TÁMOP 4.1.2.B.2-13/1-2013-0007
„ORSZÁGOS KOORDINÁCIÓVAL A PEDGÓGUSKÉPZÉS MEGÚJÍTÁSÁÉRT”

A prokarióták világáról tanároknak

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Szociális Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

MIRE KÉPESEK A BAKTÉRIUMOK?

A prokarióták világáról tanároknak

Írta:

Borsodi Andrea
és Márialigeti Károly

Illusztrálta:

Pohner Zsuzsanna

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Mikrobiológiai tanszék
Budapest, 2015.

A Márialigeti, K. 2013. (szerk.) A prokarióták világa. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, pp. 592. könyv felhasználásával.

1. ELŐSZÓ

A beszélni kezdő gyermek világra való rácsodálkozását, környezete megismerését először „Ez mi?” kérdések özöne jelzi. Hároméves korban a kérdések már az okokat is feszegetik: „Miért?” Ideális esetben ez a megismerési, tudási vágy végig kíséri az ember életét. A szülők, a család, a nevelők, a támogató tágabb társadalmi környezet egyaránt részt vesz és felelős is ezért az élethosszig tartó intellektuális fejlődésért. Ugyanazok a kérdéstípusok, akár ugyanazok a kérdések is visszatérnek, újból és újból előkerülnek, ahogy az ismeretek, tapasztalatok bővülnek és újabb mélységei alakulnak ki. A szüleitől a kérdésekre az értelmi fejlettségének megfelelő szinten jó és kimerítő választ kapó gyermek hasonló bátorsággal és nyitottsággal fog az iskolában is tanítójához, tanárához fordulni. Nagy felelősség ez a szülőnek és az iskolának (beleértve az egyetemet is) egyaránt. Nem szabad válasz nélkül hagyni a kérdéseket és nem szabad mellébeszélni sem. Persze nem tudhatunk mindent. Az igényes tanár a „Nem tudom!” választ ezért úgy folytatja, hogy „Utána nézek és visszatérünk a kérdésre!” Kis könyvünk a baktériumok változatos világa területén kísérel meg a válaszok megtalálásában segítségére lenni a tanároknak.

A legelső „Ez mi?” korszakban a szülő aligha fog találkozni a baktériumokra vonatkozó kérdésekkel. A miértek között azonban nagyon hamar kaphatunk „bakteriológiai” kérdést. Gondoljunk csak a következő időben tömörített párbeszédre: „Ez mi? - Kefir, papírdobozos kefir. Már ettél ilyet és szereted. - És … a kefir miért savanyú? - Hm?”
Máris a baktériumok élelmiszeripari felhasználásának területére tévedtünk és a feltételezhetően folytatódó miértek sora nyomán a nem bakteriológus szülő elgondolkodhat azon, hogy vajon nem tévesztett-e pályát. A biológiatanártól már elvárják a pontos választ.

Könyvünkben a bakteriológia középiskolai szinten mindenképpen előkerülő kérdéseinek megértéséhez és megválaszolásához szükséges alapvető tudást foglaltuk össze. A baktériumoknak a bioszférában betöltött központi helye és szerepe miatt ez a tudás egyben segítheti a biológia más alapvető kérdéseinek a megértését is. Az első fejezet világossá teszi, hogy baktériumok tengerében élünk. A mai fejlett eukarióták, a „látható világ” ebben és ebből alakult ki. A második fejezetben rácsodálkozhatunk a legkisebb sejtes élőlények változatos szerveződésére, morfológiai és molekuláris sokféleségére. A baktériumok anyagcseréje – főképpen az energiatermelő folyamatok terén – sokkal összetettebb, mint a fejlett eukariótáké. Igyekszünk legalább felvillantani a hihetetlen változatosság kulcsfolyamatait.

A molekuláris biológia robbanásszerű fejlődése a bakteriológiai ismereteinket teljesen új megvilágításba helyezi és új, eleddig ismeretlen világait mutatja be az életnek. Nem érthetjük meg a záporozó újdonságokat, a baktériumok vizsgálati módszerei alapjainak megismerése nélkül. A negyedik fejezetben ezt foglaljuk össze. A rákövetkező fejezet az emberi test baktériumközösségeit már a legújabb molekuláris eljárásokkal nyert eredmények tükrében mutatja be. Az emberrel kapcsolatba kerülő baktériumok egy része betegségeket okozhat. Az egészségtudatos élethez hozzátartozik az ezekről nyert ismeretek sora, de ugyanúgy a betegségek leküzdésére, megelőzésére felhasználható baktériumok, vagy azok közreműködésével létrehozott termékek ismerete. A hatodik fejezetben a baktériumok „hasznát” mutatjuk be. Alkalmazásuk közvetlenül (élelmiszerek, gyógyszerek), vagy közvetve (pl. környezetvédelem) a mindennapjaink része.

Reméljük, hogy mind a pályájukra most készülő, mind pedig a korábban végzett tanárok haszonnal forgathatják ezt a könyvecskét. Bízunk benne, hogy tanítványaik bakteriológiát érintő kérdései zömére megtalálják a választ, ill. a könyvünkből megszerzett tudás biztos alapot ad a kérdésekre pontos választ adó szakcikkek megértéséhez.
Budapest, 2015. nyarán

A szerzők

2. TARTALOMJEGYZÉK

1. Előszó	3
2. Tartalomjegyzék	5
3. Bevezetés – a bakteriológia rövid története (Márialigeti Károly)	6
4. A baktériumok helye az élővilágban és előfordulásuk környezeti határfeltételei (Borsodi Andrea)	15
4.1. A mikrobák szerveződési szintjei	15
4.2. A baktériumok helye az élővilág három doménes rendszerében	15
4.3. A prokarióta létforma környezeti peremfeltételei	22
4.4. Fajok közötti kapcsolatok	29
4.5. A baktériumok életföldrajza	36
5. A baktériumok mérete, sejtszerveződése; növekedése és szaporodása (Borsodi Andrea)	39
5.1. Kényszerek érvényesülése a sejtméret alakulásában	39
5.2. A prokarióta sejtek típusai és szerveződésük	41
5.3. Sejtosztódás és életciklus a baktériumok körében	47
5.4. Mikrobiális biofilmek	51
6. A bakteriális anyagcsere sokfélesége (Márialigeti Károly)	55
6.1. Az élet energetikai alapjai	55
6.2. A baktériumok energiatermelésének alapjai	61
6.3. Az energiatermelő anyagcsere változatai és a redukáló erő forrásai	65
6.4. A felépítő anyagcsere szénforrása	70
6.5. Kevert anyagcseretípusok	74
7. A baktériumok vizsgálati módszerei	76
7.1. A bakteriológiai kutatások alapkérdései	76
7.2. A baktériumok tenyésztése	79
7.3. Nem tenyésztéses eljárások a baktériumok vizsgálatában	85
7.3.1. A nukleinsav kivonásra alapozott baktériumközösség vizsgálata	86
7.3.2. Kemotaxonómiai és szerológiai immunológiai baktérium közösség elemző és diagnosztikai eljárások	92
7.4. A molekuláris biológiai eljárások fejlődése, új generációs szekvenálás	95
8. Az ember és baktériumközössége (Borsodi Andrea)	102
8.1. Az emberi test baktérium partnereinek megismerése	102
8.2. A humán mikrobiom	102
8.3. Kórokozók és virulencia	117
8.4. Kórokozók a lakásban és tágabb környezetünkben	121
9. A baktériumok gyakorlati alkalmazásának lehetőségei (Márialigeti Károly)	123
9.1. Baktériumok az élelmiszeriparban	128
9.2. Prokarióták felhasználása a gyógyszeriparban	135
9.3. A baktériumok haszna a mezőgazdaságban	137
9.4. Baktériumok a környezetvédelem szolgálatában	143

3. BEVEZETÉS – A BAKTERIOLÓGIA RÖVID TÖRTÉNETE

A bakteriológia bizonyítékon alapuló írott története a XVII. évszázad második felében kezdődött. Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) volt ugyanis legjobb tudásunk szerint az első ember, aki „mikroszkópján" keresztül baktérium sejteket látott. A delfti – mai szóhasználattal – textil kereskedő több száz nem egyszer ékszerszámba menő (arany, ezüst, elefántcsont elemekből készült) gömbszerű lencsét tartalmazó különleges nagyító berendezést készített, amelyekkel környezetében amit csak lehetett, megvizsgált. Észleléseit leírta és rajzokkal is bemutatta. Tanulmányait sebész-anatómus barátjának unszolására (Reinier [Reguerus] de Graaf) elküldte a londoni Királyi Társaságnak (Royal Society), ahol a másfélszáz levél nyomtatásban meg is jelent (Leeuwenhoek, 1677). E korban tökéletesítették egyébként a több lencséből, lencserendszerből és megvilágító szerkezetből álló összetett mikroszkópot is. Robert Hooke (1635-1703) számára nem utolsósorban Leeuwenhoek mintegy 0,5-1µ-os felbontású nagyítójával nyert képei jelentettek kihívást. A mikroszkópok tudományos célra már jól használható mesterséges megvilágítású típusai a XIX. század közepén jelentek meg (pl. Carl Zeiss [1816-1888] első mikroszkópja) és további tökéletesítésükkel – amint látni fogjuk – párhuzamosan fejlődött a bakteriológia tudománya is. A fénymikroszkóp fejlődése napjainkig töretlen, elég csak a XX. század közepén megalkotott fluoreszcens mikroszkópiára, majd a század végén a konfokális mikroszkópra gondolni. Napjaink Nobel-díjjal is elismert fejlesztésében a számítógépes elektronikus képfeldolgozás és a konfokális mikroszkóp összekapcsolásával alkották meg az ún. szuperrezolúciós mikroszkópot.

Mielőtt tovább ismerkednénk a bakteriológia történetével, határozzuk meg, mi is az a bakteriológia. A szófejtés adja a választ: a baktériumok tudománya, a baktériumok biológiájával foglalkozó tudomány, a mikrobiológia része. Az élővilág egy szervezetcsoportjával foglalkozik. A baktériumok sejtes szerveződésű egysejtű élőlények, amelyek a többi egysejtűtől legegyszerűbben morfológiai alapon különíthetők el: magállományukat (és benne kromoszómájukat) nem borítja magmembrán és sejtjeikben nem jellemző autonóm (saját örökítő anyaggal rendelkező) sejtszervecskék jelenléte. Vagyis prokarióta szerveződésűek. Ma már tudjuk, hogy két világuk (birodalmuk, doménjük; Bacteria és Archaea) törzsfejlődési értelemben parafiletikus, vagyis párhuzamosan fejlődtek egy közös ősből, bár nem ismerjük a közös őst. A két világot ugyanakkor „interdomén" géncsere, horizontális géntranszfer „összeköti".

Visszatérve a bakteriológia történetéhez meg kell jegyezzük, hogy nem volt szükség a baktériumok észlelésére, pontos ismeretére ahhoz, hogy hatásaik alapján már jóval korábban felhasználják őket. A szabad szemmel nem látható, betegséget, romlást közvetítő anyagok, parányok meglétét már az ókorban is feltételezték, megfigyelésekből kikövetkeztették, sőt fel is használták. Elég csak itt a biológiai hadviselés legősibb formáira utalni: a víz ihatatlanná tehető a kutakba dobott döggel; pestisben meghaltak hulláját katapulttal vetették az ostromlott erősségbe. Hasonló módon következtettek a hasznos átalakító (pl. élelmiszerek előállításában) tulajdonságok, folyamatok átolthatóságára. Természetesen fel is használták erjesztett italok, vagy kovászos kelesztett kenyér stb. készítésére. Több szerző is leírta, hogy egyes betegségek terjedése bizonyos óvintézkedésekkel korlátozható. A Biblia (és benne a Tóra, majd az azt magyarázó Talmud) közismert tisztasági törvényei (pl. lepra esetén) mellett tudjuk, hogy a „görögök" is felismerték a ragályos betegségeket (Hippokratész - tüdővész, Arisztotelész - pestis, Galénusz - veszettség stb.). Külön fejezetet érdemelne a távol kelet, Kína tudása, pl. a varioláció feltételezett már ókori alkalmazása. A későbbi korokból csak Abu Sina (latinosan Avicenna, 980-1037) évszázadokon át meghatározó alapművét említjük (Az orvoslás törvénye), amelynek harmadik könyve a higiéniával, benne a ragályos betegségek elkerülésével foglalkozik.

A legtöbb munkában azonban nem vált, nem tudott szétválni, hogy a ragályt valamilyen anyag, vagy élőlény közvetíti-e. Az orvostörténet megemlékezik a „legműveltebb rómairól", Marcus Terentius Varroról (Kr. e. 116-27), aki „A tudományok kilenc könyvben" c. munkájának orvostudományi részében láthatatlan, a levegőben terjedő „állatok" betegségterjesztő szerepéről ír. Aligha volt erre bizonyítéka. Csak közvetett bizonyítékai voltak még Girolamo Fracastoronak (1478-1553) is, aki a francia betegség (szifilisz) leírója és közvetlen fertőző úton való terjedésének megállapítója. Ő már „contagium vivum", élő ragályanyag létezéséről írt megfigyelései alapján. Tudományos, tudományfilozófiai szempontból két egymással összefüggő probléma került hosszú időre az érdeklődés középpontjába: i. a ragályos betegségek oktana és ezzel párhuzamosan ii. a „generatio spontanea" kérdésköre. Vagyis az élet, élőlények képződésének a problematikája: igaz-e az arisztotelészi abiogenezis elmélete, avagy láthatatlan, de élő propagulumokból, csírákból lesz csak élet. Francesco Redi (1626-1697), a kísérletező biológiatudomány megalapítója korszakos kísérletével bebizonyította, hogy legalábbis a legyek esetében nem áll az abiogenezis. A finom hálóval lezárt üvegben elhelyezett máj ugyan megbüdösödött, de nem lett nyüves. A legyek tehát nem „porból", hanem az általuk lerakott tojásokból nyüveken keresztül fejlődnek ki. Egy évszázadnak kellett eltelnie, hogy Lazzaro Spallanzani (1729-1799) már a mikroszkópos elemzések korában bemutassa, hogy a húsleves zavarosodását a levegővel terjedő mikroorganizmusok okozhatják (amíg az óra hosszat forralt levest tartalmazó leforrasztott lombikot nem nyitotta ki, az nem zavarosodott meg). Munkája nem vezetett az abiogenezis teljes megcáfolásához, mert kritikusai érvelése szerint a hosszas forralás és „levegőhiány" tönkretette az „életerőt" a levesben ezért nem romolhatott meg. A generatio spontanea végleges megcáfolója újabb évszázad múltán majd Louis Pasteur (1822-1895) lesz híres hattyúnyakú palackjaival. Ő már egyértelműen bizonyítani tudta, hogy a levesek a levegővel, porral bekerülő fertőzés hatására zavarosodnak, romlanak meg. A palackok nyakában alkalmazott vízzár segítségével már meg tudta győzni a kétkedőket is.

A XVII. századtól a természettudományos vizsgálatok egyik csúcsműszere a mikroszkóp. A mikroszkópok első magyarországi megjelenésére Ralovich (2014) szerint Paterson Hain János munkájából következtethetünk (Observatio XXVII. Experimenta microscopica, Eperjes-Halle, 1671). Az 1700-as években több intézményben is használtak hazánkban mikroszkópot (pl. Nagyszombati Egyetem, Sárospataki Collegium). Meglehetősen sok magyarországi szerző foglalkozott könyveiben ragályos emberi, állati és növény betegségekkel, valamint ételek és más anyagok romlásával (pl. Lippay János, Cseri Mihály, Weszprémi István, Grossinger Keresztély János). A magyar nyelv több szava esetében mai fejjel is érezzük ezt a „mikrobiológiai tartalmat". Így pl. bába, erjedés, ev, égés, éleszt, fene, fertő, franc, hideg, kel, kovász, mag, méreg, miazma, nadály, nyavalya, oltás, oltó, pokol, ragály, ragya, rosseb, rothad, savanyít, üszög, var stb.

A XIX. század közepe hozta azonban a bakteriológia tudományának szárba szökését. A tudományos vizsgálatok a betegségek kóroktanára, a baktériumok leírására, tenyésztésére, jellemzésére, az ellenük való védekezésre koncentráltak. A tudománytörténetben korszakosként jegyzett eredmények zöme a mikrobiológia két „alapító atyja" (Pasteur, L.; Koch, R.) és a körülöttük kialakult tudományos műhelyek munkája. Louis Pasteur (1822-1895) vegyész legelső kutatásaiban fermentációval létrehozott egyes szerves vegyületek (borkősav, tejsav) kettős optikai természetét vizsgálta. A sör megsavanyodásával kapcsolatos elemzései során 1857-ben fedezete fel, hogy a tejsavas erjedéstől romlott sörben mikroszkóppal vizsgálva a szokásos (élesztő) mikroba alakoktól eltérő kicsiny baktériumok (a görög bot, pálca szóból) voltak láthatóak. Az erjedés (árpaléé, musté stb.) tehát mikrobákhoz köthető. Pasteurt ez a munkája vezette el a mikrobiológiához, amelynek a legtágabban értelmezett területén ért el korszakos eredményeket (vagyis mind mikológiai, bakteriológiai, virológiai, immunológiai felfedezéseket tett). Ezekből itt csak a baktériumokhoz szorosabban

köthető eredményeket emeljük ki. Talán a legfontosabb volt a „generatio spontanea” végleges megcáfolása, amint már azt korábban említettük. A hattyúnyakú lombikok alkalmazásával egyértelművé tette, hogy a vízzár felelős a levegővel terjedő fertőző csírák, baktériumok kizárásáért és nincsen életerő a „bouillon”ban. Másik korszakos felfedezésének ihletője Edward Jenner (1749-1823) 1798-as tehénhimlővel történő - ma Pasteur elnevezésével - vakcináció volt, amely a himlő poxvírusa elleni hatásos védekezést hozta. Pasteur a kórokozó attenuálásának (sorozatos átoltásokkal történő virulencia gyengítés) módszerével állította elő a baromfikolera baktérium kórokozójából a betegség elleni oltóanyagot. Ezt a módszert alkalmazta egyébként a lépfene (*Bacillus anthracis*), ill. később a veszettség vírusa elleni védekezés kidolgozása során is. Megjegyezzük, hogy még életében létrehozták a róla elnevezett mikrobiológiai, közegészségügyi kutatóintézetet (Institut Pasteur, 1888).

Robert Koch (1843-1910) orvos munkássága szorosan a baktériumok kutatásához kötődik, bakteriológusnak nevezhetjük. Sok fontos felfedezése (lásd. **3.1. táblázat**) közül itt csak kettőt emelünk ki. Hozzá és tanítványaihoz kötődik a bakteriológia alaptechnikája a tenyésztésre alapozott mikrobiológiai vizsgálat, a tiszta tenyészetek, törzsek létrehozása. A burgonyaszeleten történő tenyésztést követően Ő alkalmazott először zselatint a tápközeg szilárdítására, majd az Ő tanítványai vezették be az agar használatát szilárdító anyagként (Angelina Fannie és Walther Hesse, 1882). Az Ő tanítványa volt Julius R. Petri is, aki 1887-ben javasolta a ma róla elnevezett tenyésztőedény, a Petri-csésze használatát. A baktériumok morfológiai jellemzésére alkalmazta az egyszerű (metilénkékes) festést és bevezette a mikroszkópos fotózást. A tiszta tenyészetekkel végzett munka és a betegségek kóroktanának összekapcsolása vezetett 1884-ben a róla elnevezett posztulátumok közléséhez (**3.1. ábra**), amely a mai napig meghatározza az egyes mikrobiológiai hatások bizonyítását. Röviden és általánosítva a betegből, vagy romlott/érintett közegből izolálni kell a folyamatért felelősnek vélt mikrobát. Ezt törzsek formájában fenntartjuk. A mikrobát visszaoltva egészséges egyedbe, vagy ép/érintetlen közegbe kialakult a betegség/romlás/korábban megfigyelt folyamat. A betegből/megromlott/érintett közegből megint csak izolálható a felelős ágens, amely megegyezik az eredeti betegség/romlás/stb. okozó mikrobával. A Koch féle posztulátumok alkalmazásának ma talán legnagyobb nehézségét az jelenti, hogy nem minden kór-, vagy romlást okozó mikroba (esetleg éppen hasznos folyamatot végző, vagy mutualista partner) izolálható és tenyészthető. Másrészt a sorozatos oltások során az eredeti mikroba megváltozik (pl. az attenuáció csökkenti a virulenciát). A mikrobiológia mai molekuláris eljárásai segítségével azonban ezek a nehézségek leküzdhetők: a mikroba jelenléte, átvitele molekuláris ujjlenyomata alapján követhető, és a megváltozás pedig nem lépi át a molekuláris elven megalkotott fajhatárokat. A mai Robert Koch Institut jogelődjét 1891-ben Robert Koch vezetésével hozták létre.

A fertőző betegségek kórokozóinak és oktanának leírása és a védekezés megoldása a bakteriológia kiemelten fontos területe maradt mindmáig. Az eredményeket Földünk lakosságának robbanásszerű növekedése igazolja (pl. a gyermekbetegségek okozta halálozások csökkenése miatt) és sok hős, akár önkísérleteket végző kutató halála szentesíti. A bakteriológia hőskorának magyar kutatóiról megemlékezve (a mikrobiológia korai történetének összefoglalását lásd Ralovich, 2014) legelőször is a szülészorvos Semmelweis Ignácot (1818-1865) kell kiemelnünk. Ő volt ugyanis az első, aki tudatosan alkalmazott fertőtlenítő eljárást, bár nem tudott a baktériumok szerepéről a fertőzésekben. A bécsi egyetemen dolgozva megfigyelte, hogy a gyermekágyi láz az egyetemi szülészeten azért oly gyakori, mert a medikusok a bonctani gyakorlatokról viszik át a „hullamérget” a szülő anyákba. A hullaméreg átvitelének megakadályozására kísérletei alapján a klórmeszet választja ki. A klórmeszes vízben a felszabaduló naszcens oxigén olyan erős oxidáló hatású, hogy megszűnteti a „hullaszagot” (meg persze elpusztítja a fertőző baktériumokat is). Semmelweis később már az egyes személyek vizsgálata között is előírta a klórmeszes vizes

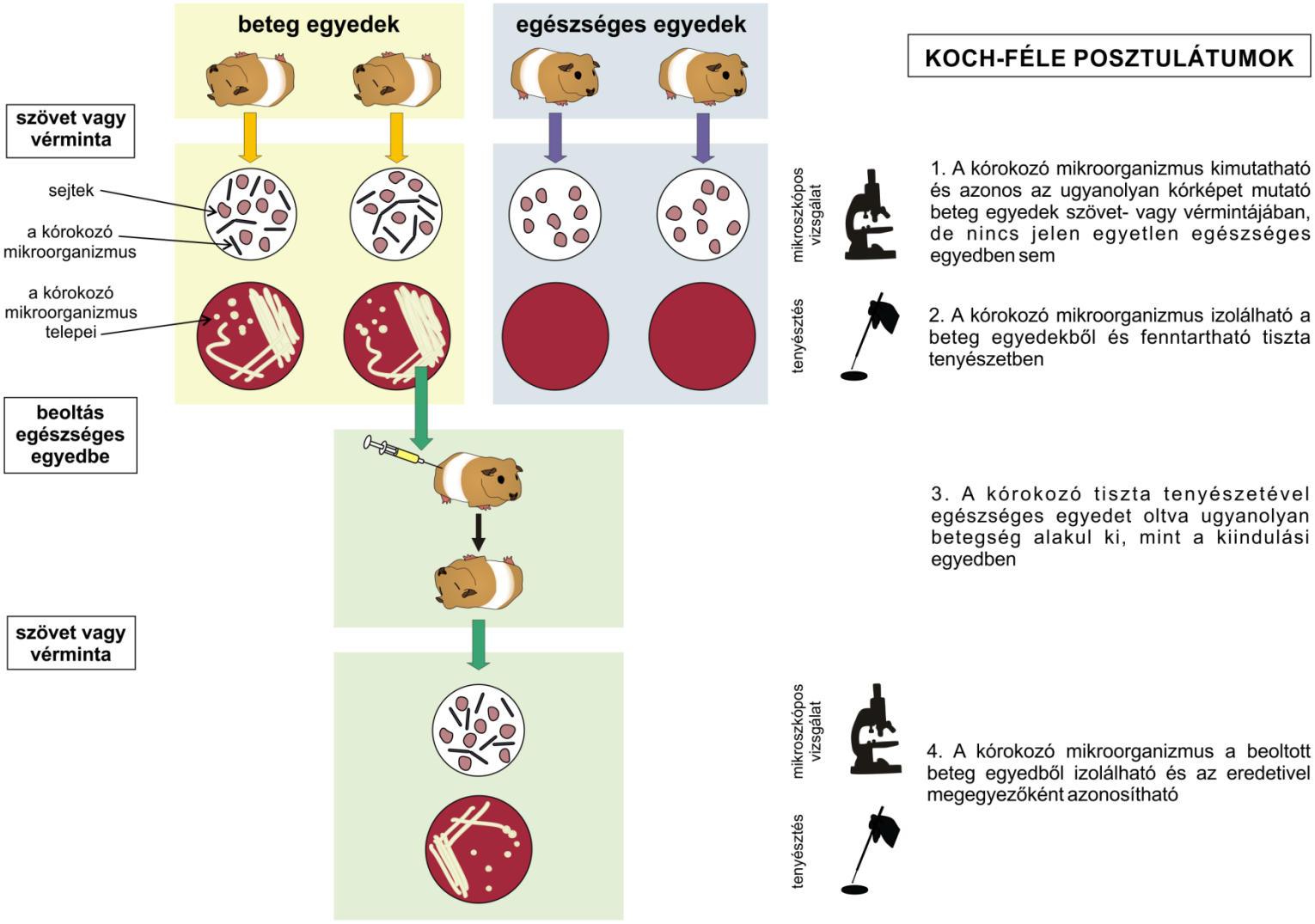
kézmosást. Semmelweis felfedezése fél évszázadra elfelejtődött. Nemcsak élete volt meglehetősen hányatott, de felfedezéséé is. A nemzetközi szakirodalom az antiszepszis fogalmát Joseph Listerhez (1827-1912) köti, pedig a sebészeti antiszepszissel kapcsolatos írása csak 1867-ben jelent meg. Mindannyiunk felelőssége, hogy Semmelweis Ignác korszakos felfedezését megismertessük és elismertessük a világgal.

A hazai bakteriológiai kutatások köréből mindenképp ki kell emelnünk a lépfene (*Bacillus anthracis*) kórtanával foglalkozó munkákat, szerzőket. Preisz Hugó (1860-1904) a baktérium virulenciájának elemzésével szerzett nemzetközi elismerést. Kimutatta ebben a tok kiemelt szerepét. A baktérium tokanyagának pontos elemzését majd Ivánovics György (1940-1980) mikrobiológus és Bruckner Győző (1900-1980) szerves kémikus fogja elvégezni 1938-ban.

A fertőző betegségek leírásával párhuzamosan indult meg a ma környezeti bakteriológiának nevezett terület kutatása. Sergei Winogradsky (1856-1953), Martinus Beijerinck (1851-1931), ill. Nicolaas Louis Söhngen (1878-1934) a kén, a nitrogén, ill. a metán körforgalmában résztvevő baktériumok első leírói (bár a nitrifikáció biológiai folyamatát 1877-ben Schlösing és Müntz már leírta). Kiemeljük még az autotrófia (autotróf CO_2 fixáció, más néven szerves anyag termelés, produkció) kimutatását, amely úgyszintén Winogradskyhoz kapcsolható. A molekuláris N megkötését Hellrieger, H. és Wilfarth, H. mutatta ki 1888-ban. A környezeti bakteriológia folyamatainak pontos megértését majd Albert Jan Kluyver általános anyagcsere modelljének közlése (1926) fogja lehetővé tenni (ill. az erre alapozott kutatások). A litotróf életmód (hogyan tud egy élőlény csak szervetlen anyagokból álló közegben szaporodni) ezt követően válik megérthetővé, világossá. Beijerinck és Kluyver a megalapítója a mikrobiológia ún. delfti iskolájának. A környezeti mikrobiológia kiemelkedő hazai képviselője Fehér Dániel (1890-1955) kimutatta, pl. hogy a sivatagok talajában is jelentős a baktériumok csíraszáma (a baktériumok tevékenységét a vízhiány gátolja).

A kórokozó baktériumok felfedezését és leírását követően természetesen indult el a patogenitási faktorok felkutatása (pl. diftéria toxin, athrax tok), valamint a bakteriális fertőzések, betegségek elleni védekezés, gyógymódok kidolgozása. Az immunológiai védekezés (vakcináció; antitoxin [pl. diftéria antitoxin, 1940] stb.) mellett, a gyógyítás kémiai módszereinek elvei jelentek meg legkorábban. Paul Ehrlich (1854-1915) 1885-ben fektette le a kemoterápia elveit. A „mágikus lövedék" elnevezés jól írja le a célt: olyan szer kifejlesztése, amely csak a célba vett mikrobát találja el és elpusztítja az élő, érintetlen (emberi) szervezetben. A Salvarsan volt a szifilisz első hatásos ellenszere. Pontosan 50 évvel később fog megjelenni a Prontosil (Gerhard J. Domagk, 1935); a szulfonamidokat a gennykeltő kokkuszok ellen vetették be és máig sok fertőzés ellen használjuk a modern változataikat. Az első antibiotikumot Alexander Fleming (1881-1955) fedezi fel (penicillin, 1929), a *Penicillium notatum* gombával fertőzött táptalajon észlelt gátló hatás alapján. Fleming egyébként első világháborús orvosi „élményei" hatására vált az aszepszis, antiszepszis, antimikrobiális hatások szenvedélyes kutatójává. Az antibiotikum fogalom megalkotója, Selman Waksman (1888-1973) izolálta az első baktériumok által termelt antibiotikumot (sztreptomicin, 1944), amely hatásos (volt) a tuberkulózis gyógyítására. Ezzel indult útjára az elsősorban aktinobaktériumok (*Streptomyces, Nocardia* stb.) által termelt antimikrobiális anyagokra alapozott antibiotikum ipar.

A genetika tudományának fejlődését is elősegítette egy sor bakteriológiai felfedezés. A mikrobiális genetika tudományág is az antimikrobiális hatások vizsgálatából fejlődött ki. Frederick Twort (1877-1950) a vakcinia vírus elleni oltóanyag fejlesztése során fedezte fel a *Staphylococcus* baktériumok lítikus ágensét (vírusát), amelyet azután két év múlva Felix d'Herelle (1873-1949) fog bakteriofágnak elnevezni. A fággal történő genetikai



3.1. ábra. A Koch-posztulátumok mind a négy lépése elengedhetetlen a kórokozó tulajdonság igazolására.

információátvitel felfedezésére (transzdukció) 1952-ben került sor (**3.1. táblázat**). A baktérium transzformációt Frederick Griffith (1877-1941) már 1928-ban leírta, azonban annak bizonyítása, hogy a patogenitást DNS vitte át, majd csak 1944-ben történik meg. A harmadik bakteriális genetikai alapfolyamatot, a konjugációt 1946-ban írták le. Ezek a felfedezések segítik a DNS örökítő anyag szerepének igazolását és megalapozzák a molekuláris eljárások és az élet természetes filogenetikai rendszerének felállítását.

A bakteriális szisztematika Ferdinand Cohn (1828-1898) óta a baktériumok morfológiai biokémiai, élettani, szerológiai tulajdonságaira alapozott mesterséges rendszert használt, amelynek középpontjában a baktériumtörzs áll. A természetes filogenetikai rendszer kialakításának igényét és a sejtek kémiai alkotóinak (vegyületeinek) elemzésére alapozott lehetőségét 1965-ben Emile Zuckerkandl és Linus Pauling elméleti biológiai cikke fogalmazta meg. Cikkükben ugyanis kifejtik, hogy a gének és az azt kódoló DNS és annak fokozatos megváltozása a törzsfejlődésre vonatkozó jelentést hordoz (szemantofor vegyület a DNS): az egyes bázisok cseréje, helyettesítése ilyen filogenetikai információ. Ebben az időben azonban még nem állt rendelkezésre DNS bázissorrend elemző eljárás, sőt a kromoszómákban levő DNS szál kivonása és megismételhető módon „kezelhető" darabokra aprítása sem volt megoldható. Ezért fordult Carl Woese (1928-2012) figyelme a fehérjeszintézis középpontjában álló riboszómális RNS felé. Ezek gradiens centrifugálással elválaszthatók és így nagy mennyiségben preparálhatók voltak, ráadásul a riboszóma kis alegységében levő (16/18 Svedberg egységnyi méretű) RNS életfontosságú feladata (fehérjeszintézis folyamata rá épül fel) miatt meglehetősen konzervatív (kevéssé változó) molekula. Az általa kidolgozott RNS katalogizálási eljárás segítségével meg tudta állapítani az egyes fajok nagyon valószínű rRNS nukleotid sorrendjét. Az összehasonlítások eredménye egy „harmadik életforma" az ősbaktériumok (Archaea) felfedezése lett. Azt is bemutatta egyben, hogy a gének tényleg alkalmasak a törzsfejlődés útjainak felfedésére.

A Carl Woese által megalapozott eljárás új utat nyitott az élővilág evolúciójának vizsgálatában és rendszerezésében. Méltó helyére végül a molekuláris biológia nukleinsav elemzési, manipulálási módszereinek kidolgozásával kerülhetett. A nukleinsav alapú molekuláris eljárásokat, a molekuláris biológiai robbanást három Nobel díjjal értékelt felfedezés tette lehetővé. 1967-ben Werner Arber munkatársaival leírta a restrikciós endonukleáz enzimek I. csoportját, majd később Hamilton O. Smith a II. típusú enzimet és Daniel Nathans pedig a specifikus helyeken történő, megismételhető hasítást mutatta ki. Az 1977. évben két kutatócsoport is közölt DNS bázissorrend elemzési eljárást. Ezek közül Fred Sanger és munkatársainak módszere vált széles körben használttá. A harmadik feladat pedig a nukleinsav szaporítás megoldása volt. A meglehetősen sok eljárás közül a Kary Mullis által kidolgozott polimeráz láncreakció vált elsődlegesen a mindennapi használat részévé. Nem hagyhatjuk ki persze a felsorolásból a molekuláris klónozás technikáját, amelyet a bakteriális genetika alapfolyamatainak és a restrikciós endonukleázok, más bakteriális nukleinsav módosító enzimeknek a felhasználásával az 1970-es évek elején dolgoztak ki és az évtized végére már elfogadott, általánosan használt eljárássá, eljárásokká vált. A molekuláris robbanás a baktériumok világának (és persze az összes többi élőlénynek) hihetetlen nagy léptékű és finom szerkezeti megismerését eredményezte, majd erre alapozva a működés, szabályozás pontos, egyre mélyülő, bár máig hiányos feltárását.

Az „omika" tudományok (genomika, transzkriptomika, proteomika, epigenomika, regulomika, bakteriomika, mikrobiomika, fenomika stb.) látványos térnyerését 1995-ben az első teljes bakteriális genom publikálása vezette be. Megjegyezzük, hogy az „omika" tudományok kialakulását és fejlődését a molekuláris biológiai eljárások, valamint a legkifinomultabb mérnöki tudományok (pl. automatizálás, robotika, mikroelektronika) mellett az informatika eszköztárának integrálása (bioinformatika) tette lehetővé. A munkát a TIGR névre elkeresztelt The Institute of Genomic Research kutatói jegyzik, Craig Venter

vezetésével. Több genomikával foglalkozó intézetből jött létre a ma már a TIGR alapítóról elnevezett J. Craig Venter Institute óriásintézmény. A baktériumok felépítésének, szerkezetének és működésének megismerése sok kutató szerint ma már azt a szintet is elérte, amelyre alapozva sejteket, sejtalkatrészeket mesterségesen szintetizálhatunk és rendszerekbe integrálhatunk (szintetikus biológia). Más kutatók az eddigi ismereteket komplex modellekben összegzik, hogy ezen keresztül segítsék a hiányzó láncszemek, információ minél gyorsabb feltárását és még mélyebb összefüggéseinek (baktériumok esetében) sejt, közösség szintű megismerését (rendszerbiológia). A különböző eredményekből két a kutatásetika határait feszegető munkát soroltunk fel az **3.1. táblázat**ban. Az első eredményt legtöbben egy kézlegyintéssel elintézik, hiszen csak egy genom szintű transzformációs eseményt oldottak meg: nem néhány gént, egy genomot transzformáltak. A szintetikus genomú sejt megalkotása után a kutatók már új baktériumfajok, cél szerint összeállított kimérák „teremtését” tervezve az „ősbűn” határvidékén dolgoznak.

