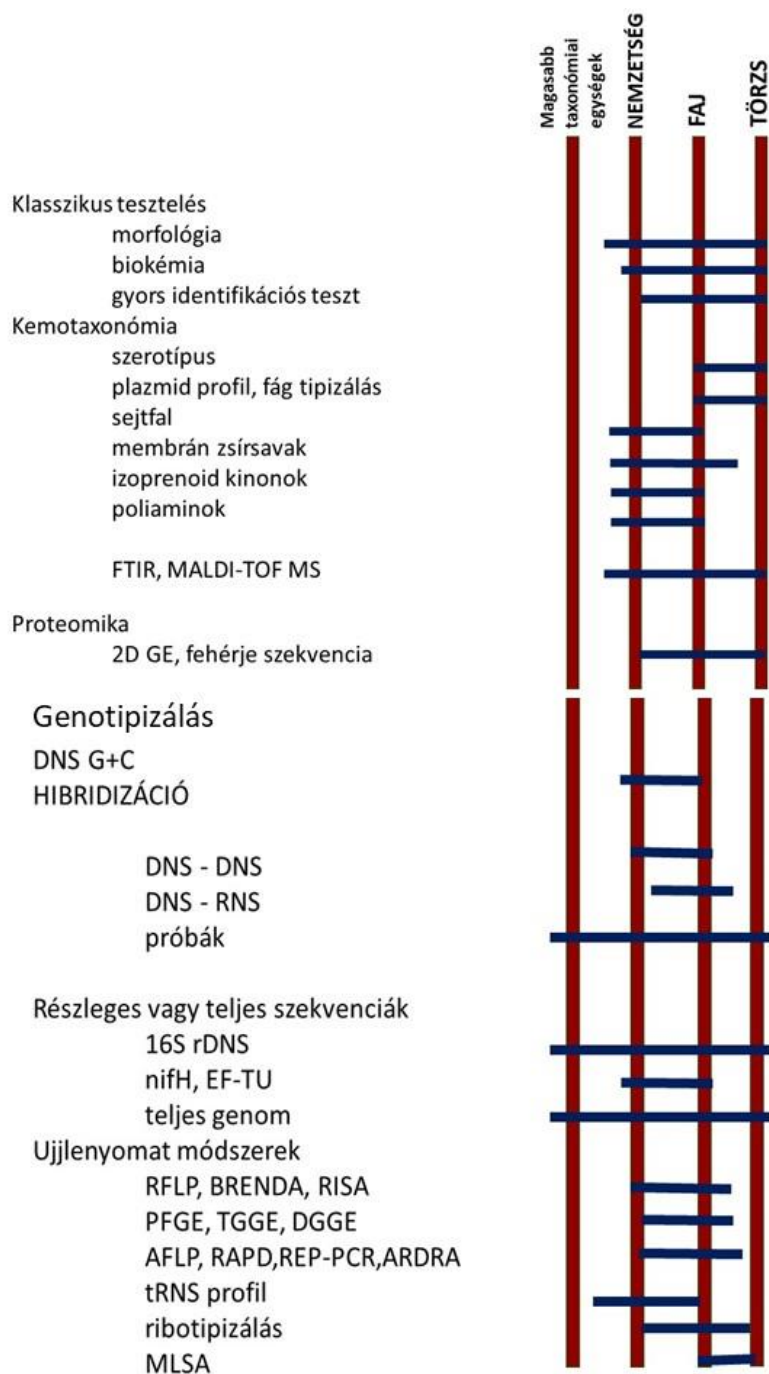
Taxonómiai szempontból fontos a **DNS G+C arány meghatározása** is. A baktériumok DNS-ében a G+C arány meghatározásával értékes adatokat kaphatunk, valamint lehetőségünk van arra is, hogy fenotípusosan hasonló mikroorganizmusokat elkülönítsünk egymástól. Ha két élőlény DNS-ének G+C tartalma több mint 10%-ban eltér, akkor genomjuk általában egész más bázisszekvenciával rendelkezik. Ugyanakkor két teljesen különböző élőlénynek is lehet ugyanakkora G+C aránya (más bázissorrend) (ma ezt az érték a baktérium teljes genomjának szekvenciájából határozzák meg).

Az utóbbi évtized(ek)ben használják a **ribotipizálás** módszerét, amely egy úgynevezett közvetett „ujjlenyomat” módszer. Az eljárás során a bakteriális DNS restrikciós enzimekkel történő hasítását követően a kapott fragmentumokat speciális próbával hibridizáltatják. A módszer faj alatti kategóriák elkülönítésére is alkalmas.

Taxonómiai „fajhatáron” lévő baktériumcsoportok pontosabb összetartozását hivatott vizsgálni a **DNS-DNS (RNS-RNS) hibridizáció** technikája. A nukleinsav-hibridizációs technikák alapja, hogy ha az egymástól pl. termálisan elválasztott két egyszálú DNS-t fokozatosan kb. 25°C-ra hűtik (T_M alá), a szálak a komplementer szekvenciáknál 2 szálú DNS-t képeznek, míg a nem komplementer szakaszok egyszálúak maradnak.

A **teljes genom szekvenálások** felhasználása a taxonómiában további érdekes eredményekhez vezetett: 2011 áprilisában 1604 Bacteria és 85 Archaea doménhez tartozó szervezet teljes genomiális szekvenciája volt elérhető (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) adatbázisból, rávilágítva az utóbbi években a szekvencia analízisek terén elért eredményekre. 2019 novemberében az EzbioCloud adatbázisában 146704 ellenőrzött genomiális szekvencia található, ezek közül 8492 a típusfajok típustörzseihez tartozik (Yoon és mtsai., 2017). A teljes genomok szekvenciájának ismeretében a DNS-DNS hibridizációs eljárások szinte feleslegesek, a genomból ráadásul számos gén jelenléte/hiánya megállapítható, szükség esetén két baktérium genomjából különböző hasonlósági értékek számolhatók, amik a fajhatárokat egyértelműen meghatározzák.

Az egyes módszerek felbontását a taxonómiai egységek között az 11. ábra szemlélteti.



11. ábra. Jelenleg használt módszerek és azok felbontása a prokarióta taxonómiában (Sackebrandt és Groebel 1994; Stackebrandt és Ebers, 2006; Richter és Rosello-Mora, 2009; Márialigeti, 2006 nyomán). (rövidítések: FTIR: Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia; MALDI TOF MS: Matriks-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria GE: gélelektroforézis; nifH: nitrógen fixáció génje; EF-TU: nem hőstabil elongációs faktor; RFLP: restrikciós fragment hossz polimorfizmus; RISA: riboszomális intergén spacer analízis; PFGE: pulzáló terű gél elektroforézis; TGGE: termális gradiens gél elektroforézis; AFLP: amplifikált fragmens hossz polimorfizmus; DGGE: denaturáló gradiens gél elektroforézis; RAPD: REP-PCR: repetitív polimeráz láncreakció; ARDRA: amplifikált riboszomális DNS restrikciós analízis; MLSA: multilókuszos szekvencia tipizálás)

3.2.5 Prokarióta taxonok leírásának módszertana és annak fejlődése 2010-től napjainkig

Még jelenleg is számos baktériumfaj leírása egyetlen kitenyészett törzs vizsgálatán alapul ('single isolate description'), amikor is az összes fenotípusos tulajdonság leírása egyetlen baktériumtörzs alapján történik, ami majdhogynem fölösleges, hiszen még adott fajon belül is számtalan geno/fenotípus létezhet. Tindall és Mtsai (2010) cikkükben megadják azon kulcsbélyegeket, amelyek vizsgálata elengedhetetlen új taxonok leírásánál, kiemelve, hogy leghelyesebb a fajleírást nem csupán egyetlen tenyésztésbe vont típus-törzs alapján megtenni. A taxonómiai leírások további őrülete, hogy gyakran megkövetelik a legközelebbi ismert rokonok ún. „side by side” analízisét - azaz nem lehet a már meglévő irodalmi adatok alapján elvégezni a szükséges összehasonlításokat, hanem azonos vizsgálatokban, a saját, újonnan leírásra kerülő taxonnal kell ezt megtenni. Így a fajleírás mára nem csak munka és időigényes, hanem igencsak költséges feladattá vált. Nem könnyíti meg a taxonómusok dolgát az sem, hogy a jelenleg elkészült „minimal standard” összefoglalók (azon összefoglalók, amelyek az egyes magasabb taxonómiai szinteken minimálisan megkövetelt vizsgálati eredményeket összegzik), mára inkább „maximal standard” követelményekkel állnak elő.

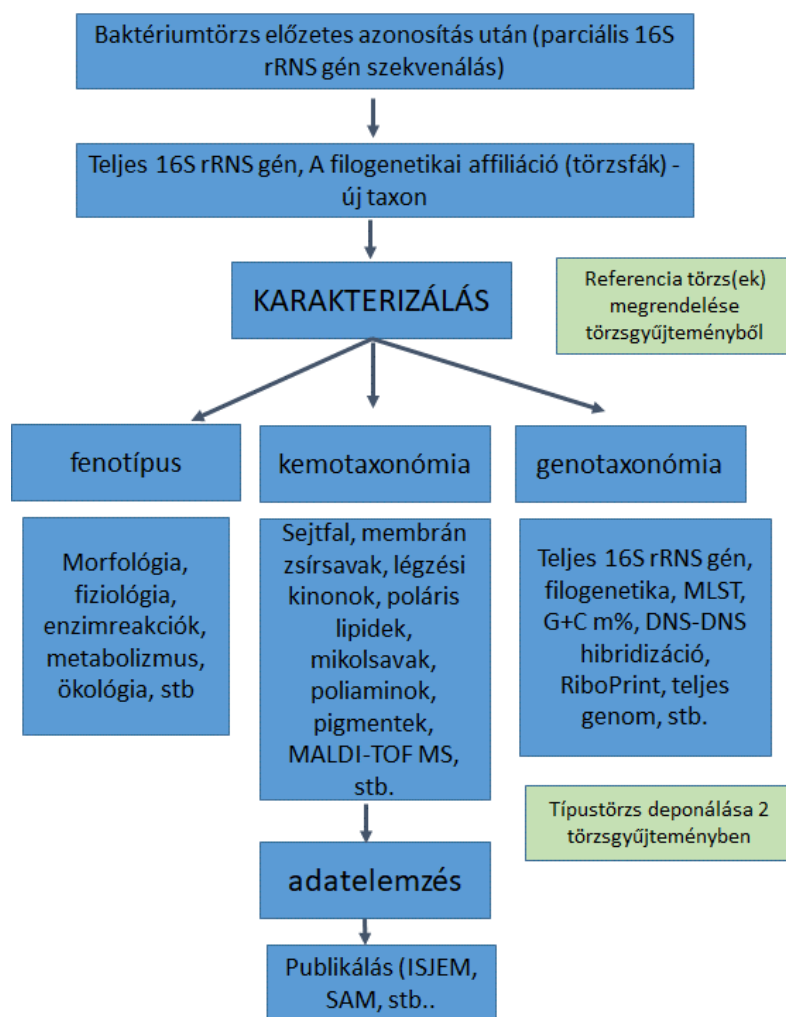
Az új baktérium taxonok leírása a korábban említett okok miatt nehézkes, többször nem volt egységes, így született meg 2012-ben egy összefoglaló cikk (Sutcliffe et al.), amelyben a szerzők megadják, milyen változtatások lennének szükségesek a taxonómiai leírások, ésszerűsítéséhez: egy baktériumtörzs leírásához szükséges karakterek számának minimalizálása elengedhetetlen.

- Minimál standardok elfogadása minden magasabb taxonómiai csoportra az International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) által.
- A kemotaxonómiai karakterek részletes vizsgálata, majd identifikációra való használata: ezek egy taxonon belül (azonos tenyésztési körülmények között) igen stabilak és ráadásul fenotípusosan jelenítenek meg egy-egy fontos biokémiai útvonalat (például lipid metabolizmus). Ezek alapján javasolják egy összefoglaló munka készítését egyes taxonok kemotaxonómiai tulajdonságaiból.
- A fajleírás az azt képviselő több törzs alapján történjen, csökkenjen az egyedül álló (single isolate) alapján elkészült fajleírások mennyisége (faj taxonómiai variabilitásának feltárása).
- Informatikai adatbázisok további fejlesztése.

- Fontos a szekvenálás megfizethetőbbé tétele, új generációs szekvenálások (NGS) felhasználása taxonómiai célokra is.
- Lehetőség szerint a teljes genom szekvenálása és összehasonlítása: a laterális gén transzfer illetve az adott taxon fiziológiai és biokémiai tulajdonságainak nyomon követésére. Ezzel a 16S rDNS szekvenciák elemzésétől a több szekvencián alapuló vizsgálatok irányába tolnak a vizsgálatok.
- Típus törzsön kívül típus genom definiálása egy fajon belül.
- 'mag genom' (olyan gének, amik különböző taxonokban is megvannak) és pan genom (az a genetikai állomány, ami egy adott taxon összes tagjában megtalálható) fogalmak alkalmazása.
- Multilokusz szekvencia tipizálás (MLST)
- Az 'in silico kemotaxonómia' megjelenése, ahol a genom szekvenciákból következtethetünk kemotaxonómiai markerekre.
- Új fajleíró cikk - minták megjelenése.

A 2010-ben megkövetelt fajleírási koncepciót foglalja össze Rainey és mtsai cikke (2011), 12.

ábra.

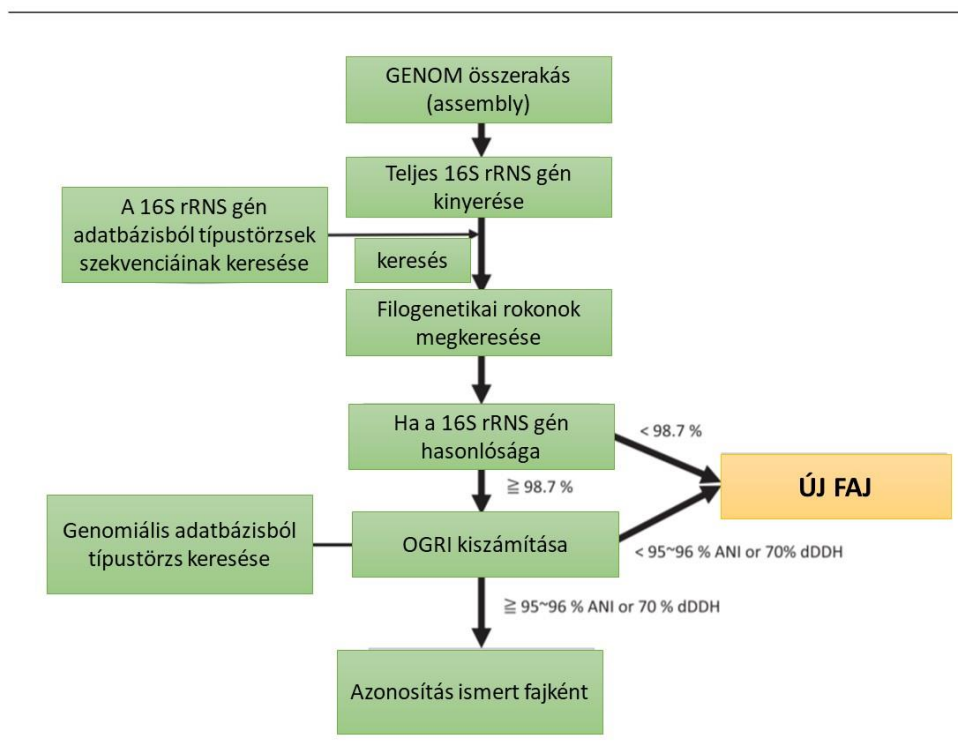


12. ábra Taxonómiai leírás folyamata (Rainey és Oren, 2011 alapján)

Ugyanakkor a DNS-szekvenálási technológia fejlődése lehetővé teszi a genomszekvenciák rutinszerű alkalmazását a mikrobiológia különféle területein, így a prokarióta taxonómiában is. 2018-ban a taxonómiai leírások esetén kötelezővé tették az adott baktérium teljes (nyers) genomjának alapvető szekvencia elemzését, Chun és mtsai (2018) megadják a genomszekvenciák felhasználásának minimumszabályait és hogyan kell ezt a taxonómiai leírásokba illeszteni, mik a kötelezően megadandó információk taxonómiai leírások esetén:

- Genom mérete: a kontigok számával definiálják (amennyiben a genom teljes szekvenciáját nem tudják meghatározni, akkor ez egy közelítő érték lesz).
- A kontigok száma és az N50: a genom összeillesztése során különböző hosszúságú kontigokat kapunk. Az analízisből a nagyon rövid szakaszokat kizárják (erre nincs egyértelmű szabály, pontosan mekkorákat) - így önmagában a kontigok száma nem megfelelő jelzőszám. Ezért használják az N50-t: ha a kontigokat legnagyobbtól a legkisebbig összeadják, az N50-t úgy definiálják, mint az a legrövidebb kontig, amelyeket összeadva a genom méretének legalább 50%-át adják.
- A lefedettség szekvenálási mélysége: szorzószámként adják meg, pl. 40,5X azt jelenti, hogy a végső összerakott szekvencia minden bázisát átlagosan 40,5-szer olvasták le. Elvileg minél több szekvenálási leolvasást generálunk, annál jobb a végső szekvencia minősége. (Illumina, Ion Torrent és Pacific Biosciences DNS szekvenáló platformokhoz 50x-t ajánlanak).
- A genomi DNS G+C aránya (mol%)
- A Sanger szekvenálással kapott 16S rRNS gént össze kell hasonlítani a teljes genomból kinyert ugyanezen génszakasszal - hogy a végső genom szekvenciájának illesztését ellenőrizzék.
- Új faj leírása esetén (ahol a két törzs 16S rRNS génjének szekvenciája 98,7% vagy a fölötti) az OGRI-értékeket minden közeli filogenetikai rokonságban lévő fajjal ki kell számítani (OGRI: Overall Genome Related Index).
- Filogenetikai fa szerkesztése.

Ezek alapján jelenleg a genomikai alapú taxonómiai leírási kötelezettséget az 13. ábra szemlélteti:



13. ábra. A genomikai alapú taxonómiai leírás jelenlegi módszertana. (Chun és mtsai., 2018 alapján)

Mindemellett a polifázikus taxonómiai módszerek alkalmazása ma még kötelező: amennyiben genetikai alapon az adott baktérium új taxonnak bizonyul, minden szempontból (fenotípusos genotípusos és filogenetikai szempontból) szükséges megismerni. A genomikai adatok minél részletesebb elemzése az egyéb karakterek részletes vizsgálatának számát esetenként lecsökkenti. Legalábbis így volt egészen 2019 őszéig....

Jövőkép.....

A 2016-os év közepén Whitman először veti fel, hogy egy prokarióta faj leírását nem kellene feltétlenül tenyészthető törzsekre alapozni, a típusörzs fogalmát módosítaná és véleménye szerint definiálni kellene egy „típus-anyag” fogalmat (amelyre legalkalmasabbnak a teljes genomot tartja). Ezzel, bár a Bakteriológiai Kódot is módosítani kellene, lehetővé válna az ún. „*Candidatus*” képviselők elnevezése is (Whitman és mtsai, 2019).

Ez hatalmas, máig tartó vitát eredményezett, amely vita eldöntését az ICSP EB (International Committee on Systematic of Prokaryotes, Executive Board) és IUMS (International Union of Microbiological Societies, <https://www.iums.org/index.php/regular-iums-members>) tagországok hivatalos delegátjainak (<https://www.the-icsp.org/icsp-members>) szavazásával 2020 második felére várhatjuk (magyarországi képviselő: dr Tóth Erika).

Pro és kontra érvek a „típus-anyag” fogalma kapcsán:

Tény, hogy a Földön élő prokarióták száma jelen tudásunk alapján nem megadható (Amann és Rosello-Mora, 2016) és hogy a Bacteria és Archaea domének érvényes fajnévvel rendelkező száma 2018-ig nem éri el a 15000-t (Parte, 2018) annak ellenére, hogy a legújabb genomikai kutatások akár milliós nagyságrendet is jósolnak (Konstantinidis és mtsai, 2017). Állításuk szerint a taxonómia hatalmas vesztesége, hogy a csak genetikai alapon ismert csoportok nem besorolhatóak, nem elnevezhetőek, mivel a mikroba törzsek nagy többsége jelenleg nem tenyésztethető. Tény az is, hogy a tenyésztett bakériumok leggyakrabban 4 nagy phylum képviselőiként kerülnek elő: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes és Bacterooidetes, legtöbbjük hagyományos táptalajokon fenntartható (Overmann és mtsai, 2019). Más részről, a leírt fajok mindössze 10%-a tehető maradék 29 phylumba és kb. 85 genetikai alapon leírt phylum egyetlen tenyésztethető képviselőt sem tartalmaz (Overmann és mtsai, 2017). Konstantinidis és mtsai standard-et is próbálnak megadni, hogyan kellene egy nem tenyésztethető taxont csak genomikai és élőhely-specifikus tulajdonságok alapján leírni. Véleményüket arra alapozzák, hogy elvileg minden faj diszkrét, monofiletikus csoportba tartozik és genomikai, valamint és fenotípusos szempontból is egy organizmus homogén populációja, amely más csoportoktól egyértelműen elkülöníthető. A szerzők véleménye szerint a metagenomikai, valamint az egysejt szekvenálásból nyerhető adatok legalább olyan stabilak, mint a baktériumtenyészeteken alapuló taxonómiai adatok. Publikációjuk szerint a nem tenyésztethető Bacteria és Archaea taxonokhoz az alábbi adatok megadása szükséges, hogy taxonként, érvényes névvel leírhatóak legyenek: a genomialis szekvencia magasabb, mint 80%-ban teljes legyen, kisebb, mint 5% kontaminációval; genetikai fajelhatárolás legközelebbi rokonától 95%-nél kisebb ANI értéket mutasson; 16S rRNS gén vagy háztartási géneje alapján filogenetikai fát kell szerkeszteni és ez is jó elkülönülést mutat; aminosav azonosság alapján azonos családhoz 45-65%, azonos nemzetséghez 65-95% és azonos fajhoz tartozónak 95-100%-os azonosság esetén sorolhatóak; 16S rRNS génjükben ugyanezek az értékek: 92-95%, 95-98,6% és magasabb, mint 98,6%; a bioinformatikai annotációt követően a metabolikus útvonalak leírása megtörténhessen legalább nemzetség szintjén; ökológiai tulajdonságai részben a metagenom analízisek során, részben az élőhely különböző mintáinak vizsgálata során kerüljenek leírásra; kísérletesen validálni lehessen a bioinformatikai eredményeket (pl. MAR-FISH, NanoSIMS, metatranszkriptomikai

elemzésekkel); mikroszkópos morfológiai leírást kell megadni és a genomikai adatokat a genom szekvenciájának deponálásával közzé kell tenni.

Bisgaard és munkatársai 2019-ben adnak hangot kétségeiknek azzal kapcsolatban, hogy a genomszekvenciát fogadjuk el, mint „típus-anyag”, különösen a klinikai izolátumok esetében látják problematikusnak a típusanyag fogalmát:

- gyakran az adatbázisokban lévő deponált szekvenciák nem megbízhatóak.
- amennyiben a lerakott DNS szekvencia egy másik (esetleg jobb minőségű) szekvenciával helyettesítődik, akkor ennek alapján a fajleírásokat magukat is módosítani szükséges.
- a genomok értékelése sok esetben korlátozott, számos funkció nem ismert vagy nem kapcsolható szekvenciákhoz.
- a genetikai adatok nem mindig korrelálnak a génexpresszióval - így egy genom szekvencia nem ad mindenre kérdésre választ, az adott mikroba metabolikus képességeit illetően.
- ha a genomot akarjuk típus-anyagként definiálni, hogyan dönthető el, mi az a minimum kritérium, amellyel egy új taxon már definiálható.

Overmann és mtsai szintén 2019-ben hangot adnak kétségeiknek a fenotípusos információk elvesztése kapcsán, amennyiben a taxonómiai leírások a későbbiekben nem tenyészthető baktériumtörzseken alapulnak, hanem csak genomiális információkon:

- egyre nagyobb lesz a rés a valóban leírt taxonok és a valid névvel rendelkező taxonok között és egy második, a Prokarióta Kód-tól független nevezéktani rendszer sem képes feloldani ezt a problémát.
- A nem tenyészthető prokarióták érvényesen publikált nevei a mikrobiális diverzitás megértéséhez akkor járulhatnak hozzá, ha megfelelő morfológiai, metabolikus és ökológiai jellemvonásokhoz kapcsolhatók.
- A nem tenyészthető mikroorganizmusok leírását ezért nem csupán abundanciaviszonyaik és specifikus élőhelyeik alapján kellene megadni, hanem learni azok kulcsfontosságú fenotípusos bélyegeit is.
- A „*Candidatus*”-ok leírásával a nevek prioritását biztosítani lehet.

A vita odáig fajult, hogy 2020-ban Rosello-Mora és mtsai cikk formájában válaszoltak a kutatóknak és törzsgyűjteményben egyéb dolgozó kollégákban felmerült kérdésekre és azt a következtetést vonják le, hogy a típus-genom fogalmának bevezetése a taxonómiai munkát mindenképpen előreviszi, és ennek segítségével inkább nyerjünk betekintést a mikrobiális világba, mint csupán a tenyészthető kisebbség megismerésével.

Jelen pillanatban nem tudni, ez a vita hová vezet, véleményem szerint hatalmas a veszélye annak, ha csupán genetikai információk alapján kíséreljük meg a baktérium taxonok leírását: kizárólag genomi adatok alapján leírni egy baktériumtaxont nem vezet megoldáshoz, hiszen a szekvencia adatok nem tudnak minden kérdésre választ adni, bizonyos anyagcsere folyamatokra és metabolikus képességekre csak erőteljes túlzásokkal lehet megfeleltetéseket keresni benne, azaz esetenként erősen feltételezéseken alapulnak. Kétségbe vonható az adatbázisokban elhelyezett szekvenciák minősége is. Ráadásul véleményem szerint a financiálisan jobban ellátott kutatócsoportok ráugranak e lehetőségre és ez esetben a taxonómia, mint olyan a bioinformatika egy ágává redukálódik mindössze....

A diverzitás elemző módszereket és jelentőségüket a későbbiekben az Anyag és módszer fejezet keretein belül ismertetem, a teljesség igénye nélkül, csak azon módszereket, amelyek kutatásaink alapjául szolgáltak.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

A közösség elemző módszereket nem lehet teljesen elválasztani természetesen a taxonómiai módszerektől, hiszen számos átfedést találhatunk, azonban a dolgozatban az egyes kutatásoknál az adott módszerekre mindig az adott kísérlet sor szempontjából fókuszálunk.

4.1 KÖRNYEZETMIKROBIOLÓGIAI/KÖRNYEZET DIAGNOSZTIKAI VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ÉS ELEMZÉSEK

4.1.1 Tenyésztéses módszerek

Fontos megjegyezni, hogy a molekuláris technikák és tenyésztéstől független módszerek alkalmazásával nyilvánvalóvá vált, hogy a prokarióták jelentős hányada nem tenyészthető, hagyományos tenyésztéses technikákkal környezettől függően a baktérium-populációk kb. 0,001-10 %-a vonható tenyésztésbe, sokszor annak ellenére, hogy életképesek (Amann és mtsai, 1995). A VBNC (viable but noncultivable) állapot több okból is létrejöhet taxontól és körülményektől is függően: indukálhatja számos környezeti ok (pl. a baktériumok az életciklusuk nyugalmi szakaszát nem tudják megszakítani, vagy valamely környezeti stressztényező hatására - extrém hőmérséklet, pH, sókoncentráció, alacsony tápanyagkoncentráció, reaktív gyökök, stb.), de előfordulhat, hogy az adott baktérium csak szintróf partner jelenlétében képes szaporodni.

Ezért mi munkánk során többféle tenyésztéses módszert alkalmaztunk és dolgoztunk ki, hogy a tenyészthető diverzitást mindinkább feltárjuk.

4.1.1.1 „Hagyományos” tenyésztés

Az eljárás során az adott mintát a klasszikus mikrobiológiai szabályoknak megfelelően dolgoztuk fel: mintatípustól függően hígítási sort készítünk belőle és a hígítási tagokat Petri csészére szélesztettük a munka szempontjából elfogadott táptalajon, majd szükség esetén a lemezek felületéről baktérium kolóniákat izoláltunk, amelyeket tisztítottunk és meghatároztuk. Ezen módszerrel egy minta tenyészthető csíraszama is meghatározható (TKE=telepképző egység/mL vagy g) az adott táptalaj függvényében. Ha a minta előzetes becslések szerint nagyon alacsony baktériumszámmal jellemezhető, akkor az adott esetben dúsítható.

4.1.1.2 „Egyszerű” dúsítás

Ezen folyamat során már az egyszerű filterre történő szűréssel is feldúsíthatjuk a vízmintánkban lévő baktériumok mennyiségét, a filter megfelelő táptalajra helyezésével a baktériumok egy része kitenyészthető, a szűrőről visszanyerhető, TKE száma meghatározható.

Vízminták esetén a dúsítás úgy is elérhető, hogy az adott minta egy kiválasztott mennyiségét (ultratiszta vizeknél 50 mL-rel dolgoztunk) táplevesbe oltjuk (R2A – DSM 830 - illetve 10%-os R2A tápleveseket használtunk) és azt a kívánt körülmények között (optimális hőmérséklet, rázatás/kevertetés) egy időintervallumig (néhány naptól 3 hétig) inkubációt végzünk. Ezután az eljárás hasonló a korábban leírtakhoz, de ezen esetekben a dúsítás már nem teszi lehetővé a minta csíraszámának becslését, hiszen az általunk előnyhöz juttatott szervezetek mennyisége megenővekszik.

4.1.1.3 Pur-habos dúsítás

Alacsony tápanyag koncentrációjú környezetekből történő tenyésztések esetén próbálták ki, hogy a mintában lévő baktériumokat hordozóhoz kötik (Yasumoto-Hirose és mtsai., 2005). Vizsgálataink során ezt a módszert fejlesztettük tovább tiszta vizekből történő bizonyos tenyésztésekhez. Ekkor poliuretán hab-kockákat (PUF) agart tartalmazó táptalajjal vontunk be és ezeket az agarkockákat inkubáltuk néhány naptól 3 hétig a mintákkal együtt (3. kép). Ezután a táptalajjal fedett PUF kockákat homogenizáltuk, hígítottuk és a korábbiaknak megfelelően táptalajra szélesztettük, ahonnan különálló kolóniák visszanyerése lehetségessé vált.



3.kép. Dúsítás poliuretán kockák segítségével. Fotó: Szuróczki Sára

4.1.2 Tenyésztéstől független módszerek

4.1.2.1 Minták mikroszkópos sejtszámának meghatározása

A mikroszkópos sejtszám meghatározásához a vízmintákat (tiszta vizek esetén 100-400 ml) 2%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, majd leszűrtük (0,45 µm, Sartorius). A filtert 1 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festékoldattal festettük Máthé és mtsai alapján (2014). A mintákat epifluoreszcens mikroszkóppal (Nikon 80i) vizsgáltuk és ImageProPlus, később a Nis(elements) programcsomag segítségével értékeltük.

4.1.2.2 Baktériumközösségek elektronmikroszkópos vizsgálata

Mintáinkat Makk és Ács (1996) liofilizációs módszerét követve preparáltuk és a preparátumokat HITACHI S-2600N elektronmikroszkóppal elemeztük.

