

VÁLASZOK DR. VASAS GÁBOR BÍRÁLATÁRA

Nagyon köszönöm Opponensemnek, Dr. Vasas Gábornak, hogy elvállalta a bírálói felkérését. Legfőképp pedig azért az időért és energiáért vagyok hálás, amit az értekezésem tanulmányozására szánt. A dolgozat szerkezetére vonatkozó dicsérő szavai azt jelentik számomra, hogy az egyes, specifikus kutatási kérdéseket sikerült egy nagy kerek egészzé formálnom és a legfőbb tudományos eredményeimet világosan bemutatnom. Köszönöm, hogy az értekezés téziseit elfogadta és bízom benne, hogy a feltett kérdésekre adott válaszaimat is teljeskörűnek találja.

1. kérdés: *A földkéreg negyede szilíciumból áll és vegyületei közül a legelterjedtebb a szilíciumdioxid valamint a kovasavak sem mondhatóak ritkának felszíni vizeinkben sem. Ugyanakkor az eltérő kőzetekből fakadó szilícium különbségek/hozzáférhető formák okozhatnak a kovaalgák mennyiségi (és minőségi) viszonyaiban olyan jelentős eltérést, ami interferálhat a kovaalga alapú minősítésben?*

Válasz: A vízgyűjtő domináns alapkőzetétől függően eltérő Si koncentrációkat találunk felszíni vizeinkben. Vulkáni kőzeten a legnagyobb a víz Si koncentrációja (világátlag $\sim 12 \text{ mg L}^{-1}$). Grániton, homokkővön és agyagpalán ez az érték világátlagban $\sim 9 \text{ mg L}^{-1}$ körül alakul. Ennél kisebb koncentrációkat gneisz és mészkő alapkőzeten (világátlag $\sim 8 \text{ mg L}^{-1}$) találunk (Wetzel, 2001). Hazánkban többnyire meszes alapkőzetű vízfolyásokkal rendelkezünk, kevés a szilikátos vízfolyásunk (ezek a Börzsöny, Bükk, Zempléni-hegység vízfolyásai). A Víz Keretirányelvnek (VKI) megfelelően jelenleg 20 vízfolyás tartozik szilikátos típusba (VGT3, 2021). A 2015-ös vízgyűjtő gazdálkodási tervben a szilikátos és meszes alapkőzetű vízfolyásokat nem tudták elkülöníteni a vízkémiai mérések alapján (ezek az elemzések a kalcium és hidrogén-karbonát koncentrációkon alapultak) (VGT2, 2015). Az egyes élőlénycsoportok, mint a bevonatlakó kovaalgák, a makrogerinctelenek és a halak alapján azonban ezeket a típusokat el tudták különíteni, azaz biológiailag validak (VGT2, 2015). A VGT2 vízkémiai eredményeivel szemben azonban már 2005-ben a Víz Keretirányelvhez kapcsolódó hazai vízfolyás felmérésünkben a kutatócsoportunk kimutatta a szilikátos alapkőzetű vízfolyások egyértelmű elkülönülését. A Si koncentráció a vizsgált vízfolyásokban $0,9 - 22,7 \text{ mg L}^{-1}$ között változott, az átlag $9,3 \text{ mg L}^{-1}$ volt (Az európai átlag $7,5 \text{ mg L}^{-1}$; Wetzel, 2001). A szilikátos vizekben jellemzően $17-23 \text{ mg L}^{-1}$ volt ez az érték, míg a meszes alapkőzetű vízfolyásokban $1-7 \text{ mg L}^{-1}$ közötti (Kovács et al., 2005). A Si koncentráció $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ alatt

válik limitáló tényezővé a kovaalgák növekedése szempontjából (Sas, 1989). A fenti adatok alapján látható, hogy a hazai folyóvizekben a bentikus kovaalgák szempontjából általánosságban nem kell Si limitációval számolnunk. Az elmúlt 20 évben általam vizsgált vízfolyás mintáknak kb. 1%-nál mértünk ennél kisebb koncentrációt. Ennek ellenére a bevonatot a kovaalgák dominálták, sűrű jól elemezhető minták voltak. Ezért azt gondolom, hogy a kovaalgák mennyiségi és minőségi viszonyaiban nem okoz olyan nagymértékű eltérést, hogy az a kovaalga alapú minősítést befolyásolná.