3.1. táblázat. A bakteriológia tudományának fejlődését meghatározó felfedezések közzététele

Év	Szerző	A tudományos felfedezés
1684	Leeuwenhoek, Antoni van	Az első ember aki „nagyítóján” keresztül baktériumot látott, észlelését leírta, közölte
1846	Semmelweis Ignác Fülöp	Az első tudatosan alkalmazott fertőtlenítő eljárás alkalmazója
1864	Pasteur, Louis	A „generatio spontanea” megcáfolása
1867	Lister, Joseph	A sebészeti antiszepszis megalapítója
1872	Brefeld, Julius Oscar; Schröter, Joseph	Tiszta tenyészet létrehozása és baktériumtelep növesztése burgonyaszeleten
1872	Cohn, Ferdinand J.	A baktériumok legkorábbi osztályozója, a *Bacillus* nemzetségnév megalkotója
1873	Hansen, Gerhard H.A.	A lepra kórokozójának (*Mycobacterium leprae*) kimutatása
1876	Koch, Robert	A lépfene kórokozójának felfedezése (*Bacillus anthracis*)
1877	Koch, Robert	A metilénkékes egyszerű festés kidolgozása, baktériumfotó készítése
1877	Schlösing, J.J. Theophile; Müntz, Achille	A nitrifikáció biológiai folyamat
1878	Burill, Thomas	Növényekben is okoznak betegséget baktériumok
1878	Lister, Joseph	Tejsavas erjesztő baktérium okozza a tej savanyodását
1880	Pasteur, Louis	Oltóanyag kidolgozása attenuálással a (*Pasteurella multocida*) baromfikolera ellen
1881	Koch, Robert	A táplemez technika kidolgozása és tiszta tenyészetek izolálása zselatinnal szilárdított táplemezen
1883	Klebs, Theodore Edward; Löffler, Friedrich	A torokgyík (*Corynebacterium diphteriae*) kórokozójának felfedezése és toxinjának kimutatása
1884	Koch, Robert	A Koch posztulátumok közlése
1885	Ehrlich, Paul	A kemoterápia elvének lefektetése
1887	Winogradsky, Sergei	A kénbaktériumok felfedezése és az autotrófia fogalmának megalkotása

1888	Beijerinck, Martinus	A dúsítási elv felfedezése, a nitrogénkötő *Rhizobium* tiszta tenyészetének előállítása
1906	Söhngen, Nicolaas Louis	A metanogén és metanotróf baktériumok leírása
1915	Twort, Frederick	A később bakteriofágnak nevezett lítikus ágens felfedezése
1915	Weizman, Chaim	Aceton és butilalkohol ipari termelése *Clostridium acetobutylicum* segítségével
1926	Kluyver, Albert Jan és Donker, Hendrick Jean Louis	H transzfer elvén alapuló általános anyagcsere modell megalkotása
1928	Griffith, Frederick	A baktérium transzformáció felfedezése
1931	Niel, Cornelius B. van	Az anaerob fotoszintézis felfedezése
1937	Marton, Ladislaus László	Elektronmikroszkópi felvételt publikál baktériumokról
1942	Waksman, Selman	Az antibiotikum elnevezés megalkotása
1944	Avery, Oswald; McCarty, Maclyn	A baktérium transzformációért DNS felelős
1946	Lederberg, Joshua; Tatum, Edward L.	A konjugáció leírása
1952	Lederberg, Joshua; Zinder, Norton	A transzdukció felfedezése
1973	Cohen, Stanley; Chang, Annie; Helling, Robert; Boyer, Herbert	A molekuláris klónozás megalapozása
1977	Woese, Carl	Az rRNS katalogizálás módszerére alapozott filogenetika kidolgozása, az élővilág három doménes rendszerének megalkotása
1977	Gilbert, Walter és Sanger, Fred	DNS bázissorrend elemzési módszerek kidolgozása
1988	Mullis, Kary	A *Thermus aquaticus* baktériumból kinyert hő stabil DNS polimeráz felhasználása és a PCR kidolgozása
1995	Venter, Craig; Smith, Hamilton; Fraser, Claire	Az első bakteriális teljes genom (*Haemophilus influenzae*) megfejtése
2007	J. Craig Venter Institute	*Mycoplasma mycoides* natív genomjának átültetése *M. capricolum* sejtbe, a sejtek *M. mycoides*szé transzformálódtak
2010	J. Craig Venter Institute	Az első szintetikus módosított *Mycoplasma mycoides* genommal szaporodó baktériumsejt megalkotása

Ajánlott irodalom

ASM, 2015. Significant events in the history of microbiology. Center for the History of Microbiology, ASM Archives.

Benedek, I. 1980. Semmelweis. Gondolat, Budapest, pp. 270.

Halász, J. 1976. Így élt Pasteur. Móra, Budapest, pp. 198.

Janovszkaja, M. 1963. Pasteur. Gondolat, Budapest, pp. 280.

Karasszon, D. 1969. A mikrobiológia magyar mesterei. Orvostörténeti Közl., 48-49, 129-139.

Kruif, P. de, é.n. Akik életünkért harcoltak. Az emberiség tizenkét jótevője. Rózsavölgyi és társa, Budapest, pp. 344.

Lechevalier, H.A., Solotorovsky, M. 1971. A mikrobiológia három évszázada. Gondolat, Budapest, pp. 218.
Leuwenhoeck, A. van, 1677. Phil. Trans. 12, 821-831.
Lovas, B. 1984. Mikroszkóp-mikrokozmosz. Gondolat, Budapest, pp. 293.
Maurois, A. 1962. Fleming és a penicillin regénye. Gondolat, Budapest, pp. 306.
Ralovich, B. 2014. Adatok a mikrobiológiával kapcsolatos ismeretek oktatás- és kutatástörténetéhez II. A szerző kiadása, Balatonberény, pp. 256.
Ratcliff, J. D. 1947. A sárga csoda. A penicillin regénye. Dante, Budapest, pp. 126.

4. A PROKARIÓTÁK HELYE AZ ÉLŐVILÁGBAN ÉS ELŐFORDULÁSUK KÖRNYEZETI HATÁRFELTÉTELEI

4.1. A mikrobák szerveződési szintjei

A mikrobiológia a szabad szemmel nem látható mikrobák tudománya. A mikrobák világa magában foglalja a sejtes szerveződésű és rendszerint néhány mikrométeres sejtátmérővel rendelkező mikroorganizmusokat csakúgy, mint az önálló életre nem képes részecskéket, a vírusokat és a prionokat. A vírusok a baktériumsejteknél kisebb méretű (20-400 nm), kizárólag gazdasejtben vagy gazdaszervezetben szaporodni képes, nukleinsavból (DNS-ből vagy RNS-ből) és az ezt burkoló fehérjékből álló kórokozók. A prionok egészséges szervezetben lévő fehérjékből kialakult, kóros térszerkezetet felvett és szivacsos agyvelőgyulladást (egyéb ún. amiloid betegségeket) előidéző fehérjék.

A mikroorganizmusok nagyon változatos, egysejtű vagy többsejtű élőlények. Közöttük tartjuk számon az összes prokarióta szervezetet, a legtöbb protozoont, bizonyos gombákat, algákat és egyes állatokat (pl. kerekesférgeket). A mikroorganizmusok a bioszférában mindenütt jelen vannak, a talajoktól és hévforrásoktól kezdve az óceánok mélyéig, mélyen a földkéregben, de akár a légkör 60 km-es magasságában is.

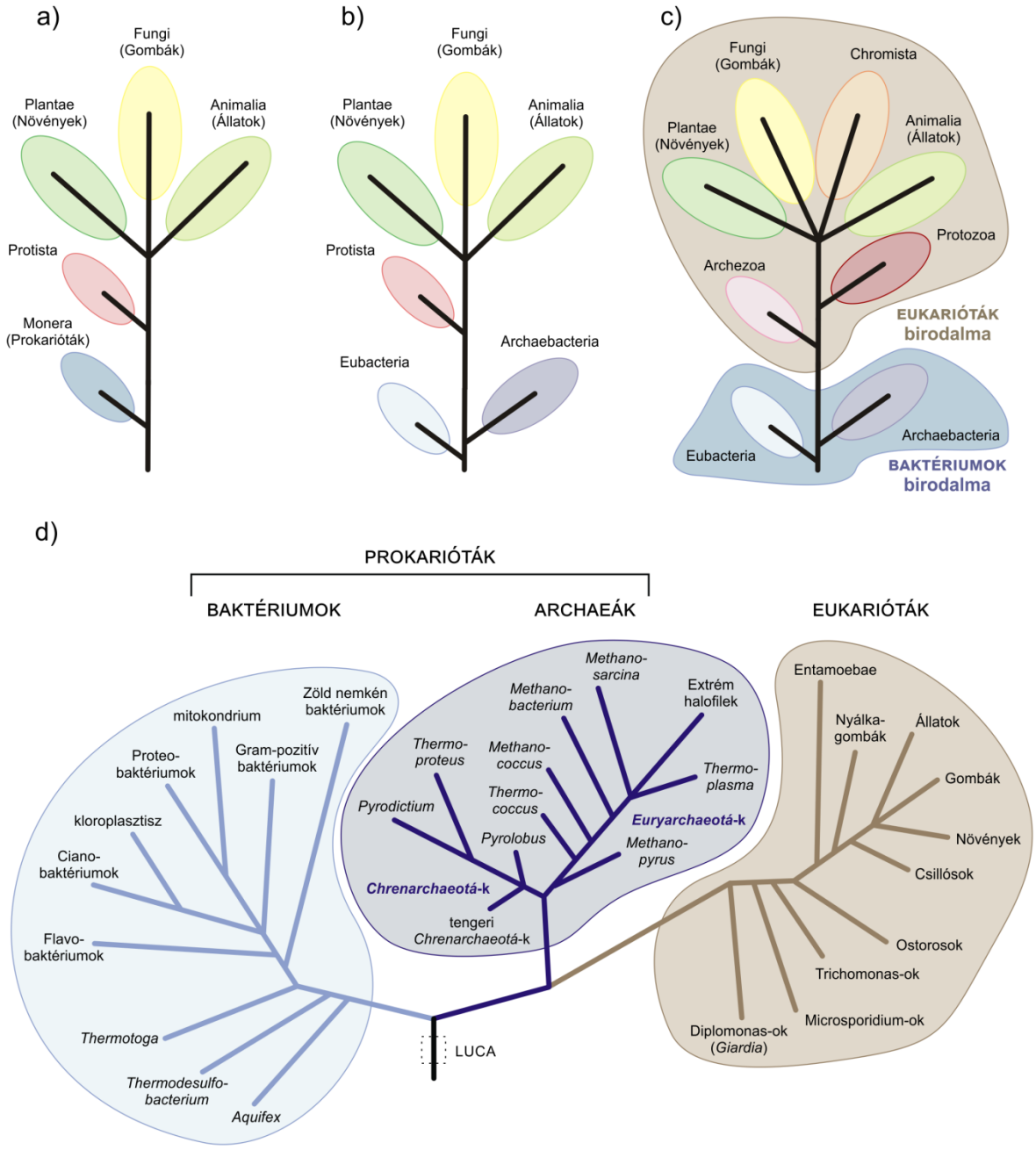
Az élővilág három doménes rendszerében az eukariótákkal szemben a prokarióták az élővilágnak azokat a többségében egysejtes szerveződési formáit jelentik, melyeknek nincsen sem maghártyával elkülönült sejtmagjuk, sem pedig más membránnal határolt autonóm sejtszervecskéjük. A prokarióták világa két birodalmat, a Bacteria és az Archaea doményt foglalja magába. A három doménre jellemző genetikai információ tárolásban és kifejeződésben, sejt felépítésben valamint főbb anyagcsere tulajdonságokban megnyilvánuló hasonlóságokat és különbségeket az **4.1. táblázat** foglalja össze.

4.2. A prokarióták helye az élővilág három doménes rendszerében

Az egész élővilág felosztására vonatkozó első rendszert Robert Harding Whittaker amerikai növényökológus javasolta 1959-ben. Ez az ún. „öt világ elmélet” (**4.1. ábra**) hosszú időn át nagy népszerűségnek örvendett. Whittaker az élőlényeket a sejttípus (prokarióta vagy eukarióta), a sejtszerveződési szint (egysejtű vagy többsejtű) és az anyagcsere módja szerint csoportosította. Ebben a rendszerben a soksejtű, sejtfal nélküli, heterotróf anyagcserével jellemezhető eukarióta szervezetek az „Animalia” (állatok) birodalomba, míg a szintén többsejtű, de sejtfallal rendelkező és elsősorban fotoautotróf anyagcserére képes eukarióták a „Plantae” (növények) birodalomba kerültek. A „Fungi” (gombák) birodalom olyan nedvszívó táplálkozást folytató és túlnyomórészt többmagvú eukarióta szervezeteket foglalt magába, amelyeknél a sejtmagvak egy sejtfallal körülvett és gyakran harántfalakkal elválasztott micéliumban találhatók. A „Protista” birodalom az egysejtes szerveződésű (de akár sejtcsoportosulásokat képező), anyagcsere szempontjából meglehetősen változatos eukarióta szervezeteket fogta össze. Whittaker ide sorolta a fototróf algákat, valamint a kemotróf protozoonokat és az egyszerű felépítésű gombákat. Ezen rendszer szerint valamennyi egysejtes szerveződésű, prokarióta szervezet a „Monera” birodalom tagja volt. Az élővilág felosztásának ez a fejlődéstörténeti leszármazást nélkülöző, csaknem kizárólag morfológiai tulajdonságok figyelembe vételével kialakított csoportosítása a biológia tudományának fejlődésével párhuzamosan egyre több problémát vetett fel.

Emile Zuckerkandl és Linus Pauling nevéhez fűződik 1965-ben a „molekuláris óra” hipotézis, mely a DNS-ben (és bizonyos fehérjékben) végbemenő random nukleotid (vagy aminosav) szekvencia változások és a különböző fajok közötti filogenetikai kapcsolatok összefüggését vizsgálta. Elméletük azon alapult, hogy az evolúciós információt hordozó

biológiai makromolekulákban bekövetkező változások neutrálisak, vagyis nem érintik, vagy nem befolyásolják lényegesen azok funkcióját, véletlenszerűen fordulnak elő és a változások nagysága az idővel arányosan növekszik. Ennek figyelembe vételével két szervezet között annál nagyobb az evolúciós távolság minél nagyobb az eltérés a bennük előforduló molekula szerkezetében. A molekuláris kronométereket használó filogenetikai elemzések azonban sok esetben bonyolultak és néha ellentmondásosak is, mivel a szekvenciák változásának mértéke az időben nem állandó, ráadásul a különböző molekulák vagy akár ugyanazon molekula különböző részei eltérő ütemben változhatnak. A hosszú időtartamú evolúciós változások nyomon követésére ezért a nagymértékben konzervatív szekvenciákat, pl. prokarióták esetében a 16S rRNS-t kódoló gént használják.



4.1. ábra. Az élővilág egységes törzsfájáról vallott nézetek fejlődése. a) Whittaker öt világ elmélete. b) Woese és Fox hat birodalom elmélete. c) Cavalier-Smith nyolc királyság elmélete. d) Woese és munkatársai háromdoménes rendszere.

4.1. táblázat. Az élővilág három doménjének elkülönítésére alkalmas fenetikai bélyegek.

	Bacteria	**Archaea**	**Eukarya**
Morfológiai tulajdonság			
Sejtátmérő	0,5-2,0 μm	0,5-2,0 μm	>10 μm
Sejtfelépítés			
Membránnal határolt sejtmag	nincs	nincs	van
Komplex sejten belüli membránrendszer	nincs	nincs	van
Sejtfal	peptidoglikán típusú	nincs peptidoglikán	nincs peptidoglikán
Sejtmembrán lipidek	egyenes láncú zsírsavak észter kötéssel	elágazó alifás láncok éter kötéssel	egyenes láncú zsírsavak észter kötéssel
Riboszóma			
mérete	70S	70S	80S
EF2 faktor diftéria toxinnal	nem reagál	reagál	reagál
Endospóra	van	nincs	nincs
Gáz vezikulum	van	van	nincs
Poli-β-hidroxialkanoát zárvány	van	van	nincs
Genetikai tulajdonságok			
DNS-függő RNS-polimeráz			
enzim száma	1	1	3
enzim szerkezete	egyszerű alegység mintázat (6 alegység)	komplex alegység mintázat (8-12 alegység)	komplex alegység mintázat (12-14 alegység)
Polimeráz II típusú promoter	nincs	van	van
Policisztronos mRNS	van	van	nincs
Intron a mRNS-ben	nincs (ritkán)	nincs	van
mRNS érés (splicing, capping, polyA tailing)	nincs	nincs	van
Timin a tRNS-ben	van	nincs	nincs
Iniciátor tRNS	formil-metionin	metionin	metionin
Plazmid	van	van	ritka
Operon	van	van	nincs
Antibiotikum érzékenység			

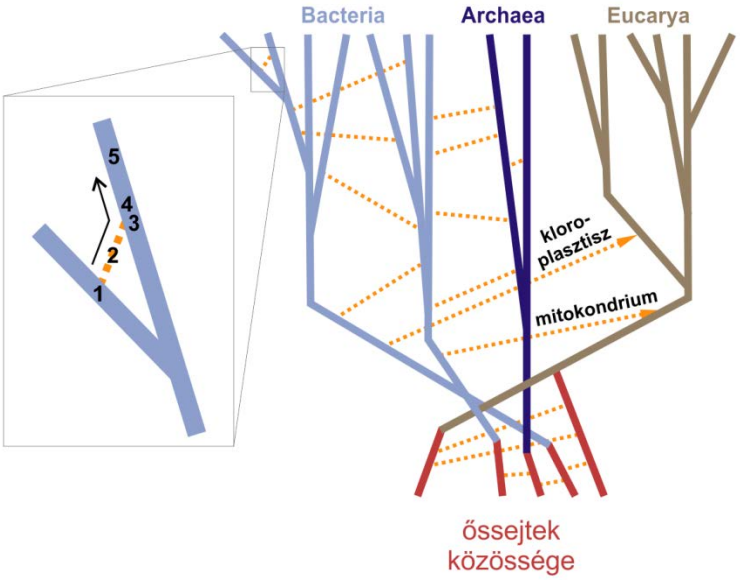
klóramfenikollal szemben	van	nincs	nincs
kanamicinnel szemben	van	nincs	nincs
penicilinnel szemben	van	nincs	nincs
streptomicinnel szemben	van	nincs	nincs
rifampicinnel szemben	van	nincs	nincs
anizomicinnel szemben	nincs	van	van
Anyagcsere tulajdonságok			
Metanogenezis	nincs	van	nincs
Nitrogén fixáció	van	van	nincs
Klorofill alapú fotoszintézis	van	nincs	van
Rodopszin-alapú energiatermelés	van	van	nincs
Kemolitotrófia	van	van	nincs
Nitrifikáció (ammónia-oxidáció)	van	van	nincs
Denitrifikáció	van	van	nincs
Disszimilatórikus kén vagy szulfátredukció	van	van	nincs
Disszimilatórikus Fe^{3+} redukció	van	van	nincs
Élettani tulajdonságok			
Növekedés 70°C felett	van	van	nincs
Növekedés 100°C felett	nincs	van	nincs

Nem meglepő tehát, hogy a molekuláris biológiai kutatások előretörésével az élővilág felosztására vonatkozóan is számos alternatív lehetőség látott napvilágot. Az amerikai Carl Woese és George Fox mikrobiológusok által 1977-ben javasolt „hat birodalom" elmélet (**4.1. ábra**), a korábban egységesen a „Monera" birodalomba sorolt prokariótákat az Eubacteria (ma Bacteria) és az Archaebacteria (ma Archaea) birodalomba különítette el a 16S rRNS-t kódoló gén szekvenciákban meglévő különbségek alapján. Thomas Cavalier-Smith angol evolúció biológus 1998-ban a sejtszerkezet (pl. ultrastrukturális jellegek) és a genetikai szerveződés (pl. rRNS gén szekvenciák és más molekuláris jellemzők) alapján alkotta meg a „nyolc királyság" elméletet **4.1. ábra**), mely szerint az élővilágot két birodalomra és nyolc királyságra osztotta fel. A „Bacteria" birodalomban két királyság, az Eubacteria és az Archaeobacteria különült el egymástól, míg az „Eukarya" birodalomba hat királyság tartozott, az Archezoa, a Protozoa, a Plantae, a Chromista, a Fungi és az Animalia. Az újonnan létrehozott Archezoa királyságba olyan kezdetleges egysejtű eukarióta szervezetek (pl. *Giardia*) kerültek, amelyeknek prokarióta típusú, 70S riboszómájuk van, és nem rendelkeznek Golgi-apparátussal, mitokondriummal, kloroplasztisszal és peroxiszómákkal sem. A másik új királyság, a Chromista, olyan főként fototróf anyagcseréjű eukarióta szervezeteket (pl. kovamoszatokat, barna algákat, cryptomonasokat) foglalt magába, amelyek a fényenergia hasznosítását lehetővé tevő színtestje nem a citoplazmában, hanem a durva felszínű endoplazmatikus retikulum belsejében található.

Napjainkban az élővilág általánosan elfogadott felosztása a földi élet evolúcióját tükröző, ún. „három domén" koncepción alapul. A Woese által 1977-ben javasolt általános érvényű filogenetikai alapú osztályozás elfogadásához azonban hosszú út vezetett. Kezdetben olyan prominens biológusok, mint Salvador Luria és Ernst Mayr is tiltakoztak a prokarióták világának felosztása ellen. A tudományos közvélemény csak az 1980-as évek közepétől hagyta jóvá az Archaea domén létezését. Carl Woese és munkatársai egy évtizedes intenzív labormunkát igénylő oligonukleotid katalogizálást követően az egyre növekvő mennyiségű bizonyíték birtokában 1990-ben „Úton az élőlények természetes rendszere felé: javaslat az Archaea, Bacteria és Eukarya domének létrehozására" címmel jelentették meg az azóta méltán világhírű publikációjukat, melyben az élővilág leszármazási viszonyainak és rokonsági kapcsolatainak bemutatására tettek kísérletet. Az 1990-es években, az amerikai Norman Pace által kidolgozott módszer révén, ami lehetővé tette a környezeti mintákban jelenlévő mikroorganizmusok tenyésztéstől független molekuláris biológiai vizsgálatát, jelentősen megnőtt az élővilág univerzális filogenetikai fáján (**1.4. ábra**) ábrázolható mikrobiális filotípusok száma (DeLong és mtsai, 1990).

Az élővilág egyetemes törzsfájának szerkesztéséhez először a 16S prokarióta, illetve a 18S eukarióta rRNS-t kódoló gént használták. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy hasonló elrendeződést mutató fákat eredményez az olyan mindhárom doménben egyaránt előforduló gének vizsgálata is, amelyek a DNS replikációban, transzkripcióban és transzlációban vesznek részt. Ma már nemcsak egyes gének, hanem csaknem 200 Bacteria, Archaea és Eukarya faj teljes genom szekvenálásából származó több mint 30 gén elemzése is megerősítette a Woese által javasolt három leszármazási ág egyértelmű elkülönülését. Az élővilág egyetemes filogenetikai fáján a gyökér arra a pontra mutat, melyben az élővilág fejlődéstörténete során még valamennyi életformát az utolsó univerzális közös ős (LUCA = Last Universal Common Ancestor) képviselte (**4.1. ábra**; Theobald, 2010). Az élővilág egyetemes filogenetikai fájának vizsgálata alapján látható, hogy nem minden prokarióta szervezet áll egymással közeli filogenetikai rokonsági kapcsolatban, és hogy az Archaea domén közelebbi kapcsolatban áll az Eukarya doménnel, mint a Bacteria doménnel. Az univerzális filogenetikai fa elemzése ugyanakkor kérdéseket is felvet. Hogyan lehetséges, hogy a leszármazási ágak korai szétválása ellenére az egymástól nagymértékben különböző szervezetek sejtjei mégis számos közös génnel rendelkeznek? Az egyik hipotézis szerint az

élet történetének korai szakaszán, még a domének szétválása előtt, igen széleskörű volt az élővilágban a génkicserélődés. Ebben az időben a sejtműködést meghatározó alapvető funkciókért felelős gének korlátozás nélkül keveredtek a közös őstől származó szervezetek között. Amennyiben ez igaz, ez magyarázatul szolgálhat arra is, amire a genom elemzések is rávilágítottak, hogy minden sejt, függetlenül attól, hogy melyik doménből származik, számos alapvető sejtfunkcióban résztvevő közös génnel rendelkezik, többel, mint ami abban az esetben lenne elvárható, ha az összes sejt csak egyetlen primitív közös őstől származott volna. A genom szekvencia elemzések azt mutatják, hogy egykoron a domének között és azokon belül is széleskörű volt a horizontális géntranszfer. Az eukarióták rendelkeznek baktériumokra vagy archaeákra jellemző génekkel, és gyakori volt a géncsere a két prokarióta domén között is. Úgy tűnik, hogy néhány baktérium még eukarióta génekre is szert tett. Bár a génátvitelnek számos mechanizmusa létezik, mégis azt valószínűsítik, hogy a legtöbb gén vírusok közvetítésével került át egyik szervezetből a másikba. Ebből következik, hogy a mikrobiális evolúció folyamatát valószínűleg nem egy fára emlékeztető, lineáris vonalak mentén felrajzolható változások sorozataként kell elképzelnünk. Ez a felismerés késztette a kutatókat arra, hogy az élet fáján megpróbálják megjeleníteni a horizontális génátadás eseményeit. Az ilyen módon megszerkesztett fa sokkal inkább egy, a főágakat számos keresztággal összekötő hálózatra emlékeztet (**4.2. ábra**), melyben az egyes keresztágak a gének átadását tükrözik. Ennek a fának további érdekessége, hogy nem egyetlen törzzsel rendelkezik, vagyis nem egyetlen közös ős található a fa tövében, hanem több egymással kapcsolatban álló törzse van, melyek mindegyike a közös ősi génállományt képező egy-egy őssejtnek feleltethető meg. De mi a helyzet az egyes doménekre jellemző egyedi génekkel, amire szintén számos példát említhetünk? Feltételezések szerint a korlátlan mértékű horizontális géntranszfer az idő múlásával akadályokba ütközött, pl. a különböző élőhelyek szelektív kolonizálása vagy a sejtekben kialakult szerkezeti akadályok miatt, és ez a korábbi szabad génkicserélődés helyett lassan elvezetett az elsődleges evolúciós leszármazási vonalak kialakulásához. Bár a Bacteria és az Archaea doménben még napjainkban is előfordul horizontális géntranszfer, az Eukarya domén tagjai ma már ritkán vesznek részt ilyen típusú génkicserélődésben. Az élővilág evolúciója során a fejlődés a szétváló leszármazási ágakon folytatódott tovább, így a különböző leszármazási ágakon egyedi tulajdonságok is rögzültek.



4.2. ábra. A horizontális génátadás és az endoszimbiózis eseményeit bemutató törzsfaszerkezet.

Az élővilág evolúciójának időbeni történéseit rekonstruálva feltételezhető, hogy a LUCA már 4,3 milliárd évvel ezelőtt létezett a Földön. A korlátlan horizontális géntranszfer következtében kialakult közös ősi genetikai komplex keverékéből körülbelül 3,7-3,8 milliárd évvel ezelőtt először a Bacteria ág vált szét az Archaea – Eukarya közös ágtól. Az Archaea és az Eukarya domén szétválására feltételezhetően 2,8 milliárd évvel ezelőtt kerülhetett sor. Az ősi típusú anaerob kemotróf (fermentatív és légző) anyagcsere mellett a fényenergia hasznosítását lehetővé tevő fototróf anyagcsere mintegy 3,3 milliárd évvel ezelőtt fejlődhetett ki a Bacteria doménben. Az ekkor még anoxikus (elsősorban redukált kénvegyületeket hasznosító) fotoszintézis mellett 2,7-3,0 milliárd évvel ezelőtt a cianobaktériumokban kialakult az oxigéntermelő fotoszintézis, mely a víz elektrondonorként való hasznosításával megnyitotta a biológiai oxigéntermelés lehetőségét. A légköri oxigénszint folyamatos emelkedése révén körülbelül 2,2 milliárd évvel ezelőtt egy újabb anyagcsere típus, az aerob légzés alakult ki. A földi élet történetének több, mint felében kizárólag prokarióta szervezetek éltek, és ez idő alatt igen nagyfokú változatosságra tettek szert. Az eukarióta sejttípus körülbelül 1,5-2,0 milliárd évvel ezelőtti létrejöttének a mai ismereteink alapján előfeltétele volt az oxigéntermelő fotoszintézis és az aerob légzés, valamint a toxikus oxigéngyökökkel szembeni védelmet biztosító enzimek (pl. szuperoxid-diszmutáz) kialakulása a prokarióták körében.

Az eukarióta sejttípusok kialakulását magyarázó elméletek közül az endoszimbiózis hipotézis a legelfogadottabb, mely szerint a ma élő eukarióta sejtek mitokondriuma egy aerob légzést folytató baktériumsejt ősének, míg a kloroplasztisz egy oxigéntermelő fotoszintézist végző cianobaktérium-szerű ősi sejtnek a bekebelezésével jöhetett létre (Martin és mtsai, 2012). A ma élő eukarióta sejtek mitokondriumára és kloroplasztiszára jellemző általános élettani és anyagcsere sajátosságok, valamint genomszerkezetük és DNS szekvenciájuk is alátámasztja az endoszimbiózis hipotézist. Példaként említhetjük, hogy a mitokondriumok és a kloroplasztiszok is prokarióta méretű (70S) riboszómákkal és cirkuláris, kettősfonalú DNS-sel rendelkeznek, továbbá a bennük található 16S rRNS gén bázissorrendje is a Bacteria doménbe tartozó fajokkal mutatja a legnagyobb hasonlóságot. Ezen kívül azok az antibiotikumok, melyek a szabadon élő baktériumsejtekben a riboszóma működését gátolják, hatással vannak ezekre a sejt szervecskékre is. Az endoszimbiózis egyik minden kétséget kizáróan fontos hajtóereje a légköri oxigén megjelenése volt, hiszen mindkét eukariótákra jellemző anyagcsere típus szorosan kapcsolódik az oxigén jelenlétéhez. Az aerob légzés a korábban anaerob katabolikus anyagcsere folyamatokhoz képest nagyobb energia felszabadítást tett lehetővé. Az oxigéntermelő fotoszintézis a gyakorlatilag korlátlan mennyiségben rendelkezésre álló víz és a fényenergia felhasználása révén szintén egy energetikailag kedvező anyagcsere folyamat széleskörű elterjedésére biztosított lehetőséget. Az eukarióta sejtek kialakulását magyarázó endoszimbiózisra kétféle feltevés született (**4.2. ábra**). Az egyik szerint a már sejtmaggal rendelkező és az Archaea doméntől elkülönülő leszármazási ágon fejlődő eukarióta sejt a mitokondrium illetve a kloroplasztisz ősének tekintett baktérium valamint a cianobaktérium sejt bekebelezése révén alakult ki, és ezt követően két irányban, a növényvilág és az állatvilág felé fejlődött tovább. Ez a feltevés a sejtmag kialakulását egy olyan evolúciós kísérlet eredményének tekinti, ami a sejt és a genom méretének növekedésében nyilvánult meg, feltehetően válaszul a Föld geokémiai folyamatait átalakító oxigéntermelő események hatására. Ezzel a hipotézissel az az egyik legnagyobb probléma, hogy általa nem könnyű megmagyarázni azt a tényt, hogy a Bacteria és az Eukarya domén tagjai hasonló membrán lipidekkel rendelkeznek eltérően az Archaea domén képviselőitől. A másik feltevés, az ún. hidrogén hipotézis az eukarióta sejtek kialakulását H_2-termelő Bacteria fajok, mint szimbionták és H_2-fogyasztó Archaea fajok, mint gazdasejtek szimbiózisára vezeti vissza. E szerint a feltevés szerint a sejtmag akkor jött létre, amikor a zsírsav szintézisért felelős gének a szimbiontából a gazdasejtbe kerültek. Ez tette lehetővé, a

gazdasejt számára a zsírsavakat tartalmazó lipidek szintézisét, és ezáltal a belső membránrendszerek (pl. a sejtmaghártya) kialakulását. A gazdasejtben a szimbiózissal egyidejűleg zajló genomméret növekedés azt eredményezte, hogy a DNS a sejten belül membránnal körülzáródott, létrejött a sejtmag, ami hatékonyabb replikáció és génexpresszió kifejlődését tette lehetővé. Később ez a mitokondriummal és sejtmaggal rendelkező eukarióta sejt egy újabb endoszimbiózis révén tett szert a kloroplasztiszra, ami az első fototróf anyagcserére képes eukarióta sejt kialakulását eredményezte. A hidrogén hipotézis tehát kielégítő magyarázattal tud szolgálni arra, hogy az eukarióták miért rendelkeznek a baktériumokhoz hasonló membrán szerkezettel, ugyanakkor bizonyos transzkripciós és transzlációs sajátosságaikat tekintve miért az archaeákkal mutatnak nagyobb hasonlóságot.

Az élővilág egyetemes törzsfájának két doménje, a Bacteria és az Archaea kizárólag prokarióta szervezeteket foglal magába, míg a harmadik, Eukarya doménbe tartozik valamennyi maghártyával körülvett valódi sejtmaggal rendelkező szervezet (**4.1. ábra**).

4.3. A prokarióta létforma környezeti peremfeltételei

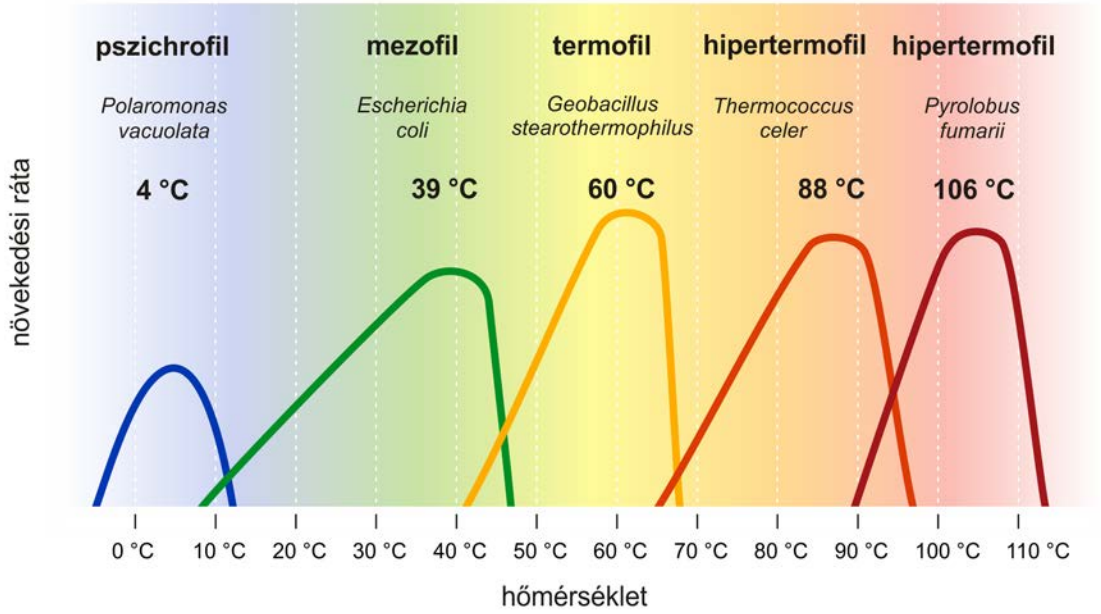
A prokarióták a Föld valamennyi lehetséges élőhelyét benépesítik, ahol növekedésük és szaporodásuk számára biztosítottak a környezeti feltételek. Ezeknek a természetes élőhelyeknek (pl. talajoknak, tavaknak, tengereknek, óceánoknak) egy részében eukarióta szervezetek is előfordulnak, sőt számtalan esetben a prokarióták ezeken az élőhelyeken az eukariótákkal együtt, gyakorta azokkal szimbionta kölcsönhatásban élnek. A prokarióták azonban olyan különleges élőhelyeken is képesek megtelepedni, ahol az eukarióták már nem képesek alkalmazkodni az élőhely által kínált környezeti peremfeltételekhez. Ezeket a szélsőséges környezeti feltételekhez adaptálódott mikroorganizmusokat extremofileknek nevezzük. Az extremofil szervezetek valójában nemcsak elviselik (tolerálják) az eukarióták számára mostoha körülményeket, hanem különféle mechanizmusaik révén azokhoz alkalmazkodva kifejezetten igénylik azokat. Közöttük tartjuk számon a földi életformák rekordereit (**4.2. táblázat**), például a legkisebb vagy legnagyobb hőmérsékleti értékeket, a szélsőségesen alacsony vagy magas pH értékeket, a nagy nyomást, a magas ozmotikus koncentrációt vagy akár sugárzást kedvelő, többségében prokarióta mikroorganizmusokat. Extremofil mikroorganizmusokban bővelkedő élőhelyek közé tartoznak pl. a vulkanikus hőforrások, a sarkvidéki tengereket vagy tavakat borító jégpáncélok, a gleccserek, olyan talajok vagy vizes élőhelyek, ahol a pH ≤ 2 vagy ≥ 10, illetve a mély tengerek, ahol a nyomás meghaladhatja az 1000 atmoszférát.

A mikroorganizmusok növekedésére és szaporodására környezetük fizikai és kémiai tulajdonságai jelentős hatással vannak. Laboratóriumi tenyésztésük során rendszerint négy környezeti tényező (a hőmérséklet, a tápközeg kémhatása, a vízaktivitás és az oxigén szint) ellenőrzésére kerül sor. A környezeti tényezőknek a mikroorganizmusok növekedésére gyakorolt hatása szempontjából néhány kardinális értéket mindig célszerű szem előtt tartani. Ilyenek a minimum, az optimum és a maximum értékek (**4.3. ábra**). A mikroorganizmusok szaporodási tartományát a rájuk jellemző minimum és maximum értékek jelölik ki, ezen belül az optimum az az érték, ahol szaporodási sebességük a legnagyobb.

A hőmérséklet elsősorban a sejtekben végbemenő enzimatikus reakciók sebességének meghatározásával befolyásolja a mikroorganizmusok növekedését. Egy bizonyos tartományon belül a hőmérséklet emelkedésével párhuzamosan nő a kémiai reakciók sebessége és ezáltal fokozódik a prokarióták anyagcseréjének aktivitása, a sejtek növekedése. Egy küszöbérték elérése után azonban növekedés gátlás következik be, elsősorban a sejtben lévő fehérjék denaturációja miatt, ami az enzimek biokémiai aktivitásának megszűnéséhez vezethet. A különböző mikroorganizmusok között nagy különbség van a szaporodásukat jellemző hőmérsékleti tartomány és optimum tekintetében. Összességében a mikroorganizmusok

4.2. táblázat. A mikroorganizmusok előfordulásának környezeti határértékei és a földi életformák rekorderei.

Környezeti tényező	Túlélési érték	Mikroorganizmus
Hőmérséklet	121°C	*Geogemma barossii* (Archaea)
	110-113°C	*Pyrolobus fumarii* (Archaea)
		Methanopyrus kandleri (Archaea)
		Pyrodictium abyssi (Archaea)
	-12°C	*Psychromonas ingrahamii* (Bacteria)
Kémhatás (pH)	≥10	*Bacillus* spp. (Bacteria)
	≤3	*Acidithiobacillus ferrooxidans* (Bacteria)
	0,5	*Picrophilus oshimae* (Archaea)
	0,0	*Ferroplasma acidarmanus* (Archaea)
Vízaktivitás	0,6-0,65	*Torulopsis* spp. (Eukarya)
		Candida spp. (Eukarya)
Nyomás (atm)	500-1035	*Colwellia hadaliensis* (Bacteria)
Sugárzás (Gy)	15000	*Deinococcus radiodurans* (Bacteria)



4.3. ábra. A környezeti tényezők minimum, optimum és maximum értékeinek kijelölése a mikroorganizmusok szaporodásának hőmérséklet tartományai esetében.

kevesebb, mint -10°C-tól nagyobb, mint 110°C-ig tartó hőmérsékleti tartományban képesek növekedni, és a szaporodásukhoz szükséges hőmérsékleti optimum értékek 4°C és több, mint 100°C között változik. Ezt a széles tartományt azonban egyetlen mikroorganizmus sem képes áthidalni, a legtöbb esetben a mikroorganizmusok hőmérsékleti tartománya 25-40°C közötti. Bár a legalacsonyabb optimum értékektől a legmagasabb értékekig folytonos az átmenet a mikroorganizmusok hőmérsékleti igénye között, mégis az egyes mikroorganizmusokra jellemző hőmérsékleti optimum érték alapján közöttük jellegzetes csoportokat különíthetünk el. A mezofil szervezetek mérsékelten nagy (25-45°C közötti) hőmérsékleti optimummal jellemezhetők (**4.3. ábra**), és a természetben széles körben elterjedtek. Megtalálhatók a mérsékelt és trópusi szélességi övek talajaiban és vizeiben csakúgy, mint a melegvérű állatok szervezetében. Példaként említhetjük az *Escherichia coli*-t, melynek hőmérsékleti optimuma

39°C körül van, de rendszerint a 8°C és 48°C közötti hőmérsékleti tartományban képes szaporodni, így egyike a legszélesebb hőmérsékleti tartománnyal jellemezhető baktériumoknak.

