
Válasz Kériné Dr. Borsodi Andrea bírálataira

Tisztelt Bíráló!

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Bírálónak, hogy vállalta a dolgozatom bírálatát, és hogy minden részletre kiterjedő, alapos, ugyanakkor pozitív értékelést adott arról. Köszönöm Bírálóm észrevételeit, amelyeket a dolgozat formai hiányosságaival kapcsolatban tett. A Bíráló által a bírálatban feltett kisebb szövegközi, illetve a dolgozat tartalmi részét illető fő kérdésekre adott válaszaim a következők:

1. Hogyan definiálható a baktériumok „obligát alkanotróf” anyagcseretípusa?

E baktériumcsoport esetében helyesebb lett volna az „obligát hidrokarbonoklasztikus” jelzőt használnom, azonban tény, hogy e heterotróf, elsősorban tengeri ökoszisztémákban előforduló baktériumok a szerves vegyületeknek csak nagyon szűk csoportját képesek hasznosítani. E csoportba az *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus* és *Thalassolituus* nemzetségek képviselői tartoznak. Közös jellemzője e mikroszervezeteknek, hogy a BIOLOG rendszer 95 szubsztrátja közül mindössze kettőt képesek hasznosítani, mégpedig a Tween 40-et és a Tween 80-at. Mindkét vegyület hosszú láncú alkilcsoportot tartalmaz. Jól ismert jelenség, hogy tengeri kőolajszennyezések esetén elsőként az alkán-lebontó *Alcanivorax* nemzetség tagjai jelennek meg, majd később a komplexebb szénhidrogének lebontására is képes *Cycloclasticus* fajok abundanciája növekszik meg és jelentős szerepet játszanak a kőolajalkotó szénhidrogének lebontásában. Azonban szigorú értelemben véve e baktériumok „obligát hidrokarbonoklasztikus” mivolta valójában túlzó, hiszen képesek más, konvencionális szubsztrátokat is hasznosítani. Az azonban tény, hogy e baktériumok preferált növekedési szubsztrátjai a kőolajalkotó szénhidrogének, és általában gyenge, vagy szinte elhanyagolható növekedést mutatnak még azon konvencionális szubsztrátok jelenlétében is, amelyeket egyébként képesek szénforrásként hasznosítani. Mindazonáltal ezek a konvencionális szénforrások biztosítják e baktériumok túlélését szénhidrogénmentes közegekben (Radwan és mtsai., 2019).

2. Milyen volt a baktériumtörzsek izolálásához használt R2A táptalajnak és a szénhidrogén-lebontó baktériumok dúsítására használt tápleveseknek a pH-ja?

A bíráló kérdésével egy fontos hiányosságra világít rá, miszerint dolgozatomban nem tüntettem fel az említett tápközegek pH-ját. Ez abból fakad, hogy minden tenyésztési és dúsítási kísérlet esetében a konvencionálisnak gondolt neutrális, tehát 7-es pH-n dolgoztam.

3. Miért alkalmaztak eltérő hőmérsékleti értéket (28°C vs. 15°C) a szénhidrogén-bontó és a vas-redukáló dúsító tenyésztések során?

A vas-redukáló dúsító tenyésztések során minden eszközzel arra próbáltunk törekedni, hogy a *Rhodoferrax* nemzetségbe tartozó mikroszervezeteket dúsítsunk fel és izoláljunk. Emiatt a dúsítás során a siklósi kárhely ST2-es talajvíz mintavételi kútjában *in-situ* uralkodó hőmérséklet alkalmazásával próbáltuk elősegíteni e mikroszervezetek feldúsulását. Mivel a mintavételi kútban általában 12-15 °C-os hőmérséklet volt mérhető egész évben, elképzelhetőnek tartottuk, hogy az általunk izolálni kívánt *Rhodoferrax* nemzetségbeli baktérium esetleg ehhez hasonló hőmérsékleti optimummal rendelkezik, emiatt próbálkoztunk meg a 15 °C-on történő dúsítással.

