

Válasz Prof. Dr. Sipiczki Mátyás bírálatára

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Prof. Dr. Sipiczki Mátyásnak MTA doktori értekezésem bírálatát és az extremofilek hazai kutatásában végzett úttörő tevékenységem elismerését. Köszönöm dolgozatom elfogadását és nyilvános vitára bocsátásának támogatását.

A bírálatban leírt megjegyzésekre és kérdésekre a következőkben válaszolok.

Bírálati megjegyzések

„... a szekvenciák taxonómiai hovatartozása nem biológiai, hanem statisztikai alapon történik. A 95%-os nemzetségeken belüli és a 97%-os fajokon belüli szekvencia-azonosság határértékek számos mikroorganizmus-csoportban félrevezetők lehetnek. Emiatt például az 5.3-17 ábrán bemutatott „16S rRNS gén amplikon-szekvenciák nemzetség szintű megoszlása”-ban a nemzetségek jelentős része csak statisztikai egységnek tekinthető: a 95%-nál nagyobb mértékben hasonló szekvenciák csoportjának.”

Egyetértek bírálóm észrevételével. A prokarióta taxonómiai egységek elkülönítésére, a faj fogalmának meghatározására a mai napig nincs egységes, mindenki által elfogadott definíció. Az utóbbi években, a genetikai-genomikai módszereknek a mikrobiális taxonómiai diverzitás feltárásában való széleskörű elterjedésével párhuzamosan is számos új prokarióta fajkonceptió látott napvilágot (Staley 2006; Riley és Lizotte-Waniewski 2009; Kim és mtsai 2014; Jain és mtsai 2018). Értekezésemben és az annak alapjául szolgáló publikációkban a Tindall és mtsai (2010) által az új baktériumfajok leírásakor a 16S rRNS gén bázissorrend elemzésével kijelölt szekvencia hasonlósági határértékeket vettem/vettük figyelembe. Mindazonáltal már a szerzők is felhívták a figyelmet arra, hogy a különböző taxonómiai csoportokban ezek a génszekvencia hasonlóságok drámaian eltérhetnek egymástól. A 16S rRNS génszekvenciák hasonlósági küszöbértékei ezért önmagukban nem alkalmazhatók teljesen egyértelmű és biztos faj/nemzetség szintű osztályozásra. Az új fajok/nemzetségek leírásakor a polifázikus taxonómia elvei szerint további genetikai, genomikai, fiziológiai és morfológiai vizsgálatokra is szükség van (Prakash és mtsai 2007; Ramasamy és mtsai 2014; Vandamme és Peeters 2014).

„Az értekezésben helyenként olyan hivatkozások szerepelnek, amelyek már túlhaladottak. Például a szekvenciák elemzésénél a mothur program „legfrissebb”, „legutóbbi” változatát használták, de a szerző hivatkozásként egy 14 évvel korábbi (2009-ben megjelent) közleményt ad meg. Mivel ez a programcsomag online használható, a megfelelő linkeket is meg lehetett/kellett volna adni (segítendő az érdeklődő olvasót a tájékozódásban). Hasonló a helyzet „az ARB-SILVA SSU legfrissebb változatának referencia adatbázisával”, amihez egy 2012-es hivatkozás lett csatolva.”

Bírálóm megjegyzését annyiban szeretném pontosítani, hogy az értekezésemben szereplő hivatkozások a szoftvereknek (pl. mothur) és a szekvencia adatbázisoknak (pl. SILVA) nem az értekezés megírásakor érvényben lévő legfrissebb változatára utalnak, hanem azokat a tanulmányokat jelölik meg, amelyek ezeknek az online elérhető felületeknek a bevezetése során készültek és amik a honlapokon is elvárt hivatkozásokként jelennek meg. A legfrissebb érvényes változat a mothur program esetében a „version 1.48.0” (kiadás dátuma: 2022.05.18; <https://mothur.org/>), a SILVA esetében az „SSU database 138” (kiadás dátuma: 2019.12.16.; <https://www.arb-silva.de/>).

Bírálati kérdések

1. Úgy tűnik, hogy a taxonómiai hovatartozás meghatározása szempontjából nem mindegy, hogy milyen adatbázist használunk. Például az 5.1-8 ábra tetején látható szekvencia az INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) adatbázisaiban történő BLAST kereséssel 99%-ot meghaladó azonosságot mutat két *Tabrizicola* faj típus törzsével és csak 97,23% erejéig azonos a *Rhodobacter ovatus* (új nevén *Cereibacter ovatus*) típus törzs szekvenciájával. Az ábrán az utóbbi típus törzs a legközelebbi rokon, az előbbi típus törzsek viszont nincsenek is a fán. Lehetséges, hogy az eredmények adatbázis-függők is lehetnek, vagy csak technikai okokról (pl. eltérő szekvencia-illesztő algoritmusok használatáról) lehet szó?