A mérsékelt hőmérsékleti értékektől eltérő szélsőségesen alacsony hőmérsékleti értékekhez alkalmazkodott extremofil mikroorganizmusokat pszichrofileknek nevezzük, melyek ≤15°C hőmérsékleti optimummal rendelkeznek (**4.3. ábra**). A pszichrofil mikroorganizmusok a Föld felszínének nagy részét kitevő hideg élőhelyeken, például a nyílt óceánok mélyén, vagy a sarkvidéki állandóan fagyott felszínű tavakban, vagy a sarkvidéki csak a nyári időszakban néhány hétre felolvadó kőzetekben, továbbá hómezőkön vagy gleccserek jegében élnek, ahol a hőmérséklet rendszerint tartósan a fagypont közelében van. A pszichrofil mikroorganizmusok között baktériumokat és algákat egyaránt találhatunk. Utóbbiak a bennük lévő színanyagok miatt tömeges elszaporodásuk esetén élőhelyük jellegzetes elszíneződését is okozhatják. A *Chlamydomonas nivalis* nevű zöld alga, a magashegységeket borító hórétegben szaporodik, melynek eróziójakor, olvadásakor vagy párolgásakor az algasejtek a hó felszínére kerülnek. Ilyenkor nagy mennyiségű élénkvörös színű spórát képeznek, melynek révén akár hatalmas területeken is pirosasra színezhetik a hó felszínét. Az eddig ismert legkisebb növekedésre alkalmas hőmérsékleten (-12°C-on) egy a *Psychromonas* nemzetségbe tartozó baktérium képes szaporodni. Ez azonban feltehetően nem a legalacsonyabb érték, hiszen bakteriális enzimaktivitást még -20°C-on is mértek. A hidegkedvelő, pszichrofil szervezetektől meg kell különböztetnünk azokat a hidegtűrő, pszichrotróf mikroorganizmusokat, amelyek szintén képesek 0°C közelében növekedni, de 20-40°C közötti hőmérsékleti optimummal jellemezhetők. Ilyenek például a mérsékelt égövi talajokban vagy vizekben télen hideg körülmények, 0°C alatti hőmérsékleten élő szervezetek, vagy az olyan mesterséges környezetekben élő mikroorganizmusok, melyek a hűtőszekrényben (4-8°C-on) tárolt élelmiszerek romlásáért felelősek. A pszichrofil mikroorganizmusok a hideg körülményekhez molekuláris szinten is alkalmazkodtak, például enzim fehérjéik felépítésében általában nagyobb mennyiségben vesznek részt poláris aminosavak és kisebb a hidrofób aminosavak aránya, mint mezofil társaikéban, és a nagyobb rugalmasságot biztosító α-helix szerkezet gyakoribb, mint a β-redőzött struktúra. A pszichrofilek citoplazma membránjában a mezofilekhez képest általában nagyobb a telítetlen (akár többszörösen telítetlen) és a rövidebb szénláncú zsírsavak aránya, ami segíti fenntartani a membránok félfolyékony állapotát és a transzportfolyamatok stabilitását kis hőmérsékleti értékeken. Egyes pszichrofilek ún. hidegsokk fehérjéket is képesek szintetizálni, amelyek segítségével a sejt többi fehérjéjének és nukleinsavának aktív térszerkezetét és működését biztosítják az optimálistól eltérő hőmérsékleti értékeken. Emellett krioprotektív védőanyagok (pl. glicerin vagy bizonyos cukrok) termelésével képesek megakadályozni a sejten belül jégkristályok kialakulását és ezáltal a sejt pusztulását. Bár jelen ismereteink szerint a -20°C alatti hőmérséklet gátolja a mikroorganizmusok növekedését, azonban az ennél sokkal kisebb hőmérsékleti értékek sem vezetnek feltétlenül a baktériumsejtek pusztulásához. A mikrobasejtek jóval a szaporodásukhoz szükséges optimális hőmérsékleti értékek alatt is képesek anyagcserét folytatni. A mikroorganizmusoknak ez a túlélő képessége a hosszú ideig tartó megőrzésük céljából alkalmazott fagyasztásos törzsfenntartási eljárások alapja. Krioprotektív anyagokat tartalmazó közegben (10%-os DMSO vagy glicerin oldatban) -80°C-on (ultra hideg fagyasztószekrényekben) vagy -196°C-on (folyékony nitrogénben) tárolva a prokarióták évtizedekig vagy akár hosszabb ideig is megőrizhetik életképességüket.

A mikrobiális életformák virágzásának a Nap sugárzó energiája által fűtött (akár 50-70°C hőmérsékletű) talajoktól egészen a geotermális szárazföldi hőforrások forrásponthoz közeli hőmérsékletű vizéig számos élőhelyen szemtanúi lehetünk. A magas hőmérséklethez alkalmazkodott mikroorganizmusok tetten érhetők ezen kívül még az óceánok mélyén is, ahol jelenlétük a kőzetlemezek határához köthető aktív vulkáni működéshez kapcsolódik. Ezek a

vulkanikus tevékenységhez köthető élőhelyek gyakran nem csak a hőmérsékleti értékek tekintetében különlegesek, hanem az egyéb környezeti tényezők (pl. a pH vagy a nyomás viszonyok) miatt is. A természetes élőhelyek mellett az emberi tevékenység hatására is keletkeznek tartósan magas hőmérsékletű, mikroorganizmusok által benépesíthető élőhelyek (pl. a komposzthalmok belsejében, a háztartási vagy az ipari meleg vizű tartályokban és hőcserélőkben). A magas hőmérsékleti értékekhez alkalmazkodott mikroorganizmusokat több csoportba sorolhatjuk (**4.3. ábra**), a mérsékelten termofilek 45-60°C közötti, a termofilek, 60-80°C közötti, míg a hipertermofilek >80°C hőmérsékleti optimummal rendelkeznek. A 65°C-os hőmérsékletet meghaladó élőhelyeken már csak prokarióták fordulnak elő, míg a 100°C feletti növekedésre képes hipertermofilek között kizárólag ősbaktériumok találhatók. Annak ellenére, hogy a magas hőmérséklethez alkalmazkodott mikroorganizmusok változatos (foto- és kemotróf, lito- és organotróf) anyagcserével jellemezhetők, a legnagyobb hőmérsékleti értéken növekedni képes szervezetek között már csak kemotrófok fordulnak elő. A jelenleg ismert legmagasabb (122°C) hőmérsékleti értéken növekedni képes szervezet egy a *Methanopyrus* nemzetségbe sorolt, metanogén anyagcserét folytató ősbaktérium. A rendszerint mélytengeri hévforrásokból származó hipertermofil szervezetek tenyésztése nem könnyű feladat, hiszen a megfelelő hőmérséklet- és nyomásértékek biztosításához speciális tenyészedények és körülmények szükségesek.

A magas hőmérsékleti értékekhez alkalmazkodott termofil prokarióták hőstabil enzimekkel rendelkeznek, amelyek meglepő módon mindössze néhány aminosavban különböznek a mezofil megfelelőjüktől. Ez a néhány aminosavban bekövetkezett változás azonban elegendő ahhoz, hogy ezáltal olyan hőstabil konformáció alakuljon ki, amelyben a mezofil enzimekhez képest a bázikus és a savas aminosavak között nagyobb számban kialakuló ionos kölcsönhatások, továbbá a hidrofób aminosavaknak a fehérjék belsejében való elhelyezkedése biztosítja azok aktív térszerkezetének fennmaradását. Bizonyos hipertermofilek a citoplazmatikus fehérjék stabilitását elősegítő oldott anyagokat (pl. di-inozitol-foszfátot, diglicerin-foszfátot vagy mannozil-glicerátot) is termelnek és felhalmozzák azokat sejtjeikben. A hipertermofil prokarióták a DNS hőstabilitásának megőrzése érdekében többféle mechanizmussal rendelkeznek. Egyesek olyan vegyületeket (pl. kálium-(ciklikus)-2,3-difoszfoglicerátot, kálium-di-mio-inozitol-foszfátot, illetve putreszcin és spermidin poliaminokat) szintetizálnak, amelyek segítségével megakadályozzák a DNS-ben nagy hőfokon végbemenő bázis leválást (depurinációt vagy depirimidinizációt), míg mások az általuk előállított reverz DNS-giráz enzim segítségével az általánosan előforduló negatív DNS szuperhélixszel szemben a spontán széttekeredésnek ellenállóbb, pozitív DNS szuperhélix szerkezetet alakítanak ki. Egyes hipertermofil ősbaktériumokban az eukariótákra jellemző hiszton fehérjékhez hasonló bázikus DNS-kötő fehérjék jelenlétét igazolták. A hipertermofil prokariótákban előforduló rRNS molekulák a mezofilekben előfordulókhoz képest gazdagabbak a hármas hidrogénhíd kötés kialakítására képes G és C bázisokban. A termofil és hipertermofil prokariótáknak azonban nem csak a fehérjéknek és a nukleinsavaknak, hanem a sejtmembránnak a megfelelő működését is biztosítaniuk kell magas hőmérsékleten. A termofil baktériumok sejtmembránját alkotó lipidekben a mezofil és főként a pszichrofil szervezetekéhez képest nagy mennyiségben fordulnak elő telített zsírsavak, amelyek az erősebb hidrofób környezet kialakításával biztosítják a membrán stabilitást magas hőmérsékleten. A hipertermofil ősbaktériumok membránszerkezete nagymértékben eltér a baktériumokétól, benne a hidrofób zsírsavak helyett a membrán teljes keresztmetszetén kovalens kötésekkel összetartott, izoprén egységekből felépülő, 40 C atomos szénhidrogén molekulák találhatók, amelyek éter kötésekkel kapcsolódnak a membrán külső és belső oldalán lévő glicerin-foszfát molekulákhoz. Ezáltal a baktériumokétól eltérő, hőstabil, ún. „egyrétegű” membrán szerkezet alakul ki. A magas hőmérsékleten stabil és aktív biológiai molekulák megismerése nemcsak a termofil/hipertermofil élővilág alapvető biológiai

folyamatainak megértése szempontjából érdekes, hanem azok lehetséges ipari-biotechnológiai felhasználásának reményében is. Példaként talán a molekuláris biológiai eljárásokban forradalmi változást hozó *Thermus aquaticus* baktériumból származó *Taq* DNS-polimeráz enzimet említhetjük, amelynek felhasználásával először nyílt lehetőség bármely mintából származó DNS molekulának az ún. polimeráz láncreakció (PCR) révén történő megsokszorozására (Brock és Freeze, 191969).

A mikroorganizmusok növekedését környezetük ionösszetétele is nagymértékben meghatározza. A köznapi gyakorlatban a mikroorganizmusok laboratóriumi tenyésztése során az alkalmazott tápközeg pH értékének beállításával biztosítjuk, hogy az oldat kémhatása (savasságának vagy lúgosságának mértéke) megfelelő legyen a mikroorganizmus szaporodásához. Bár összességében a mikroorganizmusok a növekedésükhöz igényelt pH tekintetében igen széles tartományt fednek le, az egyes fajok szaporodására jellemző pH tartomány rendszerint 2-3 pH egységre korlátozódik. A legtöbb ismert baktériumnak a pH optimuma a semlegeshez közeli értékeken (pH 5,5 és 8,0 között) található. Ezeket a szervezeteket (pl. *E. coli*) neutrofileknek nevezzük. Az ettől eltérő, optimálisan savas (pH 0-5,5) környezetekben szaporodó mikroorganizmusokat acidofileknek, míg a lúgos kémhatású (pH 8,0-11,5) kémhatású környezetekhez alkalmazkodottakat alkalofileknek hívjuk. A mikroorganizmusok anyagcsere aktivitásuk révén maguk is képesek megváltoztatni mikrokörnyezetük kémhatását. A mikrobiális kemoorganotróf fermentatív anyagcsere például a szénhidrátok lebontásakor képződő szerves savak képződése révén, míg az aerob kemolitotróf kénoxidáló baktériumok anyagcseréje a keletkező kénsav miatt a környezet savasodását, pH értékének csökkenését eredményezi. Az olyan mikrobiális anyagcsere folyamatok (mint pl. az ammonifikáció), amelyek ammónia képződésével járnak az előzőkkel ellentétben a környezet lúgosodásához, pH értékének növekedéséhez vezethetnek. Laboratóriumi körülmények között a tápközeg pH értékében mikrobiális anyagcsere hatására bekövetkező változásokat általában puffer oldatoknak a tápközeghez való hozzáadásával akadályozzák meg, így biztosítják a mikrobák szaporodásához a közel állandó optimális pH értéket.

A szélsőségesen kis pH értékekhez alkalmazkodott extremofil baktériumok között tartjuk számon a savanyú bányavizekben előforduló, vas- és kénoxidációra is képes kemolitotróf *Acidithiobacillus* nemzetség tagjait. Növekedési optimumuk pH 2-3 értéken van. A ma ismert legkisebb pH értéken növekedni képes extrém acidofil ősbaktérium, a *Picrophilus oshimae* egyben termofil is, növekedési optimuma pH 0,7 és 60°C.

A szélsőségesen nagy pH értékekhez alkalmazkodott prokarióták rendkívüli anyagcsere változatosságra képesek, és egyes természetes alkalikus élőhelyeken (pl. szikes és nátron tavakban) akár tömeges elszaporodásuk is megfigyelhető. A legismertebb és ipari felhasználási lehetőségük miatt a leginkább tanulmányozott alkalofil baktériumok a *Bacillus* nemzetségbe tartoznak (pl. *B. firmus* pH optimum 9-10). A legnagyobb pH értékekhez ($\geq$10) alkalmazkodott ősbaktériumok (pl. *Natronobacterium, Natronococcus*) többsége növekedéséhez egyidejűleg nagy só koncentrációt is igényel, így ezek haloalkalofileknek tekinthetők.

A mikroorganizmusoknak életműködésükhöz a sejten belüli pH-t neutrálishoz közeli értéken kell fenntartaniuk. Ennek biztosítására különféle mechanizmusokat (pl. a membránon keresztül specifikus aktív ion transzport folyamatokat) működtetnek. A citoplazmatikus pH érték még a legszélsőségesebb környezetben élő prokarióták esetében sem csökken 4,6 alá vagy emelkedik 9,5 fölé. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a DNS savas környezetben, míg az RNS lúgos környezetben labilis molekula, vagyis ha egy baktériumsejt ezeket a fontos makromolekulákat nem tudja stabil állapotban fenntartani, akkor elpusztul.

A mikroorganizmusoknak a kémhatás mellett környezetük ozmotikus koncentrációjának változásához is alkalmazkodniuk kell. A prokarióta sejteket határoló

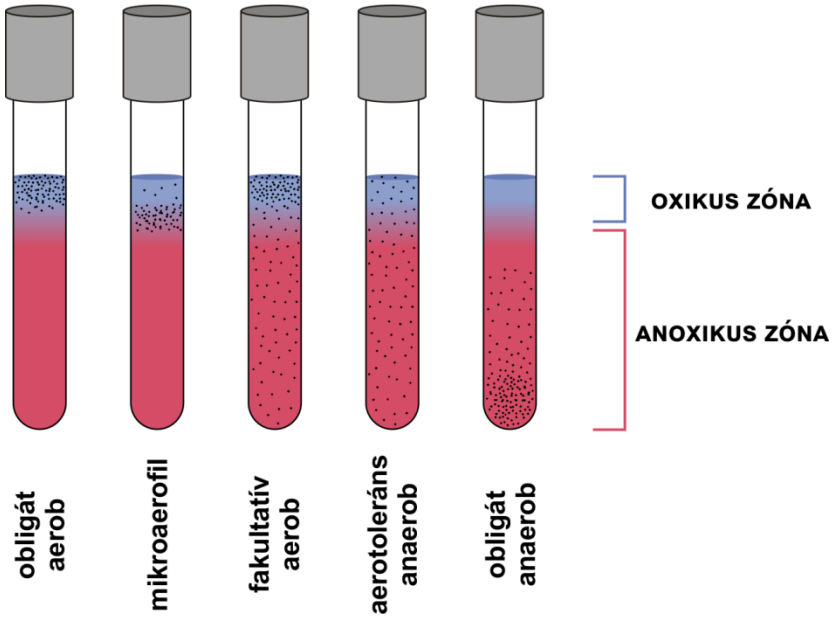
citoplazma membrán féligáteresztő, a vízmolekulák számára szabadon átjárható, így ha a sejtek hipotóniás közegbe kerülnek, sejtjeikbe víz áramlik be, míg hipertóniás közegben, sejtjeik vizet veszítenek. Szélsőséges esetben mindkettő a pusztulásukhoz vezethet. A hipotóniás környezetből érkező vízfelvétellel járó nagyfokú térfogat növekedést és a prokarióta sejt szétrobbanását a citoplazma membránon kívül elhelyezkedő összefüggő, merev és ellenálló sejtfal rendszerint megakadályozza. Hipertóniás környezetben a vízvesztés következtében a sejtmembrán összezsugorodik, a dehidratáció a plazmolízis révén károsíthatja a sejt működését. Ennek elkerülésére a legtöbb prokarióta sejtben a citoplazma állomány a külső környezethez képest enyhén hipertóniás. A prokarióták többsége a nagyobb belső ozmotikus nyomás kialakításához citoplazmájában biológiailag kompatibilis oldott anyagokat (pl. glicint, betaint, ektoint) termel és halmoz fel. Ezek a vegyületek még viszonylagosan nagy intracelluláris koncentráció esetén sem zavarják a sejtek normális anyagcserefolyamait és növekedését.

A mikroorganizmusok között a tekintetben is eltérés mutatkozik, hogy milyen mértékben képesek alkalmazkodni környezetük ozmotikus koncentrációjához. Ezt legjobban a mikroorganizmusok növekedéséhez szükséges vízaktivitás értékekkel jellemezhetjük. A vízaktivitás (a_w) 0 és 1 közötti számszerű értékét az oldat gőznyomásának és a tiszta víz gőznyomásának hányadosaként határozhatjuk meg. A szabad, kémiailag nem kötött víz vízaktivitás értéke 1. A vízben oldott anyagok csökkentik a vízaktivitást, ezáltal a mikroorganizmusok számára hozzáférhető víz mennyiségét. A baktériumok általában nagy vízaktivitás értékek (0,9-1,0) mellett képesek szaporodni, a legkisebb (0,75) vízaktivitáshoz alkalmazkodott prokarióták a halofil ősbaktériumok között találhatók.

A halofil szervezetek optimális növekedésükhöz ≥0,2 mólos NaCl koncentrációt igényelnek. Egyes extrém halofil ősbaktériumok a 2,0 mólostól akár a telítetthez közeli 6,2 mólos NaCl koncentrációjú környezetben is képesek növekedni. Az extrém halofil mikroorganizmusok általában kétféle stratégiát alkalmaznak arra, hogy ellenálljanak a nagy sókoncentrációjú környezetben uralkodó nagy ozmotikus nyomásnak. A Halobacteriales rendbe tartozó ősbaktériumok és a Bacteria domén Haloanaerobiales rendjének képviselői az ozmotikus egyensúly fenntartása érdekében sejtjeikben K^+ és Cl^- ionokat halmoznak fel. Sejtjeikben a K^+ ion koncentrációja a 4-7 mólos értéket is elérheti. Ezekben a prokariótákban a sejten belüli nagy K^+ ion koncentráció az enzimek, a riboszómák és a transzportfehérjék stabilitásához és aktivitásához is szükséges. Az ozmotikus adaptációnak ez a módja energetikailag kedvezőbb, mint a sók aktív transzporttal történő kipumpálásán és a már említett kompatibilis oldott anyagok sejten belüli felhalmozásán alapuló másik mechanizmus.

Az eukariótáktól eltérően, melyek néhány kivételtől eltekintve csak légköri oxigén jelenlétében képesek növekedni és szaporodni, a prokarióták az élővilág evolúciója során kiválóan alkalmazkodtak az oxigén mentes környezetekhez. A természetben ma is megtalálható anoxikus élőhelyeken, például tavi vagy tengeri üledékekben, lápokban, mocsarakban, vízzel elárasztott talajokban, mélyen a föld felszíne alatt, vagy az állatok tápcsatornájában szinte kizárólag prokarióták élnek, de előfordulnak az ember által létrehozott mesterséges anoxikus élőhelyeken, pl. anaerob szennyvíztisztítókban is. A mikroorganizmusok oxigénhez igényüket vagy oxigénnel szembeni tűrőképességüket tekintve különböznek egymástól (**4.4. ábra**). Ezt a tulajdonságukat elsősorban energetikai anyagcsere sajátságuk határozza meg. Aeroboknak azokat a mikroorganizmusokat nevezzük, amelyek képesek az oxigént légzési elektron transzportláncukban végső elektronfelvevőként hasznosítani. Az anaerob szervezetek erre nem képesek. Az aerobok között az oxigénhez való viszony alapján további csoportokat különíthetünk el. A szigorúan (más néven obligát) aerob mikroorganizmusok (pl. *Micrococcus luteus*) olyan aerob légző anyagcserét folytató szervezetek, amelyek optimális szaporodást 21%-os légköri oxigénszint mellett mutatnak. A fakultatív aerob (más néven fakultatív anaerob) szervezetek (pl. *E. coli*) megfelelő tápanyag

ellátottság esetén nem csak oxigén jelenlétében, hanem annak hiányában is képesek szaporodni. Anoxikus körülmények között az aerob légzéshez képest energetikailag kevésbé hatékony anaerob légzésre vagy fermentációra térnek át. A mikroaerofil szervezetek (pl. *Spirillum volutans*, *Campylobacter jejuni*) is aerobok, ezek azonban a légkörinél kisebb, 2-10%-os oxigénszint mellett képesek szaporodni. Ennek az az oka, hogy légzési kapacitásuk korlátozott, vagy oxigén jelenlétére érzékeny enzimekkel rendelkeznek. A szigorúan (más néven obligát) anaerob mikroorganizmusok (pl. *Clostridium pasteurianum*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp., *Desulfovibrio* sp., *Methanococcus* sp.) anaerob légző vagy fermentatív anyagcserét folytatnak, a légköri oxigén gátolja a növekedésüket vagy oxigén jelenlétében el is pusztulnak. Az aerotoleráns anaerob szervezetek (pl. *Enterococcus faecalis, Streptococcus pyogenes*) olyan anaerob fermentatív anyagcserét folytató mikroorganizmusok, amelyek növekedésükhöz nem igénylik az oxigén jelenlétét, de képesek tolerálni azt, így szaporodási sebességük független környezetük oxigénellátottságától.



4.4. ábra. A mikroorganizmusok csoportjai az oxigénhez viszonyulásuk, ill. oxigénnel szembeni tűrőképességük alapján.

A mikroorganizmusoknak az oxigén jelenlétéhez való eltérő viszonyulása más tényezőkkel (pl. fehérjék inaktiválódásával, reaktív oxigéngyökök képződésével) is összefüggésbe hozható. Az enzimek oxigén hatására végbemenő inaktiválódása gyakran a fehérjékben lévő szulfhidril csoportok oxidációjára vezethető vissza. Erre példaként a biológiai nitrogén fixációban kulcsszerepet játszó, és az oxigénre rendkívül érzékeny nitrogenáz enzimet említhetjük. Reaktív oxigéngyökök (pl. hidroxil, OH* vagy szuperoxid, O_2^-*) és toxikus oxigén vegyületek (pl. hidrogén-peroxid, H_2O_2) a prokarióták normál anyagcseréje során is keletkeznek. A légzési elektrontranszportlánc elektronszállítói (pl. flavoproteinek, kinonok) maguk is elősegíthetik ezeknek a vegyületeknek a képződését az oxigén vízzé történő redukciója során. Érdekes megjegyezni, hogy az immunrendszer sejtjei közül a neutrofil granulociták és a makrofágok is használják ezeket a toxikus oxigén termékeket a szervezetbe behatoló patogénekkel szembeni védelem során. Az oxigén jelenlétében növekedni képes mikroorganizmusok azonban rendelkeznek olyan enzimekkel, amelyek segítségével képesek hatástalanítani ezeket a mérgező oxigénvegyületeket. Az obligát aerob és a fakultatív anaerob szervezetek általában szuperoxid-diszmutáz (SOD) és

kataláz enzimeket termelnek, melyek az alábbi reakciókban vesznek részt. A peroxidáz enzim a katalázhoz hasonlóan szintén a hidrogén-peroxid lebontásában vesz részt.

$$2\,O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{szuperoxid-dizmutáz} O_2 + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{kataláz} 2\,H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + NADH + H^+ \xrightarrow{peroxidáz} 2\,H_2O + NAD^+$$

Az aerotoleráns anaeroboknak ugyan gyakorta nincs kataláz enzimük, de csaknem mindig megtalálható bennük a szuperoxid-diszmutáz, ami védelmet biztosít számukra az oxigén jelenlétében. A szigorúan anaerob szervezetekből azonban mindkét enzim hiányzik, vagy csak nagyon kis mennyiségben van jelen, ezért azok nem tudják tolerálni az oxigén jelenlétét.

A kontinensek terresztrikus és vizes élőhelyein, valamint a tengerek és óceánok felszíni vizében élő mikroorganizmusok mindössze a légköri nyomásnak vannak kitéve, és nem kell alkalmazkodniuk olyan nagy nyomásértékekhez, mint amilyenekkel a mély tengerek vizében vagy a mélyen a föld felszíne alatt élő mikroorganizmusoknak kell megbirkózniuk. A tengerekben a nyomás értéke a mélység 10 m-es növekedésével párhuzamosan átlagosan 1 atm-val nő, így már a közepes (3000-4000 m-es) tengermélységben élő mikroorganizmusoknak is több száz atmoszféra hidrosztatikus nyomást kell tolerálniuk. A legtöbb ilyen környezetben élő prokarióta barotoleráns, vagyis képesek a megnövekedett nyomásértékek mellett is növekedni, de nem ez az optimális számukra. Valódi barofil prokariótákat mély tengerekben élő gerinctelenek (pl. rákok és tengeri uborkák) bélrendszeréből és a Fülöp-szigetek közelében lévő Mariana-árokból (körülbelül 10 500 m mélységből) származó vízmintából mutattak ki. Ezek a nagy nyomásértékeket kedvelő szervezetek (pl. a *Shewanella*, a *Colwellia*, a *Moritella* nemzetségek tagjai) növekedési optimumukat is ilyen körülmények között (600-1000 atm nyomáson) mutatják. A *Colwellia maris* és a *Moritella marina* fajok képviselői olyannyira nyomás igényesek, hogy 400 atm-nál kisebb nyomás értéken nem képesek növekedni, ráadásul szaporodásuk hőmérsékleti optimuma 2°C körül van, így amellett, hogy extrém barofilek, még pszichrofilek is. Ezzel ellentétben a mélytengeri vulkáni működésekhez köthető magas hőmérsékletű élőhelyekről (pl. fekete füstölgők kürtőjéről) izolált szigorúan anaerob anyagcserét folytató ősbaktériumok (pl. *Pyrococcus* spp., *Methanocaldococcus jannaschii*) nem csak barofilek, hanem egyúttal hipertermofilek is.

4.4. Fajok közötti kapcsolatok

A Földünket benépesítő mikroorganizmusok rendszerint mikroszkóposan is jól megfigyelhető módon szoros kapcsolatban élnek más élőlényekkel, azok sejtjéhez vagy különböző felületéhez tapadva fordulnak elő. Ezt a mikroorganizmusok és más mikroorganizmusok vagy makroszkopikus szervezetek közötti együttélést deBary (1879) után szimbiózisnak nevezzük, függetlenül attól, hogy ez a kapcsolat az együtt élő szervezetek számára előnyös vagy hátrányos. Egy bizonyos fajba tartozó mikroorganizmus egy adott élőhelyen számos más faj képviselőivel élhet együtt, így közöttük sokféle kölcsönhatás kialakulására nyílik lehetőség. Ezek a kölcsönhatások azonban nem csak a résztvevő szervezetektől függően lehetetnek változatosak, hanem a környezet tulajdonságai is hatással vannak rájuk.

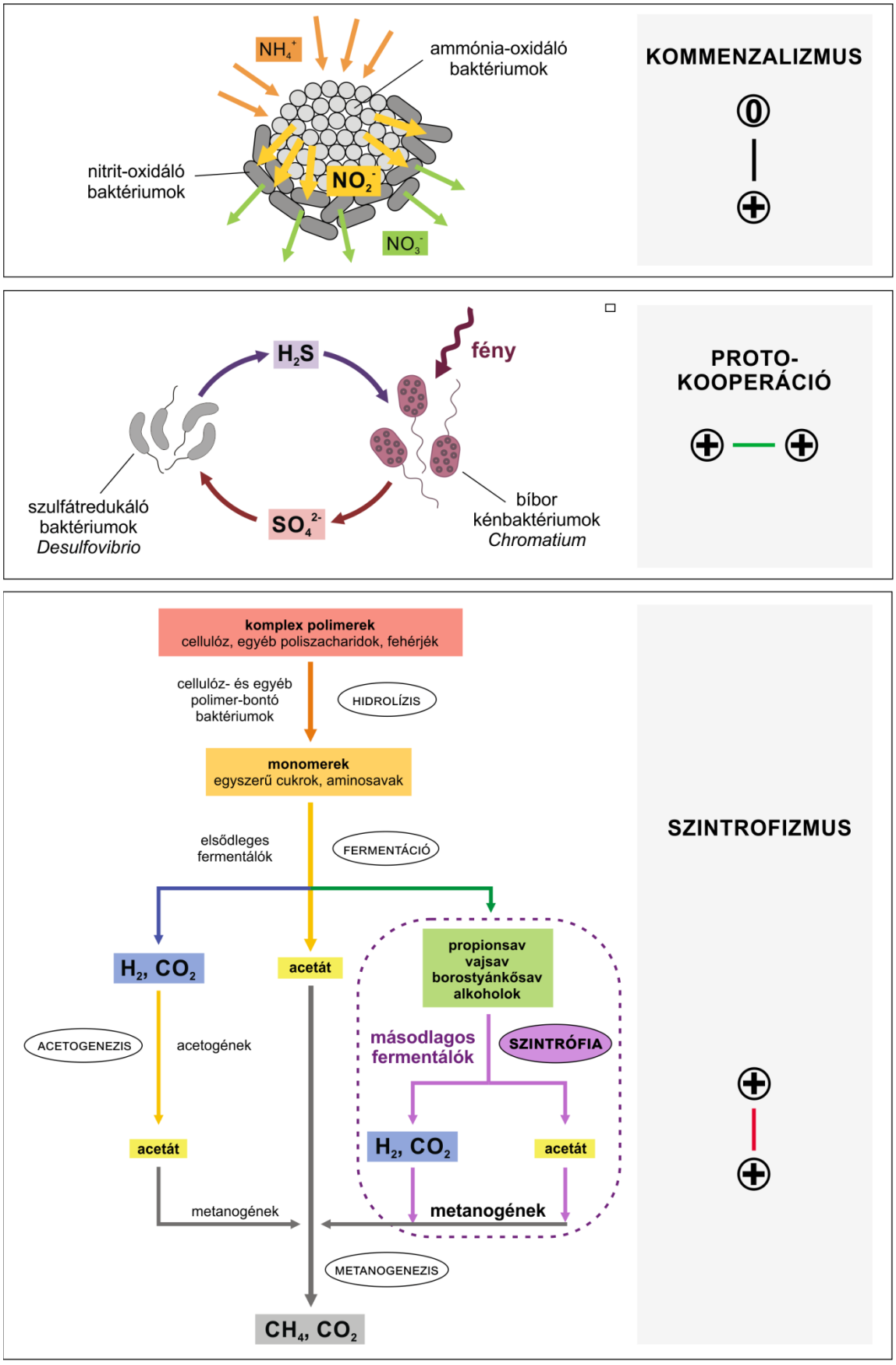
A mikroorganizmusok között létrejövő interakciókat többféle szempont (pl. az időtartam, a relatív méret, a specificitás, a kölcsönös egymásrautaltság mértéke, vagy a fitnesz) szerint is csoportosíthatjuk. A mikroorganizmusok és más szervezetek közti kölcsönhatásokat legjobban a populációk növekedési rátájában és a populáció sűrűségében megfigyelhető változások jelzik számunkra. Ha ezekben az értékekben (pozitív vagy negatív) változás következik be, akkor feltételezhetjük, hogy az együtt élő populációk között kölcsönhatás áll fenn, míg a változás hiánya a kölcsönhatás hiányára utal. Két faj populációja között a kialakuló interakciók lehetnek kooperatívak (pozitív jellegűek), melyekben az együtt élő felek túlélési hatékonysága nő és a rendelkezésre álló erőforrások kihasználása fokozódik, vagy destruktívak (negatív jelegűek), melynek a közösség hosszú időtartamú stabilitásának megőrzésében van fontos szerepe a populációk sűrűségének negatív visszacsatolásos szabályozása révén.

Neutralizmusról (0/0 kapcsolatról) akkor beszélünk, ha az adott élőhelyen előforduló két populáció között nem alakul ki kapcsolat vagy nem ismerjük a köztük lévő kapcsolat mibenlétét. Ez többféle okra is visszavezethető, pl. a rendkívül kicsi populációsűrűségre, az alacsony anyagcsere aktivitásra vagy akár a nagymértékben eltérő anyagcsere típusokra.

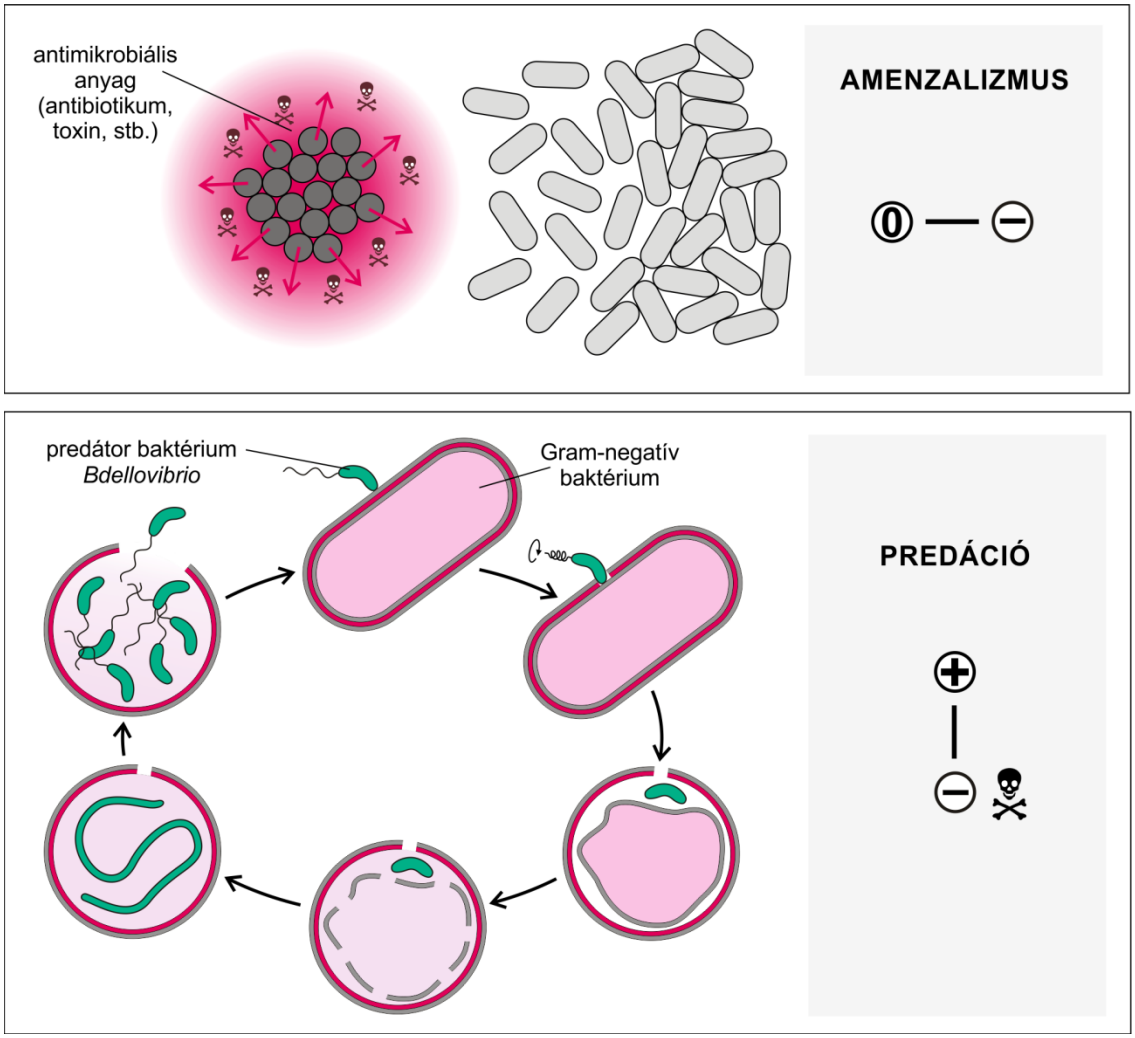
A kooperatív, vagyis a legalább az egyik fél számára pozitív kapcsolatnak a mikroorganizmusok körében többféle változata is létezik. Ilyen a kommenzalizmus, a kometabolizmus, az epifitizmus, a protokooperáció, a szintrofizmus és a mutualizmus.