4.1.2.3 T-RFLP vizsgálatok

Tenyésztéstől független terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálat során a jelölt, felszaporított 16S rDNS szekvenciát restrikciós enzimmel/enzimekkel hasítjuk. A hasítási mintázatot egy, már előre elkészített klónkönyvtárban lévő baktériumok hasítási mintázataival összevetve nagy valószínűséggel azonosítani tudjuk a mintáinkban lévő csúcsokat. Ehhez tiszta vizek (ivóvíz, ultratiszta víz) esetén vízmintánként 5-11 liter mennyiséget (mintatípustól függően) 0,45 µm pórusméretű membránszűrőn (Sartorius) szűrtünk, a szűrőről Ultra Water Clean DNA Kit (MOBIO) segítségével közvetlenül DNS-t izoláltunk, majd a mintából 16S rDNS specifikus PCR reakciót végeztünk (27F-TET és 519R primerpár). A terméket ezután AluI restrikciós enzimmel 37°C-on 3 órán keresztül emésztettük. A fragmentelemzést ABI Prism™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer) berendezéssel végeztük. Eredményeinket a GeneScan programcsomag segítségével értékeltük (Homonnay és mtsai., 2008; Bohus és mtsai., 2010; Homonnay és mtsai., 2014). A kapott T-RFLP profilokból a minták diverzitását a különböző hosszúságú fragmentek számából és egymáshoz viszonyított területarányából számoltuk. Ehhez a Shannon-Weaver-féle diverzitásindexet alkalmaztuk: $H = - \sum p_i \ln p_i$, ahol p_i az i -edik fragment mennyiségének százalékos aránya a mintán belül, n a mintában lévő fragmentek száma.

4.1.2.4 DGGE vizsgálatok

A DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis) egy poliakrilamid gélelektroforézisen alapuló szeparációs módszer. Denaturálószeres lineáris gradiensét tartalmazó poliakrilamid (PAA) gélben a duplaszálú DNS (dsDNS) szakaszok növekvő koncentrációjú denaturáló közegben vándorolnak. A DGGE-hez használt templát DNS-t PCR segítségével, speciális primerekkel szaporítjuk fel: a primerek egyike az 5' végén egy 30-50 bázispár hosszúságú úgynevezett GC-gazdag régiót, „GC-kapcsot” (GC-clamp) tartalmaz, amely megakadályozza, hogy a szálak teljesen elváljanak egymástól (Muyzer és Smalla, 1998).

DGGE vizsgálataink során az adott vízmintát steril, 0,45 µm pórusátmérőjű szűrőn leszűrtük, a filterekről a teljes DNS-t Ultra Clean Water DNA Kit (MoBio Laboratories, Qiagen Carlsbad, USA) segítségével izoláltuk. A közel teljes 16S rRNS-t kódoló szakaszt 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') és 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primerpárral szaporítottuk fel, GeneAmp PCR System 2700 machine (Applied Biosystems, USA) alkalmazásával. A PCR reakciót Nikolausz és mtsai (2004) alapján végeztük GeneAmp PCR System 2700 machine (Applied Biosystems) készülékben. Ezt egy második (nested) PCR követte 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') és 319R (5' TGC TCA TGG TGC ACG GTC TA 3' GC kapoccsal) belső primerekkel. A poliakrilamid gél összetételét, a denaturálószeres gradiensének leírását, és a futtatási kondíciókat Felföldi és mtsai (2009) publikációja tartalmazza.

4.1.2.5 Klónkönyvtárak létrehozása

A kivont közösségi DNS-ből a bakteriális 16S rRNS gén kezdeti szakaszát 27f és 519r primerek alkalmazásával polimeráz-lánreakcióban amplifikáltuk, ennek termékéből pGEM-T Easy Vector Cloning Vector System (Promega) alkalmazásával klónkönyvtárat hoztunk létre, az inszertált szekvenciákat M13 specifikus primerpár, majd TET-27f és 519r primerek alkalmazásával két lépésben amplifikáltuk. A klónokat AluI, BsuRI restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, és az előzőekben ismertetett módon T-RFLP elemzéssel csoportosítottuk. Azokat a klónokat, amelyek terminális fragmenthossza mindkét enzimmel azonos volt, egy csoportba soroltuk. A csoportreprezentánsok 16S rDNS-ének pontos nukleotid-sorrendjét meghatároztuk (Homonnay és mtsai., 2008) és ez alapján faji szinten

azonosítottuk azokat, így az egyes terminális fragmenthosszokhoz filogenetikai információt tudtunk rendelni.

4.1.2.6 Közösségi kemotaxonómiai vizsgálatok

Az élőlényközösségek kemotaxonómiai vizsgálata során a közösségalkotó fajok különböző szerkezetű kémiai anyagainak taxonspecifikus variabilitását tárjuk fel, és használjuk ki, mint információt. A vizsgált sejtalkotók extrakcióját követően amplifikáció nélkül kerülnek vizsgálatra, ezért pontos mennyiségi információt is hordoznak a bióta összetételét illetően. Leképezik azt a diverzitást, melyet a molekulavariánsok száma tükrözni képes. Ily módon hasznos kiegészítői a molekuláris vizsgálatoknak. Munkánk során a légzési kinonokat és sejtmembrán zsírsavakat vizsgáltunk (a módszer optimalizálását mi végeztük el Magyarországon először, ezért erről részletesebben kívánok itt írni).

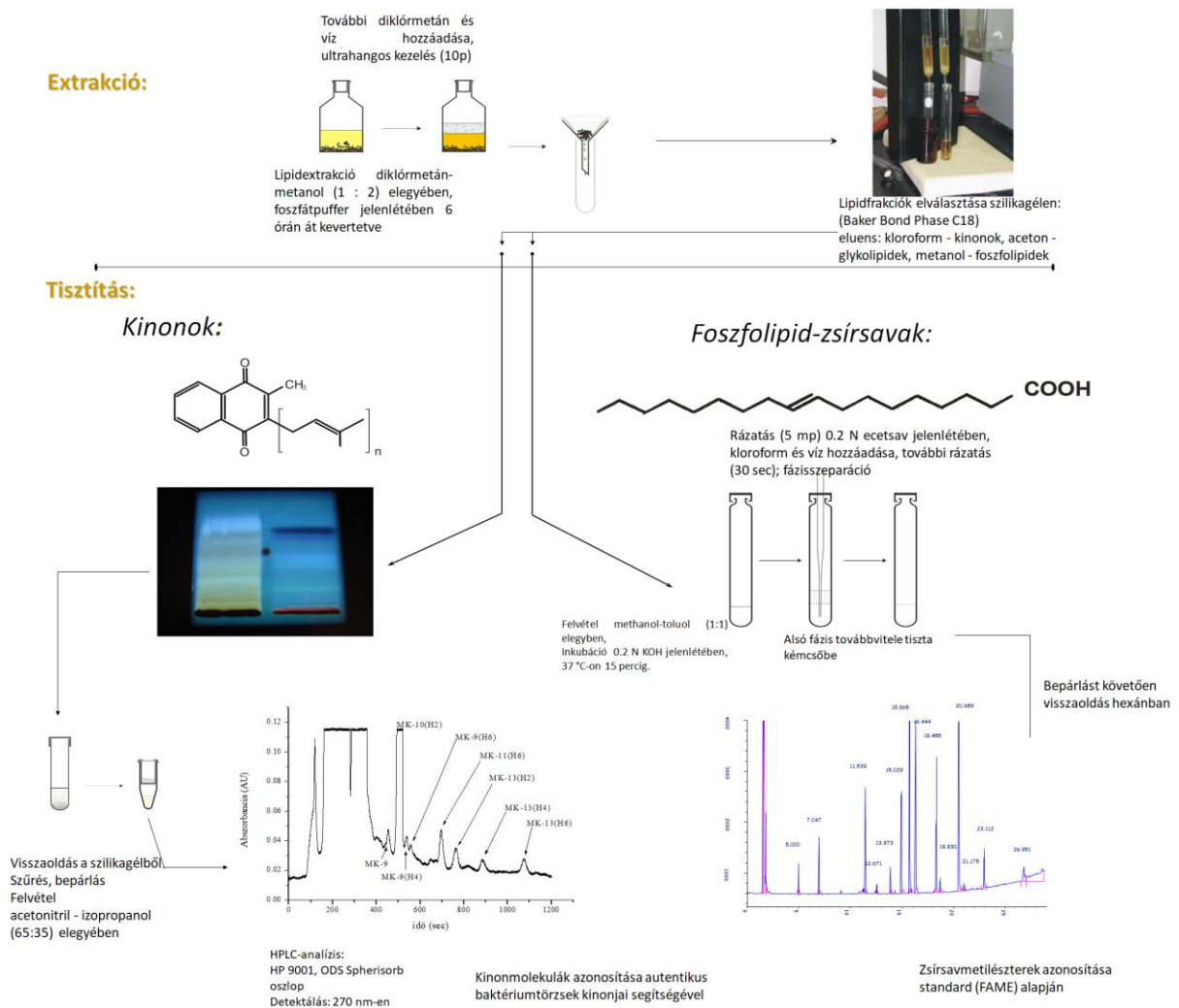
Az általunk vizsgált légzési kinonok membránkapcsolt elektron-transzportláncokban proton és elektronszállítást végző redoxivegyületek, melyek tartalmaznak egy változó hosszúságú és telítettségű poliizoprén láncot. A baktériumok között két kinontípus terjedt el széles körben: az ubikinonok és a menakinonok. Adott típusú, lánchosszúságú és lánctelítettségű kinon termelése egy adott nemzetségbe tartozó baktériumokra jellemző tulajdonság, ugyanakkor több nemzetség is termelhet megegyező kinonmolekulát (ez a módszer egyik korlátját jelenti). Mivel azonban nem minden baktériumcsoport termel kinonokat – köztük a metanogén Archaea-k sem, ezzel a módszerrel csak a közösség egy szelete, a légző szervezetek csoportja vizsgálható. Ugyanakkor ezen elemzések az adott baktériumcsoportok aktivitását is tükrözik, hiszen csak az aktívan légző szervezetek termelnek olyan mennyiségű kinonmolekulát, amely egy környezeti mintából már kémiai módszerrel kimutatható.

A másik molekulacsoport, amely hasznos információkat hordoz ilyen szempontból a membránok foszfolipidjeinek zsírsav-komponensei: metil-észterekké való derivatizálásukat követően gázkromatográffal vizsgálhatók. A foszfolipidek minden élő szervezetben jelen vannak, biomarkerekként való felhasználásukat nagyfokú, esetenként taxonspecifikus variabilitásuk teszi lehetővé (2. táblázat).

Jelölés	Elnevezés	Előfordulás, indikációs lehetőség
PLFA	foszfolipid zsírsavak	biomassza
SATFA - i, a, Me- -cy	telített, észterkötésű zsírsavak egyenesláncú elágazó láncú ciklopropil	Bacteria, Eucaria Bacteria, Eucaria Gram-pozitív baktériumok; szulfátredukálók, <i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> Gram-negatívok, <i>Clostridium</i> , <i>Bifidobacterium</i>
MUFA 16:1ω6 18:1ω6	egyszeresen telítetlen észterkötésű zsírsavak 16-os láncossz, 1 kettős kötés a láncvégtől 6. helyen 18-as láncossz, 1 kettős kötés a láncvégtől 6. helyen 15-ös, 17-es láncossz	I-es típusú metanotrófok II-es típusú metanotrófok Szulfátrdukálók is
PUFA	többszörösen telítetlen észterkötésű zsírsavak	Eukarya, cianobaktériumok
PLOH α β ω myl	észterkötésű, hidroxiszubsztituált zsírsavak -OH a karboxilcsoport melletti 1.szénatomon -OH a karboxilcsoport melletti 2.szénatomon -OH a karboxilcsoportot követő utolsó szénatomon mikolsavak (β-hidroxi, α-elágazás)	Gram-negatívok, Actinobacteria <i>Mycobacterium</i> Gombák Actinobacteria
UNOH α β myl	nem észterkötésű, hidroxiszubsztituált zss.-ak. -OH a karboxilcsoport melletti 1.szénatomon -OH a karboxilcsoport melletti 2.szénatomon mikolsavak (β-hidroxi, α-elágazás)	Anaerob baktériumok <i>Sphingomonas</i> , <i>Candida</i> <i>Bacteroides</i> , <i>Flavobacterium</i> <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i>

2. táblázat. A taxonómiai szempontból informatív zsírsavtípusok, jelöléseik, és az általuk jelzett szervezetek vázlatos áttekintése Halbritter és Mogyoróssy (2002) alapján

Közösségi vizsgálatokhoz a kemotaxonómiai markerekként használt molekulák kivonása közösen indul, a mintát diklórmetán:metanol elegyében kevertetve egy éjen át. A törmelék leszűrése után a lipidfrakciók elválasztása oszlopkromatográfiával történik (Spherisorb), kloroformmal a kinonok, acetonnal a glikolipidek, metanollal a foszfolipidek moshatók le az oszlopról. Ezután a kinonmolekulákat tartalmazó frakció további tisztítása szükséges, amelyet vékonyréteg kromatográfia vagy szintén oszlopkromatográfia segítségével valósítunk meg. A rétegről/oszlopról a tisztított frakció elemzése reverz fázisú HPLC segítségével valósítható meg, standardként kereskedelmi forgalomban kapható MK7 (K₂ vitamin) és Q-10 molekulák szolgálnak. A zsírsavak meghatározásához a molekulák zsírsav metilésztereit szükséges előállítani, majd meghatározásuk gázkromatográfiával FAME (Fatty Acid Methyl Ester) vagy BAME (Bacterial Methyl Ester) standardek segítségével valósítható meg. A közösségi kemotaxonómiai markerek kivonásának és meghatározásának folyamatát az 14. ábra szemlélteti.



14. ábra. A légzési kinonok és membránzsírsavak preparálása és meghatározása közösségi vizsgálatok során (Tauber és mtsai, 2013 nyomán)

4.2 TAXONÓMIAI LEÍRÁSOK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

4.2.1 Baktériumtörzsek tenyésztése

A baktériumok tenyésztéséhez eleinte mindig azt a táptalajt használtuk, amelyen először kitenyésztettük őket (izoláló táptalaj), később ez változhatott a további vizsgálatok függvényében. Az egyes vizsgálatoknál mindig megadjuk a tenyésztő közeget és a tenyésztés körülményeit.

4.2.2 Morfológiai vizsgálatok

A baktériumtörzsek kolónia morfológiáját a fenntartó táptalajo(k)on tanulmányoztuk, minden esetben (vizsgálatoknál megadtuk) az egyedi kolóniák vizuális értékelését követően. A sejtek alakját, méretét részben natív preparátumokban részben Gram-festett (Claus, 1992)

preparátumokon vizsgáltuk. A sejtek csillózatát transzmissziós electronmikroszkóp segítségével (TEM) határoztuk meg Tóth és mtsai (2017) alapján, néhány esetben árnyékolást alkalmazva Ohad és mtsai (1963) szerint.

4.2.3 Ökológiai és fiziológiai tolerancia vizsgálata

A baktériumtörzsek növekedését anaerob körülmények között fenntartó táptalajukra való leoltást követően anaerob rendszerben teszteltük (FormaScientific), hőmérsékleti toleranciájukat és optimumukat szintén fenntartó táptalajukra történő leoltást követően 4, 10, 20, 25, 28, 30, 37, 45, 50°C néztük, ahol erre szükség volt, finomabb léptékeket is alkalmaztunk. pH toleranciájukat és optimumukat fenntartó táplevesekben vizsgáltuk, általában pH 4-11 között, szükség esetén tágabb intervallumokban (pH beállítását HCl és NaOH oldattal végeztük, néhány esetben foszfátpufferrel állítottuk be). Sótoleranciájukat ugyanezen levesekben a sókoncentráció 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10w/v% beállításával állapítottuk meg.

4.2.4 Hagyományos biokémiai tesztek

Oxidáz aktivitást Tarrand és Gröschel (1982) alapján, kataláz aktivitást és Voges-Proskauer reakciót és különböző szénforrások hasznosítását egyedüli szénforrásként Cowan és Steel (1974) alapján, glükózból oxidatív és fermentatív körülmények között történő savképzést Hugh és Leifson (1953) alapján teszteltük. Ureáz aktivitás, nitrát redukcióját, keményítő hidrolízist, triptofánból történő indolképzést, kazeáz, zselatináz és foszfátáz aktivitást, TWEEN hidrolízist és ciszteinből történő H₂S produkciót Smibert és Krieg (1994) szerint vizsgáltuk.

4.2.5 Gyorsdiagnosztikai eljárások

A gyors identifikációs módszerek lehetővé teszik, hogy rövid idő alatt a baktériumok tiszta tenyészetének vizsgálatával elvégezzük azok tesztelését, megfelelő adatbázisok esetén azok identifikációját.

API 50CH (50 különböző szénforrás hasznosításának vizsgálatára), **API 20NE** (a nonenterális baktériumok meghatározására), **API E** (az enterális baktériumok meghatározására) és **API ZYM** (enzimatis aktivitások tesztelésére) tesztek minden esetben a gyártó által megadott protokoll szerint végeztük (bioMérieux).

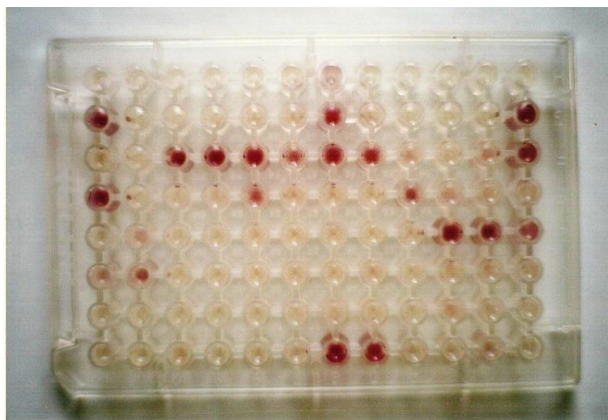
Egy API 50CH teszteredményt az 4. kép mutat be.



Pseudorhodobacter psychrotolerans JCM 30764

4. kép. *Pseudorhodobacter psychrotolerans* JCM 30764 törzsének API 50CH eredménye (savképzés detektálása különböző szénforrásokból). Fotó: Buni Dominika

A Biolog rendszer 95 különböző szénforrás egyidejű bakteriális oxidációjának vizsgálatán alapul (5. kép). A teszt eredménye az adott mikroorganizmus egyfajta "anyagcsere ujjlenyomata", amely alapján adatbázis segítségével az adott szervezet azonosítható. A tesztek itt is minden esetben a gyártó által megadott protokoll szerint végeztük (Biolog Inc).



5. kép. S5^T jelzésű baktérium Biolog profilja. Fotó: Tóth Erika

4.2.6 Kemotaxonómiai vizsgálatok

(megjegyzés: a kemotaxonómiai vizsgálatok jelentős részét a DSMZ - német törzsgyűjtemény – munkatársa, Dr. Peter Schumann végezte tudományos kooperációban.)

4.2.6.1 Baktériumok citoplazma membránjának zsírsav elemzése

A sejtek membránzsírsavait TSBA táptalajon vagy az adott baktérium fenntartó táptalaján nevelt, fiatal baktériumtenyészetekből nyertük ki (megjegyzés: a táptalaj semiféle zsírt vagy

glicerint nem tartalmazhat, valamint standard tenyészhőmérsékletet kell alkalmazni – a citoplazma membrán zsírsavösszetétele ezzel összefüggésben változhat, a hőmérséklet alapvetően befolyásolja a membrán fluiditását). Zsírsav metilésztereket nedves tenyészetekből Stead és mtsai (1992) alapján állítottuk elő, MIDI (4.10; Sherlock software package, version 6.1) rendszerrel összekapcsolt Agilent 6850 kromatográf segítségével analizáltuk, a “Summed feature” komponenseket GC/MS 320 készülék segítségével azonosítottuk (Varian).

4.2.6.2 Baktériumok légzési kinonjainak vizsgálata

Ezen vizsgálat a sejtek fenntartó táptalajukon tenyésztett, logaritmusos fázisban lévő, liofilizált biomasszájából előállított preparátumokból indul: a kinonokat Collins és mtsai (1977) alapján preparáltuk, és a kinonmolekulákat HPLC (Shimadzu LC 20A)-vel összekötött elektron-impakt tömegspektrométerrel Groth és mtsai (1997) alapján azonosítottuk, standardként azonos körülmények között tenyésztett és preparált, autentikus baktériumtörzsekből kinyert kinonokat, valamint MK-7 (Sigma) és Q-10 (Sigma) molekulákat.

4.2.6.3 Baktériumok poláris lipidjeinek analízise

A baktériumok poláris lipidjeit Minnikin és mtsai (1979) alapján határoztuk meg két-dimenziós vékonyréteg kromatográfia segítségével. A foltok azonosításához ninhidrin, Zinzadze reagenseket és molibdo-foszforssavval használtunk (Embley és Wait, 1994).

4.2.6.4 Baktériumok sejtfalának tipizálása

A baktériumok sejtfalának fő diaminosavát a sejtek teljes sejt lizátumából határoztuk meg Hasegawa és mtsai (1983) alapján.

Szükség esetén a baktérium sejtfal peptidoglikánját Schumann (2011) szerint izoláltuk és meghatároztuk.

4.2.6.5 Teljes-sejt MALDI-TOF MS vizsgálat

A baktériumok MALDI-TOF MS vizsgálatát a Brüker Daltonics etanol/hangyasav protokollja alapján hajtottuk végre (<http://clinprot.bdal.de>).

A vizsgálatot lézerrel felszerelt Microflex L20 spektrométerrel (Brüker Daltonics) végeztük, minden spektrumot lineáris, pozitív ion-módban rögzítettünk. A gyorsulási feszültség 2 kV volt, az elemzéshez 2000-20 000 m/z tömegtartományt használtunk (Tóth és mtsai., 2008).

4.2.7 Genetikai vizsgálatok

4.2.7.1 Baktériumtörzsek 16S rRNS génjének bázis sorrend elemzése

A baktériumtörzsek DNS-ét és 16S rRNS génjét Tóth és mtsai (2012) alapján izoláltuk és szaporítottuk fel az alábbi primerek alkalmazásával: 27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3'), 519F (5'- CAG CAG CCG CGG TAA TAC -3') és 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T- 3'). A PCR termékek tisztítása és szekvenálása az LGC Genomics GmbH-nál (Berlin, Germany) történt. (megjegyzés: 2007 előtti bázissorrend meghatározás módszerét ld. Tóth és mtsai 2001).

A kapott 16S rRNS gén szekvenciákat a GenBank adatbázisában lévő szekvenciákhoz illesztettük (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) BLAST keresést követően, a SILVA projekt algoritmusát (Quast és mtsai, 2013) követve, valamint az EzTaxon (később EzBioCloud) szerverét használva (Yoon és mtsai, 2017). A filogenetikai analízist a MEGA 7.0 (Kumar és mtsai, 2016) végeztük Tóth és mtsai (2014) alapján. (korábban: a filogenetikailag legközelebbi rokonokat szintén a BLAST-on keresztül tettük Altschul és mtsai, 1997 alapján, FASTA programmal (Pearson és Lipmann, 1988) és az EzTaxon 2.1 verziójának (Chun és mtsai, 2007) használtuk).

4.2.7.2 Baktériumtörzsek G+C arányának meghatározása

Mielőtt teljes genom szekvenálását kötelezővé tették volna, a genomi DNS G+C arányát a következő módon határoztuk meg: a sejteket French press (Thermo Spectronic) készülékkel feltártuk, DNS-üket ezt követően Cashion és mtsai (1977) módszerét követve hidroxipatiton tisztítottuk, majd a DNS-t P1 nukleázzal és alkalikus foszfáttal hasítottuk Meshbah és mtsai (1989) szerint. A nukleozidokat reverz fázisú HPLC (Shimadzu LC 20A) segítségével választottuk szét Tamaoka és Komagata (1984) módszere szerint. A G+C tartalmat a deoxiguanozin tiaminhoz való arányából számoltuk ki publikált genomszekvenciák DNS-eit standardként használva. 2018-tól a baktériumok DNS G+C arányát teljes genomjukból határoztuk meg.

4.2.7.3 Baktériumtörzsek közötti DNS-DNS hibridizáció vizsgálata

Mielőtt a genomszekvenálásokat kötelezővé tették, amennyiben két baktérium 97%-os (vagy ahhoz közeli) szekvenciahasonlóságot mutatott 16S rRNS génjében, a DNS-DNS hibridizációt is szükséges volt elvégezni, amit az alábbi módon végeztünk. A törzsekből a DNS izolálása a

korábban már ismertetett módon történt, a 2xSSC pufferben 67°C-on végeztük De Ley és mtsai (1970) alapján Huss és mtsai által javasolt módosítással (1983), cserélhető, 6x6 lukú Peltier termosztáttal és hőmérséklet szabályozóval kiegészített Cary 100 Bio UV/VIS spektrofotométerrel (Varian).

4.2.7.4 RiboPrint analízis

A baktériumok DNS-ének *EcoRI* enzimmel emésztett mintáinak ribotipizálását automatizált RiboPrinter rendszerrel végeztük (DuPont Qualicon) a Bruce által leírt módon (1996).

4.2.7.5 Teljes genom analízis

2018-tól a taxonómiai leírások megkövetelik az adott új taxon teljes genomjának szekvencia elemzését. Ezt Illumina MiSeq platformon végeztük MiSeq standard v2-t használva, ahogyan Genomics Core Facility RTSF, (Michigan State University, USA) javasolta, ahol a futtatás történt, a bioinformatikai elemzést mi tettük meg az alábbi módon figyelembe véve Chun és mtsai (2018) javaslatait: a bázisok beolvasása Illumina Real Time Analysis (RTA) v1.18.54 alapján történt, ennek eredményét Illumina Bcl2fastq v2.19.1. verzióval konvertáltuk FastQ formátumba. A szekvenciák leolvasásának minőségét FastQC (Andrews, 2010) programmal ellenőriztük. A leolvasott szekvenciák de novo összeillesztését SPAdes 3.10.0 (Bankevich és mtsai, 2012) végeztük. Ennek eredményét QUAST 2.3 (Gurevich és mtsai., 2013) alapján ellenőriztük, a genom lefedettségét Coverage calculator master v0.0.1 (https://github.com/GenomicaMicrob/coverage_calculator/) segítségével számoltuk. Az 500 bázispárnál rövidebb kontigokat kivettük az elemzésből.

A lehetséges szennyeződések (Lee és mtsai., 2017) alapján ellenőriztük. A teljes genom átlagos nukleotid azonosságát (gANI) az EzBioCloud (Yoon és mtsai., 2017) ANI kalkulátorával számoltuk ki. A leíráshoz szükséges gyors annotációt RAST server v2.0 (Aziz és mtsai., 2008) segítségével végeztük.

5. SAJÁT KUTATÁSOK, AMELYEKBE TAXONÓMIAI EREDMÉNYEINKET KÜLÖNBÖZŐ PROBLÉMÁK MEGOLDÁSÁRA, ILLETVE KÜLÖNBÖZŐ KÖRNYEZETEK BAKTERIOLÓGIAI DIVERZITÁSÁNAK LEÍRÁSÁRA HASZNÁLTUK FEL

A SIKERES MUNKA REMÉNYÉBEN GYAKRAN MÓDSZERTANI- ÉS TÁPTALAJFEJLESZTÉSEKET VÉGEZTÜNK

A kísérleteknél a későbbiekben hivatkozom arra a módszerre, amellyel dolgoztunk, leírásukat az anyag és módszer fejezet tartalmazza. A dolgozat hoz szorosan kapcsolódó publikációkat döntve, vastagítva, aláhúzással emelem ki, az egyéb dolgozattal összefüggő publikációkat döntéssel jelzem.

5.1 AHOGY KEZDŐDÖTT: A BIRKÁK KÖZÖTT....

(Munkában J.L.Khoga PhD hallgatóként és Hell Éva MSc hallgatóként vett részt; megjegyzés: ezt a témát csak a teljesség kedvéért tettem bele a dolgozatba, hogyan is nyílt ki az érdeklődésem az alkalmazott kutatások irányába, azaz valóban a kezdetek.... részletesebb információkat ld. a kapcsolódó további cikkekben.)

*A dolgozathoz kapcsolódó cikkek: Tóth és mtsai., 1998; **Khoga és mtsai., 2002**; Tóth és mtsai, 2006; Taxonómiai leírások: Tóth és mtsai, 2001 és **2007**; **Tóth és mtsai, 2008**.*

5.1.1 Munka elméleti háttere

Miázis alatt a gerincesek, köztük az ember lágylárvák okozta azon bántalmait értjük, amikor a lárvák (legalábbis egyedfejlődésük egy meghatározott periódusában) az élő gazda szöveteiből, szöveti folyadékából vagy béltraktusából táplálkoznak. Ehhez kapcsolódott PhD munkám, a juhok *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae) mikrobiológiai hátterét vizsgálva (egy OTKA pályázat keretein belül). Ez a légy obligát parazita szervezet, a nőtény a lárváit (larvipar) kizárólag élő állatokba (esetenként emberbe) rakja le.

A miázisos sebek és egészséges bőrfelületek mikrobiótáját vizsgálva azt találtuk, hogy az egészséges és légylárvával fertőzött állatok bőrfelületi mikrobiótája jelentős különbségeket mutatott, a wohlfahrtiosisban szenvedő állatok fertőzött területén az aktinobaktériumok jelentősen elszaporodtak (ezen felfedezések a PhD-m részét képezték, itt nem részletezem, de a teljesség kedvéért, a kiinduláshoz, úgy gondolom szükséges megemlíteni).

A baktériumok azonosítása ekkor még első sorban fenotípusos bélyegeik alapján történt (klasszikus fenotípusos bélyegek vizsgálata illetve Biolog gyorsidentifikációs rendszer segítségével, mindössze a baktériumok 25%-át vetettük alá 16S rRNS gén bázissorrend meghatározásának). **A munka azonban később is folytatódott.**

Ugyanis terepi megfigyeléseink azt mutatták, hogy a nőstény legyek melegvérű állatok élő szöveteiben táplálkoznak és szaporodnak, a hímeket inkább a cickafark növényen lehet felfedezni, annak nedveivel táplálkozik.

Kérdés: mi vonzza a legyeket az állatokhoz illetve a növényhez? Mi(k) termelik az anyagot, lehet-e ebben szerepe a kapcsolódó mikroorganizmusoknak? Lehetséges-e csapdázó anyagot összeállítani?

5.1.2 Alkalmazott módszerek, módszerfejlesztés, eredmények

Mivel az aktinobaktériumok elszaporodását tapasztaltuk a miázisos felületeken, az alábbi törzseket választottuk ki a vizsgálatainkhoz: *Rhodococcus fascians* 2V/35, *Mycobacterium aurum* 2VI/12, nem azonosított aktinobaktérium 5VI/1k és 9V/8. Negatív kontrollként a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960 és *Bacillus subtilis* ATCC 6633 baktériumtörzseket használtuk.

Először a baktériumok steril szűrletét teszteltük csapdázó anyagként szabadföldi kísérletekben, vonzza-e a legyeket, ha igen, melyeket (a kísérleteket az Állatorvosi Egyetem Parazitológiai Tanszékének munkatársaival végeztük). Ehhez a baktériumokat KingB (King és mtsai., 1954) táplevesben 72 órán át rázattuk, majd steril 0.45µm filteren (Millipore) leszűrtük.