Felhasznált irodalom:

- Kovács, Z., Kovács, C., Királykúti, I., Soróczki-Pintér, É., & Padisák, J., (2005). A magyarországi folyóvizek csoportosítása az EU Víz Keretirányelv tipológiai követelményei szerint. Hidrológiai közlöny, 85, 78-80.
- Sas, H., (1989). Lake restoration by reduction of nutrient loading: Expectations, experiences, extrapolations. Academia Verlag Richarz, St. Augustin.
- VGT2, (2015): Duna-vízgyűjtő magyarországi része. VÍZGYŰJTŐ-GAZDÁLKODÁSI TERV – 2015. Országos Vízügyi Főigazgatóság (OVF). Budapest. 698 pp.
- VGT3, (2021): Magyarország vízgyűjtő-gazdálkodási tervének második felülvizsgálata. VÍZGYŰJTŐ-GAZDÁLKODÁSI TERV – 2021. Országos Vízügyi Főigazgatóság (OVF). Budapest. 712 pp.
- Wetzel, R.G., (2001). Limnology. Lake and river ecosystems. Academic Press. pp 1006.

2. kérdés: *A dolgozat és a kutatás értelemszerűen, ahogyan a célkitűzésekben is megjelent, a kontinentális vizekkel foglalkozik és a szikes magas vezetőképességű vizek egyediségét részletezi a jelölt. A brakkvizek, tengeri/óceáni folyótorkolatok életközösségeiben ezen kovaalga alapú mérőszámok hogyan alakulnak, mennyire használhatóak ezen élőhelyeken.*

Válasz: Az irodalomban erre vonatkozóan nem sok publikált anyag lelhető fel. Véleményem szerint ez annak is köszönhető, hogy a tengerparti régiókban inkább más jellegű állapotértékelési módszerekre helyezik a hangsúlyt, mint pl. a baktérium szám meghatározására, fitoplankton toxin tartalmának és különböző szervezetekben (pl. kagyló, makroalga) talált szennyező és toxikus anyagok mérésére és különböző ökotoxikológiai tesztek (pl. Weels et al., 1999, Moschino et al., 2016, Ameen et al., 2022) alkalmazására.

A kovaalga indexek többségét vízfolyásokra és meghatározott geográfiai régiókra dolgozták ki főként a '80-as, '90-es években. Ma az Omnidia szoftver, -melyet rutin-szerűen használnak a biomonitorozásban a kovaalga indexek számolására- 25 indexet tartalmaz. Ezeket az indexeket más régiókra (Európa más részei, Dél-Amerika, Afrika, Ausztrália) és más víztípusokra is próbálták alkalmazni, így pl. tavakra, lagúnákra és brakkvizekre is. Ezekben az esetekben a gondot az okozta elsősorban, hogy a területen található fajkészlet csak kis mértékben fed át az index által használt fajkészlettel. Ha az adott mintában az index számolásához használt fajok száma < 60%, ebben az esetben az állapot értékelés nem

megbízható. Az egyetlen index, mely hatalmasnak mondható fajkészlettel (több, mint 2500 faj) dolgozik, az IPS (Specific Polluosensitivity Index by Coste in Cemagref, 1982) index. Ezért ez az index sok esetben ígéretesnek tűnt, főleg ha még a lényeges (pl. N és P formák) környezeti paraméterekkel is korrelált (Bak et al., 2004).