A kommenzalizmus (0/+ kapcsolat), más néven asztalközösség olyan egyirányú kooperatív viszony, amelyik az egyik populáció számára előnyös, a másik populáció számára közömbös. Mikroorganizmusok között kialakuló kommenzalista kapcsolat esetén gyakori, hogy az egyik populáció anyagcsere végtermékei a másik populáció számára szubsztrátumként hasznosulnak, vagyis az egyik populáció aktivitása révén egy másik populáció előnyhöz jut. Példaként említhetjük a nitrifikáció két lépésben zajló folyamatát, melyben az ammónia oxidáló baktériumok (pl. *Nitrosomonas*) anyagcseréje során keletkezett nitritet a nitrit oxidálók (pl. *Nitrobacter*) azonnal tovább alakítják nitráttá (**4.5. ábra**). Anoxikus környezetekben (pl. tavak üledékében, szennyvíztisztítókban) a szerves anyagok anaerob fermentatív lebontásával keletkező fermentációs gázokat (a hidrogént és a szén-dioxidot) a metanogén ősbaktériumok metánképzésre tudják hasznosítani. Kommenzalista kapcsolatról beszélhetünk akkor is, amikor az egyik mikrobapopuláció anyagcseréje során úgy változtatja meg a környezetét, hogy az alkalmassá válik egy másik mikrobapopuláció egyedei számára a kolonizálásra. A fakultatív anaerob anyagcserét folytató *E. coli* például az emberi vastagbélben az oxigén felhasználásával anoxikus környezetet hoz létre, ami így már alkalmassá válik az obligát anaerob szervezetek (pl. *Bacteroides*) megtelepedésére is.

Az elsősorban baktériumok között kialakuló kometabolizmus (0/+ kapcsolat), vagy régebben kooxidációnak is nevezett folyamat két populáció szintén egyirányú kooperatív kontaktusán alapul. Kometabolizmus során az egyik populáció egyedei enzimaktivitásuk révén képesek egy, a környezetükben lévő gyakran xenobiotikus vegyületet anélkül átalakítani, hogy azt szén- és/vagy energiaforrásként hasznosítanák. Ez a másodlagos szubsztrátum transzformációnak is nevezett átalakítása akkor megy végbe, ha a kometabolizmus során átalakított vegyület kémiai szerkezete és molekulamérete nagyon hasonlít az egyik populáció számára szubsztrátumként hasznosítható vegyületéhez, így az elsődleges szubsztrátum átalakításában résztvevő enzimek segítségével végbemehet a kometabolikus szubsztrátum átalakítása is. A másik populáció tagjai számára azért előnyös az előbbi folyamat, mert míg a kiindulási vegyületet nem, addig az ily módon átalakított vegyületet már képesek energetikai anyagcseréjük során hasznosítani. A kometabolizmuson alapuló folyamatokat környezetszennyező anyagok (pl. halogénezett szénhidrogének) in situ bioremediációja során gyakran felhasználják a lebontás elősegítésére.



4.5. ábra. Példák baktériumfajok közötti kapcsolatokra: kommenzalizmus, protokooperáció és szintrofizmus.



4.6. ábra. Példák baktériumfajok közötti kapcsolatokra: amenzalizmus és predáció.

Az epifitizmus (0/+ kapcsolat) növények, főként természetes vizekben élő algák és a felületükhöz kapcsolódó baktériumok kooperatív együttlétére utal. Ebben a kapcsolatban a növény (pl. kovaalga) amellett, hogy felületet biztosít a baktériumok megtelepedése számára, oxigén termelésével és oldott szerves anyag kibocsátásával is elősegíti a baktériumok szaporodását.

A protokooperáció (+/+ kapcsolat) mindkét populáció egyedei számára kölcsönösen előnyös, ugyanakkor laza kötelék. Gyakran kialakulhat ilyen együttműködés eltérő, de egymást kiegészítő anyagcsere típusú baktériumok populációi között, amelyben a résztvevő szervezetek nem obligát módon függnek egymástól. Protokooperáció révén kapcsolódhatnak egymáshoz pl. mérsékeltövi tavakban a fénnyel ellátott, de anoxikus üledékfelszínen élő szulfát-redukáló baktériumok és bíbor kénbaktériumok a kénformák átalakítása során (**4.5. ábra**).

A szintrofizmus (+/+ kapcsolat) szerves anyagok anaerob lebontásában résztvevő mikroba populációk között kialakuló pozitív kölcsönhatás. Alapja a populációk közötti hidrogén transzfer, vagyis az a képesség, hogy az egyik populáció egyedei által termelt hidrogént a másik populáció egyedei anyagcseréjükben közvetlenül felhasználják. Ilyen módon lehetőség nyílik arra, hogy az első populáció egyedei egy standard körülmények között energetikailag kedvezőtlen (endergonikus) kémiai reakciót energia nyerésre

fordítsanak az általuk előállított anyagcsere végterméknek, a hidrogénnek a második populáció egyedeinek felhasználása révén. A rendszerint nagy molekulájú szerves anyagok (pl. cellulóz, keményítő) anoxikus környezetekben végbemenő mikrobiális lebontása (**4.5. ábra**) az elsődleges fermentációval veszi kezdetét, melynek során a polimerek hidrolízisével keletkező monomereket az elsődleges fermentálók hasznosítják, miközben fermentációs végtermékként különféle szerves savakat (pl. ecetsavat, propionsavat, vajsavat, borostyánkősavat), szén-dioxidot és hidrogént állítanak elő. Az utóbbi két gáz halmazállapotú fermentációs végtermék az acetogén, vagy a metanogén szervezetek anyagcseréjében hasznosulhat tovább. A metanogének emellett még az ecetsavat is képesek szubsztrátumként felhasználni. A kettőnél nagyobb szénatom számú szerves savak (esetenként alkoholok) mikrobiális átalakításában a másodlagos fermentálók vesznek részt. Ezek a szintróf baktériumok a zsírsavak fermentációjával a metanogének számára hasznosítható ecetsavat, szén-dioxidot és hidrogént képeznek. A folyamat mindkét fél számára előnyös, hiszen a szintróf baktériumok anyagcseréje éppen a metanogének hidrogén felhasználása révén válik termodinamikailag kedvezővé (exergonikussá), míg a metanogének az anyagcseréjükhöz szükséges elektron donort, a hidrogént a szintrófoktól kapják.

A mutualizmus (+/+ kapcsolat) az együtt élő populációk számára kölcsönösen előnyös, egymástól függő specifikus kapcsolat, melynek révén a két populáció közösen olyan niche-t tud elfoglalni, amire külön-külön egyik sem lenne képes. A legtöbb ilyen kapcsolat prokarióták és eukarióták között ismert (pl. pillangós virágú növények gyökérgümő szimbiózisa, vagy a protozoonok és termeszek közötti szimbiózis, illetve a kérődző növényevő állatok bendő szimbiózisa). A mutualista kölcsönhatás egyik kevéssé ismert példája levéltetű (*Acyrthosiphon pisum*) és a *Buchnera aphidicola* fajba (Enterobacteriaceae Gammaproteobactea) tartozó baktériumok között a genom vizsgálatok alapján mintegy 150 millió évvel ezelőtt kialakult endoszimbiózis. A levéltetvekben az evolúció során egy specifikus sejt az ún. bakteriocita fejlődött ki, melyben plazmamembránnal határolt vezikulumokban, az ún. szimbioszómákban találhatók a *B. aphidicola* sejtek. Becslések szerint egy kifejlődött levéltetűben akár $5{,}6 \times 10^6$ *B. aphidicola* baktériumsejt is előfordulhat. A *B. aphidicola* baktériumsejtek a gazda nőstényeiről a szimbioszómák közvetítésével kerülnek a petékbe (vertikális géntranszfer), így a baktériumokat a rendkívül ritkán előforduló horizontális géntranszfer miatt igen nagyfokú genom stabilitás jellemzi. A *B. aphidicola* sejtek a közel rokon fajokhoz képest meglehetősen kis genom mérettel (<1 Mb) rendelkeznek. A genom méret redukciója feltehetően a levéltetűvel kialakult obligát mutualista kapcsolat (kölcsönös táplálkozási függőség) és a két faj együttes evolúciójának az eredménye. A *B. aphidicola* sejtek cirkuláris kettős fonalú DNS-éből például hiányoznak a rokon fajokban (pl. *E. coli*) megtalálható és az alapvető anyagcserében (pl. amino-cukrok, zsírsavak, foszfolipidek, komplex szénhidrátok szintézisében) szerepet játszó enzimek génjei, továbbá a patogenitási folyamatokban fontos szerepet játszó, a sejtfal külső részét képező lipopoliszacharid réteg szintéziséért felelős gének. A levéltetvek a szénhidrátokban gazdag növényi nedvek szívogatásával meglehetősen korlátozott tápanyag ellátottságra tesznek szert, hiszen azok nitrogén és egyéb esszenciális vegyületekben szegények. A mutualista együttműködés során a *B. aphidicola* sejtek látják el a gazdaszervezetet ezekkel e vegyületekkel (pl. létfontosságú aminosavakkal), cserébe a levéltetű élőhelyet és szén- és energiaforrásként hasznosítható szerves anyagokat biztosít a baktériumsejtek számára.

A destruktív, vagyis a legalább az egyik fél számára negatív kapcsolatnak is többféle változata is létezik a mikroorganizmusok körében. Ilyen az amenzalizmus, a kompetíció, a parazitizmus és a predáció.

Az amenzalizmus (0/- kapcsolat) olyan egyirányú destruktív reláció, amelyik az egyik populáció számára hátrányos, a másik populáció számára közömbös. Ennek a kapcsolatnak klasszikus esete az antibiózis, amelynek során az egyik populáció egyedei olyan vegyületeket

választanak ki a környezetükbe, amelyekkel vagy gátolják a másik populáció egyedeinek növekedését, vagy azok pusztulását idézik elő (**4.6. ábra**). Kémiai szerkezetüket tekintve az antibiózist kiváltó vegyületek lehetnek a mikroorganizmusok anyagcseréjének végtermékeként keletkező szervetlen (pl. H_2O_2, NH_3, NO_3^-, H_2S, CO_2), vagy szerves anyagok (pl. zsírsavak, etanol), de akár a mikroorganizmusok által szintetizált mérgező vegyületek (pl. exotoxinok) is. Külön csoportot képeznek a baktériumok illetve a gombák anyagcseréje során termelődött antibiotikumok, amelyek kis koncentrációban is hatásos és specifikus anyagcsere gátló szerek, s ezáltal más mikrobákat elpusztítanak, vagy szaporodásukban korlátoznak.

Az amenzalista kapcsolat egyik különleges formája érhető tetten a dél-amerikai levélvágó hangyák komplex mutualista-amenzalista kapcsolatrendszerének a fenntartásában is. A legismertebb levélvágó hangyák, az *Acromyrmex* nemzetség tagjai, akár 8 millió egyedet számláló kolóniát hozhatnak létre, melyben különböző kasztokba tartozó egyedek találhatók. A kizárólag nőstényekből álló dolgozók közül a nagyobb méretűek a növényi levelek levágásában és a hangyafészekbe történő szállításban vesznek részt, míg a kisebb méretű dolgozók a fészekben kialakított gombakertek gondozását végzik, ahol az általuk felaprított levelek biztosítják a mutualista *Leucocoprinus* nemzetségbe tartozó gombafajok tápanyag ellátását. A fészekben élő levélvágó hangyáknak, beleértve a királynőt is ezek a gombák az egyedüli táplálékforrásaik. Annak érdekében, hogy megakadályozzák a gombakerteknek egy az *Escovopsis* nemzetségbe tartozó parazita gomba általi fertőződését, a hangyák a külső vázuk alatt bonyolult kriptarendszert fejlesztettek ki bizonyos aktinobaktériumokkal való együttélés számára. Ezek a hangyák vázán élő *Pseudonocardia* nemzetségbe tartozó baktériumok olyan antimikrobiális hatású vegyületet szintetizálnak, amelyik gátló hatást fejt ki a parazita *Escovopsis* gombákra, és ezáltal megóvja a gombakerteket a fertőzéstől. Ez az egyedülálló mutualista és amenzalista kapcsolatrendszer körülbelül 50-65 millió évvel ezelőtt fejlődött ki Dél-Amerikában, és a több millió éves koevolúció alatt a kölcsönhatásban résztvevő szervezetek mindegyikét tekintve nagyon specifikussá vált.

Napjainkban egyre inkább az érdeklődés középpontjába kerülnek a feltehetően az amenzalista kapcsolat kialakításában is szerepet játszó bakteriocinek, azok a baktériumok által termelt fehérjék, melyeket bizonyos fajokba tartozó törzsek szintetizálnak ugyanazon vagy közel rokon fajokba tartozó törzsek szaporodásának gátlására. Bakteriocinek közé tartozó vegyület pl. az *E. coli* által termelt kolicin, vagy a *Staphylococcus aureus* által termelt sztafilokokcin. Az élelmiszeriparban is használt nizin egy különleges, policiklikus 34 aminosavból felépülő, széles spektrumú bakteriocin. A tejsavas fermentációt folytató *Lactococcus lactis* termeli, és a tejsavas baktériumok mellett hatásos a *Listeria monocytogenes*, a *Staphylococcus aureus*, a *Bacillus cereus* és a *Clostridium botulinum* ellen is.

A kompetíció (-/- kapcsolat), más néven versengés olyan két populáció között megnyilvánuló kölcsönhatás, amelyik mindkét populáció számára hátrányos. Két populáció között rendszerint akkor merül fel versengés, ha ugyanazt az erőforrást próbálják megszerezni, legyen az egy fizikai hely vagy egy korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló tápanyag. Ha a versengő populációk egyike rátermettebb, akkor akár teljesen kiszoríthatja a másik populációt az adott élőhelyről. Ezt a jelenséget 1934-ben Gauze csillós egysejtűekkel végzett kísérleteit követően a kompetitív kizárás elveként fogalmazta meg. A Gauze-elv kimondja, hogy két azonos niche-t betöltő faj nem élhet tartósan együtt ugyanazon az élőhelyen. A mikroorganizmusok között folyó versengés kimenetelét számos tényező befolyásolhatja, pl. a tápanyagfelvétel hatékonysága, az anyagcsere típusa és végső soron a sejtek növekedésének mértéke is. A különböző baktériumok eltérő stratégiát fejlesztettek ki a kompetíciós hatékonyság növelése érdekében. A specialisták rendszerint kevés fajta tápanyagot képesek hasznosítani, de azt nagy hatékonysággal (ún. K-stratégisták). A generalisták ezzel szemben széles szubsztrátum specificitással jellemezhetők, így többféle

tápanyagforrás hasznosítására képesek, sőt akár többféle anyagcsere típus között is képesek váltani (mixotrófok). Az opportunisták általában kerülik a versengést, de versenytársak hiányában gyorsan elszaporodnak (ún. r-stratégisták).

A parazitizmus (+/- kapcsolat) az egyik legismertebb kölcsönhatás a mikroorganizmusok és a makroszkopikus szervezetek (növények, állatok és ember) között. Ez az interakció a parazita (rendszerint mikroorganizmus) számára előnyös, míg a gazdaszervezet számára hátrányos. Parazitizmus kialakulhat tápanyagszerzés és/vagy a gazdaszervezeten vagy a gazdaszervezetben való fennmaradás céljából. Egy sikeres parazita ily módon hosszú távú együttélést is folytathat a gazdaszervezetével. Ennek az a magyarázata, hogyha a gazda a parazita inváziót követően szinte azonnal elpusztul, akkor megakadályozza a parazita szaporodását, és ezáltal egy új gazdaszervezet megfelelő számú parazitával való fertőzését. Ha azonban a parazita a gazdaszervezettel egy törékeny egyensúlyi helyzetet tart fenn, akkor ez a kölcsönhatás hosszú ideig fennmaradhat. Ez az egyensúlyi állapot belső vagy külső környezeti tényezők hatására azonban eltolódhat a gazdaszervezet vagy a parazita irányába is. Előbbi esetben pl. a gazdaszervezet immunrendszerének hatékony védelme esetén a paraziták nem tudnak tartósan megtelepedni, míg az utóbbi esetben pl. a gazda hosszú ideig tartó széles spektrumú antibiotikum terápiájának következtében az opportunista patogének nagymértékű elszaporodása a gazdaszervezet megbetegedéséhez, súlyos esetben akár a halálához is vezethet.

A parazitizmus egyik jellegzetes példájaként említhetjük a középkori Európában „fekete halálként” ismert, rettegett járványos fertőzéseket előidéző *Yersinia pestis*-t. A pestis [latin pestis, magyarul dögvész] kórokozója a *Y. pestis* evolúciós története rövid, hiszen mindössze néhány tízezer éve alakult ki a hasüregi nyirokcsomó gyulladást okozó *Y. pseudotubeculosis* baktériumból. Ezen átalakulás során azonban a *Y. pestis* gazdaszervezetbe való behatolásának és elszaporodásának képessége (invazivitása) jelentősen fokozódott. Ez részben azzal magyarázható, hogy ez a fakultatív anaerob kórokozó olyan Gram-negatív sejtfalszerkezettel rendelkezik, amelyből hiányzik az LPS külső rétege, az ún. „O-oldallánc”, így a gazdaszervezet immunrendszere a kórokozó O antigénjének hiányában nem képes annak felismerésére. A *Y. pestis* baktériummal történő fertőződés elsődleges forrásai a köztesgazdaként (vektorként) szolgáló fertőzött bolhák. A különböző bolha fajokba kétféle fertőzési ciklus során kerülhet a kórokozó, egyszersmind ezek a ciklusok biztosítják a kórokozó fennmaradását is. Az ún. természetes (más néven erdei) ciklus során a kórokozó erdei rágcsálókban (pl. ürgékben, mókusokban, egerekben és prérikutyákban) rejtőzik, innen a fertőzött rágcsálók elfogyasztásával ragadozókba (pl. prérifarkasokba) kerülhet, majd a bolha csípésével újabb egészséges rágcsálók és ragadozók fertőződhetnek meg. Az ún. városi ciklusban a kórokozó az ember közvetlen környezetében élő rágcsálókban (pl. egerekben, patkányokban) él túl, ahonnan a fertőzött rágcsálók fogyasztásával akár ragadozókba (pl. kutyákba, macskákba) is átjuthat, de a fertőzést ezek között az állatok között is leggyakrabban a bolhák közvetítik. A *Y. pestis* baktériumsejtek az emberbe is leggyakrabban a fertőzött patkánybolha (*Xenopsylla cheopsis*) csípésével kerülnek, de a fertőzés kialakulhat pestisben elpusztult állatok tetemével való közvetlen érintkezés során is. A járványok kialakulását a rossz közegészségügyi viszonyok és a zsúfoltság nagymértékben elősegíthetik. Az ember megfertőződését követően a kórokozó a vérárammal jut el a csípés helyéhez legközelebbi nyirokcsomókba, illetve a májba és a lépbe. A kórokozók a nyirokcsomók kötőszövetes állományában, vagy az immunrendszer falósejtjeiben (makrofágokban) szaporodnak, és ezáltal alakulnak ki a bubópestis jellegzetes tünetei, a hónalji és az ágyéki nyirokcsomók akár tojás nagyságú megnagyobbodásai, az ún. bubók. Ezek vérzéses szövetelhalása (nekrózisa) fekete színű vérömlenyként jelenik meg. Erre utal a fekete halál elnevezés. A fertőzés előrehaladtával a kórokozók a vérárammal vagy a nyirokrendszer közvetítésével a tüdőbe is eljutnak, ahol véres köpetképződéssel járó tüdőgyulladást idéznek elő. Az ily módon fertőzött

egyénből a kórokozók már közvetítő nélkül, cseppfertőzéssel is átjuthatnak egy másik egészséges egyénbe, ahol a csaknem 100%-os halálozással járó tüdőpestist okozzák.

A predáció (+/- kapcsolat), más néven zsákmányszerzés, olyan az egyik populáció számára előnyös a másik számára hátrányos kölcsönhatás, amelyben a predátor (ragadozó) elfogyasztja a rendszerint nála kisebb méretű prédát (zsákmányt). Ezt a kölcsönhatást a prokarióták körében csupán néhány évtizeddel ezelőtt felfedezték fel bakteriofágok után kutatva. A baktériumok között a legismertebb predátorok a *Bdellovibrio* nemzetségbe tartozó szervezetek (**4.6. ábra**). A *B. bacteriovorus* (Deltaproteobacteria) kisméretű (0,2-0,5 µm x 0,5-2,5µm), vibrio alakú, Gram-negatív sejtfalszerkezettel rendelkező sejtjei hosszú csillójuk segítségével gyors mozgásra képesek. Igazi ubikvista baktériumok, amelyek számos természetes és ember által létrehozott élőhelyen előfordulnak, beleértve a talajokat, folyókat, tengereket, a növényi rizoszféra környezetet, madarak és emlősök tápcsatornáját és féceszét, szennyvizeket és a legkülönbözőbb biofilmeket. Kétfázisú életciklus jellemző rájuk. A szabadon élő fázisban a *Bdellovibrio* sejtekre jellemző aerob kemoorganotróf anyagcsere során termelt energia legnagyobb része az aktív mozgásra és az ugyancsak Gram-negatív sejtfalszerkezettel rendelkező és zsákmányként szolgáló baktériumoknak kemotaxis segítségével történő felkutatására fordítódik. A támadási fázisban a *Bdellovibrio* sejt először egy kampó-szerű képlet segítségével a zsákmány sejt külső membránjához tapad, majd enzimatikus aktivitása révén lyukat fúr rajta, és azon keresztül behatol a zsákmánysejt periplazmatikus terébe. A behatolást követően a *Bdellovibrio* sejt megválik csillójától és „betapasztja" a zsákmánysejt külső membránján ejtett lyukat. Ezután a citoplazma membránra ható enzimek segítségével már hozzá tud férni a zsákmány citoplazma állományához. Később a zsákmánysejtből ún. bdelloplaszt jön létre, citoplazma állományának szerves anyagai teljes egészében a predátor *Bdellovibrio* sejt növekedésére és szaporodására fordítódnak. A gazdasejt periplazmatikus állományában a *Bdellovibrio* sejtek szaporodásakor először hosszú fonalas struktúrák jönnek létre, melyek feldarabolódásával kialakulnak a csillókkal rendelkező, aktív mozgásra képes utódsejtek. Ezek a külső membrán lízisével kiszabadulnak az addigra már elpusztított gazdasejtből, és áttérnek a szabadon élő fázisra.

4.5. A prokarióták életföldrajza

Az életföldrajz (más néven biogeográfia) az élőlények földrajzi elterjedését és az azt meghatározó tényezőket vizsgálja. Hagyományosan ez a tudományterület az állatföldrajz és a növényföldrajz keretében az egyes állat- és növényfajok térbeli megoszlásáról adott információt, napjainkban azonban már egyre több olyan tudományos cikk lát napvilágot, amelyik a mikroorganizmusok elterjedését kutatja.

A mikroorganizmusok kozmopolita elterjedésére vonatkozó nézet régmúltra tekint vissza. Az 1934-ben a holland Baas Becking és Beijerinck írták le először az azóta világszerte szállóigévé vált gondolatot, miszerint „Everything is everywhere, the environment selects.", vagyis minden mikroorganizmus bárhol előfordulhat, és az adott helyre jellemző környezeti tényezőktől függ, hogy azok hol képesek növekedni és szaporodni. A kozmopolita elterjedésre vonatkozó elméletet alátámasztani látszik, hogy a mikroorganizmusok kis méretük miatt rendkívül gyorsan és nagy területen képesek szétterjedni különféle élettelen közvetítők (pl. tengeráramlások, levegőben lévő porszemcsék, hajók, repülőgépek) vagy élő szervezetek (állatok és az ember) segítségével. A prokarióták az eukariótákhoz képest sokkal nagyobb anyagcsere sokféleségre és rugalmasságra képesek, továbbá olyan élőhelyeken is meg tudnak telepedni, ahol a különleges környezeti feltételek az eukarióták számára már nem teszik lehetővé az életet. Egyértelmű kozmopolita elterjedést mutatnak bizonyos az emberi szervezethez köthető baktériumfajok (pl. *Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Neisseria*

meningitidis, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae), melyeknek rendszerint csak néhány klonális leszármazási vonalával találkozhatunk világszerte.

A szabadon élő mikroorganizmusok kozmopolita elterjedésével vagy éppen endemikus előfordulásával kapcsolatban, az utóbbi évtizedekben több érdekes tanulmányt is közöltek. Ezen kutatások egyike az északi és a déli sarkvidéki tengerekben élő pszichrofil, gáz vakuólumokkal rendelkező baktériumok elterjedését vizsgálta. Ezek a baktériumok ideális endemikus jelöltek voltak, hiszen specializált niche-t foglaltak el, és a kutatók úgy vélték, hogy szűk hőmérsékleti toleranciájuk megakadályozza, hogy túléljék a Föld két pólusa közötti vándorlást. Összesen több mint 200 baktériumtörzset vontak be a vizsgálatba, és bár a két féltekéről származó izolátumok között számos közeli rokon taxon (*Octadecabacter, Polaribacter* és *Psychromonas* spp.) jelenlétét mutatták ki, a DNS-DNS hibridizációs eredmények alapján faji szinten nem találtak egyezést. Ez a tény azonban nem zárja ki, hogy ilyen fajok ne létezhetnének.

Egy másik kutatás során földrajzilag egymástól nagy távolságban lévő, de hasonló környezeti paraméterekkel jellemezhető izolált élőhelyek mikrobiális diverzitását hasonlították össze. A polinéziai, az északi-tengeri, az alaszkai és a földközi-tengeri vulkáni működéshez köthető hévforrásokból származó *Archaeoglobus, Thermococcus, Pyrococcus* és *Pyrodictium* izolátumok között igen nagyfokú volt DNS-DNS hibridizációs érték, ami ezeknek a szervezeteknek a kozmopolita elterjedésére engedett következtetni. Meglepő eredménnyel zárult az a vizsgálat, amelyik egy polinéziai vulkán kitörését követően a tengervíz felszínéről származó mintákból 10^6 TKE/L^{-1} nagyságrendű anaerob hipertermofil baktérium jelenlétét mutatta ki. Ez a nem várt eredmény azonban magyarázattal szolgálhat arra, hogy a mély tengerekben élő hipertermofil baktériumok hogyan juthatnak el a felszíni áramlások segítségével metabolikusan inaktív állapotban egyik földrajzilag izolált élőhelyről a másikba.

Egy a 2000-es évek elején publikált tanulmány 78 földrajzilag izolált terresztrikus 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 vizsgálat a törzsek között mindössze 10 polimorf hely jelenlétére mutatott rá, és ennek alapján a törzsek között endemizmust nem lehetett kimutatni, addig ugyanezen törzsek között 8 fehérje kódoló gén bázissorrendjének elemzésével már egyértelmű biogeográfiai elkülönülést lehetett 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 tükrözésére.

Az eddigi kutatási eredmények alapján úgy tűnik, hogy egy adott mikroba taxon populáció sűrűsége és terjedési képessége együttesen határozza meg, hogy a kérdéses taxon képviselői milyen mértékben képesek új és távoli élőhelyeket benépesíteni. Amíg egyes mikroba taxonok a két feltétel kombinációja révén globális szintű elterjedésre képesek (pl. endospóra képző *Bacillus* fajok), addig mások (pl. hévforrásokban élő *Sulfolobus* fajok) csak rövid távolságon belül képesek szétszóródni vagy korlátozott földrajzi eloszlást mutatnak.

Az utóbbi évtizedben végzett kutatások eredményei határozottan megerősíteni látszanak azt a tényt, hogy a növényekhez és az állatokhoz hasonlóan a mikroorganizmusoknak is van biogeográfiája, aminek kialakulásában evolúciós és ökológiai folyamatok egyaránt szerepet játszanak, azonban majd csak a jövő kutatásai adhatnak egyértelmű magyarázatot azokra a kérdésekre, hogy a diszperziós, szelekciós, genetikai sodródási és mutációs folyamatok mikor, hol, miért és hogyan járulhattak hozzá a mikrobiális biogeográfiai mintázatok kialakulásához.

Ajánlott irodalom

Baas Becking, L.G.M. 1934. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. (Geobiology or introduction to the science of the environment). Van Stockum, W.P. & Zoon, The Hague, Netherlands, pp. 218.

Bary, A. de 1879. Die Erscheinung der Symbiose. Strasbourg. pp. 136.

Brock, T.D., Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. Journal of Bacteriology, 98, 289–297.

Cavalier-Smith, T. 1988. Origin of the cell nucleus. BioEssays, 9, 72–78.

DeLong, E.F., Schmidt, T.M., Pace. N.R. 1990. Analysis of single cells and oliogotrophic picoplankton populations using 16S ribosomal RNA sequences. In: Hatori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R., Uchida, A. (eds.) Recent Advances in Microbial Ecology. Japan Scientific Societies Press, pp. 697-701.

Martin, W., Roettger, M., Kloesges, T., Thiergart, T., Woehle, C., Gould, S., Dagan, T. 2012. Modern endosymbiotic theory: Getting lateral gene transfer into the equation. Journal of Endocytobiosis and Cell Research, 23, 1-5.

Theobald, D.L. 2010. A formal test of the theory of universal common ancestry. Nature, 465, 219–222.

Whittaker, R.H. 1959. On the Broad Classification of Organisms. The Quarterly Review of Biology, 34, pp. 210-226.

Woese, C.R., Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, pp. 5088-5090.

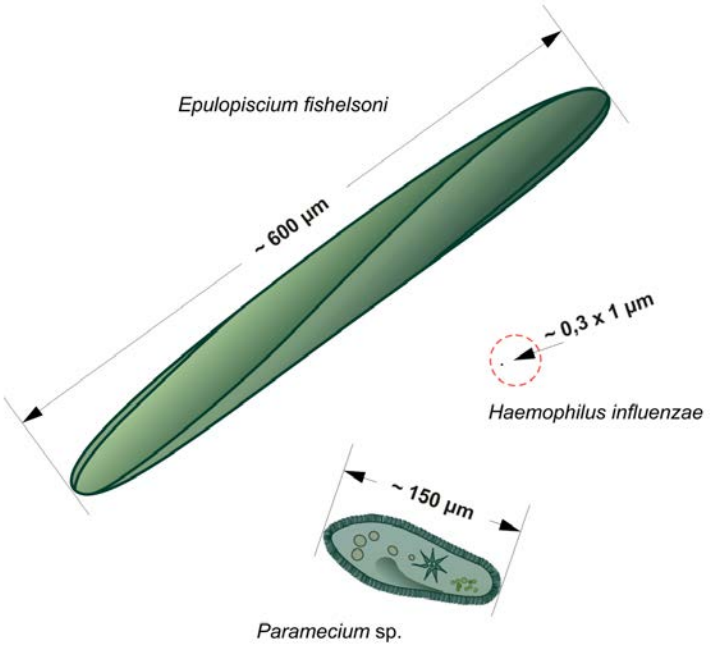
Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 87, 4576-4579.

Zuckerkandl, E. Pauling, L. 1965. Molecules as Documents of Evolutionary History. Journal of Theoretical Biology, 8, 357-366

5. A BAKTÉRIUMOK MÉRETE, SEJTSZERVEZŐDÉSE, NÖVEKEDÉSE ÉS SZAPORODÁSA

5.1. Kényszerek érvényesülése a sejtméret alakulásában

A baktérium sejtek mérete széles tartományban változik. A legkisebb szabadon élő sejtek átmérője körülbelül 0,2 µm, míg a legnagyobbaké meghaladhatja a 700 µm-t. E ritka szélsőértékektől eltekintve, melyek közt több mint 3500-szoros a méretkülönbség, a baktérium sejtek döntő többségét viszonylag szűk mérettartomány jellemzi. Egy átlagos, laboratóriumi tenyészetben fenntartott *Escherichia coli* baktériumsejt mérete 1,1-1,5 µm x 2,0-6,0 µm. A baktérium sejtekre ez a rendszerint néhány mikrométeres (1-3 µm) sejtátmérő jellemző, ami körülbelül egy nagyságrenddel kisebb, mint az eukarióta sejtek átlagosan 10-200 µm-es átmérője (**5.1. ábra**).



5.1. ábra. A legkisebb és a legnagyobb baktériumsejt és egy jellegzetes eukarióta, a papucsállatka méretének összehasonlítása

A legnagyobb méretű baktériumok egyike az *Epulopiscium fishelsoni* (Firmicutes), a doktorhalak bélmikrobiótájának tagja, amelynek sejthossza meghaladja a 600 µm-t (Angert és mtsai, 1993). A feltűnően nagy méret mellett ez a baktérium egyedülálló abban a tekintetben is, hogy sejtjében a DNS akár több ezres kópiaszámban van jelen, és az utódsejtek többszörös osztódás után az anyasejtből szabadulnak ki. A ma ismert legnagyobb méretű baktérium a *Thiomargarita namibiensis* (Gammaproteobacteria), amelyet 1999-ben fedeztek fel Namíbia partjai mentén a szulfidban gazdag tengeri üledékben (Schultz és mtsai, 1999). Gyöngysorszerűen elrendeződött kokkusz alakú sejtjeinek átmérője elérheti a 750 µm-t

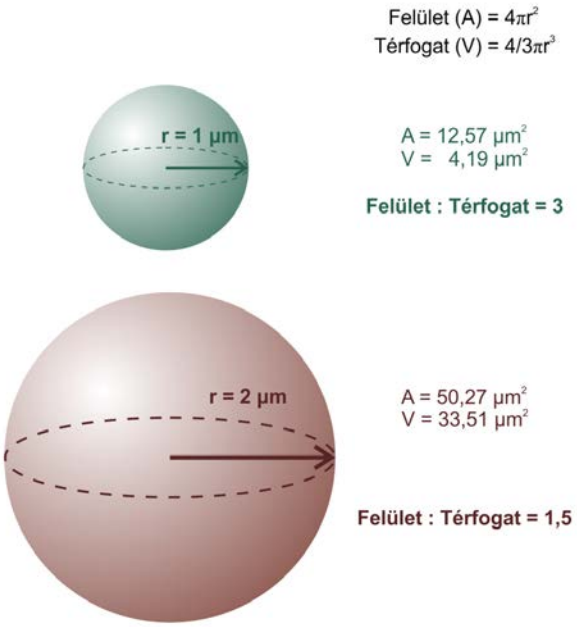
(0,75 mm), sejtjének térfogata pedig több milliószor nagyobb az *E. coli* átlagos sejttérfogatánál. Ez az anaerob kemolitotróf anyagcserét folytató baktérium energiát a szulfid oxidálásával nyer, melyhez a nitrátot használja elektron akceptorként. A hatalmas méretű sejt belsejét egyetlen (a sejt térfogatának >90 %-át is elérő) nagyméretű vakuólum tölti ki, melyben a környezetében előforduló nitrát mennyiségének akár tízezer-szeresét is képes felhalmozni. A sejt citoplazma állománya vékony rétegben a vakuólum körül található. A *T. namibiensis* sajátosan alkalmazkodott környezetéhez. A baktériumsejt a tengervízre az év nagy részében jellemző nitrát hiányos állapotot a sejtjének belsejében felhalmozott nitrát segítségével vészeli át, míg az elektron donorként szolgáló szulfidot a külső környezetéből veszi fel. Ez utóbbi részleges oxidációjával elemi ként állít elő, amit a fénymikroszkópos vizsgálatok tanúsága szerint ragyogó kén szemcsék formájában szintén képes sejtjében elraktározni, hogy azt szükségesetén tovább oxidálja szulfáttá.

A baktérium sejtek méretének alsó határát az a legkisebb térfogat jelöli ki, amely még biztosítani képes a szabadon élő létforma számára nélkülözhetetlen sejtalkotók (nukleinsavak, riboszómák, fehérjék) befogadását és működését. Az óceánok nyíltvízi régiójában igen nagy mennyiségben (10^4-10^5 sejt mL^{-1}) fordulnak elő igen csekély méretű (0,2-0,4 μm átmérőjű) sejtek. Közöttük tartjuk számon az először a Sargasso-tenger felszíni vizéből kimutatott és aerob heterotróf anyagcserével jellemezhető '*Candidatus* Pelagibacter ubique-t' (Alphaproteobacteria), amelyik egyúttal az egyik legkisebb genommérettel rendelkező szabadon élő baktérium. Számítások alapján a baktérium sejtméret alsó határa a 0,15 μm-es átmérőnél lehet, vagyis a természetben megfigyelt ennél kisebb sejtszerű képződmények feltehetően vagy nem baktériumsejtek vagy nem képesek önálló életműködésre.

A prokarióták kicsiny sejtmérete számos előnnyel jár. A kisméretű sejtek a térfogatukhoz képest nagyobb felülettel rendelkeznek, vagyis nagyobb a fajlagos felületük, mint a nagyoknak. Ezt legkönnyebben a gömb alakú (kokkusz) baktériumok példáján szemléltethetjük (**5.2. ábra**). Egy 1 μm-es sugarú gömb esetén a felület ($4r^2\pi$) = 12,6 μm^2, a térfogat ($4/3r^3\pi$) = 4,2 μm^3, vagyis a fajlagos felületük 12,6 μm^2 / 4,2 μm^3 = 3 μm^{-1}. Ha azonban a gömb sugarát 1 μm-rel növeljük, akkor a fajlagos felület a felére csökken (50,3 μm^{-2} / 33,5 μm^3 = 1,5 μm^{-1}). Konkrét példával élve a legkisebb méretű baktériumok közé tartozó *Pelagibacter ubique* esetében fajlagos felület 22 μm^{-1}, az átlagos sejtméretű *E. coli* esetében 4,5 μm^{-1}, míg a prokarióták között óriásnak számító *Epulopiscium fishelsoni* esetében csupán 0,05 μm^{-1}.

A fajlagos felület a baktérium sejtek esetében számos alapvető életfolyamatra hatással van. A sejtek növekedési rátáját a citoplazma membránon keresztül folyó transzportfolyamatok (pl. tápanyagfelvétel) sebessége nagymértékben befolyásolja. A kisebb méretű, ugyanakkor nagyobb fajlagos felülettel rendelkező sejtek nagyobb mennyiségű anyag transzportjára képesek nagyméretű társaikhoz képest, ami az élőhelyükön rendelkezésre álló adott mennyiségű erőforrás hatékonyabb felhasználását, ezáltal gyorsabb szaporodást és nagyobb populációsűrűség elérését teszi lehetővé számukra. Hosszabb időskálán nézve a kis méretnek evolúciós hatásai is lehetnek. A kisebb méretű sejtekre jellemző nagyobb szaporodási sebesség, a DNS gyakoribb replikációja miatt (még azonos mutációs rátát feltételezve is) nagyobb arányú hibalehetőséget rejt magában, ami az evolúciós jellegű változásoknak is a kiindulópontja lehet. Emellett fontos megjegyezni, hogy a baktérium sejtek rendszerint genetikailag haploidok, ami a mutációs események azonnali kifejeződésével jár együtt. Mindezek a tulajdonságok döntően hozzájárulnak ahhoz, hogy a prokarióták az eukariótákhoz képest könnyebben és gyorsabban képesek alkalmazkodni környezetükben végbemenő változásokhoz és hihetetlenül hatékonyak az új élőhelyek benépesítésében is.