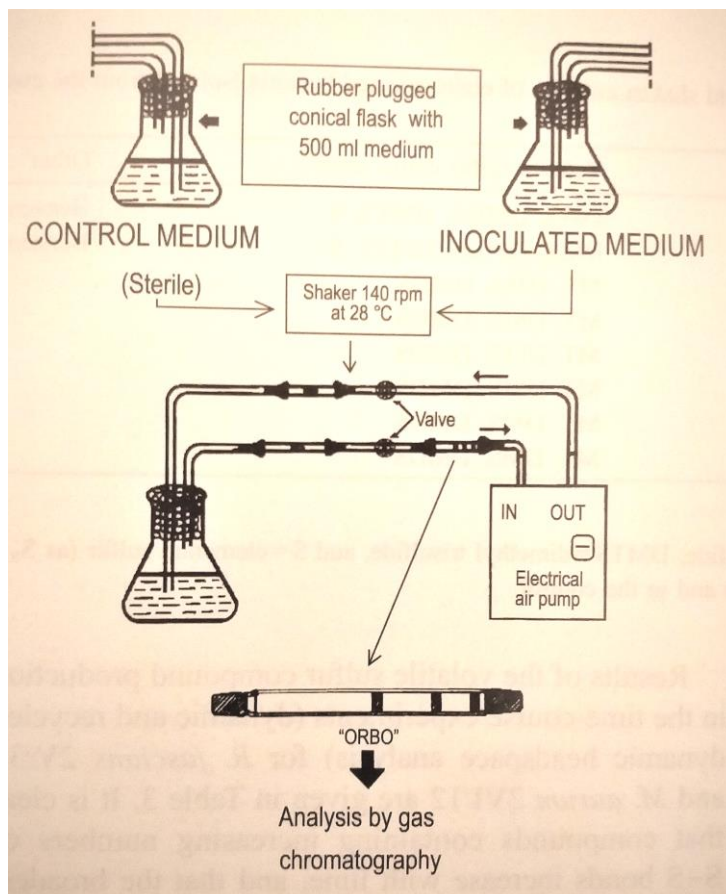
A légycsapdázási kísérlet eredményei a 3. táblázatban láthatók (Khoga és mtsai, 2002).

Baktériumtörzs	Átlagos napi csapdázott légy szám (\pm standard hiba)	
	<i>W. magnifica</i>	egyéb légyfaj
<i>Rhodococcus fascians</i> 2V/35	11,5 \pm 7,7	55,0 \pm 12,1
<i>Mycobacterium aurum</i> 2VI/12	10,8 \pm 6,5	48,6 \pm 12,1
nem azonosított aktinobaktérium 5VI/1k	3,0 \pm 1,4	31,0 \pm 1,4
nem azonosított aktinobaktérium 9V/8	2,5 \pm 2,2	7,0 \pm 0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1960	2,0 \pm 1,4	26,0 \pm 2,8
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2,0 \pm 0,0	9,0 \pm 1,4
tiszta agarlemez	3,0 \pm 1,4	10,0 \pm 1,4

3. táblázat Baktériumok szűrletével csapdázott legyek száma

A *R. fascians* 2V/35 és *M. aurum* 2VI/12 baktériumtörzsei szignifikánsan több *W. magnifica* kifejlett példányt vonzottak, mint a negatív kontrol baktériumtörzsek, bár más légyfajokat is (*Lucilia sericata*, *L. cuprina*, *Musca domestica*) erőteljesebben vonzottak (3. táblázat).

A baktériumok volatilis végtermékeit speciális módon, a 15. ábra alapján teszteltük (saját módszer): KingB agaron fenntartott, folyadék kultúrában nevelt baktériumtenyészeteket teszteltünk (kontrollként beoltatlan táptalajokat alkalmaztunk). Módszerünkben a mintavételt elektromos pumpa segítségével valósítottuk meg, a szaganyagokat aktív szenet tartalmazó „ORBO” csöveken csapdáztuk, ahonnan az anyagokat szerves oldószerrel visszaoldottuk.



15. ábra. Baktériumok volatilis végtermékeinek vizsgálata, Khoga és mtsai, 2002 nyomán.

A bakteriális „szag”anyagokat végül GC-MS segítségével analizáltuk (HP-5780, VG-12-250 MS detektor), és az alábbi vegyületeket mutattuk ki minden mintából: metántiol, dimetil-szulfid, dimetil diszulfid. A két leginkább vonzó hatást mutató baktérium (*R. fascians* és *M. aurum*) szűrléséből emellett dimetil triszulfidot, ként (ciklo-oktasulfur - S₈) és benzolt is azonosítottunk.

Megállapítottuk tehát, hogy mely baktériumok által termelt illékony anyagok felelősek a légy vonzásáért (légycsapdázó anyag összetételére is javaslatot tettünk, bár ez anyagi források hiányában már nem valósult meg).

Mindezek közben vizsgáltuk magának a légy (*W. magnifica* imago, 1-2-3. stádiumú lárváinak és bábjainak) mikrobiális közösségeit (Tóth és mtsai, 2006), a tenyésztett baktériumtörzsek azonosítása minden esetben 16S rRNS génjük alapján történt - ezen kutatások eredményeit nem ismertetjük itt részletesen, azonban megjegyezzük, hogy a légy lárváiból több új

baktérium nemzetséget sikerült leírnunk, amely taxonómiai leírások a dolgozat tárgyát képezik.

Fontos megemlíteni, hogy ezen kutatások hívták fel a figyelmet arra, hogy a mikrobiológiai alkalmazott kutatások segítségével számos esetben megoldást lehet találni bizonyos ipari/egészségügyi problémákra és hogy a mikrobiális taxonómia tükrében rengeteg válasz megadható a megfelelően feltett kérdésekre.

2003-tól az ELTE KKKK (Környezettudományi Kooperációs Kutatóközpont) keretein belül számos alkalmazott kutatásban vettünk részt.

5.2 SZENNYVÍZISZAP VIZSGÁLATOK

(A munkában részt vállaló PhD hallgatóm: Tauber Tamás (végzett), BSc hallgatóm: Wirth Balázs, TDK 1. helyezett; MSc hallgatóm: Pechál Nikolett)

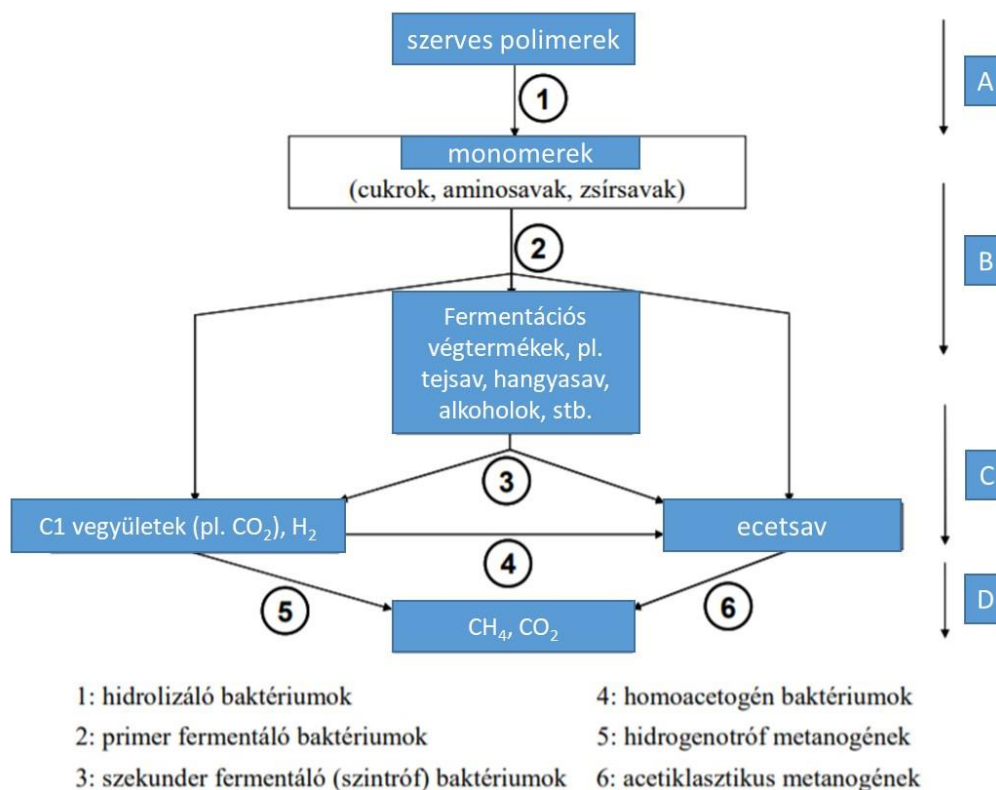
*A dolgozathoz kapcsolódó cikkek: Márialigeti és mtsai, 2006; Tauber és mtsai, 2007; **Tauber és mtsai, 2011.***

5.2.1 Munka elméleti háttere

Munkánk során a Dél-pesti Szennyvíztisztító telep üzemi anaerob iszapkezelő technológiájának ellenőrző, valamint iszapfermentációs reaktorokban folytatott félüzemi kísérleteihez kapcsolódtunk a biogáz termelés optimalizálásának céljából.

A szerves anyagok anaerob lebontásában mikroorganizmusok számtalan faja/típusa vesz részt, legyen szó természetes vagy ember által kialakított rendszerről. Ezen folyamatok nemcsak a hulladékkezelés szempontjából bírnak gazdasági jelentőséggel, hanem a mikrobák egy csoportja (metanogén ősbaktériumok) biogáz termelésére is képes.

Az 16. ábrán az anaerob iszaprohasztásban lejátszódó folyamatokat szemléltetem, megjegyezvén, hogy a szerves polimerek hidrolízise a teljes anaerob degradáció egyik kulcslépése. Az egyes anyagcserelépésekért a közösségen belül jól körülhatárolható csoportok felelősek, de anyagcseréjük során szoros egymásra utaltságban működnek.



16. ábra. Biopolimerek lebontásának egyszerűsített ábrája: a mikroorganizmusok által végzett folyamatok anaerob iszaprothasztás során, Tauber, 2013 nyomán. (A: hidrolízis; B: primer fermentáció; C: szekunder fermentáció; D: metanogenezis)

5.2.2 Alkalmazott módszerek, módszerfejlesztés, eredmények

5.2.2.1 Iszaprothasztó(k) mikrobiális közösségeinek általános vizsgálata kemotaxonómiai módszerrel

(Az általunk optimalizált kemotaxonómiai vizsgálatok pontos menetét a korábban ismertetett 14. ábra szemlélteti). A Dél-Pesti Szennyvíztisztító Üzem félüzemi iszaprothasztó első kemotaxonómiai vizsgálataiban során azt tapasztaltuk, hogy egy kinonmolekula, az MK-5(H₂) (a kinoidális gyűrűhöz 5 izoprén egység kapcsolódik és ebből egy telített) minden mintában minden egyéb kinont nagyságrendileg meghaladó mennyiségben fordult elő. A rövid láncú, egyszeresen telített menakinonok szulfátredukáló baktériumok jellemzői, ezek közül is a *Desulfobulbus* nemzetség tagjairól írták le ezt a szakirodalomban. Ennek a baktériumnak tömeges, aktív jelenlétét (a mintákból ezen módszerrel csak azon molekulafajták kimutathatóak biztonsággal, amelyek nagy mennyiségben fordulnak elő – a légzési kinon ilyen mennyiségű termelése aktív légzést feltételez a rendszerben) jelzi ez az eredmény, amit alátámasztott a minták magas szulfát tartalma is. Ismert tény, hogy a

szulfátredukáló baktériumok (egy szűk redoxpotenciál-tartományt leszámítva) erős hidrogén-kompetítorai a szén-dioxidot hidrogénnel redukáló metanogén baktériumoknak. Ezzel az eredménnyel a metántermelés hatékonyságát potenciálisan befolyásoló tényezőre találtunk, későbbi felfűtési kísérleteink eredményeképpen (Tauber és mtsai., 2007) javaslatot tettünk az üzemvitel számára az iszaprothasztás optimális hőmérsékletére vonatkozóan, ahol a metántermelésért felelős Archaea baktériumok maximális biogáztermelése mellett a szulfátredukáló baktériumok (a metanogén baktériumoktól eltérő hőmérsékleti optimumuk miatt) visszaszorulnak.

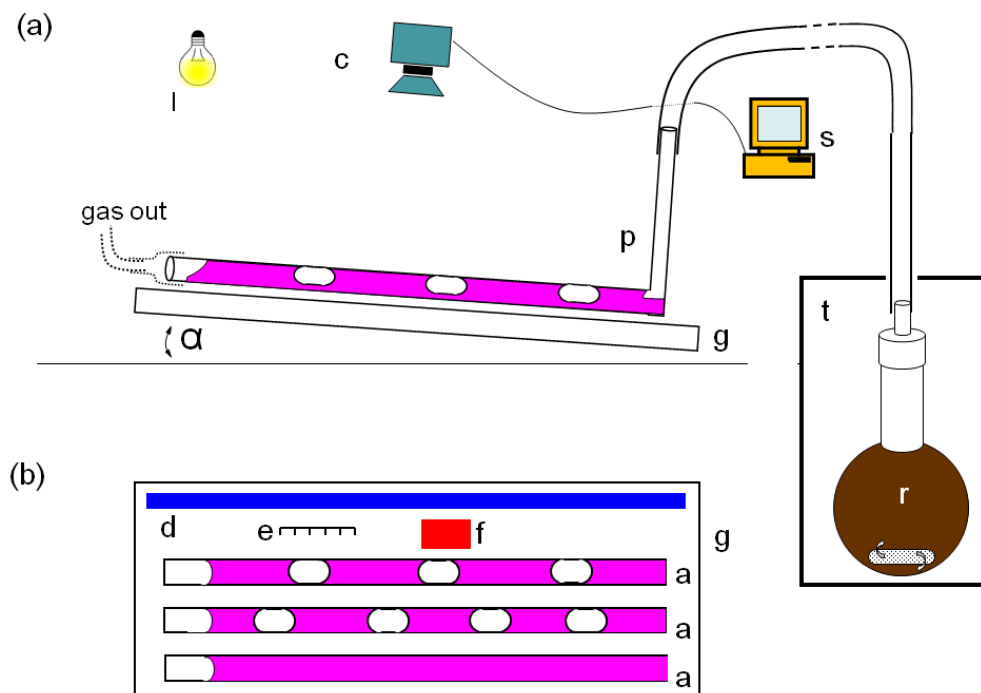
5.2.2.2 Modellrendszer építése, „buborékszámológó módszer” kidolgozása

A kísérletek sajnos az üzem napi kötelező rutin munkája miatt többször leálltak, ezért a pontos reprodukálhatóság és folyamatos munka biztosítása érdekében végül saját laboratóriumi modellrendszert kellett kialakítani (6. kép).

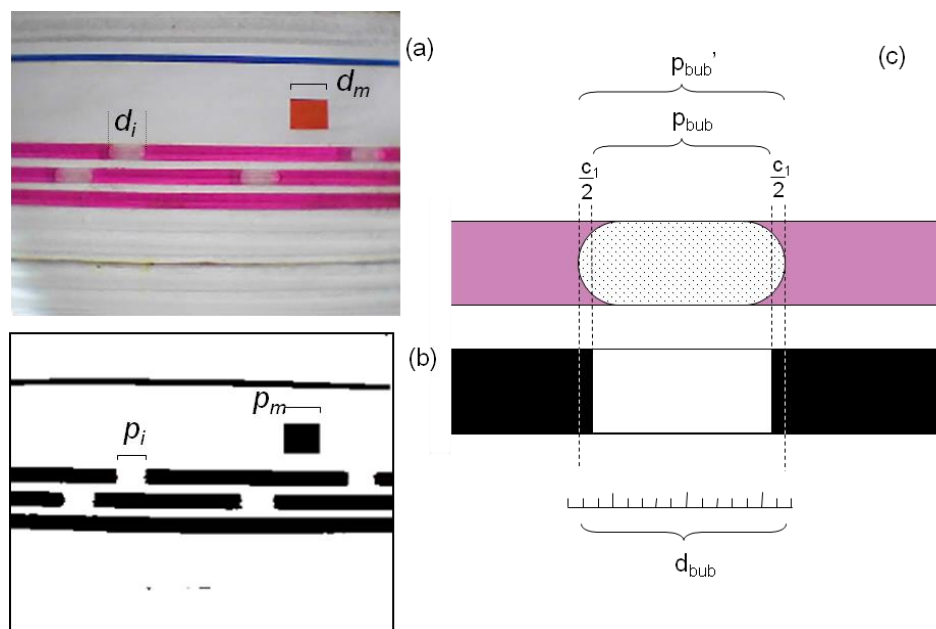


6.kép. Szennyvíziszap-rothasztó modellrendszer Fotó: Wirth Balázs (Iszaprothasztókként gömbölyű lombikokat használtunk, melyekből szilikoncsöveken keresztül elvezettük a keletkező biogázt a gázméréshez. A lombikokat termosztátban mágneses keverőasztalokra helyeztük, és a kísérlet során folyamatosan kevertettük az iszapot)

Már a kísérletek kezdeti szakaszában kiderült, hogy laboratóriumi körülmények között a biogázhozam mérése komoly nehézségekbe ütközik: a piacon hozzáférhető készülékek igen drágák (több milliós nagyságrend), amire a munkálatok ezen periódusában anyagi források nem álltak rendelkezésre. Így hát „szegény ember vízzel főz” alapon egy saját, buborékszámológó alapú módszert fejlesztettünk ki (Tauber és mtsai., 2011), mely a digitális képfelismerésen alapuló buborékmérés és -számlálás elvén működik, s amellyel alacsony gázhozamú bioreaktorok gáztermelése hatékonyan mérhető. A módszer mindössze egy számítógéphez csatlakoztatható kamerát igényel, és további detektor-berendezések nélkül alkalmazható több gázforrás hozamának párhuzamos nyomon követésére is (17. A és B ábrák).

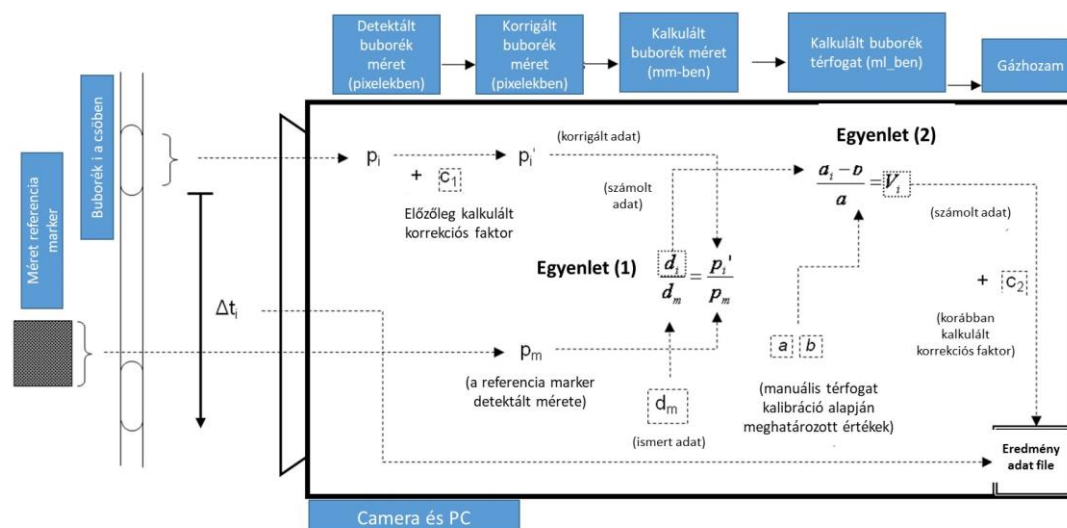


17. A. ábra A buborék számláló eszköz. a) oldalnézet: p: L alakú üvegcsővek festett folyadék- és gázbuborékokkal; g: fehér hordozó tálca; c: kamera; l: fényforrás; b) fentről: d: kiindulási vonal (kék) az automatikus csőészleléshez; e: mm-es skála a buborékméret kézi javításához; f: referencia marker az automatikus buborékméret kiszámításához; r: reaktor (keverve); s: számítógép; t: termostát; α : dőlésszög ($3^\circ - 10^\circ$)



17.B ábra Az elemzett kép és a buborék geometriája. a) és b): a 3 csővel ellátott buborékos készülék tényleges és pixelizált látványa d_i az i buborék mérete, d_m a referencia marker mérete, $[d] = \text{mm}$; p_i az i buborék kimutatott hossza, p_m a referencia marker észlelt hossza, $[p] = \text{pixelek száma}$. c) A buborék valós és észlelt hossza közötti különbséget kell használni a c_1 korrekciós tényező megállapításához. d_{bub} a kiválasztott buborék vizuálisan meghatározott mérete, p_{bub} az észlelt hossz pixeleiben, p_{bub}' a korrigált hossza pixeleiben, az egyenlő a valós mérettel. $c_1 = p_{\text{bub}}' - p_{\text{bub}}$

Amikor egy buborék áthalad a csőben, ez egy szürke szakaszként jelenik meg egy színes háttérben. A buborék hosszát egy pontos méretjelölővel meg lehet határozni (piros téglalapok a 17.A és B. ábrákon): a buborék hossza korrelál a buborék térfogatával, megfelelő egyenlet alkalmazásával ez a térfogat, így a termelt gáz mennyisége meghatározható (17. C ábra).



17.C ábra. Az adatok előállításának logikája a buborékképződés észlelése alapján. Ahol d_i az i buborék mérete, d_m a referencia marker mérete, $[d]$ = mm; p_i' az i buborék kimutatott hossza, p_m a referencia marker észlelt hossza, $[p]$ = képpontok száma; V_i az i buborék térfogata, $[V]$ = ml. Δt a két buborék megjelenése közötti idő. A szaggatott vonallal körvonalozott négyzetek a felhasználó által definiált változókat képviselik (Tauber és mtsai, 2011 alapján).

Standard gázforrások segítségével elvégeztük módszerünk kalibrálását, és az általunk kialakított szennyvíziszap-rothasztó modellreaktorokon teszteltük működését. Utóbbi méréseknél eddig ismeretlen okból jelentkező oszcilláló gázkilépést detektáltunk, melyről több lépésben bebizonyítottuk, hogy nem a mérési módszer műterméke.

A kidolgozott eljárást először a nehezen bontható szubsztrátok (cellulóz, lignocellulóz) adagolásának tesztelésére használtuk (a vizsgálatok és kiértékelésük ld. Wirth és mtsai (2011). Közben elnyertünk egy Tét pályázatot a DAAD-MÖB által kiírt projektszerű kutatási együttműködésre (DAAD-MÖB, 14624) „Természetes lignocellulóz lebontó élőhelyek vizsgálata potenciális ipari biogáztermelést serkentő mikrobatenyészetek kinyerése céljából” címmel, amely a munkálatokba egy német együttműködő partner bevonását is lehetővé tette (UFZ, Lipcse), a buborékszámoláson alapuló készüléket a német partnernél is megépítettük.

5.3 PARTI SZŰRÉSŰ IVÓVÍZ VIZSGÁLATA

(A munkában részt vállaló PhD hallgatóm: Homonnay Zalán Gábor, abszolutóriumot szerzett, MSc hallgató: Török György)

Jelen dolgozatban a témát csak részlegesen ismertetem, de fontos eredményekhez vezettek és néhány taxonómiai leírást ezen kutatások eredményeztek, ezért fontosnak tartom őket megemlíteni.

*Dolgozathoz kapcsolódó publikációk: **Homonnay és mtsai., 2008, 2014**; Taxonómiai leírások: Makk és mtsai, 2011; **Tóth és mtsai, 2011.**; Makk és mtsai, 2015.*

5.3.1 A munka elméleti háttere

A Duna mentén számos ország, így hazánk két millió lakosú fővárosának vízellátásában is központi szerepet tölt be a folyó, a főváros ivóvízszükségletét teljes mértékben a 90 km hosszan elterülő, 751 működő dunai partiszűrészű kútból álló rendszer segítségével biztosítja. Ez a rendszer csak Budapest számára évi 310 millió m³ ivóvizet nyújt, ami a magyarországi teljes ivóvízmennyiség 37, a teljes hazai partiszűrészű vízmennyiség 81%-a.

5.3.2 Alkalmazott módszerek, eredmények

A munka a Vízmű Zrt megbízásából, velük szoros kooperációban zajlott, célja az volt, hogy a víz mikrobiológiai állapotát/minőségét a kúttól a fogyasztóig feltérképezzük, ehhez tenyésztést, T-RFLP és molekuláris klónozást végeztünk.

Eredményeink szerint az intenzív klórozást követően a tenyésztethető baktériumok jelentős része elpusztult, és bár a későbbi szakaszokon újradúsulás volt megfigyelhető, a csíraszám (TKE/mL) már nem érte el a klórozatlan vizek értékét. A mikroszkópos sejtszámok a tenyésztéses eredményeknél legalább 2 nagyságrenddel nagyobbak voltak, a klórozott víz mikroszkópos sejtszám értékei nagyságrendileg megegyeztek a klórozás előtti vízminták értékeivel. A klórozás hatására ugyanakkor egy teljes közösségi átrendeződés zajlott: a klórozás utáni szakaszon azonban a nem kórokozó *Mycobacterium* fajok váltak dominánssá. Ellenálló, mikolsav-tartalmú sejtfaluk segítségével a fertőtlenítő kezeléseket is gyakran túléljük, így relatív mennyiségük növekedett a vízhálózatokban. Megjelenésüket nem lehetett összefüggésbe hozni sem fekális szennyeződéssel, sem hibás ivóvízkezeléssel, vagy üzemzavarral. A közösség másik domináns csoportját *Methylocella* nemzetség képviselői alkották, mely szervezetek ún. „egyszén” vegyületek (C1) oxidálásával is képesek energiát

nyerni (fakultatív metilotróf baktériumok). Ismert, hogy ezen vegyületek a klórozás hatására gyakran keletkeznek ivóvízhálózatokban. A tenyésztési vizsgálataink során több új baktériumtaxont fedeztünk fel (ld. taxonómiai rész).

5.4 EGY MAGYARORSZÁGI ERŐMŰ VÍZTISZTÍTÓ RENDSZERÉNEK VIZSGÁLATA

(Munkában részt válláló PhD hallgatóim: Bohus Veronika (végzett) és Kéki Zsuzsa (végzett), MSc hallgatók: Szoboszlai Márton, Grébnér Kitti)

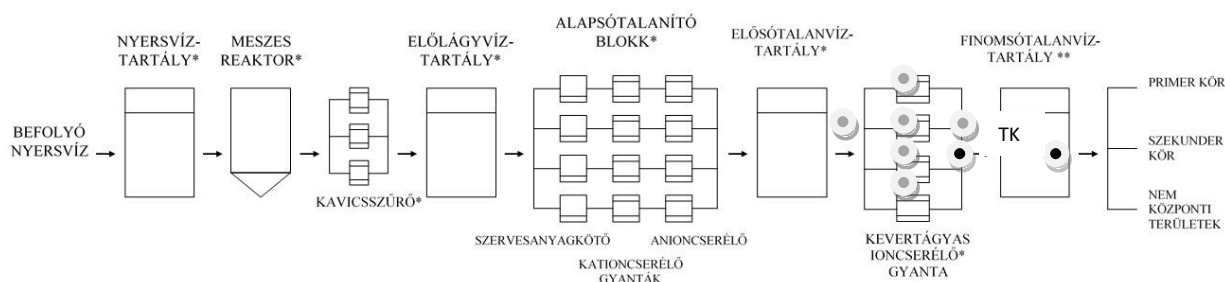
A részletes vizsgálati eredmények ebben az esetben sem képezik a dolgozat tárgyát, a taxonómiai leírásokhoz és a táptalaj fejlesztési eredményeink jelentőségének megértéséhez azonban fontosnak tartom összefoglalásukat.

*Dolgozathoz kapcsolódó publikációk: **Bohus és mtsai., 2007; 2010; Kéki és mtsai., 2013; 2019; Tóth és mtsai, 2012; 2014.***

5.4.1 A munka elméleti háttere

A nagy tisztaságú vizek csak nyomokban tartalmaznak szerves és szervetlen molekulákat, és ELVIEKBEN mikroorganizmusoktól mentesek (ez természetesen nem igaz), vezetőképessége a gyakorlatban 25 °C-on $< 0,054 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

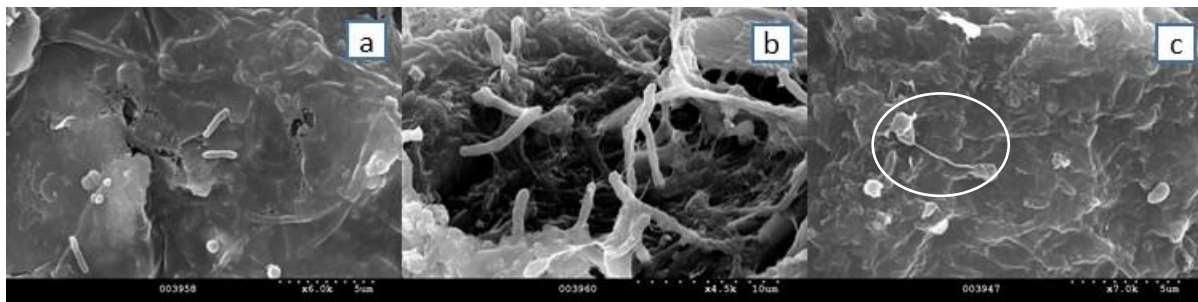
Számos ipari létesítményben alkalmaznak nagy tisztaságú vizet (UPW - ultra pure water) alapanyagként, nyersanyagként vagy hűtővízként, a mi vizsgálataink egy magyarországi erőmű vízelőkészítő üzemét célozták meg (18. ábra). A munkáról részleteiben itt sem számolunk be, azonban hogy a dolgozatban szereplő új baktériumtaxonokhoz „eljussunk”, eredményeinket Bohus (2010) alapján összefoglalom.



18. ábra. A vizsgált víztisztító üzem sematikus vázlata. A primer szekunder vízkörök a turbina ellátását illetve a hűtővíz rendszert jelentik, a marginális részek első sorban a különböző laborokat és egyéb ellátó rendszereket látják el finomsóval vízzel. A szürke pöttyök az első, a fekete pöttyök a második mintavételi időpont helyeit jelölik. TK: térfogat kiegyenlítő tartály

5.4.1 Alkalmazott módszerek, táptalajfejlesztés, eredmények

Munkánk során tenyésztést és tenyésztéstől független (mikroszkópos sejtszám meghatározás, elektronmikroszkópos vizsgálatok, DGGE, molekuláris klónozás) egyaránt használtunk. Eredményeink rövid összefoglalása: 1. Elektronmikroszkópos eredményeink azt mutatták, hogy a gumifelületek biofilmjében komplex mikrobatársulás található (7. kép).



7. kép a vizsgált biofilm minták SEM fotói. a. Az élőbevonatban található, nyálkába ágyazott sejtek, b. elágazó és fonalas szerkezetek c. *Hyphomicrobium*-okra jellemző bimbózdó forma. Fotók: Makk Judit

2. Megállapítottuk, hogy a víztisztító üzem több pontján szennyezett, a csöveket néhol komplex élőbevonat borítja, az egyes pontoknak akár stabil mikrobaközössége alakulhat ki (pl. kevertágyas ioncserélő gyanta), és hogy az általunk kimutatott mikrobák a korróziós folyamatokat befolyásolhatják, akár indukálhatják is: a biofilmeket alkotó mikrobaközösség összetételét pl. a H₂-metabolizmus, valamint egyéb anyagcseretermékek révén alakíthatják. Megjegyezzük, hogy az ioncserélő műgyanták egy részében a térhálósítást divinil-benzollal érik el, ami a *Delftia* fajok számára szén- és elektronforrásul szolgálhat - néhány *Delftia*-fajt (pl. az általunk is nagy számban kimutatott *D. acidovorans*-t) „gumi-evő”-ként is emlegetik. A kimutatott mikrobák közül több képes a levegő nitrogénjének fixálására, ami egy ilyen tápanyagszegény környezetben kulcsfontosságú lehet a mikrobák fennmaradása szempontjából. Számos kimutatott baktérium által termelt EPS réteg a biofilmek kialakításában jelentős 3. Kritikus pont elemzés során megállapítottuk azt is, hogy a beavatkozási pont maga a kevertágyas ioncserélő gyanta kell, hogy legyen és a beavatkozást biocidokkal el is végeztük (Kéki és mtsai., 2019). **Azonban hogy ehhez eljussunk, tenyésztés kapcsán további módszerfejlesztést/táptalajfejlesztést kellett végeznünk, hogy a biocidokat lehetőség szerint a rendszerben előforduló mikrobák legszélesebb körén tesztelni lehessen:** csak azon szervezeteket lehet bármely biocidra/antimikrobiális anyagra

való érzékenységre (ami később gyakorlatban is felhasználható) tesztelni, ami a kezünkben van. Táptalaj fejlesztés kísérletek

Kiindulás: a vizekből a különböző mintavételek során (összesen 5 mintavétel 2003-2010 között) 534, biofilmből 117 baktériumtörzset izoláltunk a (TSA, M27 és R2A) táptalajokról, azonosításuk ARDRA-val (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) illetve zsírsavprofiljuk alapján történő csoportosítást követően 16S rRNS génjük szekvenciája alapján történt. Ezek közül választottuk ki azokat, amelyek viszonylag gyorsan növekedőek, heterotrófok és emellett széteső sejtjeikkel a rendszer szerves anyag tartalmát jelentősen növelni képesek és a baktérium-kivonatok alapjául szolgáltak.