Tengerparti, alacsony tápanyag tartalmú, magas vezetőképességű vízfolyások esetén az EPI-D (szerves szennyezés, mineralizáció és eutrofizáció jelzésére alkalmas; Eutrophication/Pollution Index based on Diatoms; Dell'Uomo, 1996), az IDAP (Indice Diatomique Artois-Picardie; Prygiel et al. 1996) és az IPS (Specific Polluosensitivity Index; Coste in Cemagref, 1982 - mint általános szennyezés indikátor) indexeket találták megfelelőnek, ahol a fajkészletben is nagy egyezés volt, és a nagy vezetőképesség ellenére jól indikálta a tápanyag koncentrációk növekedését (Zgrundo és Bogaczewicz-Adamczak, 2002; 2004). De ezekben a tanulmányokban (Zgrundo és Bogaczewicz-Adamczak, 2002; 2004) is megjegyzik, hogy ezen indexek alkalmazása hibákat eredményezhet az állapotértékelés során, hiszen ezek az indexek édesvizekre lettek kifejlesztve. Más helyeken, brakkvízű (>1000 $\mu\text{S cm}^{-1}$), semi-arid területeken folyó kiszáradó vízfolyások esetén viszont a tesztelt indexek (Pantle-Buck index, Rott SI és EPI-D) nem voltak elég érzékenyek a különböző állapotú mintavételi helyek kimutatására. Ezt azzal magyarázták, hogy ilyen extrém környezetben (kiszáradás és a magas vezetőképesség) a közösség homogenizációja következik be, és ezért az index értékek is nagyon hasonlóak (Alvarez Dalinger et al., 2024). Egy másik tengerpartra fókuszáló tanulmány (Rovira et al., 2012) szerint ezen indexek használatának (17 indexet tesztelt) számos limitációja van: a tápanyagokra ellentétesen reagáltak és az ökológiailag fontos fajokat (brakkvízi és tengeri fajok) nem vették figyelembe. Így egyik indexeket sem tálták megfelelőnek az ökológiai állapot meghatározására (Rovira et al., 2012). Egy jellemző probléma, hogy az olyan fajok, mint pl. a *Nitzschia frustulum* jellemzően nagy tápanyag tartalmú és magasabb vezetőképességű édesvízű vízfolyásokban fordul elő. A tengerpart (ahol a tápanyagtartalom és a szalinitás hirtelen változik) közösségének viszont jellegzetes eleme és annak természetes állapotát jelzi, nem pedig annak leromlását. Így az édesvízi indexek alkalmazásával a torkolatokban és egyéb átmeneti vizek esetében nagyon óvatosan kell eljárni (Rovira et al., 2012). Licursi és munkatársai már 2010-ben felhívták a figyelmet arra, hogy a vízfolyások tengerbe torkolásánál, az árapály zónában szükség van a kovaalga fajok optimumának és toleranciájának meghatározására, hogy ezeket új index kifejlesztéséhez fel lehessen használni. Azonban az egyes régiók saját fajkészletével dolgozó, a régiókra (sajátos környezeti feltételek) egyedileg kifejlesztett indexek még mindig nagy kihívást jelentenek és váratnak magukra (Alvarez Dalinger et al., 2024). Továbbá, ezekben a víztípusokban is felmerült az igény a minden napi

gyakorlatban egyszerűbben használható módszerek felé. A Balti-tenger partjainál például a szalinitás változását a nagyméretű kovaalga fajok ($>1000 \mu\text{m}^3$) számolásával (a szalinitás csökkenésével csökken a nagyméretű fajok száma) nyomon tudják követni egy rutin monitoring programban, amit a VKI megkövetel (Ulanova et al., 2009). Továbbá édes-, és brakkvizű vízfolyásokban (Dél-Korea) a kovaalga sejtekben található lipid cseppek száma és a teratogén formák jól használhatók a szennyezés (nehézfémek) kimutatására (Pandey et al., 2018).

Felhasznált irodalom:

- Alvarez Dalinger, F. S., Lozano, V. L., Moraña, L., Borja, C. N., & Salusso, M., (2024). Are quality biological indices universally useful? Limits of benthic based indices in a brackish and arid sub-basin from Argentina. *Austral Ecology*, 49(1), e13306.
- Ameen, F., Al-Homaidan, A. A., Almahasheer, H., Dawoud, T., Alwakeel, S., & AlMaarofi, S., (2022). Biomonitoring coastal pollution on the Arabian Gulf and the Gulf of Aden using macroalgae: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113156.
- Bąk, M., Witkowski, A., Lange-Bertalot, H., & Dadal, A., (2004). Ecology of the Szczecin Lagoon diatom flora with reference to the utility of diatom indices in assessing water quality. *Diatom*, 20, 23-31.
- Cemagref, (1982). *Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux*, Rapport Q.E. Lyon – Agence de l'Eau Rhône- Méditerranée-Corse, Lyon, 218 pp.
- Dell'Uomo A., 1996, Assessment of water quality of an Apennine river as a pilot study for diatom-based monitoring of Italian watercourses, [in:] *Use of Algae for Monitoring Rivers II*, Whitton B.A., Rott E. (eds.), Institut für Botanik, Universität Innsbruck, 65-72
- Licursi, M., Gomez, N., & Donadelli, J., (2010). Ecological optima and tolerances of coastal benthic diatoms in the freshwater-mixohaline zone of the Río de la Plata estuary. *Marine Ecology Progress Series*, 418, 105-117.
- Moschino, V., Del Negro, P., De Vittor, C., & Da Ros, L., (2016). Biomonitoring of a polluted coastal area (Bay of Muggia, Northern Adriatic Sea): A five-year study using transplanted mussels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 1-10.
- Pandey, L. K., Sharma, Y. C., Park, J., Choi, S., Lee, H., Lyu, J., & Han, T., (2018). Evaluating features of periphytic diatom communities as biomonitoring tools in fresh, brackish and marine waters. *Aquatic Toxicology*, 194, 67-77.
- Pantle, R. & Buck, H., (1955). Biological monitoring of water bodies and the presentation of results. *Gas Und Wasserfach*, 96, 605.
- Prygiel J., Lévêque L., Iserentant R., (1996). *Un nouvel indice diatomique pratique pour l'évaluation de la qualité des eaux en réseau de surveillance*, Rev. Sci. Eau, 1, 97-113.
- Rott, E., Hofmann, G., Pall, K., Pfister, P. & Pipp, E., (1997). Indikationslisten für Aufwuchsalgen in Österreichischen Fließgewässern. Teil 1: Saprobien Indikation Wasserwirtschaftskataster. Bundesministerium f. Landu. Forstwirtschaft, 1–228
- Rovira, L., Trobajo, R., & Ibáñez, C., (2012). The use of diatom assemblages as ecological indicators in highly stratified estuaries and evaluation of existing diatom indices. *Marine Pollution Bulletin*, 64(3), 500-511.
- Zgrundo A., Bogaczewicz-Adamczak B., (2002). *Diatom pollution indices as a tool for monitoring coastal zone waters on the example of the Gulf of Gdańsk*, [in:] *Estuaries and other brackish areas – pollution barriers or sources to the sea?* Proceedings of ECSA Symposium 34, Gdańsk-Sopot, 2002, de Jonge V., Elliot M. (eds.), ECSA, IO PAS and Polish SCOR, 97
- Zgrundo, A., & Bogaczewicz-Adamczak, B., (2004). Applicability of diatom indices for monitoring water quality in coastal streams in the Gulf of Gdańsk region, northern Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 33(3), 31-46.
- Ulanova, A., Busse, S., & Snoeijs, P., (2009). COASTAL DIATOM-ENVIRONMENT RELATIONSHIPS IN THE BRACKISH BALTIC SEA 1. *Journal of Phycology*, 45(1), 54-68.