[KG1] megjegyzést írt: Inkább járhat, multiplex génkópiák, merodiploid állapot stb. miatt ez ennél egy kicsit bonyolultabb.

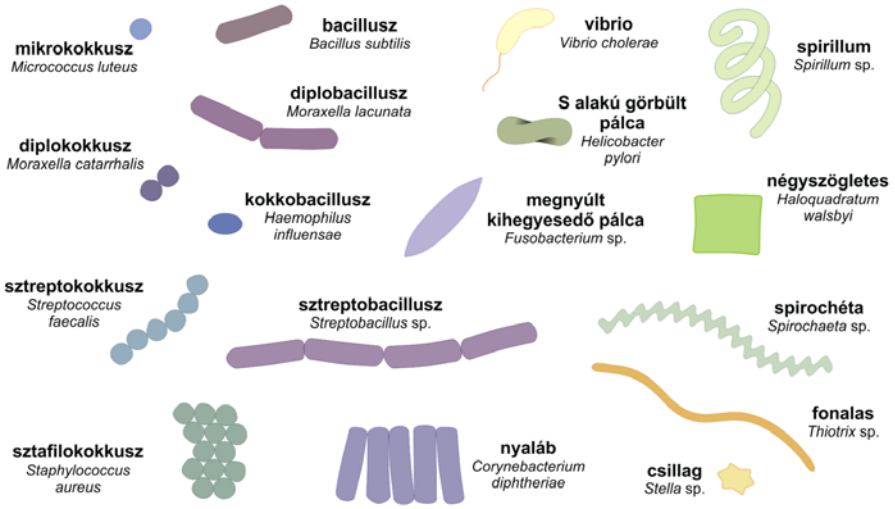


5.2. ábra. A fajlagos felület fontosságának szemléltetése.

5.2. A baktérium sejtek típusai és szerveződésük

A baktérium sejtek többsége általában néhány alapvető morfológiai típusba sorolható (**5.3. ábra**). Közöttük legegyszerűbb a többé-kevésbé szabályos, általában 1 µm körüli sejtátmérőjű gömb alak, a kokkusz (coccus). Attól függően, hogy a kokkusz alakú sejtek hány sík mentén osztódnak, és ezt követően milyen sejtelrendeződést mutatnak, további jellegzetes típusok különíthetők el közöttük. A mikrokokkusz sejtalakzat esetében a baktériumsejtek az osztódást követően különválnak egymástól. A diplokokkusz elrendeződésnél párosával, míg a sztreptokokkusz alakzatnál gyöngysorszerűen maradnak együtt. A sztafilokokkuszokra a szőlőfürtszerű sejtcsoportosulás a jellemző. A szabályos pálca alakú baktériumok (bacillus) körében már nem lehet ilyen egyértelmű csoportokat kialakítani, mert nem csak a különböző baktériumfajok között van folyamatos átmenet a kokkoidális pálcától a hosszú fonalas struktúrákig, hanem akár ugyanazon baktériumfaj esetében is nagy eltérés lehet a sejthossz és szélesség arányában a tenyésztési feltételektől és tenyészet korától függően. A csavart pálca alakú baktériumoknak három típusát különböztetjük meg egymástól. A vibrióknak és a sprillumoknak merev sejtfaluk van és csillókkal mozognak. Az előbbiek rövid sejtjei, negyed vagy fél csavarulattal rendelkeznek, míg az utóbbiak hosszabb sejtjeire többszörös csavarulat jellemző. Ezzel szemben a spirochétáknak nincs merev sejtfaluk, alakjukat sokszoros csavarulatot létrehozva változtatják, és belső csillójuk segítségével erősen viszkózus közegekben is képesek mozogni. Az előbbiekben felsorolt, a baktériumokra jellemző ún. alaptípusok mellett azonban szokatlan morfológiájú (szögletes vagy csillag alakú) sejteket és akár különféle függelékekkel vagy nyúlványokkal rendelkező sejteket is megfigyelhetünk. Bár a prokariótákra jellemző sejtalak akár fénymikroszkóp segítségével is könnyen tanulmányozható, mégis néhány kivételtől eltekintve kizárólag a sejtmorfológia alapján nem

juthatunk információhoz a sejtek egyéb (pl. taxonómiai, anyagcsere, ökológiai, patogenitási) tulajdonságaira vonatkozóan.



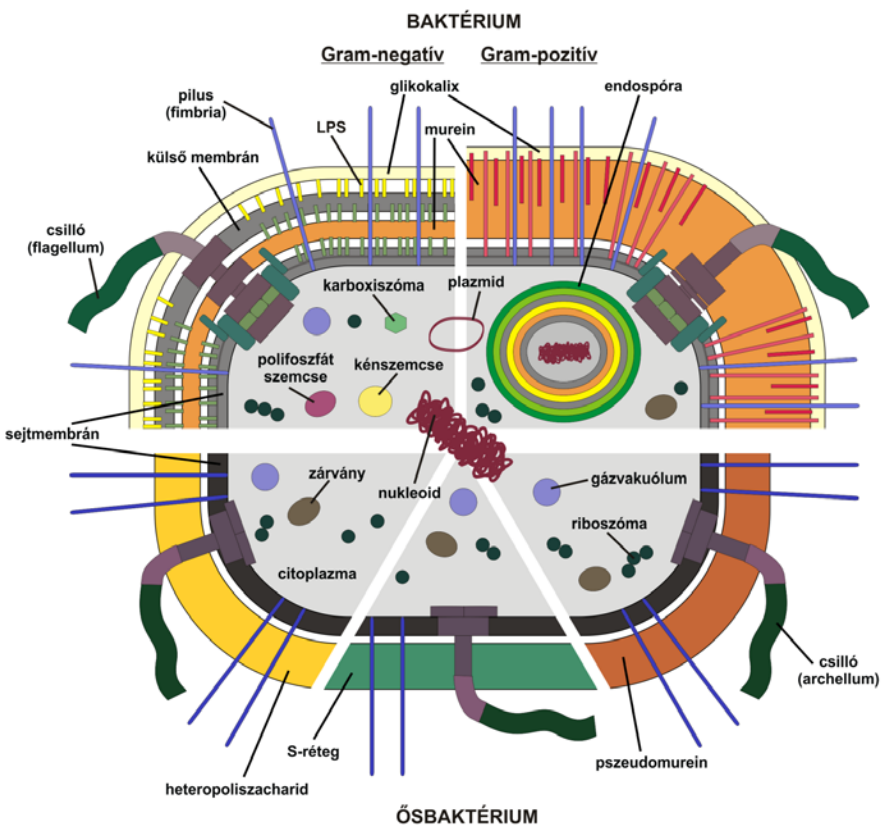
5.3. ábra. A baktériumsejtek alapvető morfológiai típusai.

A baktérium sejtek az eukariótákhoz képest általában egyszerűbb felépítésűek. A köztük lévő közös tulajdonságok ellenére számos egyedi szerveződési sajátosságot is megfigyelhetünk bennük (**5.4. ábra**). A baktérium sejteket az eukariótákhoz hasonlóan citoplazma membrán veszi körül, ezen kívül a legtöbb esetben ugyancsak összefüggő rétegként jelenik meg a sejtfal, amit kívülről glikokalix határolhat. A sejten belüli citoplazma állományban található létfontosságú sejtalkotók a nukleáris állomány és a riboszómák, míg járulékos alkotókként különböző tartalék tápanyagok, zárványok, endospóra és plazmidok fordulhatnak elő. A baktérium sejt felszínéről csillók, fimbria és pilusok nyúlhatnak a környezetbe. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy a létfontosságú sejtalkotók kivételével egyetlen baktérium sejt sem rendelkezik egyszerre valamennyi az előbbiekben felsorolt struktúrával. Ezek közül egyesek csak bizonyos sejtekben, meghatározott körülmények között vannak jelen, vagy a prokarióták életciklusának meghatározott szakaszára jellemzőek.

A citoplazma membrán folytonos rétegként összeköti és egyidejűleg el is választja a baktérium sejteket a környezetüktől. Mivel a baktérium sejtek az eukariótákkal ellentétben nem rendelkeznek membránnal határolt sejtszervecskékkel, a baktérium sejtekben minden membránhoz köthető feladatot a citoplazma membrán, vagy annak citoplazmatikus betüremkedései látnak el. A prokarióták citoplazma membránja a sejt és környezete között végbemenő oldott anyagok transzportján kívül részt vesz a sejt energetikai anyagcseréjében (pl. a légzésben, a fényenergia hasznosításban, az ATP szintézisben), a sejten kívül működő fehérjék (pl. exoenzimek) sejtből való kijuttatásában, a sejtosztódásban, a sejtfalszintézisben és a csillómozgásban is.

A citoplazma membrán felépítése a prokarióták két doménjében eltér egymástól. Amíg a baktériumokra az eukariótákhoz hasonló ún. egységmembrán szerkezet jellemző, addig az ősbaktériumokban egyedülálló módon, egyrétegű membránszerkezet alakult ki. A Bacteria doménben a citoplazma membrán alapszerkezetét általában 6-8 nm széles, foszfolipid kettősréteg alkotja, amelynek felépítésében a glicerin két szomszédos szénatomjához észter

[KG2] megjegyzést írt: Ez a mondat azt sugallja, hogy minden Archaea egyrétegű membránnal rendelkezik pedig csak egy részükre igaz, a többiekben kétrétegű membrán van, a szövegben később van is rá - igaz nem teljesen egyértelmű - utalás.



5.4. ábra. A baktérium sejtek szerveződése.

kötéssel kapcsolódó zsírsavak vesznek részt. Ezek a 12-20 szénatomszámú, telített vagy egyszeresen telítetlen zsírsavak a membrán hidrofób régióját alkotva annak belsejében helyezkednek el egymással szemben. Az Archaea doménre jellemző citoplazma membránban a glicerinhez izoprén egységekből felépülő, 20 szénatomos fitanil láncok kapcsolódnak éter kötéssel, amelyek a membrán középső, hidrofób régiójában egymással is kovalens kötést létesíthetnek. Ezáltal a membrán teljes keresztmetszetét kovalens kötésekkel áthidaló merev membránszerkezet jön létre, ami segíti az ősbaktériumok túlélését a sokszor szélsőséges környezeti feltételek mellett. A glicerin harmadik szénatomjához rendszerint egy foszfát csoporton keresztül különböző poláris csoportok (pl. etanol amin) kötődnek. Ezek a foszfolipid hidrofil részét képezve a membrán külső, periplazmatikus vagy belső, citoplazmatikus oldalán találhatók. A citoplazma membrán részét képezik még az eukariótákhoz képest a prokariótákban nagyobb mennyiségben, csoportokba rendeződve elhelyezkedő membránfehérjék is. Két típusukat különböztetjük meg egymástól, az integráns és a perifériás fehérjéket. Az összes membránfehérje 70-80%-át kitevő, amfipatikus integráns fehérjék hidrofób része a membrán hidrofób régiójába merül, míg hidrofil része kinyúlik a membrán felszínére. A citoplazma membránban kisebb mennyiségben (20-30%) jelen lévő perifériás fehérjék általában az integráns fehérjékhez kapcsolódnak, és a sejt citoplazmatikus vagy

[KG3] megjegyzést írt: A Gram-pozitív mureinbe rajzolt narancssárga, ill. piros struktúrák neve nincs feltüntetve Teichosavak?

periplazmatikus oldalán helyezkednek el. A citoplazma membrán működése szempontjából fontos az ún. félfolyékony, ugyanakkor stabil állapot fenntartása. A membrán felépítésében résztvevő molekulák oldalirányú mozgásának korlátozására a baktériumok membránjában hopanoidok, az eukarióták szteránvázas vegyületeinek analógjai fordulnak elő. Bár a prokarióták nem rendelkeznek komplex sejtszervecskékkel (pl. kloroplasztisszal vagy mitokondriummal), mégis bizonyos csoportjaikban (pl. a fotoszintetizáló bíbor baktériumokban és cianobaktériumokban, vagy a légző anyagcserét folytató nitrifikáló és metanotróf baktériumokban) rendezett citoplazmatikus membránbetüremkedéseket lehet megfigyelni. Ezeknél a baktériumoknál a nagyobb membránfelület az anyagcsere aktivitás hatékonyságának növelését biztosítja.

A baktérium sejteket kevés kivételtől eltekintve a citoplazma membránon kívül egy ugyancsak összefüggő réteg, a sejtfal határolja. Az általában merev és többrétegű sejtfal ellenáll a sejtben felhalmozott oldott anyagok ozmotikus nyomásának, és ezáltal megakadályozza a sejtek lízisét. A sejtfalra nehezedő nyomásérték ~2 atm, ami megfelel a személygépkocsikra jellemző átlagos keréknyomásnak. A baktérium sejtfal számos fontos feladatot lát el, részt vesz a sejt alakjának meghatározásában, a transzportfolyamatok szabályozása és a felületi kötődés révén a sejt és környezete közötti kapcsolat fenntartásában, az aktív mozgás elősegítésében, a külső sejtrétegek rögzítésében és megtámasztásában, továbbá a sejten kívüli függelékek kialakulásában. A Bacteria és az Archaea domén képviselői eltérő felépítésű sejtfalszerkezettel rendelkeznek. Kizárólag az előbbiekre jellemző a murein típusú, kovalens kötésekkel összetartott, hálózatos szerkezetű sejtfal, míg az utóbbiakban változatos sejtfal struktúrák (pl. pszeudomurein, poliszacharidok, S-réteg) fordulhatnak elő.

A murein alapszerkezete meglehetősen konzervatív, váltakozva összekapcsolódó N-acetil-muraminsav és N-acetil-glukózamin egységekből felépülő poliszacharid láncokból, és az N-acetil-muraminsav molekulákról lelógó tetrapeptid oldalláncokból áll (ezért szokás peptidoglikánnak is nevezni). A murein hálózatos szerkezete úgy alakul ki, hogy a baktériumsejt felszínén az egymással párhuzamosan futó szomszédos poliszacharid láncok a peptid oldalláncok között közvetlenül vagy peptid hidakon keresztül kialakuló kovalens kötések révén kapcsolódnak egymáshoz. A murein az élővilágban nem csak a benne lévő muraminsav miatt egyedülálló, hanem azért is, mert a tetrapeptid oldalláncban az aminosavak D konfigurációs izomerjei és nem természetes aminosavak (pl. diamino-pimelinsav) is megtalálhatók.

A baktériumok többségét a Christian Gram által 1884-ben kidolgozott összetett, differenciáló festést követően két csoportra, Gram-pozitívokra és Gram-negatívokra különíthetjük el. Az eljárás lényege, hogy a kristályibolya bázikus festékoldattal és a jódoldattal végzett kezelést követő alkoholos mosás során a Gram-pozitív szervezetek megtartják a festés során felvett lilás-kék színüket, míg a Gram-negatívok elszíntelenednek. Ez utóbbiakat egy második, szafranin festékoldattal végzett kezeléssel tehetjük ismét színessé, így ezek a sejtek pirosas-rózsaszínűek lesznek. A baktériumok előbb leírt eltérő festődési tulajdonságai a sejtfalszerkezetükben megfigyelhető különbségekkel magyarázhatók. Bár a murein a Gram-pozitív és Gram-negatív festődésű baktériumsejtekben egyaránt jelen van, mennyisége nagyon különböző. A Gram-pozitív sejtfalban a murein 20-30 nm vastagságú homogén réteget képez, melyben egymáson akár 25 molekularéteg is lehet, és ez képezheti a teljes sejtfalnak több mint 90%-át. Ezzel szemben a Gram-negatív sejtfalban a mindössze 3-5 nm vékony, 1-2 molekularétegből álló murein az ún. periplazmatikus térben helyezkedik el, és összességében a sejtfalnak legfeljebb 10%-át alkotja. A periplazmatikus tér a Gram-negatív baktériumokban a citoplazma membrán és az ugyancsak a sejtfal részét képező külső membrán által közrezárt terület, melyben a külső membránhoz fehérjékkel kapcsolódó mureinen kívül, pl. különböző hidrolítikus enzimek, kötő fehérjék és kemoreceptorok is előfordulnak. A citoplazma membránhoz hasonló vastagságú (~8 nm) külső membrán csak a Gram-negatív baktériumokra

jellemző. Erősen aszimmetrikus felépítésű foszfolipid kettősrétegének belső oldala a citoplazma membránhoz hasonló szerkezetű, míg a külső oldalát az összetett lipopoliszacharid (LPS) réteg lipid-A-nak nevezett része alkotja. A lipid-A-hoz kovalens kötésekkel kapcsolódik az LPS mag poliszacharidja, majd ehhez az ismétlődő oligoszacharid egységekből felépülő O-oldallánc. A külső membránban elszórtan számos pórusképző fehérje, ún. porin található, melyek a membránon keresztül zajló transzportfolyamatokban vesznek részt. A Gram-negatív baktériumokban a sejtfalnak a patogenitási folyamatokban is fontos szerepe van, hiszen a lipid-A endotoxinként hat, az LPS O-oldallánca pedig O-antigénként funkcionál. A Gram-pozitív baktériumok sejtfalában rendszerint a murein rétegekre és a sejtfelszínre merőlegesen elhelyezkedő teichosavak, illetve lipoteichosavak rendelkeznek antigén tulajdonságokkal. A fentebb leírtak alapján a baktériumsejtek Gram-festést követően megnyilvánuló színi eltérései tehát azzal magyarázhatók, hogy a Gram-pozitív sejtfalszerkezettel rendelkező baktériumokban a vastag murein réteg erősen megköti a kristályibolya-jód komplexet, amit az alkohol vízelvonó hatása a sejtfal zsugorodása miatt csak megerősít, így ezek a sejtek az elsőként alkalmazott festék színét mutatják. Ezzel szemben a komplex, de összességében sokkal vékonyabb és jelentős lipid tartalmú Gram-negatív sejtfalból az alkohol zsíroldó hatása miatt a kevésbé kötött első festék (kristályibolya-jód-komplex) kimosható, ezért ezek a sejtek csak a kiegészítő festést követően lesznek ismét színesek.

A baktériumok egy részénél a sejtfalon kívül jól körülhatárolható nyálkás vagy keményebb burok, a glikokalix (régebben toknak vagy nyáknak is nevezett réteg) képződhet. A glikokalix, ahogy erre a neve is utal, a legtöbb esetben poliszacharidokból épül fel, de ismert fehérje természetű tok is. A glikokalix szintézisének képessége genetikailag meghatározott, de a tényleges megjelenésére számos környezeti tényező, pl. a tenyésztési feltételek, a tápanyagok típusa is hatással van. A glikokalix járulékos sejtalkotóként számos előnyös tulajdonságot biztosít a baktériumsejt számára. A kórokozó baktériumokban a glikokalix jelenléte összefüggésbe hozható a patogenitással. A sejtfelszíni antigének elrejtésével a gazdaszervezet immunsejtjei nem képesek felismerni és elpusztítani a glikokalixszal rendelkező baktériumsejteket. A glikokalix a baktériumsejtek felületi kötődésében, a sejtek egymáshoz kapcsolódásában és a biofilm képződésben is szerepet játszik. A baktériumsejteket körülvevő glikokalix jelentős mennyiségű vizet és tápanyagot képes megkötni, ezáltal a baktériumsejtek túlélését is elősegíti kedvezőtlen környezeti feltételek (pl. kiszáradás vagy tápanyaghiány) esetén. A sejtfelszíni nyálkarétegnek szerepet tulajdonítanak a baktériumsejtek felülethez kötött csúszómozgásában is.

[KG4] megjegyzést írt: Ez is lehet patogenitási faktor.

A baktérium sejtek létfontosságú alkotóeleme, a maganyag (más néven nukleoid) a citoplazmában szabadon helyezkedik el, nem határolja maghártya. Általában egyetlen körkörös, kettős fonalú DNS molekula, amelynek mérete tág határok között változik. A legkisebb genommal rendelkező, obligát szimbionta (mutualista vagy parazita) baktériumok DNS-e csak néhány 100 Kb méretű, ugyanakkor a legnagyobb genommal rendelkező baktériumokban elérheti a 13000 Kb méretet is. Az *Escherichia coli* átlagos méretű (4,6 Mb) DNS-e teljesen kinyújtott állapotban a 2-3 μm hosszú sejt hosszának több mint 500-szorosa (>1 mm). Ez a relatíve nagyméretű DNS a sejt citoplazma állományába csak megfelelően feltekeredett állapotban fér be. A prokarióták összetekeredett DNS-ére, ún. negatív szuperhélix szerkezet kialakulása jellemző, melyben főként RNS-ek és fehérjék (de egyes ősbaktériumok kivételével nem az eukariótákra jellemző hiszton fehérjék) vesznek részt.

A baktérium sejtekben a fehérjeszintézis mértékétől függően igen nagy számban fordulhatnak elő 10-20 nm méretű szemcsék, riboszómák, melyek szintén létfontosságú sejtalkotók. A baktérium sejtek riboszómái az eukarióta sejtekéhez hasonlóan nagyobb részt (~60%) RNS-ből és kisebb részt (~40%) fehérjékből épülnek fel, két alegységből állnak, de azoknál kisebb méretűek. A baktérium sejtek 70S ülepedési egységgel jellemezhető

riboszómáiban háromféle rRNS található: a 16S rRNS a kis (30S) alegységben, míg a 23S rRNS és az 5S rRNS a nagy (50S) alegységben.

A baktérium sejtekben a rájuk jellemző anyagcsere és életmód függvényében különböző, gyakran fénymikroszkóppal is közvetlenül megfigyelhető vagy specifikus festéssel kimutatható szemcsés szerkezetű járulékos sejtalkotók, tartalék tápanyagok és zárványok is jelen lehetnek. A szén és/vagy energiaforrásként raktározott tartalék tápanyagok (pl. glikogén, poli-β-hidroxialkanoát) általában bőséges tápanyag ellátottság idején halmozódnak fel a sejt citoplazma állományában, és ínséges időkben segítik a baktériumsejt túlélését. Az elemi kén cseppecskék periplazmatikus térben való felhalmozása a redukált kénvegyületeket oxidáló fototróf és kemolitotróf baktériumokra jellemző, és tartalék elektron donor szerepét töltik be. Egyes baktériumok sejtjeikben (volutin szemcseként vagy metakromatikus granulumként is ismert) polifoszfátot képesek nagy mennyiségben raktározni, amit a nukleinsavak, a membránban lévő foszfolipidek és az ATP szintézise során hasznosítanak. A karboxiszómáknak nevezett, jellegzetesen sokszögletű és fehérje típusú membránnal határolt szemcsék az obligát autotróf anyagcserét folytató cianobaktériumokra, nitrifikáló és kén-oxidáló baktériumokra jellemzők. A karboxiszómáknak a Calvin-ciklus révén folyó szén-dioxid megkötés elősegítésében van szerepe. A természetes körülmények között tavak, tengerek vízében lebegő, ún. planktonikus életmódot folytató és fényenergia hasznosítására képes prokariótákban (pl. cianobaktériumokban, egyes zöld- és bíbor kénbaktériumokban, valamint halobaktériumokban) gáztartalmú zsákocskák, ún. vezikulumok találhatók. Ezeknek a merev fehérje vázzal rendelkező és a folyadékok számára átjárhatatlan sejten belüli képződményeknek a segítségével a sejtek függőleges mozgásukat tudják szabályozni a vízoszlopban, és ezáltal pl. a fototróf anyagcseréjüknek megfelelő fényellátottságú mélységbe kerülnek. Egyes természetes körülmények között pl. a tavak víz-üledék határrétegben élő baktériumok sejtjeikben gyöngysorszerűen elrendeződő, parányi magnetit kristályokat tartalmaznak. Ezeknek a nem egységmembránba zárt, ún. magnetoszómáknak a segítségével a sejtek a geomágneses erővonalak érzékelésére képesek, és azokra merőlegesen mozogva, a jellemzően mikroaerofil sejtek, a számukra kedvező oxigén ellátottságú környezetbe vándorolnak.

Kedvezőtlen környezeti feltételek esetén az endospóra képzés a baktériumok túlélését segíti elő. Az endospóra elsősorban a Gram-pozitív sejtfalszerkezettel rendelkező pálca alakú baktériumokra (pl. *Bacillus, Clostridium*) jellemző, és a vegetatív sejtekben képződik a sporulációnak nevezett sok lépésből álló folyamat során. A rendkívül összetett, több rétegű burokkal rendelkező endospóra kiszáradással, sugárzással és különböző vegyi anyagokkal szemben is ellenálló, így a baktériumok endospóra formájában akár hosszú évtizedeken át is meg tudják őrizni életképességüket. Bizonyítottan nem fertőzésből származó, életképes *Thermoactinomycetes* (Firmicutes) endospórák leghosszabb idejű túlélését először egy körülbelül 2000 éves római kori leletből dokumentálták az Egyesült Királyságban. Később a szintén *Thermoactinomyces* nemzetségbe tartozó endospórák jelenlétét több mint 9000 éves tavi üledékből is kimutatták. Az endospórák nagyfokú ellenálló képessége lehetőséget biztosít a baktériumoknak az akár kontinenseket is átívelő elterjedésben is.

A prokarióták citoplazma állományában a nukleoidnak is nevezett DNS-en kívül kisebb méretű, de szintén körkörös, kettős szálú DNS molekulák, plazmidok is előfordulhatnak. A nukleoidtól független megkettőződésre képes plazmidok még az egymástól távoli rokon baktériumok között is cserélődhetnek, a baktériumsejtek új plazmidokat vehetnek fel, de el is veszíthetik plazmidjaikat. Ezek a járulékos sejtalkotók általában a baktériumsejtek számára a környezeti feltételekhez való alkalmazkodást elősegítő anyagcsere (pl. környezetszennyező anyagok lebontása, antibiotikumok szintézise), rezisztencia (pl. nehézfémekkel vagy antibiotikumokkal szembeni ellenálló képesség) vagy virulencia (pl. növényi tumorképződés, toxinok szintézise) tulajdonságok kódolásáért felelősek.

A természetben számos mikroorganizmus képes energia igényes, aktív mozgásra, melyek közül a folyékony közegben csillókkal végzett úszómozgás a legelterjedtebb és a legjobban ismert. A bakteriális csillók egyik végükön a sejt meghatározott részéhez kapcsolódó vékony, 15-20 nm átmérőjű és rendszerint a sejt hosszát akár többszörösen is meghaladó hosszúságú, fehérjékből felépülő sejtfelszíni képződmények. A baktériumok csillója három részből áll: a sejtfelszínhez közvetlenül kapcsolódó alapi testből, egy kampónak nevezett, rugalmas és görbült összekötő részből, továbbá a sejt felszínéről a környezetbe nyúló, a kampónál merevebb fonalból (filamentum). Az egyes baktériumfajok a csillók számát és elhelyezkedését tekintve különböznek egymástól. A különböző csillózati típussal rendelkező baktériumok fénymikroszkóppal megfigyelhető mozgásmódja eltérő. A sok csillóval rendelkező sejtek általában lassú, egyenes vagy enyhén görbült vonalú mozgással jellemezhetők, míg a polárisan elhelyezkedő, egyetlen csillóval rendelkező sejtek gyors, egyik helyről a másikra irányuló cikázó mozgást végeznek. A csillómozgás sebessége általában genetikailag meghatározott tulajdonság, mivel az ugyanolyan sejtméretű, de különböző fajokba sorolt baktériumoknak eltérő a maximum sebessége. Egy baktériumsejt folyékony közegben akár 60 sejthossz s^{-1} sebesség elérésére is képes lehet. Ez a látszólag jelentéktelennek tűnő sebesség azonban viszonyítás kérdése, hiszen a leggyorsabb állatnak tartott gepárd maximum 25 testhossz s^{-1} sebességgel képes futni, vagyis ha a méreteket is figyelembe vesszük, akkor egy baktériumsejt több mint kétszer olyan gyorsan tud úszni, mint amilyen gyors mozgásra a leggyorsabb állat képes!

A baktérium sejtek felületén elszórtan előfordulhatnak más, szintén fehérjékből felépülő fonalas képződmények, melyeket pilusoknak vagy fimbriának hívunk. Ezeknek a járulékos sejtfelszíni képződményeknek a csillóktól eltérően általában nem a mozgásban van szerepük, hanem a rövidebb és igen nagyszámú fimbriának a baktériumsejtek felületi kötődésében (pl. patogén sejteknek a gazdasejthez való kapcsolódásban), míg a hosszabb és kisebb számú pilusoknak például a konjugációs folyamatokban (a sejtek közötti genetikai információ átadásban).

5.3. Sejtosztódás és életciklus a baktériumok körében

A mikroorganizmusok sejtjei minden más élő szervezethez hasonlóan véges élettartammal rendelkeznek, ezért a mikrobafajok fennmaradása kizárólag a populációik egyedeinek szaporodása révén biztosítható. A mikroorganizmusok szaporodási módjának és rátájának ismerete gyakorlati, alkalmazott mikrobiológiai szempontból is fontos lehet (pl. egyes ipari-biotechnológiai folyamatok tervezésénél a maximális hozam elérése érdekében, vagy éppen a kórokozó mikroorganizmusok szaporodásának hatékony gátlása céljából).

A baktériumsejtek növekedése számos, a sejtben zajló energiaigényes folyamattól függ, beleértve a makromolekulák építőelemeinek valamint a létrehozásukhoz szükséges különféle koenzimeknek és kofaktoroknak a szintézisét, de legfőképpen a makromolekuláknak a monomerekből való polimerizálódását. Ezeknek a makromolekuláknak a sejten belüli felhalmozódása új szerkezeti elemek (pl. riboszómák, sejtfal, citoplazma membrán, csillók) kialakulásához, végső soron pedig a sejt osztódásához vezet. A növekvő pálca alakú sejtek osztódása rendszerint hosszanti irányú megnyúlással veszi kezdetét (pl. az *E. coli* sejtek eredeti sejthosszuk kétszeresére is megnőhetnek), majd haránt irányban kettéfűződnek, és két új sejtet képeznek. Az osztódási síkot leggyakrabban a sejt középvonalában kialakuló szeptum jelöli ki, amelynek egyúttal fontos szerepe van a megkettőződött és citoplazma membránhoz kapcsolódó DNS-nek a két utódsejtbe történő elkülönítésében is. Az osztódás során a nukleoid állományon kívül mindkét utódsejt az önálló létezéshez szükséges megfelelő számú riboszómára, makromolekuláris komplexre, monomerekre és szervetlen ionokra is szert tesz. Ezt a számos

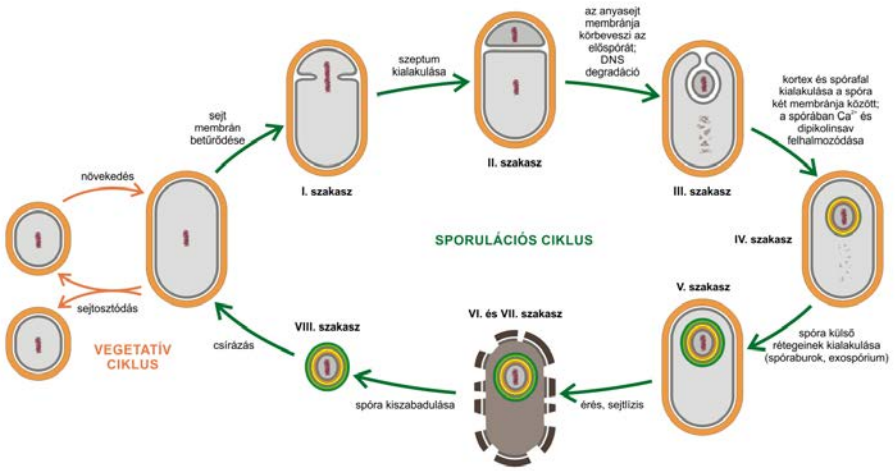
baktériumsejtre jellemző osztódási folyamatot bináris hasadásnak nevezzük, ami arra utal, hogy az osztódás során a kiindulási anyasejtből vele teljesen megegyező két utódsejt keletkezik.

Minden sejtosztódás eredményeképpen egy új generáció jön létre, ezért azt az időt, ami egy sejtpopuláció sejtszámának megkettőződéséhez szükséges generációs időnek nevezzük. Az egyes baktériumfajok között a generációs idő hosszát tekintve nagyok az eltérések, de a genetikailag meghatározott különbségeken kívül a generációs idő hosszára a tápanyag ellátottság és a hőmérséklet is hatással van. Laboratóriumi körülmények között az *E. coli* generációs ideje akár 20 perc is lehet, míg az ember bélrendszerében, ahol a szaporodásához szükséges feltételek közel sem optimálisak, általában 12 óra.

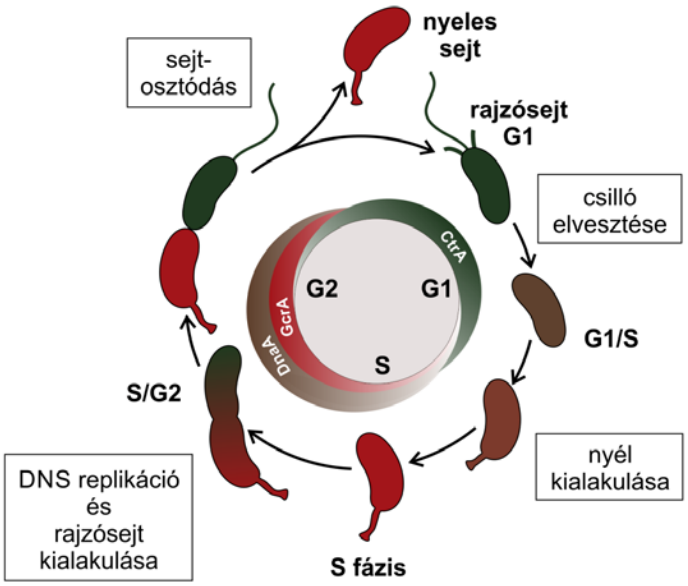
Bizonyos prokarióták a növekedésükhöz szükséges környezeti feltételek időbeni vagy térbeli korlátozottsága miatt, vagy akár az élőhely által kínált feltételekhez alkalmazkodva változatos életciklusokat folytathatnak. Az egyszerű életciklusok során a mikroorganizmusok rendszerint kétféle állapot között váltanak. Erre példaként a már a XIX. században Ferdinand Cohn által megfigyelt endospóra képző *Bacillus* fajokat említhetjük (**5.5. ábra**; Cohn, 1875). A bőséges tápanyag ellátottság mellett bináris hasadással szaporodó pálca alakú sejtek a környezeti feltételek kedvezőtlenné válásakor, pl. tápanyaghiány vagy kiszáradás hatására a sporulációnak nevezett folyamatban kitartó képletet, endospórát hoznak létre. Ebben a formában hosszú ideig megőrizhetik életképességüket, majd a megfelelő környezeti jel hatására az endospórák a csírázásnak nevezett folyamatban ismét vegetatív sejtekké alakulnak, és a folyamat ismétlődik. Hasonló, a kedvezőtlen környezeti feltételek átvészelésére képes túlélő képleteket más prokarióták is képeznek. Ilyenek. pl. egyes metanotróf baktériumok exospórái vagy a fonalas cianobaktériumok által képzett akinéták.

Az egyszerű életciklusok egy másik változatában a csillókkal aktív mozgásra képes ún. rajzósejtek és a felülethez nyéllel vagy sejtfüggelékkel kapcsolódó sejtformák váltakoznak egymással. Ilyen életciklus jellemzi a tápanyagokban szegény (oligotróf) édesvizekben gyakran megtalálható, *Caulobacter* nemzetségbe (Proteobacteria) tartozó baktériumokat. A *Caulobacter* életciklusában a csillók segítségével a vízben szabadon mozgó, de replikációra és sejtosztódásra képtelen sejtformák váltják egymást a csillóval nem rendelkező és egy nyél segítségével az aljzathoz rögzülő sejtformákkal **(5.6. ábra**). Előbbieknek a sejtek elterjedésében, míg utóbbiaknak a szaporodásban van szerepe. A *Caulobacter* életciklusát három különböző fehérje oszcilláló koncentrációváltozása szabályozza. A három közül kettő fehérje (CtrA és GcrA) csak a transzkripció szabályozásában vesz részt, míg a harmadik (DnaA) a DNS replikációjának a kezdeményezésében is közreműködik, vagyis a három fehérje az életciklus eltérő szakaszában aktív. A G1 és G2 szakaszok a baktériumsejtek növekedési fázisai, míg az S, a szintézis (DNS replikáció) szakasza. A G1 szakaszban környezeti szignál hatására az első fehérje (CtrA) foszforiláció révén aktiválódik, és megkezdődik a rögzült sejtből fejlődő rajzósejtben a csilló és más, az aktív mozgáshoz szükséges fehérjék szintézise. Ennek a szabályozó fehérjének (CtrA) a sejten belüli nagy koncentrációja gátolja a másik szabályozó fehérje (GcrA) szintézisét és a DNS megkettőződését is, ezért az osztódásra képtelen rajzósejt leválik az anyasejtről és önálló életet kezd. Az életciklus folytatásaként egy specifikus proteáz enzim hatására a rajzósejtben a szabályozó fehérje (CtrA) koncentrációja fokozatosan csökken, és ezzel párhuzamosan a G1/S átmeneti szakaszban megkezdődik a DNS replikációban is résztvevő szabályozó fehérje (DnaA) sejten belüli koncentrációjának emelkedése. A rajzósejt ennek következtében elveszti csillóját, és a folyadék fázisból a felületre kerül. Az első szabályozó fehérje (CtrA) hiányában, az S szakaszban, megindul a DNS megkettőződése, és a sejt rögzítéséért felelős nyél kialakulása. A második szabályozó fehérje (DnaA) koncentrációjának csökkenésével a harmadik szabályozó fehérje (GcrA) koncentrációjának növekedése veszi kezdetét, ami a G2 szakaszban a sejtosztódás befejezésének szabályozásában vesz részt. Ezt követően a harmadik szabályozó fehérje sejten belüli koncentrációjának csökkenése az első szabályozó fehérje koncentrációjának növekedéséhez vezet, és a ciklus

kezdődik elölről.



5.5. ábra. A baktériumok endospóraképzése.