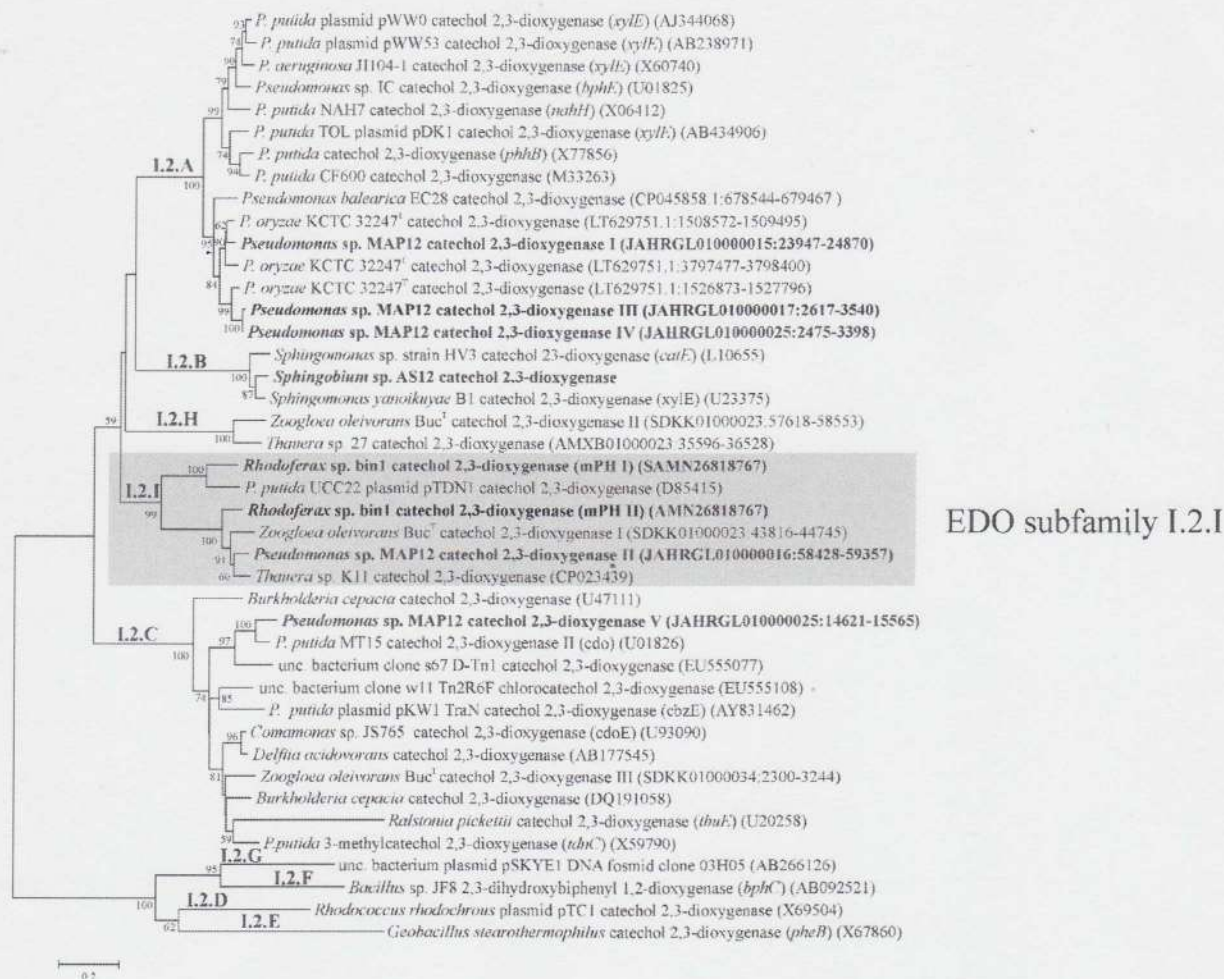
4. A 16S rDNS Roche 454 piroszekvenálási és Illumina MiSeq szekvenálási és Illumina MiSeq szekvenálási adatainak bioinformatikai értékelése során az OTU-k megállapításánál miért használtak különböző (98%-os és 97%-os) hasonlósági értékeket.