A 2004-2010-es évek eredményei alapján speciális, elsősorban oligotróf (kis szerves anyag tartalommal jellemezhető) táptalajokat dolgoztunk ki, amelyek a korábban R2A táptalajról izolált oligotróf baktériumok szűrleteit/hővel előlt tenyészeit is tartalmazták. Emellett egyéb szintetikus és komplex médiumokat is teszteltünk, direkt szélesztést és dúsítást is alkalmaztunk.

1. Táptalaj összetétele (szintetikus táptalaj - nyomelem-, makroelem-, vitamin oldat):

Nyomelem oldat*	1,00 ml
KNO ₃ -os M1 oldat***	100,00 ml
Agar	24,00 g
Finomsóatlan-víz	1000,00 ml

121 °C-on, 15 percig sterilizálva

Vitamin oldat****	1,00 ml (sterilen hozzáadva)
-------------------	------------------------------

2. Táptalaj összetétele (komplex táptalaj – csak baktérium kivonat)

Baktérium kivonat**	1,00 ml
Agar	24,00 g
Finomsóatlan-víz	1000,00 ml

121 °C-on, 15 percig sterilizálva

3. Táptalaj összetétele (C1 komponenseket is tartalmazó komplex táptalaj, vitamin oldattal)

Nyomelem oldat*	1,00 ml
Baktérium kivonat**	1,00 ml
KNO ₃ -os M1 oldat***	100,00 ml

Agar	24,00 g
Finomsóalan-víz	1000,00 ml

121 °C-on, 15 percig sterilizálva

Vitamin oldat****	1,00 ml (sterilen hozzáadva)
-------------------	------------------------------

4. Táptalaj összetétele (C1 komponenseket is tartalmazó szintetikus táptalaj):

Nátrium – acetát	0,50 g
Nátrium – formiát	0,50 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
NaHCO ₃	2,00 g
Agar	24,00 g
Finomsóalan-víz	1000,00 ml

pH 7.0 - 7.2

121 °C-on, 15 percig sterilizálva

5. Táptalaj összetétele (komplex táptalaj, R2A táplevesel):

Baktérium kivonat**	40,00 ml
R2A tápleves	100,00 ml
Finomsóalan-víz	860,00 ml
Agar	24,00 g

pH 7.0 - 7.2

121 °C-on, 15 percig sterilizálva

* Nyomelem oldat

Fe SO ₄ x 7H ₂ O	2,100 g
H ₃ BO ₃	0,030 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,100 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,190 g
NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,024 g
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,002 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,144 g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,036 g
EDTA	5,200 g
Desztillált víz	987,00 ml

pH 6.0 121 °C-on, 15 percig sterilizálva

** Baktérium kivonat összetétele, elkészítése:

A baktériumokat korábban ugyanezen rendszerből R2A táptalajon tenyésztettük ki. A kivonat elkészítése: 1 héten át R2A táplevesben, szobahőmérsékleten tenyésztve, majd elegyítve az egyes tenyészeteket, centrifugálást követően a felülúszót leöntve, ezáltal egy sűrű baktérium szuszpenziót nyerve, 121 °C-on, 15 percig sterilizálva.

felhasznált baktériumtörzsek

Delftia acidovorans (UM16)
Mycobacterium fluoranthenivorans (BB79C)
Ralstonia insidiosa (BB165B)
Novosphingobium hassiacum (RD1)
Chromobacterium violaceum (R8)
Bacillus weihenstephanensis (BB80)
Enterobacter sp. (RT11)
Bradyrhizobium sp. (BB178)

***** KNO₃-os M1 oldat összetétele:**

KNO ₃	1,00 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,02 g
Desztillált víz	1000,00 ml

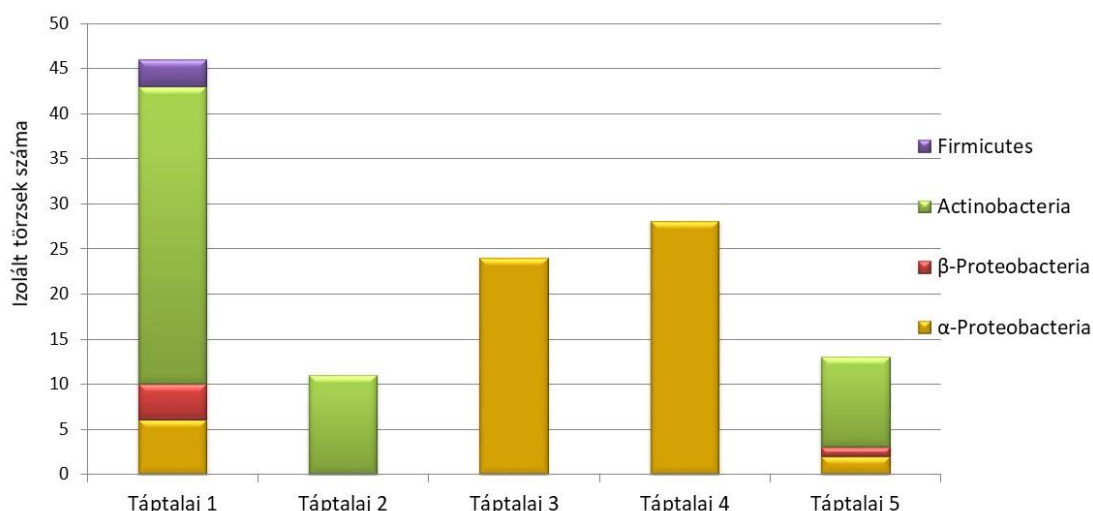
121 °C-on, 15 percig sterilizálva

****** Vitamin oldat összetétele:**

4-aminobenzoésav	40,00 mg
D(+) - biotin	10,00 mg
Nikotinsav	100,00 mg
Ca D(+) - pantotenát	50,00 mg
Piridoxin - dihidroklorid	150,00 mg
10 mM Na - foszfát puffer	1000,00 ml

pH 7.1; 0,2 mm-es filteren átszűrve, 4 °C-on, sötétben tárolva

Megállapítottuk, hogy az újonnan alkalmazott táptalajokon általában nagyobb volt a tenyészhető diverzitás, jóval több aktinobaktériumot sikerült tenyésztésbe vonnunk és számos, korábban nem tenyészhető baktériumot is sikerült tenyésztésbe vonnunk (19. ábra).



19. ábra A táptalajok hatása az ultratiszta vízből kitenyészthető baktérium közösségekre a phylum-ok szintjén [Táptalaj 1: szintetikus táptalaj (nyomelem-, makroelem-, vitamin oldat); Táptalaj 2; 5: komplex táptalajok (baktérium kivonat; baktérium kivonat és 10% R2A); Táptalaj 3; 4: C1 komponenseket tartalmazó táptalajok (vitamin oldat nélkül; vitamin oldattal)]

A speciális táptalajokról történő izolálások során megtaláltunk több, a korábbiakban R2A táptalajról is izolált baktériumot, ugyanakkor számos egyéb szervezet megjelenését is tapasztaltuk. Érdekes eredmény, hogy ezen tenyésztések során a Gram-pozitív szervezetek (*Mycobacterium*, *Microbacterium*, *Leifsonia*, *Paenibacillus* nemzetségek) előfordulása a tenyésztett baktériumok között lényegesen magasabb volt, mint korábban, bár az izolált Gram-negatív baktériumok diverzitása nagyobb (többféle szervezetet találtunk), mennyiségi arányaiban összességében kevesebben vannak, mint Gram-pozitív társaik.

Az új táptalajokon kitenyészített baktériumok irodalmi adatok szerint szintén hozzájárulhatnak a korrózióhoz. A kitenyészített új baktériumtaxonok leírását elvégeztük, közülük egy a dolgozat részét is képezi (Tóth és mtsai, 2012).

Végső eredményként sikeresen megállapítottuk a rendszer kritikus pontját, Kathon WT biociddal (laboratóriumi modellrendszer segítségével előzetes teszteléseket végeztünk) megvalósítottuk a rendszer mikroba mentesítését és kidolgoztunk egy pontos üzemviteli tervet a kevertágyas ioncserélő gyanta mikrobamentesítésére, amelyet a felkérő üzem mai napig hatásosan alkalmaz üzemviteli problémáik megoldására (Kéki és mtsai, 2019).

5.5 FÜRDŐ- ÉS TERMÉSZETES VIZEK VIZSGÁLATA

Ezen kutatások jelen pillanatban is folynak, legtöbb komolyabb eredményünk publikálás alatt van, azonban részeredményeinket magyar nyelven már közzétettük és legújabb taxonómiai leírásaink ezen vizsgálatokból származnak.

(Munkában részt vállaló PhD hallgatóim: Lippai Anett (abszolutóriumot szerzett) - fürdővizek mikrobiológiai vizsgálata és Szuróczki Sára (abszolutóriumot szerzett) - a Fertő bakteriális közösségeinek elemzése, a makrofiton borítottság hatása a víz bakteriológiai közösségeire.

Dolgozathoz kapcsolódó publikációk: Lippai és mtsai., 2017, 2018; Szuróczki és mtsai, 2016, 2017; 2018. Taxonómiai leírások: Tóth és mtsai., 2017a; Tóth és mtsai., 2017b; Szuróczki és mtsai., 2020.

5.5.1 A munka elméleti háttere

A két témát itt összevontan, röviden tárgyalom, hiszen az angol nyelvű publikációk (a dolgozat írásakor) még elfogadás/megjelenés alatt vannak.

1. A termálfürdők egyedülálló vizes környezetek, amelyekben mind ökológiai, mind antropogén hatások változásokat idéz(het)nek elő az adott víz mikrobiológiai állapotában. Gyógyfürdőink vizét elsősorban közegészségügyi szempontból vizsgálják, a forrásokat és medencéket benépesítő természetes mikrobaközösségekről ismereteink hiányosak.

2. A Fertő Európa legnagyobb sekély, alkalikus szikes tava. A magyar tórész 85%-át (75 km²) nádas (*Phragmites australis*) fedi. A makrofiton borítottság növekedése a baktériumok mennyiségének és aktivitásának növekedését eredményezheti, illetve azok diverzitását is befolyásolhatja. A vizsgálatokat egy NKFIH pályázat keretében végeztük el (NKFIH 116275).

5.5.2 Alkalmazott módszerek, eredmények

1. Célunk az volt, hogy tenyésztéses (hagyományos tenyésztés R2A táptalajon, speciális tenyésztés egy általunk kifejlesztett, alacsony tápanyag koncentrációjú táptalajon, dúsítás poliuretánhab, mint hordozó felhasználásával – ld. 3. kép), valamint tenyésztéstől független módszerekkel (mikroszkópos sejtszám meghatározás, T-RFLP, 16S rRNS gén bázissorrend elemzés) tárjuk fel a mikrobiális közösségek összetételét különböző budapesti termálfürdőkben oly módon, hogy a forrásvíz mikrobiális közösségeit összehasonlíttuk a különböző tulajdonságokkal jellemezhető medencék vizének közösségeivel, kitérve az

ökológiai és emberi fürdőzésből származó esetleges hatásokra. Eredményeink szerint a vizsgált fürdők vize higiénés szempontból nem volt kifogásolható. A Gellért gyógyfürdő esetén minden mintánkat az Alfacaproteobaktériumok dominanciája jellemezte, de megjelentek a Firmicutes, Béta- és Gammaproteobaktérium, Deinococcus-Thermus és Bacteroidetes leágazások képviselői is, vízből számos új baktériumtaxont tenyésztettünk ki (ld. taxonómiai rész). A Dandár gyógyfürdő esetén a 44°C-os forrásvizet, egy töltő-ürítő és egy vízforgató 38°C-os, valamint egy töltő-ürítő 20°C-os medencéjének mikrobiológiai vizsgálatát végeztük el. A vízminták összes sejtszáma forrásvíz esetén $1,43 \cdot 10^4$ sejt/ml, a töltő-ürítő típusú 38°C-os medencében $4,94 \cdot 10^6$ sejt/ml, a 20°C-os medencében $2,6 \cdot 10^6$ sejt/ml, a vízforgató 38°C-os medencében $7,83 \cdot 10^5$ sejt/ml értékek voltak: ez rávilágít arra, hogy nem csak a fürdőzők jelenléte, hanem a vízkezelés típusa is befolyásolja a baktériumok mennyiségét az adott víztestben. A forrásvízben tenyésztéssel eljárásal domináns taxonok a *Brevibacillus choshinensis* és *Brevibacillus brevis* voltak. A beltéri 38°C-os medencéből jelentős mennyiségben izoláltuk a *Hydrogenophaga atypica* faj képviselőit, a kültéri vízforgató medencéből pedig különböző *Pseudomonas* fajokat, amelyek a természetben széles körben elterjedtek. A beltéri 20 °C-os medencében a *Brevundimonas* nemzetség tagjai és a *Micrococcus aloeverae* mellett domináns előfordulású volt a *Rhizobium herbae* és a *Porphyrobacter colymbi*. T-RFLP vizsgálatunk alapján (Shannon és Simpson indexek) a forrás vize mutatkozott a legdiverzebbnek, tenyésztéssel azonban innen csak kevés taxont sikerült kimutatnunk.

2. Célul azt tűztük ki, hogy feltárjuk a makrofiton borítottság hatását a Fertő bakteriális közösségeire. Három különböző mintavételi pontunk volt: az osztrák-magyar határon található nyílt vízi terület, a Kis-Herlakni belső tó vize és a nádállományban futó, Külső-övcatorna vize. Munkánk során hagyományos tenyésztést és újgenerációs szekvenálást (NGS=Next Generation Sequencing) alkalmaztunk. Tenyésztés: mindhárom mintavételi ponton a Proteobacteria phylum képviselői alkották a tenyészetek többségét, de megjelentek az Actinobacteria, Firmicutes és Bacteroidetes törzsek tagjai is. A Verrucomicrobia törzs képviselőit csak a nádas vízből mutattuk ki. A Kis-Herlakni belső tó vízből és a nyílt vízből a Rheinheimera nemzetség képviselőit mutattuk ki legnagyobb számban, míg a nádas vízből a Pseudomonas nemzetséget. A hazai szikes vizekből gyakran kimutatott *Hydrogenophaga* nemzetség mindhárom mintavételi helyen megjelent. A

heterotróf baktériumok milliliterenkénti mennyisége 10^3 - 10^4 nagyságrendű volt. A baktériumok mennyisége a több huminanyagot tartalmazó mintavételi pontokon volt nagyobb, ellentétben a nyílt vízzel, ahol a fitoplankton volt jelentősebb. Megemlítendő, hogy nagy számban, elsősorban a nádas vizének mintájából sikerült a tudomány számára nézve új baktériumtaxonokat tenyésztésbe vonnunk: a Proteobacteria, Bacteroidetes és a Verrucomicrobia törzsek képviselőit, közülük ezidáig egy került leírásra, ez a dolgozat taxonómiai részében található.

NGS: Újgenerációs DNS-szekvenálás segítségével nem csak víz, hanem üledék mintákat is vizsgáltunk. Az üledék- és a vízminták baktériumközösségei jelentős eltéréseket mutattak, bár minden mintában jellemzően magas volt a proteobaktériumok aránya. Számos tenyésztésbe nem vont taxont azonosítottunk. A nyílt vízben az Actinobacteria phylumba sorolható édesvízi hgcI klád, a 'CI500-29 marine group' és a Synechococcus nemzetség volt domináns. A belső tó és a nádas vizének baktériumközössége egymáshoz sok szempontból hasonlított: más magyarországi szikes tavakban is jelen lévő Flavobacterium, Fluvicola (Bacteroidetes) nemzetségeket, a 'Candidatus Aquiluna' csoportot (Actinobacteria) és a Comamonadaceae családba (Betaproteobacteria) tartozó, egy eddig tenyésztésbe nem vont taxont mutattuk ki nagy számban. Az üledékminták esetén dominánsak voltak a Chloroflexi törzs Anaerolineaceae és GIF9 csoportjainak tagjai, illetve a Deltaproteobacteria osztály kénvegyületeket oxidáló *Thiobacillus* és a tenyészhető képviselőket nem tartalmazó Sva0485 csoportjai voltak. Összességében elmondható, hogy minden általunk vizsgált mintavételi hely jelentős prokarióta diverzitással rendelkezik, a késő őszi és nyári minták egymástól elkülönülnek, továbbá a makrofiton borítottságú területek planktonikus baktériumközösségei eltérnek a nyílt víztől.

Mindkét kutatási témához kapcsolódnak taxonómiai leírások.

6. A TAXONÓMIAI KUTATÁSOK RÉSZLETES EREDMÉNYEI

Laboratóriumomban, az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén számos új baktériumtaxon leírását végeztük el. 2001 óta 40 új baktériumfaj, illetve nemzetség polifázikus vizsgálatában vettem részt, a publikációkban sokszor első, utolsó vagy levelező szerzőként (aláhúzással jelölöm azokat, amelyek részleteiben is a dolgozat részét képezik – kiválasztásuk alapja,

hogy az elmúlt 20 évben, taxonómiában megjelenő újabb és újabb módszerek/problémák megjelenjenek):

- Tóth és mtsai, 2001: *Schineria larvae* gen. nov. sp. nov., nevezéktani revízió – *Ignatzschineria larvae* (2007)
- Kukolya és mtsai, 2002: *Thermobifida cellulolytica* sp. nov.
- Borsodi és mtsai, 2003: *Pannonibacter phragmitetus* gen. nov. sp. nov.
- Tóth és mtsai, 2008: *Wohlfahrtiimonas chitinoclastica* gen. nov. sp. nov.
- Tóth és mtsai, 2008: *Nocardioides daphniae* sp. nov.
- Borsodi és mtsai, 2008: *Bacillus aurantiacus* sp. nov.
- Szoboszlay és mtsai, 2008: *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov.
- Táncsics és mtsai, 2010: *Siphonobacter aquaeclarae* gen. nov. sp. nov.
- Tóth és mtsai, 2011: *Nocardioides hungaricus* sp. nov.
- Makk és mtsai, 2011: *Tahibacter aquaticus* gen. nov. sp. nov.
- Felföldi és mtsai, 2011: *Ottowia pentelensis* gen. nov. sp. nov.
- Rusznyák és mtsai, 2011: *Cellulomonas phragmiteti* sp. nov.
- Borsodi és mtsai, 2011: *Bacillus alkalisediminis* sp. nov.
- Vajna és mtsai, 2012: *Thermus composti* sp. nov.
- Tóth és mtsai, 2012: *Aquipuribacter hungaricus* gen. nov. sp. nov.
- Tóth és mtsai, 2014: *Phreatobacter oligotrophus* gen. nov. sp. nov.
- Felföldi és mtsai, 2014: *Hephaestia caeni* gen. nov. sp. nov.
- Felföldi és mtsai, 2014: *Eoetvoesia caeni* gen. nov. sp. nov.
- Makk és mtsai, 2015: *Arenimonas subflava* sp. nov.
- Farkas és mtsai, 2015: *Zoogloea oleivorans* sp. nov.
- Makk és mtsai, 2016: *Deinococcus budaensis* sp. nov.
- Felföldi és mtsai, 2016: *Rufibacter quisquiliarium* sp. nov.
- Táncsics és mtsai, 2017: *Rhodococcus sovatisensis* sp. nov.
- Felföldi és mtsai, 2017: *Caenimicrobium hargitense* gen. nov. sp. nov.
- Felföldi és mtsai, 2017: *Quisquillibacterium transsilvanicum* gen. nov. sp. nov.
- Tóth és mtsai, 2017: *Brevundimonas balnearis* sp. nov.
- Tóth és mtsai, 2017: *Gellertiella hungarica* gen. nov. sp. nov.
- Borsodi és mtsai, 2017: *Nesterenkonia pannonica* sp. nov.
- Borsodi és mtsai, 2017: *Nitrincola alkalilacustris* sp. nov.
- Tóth és mtsai, 2017: *Micrococcoides hystricis* gen. nov. sp. nov.
- Borsodi és mtsai, 2017: *Bacillus kiskunsagensis* sp. nov.
- Révész és mtsai, 2018: *Sphingobium aquiterrae* sp. nov.
- Kukolya és mtsai, 2018: *Xylanibacillus composti* gen. nov. sp. nov.
- Máthé és mtsai, 2018: *Rhizobium aquaticum* sp. nov.
- Szuróczi és mtsai, 2019: *Arundinibacter roseus* gen. nov. sp. nov.
- Makk és mtsai, 2019: *Deinococcus fonticola* sp. nov.

- Felföldi és mtsai, 2019: *Sapientia aquatica* gen. nov. sp. nov.
- Borsodi és mtsai, 2019: *Anaerobacillus alkaliphilus* sp. nov.
- Szuróczki és mtsai, 2020: *Phragmitibacter flavus* gen. nov. sp. nov.
- Felföldi és mtsai, 2020: *Siculibacillus lacustris* gen. nov. sp. nov.

(az irodalmi hivatkozások között csak azokat tüntetem fel, amelyek kapcsolódnak a dolgozat anyagához)

Emellett az alábbi taxonómiai publikációt tartom kiemelkedőnek:

Tóth EM., Borsodi AK. (2014) The Family *Nocardioideae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg

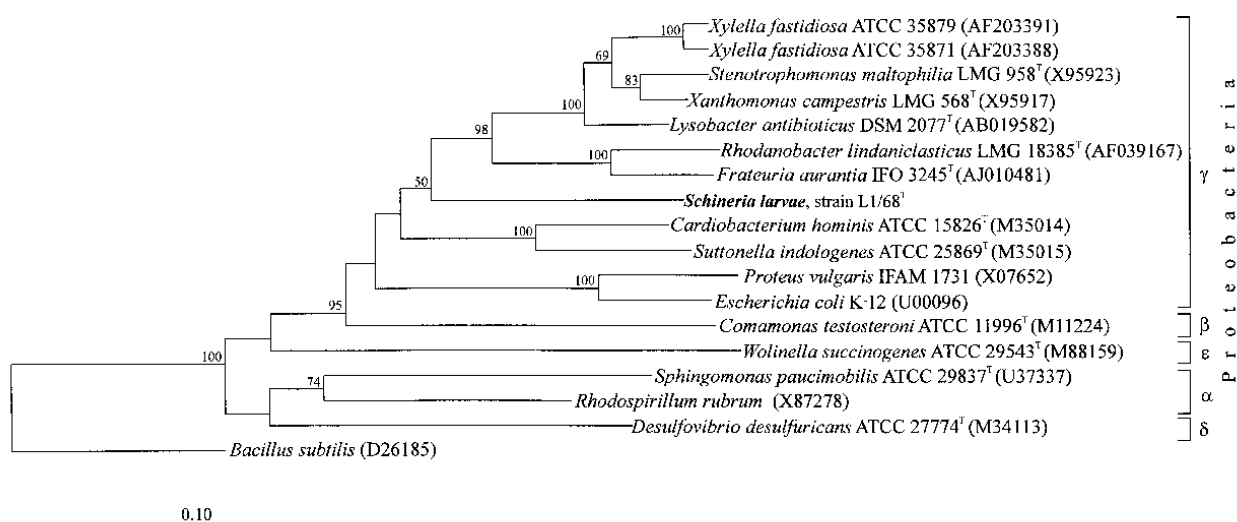
6.1 *Schineria larvae* gen. nov. sp. nov., nevezéktani revíziója - *Ignatzschineria larvaea* (Tóth és mtsai, 2007.)

eredete: *Wohlfahrtia magnifica* légy 3. stádiumú lárvája

(Az első, általam új taxonként felfedezett baktérium, részletes taxonómiai leírás Tóth és mtsai., 2001, itt csak a filogenetikai pozícióját mutatom be, ezen baktérium taxonómiai leírása 2001-ben a PhD dolgozatom része volt, itt ezen baktérium kapcsán felmerült nevezéktani problémákra hívom fel a figyelmet).

Filogenetikai elemzés eredményei:

A baktériumtörzsek filogenetikai analízise a csoportot egy teljesen különálló leágazásnak mutatta a γ -proteobaktériumok körében (20. ábra).



20. ábra. L1/68^T baktériumtörzs filogenetikai helyzetét mutató, 16S rRNS gén alapján készült neighbour-joining filogenetikai törzsfá. Csak az 50%-nál magasabb bootstrap értékeket mutatjuk, bar: 100 nt.

Az általunk izolált baktériumok a γ -proteobaktériumokon belül egy új nemzetséget képviseltek, *Schineria larvae* (shi'ner.i.a. N.L. fem., lar'vae. L. gen. fem.) nevet javasoltunk számukra.

Sajnos 2005-ben kiderült, hogy tévedtünk a baktériumunk névválasztásakor, az általunk adott név „Schineria” a Bacteriological Code (2/51b(4) pontja szerint illegitim, mert egy ritka Diptera rovarnak is ez a nemzetség neve: *Schineria* Rondani, 1857 (Animalia: Arthropoda: Insecta: Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha: Tachinidae) [Index to Organism Names (Thomson BIOSIS) at <http://www.organismnames.com/query.htm>]. Ezért egy nevezéktani revízióval a baktérium nevét meg kellett változtatnunk: eredetileg is Ignatz Rudolph Schiner (1813–1873) számára szeretnénk volna emléket állítani, aki először írta le az általunk vizsgált légyfajt (*Wohlfahrtia magnifica*), így az új név (hosszadalmas ellenőrzések után) *Ignatzschineria* (lg.natz.schi.ne'ri.a. N.L. fem. n.) larvae lett (Tóth és mtsai., 2007).

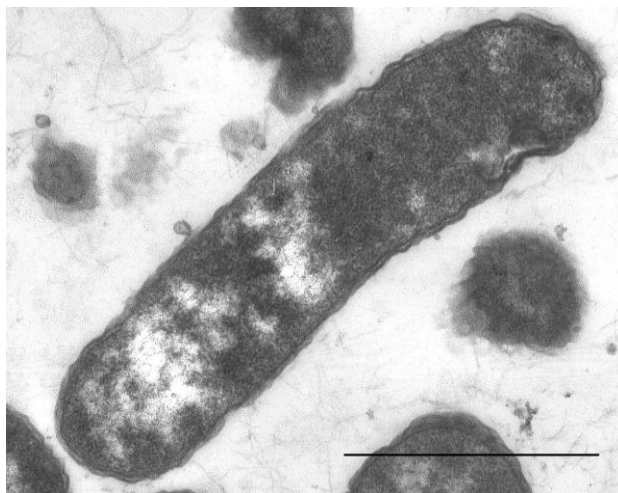
6.2 Wohlfahrtiimonas chitiniclastica gen. nov. sp. nov. (Tóth és mtsai., 2008)

A *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae) parazita légyfaj 3. stádiumú lárváiból kerültek elő az E43 és S5 jelzésű baktériumtörzsek. Ezek a baktériumok a mi korábban izolált *Ignatzschineria larvae* baktériumunkkal mutattak legnagyobb hasonlóságot (93,8-94,8% szekvencia egyezés a 16S rRNS génjükben), minden más korábban izolált taxontól távolabb estek. A 93,8%-os hasonlóság is igen alacsony, ez már előre vetítette, hogy ismételen új nemzetséget találtunk.

A típusörzs szekvenciájának GenBank/EMBL/DDBJ azonosító száma: AM397063.

Morfológiai tulajdonságok:

A baktérium sejtjei Gram negatív festődésű, egyenes, 1,5-2,0 x 0,5-1,0 μm méretű pálcák. King B agaron kis méretű, konvex, sima felületű, fényes kolóniákat képeznek. Elektronmikroszkópos képük nem mutatott az *Ignatzschineria larvae* esetén jól körülírt invaginációkat (8. kép). Csillózatot nem találtunk, mozgásra nem képes baktérium.



8. kép. *W. chitiniclastica* S5^T törzsének transzmissziós elektronmikroszkóppal készült képe. Bar: 1 μ m.
Fotó: Kovács Attila

Fiziológiai és biokémiai karakterizálás eredményei

Szigorúan aerob baktérium. Optimálisan pH 5,0-10,5 között, 28-37°C-on mutat növekedést, kataláz és oxidáz pozitív.

Negatív Voges–Proskauer reakcióban, eszkulin, ureáz kazein, selatin és keményítő bontásban, triptofánból indolt nem képez, cizteinből H₂S-t nem képez és a TWEEN 80-t sem degradálja. Erős kitináz aktivitással rendelkezik. Biolog tesztben pozitív reakciót mutatott az alábbi szubsztrátok hasznosításában: glikogén, Tween 80, D-fruktóz, D-mannóz, D-pszikóz, mono-metillsukcinát, ecetsav, hangyasav, α -hidroxi-vajsav, propionsav, szukcinilsav, bróm-szukcinilsav, szukcinaminsav, D-alanin, L-alanin, L-alanilglicin, L-aszparagin, L-aszpartát, L-glutaminsav, L-ornitin, L-fenilalanin, L-treonin, glicerol, α -keto-vajsav, α -keto-glutársav és DL-tejsav, negatív volt α -ciclodextrin, dextrin, N-acetil-D-galaktózamin, N-acetil-D-glükózamin, adonitol, L-arabinóz, D-arabitol, cellobióz, i-eritritol, L-fukóz, D-galaktóz, gentiobióz, α -D-glükóz, m-inozitol, α -D-laktóz, laktulóz, maltóz, D-mannitol, β -metil-D-glükózid, raffinóz, L-ramnóz, D-szorbitol, sukroz, trehalóz, turanóz, xilitol, cis-akonitsav, citromsav, D-galaktonsav-lakton, D-galakturonsav, D-glükonsav, D-glükózaminsav, D-glukuronsav, β -hidroxi-vajsav, p-hidroxi-fenilecetsav, D-szaccharinsav, glukuronamid, alaninamid, glicil-L-aszparaginsav, glicil-L-glutaminsav, L-hisztidin, hidroxi-L-prolin, L-pirolglutamát, DL-karnitin, inosit, uridin, timidin, feniletilamin, putreszcín, 2-aminoetanol, DL- α -glicerol foszfát, glükóz-1-foszfát, glükóz-6-foszfát, malonsav, α -ketovaleriánsav és itakonsav. Az általunk izolált 2 törzs TWEEN 40, mellibióz, metilpiruvát, L-leucin, L-prolin, D-

szerin, L-szerin, α -amino-vajsav és 2,3-butándiol bontásában különbséget mutatott. Erőteljes kitinbontó képességgel rendelkezik.

Elkülönítését legközelebbi rokonától a 4. táblázat mutatja:

Tulajdonság	<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	<i>Ignatzschineria larvae</i>
Oxidáció:		
Glikogén	++	-
Cisz-akonitsav	-	+++
Citromsav	-	+++
Glicil-L- aszparaginsav	-	+++
Glicil-L-glutaminsav	-	+++
L-hisztidin	-	+++
L-piroglutaminsav	-	+++
D-pszikóz	+++	v
Metilpiruvát	v	v
Hangyasav	+++	v
D-fruktóz	+++	v
γ -hidroxi-vajsav	-	+++
Propionsav	+++	-
γ -amino-vajsav	v	+++
Glicerol	++	v
Oxidáz reakció	+	v
Foszfatáz reakció	v	+++
Ureáz aktivitás	-	+++
H ₂ S képzés	-	+++
Növekedés pH=5	+++	-

4. táblázat. S5^T, E43 baktériumok fenotípusos elkülönítése az *Ignatzschineria larvae* (DSM 13226^T) baktériumtól (Tóth és mtsai., 2008).