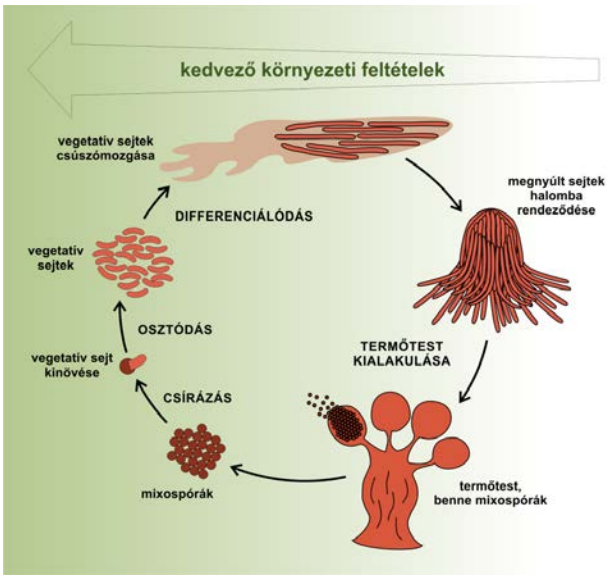


5.6. ábra. A *Caulobacter* fajok életciklusa és annak szabályozása.

Egyes prokarióták még az előbbinél is bonyolultabb életciklusra képesek. Az ún. komplex életciklusok során nem csak a rajzó és rögzült sejtalakok, hanem az egy és többsejtes állapotok is váltakoznak egymással (**5.7. ábra**). A komplex életciklusú, termőtest képző baktériumok a legnagyobb genom méretű mikroorganizmusok közé tartoznak, és akár több

mint 10000 génnel is rendelkezhetnek. A *Myxococcus xanthus* (Deltaproteobacteria) egyetlen cirkuláris DNS-e 9,2 Mb méretű. A termőtest képző baktériumok vegetatív sejtje általában olyan csilló nélküli, egyszerű, Gram-negatív pálca, amelyik szilárd felületen csúszómozgásra képes annak érdekében, hogy tápanyag szükségletét más baktériumsejtek lízisével biztosítsa. Meghatározott körülmények között a rajzó, vegetatív sejtek jellegzetes sejtcsoportosulást, ún. termőtestet hoznak létre, amelynek belsejében néhány sejt nyugvó állapotba tér, ún. mixospórává alakul. A mixospórák elsődleges funkciója a baktériumok kiszáradással szembeni védelme az élőhely időszakos kiszáradásakor, de a baktériumok elterjedésének elősegítésében is részt vesznek. A mixobaktériumokra jellemző termőtest nagyon változatos lehet, az egyszerű nyálkaburokba ágyazott mixospóra tömegtől egészen a fallal, nyéllel és bonyolult feji résszel rendelkező alakzatokig. A fény hatására képződő karotinoid típusú pigmentektől gyakran feltűnő színű termőtestek a természetben rendszerint nedves korhadó fákon vagy más növényi részeken fejlődnek, és egy kézi nagyító segítségével akár szabad szemmel is látható, több 100 μm-es méretet is elérhetnek. A termőtest képződése a vegetatív sejtekből általában a tápanyag hiány következtében indul meg. Ekkor a mixobaktériumok rajzó sejtjei az általuk termelt nyálka segítségével a szilárd felületen jellegzetes egy irányba mutató csúszómozgást végeznek. Az első sejtek által létrehozott nyálka útvonalak a többi sejt számára már nyomvonalként szolgálnak, és a kemotaxis által szabályozott mozgás során a sejtek végül jellegzetes halomszerű csoportosulást hoznak létre. A termőtest ezt követően a halomba rendeződött sejtek differenciálódása révén jön létre, melyben a sejtsűrűségtől függő, ún. quorum sensing szabályozás érvényesül, így egyes sejtek a termőtest nyálkával összetartott nyelének a képzésében, míg mások a feji részben található mixospórák kialakulásában vesznek részt. A termőtestből kiszabaduló mixospórák a számukra kedvező környezeti feltételek esetén a csírázásnak nevezett folyamatban ismét rajzó sejtekké alakulnak.

[KG5] megjegyzést írt: Ez lehet egy kicsit magyarázni kellene hogy mi is ez, alant a biofilmképződésben kiemelt jelentősége van, bár ott nincs említve.



5.7. ábra. Komplex életciklus a mixobaktériumok körében.

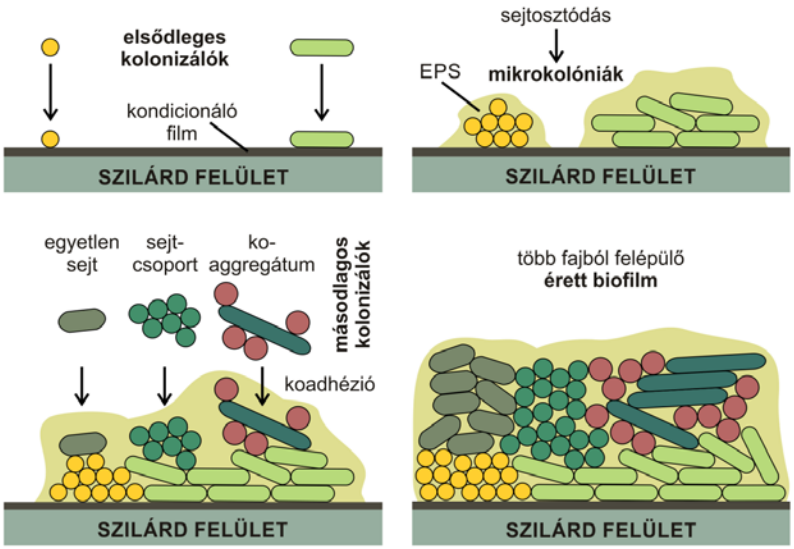
5.4. Mikrobiális biofilmek

A mikroorganizmusok számára az élő és élettelen felületek egyaránt fontos élőhelyeket jelentenek, hiszen a felülethez rögzült életmód a planktonikushoz képest rendszerint bőségesebb tápanyag ellátottságot, a ragadozókkal és a fizikai és kémiai zavarásokkal szemben hatékonyabb védelmet biztosít, és magában hordozza a különböző fajok közötti kölcsönhatásokon alapuló, önszerveződő közösségi anyagcsere folyamatok kialakulásának lehetőségét. Biofilmek gyakorlatilag bármilyen természetes vagy mesterséges felületen kialakulhatnak, ahol a felülettel érintkező vizes közegben a mikroorganizmusok jelen vannak. Egyes különleges élőhelyeken (pl. hőforrások környezetében), ahol a mikroorganizmusokat fogyasztó eukarióták a számukra kedvezőtlen környezeti feltételek miatt nincsenek jelen, a kizárólag prokarióták által alkotott biofilmek akár szabad szemmel is látható méretű, centiméteres vastagságot is elérhetnek. Az ilyen vastag biofilmeket az angolban „mat”-nek, magyarul szövedéknek nevezzük. Biofilmek mesterséges felületeken, pl. ipari berendezésekben (hőcserélőkben, ivóvíz vezetékekben) vagy akár orvosi eszközök (katéterek, implantátumok) felületén is létrejöhetnek. Jelenléte általában nem kívánatos. A csővezetékekben a biofilm hatására csökken az átfolyási sebesség és a hőkicserélődés hatékonysága, a korróziós folyamatok felgyorsulhatnak, sőt kórházi ivóvízcsapokhoz köthetően nozokomiális fertőzések is kialakulhatnak. Az emberi szervezetbe helyezett orvosi eszközökön a biofilmek képzésében leggyakrabban a súlyos, gyakran végzetes kimenetelű fertőzéseket előidéző, számos antibiotikumnak ellenálló (multirezisztens) opportunista kórokozók vesznek részt. A biofilmek képződése meghatározott helyeken ugyanakkor előnyös tulajdonságokkal bír, illetve az ember ezeket a biofilmeket saját hasznára fordíthatja. Ilyen gyakorlati szempontból fontos biofilmek találhatók pl. a biológiai szennyvíztisztító rendszerekben, ahol különféle szennyező anyagok mikrobiológiai lebontása történik. Biofilmek alkalmazása segíti a bioremediációs technikákat is, pl. a talajvíz szennyeződések immobilizálásakor, a kőolaj szennyeződések lebontásának fokozásakor vagy meddőhányók érctartalmának kilúgozással történő kinyerésénél.

A biofilmek kialakulását a legegyszerűbben úgy igazolhatjuk, hogy vizes közegbe egy tárgylemezt merítünk, majd bizonyos idő elteltével a tárgylemezt fénymikroszkóp alatt megvizsgáljuk. A tárgylemezen először mikrobasejtekből szórványosan kialakult sejtcsoportokat (mikrokolóniákat) figyelhetünk meg, éppen úgy, ahogy ez természetes körülmények között is végbemegy a biofilm képződés kezdeti szakaszában. Ha a tárgylemezes kísérletünket nem csak egyszeri alkalommal végezzük el, hanem a tárgylemezt hosszabb időn keresztül a vízbe merítve tartjuk, és közben többször is megvizsgáljuk, akkor a sejttömeg mennyiségi növekedésének és a biofilm érési folyamatának, sajátos szerveződésének is szemtanúi lehetünk.

A biofilmek képződésének kezdeti szakaszában (**5.8. ábra**) a vizes közegben lebegő vagy csillókkal aktívan mozgó mikroorganizmusok általában kemotaxissal a szilárd felületre kitapadt szerves anyagokból álló, ún. kondicionáló film közelébe kerülnek. Az elsődleges kolonizálók ezt követően véletlenszerűen ütköznek a felülettel, majd rendszerint gyenge fizikai-kémiai kölcsönhatások révén, reverzibilisen kötődnek. Megfelelő környezeti feltételek esetén az elsődleges kolonizálók később irreverzibilisen kapcsolódnak a felülethez. A végleges kötődés során a biofilmképző sejtekben jellegzetes fenotípusos változások mennek végbe, pl. a mozgó sejtek elvesztik csillójukat, ezáltal megszüntetnek egy, a biofilmet destabilizáló faktort. Ezt követően a már rögzült sejtek elkezdenek osztódni, és ennek eredményeképpen először az azonos fajba tartozó sejtekből álló mikrokolóniák jönnek létre (**5.8. ábra**).

[KG6] megjegyzést írt: Ez valahogy másképp kellene kifejezni.



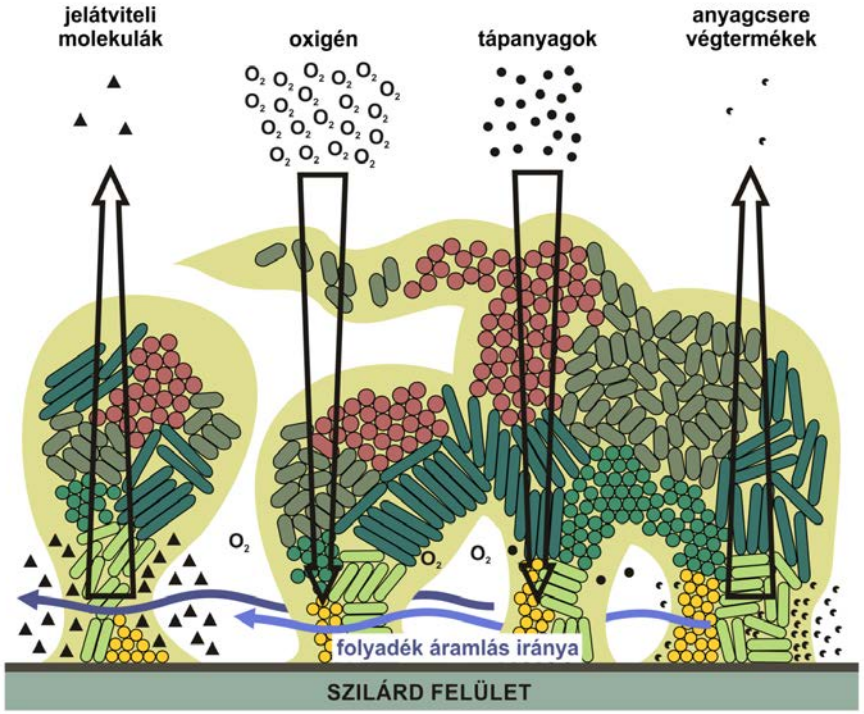
5.8. ábra. A biofilmek kialakulásának szakaszai.

A biofilm képződés jellemző sajátossága az osztódó sejtek közötti nagy mennyiségű, nyálkás EPS (extracelluláris polimer szubsztancia) mátrix termelődése és felhalmozódása (**5.8. ábra**). Az EPS legnagyobb részét poliszacharidok képezik, de egyéb makromolekulák (fehérjék, nukleinsavak és más heteropolimerek) is előfordulhatnak benne. A sejteket körülvevő és a biofilm szerkezet kialakításában elsődleges szerepet játszó EPS mátrix homeosztázist és védelmet biztosít a megtelepedő mikroorganizmusok számára. A mátrix oldott szerves anyagokat képes felületén adszorbeálni, ezáltal a közösség számára fontos növekedési faktorokat és tápanyagokat koncentrál. Ioncserélőként működve korlátozza a különféle komponenseknek a környezetből a biofilmbe való bejutását, így megakadályozhatja pl. bizonyos antimikrobiális ágensek, toxinok, fémek felhalmozódását. Az EPS védelmet nyújt a környezeti stressz hatásokkal (pl. UV-sugárzással, pH-változással, ozmotikus sokkal, kiszáradással, és a bakteriofágokkal) szemben is.

Az elsődleges kolonizáló sejtek szaporodásának eredményeképpen a felület fedettsége megnő, így a sejtek környezetében megváltoznak a mikrokörnyezeti feltételek, ami a vizes közegből újabb mikroorganizmusoknak a biofilmbe való beépüléséhez vezet. A másodlagos kolonizálók, melyek lehetnek magányos sejtek, de képezhetnek sejtcsoportokat vagy különböző fajok sejtjeiből álló koaggregátumokat is, minden esetben specifikus sejtfelszíni kötődés révén az elsődleges kolonizálók sejtjeihez kapcsolódnak (**5.8. ábra**). Ez egyúttal azt is jelenti, hogy az elsődleges kolonizálók összetétele határozza meg azt, hogy mely mikroorganizmusok képesek bekapcsolódni a biofilm érési folyamatába. A másodlagos kolonizálóknak az osztódásával és további EPS képzéssel az egyre heterogénebb, közösségi anyagcsere rendszerekké szerveződő biofilm strukturálisan és funkcionálisan is tagolttá válik.

Az érett biofilmet tehát nevével ellentétben nem homogén bevonatként kell elképzelnünk. Az EPS mátrixban a sejtcsoportok mikrocsatornácskák révén létesítenek kapcsolatot egymással, illetve a környezetükkel (**5.9. ábra**). A mikrocsatornácskákon keresztül bonyolódik a biofilm anyagforgalma: a tápanyag- és oxigénfelvétel, az anyagcsere termékek „cseréje”, valamint a végtermékek leadása. Bár a legtöbb biofilm belseje a csatornácskákon

keresztül zajló folyadék áramlásnak köszönhetően oxigénnel többé-kevésbé ellátott, a mikrokolóniák belsejében létrejöhetnek mikroaerofil, sőt anoxikus mikrokörnyezetek is. Az érett biofilmben a résztvevő sejtek között sokoldalú kölcsönhatás jöhet létre, beleértve az eltérő anyagcsere típusú mikroorganizmusok között kialakuló együttműködéseket. A biofilm azért válhat komplex, jól működő, tagjai számára kedvező élőhellyé, mert a közösség élete szabályozott. Ennek alapját olyan aktívan, vagy passzívan transzportálódó mikrobiális anyagcseretermékek biztosítják, amelyek megváltoztathatják a szomszédos mikrobák fehérje szintézisét, élettani állapotát. A szignálmolekulák lehetnek anyagcsere termékek, fehérjék vagy nukleinsavak egyaránt. A biofilm baktériumok körében egyúttal a konjugáció révén megvalósuló intra- és interspecifikus géntranszfer a szoros közelségben együtt élő fajok között hatékony génkicserélődésre is lehetőséget biztosít. A biofilmben megjelenő új genetikai elemek lehetnek pl. antibiotikum-rezisztenciáért felelős plazmidok, vagy patogenitási szigetek is.



5.9. ábra. Az érett biofilm szerkezete.

Ajánlott irodalom

Angert, E.R., Clements, K.D., Pace, N.R. 1993. The largest bacterium. Nature, 362, 239–241.
Cohn, F. 1875. Untersuchungen über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Planzen, 1, 127-222.
Gram, H.C. 1884. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. Fortschritte der Medizin, 2, 185–189.
Schulz, H.N., Brinkhoff, T., Ferdelman, T.G., Mariné, M.H., Teske, A., Jorgensen, B.B. 1999.

Science 284, 493–495,

6. A BAKTERIÁLIS ANYAGCSERE SOKFÉLESÉGE

6.1. Az élet energetikai alapjai

A sejteknek életműködéseik fenntartásához energiára van szükségük. Az energia legegyszerűbb megfogalmazásában munkavégző képességként, vagy hő átadó képességként jelölhető meg. Munkát végez egy élőlény, amikor aktívan mozog, de munkát végez akkor is, amikor a „nagyon híg környezetből" a sejtjeibe felvesz tápanyagokat, vagy ezeket „rendezett" nagyobb molekulákká alakítja, tartalék tápforrásokat halmoz fel stb.

Az energia egysége a joule (J), amely az a befektetett energia, vagy elvégzett munkamennyiség, amit 1 newton (N) erő 1 méternyi úton alkalmazva végez ($kgms^{-2}$). *Hasonlóképpen egy J az a munkamennyiség, befektetett energia, amellyel egy coulomb (C) elektromos töltést egy voltos (V) elektromos potenciálkülönbségben át lehet vinni (C V).*

Az energiának nagyon sok fajtája van, de a biológiai rendszerekben két alapvető típusával találkozunk: a mozgási (kinetikus) energiával és a „helyzeti", tárolt, vagy sokkal inkább „potenciális" energiával. A mozgási energia a molekulák, atomok mozgása formájában egyúttal a hőenergiát is jelzi. (Mérni közvetve szokták, a hőmérséklet változása formájában.) Hasonló módon a fényenergia, amely az élővilág egy csoportja számára (fényenergiát hasznosítók) elsődlegesen fontos, a fotonok mozgási energiájaként tekinthető. A mindennapjainkban a hőenergia sokféle munkavégzésre használható, ugyanakkor a sejtek és környezetük közötti hőmérséklet különbséget a sejtek (általában) nem tudják munkavégzésre igénybe venni. A biológiai rendszerekben a tárolt energia kiemelt fontosságú. A molekulák kémiai kötései ilyen tárolt energiát jelentenek, de ilyen potenciális energiát jelent a különböző anyagok koncentráció-különbsége a sejten belül, ill. kívül akár semleges, akár töltéssel rendelkező anyagokról legyen is szó.

Biológiai rendszerekben a csak a rendszerre vonatkozó szabadenergiát, vagyis a hasznos munkára fordítható energiaváltozást (ΔG) érdemes vizsgálni. Josiah Willard Gibbs (1839-1903) vezette be a fizikában (termodinamikában) a szabadenergia fogalmát, amelyet (bio)kémiai reakciók esetében a legegyszerűbben így fogalmazhatunk meg: ha egy rendszer hőmérséklete és nyomása nem változik, akkor egy kémiai reakció akkor fog önként lezajlani, ha a Gibbs féle szabadenergia változás értéke negatív.

$$\Delta G_{rendszer} = \Delta G_{termékek} - \Delta G_{reaktánsok} = < 0$$

Az önként végbemenő reakciókat exergonikusnak nevezzük (energia felszabadulással jár), míg az önként végbe nem menő folyamatok endenergonikusak, vagyis energia befektetést igénylők. Ha a Gibbs féle szabadenergia értéke zérus, akkor a reakció termodinamikai egyensúlyban van. A szabadenergiát $kJ\ M^{-1}$ értékben fejezzük ki.

Egy reakció Gibbs féle szabadenergia változását a rendszer állapothatározók értéke, vagyis a hőmérséklet, a nyomás, ill. a reaktánsok és a termékek kezdeti koncentrációja befolyásolja. Ezen túlmenően, mivel a biológiai rendszerekben a reakciók vizes oldatokban folynak a folyamatok szabadenergia változása az oldat pH-jától is függ. A számításokban ezeket figyelembe kell venni és ezt a Gibbs féle szabadenergia értékéhez ragasztott felső index jelzésekkel is szimbolizáljuk. A standard Gibbs féle szabadenergia változás (ΔG^o) értéke 1013,25 hPa nyomásra és 1,0 M reaktáns és termék oldatkoncentrációra (gázok esetén 1013,25 ~~HPa~~ hPa nyomáson) vonatkozik, 25°C (298 K) hőfokon. Ha még a víz proton koncentrációját is figyelembe vesszük, akkor a ΔG^o' érték 7-es pH meglétére utal. Olyan kémiai folyamatokban, amelyekben a H^+ részt vesz, a pH-t mindenképpen figyelembe kell venni.

Biológiai rendszerekben ritkán jellemző a standard körülmények megléte. Különösen a reaktánsok és termékek koncentrációja tér el az 1 M-os értéktől (nagyságrendjük $\leq 10^{-2}$ M). Egy

$$n\,A + m\,B \longleftrightarrow o\,C + p\,D$$

reakció esetén

$$\Delta G = \Delta G^o + RT \ln([C]^o\ [D]^p / [A]^n\ [B]^m)$$

ahol R az egyetemes gázállandó (értéke 8,29 $kJ^{-1}\ K^{-1}$), T a hőmérséklet K fokokban, majd pedig a termékek és reaktánsok mólkoncentrációja (aktivitása) arányának logaritmusát vesszük.

Egyensúly esetén az egyensúlyi konstans értéke:

$$K_{eq} = [C]^o\ [D]^p / [A]^n\ [B]^m$$

Miután az egyensúlyi reakció esetében a Gibbs féle szabadenergia értéke zérus, a standard szabadenergia értéke a gyakorlatban az egyensúlyi állandóból mérhető, számolható.

$$\Delta G = 0 = \Delta G^{o\prime} + RT \ln K_{eq}$$

A standard érték megadásánál a korábban már jelzett állapothatározókkal számolunk. A Gibbs féle szabadenergia standard értéke nem jelzi, hogy egy folyamat önként végbemegy-e. Erre csak az aktuális (hőmérséklet, nyomás, pH, mólkoncentrációk figyelembe vételével számított) ΔG érték ismeretében következtethetünk.

Az egyes kémiai reakciók Gibbs féle szabadenergia változását a termékek és reaktánsok *képződési* szabadenergia értékeiből magunk is kiszámíthatjuk, ha felírjuk a reakciót és a reakció egyenletet megfelelően rendezzük. Standard viszonyok érvényesülése esetén:

$$\Delta G^{o\prime} = \Sigma\ \Delta G^{o\prime}_{K(termékek)} - \Sigma\ \Delta G^{o\prime}_{K(reaktánsok)}$$

Az egyenletrendezés során három feltételt kell mindenképpen figyelembe venni. Ezek: i. az egyenlet két oldalán a reakcióban részt vevő atomok számának meg kell egyeznie; ii. amennyiben a reakcióban ionok is reaktánsok, vagy termékek, a két oldalon a töltéseknek is meg kell egyezniük; és iii. a reakciónak oxidoredukciós szempontból is egyensúlyban kell lennie, vagyis az egyik reaktáns által leadott valamennyi elektront a többi reaktánsnak fel kell vennie. Ez utóbbi számolásánál nagy segítséget jelenthet az oxidációs számok használata. A biológiai rendszerekben jellemző vegyületek, ionok esetében az azokban részt vevő elemek oxidációs számát néhány egyszerű szabály alkalmazásával meghatározhatjuk:

- az elemekben az elem oxidációs száma 0 (a kétatomos elemekben is) (pl. C, S, P, N_2, H_2);
- egy elem ionjának az oxidációs száma megegyezik az ion töltésével (pl. az S^{2-} esetében - 2, a Mn^{2+} esetében +2);
- egy molekulában az azt alkotó atomok oxidációs számának összege 0, vagyis definíciószerűen „semleges” (pl. CH_4, a metánban a C oxidációs száma -4 és a 4 hidrogéné együttesen +4; a CO_2 molekulában a C oxidációs száma +4, a 2 oxigéné együttesen pedig -4). Vegyületekben az oxigén általában -2, míg a hidrogén +1 oxidációs számú. Szerves vegyületek esetében a C oxidációs számát ennek megfelelően egyszerű kiszámítani;
- egy ion esetében az azt alkotó atomok oxidációs számának az összege megegyezik az ion töltésével (pl. SO_4^{2-} ionban a S oxidációs száma +6 és a 4 oxigéné 4 x -2 = -8, vagyis ezek összege -2);

- komplex szerves vegyületekben az egyes C atomok pontos oxidációs száma csak a szerkezet ismeretében becsülhető meg, mégis az összegképletük alapján a C-re vonatkozó oxidációs szám megadható. Pl. a glukóz ($C_6H_{12}O_6$) molekulában a C oxidációs száma 0, akárcsak a tejsav ($C_3H_6O_3$) esetében. Az etilalkoholban (C_2H_6O) -4.

A kémiai reakciók legtöbbje atomok közötti elektronátadással is jár, amely akár új kémiai kötések kialakulásához is vezethet. Az az atom, amelyik elektront ad le oxidálódik (az elektronleadás oxidáció), míg az, amelyik elektront vesz fel redukálódik (az elektronfelvétel redukció). Miután kémiai reakciókban „az elektronok megmaradnak", ezért miközben egy atom, vagy molekula oxidálódik, egy másiknak redukálódnia kell. A sejtekben zajló biológiai folyamatok, különösen is az energiatermelés sok lépésből álló, szabályozott oxidoredukciós (redox) reakciósorozatok, amelyek lépései egyszerűen elektronátmenettel jellemezhetők, vagy gyakorta egy elektron és egy proton (együttesen H atom) átadásával járnak. Az előbb már említett „elektron megmaradás" elve értelmében a redox folyamatok párokban zajlanak: az elektronleadó fél reakcióban az elektrondonor anyag oxidálódik, míg az elektron fogadó fél reakcióban az elektron akceptor anyag redukálódik. Példaként álljon itt a ferro (Fe^{2+}) ionok oxidációja molekuláris oxigén jelenlétében. Itt pusztán elektron átvitelt figyelhetünk meg.

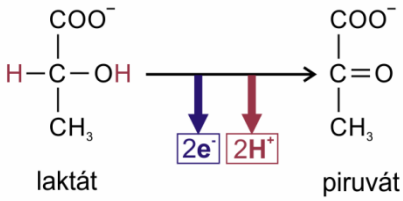
$2\ Fe^{2+} \rightarrow 2\ e^- + 2\ Fe^{3+}$ — elektron donor félreakció

$½\ O + 2\ e \rightarrow O^{2-}$ — elektron akceptor félreakció

$O^{2-} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O$ — víz képződése

$2\ Fe^{2+} + ½\ O_2 \rightarrow 2\ Fe^{3+} + O^{2-}$ — a reakció egyenlet

Másik példaként vegyük szemügyre a tejsav → piroszőlősav átalakulást:



Ebben az esetben a tejsav oxidálódik és piroszőlősavvá alakul, miközben két elektront és két protont veszt. Ez az elektron donor félreakció. Az elektron akceptor félreakcióban pedig a NAD^+ molekula NADH + H^+ molekulává alakul át. Amint az a biológiai rendszerekben gyakori, így jelen esetben is H transzfer történt, mivel az elektronok oldatban nem fordulhatnak elő „önmagukban".

Az egyes anyagok különböznek a tekintetben, hogy inkább elektrondonorként, vagy elektron akceptorként viselkednek-e a redox reakciókban. Az anyagok elektronvesztési, ill. elektron felvételi erélyét redox potenciálnak nevezzük (E) és a referenciának kijelölt hidrogén elektródhoz viszonyítva voltban (V) mérjük:

$$2\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow H_2 \qquad E_0 = 0\ V$$

A redox potenciál értékeket is kifejezhetjük standard körülmények érvényesülésére. Az E_0 értékét 1013,25 hPa nyomáson, 298 K hőmérsékleten és 1 M töménységű reaktánsok jelenlétében kapjuk. Ez a folyamat természetesen pH függő, hiszen a reakcióban protonok vesznek részt. Az E_0' érték a redox potenciál 7-es pH-n mért értéke E_0' = -0.41 V. Vagyis pH egységenként - 0,059 V értékkel változik.

A **6.1. táblázat**ban a mikrobiológiai szempontból fontos standard redox potenciál értékekből kialakuló „redox tornyot" mutatjuk be (E_0' értékek). A redox párok írásmódjánál

azt az elvet követjük, hogy az oxidált formát tüntetjük fel először, majd a „per” jelet követi a redukált alak. Az egyes anyagok a körülményektől függően elektrondonor és elektron akceptor minőségében is felléphetnek. Ugyanakkor a redoxpotenciál értéke arról tájékoztat, hogy minél negatívabb ennek értéke, az illető anyag annál inkább elektrondonor minőségében lép fel; és viszont, minél pozitívabb egy anyag redoxpotenciál értéke, annál hatásosabb elektron akceptor. Másképp megfogalmazva a negatívabb redoxpotenciálú anyag redukálja a pozitívabb redoxpotenciálút, miközben maga oxidálódik.

6.1. táblázat. A bakteriológiai szempontból lényeges standard redoxpotenciál értékek

Redox pár	E_0’ (V)
SO_4^{2-} / HSO_3^-	-0.52
CO_2 / formiát$^-$	-0.43
2 H^+ / H_2	-0.41
$S_2O_3^{2-}$ / HS^- + HSO_3^-	-0.40
Ferredoxin ox / red	-0.39
NAD^+ / NADH + H^+	-0.32
Citokróm c_3 ox / red	-0.29
CO_2 / acetát$^-$	-0.29
S_0 / HS^-	-0.27
CO_2 / CH_4	-0.24
FAD / $FADH_2$	-0.22
SO_4^{2-} / HS^-	-0.217
Acetaldehid / etanol	-0.197
Piruvát$^-$ / laktát$^-$	-0.19
FMN / FMNH	-0.19
Dihidroxiaceton foszfát / glicerinfoszfát	-0.19
HSO_3^- / HS^-	-0.116
Menakinon ox / red	-0.075
APS / AMP + HSO_3^-	-0.060
Rubredoxin ox / red	-0.057
$S_4O_6^{2-}$ / $S_2O_3^{2-}$	+0.024
Fumarát^{2-} / szukcinát^{2-}	+0.033
Citokróm b ox / red	+0.035
Ubikinon ox / red	+0.113
AsO_4^{3-} / AsO_3^{3-}	+0.139
$Fe(OH)_3$ + HCO_3^- / $FeCO_3$ (Fe^{3+} / Fe^{2+}, pH 7) (ugyanez pH 2 esetében 0.77 V)	+0.20
$S_3O_6^{2-}$ / $S_2O_3^{2-}$ + HSO_3^-	+0.225
Citokróm c_1 ox / red	+0.23
NO_2^- / NO	+0.36
Citrokróm a_3 ox / red	+0.385
NO_3^- / NO_2^-	+0.43
SeO_4^{2-} / SeO_3^{2-}	+0.475
Mn^{4+} / Mn^{2+}	+0.798
O_2 / H_2O	+0.82
ClO_3^- / Cl^-	+1.03
NO / N_2O	+1.18
N_2O / N_2	+1.36

Egy redox reakcióban résztvevő párok potenciálkülönbsége (ΔE_0') arányos a reakció Gibbs féle szabadenergia változásával ($\Delta G^{0'}$):

$$\Delta G^{0'} = - nF\ \Delta E_0'$$

ahol n a reakcióban átvitt elektronok száma és F az ún. Faraday féle állandó (értéke 96,48 kJ V^{-1}) és

$$\Delta E_0' = E_0'_{(\text{elektron akceptor})} - E_0'_{(\text{elektron donor})}$$

Megjegyezzük, hogy 1 M (vagyis 6 x 10^{23}) elektron töltése 96480 coulomb (emlékezzünk vissza a fejezet legelején az energia számítására).

Itt is igaz az a megfontolás, amit a Gibbs féle szabadenergia számításánál korábban tettünk! A standard redoxpotenciálok különbsége nem informál arról, hogy egy redox folyamat valós körülmények között végbemegy-e, hiszen a standard feltételek az oxidált és a redukált forma egyaránt 1 M mennyiségét feltételezik. A valóságban pedig ezek koncentrációja lényegesen különbözhet. Gondoljunk csak arra, hogy pl. pH 7 értéken a Fe^{3+} ionok oldhatatlan $Fe(OH)_3$ csapadék formájában kiválnak, vagyis ezen a pH-n a Fe^{3+}/Fe^{2+} rendszerből a Fe^{3+} szinte hiányzik, míg pH 2 értéken akár a Fe^{2+} ionokkal azonos is lehet a koncentrációja (**6.1. táblázat**). Vagyis minden esetben az aktuális koncentrációk (ill. reakció feltételek) figyelembe vétele szükséges a Nernst egyenlet szerint:

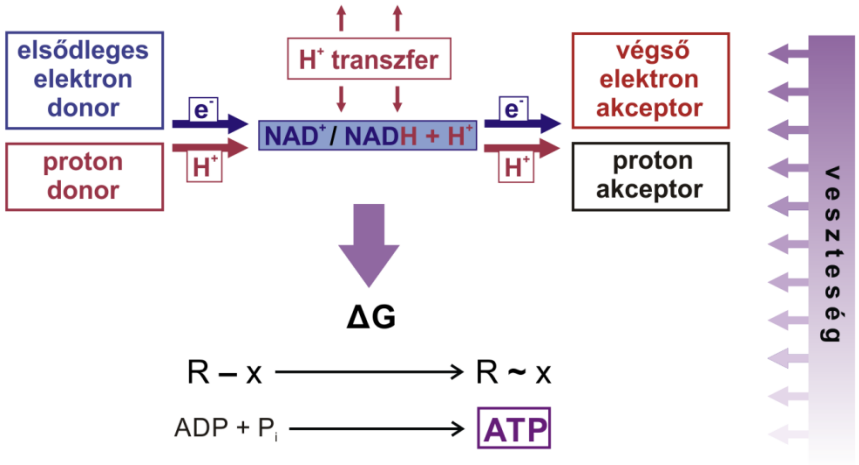
$$E_h = E_0' + \frac{2{,}303RT}{nF} \lg \frac{[\text{elektronakceptor}]}{[\text{elektrondonor}]}$$

ahol E_h az aktuális redoxpotenciál, E_0' a standard redoxpotenciál (pH 7, 298 K és 1013,25 hPa), R az egyetemes gázállandó (8,31 J K^{-1} M^{-1}), T az abszolút hőmérséklet (K), F pedig a Faraday féle szám (96,48 kJ V^{-1}), n az átvitt elektronok / töltések száma. A 2,303 RT/nF értéke 0,059 V, ha n = 1, míg 0,03 V, ha n = 2.

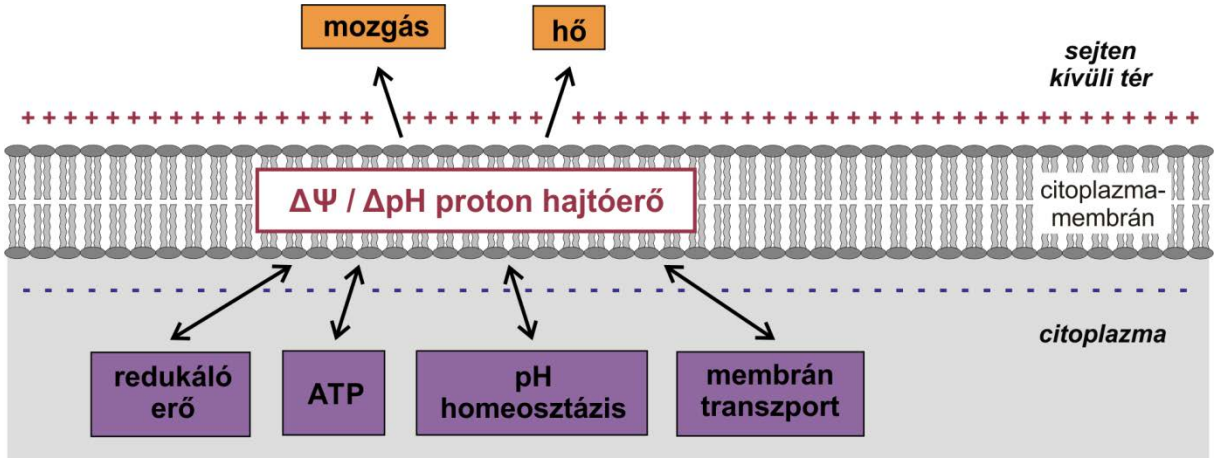
Lényeges észlelnünk azt is, hogy a sejtekben az energiaforrásként szolgáló redox párok (elektrondonor anyag és elektronakceptor anyag) között a kapcsolat leggyakrabban elektron, ill. H (proton és elektron) szállító kismolekulák közreműködésével zajlik (**6.1. ábra**). Ilyen molekulák jellemezően a nikotinsav adenin dinukleotid (NAD^+), illetve a foszfátja, a $NADP^+$. Megjegyezzük, hogy a NAD^+ / NADH + H^+ inkább a katabolikus folyamatokban, míg a $NADP^+$ / NADPH hidrogénszállító jellemzően az anabolikus anyagcserében fordul elő. Természetesen a sejtek elsődleges elektron donor és végső elektron akceptor szükséglete jelentős mennyiségű, ugyanakkor az elektron, ill. hidrogén szállítókra csak „katalitikus mennyiségben" van szükség (és ilyen mennyiségben is találhatók a sejtben), hiszen folyamatosan redukálódva, ill. oxidálódva regenerálódnak.

A sejtek a tápforrásokból kinyert Gibbs féle szabadenergia lehetséges legnagyobb részét kémiai kötések formájában potenciális energiaként elraktározzák. A szabadenergia másik része hő formájában elvész (**6.1. ábra**). A potenciális energia formájában rendelkezésre álló energiát az élő sejtek mindenek előtt is sejtmembránjuk két oldala között kialakított proton hajtóerő (elektrokémiai gradiens) létrehozására fordítják (**6.2. ábra**). A membrán külső (a sejt környezetével érintkező) oldalán protonok (ill. Na^+, K^+ ionok) dúsulnak a belső citoplazmatikus oldalhoz viszonyítva. Ennek révén a membrán két oldala között töltéskülönbség ($\Delta\varphi$ elektromos potenciál különbség), valamint protonkoncentráció különbség (ΔpH, kémiai grádiens) alakul ki. Ennél az élethez feltétlenül szükséges energiatöltésnél tartósabb a szabadenergia rövidtávú raktározására, ill. átvitelére leggyakrabban használt ATP. Itt energiatárolásra a molekulában levő foszfoanhidrid kötés szolgál. Léteznek további ún. nagyenergiájú kötéseket tartalmazó (foszfát) vegyületek. A nagyenergiájú kötések esetében

$\Delta G^{0'}$ > - 25-30 kJ M^{-1}. Ez a szabadenergia érték jelentősen meghaladja az élő rendszerekben általánosan jellemző kovalens kötések kötési energiáját.