A bírálóm által feltett kérdésre adott válaszom betekintést enged az utóbbi évtizedben (i) a bakteriális taxonómiai adatbázisokban található szekvenciák számának rohamos növekedésébe, (ii) az újonnan leírt baktérium fajok és nemzetségek számának folyamatos bővülésébe, (iii) a baktérium taxonok rendszeres revíziójába és (iv) az adatbázis-függő eredmények miatti osztályozási nehézségekbe is.

A TO-WS-102 jelzésű baktérium törzset 2011-ben izoláltuk a Szarvas környéki Therm-Organ (TO) hűtő-tározótó vizéből. A baktérium törzs 941 bázispár hosszúságú 16S rRNS gén szekvenciája az akkori legfrissebb EzTaxon-e adatbázis (Kim és mtsai 2012) alapján a legnagyobb hasonlóságot a Srinivas és mtsai által 2008-ban leírt anoxikus fototróf *Rhodobacter ovatus* faj JA234^T típus törzsével mutatta, ez található a törzsfán is. A TO-WS-102 baktérium törzs szekvenciáját ezért ennek a taxonómiai besorolásnak megfelelően helyeztük el a GenBank adatbázisban (LN650470 azonosító számmal). A *Rhodobacter* nemzetség azóta két taxonómiai revízió is átesett, melynek során a *R. ovatus* faj először a Suresh és mtsai (2019) által végzett taxogenomikai vizsgálatok alapján a 2019-ben újonnan elkülönített *Luteovulum* gen. nov. nemzetségbe került *L. ovatum*ként. Ezt követően a faj 2020-ban újabb taxonómiai revízió esett át (Hördt és mtsai 2020), melynek eredményeként a Suresh és mtsai által 2015-ben egy másik taxonómiai revízió során létrehozott *Cereibacter* gen. nov. nemzetségbe sorolták át. A *R. ovatus* faj jelenleg érvényes neve tehát *Cereibacter ovatus* (Srinivas és mtsai 2008; Hördt és mtsai 2020). Mindeközben Tarhriz és mtsai (2013) *Tabrizicola aquatica* gen. nov. sp. nov. néven egy új Alphaproteobacteria nemzetséget és annak típusfaját írták le, mely validált státuszát 2014-ben nyerte el. Ennek a nemzetségnek egy tibeti sós tó üledékéből izolált, új, aerob, anoxikus fotoheterotróf baktériumfaja a *T. sediminis* (Liu és mtsai 2019). A *Tabrizicola* nemzetség taxonómiai revíziójára 2022-ben került sor, melynek során fajaik egy részét az újonnan elkülönített *Pseudotabrizicola* gen. nov. nemzetségbe sorolták át (Ma és mtsai 2022). Amennyiben tehát az értekezésemben szereplő ábrát a ma érvényben lévő taxonómiai adatok alapján újra szerkeszteném, úgy a törzsfán a TO-WS-102 baktérium törzsszel legközelebbi rokon fajként a *Pseudotabrizicola sediminis* faj (korábban *Tabrizicola sediminis*) DRYC-M-16^T típus törzsét szerepeltetném (Liu és mtsai 2019; Ma és mtsai 2022). A baktérium törzsek 16S rRNS gén szekvencia alapú azonosítására leggyakrabban alkalmazott EzBioCloud (Yoon és mtsai 2017) és NCBI adatbázisok frissítése, a taxonómiai revíziók nyomán követése eltérő ütemben történik. Ez látszik a TO-WS-102 jelzésű baktérium törzsnek a kizárólag típus törzsek adatait felhasználó szekvencia illesztési eredményeiből is. Az EzBioCloud adatbázis felhasználásával nyert szekvencia hasonlósági értékek a teljesség (completeness) mértékével a felső, míg az NCBI adatbázis BLAST kereséssel kapott hasonlósági értékei a lefedettséggel az alsó táblázatban láthatók.

List of hits from EzBioCloud 16S database

Tasks	Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity	Variation ratio	Hit taxonomy	Completeness (%)
<input type="checkbox"/>	Pseudotabrizicola sediminis	DRYC-M-16(T)	RPEM01000006	99.04	9/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Pseudotabrizicola	100.0
<input type="checkbox"/>	Pseudotabrizicola alkalilacus	DJC(T)	MF162183	98.72	12/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Pseudotabrizicola	100.0
<input type="checkbox"/>	Pseudotabrizicola algicola	ETT8(T)	KY363643	97.34	25/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Pseudotabrizicola	100.0
<input type="checkbox"/>	Luteovulum ovatum	JA234(T)	AM690348	96.92	29/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Luteovulum	81.6
<input type="checkbox"/>	Rhodobacter sediminicola	JA983(T)	LR596790	96.81	30/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Luteovulum	100.0
<input type="checkbox"/>	Tabrizicola piscis	K13M18(T)	MK285603	96.71	31/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Tabrizicola	100.0
<input type="checkbox"/>	Tabrizicola fuiformis	SY72(T)	MF543060	96.60	32/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Tabrizicola	100.0
<input type="checkbox"/>	Cyponkella collinsensis	4-T34(T)	KM978076	96.60	32/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Cyponkella	100.0
<input type="checkbox"/>	Cyponkella psychrotolerans	PAMC 27389(T)	LGIC01000003	96.60	32/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Cyponkella	100.0
<input type="checkbox"/>	Haematobacter masaliensis	CCUG 47968(T)	DQ342309	96.39	34/941	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Haematobacter	100.0