A táblázatból jól látszik, hogy számos fenotípusos tulajdonságban térnek el új izolátumaink legközelebbi rokonuktól, az *Ignatzschineria larvae* baktériumtól.

Kemotaxonómiai jellemzés:

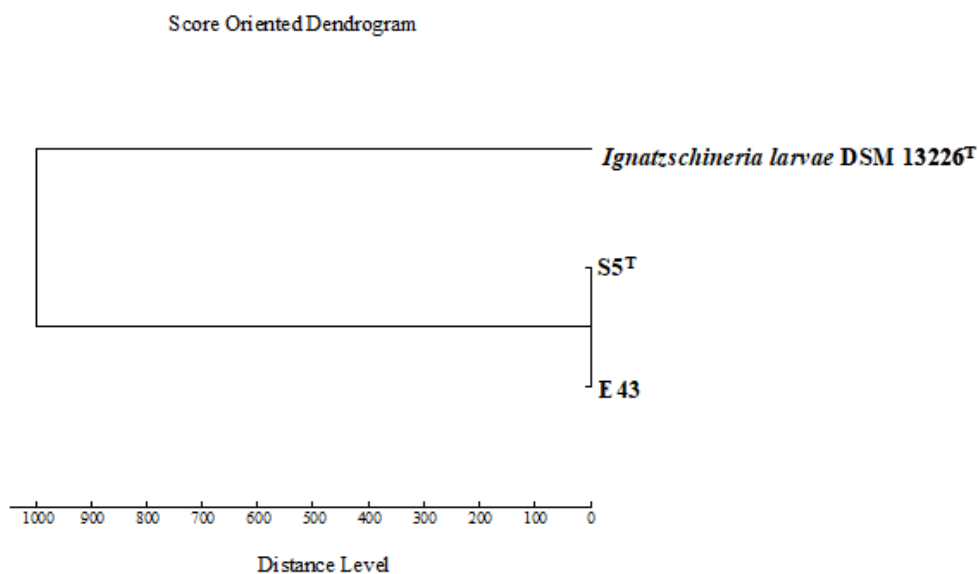
Sejtfala diamino-pimelinsavat tartalmaz. Fő izoprenoid kinonja a Q-8, minor komponensként megjelenik a Q-7 és Q-9. Fő zsírsavait az *Ignatzschineria larvae* (DSM 13226^T) törzssel együtt az 5. táblázat tartalmazza:

Strain	Fatty acid composition (%)									
	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{16:1}	C _{18:1}	C _{12:0} 3OH	C _{14:0} 3OH	C _y C _{18:0}	C _y C _{19:0}
S5 ^T	5.24	21.82	7.67	-	-	47.24	2.45	-	-	7.32
E43	5.69	24.52	7.11	-	-	44.61	2.58	-	-	6.77
DSM 13226 ^T	-	20.1	23.1	0.6	2.8	30.7	2.8	6.0	8.9	-

5. táblázat S5^T, E43 és DSM 13226^T törzsek zsírsavprofiljának összehasonlítása (Tóth és mtsai, 2008 alapján). (A vizsgálathoz a baktériumtörzseket azonos körülmények között tenyésztettük, a fő zsírsavakat bekeretezés jelzi). Poláris lipidjeik a foszfatidil glicerín (PG), a foszfatidil atanol-amin (PE) és a foszfatidil szerin (PS).

A típus törzs DNS-ének G+C aránya: 44,3mol%.

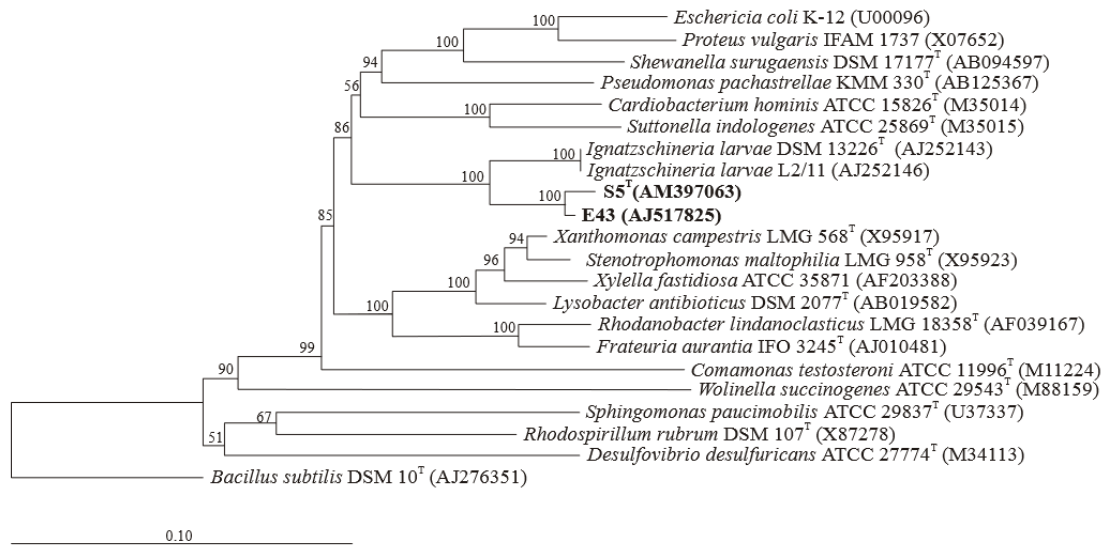
MALDI-TOF MS spetrumuk az újonnan izolált baktériumoknak hasonló volt és egyértelmű elkülönülést mutatott az *I. larvae* DSM 13226^T törzstől (21. ábra).



21. ábra. BioTyper software (1.1. verzió, Bruker) segítségével, S5^T, E43 és *Ignatzschineria larvae* DSM 13226^T baktériumok MALDI-TOF MS spektruma alapján készült dendrogram

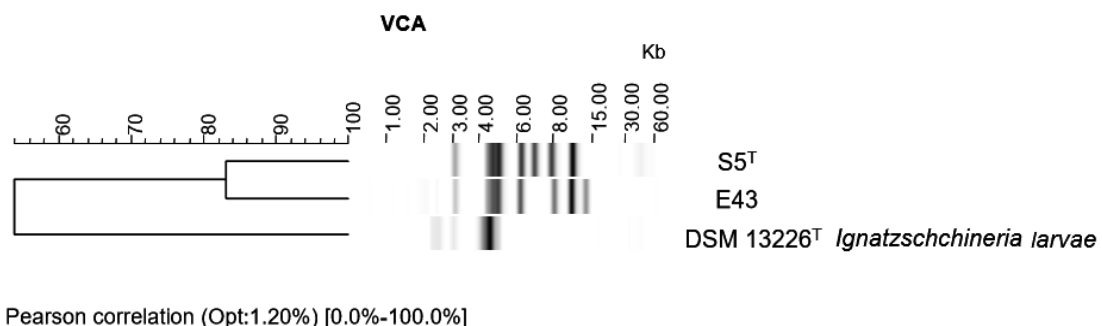
Filogenetikai elemzés eredményei:

Az E43 és S5^T baktériumtörzsek filogenetikai helyzetét a 22. ábra mutatja, γ -proteobaktériumokhoz történő tartozásuk egyértelmű.



22. ábra. Az E43 és S5^T baktériumtörzsek filogenetikai helyzetét mutató, 16S rRNS gén alapján készült neighbour-joining filogenetikai törzsfá. Csak az 50%-nál magasabb bootstrap értékeket mutatjuk, bar: 100 nt.

A két baktériumtörzs 16S rRNS génjükben egymáshoz 98,4%-os hasonlóságot mutatott, legközelebbi rokonuk az általunk korábban leírt *Ignatzschineria larvae* (DSM 13226^T): az S5^T 93.8 %, míg az E43 94,4%-os hasonlósággal. További rokonaik és hasonlósági értékei (16S rRNS génben): *Suttonella indologenes* ATCC25869^T, 84.9 %; *Cardiobacterium hominis* ATCC 15826^T, 85.3 %; *Pseudomonas pachastrellae* KMM 330^T, 87.4 %; *Shewanella surugaensis* DSM 17177^T, 87.5 %; *Proteus vulgaris* IFAM 1737, 85.6 %; *Escherichia coli* K-12, 85.9 %; *Xanthomonas campestris* LMG 568^T, 87.7 %; *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958^T, 87.3 %; *Xylella fastidiosa* ATCC 35871, 87.9 %; *Lysobacter antibioticus* DSM2077^T, 86.2 %; *Rhodanobacter lindanoclasticus* LMG 18385^T, 87.7 %; *Frteuria aurantia* IFO3245^T, 86.4 %). Elkészítettük a 3 baktérium RiboPrint profilját is (23. ábra).



23. ábra. S5^T, E43 és DSM 13226^T törzsek RiboPrint elemzés során készült dendrogramja (UPGMA, Pearson korrelációs koefficiens).

Az összegző elemzés azt mutatta, hogy két baktériumtörzs (S5^T és E43) RiboPrint elemzésük szerint hasonlósága magas (82,5%), míg az *Ignatzschineria larvae* típus törzsétől jelentősen elkülönülnek (54%).

A végső választ arra a kérdésre, hogy a két baktériumtörzs (S5^T és E43) azonos fajhoz tartoznak-e vagy sem, DNS-DNS hibridizációjuk adta 78,5 (ismétlésben 86,9)%-os értékkel, ami meghaladja a 70%-os határértéket, ezért a két újonnan izolált baktériumtörzset azonos fajhoz tartozónak fogadtuk el.

Eredményeink alapján ezt a baktériumot új nemzetséghez soroltuk, *Wohlfahrtiimonas* (Wohl'fahr.ti.i.mo'nas. N.L. n. Gr. fem. n.) *chitiniclastica* (chi.ti.ni.clas'ti.ca. N.L. neut.) gen. nov., sp. nov. néven 2008-ban leírtuk. Típus törzsnek a S5-t jelzésűt választottuk, 2 független törzsgyűjteményben deponáltuk (DSM 18708=CCM7401)

Fontos megjegyzés:

Baktériumunkat egy parazita légyfajból izoláltuk, könnyen tenyésztethető, jól növekedő baktérium. Fenntartásához KingB táptalajt használtunk, véres agaron nem mutatott hemolízist, ezért munkánk során nem igényelt különleges körülményeket, Risk 1 fokozatú baktériumként deponáltuk a törzsgyűjteményekben.

Azonban az idő előreheladtával a *W. chitiniclastica* baktériumot egyre gyakrabban írták le humán kórokozóként, időnként fatális kimenetelű szepsziseket okozva (Rebaudet és mtsai., 2009; Almuzara és mtsai., 2011; Conelli és mtsai., 2019). És bár az esetek többségében légylárvá fertőzöttség is kísérte az eseteket, mindenképp érdemes megjegyezni, hogy a baktériummal a továbbiakban Risk 2-ként szükséges dolgozni.

6.3 *Nocardioides hungaricus* sp. nov. (Tóth és mtsai., 2011)

eredete: budapesti ivóvíz hálózat

A baktériumtörzsek szekvenciájának GenBank/EMBL/DDBJ azonosító számai: 1RaM5-12^T: AM981198; 1RaM5-3: AM981197; és 1RaM5-15: AM981199.

3 Gram pozitív baktériumot izoláltunk Budapest ivóvíz hálózatából 2007-ben R2A (Reasoner & Geldreich, 1985) táptalajról a vízrendszer vizsgálata során (1RaM5-12^T, 1RaM5-3 és 1RaM5-15.)

Morfológiai jellemzés:

A baktériumtörzsek Gram pozitív, szabályos pálcá alakú baktériumok 0.4-0.6x0.9-1.7 µm mérettel. Endospórát nem képeznek, nem mozognak. R2A táptalajon fehér, fényes, kerek, konvex kolóniákat képeznek.

Fiziológiai és biokémiai karakterizálás eredményei:

20-37 °C között növekednek, 20-28°C optimummal, növekedésük optimális pH tartománya 6-7 között van, habár 5-9 között is képesek szaporodásra. 0-2,5% NaCl koncentrációt tolerálnak.

Glükózt sem oxidatív, sem fermentatív úton nem bontják, ureáz és foszfatáz aktivitásuk, Voges-Proskauer és metilvörös reakciójuk, triptofánból történő indolképzésük, H₂S produkciójuk ciszteineből negatív. Nitrátot nem redukálják nitritté. API CH50 tesztben az eszkulin hidrolízist kivéve minden szubsztrátra negatív reakciót mutattak. Alkalikus foszfatázt, észterázt (C4), észteráz lipázt (C8), leucin arilamidázt, valin arilamidázt, savas foszfatázt, naftol-AS-BI-foszfohidrolázt, β-galaktozidázt, α-glükozidázt és β-glükozidázt termelnek.

Rokonaiktól való fenotípusos elkülönítésük eredményeit a 6. táblázat tartalmazza.

Tulajdonság	1		2		3	4
	1RaM5-12 ^T pálca	1RaM5-15 pálca	1RaM5-3 pálca	pálca, kokkusz	pálca, kokkusz	pálca
sejt alakja						
sejt mérete (µm)	0.4- 0.6x0.8- 1.7	0.5- 0.6x0.9- 1.6	0.5- 0.6x1.0- 1.7	0.5- 0.6x1.2 -1.6	0.8-1.0x1.7- 2.0	0.4-0.8x1.5- 10.0
pálca-kokkusz sejtciklus mozgás	-	-	-	+	+	-
kolónia színe	fehér	fehé r	fehér	krém	krém	fehér
oxidáz reakció	-	-	-	-	+	+
Hőmérsékleti optimum (°C)	20-28	20- 28	20-28	35	30	25
pH optimum	6-7	6-7	6-7	8	6-7	6-7
NaCl% optimum	0-2.5	0- 2.5	0-2.5	ND	ND	0-0.5
Nitrát redukció nitritté	+	+	+	+	+	-
Hugh és Leifson teszt	-	-	-	-	ND	ND
H ₂ S produkció	-	-	-	ND	ND	-
Hidrolízis:						
eszkulin	+	+	+	+	+	ND
kazein	-	-	-	-	+	ND
zselatin	+	-	-	+	ND	ND
Tween 80	+	+	+	-	+	w
keményítő	-	-	-	+	-	+
Enzim aktivitások						
alkalikus foszfatáz	+	+	+	+	-	+
észteráz (C4)	+	+	+	-	-	+
lipáz (C14)	w	+	+	-	-	-
β-galaktozidáz	+	w	+	-	-	-
valin arilamidáz	w	-	-	w	-	-
cisztein arilamidáz	-	-	-	+	+	-
trypsin	-	-	-	+	+	-
α-Glükózidáz	+	+	+	+	+	-
β- Glükózidáz	+	+	+	-	w	-
Izolálás helye		Ivóvíz rendszer		Olajpala- oszlop	Talajvíz	Talaj

6. táblázat. A 1RaM5-12^T, 1RaM5-3, 1RaM5-15 és rokonaik fenotípusos különbségei. Törzsek: 1, 1RaM5-12^T, 1RaM5-3 és 1RaM5-15; 2, *Nocardioides pyridinolyticus* OS4^T; 3, *N. aquiterrae* GW-9^T; 4, *N. hankookensis* DS-301^T. Adatok Yoon és mtsai. (2008) és saját vizsgálatok. +, pozitív; -, negatív; ND, nem meghatározott; w, gyengén pozitív

Kemotaxonomiai jellemzés:

A kemotaxonomiai elemzés szerint a törzsek (a többi *Nocardioides* fajhoz hasonlóan) LL-DAP-t tartalmaztak, fő izoprenoid kinonjuk a MK8(H₄) és az egyetlen kimutatható poláris lipidjük a difoszfatidil-glicerin volt.

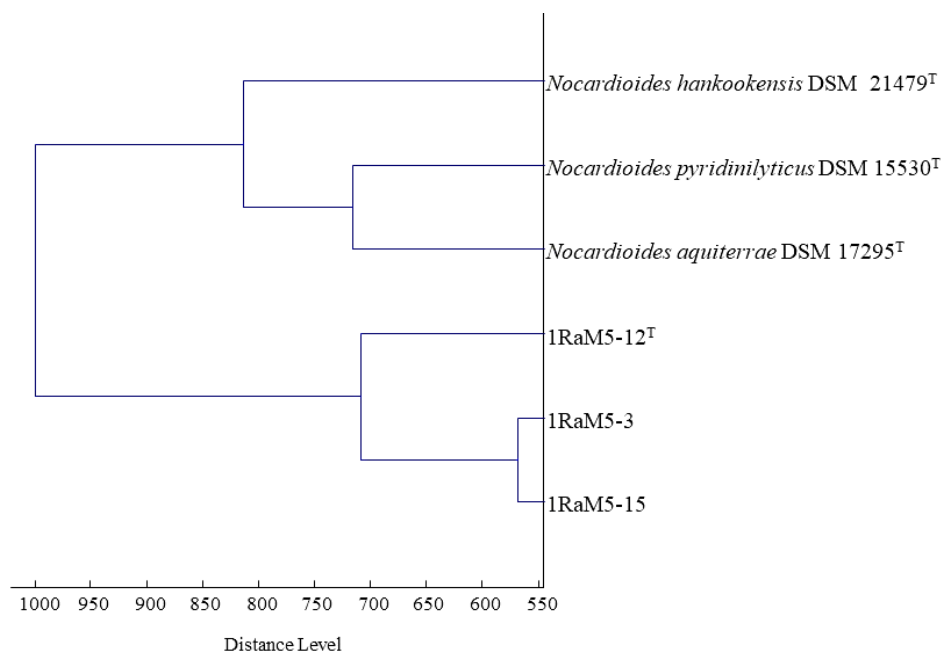
Zsírsvaikat az 7. táblázat tartalmazza.

zsírsvak	1RaM5-12^T	1RaM5-15	1RaM5-3
egyenes szénláncú zsírsvak			
C _{16:0}	1.21	3.14	1.08
C _{17:0}	0.95	0.75	0.86
C _{18:0}	0.89	0.73	0.94
elágazó zsírsvak			
iso C _{15:0}	4.11	4.72	4.47
anteiso C _{15:0}	0.94	0.93	0.83
iso C _{16:0}	62.04	47.03	51.33
iso C _{16:1} H*	0.45	1.02	0.90
iso C _{17:0}	2.11	1.89	2.41
anteiso C _{17:0}	7.58	7.12	8.6
anteiso C _{17:1} ω _{9c}	0.19	0.45	0.43
iso C _{18:0}	1.29	0.93	1.34
telítetlen zsírsvak			
C _{16:1} ω _{7c}	1.13	6.35	1.67
C _{17:1} ω _{8c}	1.46	3.92	4.18
C _{18:1} ω _{9c}	3.46	7.59	7.78
C _{18:1} ω _{7c}	-	2.01	0.35
10-metil zsírsvak			
10-Me C _{16:0}	3.48	-	3.59
10 Me C _{17:0}	3.82	3.75	5.13
10 Me C _{18:0}	3.83	2.69	3.77
(TBSA)			

*A kettős kötés pozíciója nem meghatározott

7. táblázat. A 1RaM5-12^T, 1RaM5-3 és 1RaM5-15 baktériumtörzsek zsírsvak összetétele, a tenyésztés TSA (Difco) történt 28 °C-on 2 napig. A fő bekeretezéssel jelöltük.

A törzsek és legközelebbi rokonaik MALDI-TOF tömegspektruma alapján készült dendrogram a 24. ábrán látható.



24. ábra. Baktériumtörzsek MALDI-TOF tömegspektrumából BioTyper software (version 1.1, Bruker Daltonics) által készült dendrogram. Baktériumok: 1RaM5-12^T, 1RaM5-3 and 1RaM5-15 (saját izolátumok), *Nocardiooides pyridinolyticus* (DSM 15530^T), *N. aquiterrae* (DSM 17295^T) and *N. hankookensis* (DSM 21479^T).

A MALDI-TOF elemzés baktériumtörzseinket közeli rokonoknak mutatta, és elkülönítette legközelebbi rokonaiktól.

A típus törzs G+C mol%-a: 71.4 mol%.

Filogenetikai elemzés eredményei:

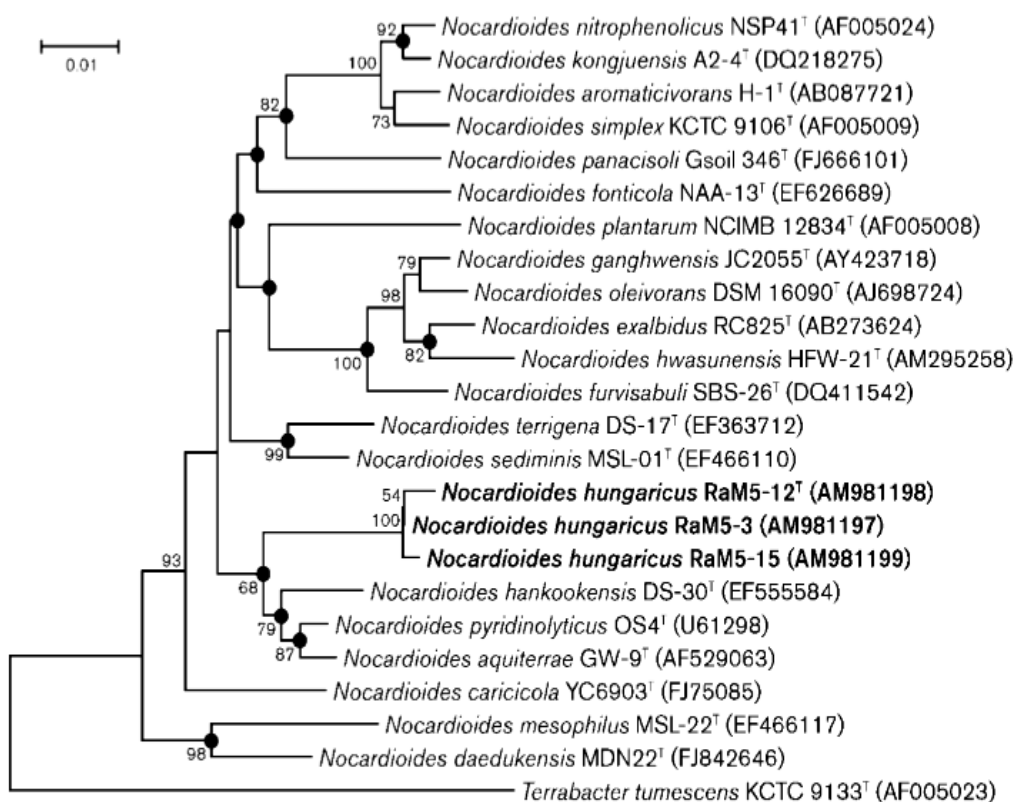
A baktériumtörzsek és rokonaik filogenetikai dendrogramja a 25. ábrán látható.

A Kimura 2-paraméteres módszerrel készült neighbour-joining filogenetikai fa szerint a 1RaM5-12^T, 1RaM5-3 és 1RaM5-15 egy elkülönülő csoportot képeznek a *Nocardiooides* nemzetségben belül.

(Megjegyzés: A minimum evolution és maximum-parsimony algoritmusokkal készült filogenetikai fák is hasonló eredményt mutattak, az adatokat nem közöljük itt).

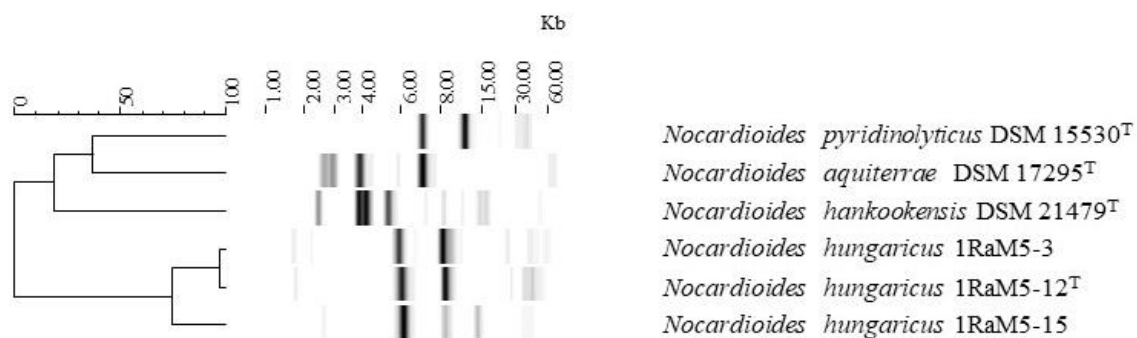
Típus törzsünk (1RaM5-12^T) legközelebbi rokonai *N. pyridinolyticus*, *N. aquiterrae*, *N. sediminis* és a *N. hankookensis* voltak: 1RaM5-12^T és *N. pyridinolyticus* OS4^T (96,06%), *N. aquiterrae* GW-9^T (95,72%), *N. sediminis* MSL-01^T (95,43%) and *N. hankookensis* DS-30^T (95,37%) hasonlóságokkal 16S rRNS génjeik

alapján. Minden más *Nocardioides* faj a 16S rRNS génben 95,2% alatti hasonlóságot mutatott.



25. ábra. 16S rRNA génszekvenciák alapján készült neighbour joining filogenetikai fa, amely az 1RaM5-12^T, 1RaM5-3 és 1RaM5-15 törzsek filogenetikai pozícióját mutatja rokonaik körében. A filogenetikai fán csak a >50%-nál magasabb bootstrap értékeket tüntettük fel, nóduszok jelölik azon lágazásokat, amelyek a “minimum evolution” és “parsimony” algoritmusokkal is ugyanilyen leágazásokat mjelezték. Bar, 1 bázispárnyi szubsztitúciót jelöl 100 bázispáronként.

Mind a fenotípusos eredmények, mind a filogenetikai elemzés azt mutatta, hogy az általunk izolált három baktérium egymással nagyfokú hasonlóságot mutatnak, ezért feltételezhetően azonos fajhoz tartoznak - 16S rRNS génjük hasonlósága: 1RaM5-12^T a 1RaM5-15 törzshöz 99.2%, 1RaM5-12^T a 1RaM5-3 törzshöz 99.6% és a 1RaM5-15 törzs az 1RaM5-3 törzshöz 99.7%. Azonos taxonhoz való tartozásukat az elvégzett RiboPrint elemzés is alátámasztotta (26. ábra).



26. ábra. 1RaM5-12^T, 1RaM5-3, 1RaM5-15, *Nocardioioides pyridinolyticus* (DSM 15530^T), *N. aquiterrae* (DSM 17295^T) és *N. hankookensis* (DSM 21479^T) együttesen ábrázolt PvuII RiboPrint profilja. Az elemzéskor Pearson koefficiens alapján UPGMA analízist választottunk.

Fiziológiai és biokémiai karakterisztikumai eltérései, fehérjék MALI-TOF spektruma, RiboPrint profiljuk, és 16S rRNS génjük nagyfokú különbözőségei, valamint a filogenetikai elemzések alátámasztották, hogy törzseink egy új fajt képviselnek a *Nocardioioides* nemzetségben belül. Fajnévnek a *Nocardioioides hungaricus* sp. nov. nevet javasoltuk, (hun.ga'ri.cus, M.L. masc. adj. hungaricus, utalva a törzsek magyarországi eredetére. Típus törzsnek a 1RaM5-12^T baktériumot választottuk (DSM 21673^T=NCAIM 02330^T).

6.4 *Aquipuribacter hungaricus* gen. nov. sp. nov. (Tóth és mtsai., 2012).

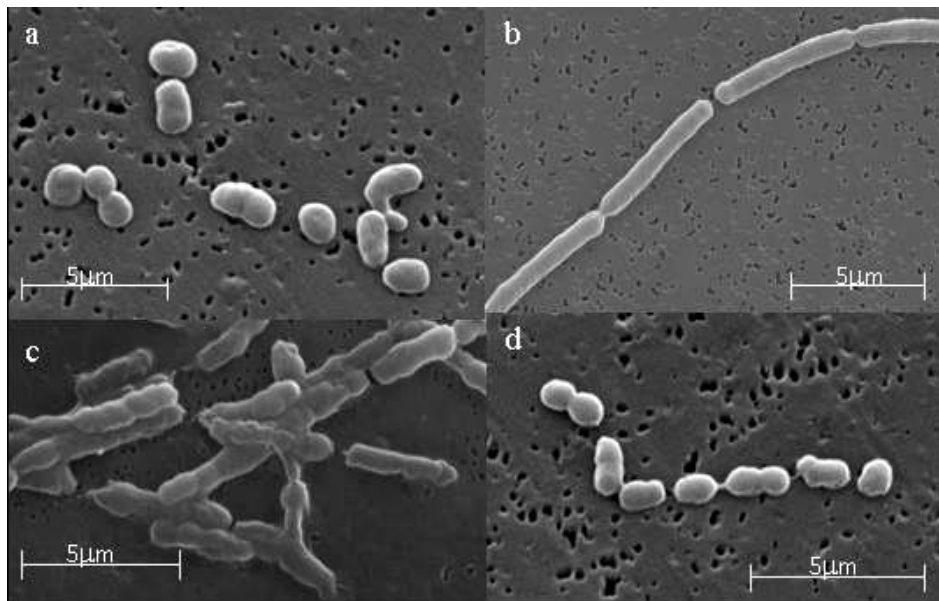
eredete: ultratiszta víz (magyarországi erőmű ultratiszta vizet előállító rendszere)

Szekvenciájának GenBank/EMBL/DDBJ azonosító száma: FM179321

Egy igen érdekes baktériumtörzs (IV-75^T) izoláltunk R2A agaron az általunk vizsgált magyarországi erőmű vízellátó rendszeréből. Eleinte azt gondoltuk, nem lehetséges a baktériumot tiszta tenyészetben előállítani, mert a mikroszkópos felvételeken többször, többféle morfológiai típust is megfigyelhettünk. Végül sikerült megfejteni a rejtélyt: a baktérium speciális morfológiai sejtciklussal rendelkezik és minden más szempontból is különbözik minden eddig leírt taxontól. 16S rRNS génje alapján egközelebbi rokona az *Arsenicoccus bolidensis* CCUG 47306^T (94.3%) volt. Ez alapján az érték alapján feltételeztük, hogy baktériumunk új nemzetség tagja lesz.

Morfológiai jellemzés:

A IV-75^T baktériumtörzs Gram pozitív festődésű, jellegzetes sejtciklussal jellemezhető (9. kép): kb. 44 óráig a baktériumtörzs sejtjei főleg osztódó gömb (kokkus) formát mutatnak (a), ezután (76-84 óra) megnyúlnak, szabályos pálca formát vesznek fel (b). Kb. 90 óra múlva a pálcák (amelyeken eddigre időnként elágazások is megfigyelhetők - c) újra legömbölyödnek (d).



9. kép. A IV-75^T baktériumtörzs morfológiai sejtciklusa (fotó: Tóth és mtsai, 2012), Fotó: Makk Judit

Fiziológiai és biokémiai karakterizálás eredményei:

A IV-75^T baktériumtörzs számos tulajdonságában különbözött legközelebbi rokonaitól (8. táblázat), mindamelllett, hogy rokonaihoz hasonlóan oxidáz reakciója, ureáz aktivitása, zselatin és kazein bontása negatív volt, nem rendelkezett foszfatáz, lipáz, β -glükuronidáz, α -mannozidáz és α -fukozidáz aktivitással, nem képezett H₂S-t ciszteineből és indolt triptofánból, negatívnak bizonyult a Voges-Proskauer reakciója is.