6.1. ábra. A baktériumsejtben zajló redox folyamatokból származó szabadenergia nagyenergiájú kötésekben (~), pl. ATP formájában tárolódik. A hidrogéntranszfert katalitikus mennyiségben jelenlevő hidrogénszállítók (pl. NAD^+, NADP, FAD^+) végzik.



6.2. ábra. A baktériumsejtek a redox folyamatokból felszabaduló energiát proton hajtóerő kialakítására fordítják. Ez az elektrokémiai potenciálgrádiens sok különböző életműködést energizál.

A leggyakoribb nagyenergiájú vegyületeket az **6.2. táblázat**ban soroljuk fel. Ezek a nagyenergiájú vegyületek szolgálnak azután a legváltozatosabb munkavégzésre a sejtben (makromolekulák és egyéb sejtalkotók szintézise, mozgás, transzport stb.). Amint láthatjuk az ATP nagyenergiájú kötéseinek hidrolízise mintegy -35 kJ M^{-1} szabadenergia változással jár. Ugyanakkor az ATP szintézisét a sejt aktuális ATP / ADP aránya, valamint az inorganikus foszfát koncentrációja és a pH is befolyásolja. Az aktívan szaporodó *Escherichia coli* sejtben az ATP / ADP arány 7,5-8 közötti érték (8 mM [ATP], 1 mM [ADP], 8 mM [P_i]). Ilyen körülmények között 1 M ATP szintézisének az aktuális energiaigénye -55-60 kJ M^{-1} érték.

A glukóz - ammónium szulfát - foszfát minimál táptalajon szaporodó *Escherichia coli* K-12 törzs mintegy 40 percenként megkettőződik. Az átlagos sejtje 9,5 x 10^{-13} g tömegű, amelyből 70% víz (6,7 x 10^{-13} g). A 2,8 x 10^{-13} g száraz tömegének 55 %-a fehérje, 16,7 %-a rRNS, 3 %-a tRNS, 0,8 %-a mRNS, 3,1 %-a DNS, 9,1 %-a lipid, 5,4 %-a lipopoliszacharid, 2,5 %-a peptidoglikán, míg 4,4 %-át építőkövek és szervetlen ionok teszik ki. Továbbra is a

6.2. táblázat. Nagyenergiájú kötések biológiai rendszerekben

Vegyület	Nagyenergiájú kötés típus	$\Delta G^{0'}$ kJ M^{-1}
foszfoenol-piruvát	enol foszfát	-51,6
1,3-biszfoszfo-glicerát	acil foszfát	-51,9
ATP $\rightarrow$ AMP + PP_i	foszfoanhidrid	-45,6
ATP $\rightarrow$ ADP + P_i	foszfoanhidrid	-31,8
ADP $\rightarrow$ AMP + P_i	foszfoanhidrid	-31,8
acetil-CoA	tioészter	-35,7
acetil-foszfát	anhidrid	-44,8
propionil-CoA	tioészter	-35,6
butiril-CoA	tioészter	-35,6
kaproil-CoA	tioészter	-35,6
szukcinil-CoA	tioészter	-35,1
butiril-foszfát	anhidrid	-44,8
karbamil-foszfát	anhidrid	-39,3
APS (adenozin-foszfoszulfát)	anhidrid	-88,0

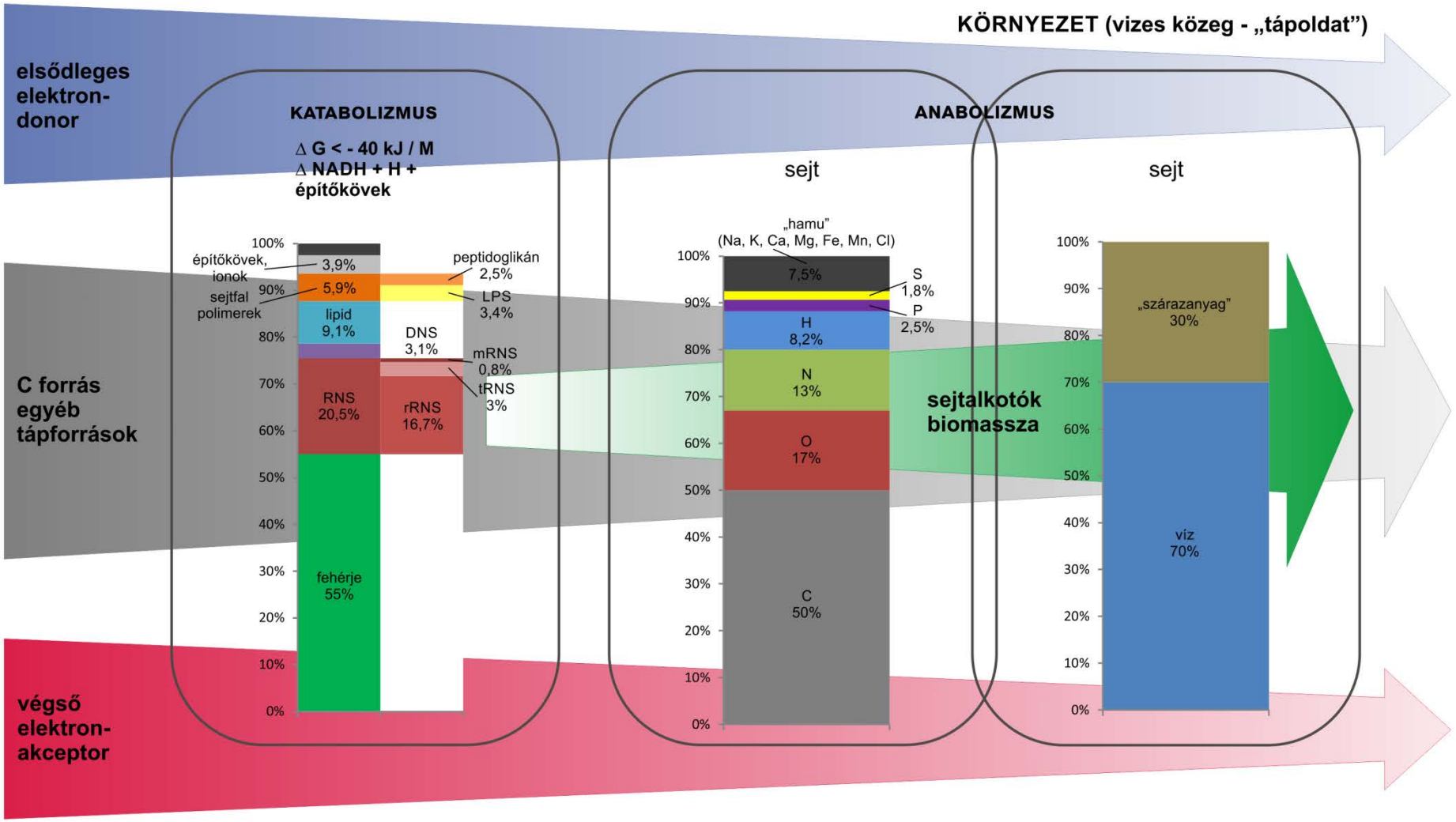
számoknál maradva, de már az egyes alkatrészek „darabszámát" felsorolva megállapíthatjuk, hogy az aktívan szaporodó sejtben átlagosan 2 kromoszomális DNS példányt mutathatunk ki, 18-20 000 riboszóma működik és 1-2 000 különböző fehérje összesen mintegy 2 milliónyi molekulája végzi az anyagcsere folyamatokat. Ennek a hihetetlenül komplex gépezetnek a működtetése másodpercenként 2 milliónál is több ATP molekula energiáját igényli… Bár az egyes mikrobafajok szaporodási sebessége különböző és nyilvánvalóan vannak az *E. coli*nál egyszerűbb és sokszorosan összetettebb felépítésű sejtek, ezt az átlagos nagyenergiájú kötésmennyiséget elő kell állítani.

Habár az ATP a sejtek rövid távon, dinamikusan használható nagyenergiájú vegyülete (az ATP „metastabil" vegyület, enzimek nélkül lassan hidrolizál), a sejtek hosszabb távra energiaraktározó polimereket képeznek. Ezek később ATP képzése mellett „energiatermelésre" használhatók. A különböző anyagcseréjű prokarióták esetében ilyen szerepet tölt be a glikogén, a poli-hidroxialkanoátok (elsősorban a poli-β-hidroxivajsav), a polifoszfátok, az elemi kén.

6.2. A baktériumok energiatermelésének alapjai

A prokarióták világában a morfológiai változatosság - az eukariótákhoz viszonyítva - relatíve csekély. Végletekig egyszerű a sejtes élethez szükséges *alap*anyagcsere. Az önálló sejtes élet fenntartásához mintegy 450 gén elegendő. A leglényegesebb funkciók aránya a génekben: replikáció 7%; transzkripció 3%; transzláció 22%; transzport 7%; szabályozás 6%; szerkezet fenntartás-építés 4%; **„anyagcsere" 15%**; egyéb ismert 15%; nem ismert funkciók 21%. A ma már ezres nagyságrendben rendelkezésre álló teljes genomok összehasonlító elemzése alapján a prokarióták energetikai anyagcseréjének génjei a genom legalább harmadát teszik ki. A baktériumok világában a változatosság „forrása" az anyagcsere, és abban is elsősorban az energiatermelés terén kialakult diverzitás bámulatos.

Az élőlények anyagcsere (metabolizmus) hálózatát felépítő reakciók elvileg mindkét irányban végbemehetnek. Mégis termodinamikai, vagy egyéb (pl. szabályozási) okokból a reakciók egy része jellemzően csak az egyik irányba folyik. Az anyagcsere hálózatban két fő irányt lehet felfedezni. A lebontó anyagcsereirány (katabolizmus) feladata mindenekelőtt is az életműködések fenntartásához szükséges energia biztosítása, ill. „energia-töltés" (leegyszerűsítve ATP/ADP arány) fenntartása. E mellett ezek a folyamatok biztosítják a sejtek redukáló erejének (leegyszerűsítve $NADH+H^+/NAD^+$ arány) kialakulását. E kettő nem mindig



6.3. ábra. A katabolizmus folyamatai energiát, redukáló erőt és építőköveket biztosítanak a sejt felépítő folyamatainak. Az anabolizmus feladata a fennmaradás, növekedés, szaporodás végső soron a biomassza előállítása.

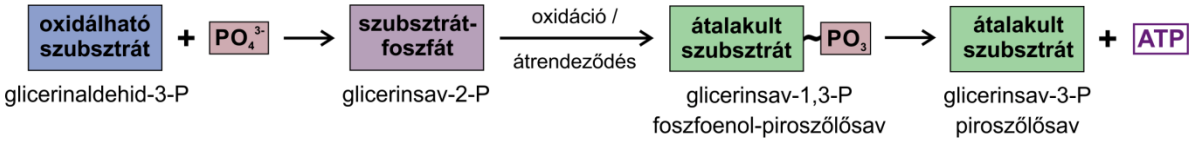
egyszerűen „átváltható”, egymásba alakítható. A lebontó anyagcsere feladata, ill. gyakran egyúttal eredménye a sejtanyagok felépítéshez szükséges építő kövek kialakítása, legyenek azok szerves, vagy szervetlen molekulák, ionok (**6.3. ábra**).

A másik jellemző anyagcsere irány a testanyagok felépítése (anabolizmus). Ezek a folyamatok általában energia „befektetést” igényelnek (endergonikus reakciók), ill. komplex és gyakran redukáltabb molekulák kialakításával járnak, vagyis a redukáló erő meglétét is feltételezik, a redukált elektron, ill. hidrogénszállítók mennyiségét csökkentik. Ezzel együtt természetesen vagy a sejtekben rendelkezésre álló, vagy a környezetből felvett építőköveket felhasználják (**6.3. ábra**).

Az élővilág számára az energiának két forrása áll rendelkezésre. A **kemotróf** élőlények a környezetükben rendelkezésre álló szerves, vagy szervetlen anyagokból nyerik az ATP formájában konzerválható „szabadenergiát”. A **fototróf** szervezetek a fényenergiát képesek az ATP kémiai kötéseiben levő energiává konvertálni. Bárhány változata is létezik a kemo-, ill. fototróf katabolikus anyagcsere utaknak a nagyenergiájú foszfát kötések kialakítására (foszforiláció) az élővilágban két mechanizmus ismeretes. Az egyik, a feltehetően ősibb rendszer, a *szubsztrát szintű foszforiláció*. A másik esetben az ATP szintézise, a *foszforiláció proton hajtóerő segítségével*, annak rovására történik. A proton hajtóerő létrejötte szerint megkülönböztetjük az *elektrontranszport*hoz kapcsolható rendszereket, ill. a *membrán iontranszport* folyamatokhoz csatolt utakat.

A szubsztrát szintű foszforiláció folyamata meglehetősen egyszerű. Ez esetben az ATP közvetlenül a szubsztrát katabolizmusa során kialakuló nagyenergiájú köztitermékekből szintetizálódik. E molekulákat a **6.2. táblázat**ban soroltuk fel (a teljesség igénye nélkül). Példaképpen a mindenki által ismert Embden-Meyerhof-Parnas anyagcsereútban („glikolízis”) előforduló két szubsztrát szintű foszforilációval járó lépést hozzuk fel (**6.4. ábra**):

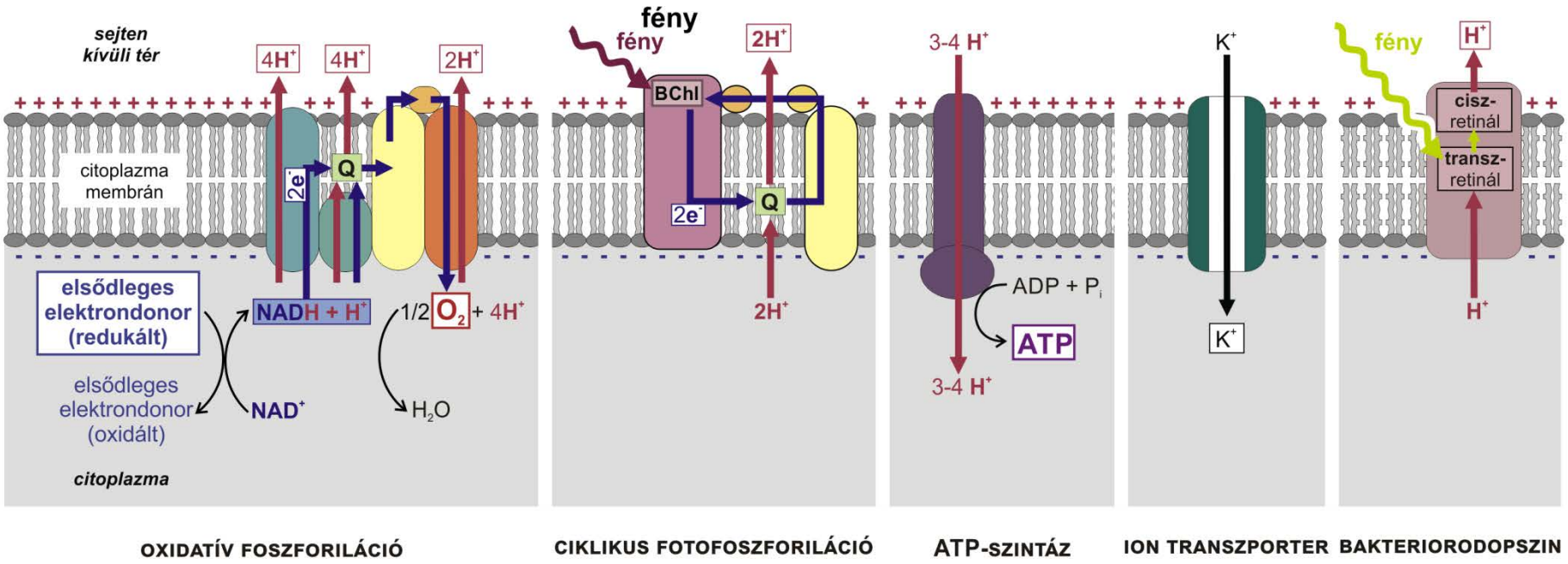
- a glicerinaldehid-3-P oxidációja glicerinsav 1,3-biszfoszfáttá, majd ebből ATP képzése, ill.;
- a glicerinsav-2-P átalakítása foszfoenolpiruváttá, majd ebből ATP szintézise.



6.4. ábra. Szubsztrát szintű foszforilációs lépések a glikolízis során.

Az élővilág legnagyobb részében a proton hajtóerő kialakulása elektrontranszporthoz kötött (**6.5. ábra**). Ezt az elektrontranszport folyamatot az oxidatív foszforiláció esetében elsődleges elektron donorok és végső elektron akceptorok közötti redox potenciál különbség hajtja. A fotofoszforiláció folyamatában az elektrontranszport a fény segítségével gerjesztett klorofill molekulák elektronleadásával indul, majd az elektronok az elektrontranszportláncon áthaladva oda is térnek vissza. Amennyiben ez a folyamat ciklikus, fotofoszforilációról beszélünk. A membrán iontranszport folyamatokhoz köthető proton hajtóerő képzés csak az élővilág néhány kisebb prokarióta csoportjában alakult ki. Ez esetben is két mechanizmust lehet megkülönböztetni. Egyes obligát anaerob baktériumok (leggyakrabban) szukcinát, ill. oxalát oxidálásához kötve hoznak létre *proton antiport* / *szimport* hajtóerőt. Ennél jobban ismert a *fény hajtotta protonpumpa*, a bakteriorodopszin segítségével kialakuló proton hajtóerő (**6.5. ábra**).

A proton hajtóerő kialakulását részletesebben az oxidatív foszforiláció példáján mutatjuk be a Mitchell féle kemiozmotikus modell (1961) nyomán. A modell a mitokondrium energiatermelésének a magyarázatára szolgált. Mi a mitokondrium legközelebbi filogenetikai



6.5. ábra. Proton hajtóerő kialakulása baktériumokban elektrontranszport, ill. protontranszport folyamatok során.

ősének a *Paracoccus denitrificans* baktériumnak az aerob anyagcseréjét vesszük például (**6.6. ábra**). Az ábrán látható, hogy a citoplazmatikus oldalon H szállítók oxidálóknak. A leadott elektronok és protonok útja azonban kettéválik. Amíg az elektronok az elektrontranszport láncban a végső elektron akceptor (jelen esetben molekuláris oxigén) felé haladnak egy folyamatosan növekvő redox potenciál mentén, a protonok a membrán külső oldalára kerülnek. Az elektronszállítók a redox potenciáljuknak megfelelő sorrendben következnek egymás után az elektrontranszportláncban. Az is feltűnő, hogy az elektronszállítók elhelyezkedése nem szimmetrikus, és míg egyesek protonokat és elektronokat egyaránt szállítanak (pl. FMN - flavin mononukleotid), mások csak az elektronokat tudják tovább adni (pl. Fe-S fehérjék, citokrómok) és a protonok a membrán külső oldalára kerülnek. Kiemelést érdemelnek a kinonok, amelyek a membránban „mozognak". Redukciójukkor elektronokat az elektrontranszport láncból nyernek, míg protonokat a citoplazmából vesznek el. Ekkor átfordulnak a membrán külső oldalára. Amikor elektronjaikat az elektrontranszport láncban továbbadják, protonjaikat a periplazmatikus oldalon adják le. A protonok egy része az elektron szállítókról származik ($NADH+H^+$), míg más protonok a víz disszociációja során „szabadultak" fel és kerülnek transzportra.

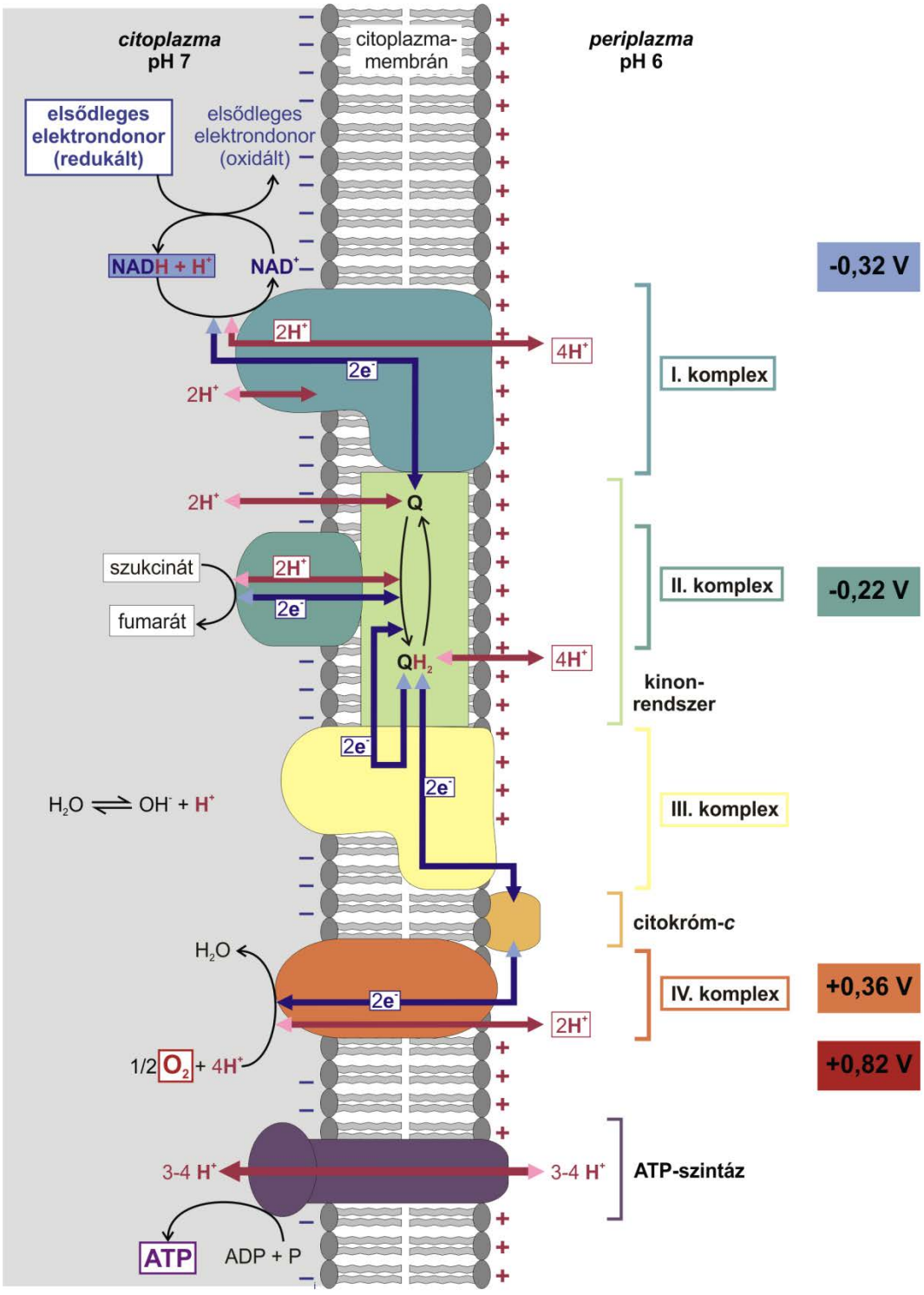
A citoplazma membrán a protonok, ill. hidroxil ionok számára (töltött „részecskék") egyebekben „átjárhatatlan". Emiatt az elektron transzport folyamata pH gradienst (ΔpH) alakit ki: a citoplazma membrán külső oldalán a pH (erőteljesen) lecsökken a citoplazma közel semleges pH értékéhez viszonyítva. A pH gradiens egyidejűleg töltésmegoszlást is jelent a membrán két oldalán ($\Delta\psi$; a külső oldalon pozitív, míg a belső oldalon negatív töltéstöbblet alakul ki). Vagyis az elektrontranszport hatására *elektrokémiai potenciálgrádiens*, más néven *proton hajtóerő* jön létre. Hasonlíthatjuk ezt egyfajta akkumulátorhoz is, ahol az elsődleges elektron donor és a végső elektron akceptor közötti redoxpotenciál különbséggel (ΔE) alakítjuk ki a proton hajtóerővel feltöltött állapotot. Az elektrontranszport révén létrejött potenciális energia az ATP szintáz enzimek segítségével nagyenergiájú kötésekbe konvertálható. Megjegyezzük, hogy a proton hajtóerő közvetlenül felhasználható a baktériumsejtek (csilló)mozgására, membrántranszportjának energizálására, a citoplazmatikus pH homeosztázis fenntartására stb. Fontos tudnunk azt is, hogy az ATP szintáz enzimrendszer működése reverzibilis, vagyis ATP energiája befektetésével protonok lökhetők ki a membrán külső oldalára, proton hajtóerő hozható létre (**6.2. ábra**).

6.3. Az energiatermelő anyagcsere változatai és a redukáló erő forrásai

Megállapítottuk, hogy egy sejtnek a felépítő anyagcseréje ellátásához két feltételnek kell megfelelnie: energiát (ATP) kell előállítani és e mellett fenn kell tartania a sejt redox egyensúlyát ($NAD^+/NADH+H^+$), redukáló erőt kell termelni.

Az energiakonzerválást illetően a kemotróf szervezetek *erjesztők (fermentálók),* vagy *légzők (respirálók)* lehetnek (**6.7. ábra**). A fermentáció anaerob (vagyis az oxigéntől független) katabolikus anyagcsere, ahol szerves anyag mind az elektron donor, mind pedig az elektron akceptor és az elektron donor szubsztrát egyúttal a redukáló erő forrása is: *kemoorganotróf anyagcsere*. Megjegyezzük, hogy a fermentációs energiatermelő folyamatok elektron akceptora jellemzően az elektron donor szubsztrát egy „bomlásterméke" és az ATP pedig szubsztrát szintű foszforiláció segítségével termelődik. Az így előállított ATP-ből a sejtek az ATP szintázt ATP-áz irányban használva képesek proton hajtóerőt generálni, ami membrántranszportjuk, a csillómozgás stb. energizálását teszi lehetővé (**6.2. ábra**).

Néhány fermentáló baktérium esetében a szubsztrátok redox reakciója során felszabaduló szabadenergia nem elegendő nagyenergiájú kötések kialakítására (vagyis $\Delta G > -25\text{-}30\ kJM^{-1}$). Ilyen pl. a szukcinát fermentációja propionáttá:



6.6. ábra. A *Paracoccus denitrificans* baktérium proton hajtóerő előállítása aerob anyagcseréje során. A membrán két oldalán a + és - töltések a hidrogén ionok, ill. hidroxil ionok jelzésére szolgálnak. Az elsődleges elektron/hidrogén donorról szállító molekulák ($NADH+H^+$) juttatják a membránba az elektronokat és protonokat. Az elektronok a membránban elhelyezkedő elektronszállítókon keresztül (elektrontranszportlánc) a végső elektron akceptorra (O_2) jutnak. Az elektrontranszport során protonok kerülnek a membrán külső, periplazmatikus oldalára. Így alakul ki a proton hajtóerő (elektrokémiai potenciál gradiens), amely ATP szintézisére fordítható. (A fordított elektrontranszport lehetséges folyamatát halvány nyílhegyekkel jelezzük.)

$$szukcinát^{2-} + H_2O \rightarrow propionát^{-} + HCO_3^{-} \quad \Delta G^{0'} = -20{,}5\ kJM^{-1}$$

Ilyen esetekben a szubsztrátok membrán transzportja („donor be"; „akceptor ki") ionpumpák (Na^+, H^+) működéséhez kötött és ennek segítségével proton hajtóerő alakul ki, ami azután az ATP szintáz segítségével nagy energiájú foszfátkötést (ATP) hoz létre (**6.5. ábra**). Szélsőséges esetben elegendő, ha a szubsztrátok között kialakuló redox reakció eredményeképpen csak egyetlen töltött részecskényi (Na^+, H^+) proton hajtóerő jön létre. Aktuális szabadenergiában kalkulálva ez $\Delta G = -12\ kJM^{-1}$ energiát jelent, vagyis ez standard szabadenergiában számolva akár enyhén ≥ 0 értékű is lehet. Megjegyezzük, hogy az ősi típusú ATP szintáz enzimek nem pusztán protonokat, hanem nátrium ionokat (Na^+) is elfogadnak (sőt ritkán K^+ ionokat is). Néhány a baktériumok filogenetikai fájában „mélyen" leágazó csoport tagjaiban jellemzően Na^+ ion hajtja az ATP szintázt.

A légzők ATP szintézise az elektrontranszport foszforilációhoz kötött. Az elektron donorok függvényében lehetnek organotrófok, vagy litotrófok. A kemoorganotróf légző szervezetek elsődleges elektron donorjai szerves anyagok, amelyek egyúttal a redukáló erő kialakítását is szolgálják, vagyis protonok is nyerhetők belőlük (H donorok). A végső elektron akceptor függvényében megkülönböztetjük az *aerob légzők*et, valamint az *anaerob légzők*et. Ez utóbbi esetben az elektron akceptorok redukálható szervetlen anyagok, mint pl. a NO^{3-}, SO_4^{2-}, Fe^{3+}, vagy a CO_2. Az oxidációs számok ismeretében nyilvánvaló, hogy pl. a NO_3^- ion esetében a végső elektron akceptor a N atom lesz stb. (**6.7. ábra**).

A kemoorganotróf légző mikrobák különleges csoportját alkotják a C-C kötést nem tartalmazó szerves vegyületeket elsődleges elektron donorként hasznosító *metilotróf*ok élettani csoportja.

A *kemolitotróf légzők* elektron donorjai szervetlen anyagok (mint pl. NH_3, S^{2-}, Fe^{2+}, H_2), amelyeket vagy aerob módon, O_2 végső elektron akceptorral hasznosítanak, vagy anaerob katabolikus anyagcserében az előbb már említett „alternatív" végső elektron akceptorok valamelyikével. A kemolitotróf mikrobák elsődleges elektron donor szubsztrátjai gyakorta nem proton donorok egyúttal (pl. S_0 - elemi kén), vagyis esetükben a redukáló erő ($NADH+H^+$) fenntartása közvetlenül nem lehetséges. A kemolitotróf mikrobák az anabolizmusukhoz szükséges redukáló erőt jellemzően ún. *fordított elektron transzport* segítségével alakítják ki. Ez esetben végül is ATP energiája rovására jön létre a $NADH+H^+$. A fordított elektron transzport magyarázza, hogy pl. egy NO_2^- oxidáló nitrifikáló baktérium légzési elektron transzport lánca miért tartalmaz NADH-dehidrogenázt, pedig az NO_3^-/NO_2^- redox pár a citokróm-a szintjén csatlakozik az elektron transzport lánchoz (**6.6. ábra**).

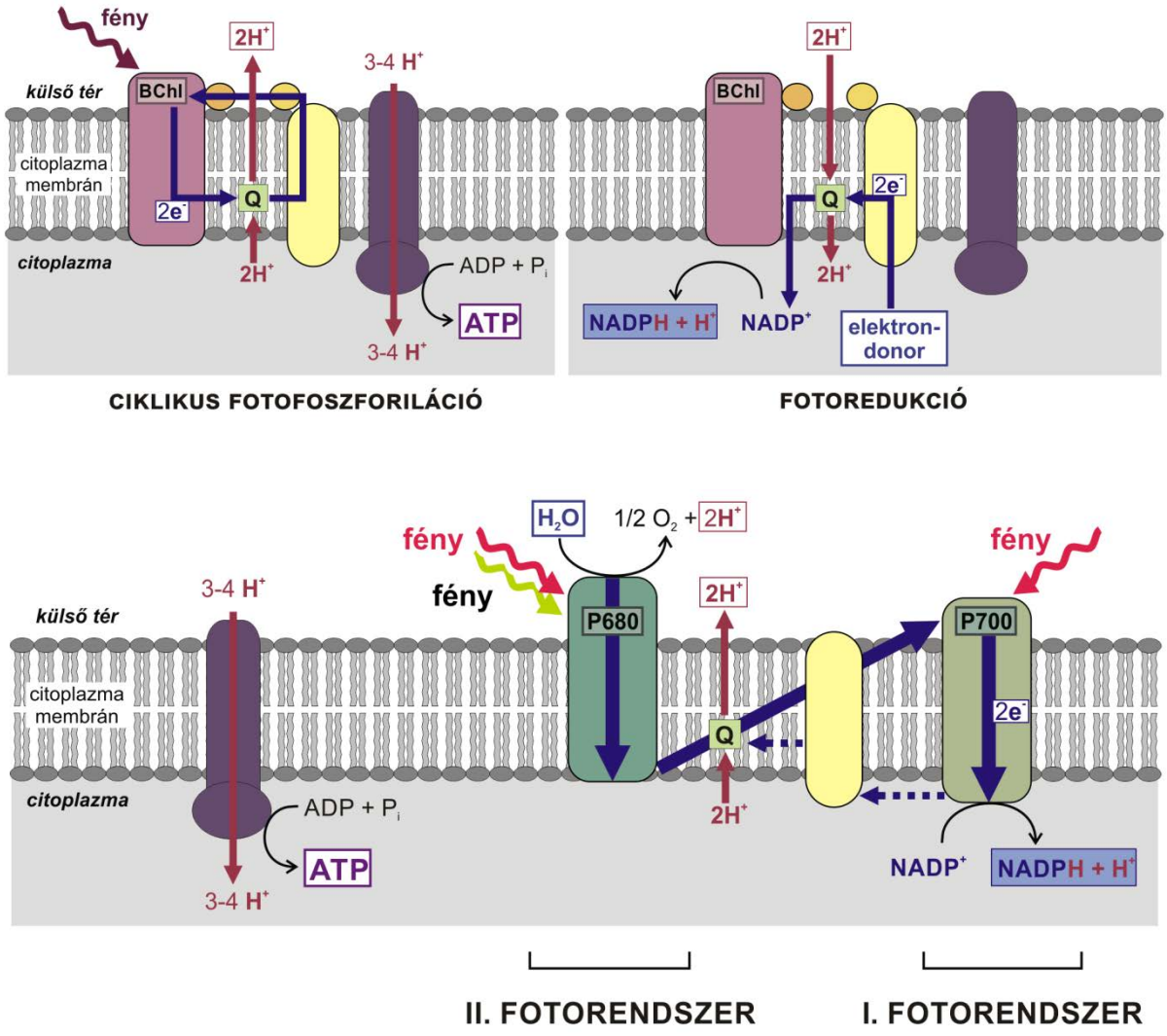
A légzést lehetővé tevő légzési elektrontranszport lánc, ill. oxidatív foszforiláció esetében is meg kell állapítsuk, hogy minden olyan elektron donor/elektron akceptor redox pár felhasználható energiatermésre, amelyek légzési láncba csatolásával „legalább egy protonnyi" proton hajtóerő jön létre (aktuális szabadenergiában számolva $\Delta G \leq -12\ kJM^{-1}$). Ki kell emelnünk az anaerob légző baktériumok sorából az ún. halorespirálókat. Ezek végső elektron akceptora valamely halogénezett szerves vegyület, pl. tetraklór-etén. Felhívjuk a figyelmet a szén-halogén kötés „különlegességére". A klór elektronegativitása (3,0) nagyobb, mint a széné (2,5), vagyis nem a szerves molekula szene, hanem a klór lesz az amelyik redukálódik (a tetraklór-eténben az egyik klór lesz az elektron akceptor!).

A fototrófok túlnyomó része ATP-t a fotofoszforiláció folyamatában, fény hajtotta elektrontranszport eredményeképpen állít elő (**6.8. ábra**). Két nagy csoportjukat megkülönböztethetjük a fotorendszerek száma alapján (egy-, ill. két fotorendszeres mikrobák), de megkülönböztethetjük a redukáló erő (redukált koenzimek) forrása alapján is. Az egy fotorendszeres mikrobák a redukáló erő előállítására (fotoredukció) elektron donorként különböző szervetlen anyagokat használnak (H_2, S^{2-}, S_0, akár NH_3), míg a két fotorendszerrel rendelkezők elektron donorja a víz (a víz fotolízise szolgáltat elektronokat).

			VÉGSŐ ELEKTRONAKCEPTOROK		
			SZERVETLEN		SZERVES
			O_2 (AEROB LÉGZŐK)	NO_3^-, NO_2^-, SO_4^{2-}, S^0, Fe^{3+}, CO_2 (ANAEROB LÉGZŐK)	
ELSŐDLEGES ELEKTRONDONOROK	SZERVES (ORGANOTRÓFOK)	C – C kötés van 1C hasznosító	KEMOORGANOTRÓF AEROB LÉGZŐK METILOTRÓFIA METANOTRÓFIA	KEMOORGANOTRÓF ANAEROB LÉGZŐK NITRÁTLÉGZÉS SZULFÁTLÉGZÉS VASLÉGZÉS CO_2 LÉGZŐK (METANOGÉNEK)	FERMENTÁCIÓ TEJSAVAS ERJEDÉS IONPUMPÁVAL FERMENTÁLÓK SZERVES ANYAGGAL LÉGZŐK (FUMARÁT LÉGZÉS)
	SZERVETLEN (LITOTRÓFOK)	NH_3 NO_2^- S^{2-} S^0 Fe^{2+} H_2	KEMOLITOTRÓF AEROB LÉGZŐK NITRIFIKÁLÓK KÉNBAKTÉRIUMOK VASBAKTÉRIUMOK „DURRANÓGÁZ” BAKTÉRIUMOK = AEROB HIDROGÉNOXIDÁLÓK	KEMOLITOTRÓF ANAEROB LÉGZŐK NITRÁTLÉGZŐ KÉNBAKTÉRIUMOK VASLÉGZŐ KÉNBAKTÉRIUMOK ANAEROB HIDROGÉNOXIDÁLÓK [CO_2 LÉGZŐK (METANOGÉNEK)]	HALORESPIRÁCIÓ TETRAKLÓR-ETÉNNEL LÉGZŐK

6.7. ábra. A kemotróf anyagcsere változatai**.** Az egyes csoportok háttérszíne az energia-előállítás típusára utal: szürke - oxidatív foszforiláció, világoszöld – szubsztrát szintű foszforiláció, sötétebb zöld - ionpumpával fermentálók. A piros és kék betűk az autotróf és heterotróf csoportokat jelölik.