Kísérleteim során a Roche 454 piroszekvenálás volt az első újgenerációs, nagy áteresztőképességű nukleinsav szekvenálási módszer, amelyet használhattam. Ennek megfelelően akkor még nem rendelkeztem tapasztalattal a szekvencia adatok bioinformatikai kiértékelése terén. A kérdéses kísérletet, ahol e módszert alkalmaztuk, egy németországi kutatócsoporttal együttműködve végeztem el, és az adatok kiértékelésében is ők voltak segítségemre. Az OTU-k 98%-os 16S rRNS gén szekvencia hasonlóság melletti megállapítása a németországi labor protokollja szerint történt. A későbbi kísérletek során az Illumina MiSeq szekvenálási adatok bioinformatikai kiértékelését azonban már minden esetben önállóan, a MOTHUR szoftver segítségével végeztem, ahol 97%-os hasonlóság mellett definiáltam az OTU-kat Tindall és mtsai. javaslata alapján (2010).

5. Milyen kísérletek történtek eddig (szakirodalmi adatok és saját tapasztalatok alapján) a BTEX-vegyületekkel szennyezett területeken világszerte gyakran domináns szervezetként kimutatott *Rhodofex* baktériumok kitenyésztésére? Mi lehet az eddigi sikertelenség oka? Segítheti-e a metagenom összeszereléssel létrehozott teljes bakteriális genom ismerete a tenyésztés eredményességét?

Az utóbbi egy évben végzett mikroaerob körülmények közötti dúsítási kísérleteim során sikerült a kérdéses *Rhodofex* baktériumot feldúsítanom. A siklósi talajvízből kiindulva, mind benzol, mind pedig xilol jelenlétében e baktérium lett a feldúsított baktériumközösség egyik legabundánsabb képviselője (jellemzően 30% feletti abundancia értékkel). Fontos megjegyezni, hogy e baktérium csak mikroaerob körülmények között dúsult fel, és az aerob kontroll tenyészetekben vagy nem volt kimutatható e baktérium, vagy mindössze 5% körüli abundanciát ért el. Mindezek ellenére, a kérdéses baktériumot nem sikerült tenyésztésbe vonnunk. Azonban az egyik xilol-lebontó dúsító tenyészet esetében, ahol 30% feletti abundanciával volt jelen, metagenom szekvenálás segítségével sikerült feltárnunk e baktérium közel teljes genomját. Megállapítottuk, hogy több olyan gén klaszterrel rendelkezik, amelyek képessé teszik nem csak a xilol, de a toluol, illetve a benzol lebontására is. Sikerült két olyan klasztert azonosítanunk, amelyek egy-egy több komponensű fenol-hidroxilázt kódolnak. E klaszterek *meta*-típusú gyűrűhasításért felelős katekol 2,3-dioxigenázt is kódoltak, amelyek azonban nem voltak besorolhatóak az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjába. Sőt, egyik ismert alcsaládba sem sikerült őket besorolni, és egy átfogó filogenetikai elemzéssel bizonyítottuk, hogy e C23O enzimek az extradiol dioxigenázok egy új, eddig le nem írt alcsaládjába tartoznak, amelyet I.2.I alcsaládnak neveztünk el (1. ábra). (Az eredményeinket leíró kézirat jelenleg bírálati szakaszban van az Environmental Science & Technology folyóiratnál). A genomot tovább elemezve feltártuk egy teljes *narGHIJ* operon jelenlétét a genomban, ami alapján kijelenthető, hogy e *Rhodofex* nemzetségbe tartozó baktérium fakultatív anaerob mikroszervezet, amely oxigén hiányában képes nitráttal lélegezni, és azt legalább nitritig redukálni. Arra azonban nem kaptunk választ, hogy szilárd táptalajon miért nem tudtuk a mai napig kitenyésztetni ezt a baktériumot. A kísérleteinkkel egyidőben jelent meg azonban egy tanulmány egy japán kutatócsoport eredményei alapján, amelyben egy neutrális pH-n vas(II) oxidációjára, és vas(III) redukációjára egyaránt képes *Rhodofex* baktériumról adtak hírt, amelyet sikeresen ki is tenyésztettek (Kato és Okhuma 2021) és nem hivatalosan „*R. lithotrophicus*”-ként nevezték el. E baktérium teljes genomját összehasonlítottuk a mi metagenom-asszociált *Rhodofex* genom szekvenciánkkal, és közöttük 97,5%-os ANI értéket állapítottunk meg. Ez alapján a két baktérium egy fajhoz tartozik. A japán kutatócsoport szintén

mikroaerob körülmények között végzett dúsítást, és kifejezetten vas(II) oxidáló szervezetek dúsítását célozta meg. Véleményem szerint részben emiatt lehetett sikeres a baktériumtörzs izolálása is. A mi dúsító tenyésztéseinkben ugyanis jellemzően a *Pseudomonas* nemzetség képviselői voltak a legdominánsabb szereplők (50% vagy a feletti abundanciával), így az R2A táplemezen könnyűszerrel túlnőtték a minden bizonnyal mikroaerob körülményeket preferáló „*Rhodoferrax lithotrophicus*”.