Tulajdonság	1	2	3	4
NaCl tolerancia	0-2.5	0-5	0-5	0-2.5
növekedés pH intervalluma	6-9	5-9	5-9	6-8
nitrát redukciója nitritig	-	+	+	+
Hidrolízis:				
keményítő	+	+	+	-
Tween 80	-	+	+	-
Savképzés:				
L-arabinóz	+	-	-	-
D-xilóz	-	+	+	-
D-fruktóz	-	+	+	+
D-galaktóz	-	+	+	-
D-glükóz	-	+	+	+
D-mannitol	-	+	+	-
arbutin	-	+	+	-
N-acetil-glükózamin	-	+	-	-
szalicin	-	+	+	-
D-cellobióz	-	+	+	-
D-maltóz	-	+	+	+
D-laktóz	-	+	+	-
D-melibióz	-	+	+	-
D-szacharóz	-	+	+	+
D-trehalóz	-	+	+	-
D-raffinóz	-	+	+	+
gentiobióz	-	+	+	-
glikogén	-	+	-	+
K-5-ketoglükonát	+	-	-	-
Enzimaktivitás (API ZYM)				
alkalikus foszfatáz	+	+	+	-
észteráz (C4)	+	+	+	-
észteráz lipáz (C8)	+	+	+	-
leucin arilamidáz	+	+	+	-
valin arilamidáz	+	-	-	-
cisztein arilamidáz	+	-	-	-
tripszin	-	-	-	+
Naftho-AS-BI-foszfohidroláz	-	+	+	+
α -galaktozidáz	+	+	-	-
β -glükozidáz	+	+	-	+
N-acetil- β -glükózaminidáz	+	-	-	-

8. táblázat. A IV-75^T baktériumtörzs fenotípusos különbözőségei legközelebbi rokonaitól.

Taxonok: 1, IV-75^T baktériumtörzs; 2, *Arsenicoccus bolidensis* DSM 15745^T; 3, *Arsenicoccus bolidensis* DSM 30750 4, *Arsenicoccus piscis* DSM 22760^T; +, Pozitív; -, negatív; (a tesztek mind saját eredmények).

Kemotaxonomiai jellemzés eredményei:

Kemotaxonomiai analízis már rávilágított, hogy a IV-75^T baktériumtörzs még a tágabb csoporton belüli jelentősebb elkülönülést mutat: fő menakinonja a MK-10(H₄) volt, ami nem jellemző legközelebbi nemzetségekre - *Arsenicoccus*, *Ornithinimicrobium* és *Serinicoccus*

nemzetségek mindegyike MK-8(H₄)-t termel légzési elektrontranszport láncában. Sejtfalában *meso*-Dpm-t találtunk karakterisztikus diaminosvaként, ami szintén elhatárolta a közeli nemzetségektől (ezt a molekulát mindössze a *Serinicoccus* nemzetség 2 fajában találták - Traiwan *et al.*, 2010), minden más *Serinicoccus* faj ornitint tartalmaz, míg a legközelebbi nemzetségre, az *Arsenicoccus* nemzetségre az LL-Dpm jellemző, az *Ornithinimicrobium* nemzetség képviselői pedig ornitint tartalmaznak sejtfalukban.

Megállapítottuk tehát, hogy baktériumtörzsünk peptidoglikán A1 γ típusú sejtfallal rendelkezett, ami nem igazán jellemző a rokon nemzetségekre.

A IV-75^T baktériumtörzs zsírsavprofilját (legközelebbi rokonaiéval együtt a 9. táblázat mutatja. Citoplazma membránjának fő zsírsava az anteiso-C_{15:0}, ami rokonaitól szintén elkülöníti.

Zsírsavak	1	2	3	4
Telített zsírsavak				
C _{13:0}		0.1		
C _{14:0}	1.3	2.3	1.6	
C _{15:0}	0.7	2.2	1.3	0.8
C _{16:0}	9.2	11.1	5.3	1.6
C _{17:0}	3.9	4.6	2.2	4.2
C _{18:0}	7.3	4.2	1.3	1.9
C _{19:0}		0.1		
C _{16:0} N alkohol	1.2			
Telítetlen zsírsavak				
C _{15:1} ω 6c		0.4	0.5	
C _{16:1} ω 5c				
C _{16:1} ω 7c	1.4	12.9	14.1	1.5
C _{17:1} ω 8c	0.8	4.2	5.7	4.3
C _{18:1} ω 5c				
C _{18:1} ω 9c	17.5	11.2	12.8	1.4
C _{18:3} ω 6c (6, 9, 12)	7.8			
C _{16:1} ω 7c alkohol				
Sum In Feature 6 (C _{19:1} ω 11c/C _{19:1} ω 9c)		0.2	0.3	
Telített, elágazó láncú zsírsavak				
iso-C _{13:0}	0.3	2.9	0.9	1.1
iso-C _{14:0}	2.2	13.7	10.1	5.5
iso-C _{15:0}	5.3	14.8	21.6	37.4
iso-C _{16:0}	3.8	4.1	8.7	11.8
iso-C _{17:0}	3.0	0.6	1.3	2.5
anteiso-C _{13:0}		1.2	0.3	
anteiso-C _{15:0}	29.8	7.3	6.3	10.2
anteiso-C _{17:0}	4.6	1.2	2.1	5.9
10Me17:0			0.4	1.0
TBSA 10Me18:0			0.2	

Telítetlen, elágazó láncú zsírsavak			
iso-C _{15:1} ω _{9c}		0.1	1.4
iso-C _{16:1}		0.6	2.2
iso-C _{17:1} ω _{9c}	0.2	1.3	2.5
anteiso-C _{17:1} ω _{9c}		0.8	2.8

9. táblázat. A IV-75^T baktériumtörzs és az *Arsenicococcus* nemzetség tagjainak zsírsavprofiljának összehasonlítása. Taxonok: 1, IV-75^T baktériumtörzs; 2, *Arsenicococcus bolidensis* DSM 15745^T; 3, *Arsenicococcus bolidensis* DSM 30750 4, *Arsenicococcus piscis* DSM 22760^T. A törzseket R2A táptalajon 28 °C-on, 72 óráig növesztjük, vizsgálatukat párhuzamosan végeztük. Saját új baktériumunk fő zsírsavait piros négyzög jeöli.

IV-75^T baktériumtörzs foszfatidil glicerolt, két nem azonosított foszfolipidet, egy glikolipidet tartalmazott poláris lipidként.

Teljes genomjának G+C aránya: 75 mol%.

Már ezidáig is érdekes újdonságokat tudtunk meg baktériumtörzsünk kapcsán, úgy tűnt, nehéz besorolni bármely taxonómiai egységbe, minden jelenleg létező nemzetségtől jól elkülöníthető volt, ezt mutatja a 10. táblázat is.

Taxon	Sejt morfológia	Peptidoglikán diaminosav	G+C (mol%)	Fő menakinon	Poláris lipid	Peptidoglikán típus
IV-75 ^T	pálca-kokkusz	<i>meso</i> -Dpm	75	MK-10(H ₄)	PG, DPG, Pls, GLs	A1gamma (A31)
<i>Arsenicococcus</i> *	sejtciklus kokkusz	LL-Dpm	71-72	MK-8(H ₄)	ND	A3gamma (A41.1)
<i>Ornithini-microbium</i> †	szabálytalan pálcák és kokkuszok	L-Orn, [L-Lys]	69-71	MK-8(H ₄)	PI, PG, DPG, PLs, GLs	ND
<i>Serinicoccus</i> ‡	kokkoid formák	L-Orn, [<i>meso</i> -Dpm]	72-73.5	MK-8(H ₄)	PI, PG, DPG, GL, [PC]	ND [A1gamma (A31)]

10. táblázat. A IV-75^T baktériumtörzs és a rokon nemzetségek elkülönítése. Rövidítések: Dpm, 2,6-diaminopimelinsav; Lys, lizin; Orn, ornitin; példa izoprenoid kinonra: MK-8(H₄), részlegesen telített láncú menakinon, amelyben a 8 izoprén egységből 2 telített; DPG, difoszfatidil-glicerol; PG, foszfatidil-glicerol; PI, foszfatidil-inozitol; PL(s), azonosítatlan foszfolipid(ek); GL(s), azonosítatlan glikolipid(ek); ND, nincs elérhető adat. A szögletes zárójelben lévő adatokat csupán néhány faj esetén publikálták.

*Adatok Collins és *mtsai*. (2004) és Hamada és *mtsai*. (2009).

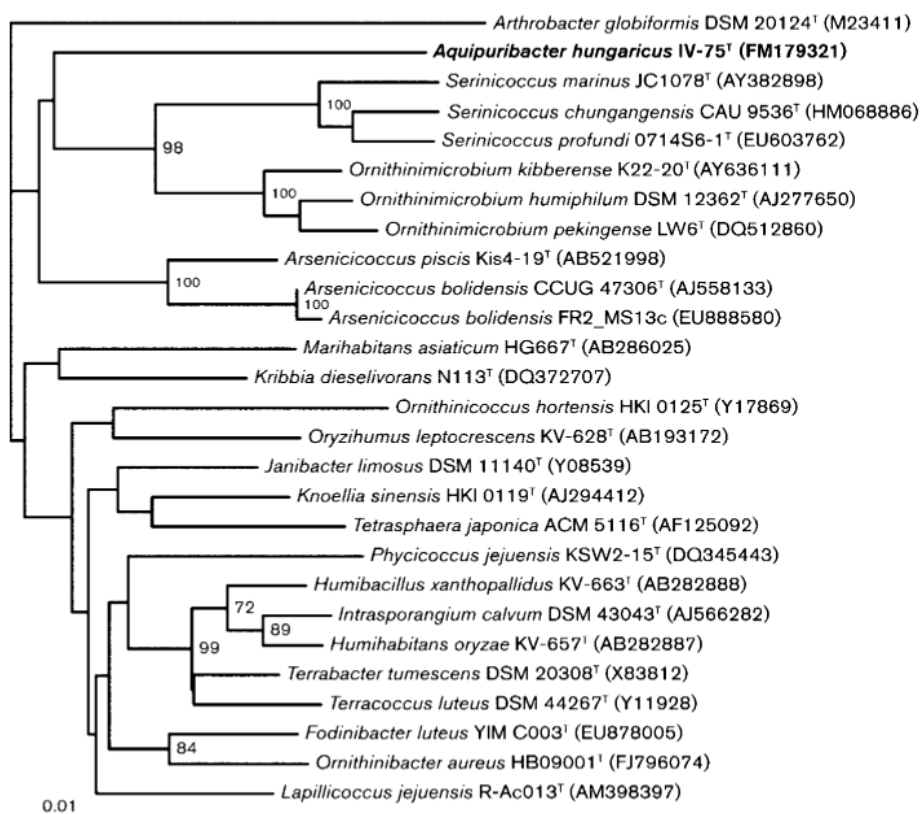
† Adatok Groth és *mtsai*. (2001), Mayilraj és *mtsai*. (2006) and Liu és *mtsai*. (2008)

‡ Adatok Yi és *mtsai*. (2004), Traiwan és *mtsai*. (2011) and Xiao és *mtsai*. (2011)

§Schleifer & Kandler (1972) és (http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?content_id=35) nyomán.

Filogenetikai jellemzés eredményei:

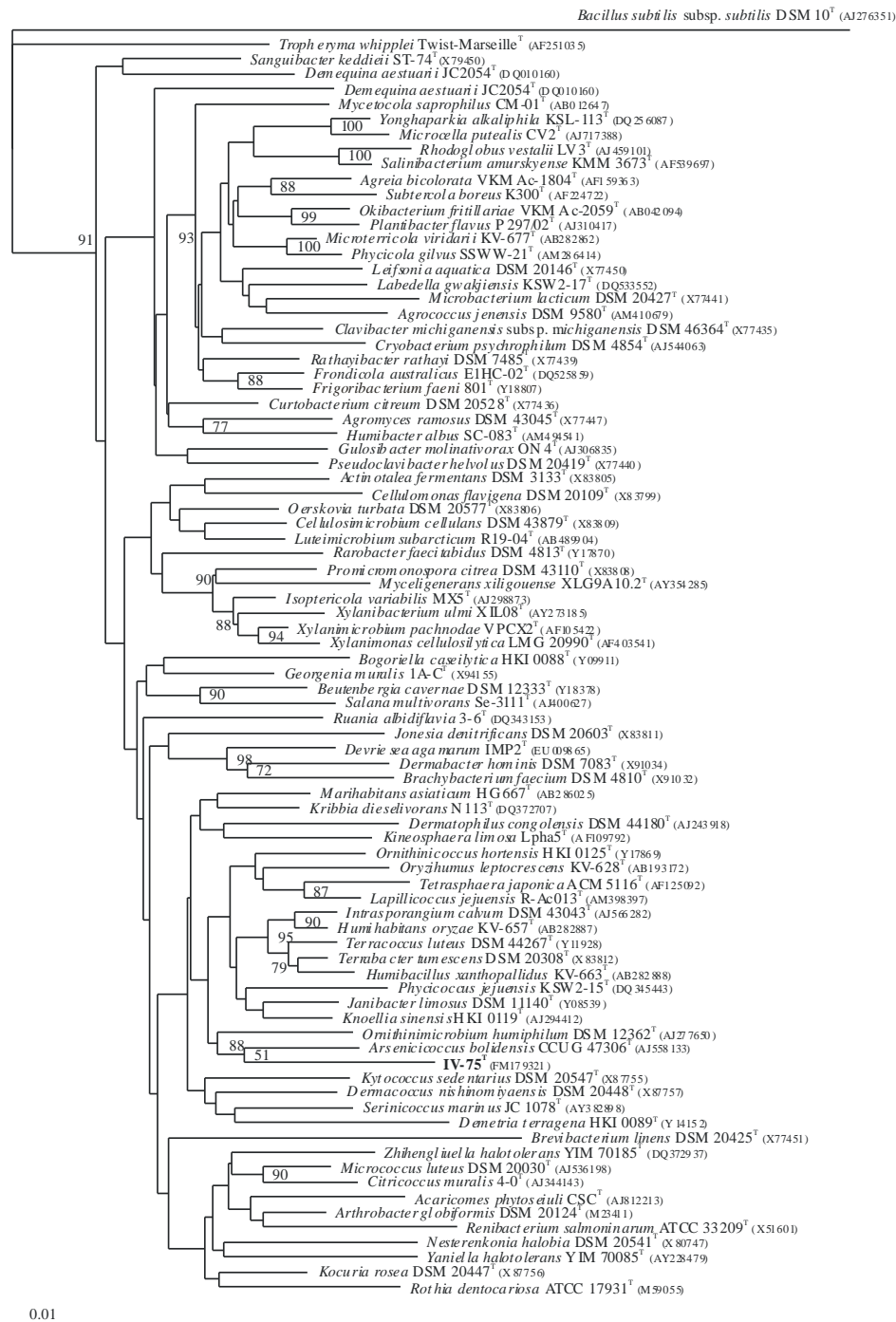
16S rNS génje alapján a IV-75^T baktériumtörzs legközelebbi rokonai: *Arsenicococcus bolidensis* CCUG 47306^T, 94.3%; *Arsenicococcus piscis* Kis4-19^T, 93.6%; *Ornithinimicrobium kibberense* K22-20^T, 94.0%; *Ornithinimicrobium humiphilum* DSM 12362^T, 93.2%; *Ornithinimicrobium pekingense* LW6^T, 92.7%; *Serinicoccus profundus* 0714S6-1^T, 92.1%; *Serinicoccus marinus* JC1078^T, 91.9%; és *Serinicoccus chungangensis* CAU 9536^T, 91.9%. Ez alapján látható, hogy törzsünk különböző nemzetségekhez mutat alacsony, de közeli hasonlóságot, amit filogenetikai pozíciója is tükrözött (27. ábra). A 41. ábrán a IV-75^T baktériumtörzs filogenetikai pozíciója látszik a *Micrococcineae* alrend tagjai között.



27. ábra. A IV-75^T baktériumtörzs és rokonaik 16S rNS génszekvenciái alapján Neighbour-joining módszerrel készült filogenetikai fa. Külső csoportnak az *Arthrobacter globiformis* DSM 20124^T használtuk. Bar, 0,01 szubsztitúciót jelöl nukleotid pozícióként. A fán csak a 40 %-nál magasabb bootstrap értékeket jelöltük.

Ugyanakkor a Micrococcinae alrend típusfajainak típusörzsei felhasználásával, 16S rNS gének alapján készült filogenetikai fa azt mutatta, hogy a IV-75^T baktériumtörzs köztes pozíciót foglal el az Intrasporangiaceae, Dermacoccaceae és a Dermatophilaceae család

képviselői között. Az *Arsenicococcus bolidensis* és *Ornithinimicrobium humiphilum* alcsoporthoz tartozását is csupán 51%-os bootstrap érték jelölte (28. ábra) (a különböző faszerkesztési módokkal készült filogenetikai elemzések hasonló csoportosulást mutattak, a részletes adatokat itt nem tüntettem fel).



28. ábra. IV-75^T baktériumtörzs filogenetikai pozíciója a *Micrococcineae* alrend tagjai között (16S rRNS génjeik alapján). A 70%-nál magasabb bootstrap értékeket tüntettük fel (valamint a IV-75^T baktériumtörzs és az *Arsenicococcus bolidensis* közötti értéket), külső csoportnak a *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10^T törzset használtuk. Bar, 0,01 szubsztitúciót jelöl nukleotid pozícióként.

Ezért az *Intrasporangiaceae*, *Dermacoccaceae* és a *Dermatophilaceae* család 16S rRNS génjében lévő szignatúra nukleotidjait (Zhi és mtsai., 2009) összehasonlítottuk saját baktériumtörzsünk ugyanezen pozícióival (11. táblázat).

Pozíció(k)	Baktériumtörzs IV-75 ^T	1*	2*	3*
120	A	A	A	A
131:231	A-G	A-G	Y-K	A-G
196	U	G	A	C
342:347	C-G	C-G	C-G	C-G
444:490	U-A	a-u	A-U	A-U
580:761	C-G	U-A	U-A	U-A
602:636	C-G	C-G	C-G	C-G
670:736	A-U	A-U	A-U	A-U
822:878	G-C	G-C	G-C	G-C
823:877	G-C	G-C	G-C	G-C
826:874	C-G	C-G	C-G	C-G
827	U	U	U	U
843	C	U	U	c
950:1231	U-A	U-A	U-A	U-A
1047:1210	G-C	G-C	G-C	G-C
1109	C	C	C	C
1145	G	G	G	G
1309:1328	G-C	G-C	G-C	G-C
1361	G	C	G	G
1383	C	C	C	C

11. táblázat. A IV-75^T baktériumtörzs és a rokon családok 16S rRNS génjében lévő szignatúra nukleotidok összehasonlítása. *Intrasporangiaceae* (1), *Dermatophilaceae* (2) és *Dermacoccaceae* (3). A kis betűvel jelzett nukleotidok nem minden baktériumtörzsben vannak jelen az adott csoporton belül. Az Y, C vagy U; K, G vagy U; Vastaggal jelöltük azon nukleotidokat, amelyekben a IV-75^T baktériumtörzs eltérést mutatott. * Adatok: Zhi és mtsai., (2009).

Ezek alapján megállapítottuk, hogy a IV-75^T szignatúra nukleotidjai 3-5 pozícióban eltérést mutattak minden rokonuktól a vizsgált családok körében, így baktériumunkat egyik családba sem sikerült egyértelműen besorolni. Azonban a törzs egyértelműen az *Arsenicococcus* és az *Ornithinimicrobium* nemzetségek típusfajainak típustörzseivel csoportosult, és mindkettő az *Intrasporangiaceae* család tagja, ezért jelen esetben IV-75^T baktériumtörzset az *Intrasporangiaceae* családhoz soroltuk (megjegyzés: egyetlen baktériumtörzs alapján nem lehetséges új családot létrehozni, ha később további, jelen törzshöz tartozó baktérium kerül leírásra, új családot definiálni akkor nyílik mód).

Végül az új baktériumot *Aquipuribacter hungaricus* (A'quae.pur.i.bac.ter, L. n., L. fem. adj. pura pure, Gr. n. bakterion; N.L. masc. n. Aquaepuribacter; hun.ga'ri.cus, M.L. masc. adj. hungaricus) néven írtuk le 2012-ben. Típus törzse: IV-75^T (5DSM 21674^T=NCAIM B 02333^T).

6.5 *Gellertiella hungarica* gen. nov. sp. nov. (Tóth és mtsai, 2017).

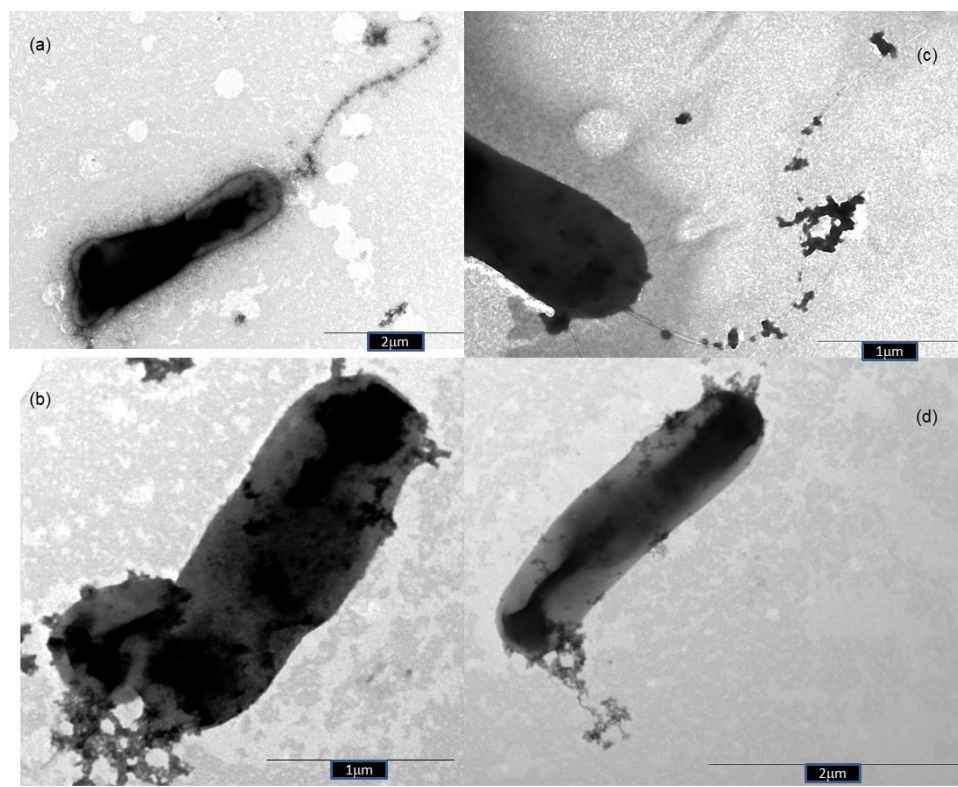
eredete: fürdővíz

16S rRNS génje szekvenciájának GenBank/EMBL/DDBJ azonosító száma: LN651200.

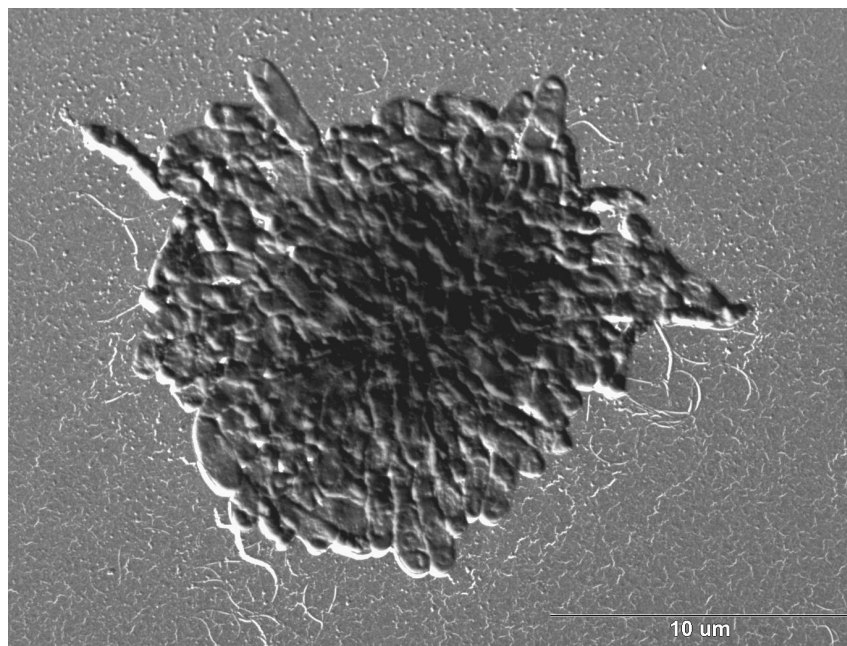
Munkáink során egy, a Rhizobiaceae családhoz tartozó baktériumot izoláltunk 2013-ban a Gellért fürdő egy 36°C-os medencéjéből R2A táptalajon történő direkt izolálást követően (RAM11^T).

Morfológiai jellemzés:

A RAM11^T baktérium törzs Gram negatív sejtfalszerkezetű, bimbózáásra és folyékony táplevesben rozetta képzésre volt képes. Poláris flagellummal aktívan mozgó baktérium (10-11. képek), sejtjeinek mérete: 0.4-0.6x1.1-2.1 μm. R2A táptalajon kisméretű, fényes, áttetsző fehér kolóniákat képezett.



10. kép RAM11^T baktérium transzmissziós elektron mikroszkópos (TEM) képe. (a) bimbózó sejtek és poláris flagellum (b) bimbózó sejtek (c) poláris flagellum (d) sötétlen festődő, elektrondenz sáv a sejt hosszában. Fotó: Bóka Károly



11. kép. RAM11^T baktérium rosetta képzésének transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) készült képe folyadék kultúrában. Fotó: Bóka Károly

Fiziológiai és biokémiai karakterizálás eredményei:

A RAM11^T baktériumtörzs szigorúan aerob, oxidáz és kataláz pozitív baktérium, 15-45°C-on mutat növekedést (optimuma 20-37°C), pH 5-10 között (optimuma 7-9), 0-1 w/v% NaCl (optimuma 0%) jelenlétében. Foszfátáz, zselatináz, α -amiláz, kazeáz, észteráz (C4), észteráz lipáz (C8), leucin arilamidáz, tripszin, savas foszfátáz, naphthol-AS-BI-foszfohidroláz, α -glükózidáz és N-acetil- β -glükózaminidáz enzimekkel rendelkezik. Eszkulint nem hidrolizál. AZ API 50CH a D-fruktózon kívül tesztben egyetlen szénforrásból sem képez savat. Az alábbi antibiotikumokra érzékeny: amoxicillin, ampicillin, cefoxitin, cefuroxim, penicillin G, netilmicin, imipenem, vankomicin, linezolid, neomicin, piperacillin+tazobactam kombináció, koproflaxacin, tobramicin, gentamicin, carbenicillin, meropenem és erythromicin, rezisztens a cefamandolra, polimixin B-re és a klindamicinre.

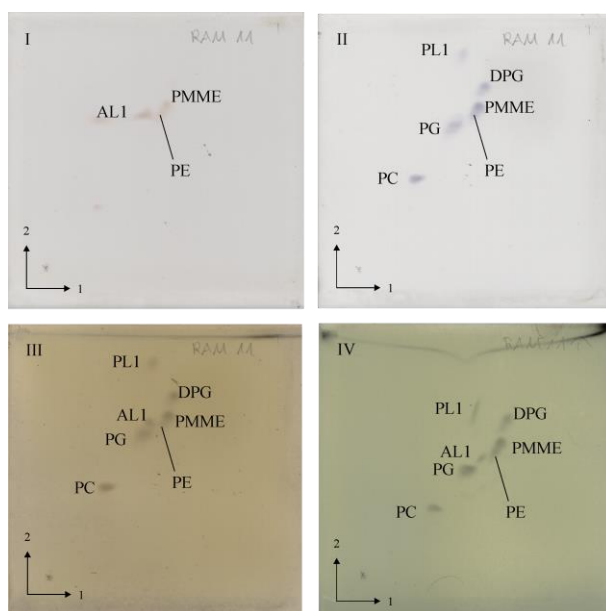
Legközelebbi rokonaitól való fenotípusos eltéréseit a 12. táblázat tartalmazza.

Tulajdonság	1	2 ^a	3	4	5	6
kolónia színe	áttetsző fehér	szürkés- fehér	áttetsző barnás	fehér	fényes sárga	fehér
növekedés R2A táptalajon	+	+	-	-	-	-
növekedés TSA táptalajon	gyenge	+	+	-	+	-
sejtméret (µm)	0,4- 0,6x1,1- 2,1	0,5- 1,3x1,5-2,5	0,8-10,x2,2- 2,4 ^b	0,5-0,6x1,5- 2,2	0,5- 0,8x2,0- 3,0	0,6- 0,9x1,5-2,4
sejt alakja és szerveződése	pálca	pálca	pálca	pálca	pálca és elágazó filament	pálca
csillózat	poláris, monotrich	poláris, subpoláris	- ^b	peritrich ^c	peritrich ^d	ND
Hidrolízis:						
eszkulin	+	-	-	+	-	+
zselatin	+	-	-	-	-	-
Savképzés:						
D-fruktóz keményítő	+	-	-	-	-	-
Növekedés:						
hőmérséklet (°C)						
tartomány	15-45	20-37	10-37	5-45	4-45	4-45
optimum	20-37	25-30	25-30	20-30	15-37	15-37
NaCl (% w/v)						
tartomány	0-1	0-3	0-3	0-2	0-3	0-2
optimum	0	1-2	1	0-1	1	1
pH						
tartomány	5-10	6-8	6-8	4-9	6-9	5-10
optimum	7-9	6-7	8	5-7	7-8	6-8

12. táblázat. RAM11^T baktériumtörzs és rokonai fenotípusos elkülönítése. 1. RAM11^T 2. *Ensifer adhaerens* LMG 20216^T 3. *Rhizobium azooxidifex* DSM 100211^T, 4. *Rhizobium leguminosarum* LMG 14904^T, 5. *Mycoplana dimorpha* DSM 7138^T, 6. *Ensifer americanus* DSM 15007^T. +, pozitív; -, negatív; Adatok az alábbiak kivételével a jelen vizsgálatokban készültek: a: Casida LE (1982), Willems és mtsai, (2003) and Kathiravan és mtsai (2013) b: Behrendt és mtsai (2016) c: Young (1999) d: Urakami és mtsai, (1990).

Kemotaxonomiai jellemzés:

A RAM11^T baktériumtörzs légzési kinonja a Q-10, foszfatidil-glicerolt (PG), foszfatidil-etanolamint (PE), foszfatidil-monometil-etanolamint (PMME), foszfatidil-kolint (PC), egy nem azonosított aminolipidet és egy nem azonosított foszfolipidet tartalmaz poláris lipidként (12. kép).



12. kép. RAM11^T baktériumtörzs poláris lipidjei két-dimenziós vékonyréteg kromatográfiás futtatást követően. Rövidítések: PG, foszfatidil-glicerol; PE, foszfatidil-etanolamin; PMME, foszfatidil-monometil-etanolamin; PC, foszfatidil-kolin; AL1, nem azonosított aminolipid; PL1, nem azonosított foszfolipid.

Sejtfala *meso*-diamino-pimelinsavat tartalmaz.