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 0 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Tabrizicola sediminis strain DRYC_M_16 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Pseudotabrizicola sedi...	1692	1692	99%	0.0	99.36%	1338	MK693145.1
<input type="checkbox"/> Tabrizicola sediminis strain DRYC_M_16 16S ribosomal RNA partial sequence	Pseudotabrizicola sedi...	1692	1692	99%	0.0	99.36%	1338	NR_175512.1
<input type="checkbox"/> Tabrizicola alkalilacus strain DJC 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Pseudotabrizicola alkali...	1679	1679	99%	0.0	99.04%	1431	MF162183.1
<input type="checkbox"/> Tabrizicola alkalilacus strain DJC 16S ribosomal RNA partial sequence	Pseudotabrizicola alkali...	1679	1679	99%	0.0	99.04%	1431	NR_175454.1
<input type="checkbox"/> Tabrizicola formosa 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Pseudotabrizicola form...	1674	1674	99%	0.0	98.93%	1425	KY457223.1
<input type="checkbox"/> Tabrizicola algicola strain ETT8 16S ribosomal RNA partial sequence	Pseudotabrizicola algic...	1607	1607	99%	0.0	97.65%	1455	NR_179092.1
<input type="checkbox"/> Tabrizicola algicola 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Pseudotabrizicola algic...	1607	1607	99%	0.0	97.65%	1455	KY363643.3
<input type="checkbox"/> Cereibacter ovatus strain JA234 16S ribosomal RNA partial sequence	Cereibacter ovatus	1585	1585	99%	0.0	97.23%	1381	NR_115057.1
<input type="checkbox"/> Tabrizicola piscis strain K13M18 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Tabrizicola piscis	1574	1574	99%	0.0	97.01%	1395	MK285603.1
<input type="checkbox"/> Tabrizicola piscis strain K13M18 chromosome complete genome	Tabrizicola piscis	1574	3148	99%	0.0	97.01%	4189112	CP034328.1
<input type="checkbox"/> Tabrizicola piscis strain K13M18 16S ribosomal RNA partial sequence	Tabrizicola piscis	1574	1574	99%	0.0	97.01%	1395	NR_180365.1

2. Milyen alapon lettek kiválasztva a legközelebbi rokon fajok a törzsfák szerkesztése során? Egy furcsa példa: 5.4-10 ábrán a MH472820 szekvencia (törzs: RS7-3) fajnév nélküli. Az adatbázisban viszont a Szerző a Daejeonella huanghensis név alatt jegyezte be. Ez a faj viszont nem is szerepel a bemutatott törzsfán. Azon egy másik faj szerepel a legközelebbi rokonként. A MH472820-vel 100%-ban azonos MH667858 (törzs: RS9-3) mellett már a Daejeonella huanghensis (szinonim: Pedobacter huanghensis) szerepel legközelebbi rokonként az 5.4-9 ábrán.

A törzsfákon az általunk tenyésztésbe vont baktériumtörzsekkel legközelebbi rokon fajokként az EzTaxon-e (Kim és mtsai 2012), illetve az EzBioCloud (Yoon és mtsai 2017) adatbázisokban szereplő validált fajok típus-törzsei közül a legnagyobb szekvencia egyezést mutatót ábrázoltuk. Bírálom által említett mindkét baktériumtörzs a Daejeonella huanghensis (korábban: Pedobacter huanghensis) faj típus-törzsével mutatta a legnagyobb szekvencia hasonlóságot. Az RS7-3 törzs esetében feltehetően figyelmetlenségéből maradt le a törzsfáról (5.4-10. ábra) a hozzá legközelebb álló faj típus-törzse.

3. A Nesterenkonia pannonica fajnév a mai Magyarország területének egy részét képező egykori római tartományra utal. Viszont olyan területen lett felfedezve (a mai Kiskunságban), ami nem tartozott Pannonia provinciához, és a római időkben jazygok lakták. (?Nesterenkonia jazyga?, mint pl a fürkész Neochrysocharis jazyga Erdős). A Fertő-tóból izolált Pannonibacter esetében nem merülhet fel ilyen dilemma.