1. ábra: A *Rhodoferrax* sp. bin1 genomjában kódolt C23O enzimek filogenetikai helyzetét bemutató, neighbor-joining módszerrel, aminosav szekvenciák alapján készített fa. A fa főbb elágazásainál jelölve vannak a releváns extradiol dioxigenáz alszaládok. (EDO, extradiol dioxigenáz).

6. Meckenstock és mtsai (2015) kutatási eredményei alapján az valószínűsíthető, hogy oxigén-limitált környezetekben a baktériumok szénhidrogénbontó aktivitása a szennyezési csóva szélénél (kisebb szennyezőanyag és nagyobb oxigén koncentráció mellett) a legerősebb. Ennek ismeretében milyen módszerekkel és hogyan monitorozná ma a siklósi kárhelyet? Miben várna eltérést a korábban a csóva középpontjában végzett kutatás eredményeihez képest?

Amennyiben lehetőségem lenne rá, akkor a szennyezési csóva középpontját egy olyan mintavételi kút által vizsgálnám, amelynek segítségével néhány 10 cm-es vertikális felbontásban tudnám feltárni a mikroba közösség összetételét. Sajnos kutatói karrierem során csak az Amerikai Egyesült Államokban találkoztam ilyen, az Egyesült Államok Geológiai Szolgálat (USGS) által fúrt és működtetett mintavételi kúttal. A siklósi kárhelyen ugyanakkor vizsgáltuk a szennyezési csóva szélén elhelyezkedő (ST5-ös jelű) mintavételi kút mikroba közösségét (ahogy ez a dolgozatban is szerepel), és ott a *Rhodoferrax* nemzetségbe tartozó baktériumok 60% körüli abundanciáját figyeltük meg. Figyelembe véve ezt, illetve az előzőekben említett legújabb mikroaerob dúsítási kísérleteim eredményeit én azt feltételezem, hogy az aerob-anaerob határrétegekben e mikroszervezetek domináns közösségalkotókként vannak jelen és kulcsszerepet játszanak a szennyezőanyagok lebontásában.

7. Kutatási eredményei alapján milyen konkrét javaslatokat tenne a vizsgált kárhelyek bioremediációjában résztvevő gyakorlati szakemberek számára?

A legfontosabb javaslatom az lenne, hogy egy kárhely tényfeltárása során a szennyezett közeg mikroba közösségének feltárása is történjen meg, hiszen ez nagy mértékben hozzájárulhat a kármentesítés sikerességéhez. Egy, a siklósihoz hasonló kárhely esetében pedig a nitrát utánpótlásban látom a megoldást. Wilson és Bouwer (1997) feltételezték elsőként, hogy az ehhez hasonló közegekben a nitrát-légzésre is képes, ám aerob BTEX-lebontási útvonalakkal rendelkező mikroszervezetek a nyomnyi mennyiségben jelen lévő oxigént még felhasználhatják a lebontó anyagcseretevékenységeik során, miközben respirációjukhoz már nitrátot használnak. Egyes eredményeim úgy vélem szintén megerősítik ezt a feltételezést.

Még egyszer köszönöm bírálóm munkáját, és segítő kritikai megjegyzéseit!

Felhasznált irodalom

Kato, S., és Ohkuma, M. (2021) A single bacterium capable of oxidation and reduction of iron at circumneutral pH. Microbiol. Spectr. 9: e0016121.

Radwan S., Khanafer MM., Al-Awadhi HA. (2019) Ability of the So-called obligate hydrocarbonoclastic bacteria to utilize nonhydrocarbon substrates thus enhancing their activities despite their misleading name. BMC Microbiol. 19: 41.

Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 249-266.

Wilson L.P. és Bouwer EJ (1997) Biodegradation of aromatic compounds under mixed OXygen/denitrifying conditions: a review. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18:116-130.

Gödöllő, 2022. 08. 22.



Dr. Táncsics András