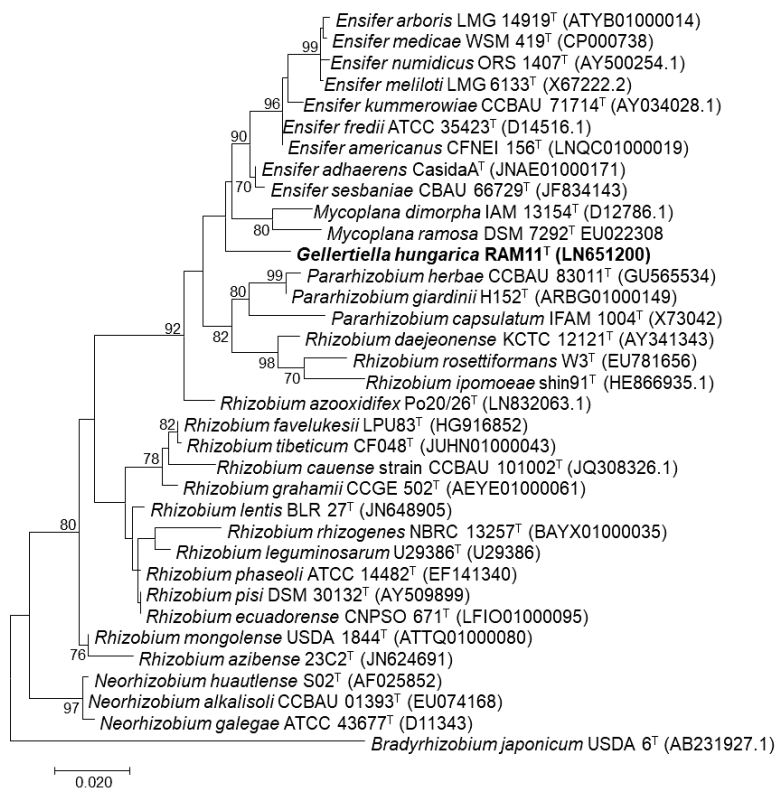
Jellegzetes zsírsavait a 13. táblázat mutatja, piros négyszög jelzi citoplazma membránjának jellegzetes, fő zsírsavmolekuláját..

Zsírsav	1	2	3	4	5	6
C _{15:0}	-	-	-	-	-	1,44
C _{16:0}	4,7	25,5	5,2	3,4	5,9	3,9
C _{17:1} ω8c	0,6	-	0,3	-	-	2,7
C _{17:1} ω6c	0,2	-	-	-	-	1,27
C _{17:0} cyclo	-	19,9	0,3	-	0,4	-
C _{17:0}	0,8	0,3	0,6	-	1,0	6,8
C _{18:1} ω7c	74,1	10,7	72,4	69,6	32,9	55,3
C _{18:0}	1,6	0,5	3,6	-	7,8	1,7
isoC _{17:0}	-	0,2	-	15,3	-	-
10MeC _{19:0}	-	-	-	1,9	-	-
11Me _{18:1} ω7c	9,3	-	-	-	7,8	0,1
C _{17:0} 3OH	0,2	-	-	-	-	0,1
C _{19:0} cyω8c	1,3	1,4	7,9	13,6	34,4	16,5
C _{19:0}	-	-	-	-	-	0,1
C _{20:1} ω7c	-	-	0,26	-	-	0,2
Summed feature 2	4,1	0,3	4,4	7,1	0,5	3,7
Summed feature 3	0,8	5,9	2,2	1,9	0,4	2,0

13. táblázat. RAM11^T baktériumtörzs és rokonai zsírsavösszetétele, fő zsírsavat bekeretezéssel jelöltem. 1. RAM11^T 2. *Ensifer adhaerens* TA12-B 3. *Ensifer americanus* DSM 15007^T 4. *Rhizobium azooxidifex* DSM 100211^T 5. *Rhizobium leguminosarum* LMG 14904^T 6. *Mycoplana dimorpha* DSM 7138^T. Adatok az alábbiak kivételével a jelen vizsgálatok során készültek: 2, Tralau és mtsai., és 4: Behrendt és mtsai (2016)

Filogenetikai elemzés eredményei:

A filogenetikai elemzés eredményei az újonnan izolált baktériumot egyértelműen a Rhizobiaceae családhoz tartozónak mutatta. Legközelebbi rokonai: *Ensifer adhaerens* Casida A 97.44%, *Ensifer* (syn *Sinorhizobium*) *americanus* CFNEI 156^T 96.87% és *Rhizobium azooxidifex* Po 20/26^T 96.76%, tehát különböző nemzetségekhez mutatott közel azonos mértékű hasonlóságot (mindegyikhez közel azonos mértékben), emellett a 16S rRNS génjük alapján készült filogenetikai fán is távoli csoportosulást mutatott ugyan az *Ensifer*, *Mycoplana* nemzetség tagjaival, de *Rhizobium* nemzetségtől egészen távol helyezkedett el (29. ábra).



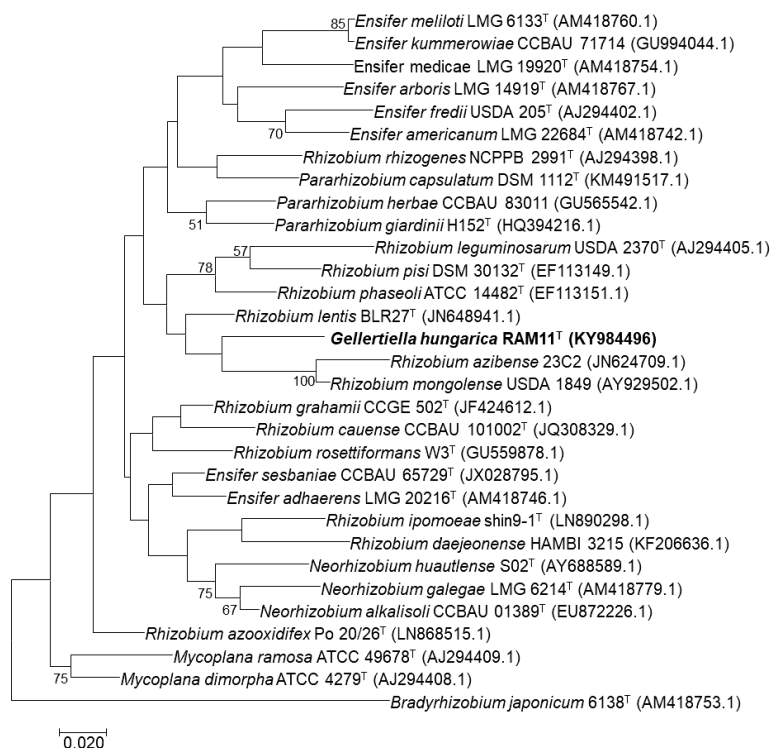
29. ábra A RAM11^T baktériumtörzs és rokonai 16S rRNS génje alapján készült ML filogenetikai törzsfája. Az ábrán csak a 70% fölötti bootstrap értékeket mutatjuk. Bar: 0,01 szubsztitúció nukleotidonként.

Ezért a filogenetikai analízist egyéb funkció génekkel is elvégeztük: *recA*, *atpD*, *glnII* (nod és nifH gének nem voltak jelen baktériumtörzsünk genomjában, ezért azokra bár teszteltük baktériumunkat, nem lehetett filogenetikai faszterkesztésre felhasználni.)

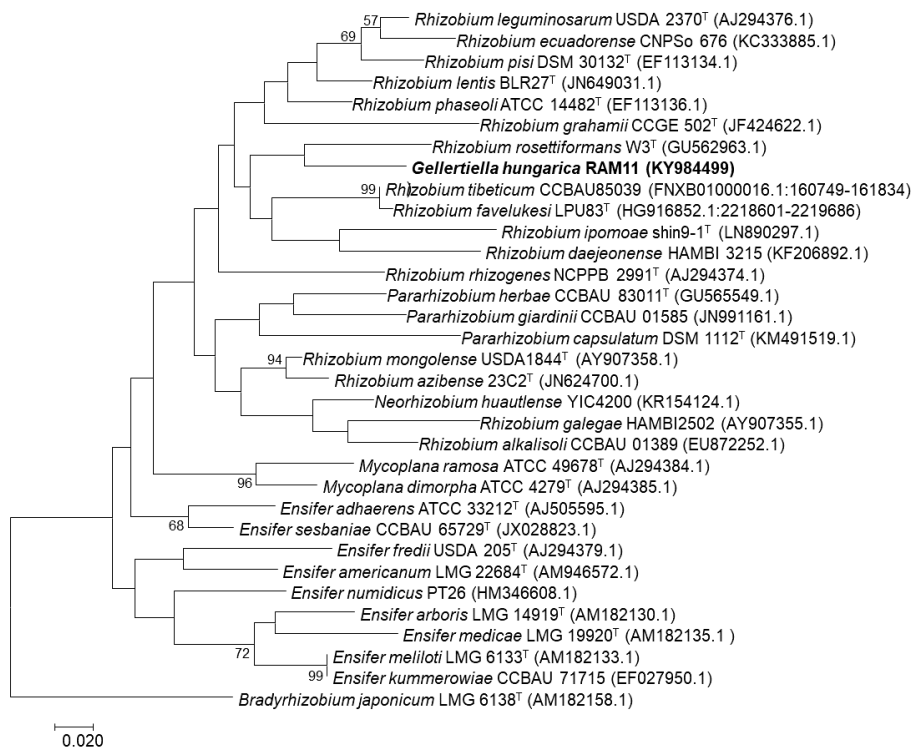
A vizsgálatok alapján készült filogenetikai fák az előzőekhez hasonló eredményeket mutattak (30-32. ábrák). A *glnII* gén (glutamin szintetáz) alapján a RAM11^T baktériumtörzs legközelebbi rokona az *Ensifer americanum* CFNEI173 (88.09%), *recA* (rekombináza) gén

alapján a *Rhizobium marinum* MGL06 (91.58%), az *atpD* (ATP szintáz β alegysége) *Agrobacterium tumefaciens* ZY-40s (92.79%), tehát baktériumtörzsünk ezen háztartási génjeinek szekvencia hasonlósága alapján különböző nemzetségek képviselőihez mutatott hasonlóságot.

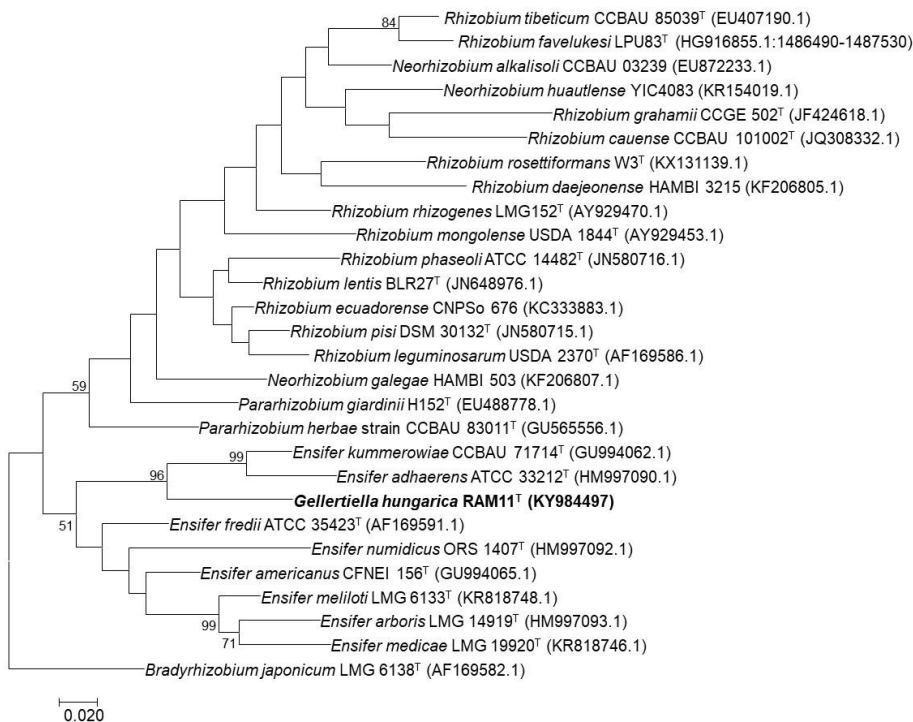
Ha a filogenetikai elemzést nézzük, az *atpD* és *recA* gének szekvenciái alapján készült filogenetikai fán a RAM11^T különböző *Rhizobium* fajokkal csoportosul, míg a *glnII* gén alapján készül ML (Maximum Likelihood) törzsfá az *Ensifer* nemzetség tagjaival való csoportosulást mutatja. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a RAM11^T baktériumtörzs egy különálló nemzetséghez tartozik.



30. ábra. RAM11^T baktériumtörzs és rokonai *atpD* gén alapján készült, ML törzsfája. Az ábrán csak az 50% feletti bootstrap értékeket tüntettük fel. Bar: 0,01 szubsztitúciót jelöl bázispáronként.



31. ábra. RAM11^T baktériumtörzs és rokonai *recA* gén alapján készült, ML törzsfája. Az ábrán csak az 50% feletti bootstrap értékeket tüntettük fel. Bar: 0,01 szubsztitúciót jelöl bázispáronként.



32. ábra. RAM11^T baktériumtörzs és rokonai *glII* gén alapján készült, ML törzsfája. Az ábrán csak az 50% feletti bootstrap értékeket tüntettük fel. Bar: 0,01 szubsztitúciót jelöl bázispáronként.

Az új baktériumot polifázikus taxonómiai elemzése alapján *Gellertiella hungarica* (Gel.ler.ti.el'la. N.L. dim. fem. n.; hun.ga'ri.ca, MN.L. fem. adj.) néven új nemzetségként írtuk le, utalva ezzel a baktérium eredetére (Gellért fürdő, Magyarország). Típustörzse a RAM11^T (=DSM 29853^T =NCAIM.B 02618^T)

6.6 *Phragmitibacter flavus* gen. nov. sp.nov. (Szuróczki és mtsai., 2020)

eredete: Fertő nádassal borított vízterülete

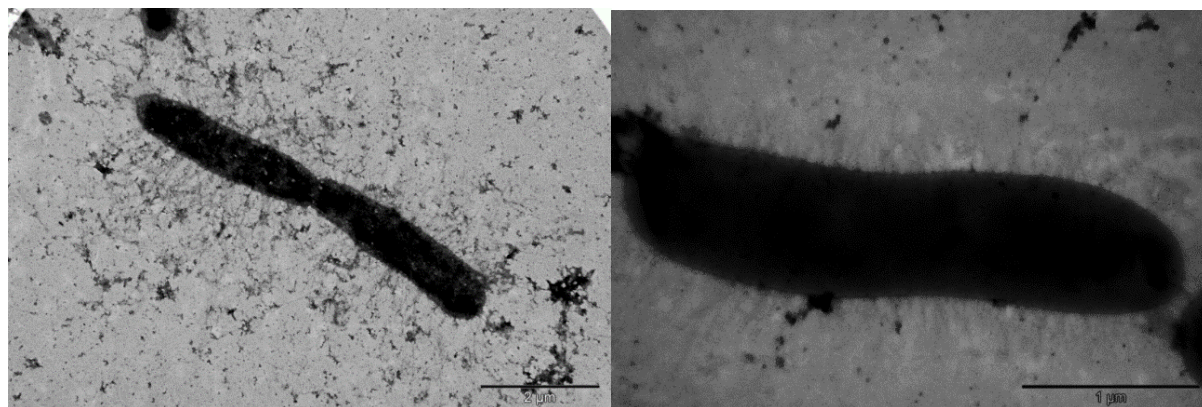
16S rRNS génje szekvenciájának GenBank/EMBL/DDBJ azonosító száma: MG799125. Teljes genomjának DDBJ/ENA/GenBank azonosítója: VAUV00000000.

2015 novemberében egy NKFIH (116275) pályázat keretében a Fertő nyílt vizét és nádassal benőtt területeit mintáztuk, ahonnan számos baktérium között az MG-N-17^T baktériumtörzset is izoláltuk.

Morfológiai jellemzés:

Az MG-N-17^T baktériumtörzs sejtjei pálca alakúak, méretük 2,28-3,23 x 0,42-0,72 µm. csillóval nem rendelkeznek, aktív mozgásra nem képesek, de elektronmikroszkópos felvételeken sejtjeiken számos pilus figyelhető meg (13-14. képek).

R2A táptalajon kis méretű, sárga, ép szélű, kerek kolóniákat képeznek.



13-14. képek. Az MG-N-17^T baktériumtörzs sejtjeinek elektronmikroszkópos képe. A sejteken jól megfigyelhető a nagyszámú pilus jelenléte. Fotó: Bóka Károly

Fiziológiai és biokémiai karakterizálás eredményei:

Az MG-N-17^T baktériumtörzs 15-35°C (optimuma 22-28°C) hőmérsékleten és pH 7,0-10,0 (optimuma 8,0–9,0) mutat növekedést, NaCl jelenlétét maximum 2%-ig tolerálja. Hidrolizálja a Tween 60, 20, pozitív ureáz és az α-amiláz aktivitása. Anaerob körülmények között nem növekedik még nitrát jelenlétében sem, triptofánból indolt és ciszteinből H₂S-t nem termel, kazeáz, zselatináz, DN-áz, foszfatáz, celluláz, kitináz aktivitása negatív. Az alábbi komponenseket nem bontja: Tween 80, eszkulin, tirozin, L-arginin. Az API 50CH és ZYM tesztekben elkülönülését legközelebbi rokonától a *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136^T törzstől az 14. táblázat mutatja.

Tulajdonság	MG-N-17^T	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> DSM 4136^T
izolálási hely	mezotróf tó	eutróf tó
színe R2A agaron	sárga	halvány sárga
hőmérséklet (°C)		
növekedés intervalluma	15-35	10-40*
pH növekedés		
intervalluma	7,0-10,0	6,0-10,0
optimuma	8,0-9,0	7,0-8,0
sejtek mérete (µm)	0,4-0,7 x 2,3-3,2	0,8-1,0 x 1,0-3,8
sejtek alakja	vékony pálca	pálca
prothaeca jelenléte	-	+
eszkulin hidrolízis	-	+
Tween 20 bontás	+	-
foszfatáz aktivitás	-	+
Hugh-Leifson ox.	-	+
Hugh-Leifson ferm.	-	+
Savképzés (API 50 CH):		
D-xilóz	-	w+
D-galaktóz	+	-
D-glukóz	+	-
inozitol	w+	-
D-cellobióz	-	+
D-maltóz	w+	+
D-laktóz	-	+
D-melibióz	-	+
D-melezitóz	-	+
D-Raffinose	-	+
gentiobióz	w+	+
D-turanóz	+	w+
L-fukóz	-	w+

Enzimaktivitás (API ZYM)		
tripszin	w+	-
savas foszfatáz	w+	-
α -mannozidáz	-	w+

14. táblázat. Az MG-N-17^T baktériumtörzsmorfológiai, fiziológiai és biokémiai karakterei alapján való elkülönítése legközelebbi rokonától. w: gyenge reakció

Kemotaxonómiai jellemzés:

Az MG-N-17^T baktériumtörzs az alábbi kinonokat termeli: MK-10, MK-11, MK-12 és MK-9. Zsírsvait az 15. táblázat tartalmazza. Fő poláris lipidjei a foszfatidil glicerol (PG), a difoszfatidil-glicerol (DPG), foszfatidil-etanolamin (PE), egy azonosítatlan foszfolipid és egy azonosítatlan glikolipid.

Zsírsvav	MG-N-17 ^T	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> DSM 4136 ^T
Summed Feature 2	-	tr
C _{12:0}	tr	tr
anteiso-C _{13:0}	tr	tr
C _{13:1} AT 12-13	-	tr
C _{13:0}	-	tr
iso-C _{14:0}	9,03	12,65
unknown 13,957	-	tr
C _{14:0}	3,67	3,99
unknown 14,502	-	tr
iso-C _{15:0}	tr	tr
anteiso-C _{15:0}	35,32	38,32
C _{15:0}	1,99	2,80
C _{16:1} ω 7c-OH	tr	tr
Summed Feature 2*	1,66	1,10
iso-C _{16:0}	1,50	tr
C _{16:1} ω 11c	tr	tr
C _{16:1} ω 5c	17,70	24,56
C _{16:0}	25,71	10,97
anteiso-C _{17:0}	tr	tr
C _{17:0}	tr	tr
C _{16:0} 3-OH	tr	tr

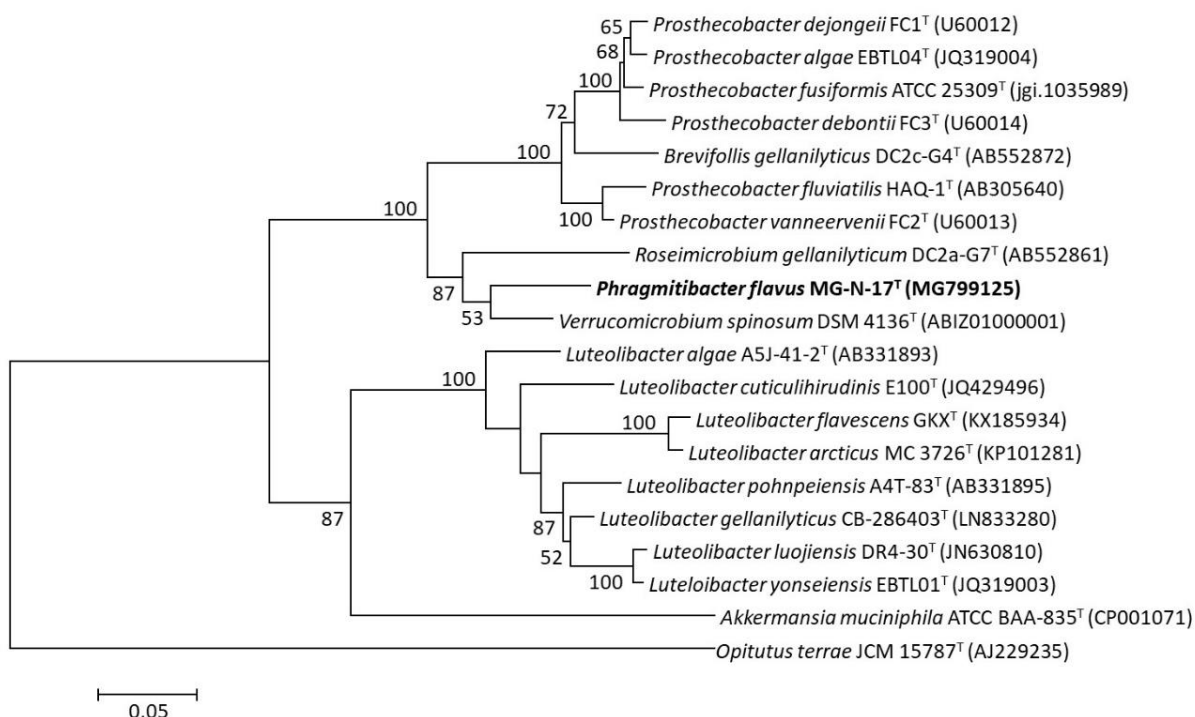
15. táblázat. MG-N-17^T baktériumtörzs és legközelebbi rokonának zsírsvavprofilja, az új baktériumtaxon fő zsírsvait bekeretezéssel jelöltem. tr: nyomnyi mennyiségben jelen lévő

Filogenetikai elemzés eredményei:

16S rRNS génje alapján az MG-N-17^T baktériumtörzs legközelebbi rokonai a *Verrucomicrobiaceae* család tagjai. Legmagasabb szekvencia hasonlóságot az alábbi

baktériumokkal mutatja (bár mind alacsony): *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136^T (94,38%), *Roseimicrobium gellanilyticum* DC2a-G7^T (91,55%), *Prostheco bacter fluviatilis* HAQ-1^T (90,82%) *Prostheco bacter fusiformis* ATCC 25309^T (90,47%) *Prostheco bacter vanneervenii* FC1^T (90,45%) és *Prostheco bacter dejongeii* FC2^T (90,32%). Az ML filogenetikai fán *V. spinosum* DSM 4136^T and *R. gellanilyticum* DC2a-G7^T törzsekkel csoportosul együtt (33. ábra), bár azokkal is csak 53 illetve 54% bootstrap értékekkel.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy baktériumunk a *Verrucomicrobiaceae* családon belül egy jól elkülönülő ágat, egy új nemzetséget képvisel.



33. ábra. MG-N-17^T baktériumtörzs rokonsági viszonyait szemléltető maximum likelihood filogenetikai fa. Az ábrán a 50%-nál nagyobb bootstrap értékeket tüntettük fel, bar 0,05 szubsztitúciót jelöl bázispáronként.

Teljes genom szekvenálás eredménye és összehasonlítása legközelebbi rokonával:

MG-N-17^T baktériumtörzs teljes genomja mintegy 44 kontigot tartalmaz, N50 értéke 348255 nukleotid, 56,5x lefedettségű értékkel.

A nyers szekvencia adatok alapján (BioProject ID PRJNA540970; GenBank azonosító: VAUV000000000) a teljes genom átlagos teljes azonossága (gANI) a *V. spinosum* DSM 4136^T baktériumtörzs (GenBank accession number ABIZ000000000.1) szekvenciájával 70.45 % volt. A genomiális adatok alapján egy rövid annotálást is elvégeztünk: flagelláris géneket a MG-N-17^T baktériumtörzs genomja nem tartalmaz a *V. spinosum* DSM 4136^T törzséhez hasonlóan, a

glikolízis és glükoneogenezis génjeik megegyeztek. Piridoxin lebontási útvonal, sziderofór atracelin (sziderofór bioszintézis operon) de novo purin bioszintézis gének és bifenil lebontási útvonal génjei a *V. spinosum* DSM 4136^T baktériumtörzsben kimutathatóak voltak, de a mi törzsünkben nem. Ugyanakkor az alábbi géneket megtaláltuk MG-N-17^T baktériumtörzsben, de hiányoztak a *V. spinosum* DSM 4136^T baktériumtörzs genomjából: cink rezisztenciáért felelős gének, ABC transzporter, fehérje deglikoziláció, kardiolipin szintézis, nitrit szintáz, terminális citokróm C oxidáz, aromás aminosav katabolizmus, poliamin metabolizmus, arginine bioszintézis, szerin-glioxalát ciklus, vegyes savas fermentáció génjei. Ezen adatok szintén azt erősítették meg, hogy az általunk izolált baktérium egy külön nemzetséghez tartozik.

A MG-N-17^T baktériumtörzs genomszekvenciája alapján számolt G+C arány 56,9 mol%.

Összesített eredményeink alapján az MG-N-17^T baktériumtörzset új nemzetséghez tartozó baktériumtaxonnak írtuk le *Phragmitibacter* (Phag.mi.ti.bac'ter. L. masc. n.) *flavus* (fla'vus. L. masc. adj.) néven írtuk le, típus törzsét 2 független törzsgyűjteményben helyeztük el (MG-N-17^T (=DSM 106674^T=NCAIM B.02643^T).

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkáink során általánosan azt tapasztaltuk, hogy számos környezeti probléma megoldható annak tükrében, ha a kérdésekre megfelelő módszerekkel próbálunk meg választ adni. A tenyésztési vizsgálatok együttes alkalmazása a modern, molekuláris biológia és kemotaxonómia széles tárházával hihetetlenül gazdag eszközt nyújt ahhoz, hogy megfelelő választ adhassunk a felmerült kérdésekre – még akkor is, ha időnként új módszerek/táptalajok kidolgozására van is szükség:

- Baktériumok volatilis végtermékeinek analizálására kidolgozott módszer segítségével egy potenciális légy csapdázó anyag kidolgozása vált lehetségessé. A kutatás során leírt új baktérium taxonok: *Schineria (Ignatzschineria) larvae* gen. nov. sp. nov. és **Wohlfahrtiimonas chitinoclastica gen. nov., sp. nov.**
- Mikrobiális közösségek szerkezetének és működésének feltárására egy jól működő, közösségi kemotaxonómiai módszert dolgoztunk ki, amellyel különböző markerek együttes vizsgálatára nyílt mód. Emellett a Bacteria és Archaea domének szerkezetének és működésének feltárása hozzájárult az üzemi biogáztermelés optimalizálásához egy szennyvíztisztító üzemben. Kidolgoztunk egy buborékszámológáson alapuló, biogáztermelésre szolgáló módszert, amellyel alacsony gázhozamú bioreaktorok gáztermelése hatékonyan mérhető.
- Ivóvízes rendszerekben a klórozás a baktériumok sejtszámát ugyan hirtelen lecsökkenti, de a rendszerben újraszaporodás tapasztalható, klórozás hatására a mikrobiális közösség jelentősen átrendeződik.
- Ivóvízbázisok és ultratiszta vizet előállító rendszerek vizsgálata során új táptalajokat fejlesztettünk ki, amely során több új baktérium taxont izoláltunk: **Nocardioides hungaricus sp. nov.**, *Tahibacter aquaticus* gen. nov., sp. nov., **Aquipuribacter hungaricus gen. nov. sp. nov.**, *Phreatobacter oligotrophus* gen. nov., sp. nov.
- Fürdővizek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a mikrobiális közösségekre nem csak a fürdőzők mennyisége és a környezeti körülmények vannak erőteljes hatással, hanem a vízkezelés típusa is. A Fertő mikrobiológiai vizsgálatai rávilágítottak, hogy a nád borítottság nagymértékben befolyásolja a víz és az üledék mikrobiális közösségeinek összetételét. Mindkét környezetből új taxonokat írtunk le: **Gellertiella**

***hungarica* gen. nov., sp. nov.; *Brevundimonas balnearis* sp. nov., *Phragmitibacter flavus* gen. nov., sp. nov.**

- Prokarióta taxonómiai kutatásaink eredményei azt mutatták, hogy a rejtett diverzitás nagyon nagy százaléka feltáráásra vár, tenyésztéses vizsgálataink, a kifejlesztett új táptalajok és alkalmazott új tenyésztési technikák gyakran vezettek új baktériumtaxonok felfedezéséhez. Bár a prokarióta taxonómia maga alap kutatás jellegű, eredményei nélkülözhetetlenek a modern mikrobiális ökológia és alkalmazott mikrobiológia területén. 2001 óta összesen 40, a tudományra új baktériumtaxon leírását valósítottuk meg mikrobiológiai kutatásokhoz kapcsolódóan.

8. SUMMARY

During our work we have generally found that many environmental problems can be solved if we try to answer a question in appropriate way. The combination of cultivation with a wide range of modern molecular biological as well as chemotaxonomical methods provides an incredibly rich tool to answer the questions – even if sometimes novel methods/media need to be developed:

- We have developed a method to test the volatile end products of bacteria being dominant in myiatic wounds. It made possible to plan a fly trap. Novel bacterial taxa were described: *Schineria* (*Ignatzschineria*) *larvae* gen. nov. sp. nov. and ***Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* gen. nov., sp. nov.**
- To explore the structure and function of microbial communities we developed a chemotaxonomical method to study different chemotaxonomical markers simultaneously. The revealing of the structure of the Bacteria and Archaea domains lead to the optimization of biogas production in a wastewater treatment plant. Moreover, a new method to test the biogas production was developed which was based on the counting of the number of the bubbles. It can be used to measure effectively the gas production of low gasyield bioreactors.
- In drinking water systems, chlorination suddenly reduces the number of bacterial cells, but there is a re-proliferation in the system, and due to chlorination, the structure of the microbial community is significantly changed. During the study of drinking water (supply) and ultrapure water (UPW) systems new media were

developed which helped to cultivate novel bacterial taxa: *Nocardioides hungaricus* sp. nov., *Tahibacter aquaticus* gen. nov., sp. nov., *Aquipuribacter hungaricus* gen. nov. sp. nov., *Phreatobacter oligotrophus* gen. nov., sp. nov.

- During the study of the waters of thermal baths we found that structure of the microbial communities are strongly affected by the number of bathers, environmental conditions as well as the water treatment type. Microbiological studies of Lake Fertő revealed that reed cover strongly influences the composition of microbial communities of the water and the sediment. Novel bacterial taxa were described from both environments: *Gellertiella hungarica* gen. nov., sp. nov.; *Brevundimonas balnearis* sp. nov., *Phragmitibacter flavus* gen. nov., sp. nov.
- The results of our prokaryotic taxonomic studies showed that large percentage of hidden diversity is awaiting for exploration: our cultivation studies, novel media developing and new cultivation techniques we used, often led to discover new bacterial taxa. Though taxonomy belongs to basic research topics, its results are indispensable in the field of modern microbial ecology and applied microbiology. Since 2001, my laboratory has been connected to the description of 40 novel bacterial taxa.

9. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Almuzara MN., Palombarani S., Tuduri A., Figueroa S., Gainecini A., Sabater L. (2011). First case of fulminant sepsis due to *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*. J Clin Microbiol 49, 2333-2335.
- Altschul, SF., Madden, TL., Schaffel, A., Zhang, Z., Miller, W., Lipmann, DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25, 3389-3402.
- Amman, RI., Ludwig, W., Schleifer, KH. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59, 143-169.
- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Angenent LT., Karim K., Al-Dahhan MH., Wrenn AN., Domínguez-Espinosa R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. Trends in Biotechnol 22(9), 477-485.
- Aziz RK., Bartels D., Best AA., DeJongh M., Disz T., Edwards RA., Formsma K., Gerdes S., Glass EM., Kubal M., Meyer F., Olsen GJ., Olson R., Osterman AL., Overbeek RA., McNeil LK., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch GD., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein

- V., Wilke A., Zagnitko O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics* 9, 75.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D, Gurevich AA., Dvorkin M., Kulikov, AS., Lesin, VM., Nikolenko, SI., Pham, S., Prjibelski, AD., Pyshkin, AV., Sirotkin, AV., Vyahhi, N., Tessler, G., Alekseev, MA., Pevzner, PA. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its application to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19, 455-477.
- Behrendt U., Kampfer P., Glaeser SP., Augustin J., Ulrich A. (2016). Characterisation of the N₂O-producing soil bacterium *Rhizobium azooxidifex* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 2354-2361.
- Bergey, DH., Harrison, FC., Breed, RS., Hammer, BW., Huntoon, FM. (eds., 1923). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1st ed., The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- Bisgaard, M., Christensen, H., Clermont, D., Dijkshoorn, L., Jand, JM., Moore, ERB., Nemec, A., Nørskov-Lauritsen, N., Overmann, J., Reubsæet, FAG. (2019). The use of genomic DNA sequences as type material for valid publication of bacterial species names will have severe implications for clinical microbiology and related disciplines. *Diagn Microbiol Inf Dis* 95, 102-103.
- Bocher, BR. (2009). Global phenotypic characterisation of Bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 33, 191-205.
- Bohus, V., Székely, AJ., Makk, J., Márialigeti, K., **Tóth, EM.** (2007). Ultratiszta vizek bakteriológiai vizsgálata tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független módszerekkel. *Hidr Közl* 87, 58-61.
- Bohus V., Szoboszlay, M., Márialigeti, K., **Tóth, EM.** (2008). Ipari hűtővíz bakteriológiai vizsgálata tenyésztéses és molekuláris módszerekkel. *Hidrol Közl* 88(6), 31-33.
- 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.
- Bott, TR. (1998). Techniques for reducing the amount of biocide necessary to counteract the effects of biofilm growth in cooling water systems. *Appl Thermal Eng* 18, 1059-1066.
- Bradley, JC. (1961). Preface to the 1st edition of the International Code of Zoological Nomenclature. Brickell, C.D., Alexander, C., David, JC, Hettterscheid, WLA., Leslie, AC., Malecot, V., Xiaobai Jin, és mtsai (ed). (2009). "International Code of Nomenclature for Cultivated Plants" (PDF). *Scripta Horticulturae* (8th ed.). International Society of Horticultural Science 10, 1-184.
- Brown, CT., Hug, LA., Thomas, BC., Sharon, I., Castelle, CJ., Singh, A., Wilkins, MJ., Wrighton, KC., Williams, KH., Banfield, JF. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* 523(7559), 208-211.
- Bruce, J. (1996). Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food Tech* 50, 77-81
- Carvalho De CCR. (2007). Biofilms: Recent developments on an old battle. *Recent Patents on Biotechnol* 1., 49-57.
- Cashion, P., Holder-Franklin, MA., McCully, J., Franklin, M. (1977). A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* 81, 461-466.

- Casida LE. (1982). *Ensifer adhaerens* gen. nov. sp. nov.: a Bacterial Predator of Bacteria in Soil. Int J Syst Bacteriol 32(3), 339-345.
- Castelle, C.J., Banfield, J.F. (2018). Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life. Cell 172, 1181-1197.
- Cavalier-Smith, T. (1998). "A revised six-kingdom system of life". Biological Reviews. 73(03), 203-66.
- Chen, C-L., Liu, W-T., Chong, M-L., Wong, M-T., Ong, S.L., Sean, H., Ng, WJ. (2004). Community structure of microbial biofilms associated with membrane-based water purification processes as revealed using a polyphasic approach. Appl Microbiol Biotechnol 63, 466-473.
- Chun, J., Lee, J., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y-W (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of Prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 57, 2259-2261.
- Chun, J., Rainey, F.A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. Int J of Syst and Evol Microbiol, 64, 316-324.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., és mtsai (2017). EzTaxon: A webbased tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int J of Syst and Evol Microbiol, 57, 2259-2261.
- 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.
- Claus M. A standardised Gram staining procedure (1992). World J Microbiol Biotechnol 8, 451-452.
- Cloete, TE, Jacobs, L., Brözel, VS. (1998). The chemical control of biofouling in industrial water systems. Biodegradation 9, 23-37.
- Cole, JR., Wang, Q., Cardenas, E., Fish J., Chai, B., Farris, RJ., Kulam-Syed-Mohideen, AS., McGarrell, DM., Marsh, T., Garrity, GM., Tiedje, JM. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for RNA analysis. Nucl Acid Res 2009 Jan; 37(Database issue): D141–D145.
- Collins, MD., Pirouz, T., Goodfellow, M., Minnikin, DE. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. J Gen Microbiol 100, 221-230.
- Collins, M., Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol Rev 45, 316–354.
- Connelly, KL., Freeman, E., Smibert, OC., Lin, B. (2019). *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* bloodstream infection due to a maggot-infested wound in a 54-year-old male. J of Global Inf Dis 11(3), 125-126.
- Cowan, ST., Steel, KJ. (1974). Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Davis, KER., Josep,h SJ., Janssen, PH. (2004). Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 71(2), 826-834.
- De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. Eur J Biochem 12, 133-142.

- Doolittle, WF. (1999). Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*. 284, 2124-2129.
- Embley, TM., Wait, R. (1994). Structural lipids of Eubacteria, In *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*, pp. 141-147. Edited by M. Goodfellow, AG. O'Donnell. New York: John Wiley and Sons.
- Emerson, D., Worden, RM., Breznak, JA. (1994). A diffusion gradient chamber for studying microbial behaviour and separating microorganisms. *Appl Env Microbiol* 60(4), 1269-1277.
- Felföldi T., Somogyi B., Márialigeti K., Vörös L. (2009). Characterization of photoautotrophic picoplankton assemblages in turbid, alkaline lakes of the Carpathian Basin (Central Europe). *J of Limnol* 68, 385-395.
- Fleischmann, RD., Adams, MD., White, O., Clayton, RA., Kirkness, EF., Kerlavage, AR., Bult, CJ., Tomb, JF., Dougherty, BA., Merrick, JM. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), 496-512.
- Flemming, HC., (2002). Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 629-640.
- Gasc, C., Ribière C., Parisot, N., Beugnot, R., Defois, C., Petit-Biderre, C., Boucher, D., Peyretailade, E., Peyret, P. (2015). Capturing prokaryotic dark matter genomes. *Res Microbiol* 166, 814–830.
- Glaeser, SP., Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol* 38(4), 237-245.
- Gram, H.C. (1884). "Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten". *Fortschritte der Medizin* (in German). 2, 185–189. An English translation is in *Brock, T.D. (1999). Milestones in Microbiology 1546-1940*.
- Grébner K. (2010). Egy magyarországi erőmű vízelőkészítő üzemében fellelhető baktériumok faji szintű azonosítása és biocidekkel szemben mutatott érzékenységük tesztelése (MSc szakdolgozat). ELTE TTK, Mikrobiológiai Tanszék.
- Grisham, C., Garrett, R. (1995). *Biochemistry*. Saunders College Publishing. 242.
- Groth, I., Schumann, P., Rainey, F. A., Martin, K., Schuetze, B., Augsten, K. (1997). *Demetria terragena* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes isolated from compost soil. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1129-1133.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075.
- Halbritter, A., Mogyoróssy, T. (2002). Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis of rizosphere communities in a peat soil. *Agrokémia és Talajtan* 51, 123-128.
- Hasegawa, T., Takizawa, M., Tanida, S. (1983). A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 29, 319-322.
- Hegde, N., Maddur, MS., Kaveri, SV., Bayry, J. (2009). "Reasons to include viruses in the tree of life". *Nature Reviews Microbiology* 7 (8), 615.
- Homonnay, ZG., Makk, J., Brumbauer, A., Párkány-Simon, B., Márialigeti, K., **Tóth EM.** (2008). A budapesti ivóvíz baktériumközösségének vizsgálata a hálózat két jellemző pontján. *Hidr Közl* 88, 79-81.

- Homonnay, ZG., Török, G., Makk, J., Brumbauer, A., Major, E., Márialigeti, K., **Tóth, E.** (2014). Bacterial communities in the collection and chlorinated distribution sections of a drinking water system in Budapest, Hungary. *J Basic Microbiol* 54, 729-738.
- Hug, LA., Baker, BJ., Anantharaman, K., Brown, CT., Probst, AJ., Castelle, CJ., et al. (2016). "A new view of the tree of life". *Nature Microbiology*. 1 (5), 1-6.
- Hugh, R., Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by Gram negative bacteria. *J Bacteriol* 66, 24-26.
- Huss, VAR., Festl, H., Schleifer, KH. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* 4, 184-192.
- Ishii S., Tago K., Senoo K. (2010). Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications. *App Microbiol Biotechnol*, 86, 1281-1286.
- Kamagata, Y., Tamaki, H. (2005). Cultivation of uncultured fastidious microbes. *Microbes and Environment* 20, 85-91.
- Karlsson, R., Gonzales-Siles, L., Boulund, F., Svensson-Stadler, L., Skovbjerg S., Karlsson, A., Davidson, M., Hulth S., Kristiansson, E., Moore ER. (2015). Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms-A prospectus. *Syst and Appl Microbiol* 38(4), 246-257.
- Kathiravan R., Jegan S., Ganga V., Prabavathy VR., Tushar L., Sasikala, CH., Ramana, ChV (2013). *Ciceribacter lividus* gen. nov., sp. nov., isolated from rhizosphere soil of chick pea (*Cicer arietinum* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 4484-4488.
- Kéki, Z., Grébner, K. Bohus, V. Márialigeti, K., **Tóth, E.** (2013). Application of special oligotrophic media for cultivation of bacterial communities originated from ultrapure water. *Acta Microbiol Immunol Hung* 60, 345-357.
- 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.
- King, EO., Ward, MK. Raney, DE. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44, 301-307.
- Khoga, JM., **Tóth, E.**, Márialigeti, K., Borossay, J. (2002). Fly-attracting volatiles produced by *Rhodococcus fascians* and *Mycobacterium aurum* isolated from myiatic lesions of sheep. *J Microbiol Meth* 48, 281-287.
- Kim, M., OH, HS., Park, SC., Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J of Syst and Evol Microbiol*, 64, 346–351.
- King AMQ., Adams MJ., Carstens EB., Lefkowitz EJ., (eds). (2011). The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) The International Code of Virus Classification and Nomenclature. In: King AMQ., Adams MJ., Carstens EB., Lefkowitz EJ., (eds). *Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press; London, United Kingdom. 1273-1277.

- Konstantinidis, KT., Rosello-Mora, R. (2015). Classifying the uncultivated microbial majority: A place for metagenomic data in the Candidatus proposal. *Syst and Appl Microbiol* 38(4), 223-230.
- Konstantinidis, KT., Roselló-Mora, R., Amann, R. (2017). Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *Int J Microbial Ecol* 11, 2399-2406.
- Krieg, NR., Holt, J.G. (eds., 1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kulakov, L., McAlister, MB., Ogden, KL., Larkin, MJ., Hanlon, JF. (2002). Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems. *Appl Env Microbiol* 68(4), 1548-1555.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol and Evol* 33, 1870-1874.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Chichester: John Wiley & Sons. 115–175.
- Lapage, SP., Sneath, PHA., Lessel, EF., Skerman, VBD., Seeliger, HPR., Clark, AC. (1992). *International Code of Nomenclature of Bacteria*. Washington, DC: ASM Press.
- Lax, G., Eglit, Y., Eme, L., Bertrand, EM., Roger, AJ., Simpson, AGB. (2018). Hemimastigophora is a novel supra-kingdom-level lineage of eukaryotes. *Nature* 564, 410–414.
- Lee I., Chalita M., Ha SM., Na SI., Yoon SH., Chun, J. (2017). ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 2053-2057.
- Lemmer, H., Kroppensted, RM. (1984). Chemotaxonomy and Physiology of Some Actinomycetes Isolated from Scumming Activated Sludge, *Syst Appl Microbiol*, 5, 124-135.
- Lippai, A., Káli, Sz., Vajna, B., Szuróczki, S., **Tóth, E.** (2017) A Dandár fürdő mikrobiológiai vizsgálata. *Hidr Közl* 97, 9-14.
- Liu, W.T., Marsh, TL., Cheng, H., Forney, LJ. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl and Environ Microbiol*, 63, 4516–4522.
- Ludwig W1, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lüssmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer KH. (2004). ARB a software environment for sequence data. *Nucl Acid Res* 32(4), 1363-1371.
- Lynn M., (1970). *Origin of Eukaryotic Cells: Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth*. Yale University Press.
- Makk, J., Ács, É. (1996). Interaction between diatoms and bacteria in the biofilm of the Danube river. *Proceedings of the 31st International Conference of IAD*, 109-114.
- Makk, J., Homonnay, ZG., Kéki, Zs., Lejtovicz, Zs., Márialigeti, K., Spröer, C., Schumann, P., **Tóth, EM.** (2011). *Tahibacter aquaticus* gen. nov., sp. nov. a new gammaproteobacterium isolated from the drinking water network of Budapest (Hungary). *Syst Appl Microbiol* 34, 110–115.

- Makk, J., Homonnay, ZG., Kéki, Z., Nemes-Barnás, K., Márialigeti, K., Schumann, P., **Tóth, EM.** (2015). "Arenimonas subflava sp. nov., isolated from a drinking water network, and emended description of the genus Arenimonas". *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 1915–21.
- Márialigeti, K. (1996). A baktériumok ellentmondásos helye a biológiai sokféleségben. *Természet világa* 58-61.
- Márialigeti, K., Berta, B., Gorál, R., Pohner, Zs., Székely, AJ., Tauber, T., **Tóth, EM.** (2006). Use of molecular fingerprint techniques in the optimisation of sewage treatment biotechnologies pp. 23-35. In: Deák, T (szerk.) *Proceedings of the 25th Annual meeting of the European Culture Collections Organisation*.
- Máthé, I. Borsodi, AK., Tóth, EM., Felföldi, T., Jurecska, L., Krett, G., Kelemen, Z., Elekes, E., Barkács, K., Márialigeti, K. (2014). Vertical physico-chemical gradients with distinct microbial communities in the hypersaline and heliothermal Lake Ursu (Sovata, Romania). *Extremophiles* 18(3), 501-514.
- Mayr, E. (1942). Columbia University Press, New York.
- Mesbah, M., Premachandran, U., Whitman, WB. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by highperformance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 159-167.
- Minnikin, DE., Collins, MD., Goodfellow, M. (1979). Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. *J Appl Bacteriol* 47, 87-95.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51(1), 263-73.
- Murray, RGE., Stackebrandt, E. (1995). Taxonomic Note: Implementation of the Provisional Status Candidatus for Incompletely Described Prokaryotes. *Int J Syst Bacteriol*. 45(1), 186-7.
- Muyzer, G., De Waal, EC., Uitterlinden, AG. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl and Environ Microbiol* 59, 695–700.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(1), 127-141.
- Myers, EW., Miller, W. (1988). Optimal alignments in linear space. *Computer Applications in the Biosciences*, 4(1), 11–17.
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, EM., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., Epstein, SS. (2010). Use of Ichip for high-throughput in situ cultivation of „unculturable” microbial species. *Appl Environ Microbiol* 76, 2445-2450.
- Nikolausz M., Márialigeti K., Kovács G. (2004). Comparison of RNA- and DNA-based species diversity investigations in rhizoplane bacteriology with respect to chloroplast sequence exclusion. *J Microbiol Meth* 56(3), 365-373.
- O'Farrell PH. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250(10), 4007-21.

- Ohad I., Danon D., Hestrin S. (1963). The use of shadow casting technique for measurement of the width of elongated particles. *J of Cell Biol* 17,321-326.
- Overmann, J., (2014). Principles of enrichment, isolation, cultivation and preservation of Prokaryotes. In: Rosenberg, E., De Long, EF., Lorry, F., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds). *Prokaryotes*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 149-208.
- Overmann, J., Abt, B., Sikorski, J. (2017). The significance and future cultivation. *Annu Rev Microbiol* 71, 711-730.
- Overmann, J., Huang, S., Nübel, U., Hahnke, RL., Tindall, BJ (2019). Relevance of phenotypic information for the taxonomy of not-yet-cultured microorganisms. *Syst Appl Microbiol* 42, 22-29.
- Pace NR. (1997). A molecular view of diversity and the biosphere. *Science* 276, 734-740
- Parker, CT., Tindall, BJ., Garrity, GM. (eds) (2019). International Code of Nomenclature of Prokaryotes Prokaryotic Code (2008 Revision). *Int J Syst Evol Microbiol* 69, 1A, S1–S111.
- Parte, A.C. (2018) LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (www.bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 1825-1829.
- Pearson, WR., Lipman, DJ. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2444-2448.
- Podani, J. (2007). Az élet törzsfája *Élet és Tudomány*, 62(30), 943-946.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, BM., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, FO. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucl Acid Res* 35(21), 7188-7196.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner FO. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl Acids Res* 41, 590-596.
- Rainey, FA., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, RM., Stackebrandt, E. (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46, 1088–1092.
- Rainey, F., Oren, A. (Eds). In: *Methods in Microbiology*, 28. Taxonomy of Prokaryotes. (2011).
- Rao, TS., Nair, KVK. (1998). Microbiologically influenced stress corrosion cracking failure of admiralty brass condenser tubes in a nuclear power plant cooled by freshwater. *Corrosion Science*, 40, 1821-1836.
- Reasoner DJ., Geldreich EE. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49,1-7
- Rebaudet, S., Genot, S., Renvoise, A., Fournier, PE., Stein, A. (2009). *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* bacteremia in homeless woman. *Emerg Infect Dis.* 15, 985–7.
- Richter, M., Rosello-Mora, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *PNAS*, 106 (45), 19126-19131.
- Ride, WDL., Cogger, HG., Dupuis, C., Kraus, O., Minelli, A., Thompson, FC., Tubbs, PK. (1999). *International Code of Zoological Nomenclature (4th Edition)*. ISBN 0 85301 006 4

- Rossello-Mora, R., Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25, 39-67.
- Rosselló-Móra, R., Whitman, W.B. (2018). Dialogue on the nomenclature and classification of prokaryotes, *Syst Appl Microbiol* 42, 5-14.
- Rossello-Mora, R., Konstantinidis, K.T., Sutcliffe, I., Whitman, W.B. (2020) Opinion: Response to concerns about the use of DNA sequences as types in the nomenclature of prokaryotes. *Syst and Appl Microbiol In Press*.
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N.; Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D., Kirk, P.M., Thuesen, E.V. (2015). "A higher level classification of all living organisms". *PLOS ONE*. 10(4), e0119248.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bioland Evol*, 4, 406–425.
- Sarró, M.I., García, A.M., Moreno, D.A. (2007). Development and characterisation of biofilms on stainless steel and titanium in spent nuclear fuel pools. *J of Industrial Microbiol Biotechnol* 34(6), 433-441.
- Sasser, M.J., Microbial ID, Inc; (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note 101.
- Schleifer, K.H., Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36, 407-477.
- Schleifer, K.H., Amann, R., Rosselló-Móra, R. (2015) Taxonomy in the age of genomics. *Syst and Appl Microbiol* 38(4), 207-208.
- Schleinitz, K.M., Kleinstaub, S., Vallaes, T., Babel, W. (2004). Localization and Characterization of two novel genes encoding stereospecific dioxygenases catalyzing 2(2,4-dichlorophenoxy)propionate cleavage in *Delftia acidovorans* MC1. *Appl Environ Microbiol* 70, 5357-5365.
- Schumann P. (2011). Peptidoglycan structure (2011). *Methods Microbiol* 38, 101-129.
- Schumann, P., Maier T. (2014). MALDI-TOF mass spectrometry applied to classification and identification of bacteria. *Methods in Microbiology*, 41, 275-303.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A. (1980) Approved List of Bacterial Names. (First Draft) *Int J Syst Bacteriol* 26, 563-599.
- Sneath, P.H., Sokal, R.R. (1962). Numerical taxonomy. *Nature*. 193, 855-860.
- Soini, S.M., Koskinen, K.T., Vilenius, M.J., Puhakka, J.A. (2002). Occurrence of bacteria in industrial fluid power systems. *Clean Technol Environ Policy* 4, 26-31.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *IntJ of Syst Bacteriol*, 44, 846–849.
- Stackebrandt, E., Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33, 152-155.

- Stead, DE., Sellwood, JE., Wilson, J., Viney, I. (1992). Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol* 72, 315-321.
- Stevenson BS., Eichorst SA., Wertz JT., Schmidt TM., Breznak JA. (2004). New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* 70, 4748-4755.
- Sutcliffe IC., Trujillo ME., Goodfellow M. (2012). A call to arms for systematists: revitalising the purpose and practises underpinning the description of novel microbial taxa. *Antonie van Leeuwenhoek* 101(1), 13-20.
- Szuróczki, S., Kéki, Z., Kali, S., Lippai, A., Márialigeti, K., **Tóth, E.** (2016). Microbiological investigations on the water of a thermal bath at Budapest. *Acta Microbiol Immunol Hung* 63, 229-241.
- Szuróczki, S., Korponai, K., Sári, E., Tugyi, N., Felföldi, T., Somogyi, B., Márialigeti, K., **Tóth, E.** (2017). Planktonikus baktériumközösségek vizsgálata a Fertő vizében (nyílt víz, belső tó, nádas). *Hidr Közl* 97, 40-47.
- Szuróczki, S., Szabó, A., Korponai, K., Felföldi, T., Márialigeti, K., Tóth, E. (2018). A Fertő vizét és üledékét alkotó baktériumközösségek vizsgálata újgenerációs DNS-szekvenálással. *Hidr Közl* 98, 78-85.
- Szuróczki, S., Abbasszade, G., Szabó, A., Bóka, K., Schumann, P., Tóth, E. (2020). *Phragmitibacter flavus* gen. nov., sp. nov. a new member of the family Verrucomicrobiaceae *Int J Syst Evol Microbiol* In Press, doi.org/10.1099/ijsem.0.004025
- Tamaoka, J., Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 25, 125-128.
- Táncsics, A., Kéki, Zs., Márialigeti, K., Schumann, P., **Tóth, EM.** (2010). *Syphobacter aquaclari* gen.nov., sp. nov., a new member of the family "Flexibacteraceae", phylum *Bacteroidetes*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2567-2571.
- Tarrand, JJ., Gröschel, DHM. (1982). Rapid, modified oxidase test for oxidase-variable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 16, 772-774.
- Tauber, T., Berta, B., Székely, AJ., Gyarmati, I., Kékesi, K., Márialigeti, K., **Tóth, EM.** (2007). Characterisation of community structure of bacteria in parallel mesophilic and thermophilic pilot scale anaerobe sludge digesters. *Acta Microbiol Immunol Hung* 54, 47-55.
- 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.
- Tauber, T. Szennyvíziszap rothasztó mikrobaközösségek vizsgálatának optimalizálása. Doktori disszertáció, ELTE, 2013.
- Tindall, BJ., Móra, RR., Busse, HJ., Ludwig, W., Kampfer, P. (2010). Notes on the characterisation of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Int J Syst Evol Microbiol* 60, 249-266.
- Tóth EM.,** Borsodi, AK, Euzéby, JP., Tindall, BJ., Márialigeti, K. (2007). Proposal to replace the illegitimate genus name *Schineria* Tóth *et al.* 2001 by the genus name *Ignatzschineria* gen.

- nov., and the species *Ignatzschineria larvae* comb. nov. to replace the illegitimate combination *Schineria larvae* Tóth *et al.* 2001. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 0-1.
- Tóth, E.,** Farkas, R., Márialigeti, K., Mokhtar, IS. (1998). Bacteriological investigations of wound myiasis of sheep caused by *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae). *Acta Vet Hung* 46, 219-229.
- Tóth, E.,** Kovács, G., Schumann, P., Kovács, AL., Steiner, U., Halbritter, A., Márialigeti, K. (2001). *Schineria larvae* gen. nov., sp. nov., isolated from the 1st and 2nd larval stage of *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae). *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1234-1254.
- Tóth, EM.,** Tauber, T., Kovács, H ; Bohus, V ; Borsodi, A K ; Révész, S ; Márialigeti, K. (2004). Evaluation of biodiversity by respiratory quinone (RQ) and phospholipid fatty acid (PLFA) analysis in different soils and sediments. In: Chroňáková, A; Křišťůfek, V; Elhottová, D; Malý, D (szerk.) Present methods for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates. Ceske Budejovice, Csehország, Institute of Soil Biology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, 31-37.
- Tóth, EM.,** Hell, É, Kovacs, G, Borsodi, AK, Marialigeti, K. (2006). Bacteria isolated from the different developmental stages and larval organs of the obligate parasitic fly, *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera : Sarcophagidae). *Microbial Ecol* 51(1), 13-21.
- Tóth, EM.,** Schumann, P., Borsodi, AK., Kéki, Zs., Kovács, AL.K., Márialigeti, K. (2008). *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* gen. nov., sp. nov. a new gammaproteobacterium isolated from *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae). *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 976-981.
- Tóth, EM.,** Kéki, Zs., Makk, J., Homonnay, ZG., Márialigeti, K., Schumann, P. (2011). *Nocardioides hungaricus* sp. nov., isolated from the drinking water supply system of Budapest (Hungary). *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 549-553.
- Tóth, EM.,** Kéki, Zs., Bohus, V., Borsodi, AK., Márialigeti, K., Schumann, P. (2012). *Aquipuribacter hungaricus* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the ultra-pure water system of a Hungarian power plant. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 556–562.
- Tóth, EM., Vengring, A., Homonnay, ZG., Kéki, ., Spröer, C., Borsodi, AK., Márialigeti, K., Schumann, P. (2014). *Phreatobacter oligotrophus* gen.nov., sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from ultrapure water of the water purification system of a power plant *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 839-845. **Tóth, E.,** Szuróczi, S., Kéki, Zs., Bóka, K., Szili-Kovács, T., Schumann, P. (2017a). *Gellertiella hungarica* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium of the family Rhizobiaceae isolated from a spa in Budapest. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 4565-4571.
- Tóth, E.,** Szuróczi, S., Kéki, Zs., Kosztik, J., Makk, J., Bóka, K., Spröer, C., Márialigeti, K., Schumann, P. (2017b). *Brevundimonas balnearis* sp. nov., isolated from the well water of a thermal bath. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 1033-1038.
- Tralau T, Yang EC, Tralau C, Cook AM, Küpper FC. (2011). Why two are not enough: degradation of p-toluenesulfonate by a bacterial community from a pristine site in Moorea, French, Polynesia. *FEMS Microbiol Letters* 316, 123-129.

- Urakami T., Oyanagi H., Araki H., Suzuki K., Komagata K. (1990). Recharacterization and emended description of the genus *Mycoplana* and description of two new species, *Mycoplana ramosa* and *Mycoplana segnis*. *Int J Syst Bacteriol* 40, 434-442.
- Videla, HA. (2002). Prevention and control of biocorrosion. – *Int Biodeterioration and Biodegradation* 49, 259-270.
- Whitaker, R. (1969). New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* (New York, N.Y.) 163(3863), 150-160.
- Whitman, WB., Coleman, DC., Wiebe, J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6578-6583.
- Whitman, W. (2015). Genome sequences as the type material for taxonomic descriptions of prokaryotes. *Syst and Appl Microbiol* 38(4), 217-222.
- Whitman, WB. (2016). Modest proposals to expand the type material for naming of prokaryotes. . *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 2018-2112.
- Whitman, WB., Sutcliffe, IC., Rossello-Mora, R. (2019). Proposal for changes in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes: granting priority to *Candidatus* names. *Int J Syst Evol Microbiol* 69, 2174-2175.
- Willems, A., Fernández-López, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N., Gillis, M. (2003). Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(4), 1207-1217.
- Williams, TM. (2007). The mechanism of action of isothiazolone biocides. *Powerplant Chemistry* 9(1), 14-22.
- Williams, TA., Szöllősi, JA., Spang, A., Foster, PG., Heaps, SE., Boussau, B., Ettema, TJG., Embley, TM. (2017). Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life. *PNAS* 114 (23) E4602-E4611.
- Wirth, B., Tauber, T., Palatinszky, M., Márialigeti, K., Tóth E. (2011). The effect of substrate change on the operation of a waste water sludge digester. *Acta Microbiol et Immuol Hung* 58, 238.
- Woese, CR., Fox, GE. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5088-5090.
- Woese, CR. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51(2), 221–271.
- Woese, CR., Kandler, O., Wheelis, ML. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 87, 4576-4579.
- Woese CR. (1994). There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol Rev* 58(1), 1-9.
- Yasumoto-Hirose, M., Nishijima, M., Ngirchchol, MK., Kanoh K., Shizuri Y., Miki W. (2005), Isolation of marine bacteria by in situ culture on media-supplemented polyurethane foam. *Marine Biotechnol* 8, 227-237.

- Yoon SH., Ha SM., Lim JM., Kwon SJ., Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek* 110, 1281–1286.
- Yoon, SH., Ha, SM., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67,1613-1617.
- Young JM. (1999). Correction to the authority of *Rhizobium leguminosarum*. *Int J Syst Bacteriol* 49, 1943.
- Zhi, X.-Y., Li, W.-J., Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 589-608.
- Zigman, PM. (2007). "Monistische Hintergründe von Ernst Haeckels »Oecologie«-Konzept in seinem Projekt einer reformierten Biologie", in: *Jahrbuch für Europäische Wissenskulturr* (Franz Steiner Verlag Stuttgart), 69-116.

10.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a rengeteg munkát PhD hallgatóimnak és a velük együtt ügyködő egyetemista hallgatóknak, akikkel a közösen tanulmányozott témák, a feladatok megoldásai komoly eredményeket hoztak az ipar és az alap kutatás számára egyaránt. Külön köszönet Dr. Bohus Veronikának és Dr. Kéki Zsuzsának az ultratiszta vizes témában való közreműködésükért, Dr. Tauber Tamásnak a biogáz termelés optimalizálásakor nyújtott segítségével, Homonnay Zalának a parti szűrés mikrobiológiai vizsgálatában való közreműködéséért, Lippai Anettnek a fürdők vizsgálatában nyújtott segítségével, Szuróczki Sárának a Fertő kapcsán végzett közös munkáért.

A taxonómiai kutatások során legnagyobb segítséget Dr. Peter Schumanntól (DSMZ) kaptam, aki megtanított a kemotaxonómiai módszerek alapvető technikáira és nyomon kísérte minden, kemotaxonómiával kapcsolatos módszerfejlesztésünket.

Köszönetem szeretném kifejezni az ELTE Mikrobiológiai Tanszéke minden munkatársának az évek során nyújtott tapasztalatcseréért és szakmai együttműködésekért, az asszisztenseknek a gyakorlati munkavégzésben. Külön köszönettel tartozom Dr. Márialigeti Károlynak a támogatásért, aki pályám kezdetein mikrobiológiai gondolkodásra tanított és PhD témavezetésemet is vállalta.

Emellett köszönet illeti mindazon kollégákat, akik a problémák megoldásában a cégek részéről technikai és szakmai segítséget nyújtottak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak a legmesszemenőbb támogatást.

A dolgozatom édesapámnak és a testvéremnek ajánlom, akik már nem lehetnek velünk....