A Nesterenkonia pannonica sp. nov. néven leírt új baktériumfaj nevében a „*pannonica*” szó eredete tényleg az ókori Pannónia néven ismert római provincia illír eredetű, pannon őslakosságának a nevére vezethető vissza. Akkoriban Pannónia valóban a Duna vonalától nyugatra eső területeket foglalta magába. Napjainkban azonban a „pannon” megnevezés az ennél sokkal nagyobb kiterjedésű Pannon-(Kárpát-)medencére, illetve a Pannon Biogeográfiai Régióra utal.

https://www.eea.europa.eu/publications/report_2002_0524_154909/biogeographical-regions-in-europe/pannonian.pdf

4. A Szerző a 40. oldalon említi, hogy a PCR amplifikációnak és a klónkönyvtárak létrehozásának közösség szerkezeti torzító hatása van. Miként lehet ezt a hatást észlelni?

Ma már elvitathatatlan tény, hogy a DNS-szekvenciák érzékeny kimutatását és azonosítását lehetővé tevő molekuláris biológiai technikáknak a mikrobiális ökológiai kutatásokba való széles körű elterjedésével a természetes mikrobiális közösségek sokkal nagyobb diverzitásának a feltárására nyílt lehetőség, mint a klasszikus, baktériumtörzsek izolálásán alapuló tenyésztéses megközelítéssel. Az új módszerek kétségtelen előnyét jelentő egyre nagyobb áteresztőképesség, gyorsaság és relatíve jó haszon-költség arány ellenére, ezeknek a metodikáknak is megvannak a maguk korlátai.

A PCR amplifikáció során jelentkező közösség szerkezeti torzító hatások között talán az egyik legfontosabb, hogy környezeti (heterogén) DNS mintákat templátként alkalmazva a különböző templátok nem az eredeti mintában jelenlévő arányuknak megfelelően sokszorozódnak meg. Így a közösségi PCR termékek összetétele nem tükrözi vissza a kiindulási arányokat. Ennek oka lehet, hogy a különböző templát molekulák célszekvenciái nem ugyanolyan mértékben hozzáférhetők a primerek számára; a primer és templát hibridek kötődési energiája nem azonos; a polimeráz enzim nem azonos hatékonysággal végzi a lánchosszabbítást a különböző szálak esetén; az eltérő templátok elongációját a szubsztrát fogyása különböző mértékben befolyásolja. Ismert az is, hogy multitemplát PCR során nem létező „műtermékek” pl. heteroduplekxek, kimérák és a polimeráz enzimek hibájából eredő mutációk jöhetnek létre, melyek számváltozása pozitív korrelációt mutat a ciklusszám növekedésével. A PCR ciklusszámával összefüggő torzító hatás jelentkezhet a kiindulási templátok eltérő arányából következően is, ugyanis a PCR előrehaladtával a növekvő termék koncentrációknál a primerkötődés hatékonysága csökken a nagyobb koncentrációjú termékek esetében a kisebb koncentrációjúakhoz képest (reanneláció gátlás). Ez a kiindulási templát arányokhoz képest ellentétes termék koncentráció változást (kiegyenlítődést) eredményezhet (1:1 arányú torzítás), ami a PCR ciklusszámának és a templát kiindulási koncentrációjának a csökkentésével mérsékelhető (Wintzingerode és mtsai 1997; Polz és Cavanaugh 1998; Qiu és mtsai 2001; Kanagawa 2003; Kurata és mtsai 2004; Sipos és mtsai 2007, 2010).

Környezeti DNS-ből kiinduló PCR esetén nemcsak a taxonómiai összetétel, hanem a különböző fajokba tartozó baktériumok eltérő genomi tulajdonságai (genomméret, génösszetétel, DNS bázisösszetétel) is befolyással lehetnek a multitemplát PCR-re. A környezetmikrobiológiai diverzitás elemzésekben leggyakrabban vizsgált 16S rRNS gén a különböző baktériumfajokban eltérő számú (1-15 között változó, átlagosan 4,1 operon/genom) és elrendeződésű operonban (rrn) található (pl. generalistákban nagyobb az operonok száma, mint a specialistákban). A genomszerkezeti különbségekből adódó torzító hatások csökkentésére ismeretlen összetételű

közösségszerkezet vizsgálata során azonban sajnos még nincs hatékony és megbízható lehetőség (Sipos és mtsai 2007, 2010; Laursen és mtsai 2017).