Wells, P. G., (1999). Biomonitoring the health of coastal marine ecosystems—the roles and challenges of microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-12), 39-47.

3. kérdés: *A kitekintés fejezetben a jelölt ugyan érinti a kérdést, de szeretném megkérdezni, hogy a jelenlegi technikák (hagyományos illetve molekuláris alapú) és azok korlátjainak ismeretében a kovaalga alapú minősítést milyen standardizált „workflow”-al tudná elképzelni a közeljövőben, amelyek a legnagyobb hatékonysággal és áteresztőképességgel rendelkezne?*

Válasz:

A kovaalga alapú állapotértékelés alapja a megfelelő taxonómiai precizitás, tudás. Emellett egy monitorozó rendszerben nagy szükség van arra, hogy egyszerre nagyszámú mintát, automatizáltan tudjunk elemezni. Ezek a módszerek ma rohamléptekkel fejlődnek, és hozzáférhetőek vagy hozzáférhetőek lesznek rövid időn belül, „csupán” pénz kell hozzá. Jelenleg már több európai országban alkalmazott molekuláris módszerek egyik nagy előnye, hogy nagyszámú mintát tudnak elemezni egyszerre (metabarkódolás). Ebből a szempontból ez egy tökéletes módszer lenne, ha minden szekvenciához fajt és annak ökológiai igényeit is hozzá tudnánk rendelni. Azonban egy „megadiverzitású” (jelenleg kb. 12 000 kovaalga fajt ismerünk; Guiry, 2012) algacsoport esetében ez nagyon nehéz. A kovaalgák referencia adatbázisa - folyamatos fejlesztése ellenére is- még viszonylag korlátozott használhatóságú, ~ 8000 szekvenciát és 1500 fajt tartalmaz (Rimet et al., 2019). Jelenleg még a hagyományos mikroszkópos módszerrel több fajt találnak meg a mintákban (pl. Tapolczai et al. 2024; Kulaš et al. 2022), mint a párhuzamosan végzett molekuláris módszerrel. A jövőben a metabarkódolás technológiájának fejlődésével azonban lehetőség lesz hosszabb génszakaszok használatára is, melyek a fajokat jobban elkülönítik egymástól. Azonban mivel a kovaalga indexek értékét alapvetően a domináns fajok határozzák meg, ezen fajok többnyire megtalálhatók az adatbázisban. Problémát jelent azonban, hogy sok esetben a kovaalga tenyészetek, amikből a szekvenciát meghatározták, nem kerültek fotódokumentálásra, így azok taxonómiai helyessége is sok esetben bizonytalan. A faj pontos meghatározásának elkerülésére egy lehetséges módszer lenne, hogy a molekuláris módszerrel meghatározott taxonómiai egységekhez (DNS szekvenciákhoz) párosítanánk az ökológiai igényüket (Tapolczai et al., 2021).