Fontos szempont még a megfelelően specifikus primer tervezése/kiválasztása, ami a célszekvenciát nagy hatékonysággal képes felszaporítani. Azonban még a 16S rRNS filogenetikai markergén konzervatív régióira tervezett ún. „univerzális” primerek sem biztosítják teljeskörűen, minden baktérium taxonra vonatkozóan a primerekkel szemben támasztott általános követelményeket (optimális primer és célszekvencia hosszúság, olvadási hőmérséklet, pontos illeszkedés, DNS G+C mol%, inter- és intramolekuláris másodlagos szerkezetek elkerülése) (Baker és mtsai 2003; Tringle és Hugenholtz 2008; Martínez-Porchas és mtsai 2016). Multitemplát PCR során figyelembe kell vennünk még a PCR körülményeit (a kezdeti denaturáció, az annealáció és a lánchosszabítás hőmérsékletét), a ciklusszámot, és a reakcióhoz használt polimeráz enzim(ek) specifikus tulajdonságait is (Polz és Cavanaugh 1998; Sipos és mtsai 2007; Kalle és mtsai 2014).

Az 1990-es évektől egészen az új generációs szekvenálási módszerek elterjedéséig a heterogén (általában 16S rRNS gén) PCR termékek szétválasztására széles körben alkalmazták a TA-klónozó rendszereket, melyekben a linearizált klónozó vektorok DNS szálai 3' végükön egy túlnyúló timin nukleotidot tartalmaznak. A közösségszerkezeti torzító hatásoktól azonban a molekuláris klónkönyvtárak létrehozása sem volt mentes. Ezek közé tartozik a heterogén (bázissorrendjükben és hosszukban eltérő) inzertek ligálási hatékonyságának a különbözősége, másnéven a klónozó vektorok méret preferenciája, valamint az inzert szekvenciák hatása a DNS-fehérje interakciókra és a transzformált sejtekre (Taylor és mtsai 2007; Palatinszky és mtsai 2011).

5. A hazai szikes tavakban identifikált baktériumok döntő részét a világ más tájain is megtalálták. A szikes talajok növényeinek gyökerein található fajokat úgyszintén. Tekinthető bármelyik vizsgált baktérium-közösség specifikusan hazainak?

A mikrobiális ökológiával foglalkozó kutatókat régóta foglalkoztatja annak megismerése és magyarázata, hogy mi határozza meg a természetes környezetekben előforduló mikrobaközösségek (α , β és γ) diverzitásának térbeli mintázatát és időbeni változását. Más szavakkal és leegyszerűsítve, létezik-e mikrobiális biogeográfia és beszélhetünk-e mikrobiális endemizmusról?

Számos kutató véleménye szerint a mikrobiális biogeográfiai mintázatokat alapvetően két tényező határozza meg: a diszperziós korlát és a környezeti heterogenitás. Finlay (2002) elképzelése szerint az 1 mm-nél kisebb méretű szervezetek ubikvistáknak tekinthetők, mivel lényegében korlátlan mértékű (aktív vagy passzív) diszperzióra képesek. Ez a megállapítás azon a feltevésen alapul, hogy a mikrobák nagy lokális abundanciája fokozza annak a valószínűségét, hogy egyes mikrobák nagy távolságot tesznek meg, és csupán a véletlen folytán is sikeresen kolonizálnak egymástól távoli élőhelyeket. Ezt az elméletet látszik alátámasztani, hogy bizonyos az emberi szervezethez köthető baktériumfajok (pl. *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) egyértelmű kozmopolita elterjedést mutatnak, és ezeknek világszerte csak néhány klonális leszármazási vonalával találkozhatunk (Smith és mtsai 1991). Roberts és Cohan (1995) három kontinens sivatagi talajaiból izolált, endospóra képző *Bacillus subtilis* és *B. mojanensis* törzseken végzett vizsgálatokkal kimutatták, hogy a törzsek közötti rekombináció mindkét fajon belül körülbelül ugyanolyan ütemben következett be, mint a semleges mutáció, függetlenül a törzsek

származási helyétől vagy filogenetikai hasonlóságának mértékétől, vagyis globális pánmiktikus elterjedéssel rendelkeztek.

Baas-Becking (1934) kozmopolita hipotézise szerint “everything is everywhere, but the environment selects” (Minden mindenütt jelen van, azonban a környezet szelektál.). Eszerint diszperziós korlátok hiányában a mikrobaközösségek biogeográfiai mintázatai a mindenkori környezeti feltételeket tükrözik vissza, és a hasonló környezetek hasonló mikrobiális taxonoknak adnak otthont, függetlenül az élőhelyek közötti földrajzi távolságtól. A környezeti komplexitás hipotézis szerint azonban a még viszonylag homogénnek tűnő környezetek is számos különböző mikrokörnyezetet rejthetnek magukban. Ily módon egy adott környezetben az élőhelyek lehetséges száma és az élőlények mérete között fordított arányosság áll fenn., Kisebb méret esetén tehát megnő a környezeti heterogenitás finomabb érzékelésének és ezáltal a környezet különböző szervezetei általi hasznosításának a módja és száma is, ami a mikrobiális diverzitás növekedését eredményezi. Adott térben az együtt élő baktérium populációk ezért gyakran nagyon eltérő környezeti igényekkel rendelkezhetnek (pl. redox-szintek, szubsztrát preferenciák, pH vagy fény elérhetősége tekintetében). A mikrobiális élőhelyekre jellemző környezeti paraméterek ugyanakkor időben is gyakran változnak, így a mikrobaközösségek tagjainak folytonosan versenyezniük kell egymással a rendelkezésükre álló, gyakran korlátozott erőforrásokért. Ilyen körülmények között a fajok szaporodási rátájának ingadozásai vezethetnek a közösségen belül a versenytársak tartós fennmaradásához („storage effect”). Az előbbieket alapján a biogeográfiai mintázatok meghatározása még akkor is rendkívül nehéz, ha egy vagy néhány környezeti tényező és a közösség összetétele közötti összefüggés feltárása alapján úgy tűnik, hogy a mikrobiális diverzitást befolyásoló egyetlen tényező a környezeti heterogenitás. Ennek több oka is lehet: 1) a legtöbb mikrobiális élőhely fizikai környezete nagyon változatos, és nehéz a környezeti jellemzőket olyan finom felbontási szinten mérni, ami az egyes mikrobák számára releváns, 2) a környezeti hatások nagymértékben függenek a kérdéses taxonoktól és a vizsgálat léptékétől, 3) a mikrobák jelentős hatást gyakorolhatnak helyi környezetükre, ami megnehezíti a közösségre gyakorolt környezeti hatások és a közösség környezetre gyakorolt hatásainak a megkülönböztetését. A lokális és globális mértékű nagy mikrobiális diverzitás emellett összefüggésbe hozható a jelentős mértékű speciációval (fajképződéssel) és az elhanyagolható mértékű extinkcióval (kihalással) is. Ez olyan a prokariótákra jellemző tulajdonságok következménye, mint a viszonylag rövid generációs idő, a nagymértékű horizontális géntranszfer, a környezeti nichek nagyfokú szeparációja, a fajok közötti interakciók sokfélesége, továbbá a kedvezőtlen környezeti feltételekhez történő adaptáció, valamint a populációkon belüli nagy egyedszám (Ramette és Tiedje 2007; Fierer 2008; Green és mtsai 2008; Hedlund és Staley 2014).

Az utóbbi évtizedekben több érdekes tanulmány is napvilágot látott az extremofilek kozmopolita elterjedésével vagy éppen endemikus előfordulásával kapcsolatban. Ezen kutatások egyike az északi és a déli sarkvidéki tengerekben élő pszichrofil, tengeri jégben előforduló baktériumok (*Polaromonas*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Gelidibacter*, és *Octadecabacter* spp.) elterjedését vizsgálta. Ezek a baktériumok ideális endemikus jelöltek voltak, hiszen specializált niche-t foglaltak el, ezért a kutatók úgy vélték, hogy szűk hőmérsékleti toleranciájuk megakadályozza, hogy túléljék a Föld két pólusa közötti vándorlást. Az eddigi vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy bár egyes nemzetségek tagjai mindkét póluson előfordultak, de közöttük kozmopolita fajokat nem tudtak azonosítani (Staley és Gosink 1999).

Egy Whitaker és mtsai (2003) által jegyzett tanulmány 78 földrajzilag izolált teresztrikus vulkanikus élőhelyről (Izlandról, Kamcsatkáról, az USA nyugati részéből) származó *Sulfolobus islandicus* fajba sorolt törzs genetikai hasonlóságát vizsgálta. Amíg a 16S rRNS gén bázissorrendjének meghatározásán alapuló elemzések a törzsek között mindössze 10 polimorf hely jelenlétére mutattak rá, és eszerint a törzsek között endemizmust nem lehetett kimutatni, addig ugyanezen törzsek között 8 fehérje kódoló gén bázissorrendjének elemzése alapján már egyértelmű biogeográfiai elkülönülést tudtak igazolni. Ezek az eredmények arra irányították rá a kutatók figyelmét, hogy bár a 16S rRNS gén bázissorrendjének elemzése kiváló lehetőséget biztosít a filogenetikai kapcsolatok feltárására, de erősen konzervatív jellege miatt nem alkalmas a fajon belüli biogeográfiai mintázatok meghatározására.

A mikrobiális diverzitás mintázatokra ható előbbieken felvázolt tényezők és esettanulmányok alapján úgy gondolom, hogy a magyarországi szikesek általunk vizsgált baktérium-közösségei nem tekinthetők „specifikusan hazainak”, de egyes általunk izolált és extrém környezeti feltételekhez alkalmazkodott baktérium taxon esetében nem zárható ki az endemizmus lehetősége sem. Ennek igazolásához vagy megcáfolásához azonban további részletes genomikai vizsgálatokra lenne szükség.

6. A törzsfák/dendrogramok készítésénél NJ és ML módszereket használtak. Miért kétfélet, és mi alapján dönt el a választás?