A molekuláris módszer mellett a hagyományos módszert is lehetne forradalmasítani. A preparátumok elkészítésének automatizálása a mérnökök számára nem jelentene nagy kihívást. Egyszerre több száz minta automatizált roncsolása, mosása, preparátumra cseppentése és beágyazása a mai technológiák (robotkarok stb.) segítségével könnyen megvalósítható lenne. Ezen felül ma már létezik a nagy áteresztőképességű mikroszkópos képanalízis technikája. Ez

azt jelenti, hogy a mikroszkópba több preparátumot tudunk egyszerre behelyezni, és az egyes preparátumokban lévő valvákrol pillanatok alatt automatizálva képet készít egy program. Gépi tanulás segítségével pedig megtanítható, hogy melyik faj micsoda (ehhez taxonómusok kellene) és ezek után az összetétel könnyen automatizálva meghatározható. Ezen felül persze a képelemzésekből más adatok és információk is kivonhatók (méret, biomassa stb.).

A DNS metabarkódolást és a hagyományos taxonómiai analízis harmonizációjára azonban feltétlenül szükség van, mely a DNAquaIMG projekt (<https://dnaquaimg.eu/>) kerül megvalósításra, jelenleg 11 ország, 44 kutatója dolgozik rajta. Ez viszont (jó) taxonómusok nélkül lehetetlen feladat. Taxonómusokból azonban már most nagyon kevés van, és a helyzet csak rosszabb lesz. Jelenleg ugyanis nemcsak a fajok, hanem a taxonómusok kihálásának is szemtanúi vagyunk. Ez a későbbiekben hatalmas gondot jelent majd a szakma számára.

Amíg azonban az automatizált és már validált, megbízható technikák nem állnak rendelkezésre, addig a közeljövőben a digitális taxonómiai interkalibráció alkalmazása egy nagy előrelépés lehet az állapotértékelések minőségének biztosításában. Ez azt jelenti, hogy egy digitális preparátumot (nagy felbontású digitalizált lenyomata az eredeti preparátumnak) kapunk elemzésre webes felületen, ahol az egerrel navigálunk, zoomolunk és fókuszálunk. Az egyes valvákat ki tudjuk jelölni, megszámozni és megnevezni. Az egyik nagy előnye ennek a technikának, hogy pontosan tudjuk, hogy ki melyik valvát határozta meg és így valóban összehasonlítható lesz az eredmény. Létre kell hozni egy úgynevezett „gold standard”-et (taxonómusok, szakértők eredményei), melyhez aztán hasonlítják az interkalibrációban résztvevők eredményét. Ez a módszer lehetőséget nyújt a biodiverzitás és a rutin vízminőségi monitorozás közötti kapcsolat megteremtésére is a VKI ernyője alatt.

A molekuláris módszerek mellett tehát a digitális képalkotás szintén egy nagyon ígéretes módszer, aminek az alkalmazása megvalósítható lesz a közeljövőben. Így az adatok (molekuláris és mikroszkópos) összevethetők lesznek akár kontinentális skálán is.

Irodalomjegyzék:

Guiry, M. D., 2012. How many species of algae are there? *J. Phycol.*, 48,1057–1063.<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>

Kulaš, A., M. G. Udovič, K. Tapolczai, P. Žutinić, S. Orlić, Z. Levkov, 2022. Diatom Edna metabarcoding and morphological methods for bioassessment of karstic river. *Science of the Total Environment* 154536.

Tapolczai, K., T. Chonova, D. Fidlerová, J. Makovinská, D. Mora, A. Weigand, J. Zimmermann, 2024. Molecular metrics to monitor ecological status of large rivers: Implementation of diatom DNA metabarcoding in the Joint Danube Survey 4. *Ecological Indicators* 160, 111883.

Tapolczai, K., G. B. Selmeczy, B. Szabó, B. Viktória, F. Keck, A. Bouchez, F. Rimet & J. Padišák, 2021. The potential of exact sequence variants (ESVs) to interpret and assess the impact of agricultural pressure on stream diatom assemblages revealed by DNA metabarcoding. *Ecological Indicators* 122: 107322

Rimet, F., Gusev, E., Kahlert, M., Kelly, M. G., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., ... & Bouchez, A. (2019). Diat. barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. *Scientific Reports*, 9(1), 15116.

Végezetül szeretném ismét megköszönni Dr. Vasas Gábornak a bírálatba fektetett munkáját és kérem válaszaim elfogadását.

Veszprém, 2024. november 4.

Stenger-Kovács Csilla