A környezetmikrobiológiai és bakteriális taxonómiai leíró közleményekben a prokarióták osztályozása elsősorban a 16S rRNS gén szekvencia hasonlóságokon és az ebből nyert filogenetikai fa rekonstrukciókon alapul. A DNS szekvencia adatokból kiinduló törzsfák szerkesztésére számos módszer áll rendelkezésünkre, ilyen pl. a távolság alapú Neighbor-Joining (NJ) (Saitou és Nei 1987) és a karakter alapú Maximum Likelihood; (ML) (Felsenstein 1981) módszer. Távolság alapú módszer alkalmazása esetén megfelelő szubsztitúciós modell alkalmazásával taxon (OTU) páronként kerül sor a genetikai távolság kiszámítására, majd az így kapott távolságmátrix alapján történik a törzsfá szerkesztése. Karakter alapú módszer esetén a törzsfá szerkesztése az illesztett szekvencia adatokat tartalmazó ún. karaktermátrixból indul ki.

Egy másik csoportosítás szerint, mely az elméletileg lehetséges fák közötti döntést veszi alapul, algoritmikus és optimalizációs módszereket különböztethetünk meg egymástól. Az algoritmikus módszerek, mint pl. a NJ esetében, a fa felépítése az ágak fokozatos hozzáadásával történik adott algoritmus szerint. A NJ törzsfák ily módon gyorsan létrehozhatók, ezért inkább nagy mennyiségű és különböző rendszertani csoportokba tartozó taxon ábrázolására alkalmasak. Az optimalizációs módszerek, mint pl. az ML esetében, az ún. „tree score” (fa likelihood értékének) kiszámítása karakterekre bontva történik. Az ML törzsfák ezért pontosabbak, így molekuláris evolúciós vizsgálatokra megfelelőbbek, de elemzésük sokkal időigényesebb (Pénzes 2013). A prokarióta törzsek fajleíró közleményeiben megkívánt filogenetikai törzsfá szerkesztési módszereket Tindall és mtsai (2010) foglalták össze. Ezek alapján többféle, alternatív törzsfá szerkesztési módszert kell használni, melyek között preferált a maximum likelihood módszer alkalmazása. A neighbor-joining módszert elsősorban nyers szűrésre ajánlják.

Az értekezés alapjául szolgáló publikációkban ezért találkozhat az olvasó mindkét törzsfá szerkesztési módszerrel.

7. Mit jelentenek a csillagok az 5.4-10 ábrán, a # számok a 5.4-2 ábrán? A felső-indexben hiányzó T azt jelenti, hogy nem típus törzsből származik a szekvencia?

Az 5.4-10. ábrán csillaggal jelölt (RH és RS jelzésű) törzseket a (nem vulkanikus) permafroszt olvadéktóból izoláltuk és kontrollként használtuk a kráter tóból izolált (RH és PH jelzésű) törzsek vizsgálatához. Az 5.4-2. ábrán a baktériumtörzsek azonosítói mögötti „# számok” azoknak a szekvencia elemzésbe nem vont törzseknek a számát jelölik, amelyek a törzsfán szereplő baktériumtörzsszel megegyező ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) mintázattal rendelkező csoportba tartoztak, így nagy valószínűséggel ugyanahhoz a fajhoz tartoztak. A törzsfákon az egyedi azonosító mellett a felső indexben szereplő „T” valóban az adott faj típus törzsére utaló jelzés, vagyis ennek hiánya azt jelenti, hogy a törzsfa szerkesztéséhez nem az adott faj típus törzsének a szekvenciáját használtuk fel.

Végül még egyszer szeretnék köszönetet mondani bírálómnak opponensi munkájáért és kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2023. augusztus 30.



Borsodi Andrea

Hivatkozások jegyzéke

- Baas-Becking LGM (1934) *Geobiologie of Inleiding Tot de Milieukunde*, p. 263. Van Stockkum & Zoon, The Hague: The Netherlands.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55:541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- Fierer N (2008) Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. Accessing uncultivated microorganisms: from the environment to organisms and genomes and back 95–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01406.x>
- Finlay BJ (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296, 1061–1063. doi:10.1126/science.1070710
- Green JL, Bohannan BJM, Whitaker RJ (2008) Microbial biogeography: From taxonomy to traits. *Science* (1979) 320:1039–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1153475>
- Hedlund BP, Staley JT (2014) Microbial endemism and biogeography. In: *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp 225–231
- Hördt A, López MG, Meier-Kolthoff JP, et al (2020) Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. *Front Microbiol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>
- Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, et al (2018) High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun* 9:5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Kalle E, Kubista M, Rensing C (2014) Multi-template polymerase chain reaction. *Biomol Detect Quantif* 2:11–29. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.11.002>
- Kanagawa T (2003) Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng* 96:317–323. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90130-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90130-7)
- Kim M, Oh H-S, Park S-C, Chun J (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:346–351. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0>
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, et al (2012) Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:716–721. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>
- Kurata S, Kanagawa T, Magariyama Y, et al (2004) Reevaluation and reduction of a PCR bias caused by reannealing of templates. *Appl Environ Microbiol* 70:7545–7549. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7545-7549.2004>
- Laursen MF, Dalgaard MD, Bahl MI (2017) Genomic GC-content affects the accuracy of 16S rRNA gene sequencing based microbial profiling due to PCR bias. *Front Microbiol* 8:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01934>

- Liu Z-X, Dorji P, Liu H-C, et al (2019) *Tabrizicola sediminis* sp. nov., one aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria from sediment of saline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 69:2565–2570. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003542>
- Ma T, Xue H, Piao C, et al (2022) Reclassification of 11 members of the family Rhodobacteraceae at genus and species levels and proposal of *Pseudogemmobacter hezensis* sp. nov. *Front Microbiol* 13:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.849695>
- Martínez-Porchas M, Villalpando-Canchola E, Vargas-Albores F (2016) Significant loss of sensitivity and specificity in the taxonomic classification occurs when short 16S rRNA gene sequences are used. *Heliyon* 2:e00170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00170>
- Palatinszky M, Nikolausz M, Sváb D, Márialigeti K (2011) Preferential ligation during TA-cloning of multitemplate PCR products – A factor causing bias in microbial community structure analysis. *J Microbiol Methods* 85:131–136. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.007>
- Pénzes Zs (2013) Makroevolúció: módszerek és mintázatok
- Polz MF, Cavanaugh CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64:3724–3730. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3724-3730.1998>
- Prakash O, Verma M, Sharma P, et al (2007) Polyphasic approach of bacterial classification - An overview of recent advances. *Indian J Microbiol* 47:98–108. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0022-x>
- Qiu X, Wu L, Huang H, et al (2001) Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol* 67:880–887. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.880-887.2001>
- Ramasamy D, Mishra AK, Lagier J-C, et al (2014) A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:384–391. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.057091-0>
- Ramette A, Tiedje JM (2007) Biogeography: An emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microb Ecol* 53:197–207. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-5010-2>
- Riley MA, Lizotte-Waniewski M (2009) Population genomics and the bacterial species concept. pp 367–377
- Roberts MS, Cohan FM (1995) Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution (N Y)* 49:1081–1094. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1995.tb04435.x>
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sipos R, Székely A, Révész S, Márialigeti K (2010) Addressing PCR biases in environmental microbiology studies. pp 37–58
- Sipos R, Székely AJ, Palatinszky M, et al (2007) Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community

- analysis. FEMS Microbiol Ecol 60:341–350. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00283.x>
- Smith JM, Dowson CG, Spratt BG (1991) Localized sex in bacteria. Nature 349:29–31. <https://doi.org/10.1038/349029a0>
- Srinivas TNR, Anil Kumar P, Sasikala Ch, et al (2008) *Rhodobacter ovatus* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a polluted pond. Int J Syst Evol Microbiol 58:1379–1383. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65619-0>
- Staley JT (2006) The bacterial species dilemma and the genomic–phylogenetic species concept. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 361:1899–1909. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1914>
- Staley JT, Gosink JJ (1999) Poles apart: Biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. Annu Rev Microbiol 53:189–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.189>
- Suresh G, Lodha TD, Indu B, et al (2019) Taxogenomics resolves conflict in the genus *Rhodobacter*: A two and half decades pending thought to reclassify the genus *Rhodobacter*. Front Microbiol 10:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02480>
- Suresh G, Sasikala Ch, Ramana Ch V. (2015) Reclassification of *Gemmobacter changlensis* to a new genus as *Cereibacter changlensis* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 65:794–798. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000016>
- Tarhriz V, Thiel V, Nematzadeh G, et al (2013) *Tabrizicola aquatica* gen. nov. sp. nov., a novel alphaproteobacterium isolated from Qurugöl lake nearby Tabriz city, Iran. Antonie Van Leeuwenhoek 104:1205–1215. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0042-y>
- Taylor DL, Herriott IC, Long J, O’Neill K (2007) TOPO TA is A-OK: a test of phylogenetic bias in fungal environmental clone library construction. Environ Microbiol 9:1329–1334. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01253.x>
- Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, et al (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. Int J Syst Evol Microbiol 60:249–266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- Tringe SG, Hugenholtz P (2008) A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. Curr Opin Microbiol 11:442–446. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.011>
- Vandamme P, Peeters C (2014) Time to revisit polyphasic taxonomy. Antonie Van Leeuwenhoek 106:57–65. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0148-x>
- Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic Archaea. Science (1979) 301:976–978. <https://doi.org/10.1126/science.1086909>
- Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based analysis. FEMS Microbiol Rev 21:213–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x>
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al (2017) Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. 67:1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>