Ennek következménye oxigén felszabadításuk (oxigéntermelő fotoszintézis). Megjegyezzük, hogy az egy fotorendszeres baktériumok egy csoportja fotoredukciója során szerves elektron donorokat is elfogadhat. Az egy fotorendszerrel rendelkező mikrobák élettani csoportjainak hagyományos elnevezését a legelső fajaik tenyészeteinek színe (zöld és bíbor baktériumok), ill. kénfelhalmozó tulajdonságuk (kén és nemkén baktériumok) adta (**6.9. ábra**).



6.8. ábra. Az egy és két fotorendszeres baktériumok fotofoszforilációja és fotoredukciója.

A fototróf mikrobák másik csoportja proton hajtóerőt fény hajtotta proton pumpával állít elő a bakteriorodopszin pigment segítségével. A fény hajtotta protonpumpa azonban csak bizonyos kemoorganotróf alap anyagcseréjű szervezetek esetében található meg és „pusztán” többlet ATP előállítását szolgálja. Ez az anyagcsere sok fotikus vízi környezetben előnyt jelent a szaporodásnál.

Vagyis a fototrófok esetében redukáló erő kialakítása igényli a külső elektron donorokat, hiszen ilyen esetben az elektronokat – ahelyett, hogy a reakciócentrumba térnének vissza – a NAD, NADP, stb. molekulák redukálására fordítja az anyagcsere. Ezt az elektront pótolja a szervezet kénről, S^{2-} ionról, H-ről stb., vagy az aeroboknál vízből (**6.8. ábra**). A heliobaktériumok esetében hasonló az anyagcsere, mint a fény hajtotta protonpumpával rendelkezőknél. Alapanyagcseréjük kemoorganotróf, de ciklikus fotofoszforilációban fény segítségével többlet ATP-t állíthatnak elő. A nyílt tengerekben ez nagyon lényeges, hiszen az

elsődleges elektron és proton donor szerves anyagok mennyisége ezen az élőhelyen általában nagyon csekély.

6.4. A felépítő anyagcsere szénforrása

Az élőlények szárazanyagának zöme (>96%) szerves anyag. A szerves anyagok felépítésének kulcsa a szén-szén kötések kialakításának képessége. Az *autotróf élőlények* szervetlen C forrásokból (CO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-}) képesek szerves anyagaikat felépíteni, a szén - szén kötéseket létrehozni. A baktériumok között az autotróf széndioxid fixációs anyagcsere utaknak több típusa jött létre. A *heterotróf mikrobák* testanyagaik felépítéséhez szerves vegyületekre utaltak, vagyis olyan szerves anyagokra, amelyekben van szén - szén kötés. A kemo- és fototrófok anyagcseretípusait bemutató **6.7.** és **6.9. ábrák**on színkóddal jelöltük az autotróf és heterotróf élettani csoportokat. Rögtön kiemeljük az 1 C vegyület hasznosítókat, amelyeket energetikai anyagcseréjük alapján összefoglalóan metilotrófoknak nevezünk. (Kiemelt globális fontosságú csoportjuk a metanotrófok, a metánt elsődleges elektron donorként hasznosító metilotrófok.) Szubsztrátjaik (elektron donorjaik) ugyanis hiába szerves anyagok (metán, metanol, metilamin, metántiol stb.), nem tartalmaznak szén - szén kötést. Emiatt e szervezetek autotróf széndioxid fixációra kényszerülnek anabolikus anyagcseréjük ellátására. Az átlagos kemoorganotróf szervezetek esetében (szubsztrátjaik tartalmaznak szén - szén kötéseket) az anabolizmus heterotrófiára épül. Logikus módon a kemolitotróf szervezetek autotrófiára kényszerülnek.

A fototrófok csoportjaiban az autotrófia, ill. heterotrófia a szerint válik el, hogy a mikroba rendelkezik-e fotoredukcióval. Az a mikroba, amelyik fény segítségével, fény hajtotta elektrontranszport láncában ki tud alakítani redukált koenzimeket, autotróf lesz, rendelkezik az autotróf széndioxid fixációs anyagcsere utak valamelyikével. Amelyek erre nem képesek, heterotrófok lesznek. E ponton tehát értelmezhetővé válik a fotoszintetizáló/kemoszintetizáló (fotoszintézis/kemoszintézis) nagyon gyakran használt fogalma. Vagyis egy fotoszintetizáló fotoautotróf, ahogyan egy kemoszintetizáló kemoautotróf szervezet a redukáló erő forrásától függetlenül. Mégis az „igazi" fotoszintetizálók/kemoszintetizálók egyben litotrófok is.

Autotróf szén-dioxid fixáció során az oxidált állapotú szén a baktériumsejtekben különféle mechanizmusok révén redukálódik, majd a sejt szerves anyagaként asszimilálódik. A közismert Calvin ciklus az eukarióta szervezetek körében szinte egyedüliként terjedt el. A baktériumok világa azonban megmutatja számunkra, hogy a szerves kötések kialakításának e létfontosságú anyagcseréje az evolúció során többször is kialakult, más és más mechanizmusokkal jelent meg (**6.3. táblázat**).

A hidroxi-propionát úton 2 molekula szén-dioxid fixációja megy végbe, amelyből végül a sejt szerves anyagainak kiinduló vegyületeként glioxalát keletkezik. A hidroxi-propionát út feltehetően az egyik legősibb, ha nem a legősibb szén-dioxid fixációs mechanizmus, amit az is bizonyít, hogy nemcsak az evolúciós fejlődést tekintve legősibb anoxikus fotoszintetizáló baktériumokra, hanem a prokarióták filogenetikai törzsfáján ugyancsak korai leágazást képviselő *Metallosphaera*, *Acidianus* és *Sulfolobus* (Archaea) nemzetségekre is ez jellemző.

A reduktív citrát-ciklus során 3 molekula szén-dioxid fixációja 1 molekula glicerinaldehid-3-foszfát képződését eredményezi. A reduktív citrát-ciklus legtöbb lépésében többnyire ugyanazok az enzimek vesznek részt, mint amelyek a normál citrát-ciklusban.

A természetben a Calvin-ciklus a legszélesebb körben elterjedt autotróf szén-dioxid fixációs mechanizmus. A folyamatot Melvin Calvin (1911-1997) amerikai vegyészről nevezték el, akinek ezt a munkatársaival (A. Bensonnal és J. Basshammal) együtt végzett

A FOTOFOSZFORILÁCIÓ MECHANIZMUSA	A REDUKÁLÓ ERŐ FORRÁSA
FÉNY HAJTOTTA ELEKTRONTRANSZPORTLÁNC FOTOFOSZFORILÁCIÓ **EGY FOTORENDSZER** ZÖLD KÉNBAKTÉRIUMOK BÍBOR KÉNBAKTÉRIUMOK BÍBOR NEMKÉN BAKTÉRIUMOK HELIOBAKTÉRIUMOK **KÉT FOTORENDSZER** CIANOBAKTÉRIUMOK / KLOROPLASZTISZ	**FOTOREDUKCIÓ** **ANOXIKUS FOTOSZINTÉZIS** H_2, S^{2-}, S^0, SO_3^{2-}, H_2, S^{2-}, S^0, SO_3^{2-}, NH_3 H_2, S^{2-}, SO_3^{2-}, szerves anyag KEMOORGANOTRÓF ALAPANYAGCSERE **OXIGÉNTERMELŐ FOTOSZINTÉZIS** H_2O – FOTOLÍZIS
FÉNY HAJTOTTA PROTONPUMPA HALOBAKTÉRIUMOK PROTEORODOPSZINOS EUBAKTÉRIUMOK	KEMOORGANOTRÓF ALAPANYAGCSERE

6.9. ábra. A fototróf anyagcsere változatai**.** A színek jelentése: szürke - ATP előállítás fotofoszforilációval, zöld - ATP előállítása fény hajtotta protonpumpa segítségével, piros - autotróf szervezetek, kék - heterotróf szervezetek.

6.3. táblázat. A főbb bakteriális autotróf széndioxid fixációs útvonalak.

Elnevezés	Összegző egyenlet	Kulcsenzimek	Jellemző baktériumcsoport
hidroxi-propionát anyagcsereút	$2\ CO_2 + 2\ NADPH+H^+ + 3\ ATP \rightarrow C_2H_2O_3 + H_2O$	acetil-KoA-karboxiláz, propionil-KoA-karboxiláz	Zöld nem-kén baktériumok (pl. *Chloroflexus*), *Metallosphaera*, *Acidianus*, *Sulfolobus* stb.
reduktív citrát-ciklus	$3\ CO_2 + 12\ H + 5\ ATP \rightarrow C_3H_6O_3PO_3^{2-} + 3\ H_2O$	α-ketoglutorát-ferredoxin-oxidoreduktáz, izocitrát dehidrogenáz, piruvát-ferredoxin-oxidoreduktáz	Zöld kénbaktériumok (pl. *Chlorobium*), *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Aquifex*, *Thiomicrospira*
Calvin ciklus (reduktív pentóz-foszfát út)	$6\ CO_2 + 12\ NADPH+H^+ + 18\ ATP \rightarrow C_6H_{12}O_6(PO_3H_2) + 12\ NADP^+ + 18\ ADP + 17\ P_i$	ribulóz-1-5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz, foszforibulokináz	Cianobaktériumok, a legtöbb litotróf (nitrifikálók, bíbor kénbaktériumok stb.)
acetil-KoA (Wood-Ljungdahl) anyagcsereút	$4\ H_2 + H^+ + 2\ HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + 4\ H_2O$	szén-monoxid-dehidrogenáz (acetilkoenzim A-szintáz)	Metanogének
szerin anyagcsereút	$HCHO + CO_2 + 2\ NADH+H^+ + 3\ ATP \rightarrow CH_3COO^- + NADP + H_2O$	foszfo-enolpiruvát-karboxiláz	Egyes metilotrófok
ribulóz-monofoszfát anyagcsereút	$3HCHO + NADPH+H^+ + ATP \rightarrow C_3H_6O_3PO_3^{2-} + NADP$	hexulóz-foszfát-szintetáz	Egyes metilotrófok

kutatását 1961-ben kémiai Nobel-díjjal ismerték el. A prokarióták közül Calvin-ciklus (más néven reduktív pentóz-foszfát-ciklus) segítségével a bíbor baktériumok, a cianobaktériumok,az aerob kemolitotróf baktériumok és egyes ősbaktériumok képesek a szén-dioxid megkötésére. A Calvin-ciklus működéséhez a szén-dioxidon kívül redukáló erőre ($NADPH+H^+$), energiára (ATP) és számos enzimre van szükség, melyek közül a RuBisCO és a foszforibulokináz a folyamat kulcsenzimei. A Calvin-ciklust általában 6 molekula szén-dioxidnak a megkötésével és 1 molekula fruktóz-6-foszfátnak a képződésével összegezzük.

A Calvin-ciklus révén szén-dioxid fixációra képes autotróf prokarióták közül számos képez sejtjének belsejében karboxiszómának nevezett sokszögletű zárványokat. Ezeket a körülbelül 100 nm átmérőjű intracelluláris képződményeket egy vékony fehérjeburok határolja. Egy-egy karboxiszóma belsejében mintegy 250 kristályos szerkezetű ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz (röviden RuBisCO) enzim található. A karboxiszóma a baktériumsejtben egyfajta szén-dioxid koncentráló feladatot lát el, hogy az könnyebben hozzáférhetővé legyen a RuBisCO számára. A szervetlen szén felvétele a baktériumsejtbe általában bikarbonát-ion (HCO_3^-) formájában történik, de a karboxiszómába már szén-dioxid formájában lép be a karbon-anhidráz enzim közreműködésével. Így a karboxiszóma belsejében a RuBisCO enzim szubsztrátjaként a szén-dioxid molekula vesz részt a Calvin-ciklus első, karboxilációs lépésében. A karboxiszóma révén a sejt egyúttal korlátozza az oxigénnek, az enzim másik szubsztrátjának a hozzáférését a RuBisCO számára. A baktériumsejt ily módon biztosítja, hogy a RuBisCO enzim a ribulóz-1,5-biszfoszfát molekulának a kevesebb energiát és redukáló képességet igénylő karboxilálását, ne pedig oxidálását katalizálja.

Az acetil-koenzimA (más néven Wood-Ljungdahl) útvonal az obligát anaerob anyagcserét folytató prokariótákban terjedt el széles körben, és egyaránt szolgál az acetátnak szén-dioxiddá történő (katabolikus) oxidálására és a szén-dioxidnak acetáttá történő (anabolikus) redukciójára. Az acetil-koenzimA útvonal a korábban ismertetett ciklikus autotróf szén-dioxid fixációs útvonalaktól (hidroxi-propionát út, reduktív citrát-ciklus, Calvin-ciklus) eltérően lineáris folyamat, benne 2 molekula szén-dioxid acetáttá redukálódik. Kulcsenzime a Ni-, Zn- és Fe-kofaktorokat tartalmazó szén-monoxid-dehidrogenáz (újabb nevén acetil-koenzimA-szintáz) enzim, amely egy szén-dioxid molekulának az acetát karbonil-csoportjává történő redukcióját is katalizálja. A másik molekula szén-dioxid egy az előbbitől független, háromlépéses reakció során redukálódik az acetát metil-csoportjává.

Az aerob metilotróf baktériumokban három útvonalat ismerünk a szénvegyületek beépítésére. Ezek közül kettő a szenet a formaldehid szintjén is asszimilálja (a szerin útvonalon és a ribulóz monofoszfát útvonalon). Néhány baktérium pedig a Calvin ciklust használja szén-dioxidot kötésre.

A szerin anyagcsere út esetében a formaldehid tetrahidrofolsav közvetítésével épül rá a glicin aninosavra és abból szerin képződik. A szerin molekula több transzformációs lépésben foszfo-enolpiruváttá (PEP) alakul, amely karboxilálódva (PEP karboxiláz) almasavvá alakul. Ebből regenerálódik a glicin és képződik a felépítő anyagcserében felhasználható acetil csoport.

A ribulóz-monofosztáf anyagcsereúton a formaldehid ribulóz-monofoszfát akceptor molekulára kerül. Az így létrejött kexózból hasad le a bioszintézishez szükséges glicerinaldehid-3-foszfát. A hexózból regenerálódik azután (a Calvin-ciklushoz hasonló folyamatokban) a ribulóz is.

Akár autotróf egy szervezet, akár heterotróf a felépítő anyagcsere 13 kulcsvegyületét (szénvázát) elő kell tudnia állítani, hogy majd ezekből a sejtanyagokat felépíthesse. A 13 vegyület: szedoheptulóz-7-P, glukóz-6-P, fruktóz-6-P, pentóz-5-P, eritróz-4-P, dihidroxiaceton-P, glicerinsav-3-P, foszfoenol-piruvát, oxálacetát, α-ketoglutarát, szukcinil-CoA, piruvát, acetil-CoA. Az ezekre épülő lényeges bioszintetikus utakat csak felsoroljuk:

- szedoheptulóz-7-P → lipopoliszacharid alkatrészek (pl. 2-keto-3-dezoxioktoncuát).
- glukóz-6-P → cukor nukleotidok (pl. uridin difoszfoglukóz), murein bioszintézis, energiatároló poliszacharidok.
- fruktóz -6-P → amino cukrok felépítése.
- pentóz-5-P → ribonukleotid és dezoxiribonukleotidok bioszintézise, vitaminok és kofaktorok (riboflavin, nikotinamid koenzimek stb.).
- eritróz-4-P → a foszfoenol piruváttal együtt az aromás aminosavak bioszintézise, kinon bioszintézis stb.
- dihidroxiaceton-P → foszfolipidek, nikotinamid koenzimek.
- glicerinsav-3-P → a szerin aminosav család felépítése.
- foszfoenol-piruvát → az eritróz-4-P-tal együtt az aromás aminosavak felépítése és lipopoliszacharid felépítés stb.
- oxálacetát → az aszparaginsav aminosav család felépítése.
- α-ketoglutarát → a glutamát aminosav család felépítése.
- szukcinil-CoA → a citrát köri intermedierek képzéséhez szükséges.
- piruvát → a piruvát aminosav család felépítése.
- acetil-CoA → zsírsavszintézis, murein bioszintézis.

6.5. Kevert anyagcseretípusok

A baktériumoknak csak egy része obligát szervezet, vagyis kötelezően csak egy katabolikus, vagy anabolikus anyagcseretípust folytat. Az *Escherichia coli* obligát kemoorganotróf heterotróf anyagcseréjű, azonban energiatermelését tekintve lehet fermentáló (vegyes savas erjedés glukózból), bár elsősorban légző. Ha légzését nézzük, akkor mind aerob, mind pedig anaerob respirációra képes. A **6.4. táblázat**ban néhány jellemző légzési redox pár változatát és az azokhoz köthető szabadenergia változást mutatjuk be. Vagyis az *E. coli* nem obligát légző.

6.4. táblázat. Az *Escherichia coli* néhány jellemző légzési redox pár változata.

Akceptor	Donor	$\Delta G^{0'}$ (kJM^{-1})
O_2 / H_2O	NAD^+ / NADH + H^+	-220
NO_3^- / NO_2^-	CO_2 + H_2O / formiát	-167
NO_3^- / NO_2^-	NAD^+ / NADH + H^+	-145
NO_3^- / NO_2^-	glicerinaldehid / glicerinsav-3-P	-120
DMS / DMSO	NAD^+ / NADH + H^+	-92
TMA / TMAO	NAD^+ / NADH + H^+	-86
szukcinát / fumarát	NAD^+ / NADH + H^+	-68

DMS: dimetil-szulfid; DMSO: dimetil-szulfoxid; TMA: trimetilamin; TMAO: trimetilamin-N-oxid

Vannak azután olyan mikroorganizmusok is, amelyek ennél is változatosabb energiatermelésre képesek. Egyes bíbor nemkén baktériumok képesek fotolitotróf, fotoorganotróf, kemoorganotróf légző és fermentáló anyagcserére is. Hozzátehetjük még, hogy ekkor nemcsak az ATP előállítás módjában, de a redukáló erő forrását illetően is váltanak, sőt még az autotróf, ill. heterotróf anabolizmusba is átkapcsolnak. Az olyan szervezeteket, amelyek energiatermelő, redox állapotot meghatározó anyagcseréjük, ill. szénforrás tekintetében több változatot is végezhetnek *mixotróf*nak nevezzük. Természetesen a váltás a környezeti feltételek függvényében mindig az optimális energiatermelésnek megfelelve történik. Az előbb már említett bíbor nemkén baktériumnál maradva, szulfid

ionokban gazdag élőhelyen fény jelenlétében fotolitoautotróf anyagcserét folytat. Ha nincs fény, akkor a kemoorganotróf légzés az energetikailag hasznosabb, míg a legkevesebb energiát a fermentációval nyeri.

Vannak a mixotrófiának azonban érdekesebb esetei. Az obligát metilotróf szervezetek pl. egyben obligát mixotrófok is, hiszen hiába kemoorganotróf légző szervezetek, szénforrásként széndioxidot hasznosítanak obligát módon. Vagyis kemoorganoautotróf az anyagcseréjük. Még ennél is érdekesebb néhány fototróf élettani csoport esete, így elsősorban is a fény hajtotta protonpumpával rendelkező fototrófoké. Ezek ugyanis alapvetően kemoorganotróf légző anyagcseréjű szervezetek, amelyek fototróf ATP termelésükkel többlet energiát állíthatnak elő. Ezzel hozzájárulnak a sejt ATP/$NADH+H^+$ arányának beállításához. Hasonlóan fotoheterotrófok a heliobaktériumok is, bár ezek ATP-t ciklikus fotofoszforilációval állítanak elő. Az utóbbi évek szisztematikus kutatása egyre több kemoorganotróf baktérium nemzetségben fedezi fel a fototróf ATP termelés képességét.

Ajánlott irodalom

Márialigeti, K. (szerk.) 2013. Bevezetés a prokarióták világába. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, pp. 596.

Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. 2013. The Prokaryotes. Prokaryotic Physiology and Biochemistry. Springer, New York, pp. 682.

7. A baktériumok vizsgálati módszerei

7.1. A bakteriológiai kutatások alapkérdései

A bakteriológia történetére visszatekintve megállapíthatjuk, hogy fejlődését a ma „felfedező kutatás" fogalommal körülírt munkák jellemzik. A felfedező kutatást korunk kutatásfinanszírozói „felhasználás orientált kutatásnak" határozzák meg. Magyarán, olyan kíváncsiságunk által hajtott alapkutatás, aminek az eredménye rögtön a gyakorlati felhasználás kiindulópontja is. Vagyis az alapkutatási eredményre azonnal alkalmazott kutatások és végül termékfejlesztés is ráépíthető. Gondoljunk csak bele Pasteur baromfikolerával kapcsolatos munkájába. A betegség, a kórfolyamat megfigyelése alapján feltételezte kórokozó szerepét. Ezzel kapcsolatos alapkutatása elvezetett a kórokozó izolálásához, leírásához. Nem állt meg azonban ezen a ponton, hanem megindította – mai kifejezéssel – az „innovációs láncot". Az alkalmazott kutatás eredménye az attenuálás technikája, a termékfejlesztés eredménye pedig a baromfikolera elleni oltóanyag lett.

Ebben a korban a biológiai termékek alkalmazásánál – az akkori tudás- és ismeretszintnek megfelelően – kevesebb biztonsági megfontolásnak kellett eleget tenni. Így az alapkutatási felfedezés (kórokozó izolálása, leírása) és a termék (baromfi kolera elleni oltóanyag) előállítása, forgalmazása között jóval kevesebb idő telt el, mint ma. A tudománytörténeti írások azonban gyakorta elfedik, vagy elfeledik leírni az a hihetetlenül sok eredménytelenül végződött, vagy éppen súlyos tragédiákhoz vezetett munkát, amit a bakteriológusok végeztek. És akkor még nem is emlékeztünk meg arról a „tudományos légkörről", amelyben az adott, kiemelt és ténylegesen nagyon eredményes személy tevékenykedett. Aligha lehet azt a sok párhuzamosan folyó kutatást, a hihetetlen mennyiségű impulzust számba venni, amelyekből az utókor számára is feljegyzett, nagy tudományos előrelépést jelentő siker lepárlódott. Minél régebbi korokba tekintünk vissza, természetszerűen annál kevésbé idézhető fel az intellektuális háttér, amelyben egy-egy kiemelkedő felfedezés létrejött, paradigmaváltó gondolat megfogalmazódott.

Könyvünk bevezetésében már megállapítottuk, hogy a bakteriológia szervezet-, szerveződés szintű tudomány, vagyis a baktériumok legtágabban értelmezett biológiájának megismerésével foglalkozik. A „baktériumbiológia" négy alapvető tudományterületben összegezhető.

1. A kutatások első területe a baktériumok szerveződésének, szerkezetének és működésének megismerésére koncentrál. Azt vizsgálja, hogy miből és hogyan épül fel egy baktériumsejt, vagy annak különböző elemei (pl. riboszóma, sejtmembrán) és ezek az elemek hogyan működnek. Egy fajta „funkcionális anatómia" és persze biokémia, molekuláris biológia.
2. A bakteriológiai kutatások második átfogó területe a legtágabban értelmezett sokféleség (diverzitás) megismerését célozza. Kérdései arra koncentrálnak, hogy hány és milyen működésű szervezetek (fajok, élettani csoportok, biokémiai rendszerek stb.) tartoznak egy-egy típusba és azoknak meg kívánja ismerni a hasonlóságait és különbségeit. Vagyis egyfajta összehasonlító (komparatív) elv is vezérli.
3. A harmadik lényeges szintje a kutatásoknak az ökológia. Mi módon szerveződnek a sejtek populációkba, a fajok közösségekbe. Milyen kölcsönhatásban állnak egymással, az élettelen és élő környezettel az anyagcsere szinttől a fajok, közösségek szintjéig.
4. A baktériumok megismerésének következő eleme az egyes diverzitási csoportok (pl. fajok, funkciók, biokémiai rendszerek) leszármazásának és rokonsági viszonyainak feltárása. Vagyis az evolúció legtágabb vonatkozásainak, területének a kutatása.

Mind a négy terület felvetheti és fel is veti azt a kérdést, hogy a megfigyelt jelenség, a megismert működés, szabályozás, rendszer hat-e az emberre, akár közvetlenül, akár közvetve. Ennek megismerését követően azonban mi emberek mindig feltesszük azt a kiegészítő kérdést

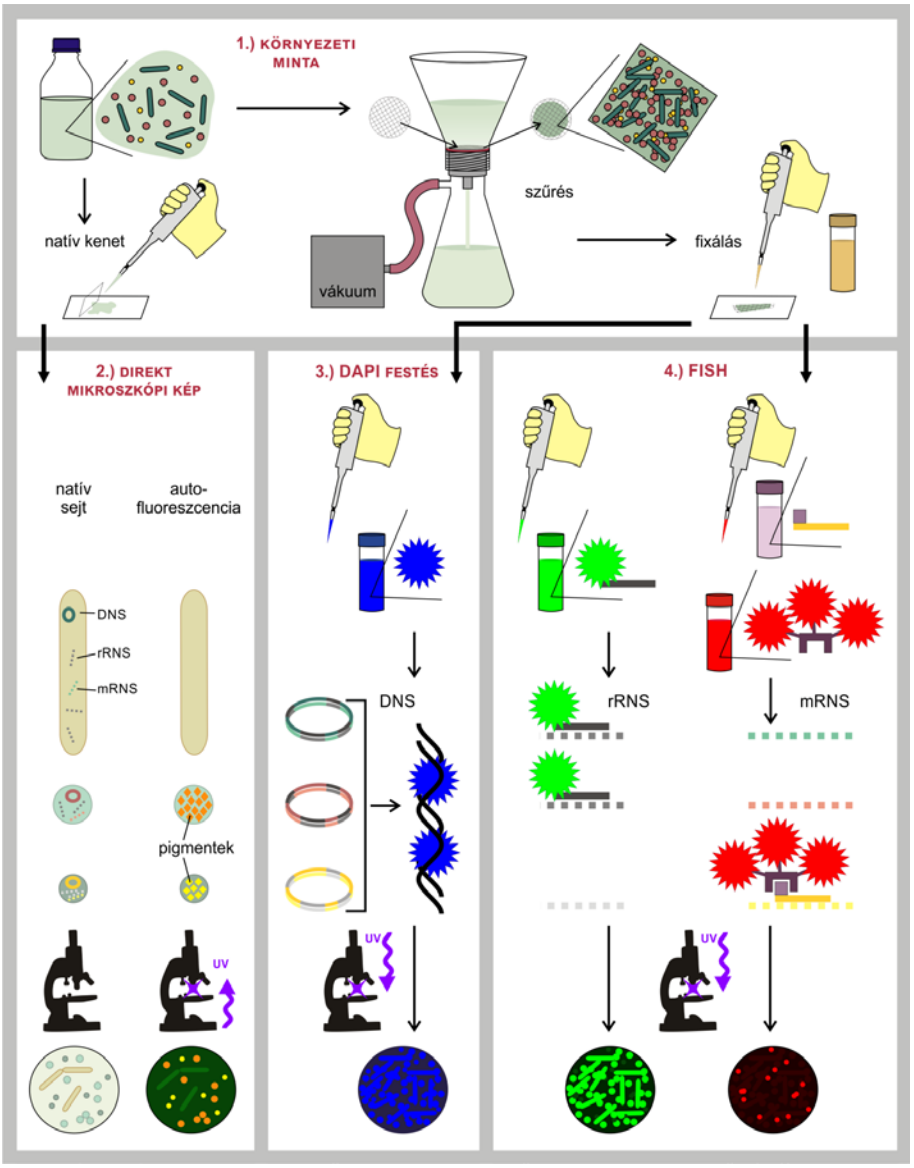
is, hogy a megfigyelt jelenség hogyan hasznosítható!? Ezen a ponton figyelmeztetnünk kell a kutatással kapcsolatos meglehetősen bonyolult etikai kérdésekre is. Eklatáns példaként a lépfene kórokozójának megismerését idézzük emlékezetünkbe. Robert Koch 1876-ban írta le a kórokozó *Bacillus anthracis*t és megindulhatott a kórokozó elleni védekezés stratégiájának kidolgozása. Alig negyed évszázad elteltével már az is nyilvánossá vált, hogy a felhalmozódott tudást a biológiai hadviselésben is fel kívánják használni, megindultak az ez irányú kísérletek. Az I. Világháború balkáni hadszínterén a kor nélkülözhetetlen szállító eszközeit (ló, ösvér, szamár stb.) már lépfene biológiai fegyverrel támadták a „monarchia" fejlesztői.

A megismerni → megérteni → felhasználni hármas logikája a tudományban, a kutatások mindennapjaiban jellemzően két egymásba csatolt úton folyik. Az ún. induktív úton az empirikus (tapasztalati) módszerrel először adatokat, információt gyűjtünk (megfigyelés; összehasonlítás; kísérlet: mérés, elemzés, szintézis). E tényekre alapozva megfogalmazzuk a törvényszerűségeket, amelyek a sokasodó tényekkel alátámasztva elméletté jegecesednek. A deduktív kutatások pont fordított logikát követnek. A természettudományos kutató elméletet alkotva mond ki vélt törvényszerűségeket, majd hipotézisét (feltételezését) empirikus vizsgálatokban tesztelik. Akármelyik úton jár is azonban, a tudományos kutatót és kutatást mindenképpen az kell jellemezze, hogy tervszerűen alapos, nagyon pontos fogalmakkal él, munkájában kiemelten figyel a logikai tisztaság elvének és gyakorlatának alkalmazására és eredményeit gondos ellenőrzésnek veti alá. Vagyis a jó eredmény i. általánosítható (elmélet alkotható belőle), ii. megismételhető (reprodukálható), újból bejárható az eléréséhez vezető út, és iii. ellentmondás mentes (más szóval koherens).

A bakteriológiai kutatás hihetetlen komplexitása (az eredményes tudományos kutatás megalapozásaként és hatására újabb és újabb tudományos problémák vetődnek fel) azt okozza, hogy kutatási eredményként ma már nagyon sok dolog elkönyvelhető. Így: egyszerűen új adatok, a kutatást segítő vegyszerek, reagensek, számítógépes programok, eszközök stb. is. A baktériumok vizsgálati eljárásai hasonló módon nagyon komplexek. A természettudományok teljes területén kifejlesztett módszereket megkísérlik alkalmazni a biológiai, így mikrobiológiai folyamatok elemzésében. A szinte áttekinthetetlen mennyiségű és típusú vizsgálati eljárás a bakteriológia tudományának történeti fejlődéséhez kötve logikus vizsgálati rendszerekbe sorolható.

A leghagyományosabb eljárás csomag a mikroszkópos technikákra alapul. Egészen Antoni van Leeuwenhoekhez és Robert Hookehoz vezethető vissza a kezdete. A fénymikroszkóppal a baktériumok akár in-situ, természetes közegükben is megfigyelhetők (**7.1. ábra**). Az 1940-es évektől a transzmissziós elektronmikroszkópia a finom felbontású szerkezetkutatás fontos eljárásává vált, míg a pásztázó elektronmikroszkóp a háromdimenziós szerkezetkutatás első eszköze volt. A változatos modern mikroszkópos, vagy egyéb képalkotó technikák már több vizsgálati eljárás lehetőségeit integrálják. A korai mikroszkópos vizsgálatok biológiai korlátja a bakteriológiában nyilvánvalóan az volt, hogy a kutató nem tudta az észleléseit egy-egy fajhoz kötni a morfológiai bélyegek relatív szegényessége következtében.

A fajhoz köthető információk, sőt a faj alatti legelemibb mikrobiológiai kategóriához, a törzshöz kapcsolható eredmények elérésének első lehetőségét Robert Koch iskolájának tiszta tenyészetekre, törzsekre alapozott módszertana hozta el (**7.2. ábra**). Ez máig meghatározó, központi eleme maradt a mikrobiológia kutatásának. *A faj*t ugyanis *a bakteriológiában törzstenyészetek homogén, vagy nagyon hasonló tulajdonságokat mutató csoportjaként határozzuk meg*. A törzsekhez kötött telep- és sejtalaktani (morfológiai, morfometriai), biokémiai, élettani, ökológiai, immunológiai, sejtszerkezeti és -kémiai stb. tulajdonságok már értelmet nyernek. Pasteur baromfikolerával kapcsolatos kutatásaiból példát véve elmondhatjuk, hogy a betegségokozó „vad" törzs az attenuálás során elvesztette egy sor



7.1. ábra. Néhány jellemző mikroszkópos vizsgálati eljárás folyamatábrája. A bal oldalon natív minta vizsgálatát, áteső fehér fénnyel, ill. UV megvilágítással nyert „képét" látjuk. Középen a sejtszámlálás jellemző példáját mutatjuk be, míg jobb felől a fluoreszcens in-situ hibridizáció (FISH) áttekintését adjuk.

virulencia faktorát, amíg kialakult a „vakcina törzs”. Ez ma már nyomon követhető szerológiai, genetikai, élettani, biokémiai stb. vizsgálatokkal.

A következő nagy előrelépést a tenyésztéstől független eljárások térnyerése jelentette. Carl Woese filogenetikai módszere kijelölte azokat a nukleinsav bázissorrendben kódolt molekuláris órákat (kronométer), amelyek megvilágították a baktériumok törzsfejlődését, és a fajok, törzsek követését molekuláris ujjlenyomatokra alapozva teszik lehetővé (**7.3. ábra**). Ezzel egyrészt megnyílt számunkra a nem tenyészthető mikrobák eddig rejtett világa, másrészt a legváltozatosabb közegekben és akár egy-egy sejt szintjén teszik lehetővé a fajok, törzsek, genotípusok nyomon követését (pl. (elektron)mikroszkópban is, vizuálisan [**7.1. ábra**]). A módszer már klasszikusnak tekinthető alkalmazása során a megfelelő információt konszenzus PCR, majd az azt követő klóntár készítéssel és bázissorrend elemzéssel kapjuk. A robbanásszerű technikai fejlődés eredményeként ma már az első két lépés egyben, ún. klonális PCR segítségével történik, a bázissorrend elemzés pedig olyan berendezésekben, ahol akár több milliónyi reakció zajlik párhuzamosan (**7.7. ábra**).

[KG1] megjegyzést írt: A jelölt mondatrészt keretező zárójel felesleges

[KG2R1] megjegyzést írt:

A tenyésztéstől független baktérium, ill. baktériumközösség vizsgálatok köre még további lehetőségeket tartogat. Elemezhető ugyanis a baktériumokat felépítő nukleinsavaktól eltérő, egyéb fajspecifikus kémiai sejt alkatelemek köre, az ún. kemotaxonómiai bélyegek (**7.5. ábra**). Ha faji szinten nem is mindig, de nemzetségek szintjén leggyakrabban specifikus a sejtek (citoplazma membrán és egyéb) zsírsav összetétele, vagy az energiatermelő folyamatokban kulcs szerepet vállaló molekulák: légzési kinonok, a fototrófok (bakterio)klorofillje, egyéb pigmentek (pl. karotenoidok). De az állati (emberi) szervezetben a baktériumok jelenlétére adott immunválasz is specifikus (lehet). A monoklonális ellenanyagok felhasználásával pl. ilyen fajspecifikus eljárások segítik a fertőzések diagnózisát (**7.6. ábra**).

Az egyes vizsgálati csoportok eljárásai kölcsönösen segítik és kiegészítik egymást. Valamennyi eljárásnak vannak ugyanis jellemző korlátai, már felismert és figyelembe is vett torzításai (meg persze jó eséllyel eddig még fel nem tárt hibái). Egy-egy jól tervezett vizsgálat sorozatban az egyes módszerek célszerű kombinációja adhatja a legmegbízhatóbb eredményt. A legmegbízhatóbb modern eljárások komplex alkalmazása sem küszöbölheti ki azonban a mintavétel, ill. a minta hibáját. Csak reprezentatív mintára alapozva érhető el általánosításra alkalmas, reprodukálható és koherens eredmény. (A mintavétellel kapcsolatban lásd pl. Márialigeti és Romsics, 2012.) Különösen is igaz ez a megállapítás a bakteriológia egyik kiemelten fontos területére, a diagnosztikára, vagyis a kórisme esetében.

7.2. A baktériumok tenyésztése

A mikrobiológia tudománya a tenyésztéses eljárások felfedezése és általános alkalmazása révén a XIX. század utolsó negyedében vált „nagykorúvá”. A mikroszkóp felbontóképessége és baktériumok estében a morfológiai bélyegek szegényessége nem tette lehetővé a fajok elkülönítését. A legváltozatosabb hagyományos (egyszerű és differenciáló) festési eljárásokkal (pl. Gram-festés, saválló festés) is csak pálca, gömb stb. alakú kisebb és nagyobb sejtekből álló, sok fajt képviselő csoportok (pl. Gram-pozitív kokkuszok, saválló szabálytalan pálcák) voltak alkothatók (**7.1. ábra**). Egyes különleges helyzetekben, környezetekben a mikroszkóp nagy segítséget jelentett. Pasteur pl. a sör savanyodását vizsgálva észrevette, hogy a megsavanyodott sörben kisméretű pálca alakú sejtek jelennek meg a jó sörben jellemző nagy tojás alakú élesztősejtek helyett. Ugyanebben az időben a kórokozók vizsgálatánál már állat (növény) kísérleteket alkalmaztak egyfajta tenyésztésként. Nem zavarta a kísérleteket, hogy a kórokozó mikroba mellett más mikrobák is jelen voltak, amennyiben a betegséget egyetlen virulens mikroba okozta. Korabeli jellemző példával élve, a veszettség csak akkor alakult ki a kísérleti ebekben, ha az oltásra használt nyál, agyszövet szuszpenzió veszett állatból származott. Mikroszkópban a kórokozót nem legfeljebb az általa okozott elváltozásokat

észlelhette Pasteur. Vagy Koch a kórokozókra nagyon érzékeny tengerimalacok tömegét oltva győződött meg posztulátumai helyességéről, mert a mikroszkópi kép nem mindig segített. A mikrobiológiában, a kórokozók kutatásában az állat- és növényoltási kísérletek máig meghatározó fontosságúak maradtak, sokat fejlődtek (pl. SPF, vagy akár csíramentes állatok növények alkalmazása). Az élőlényekben történő tenyésztés mellett, helyett azonban meghatározóvá vált a tápközegek használata. A **7.2. ábrán** ennek menetét foglaljuk össze valamilyen környezeti minta bakteriológiai vizsgálata esetén.

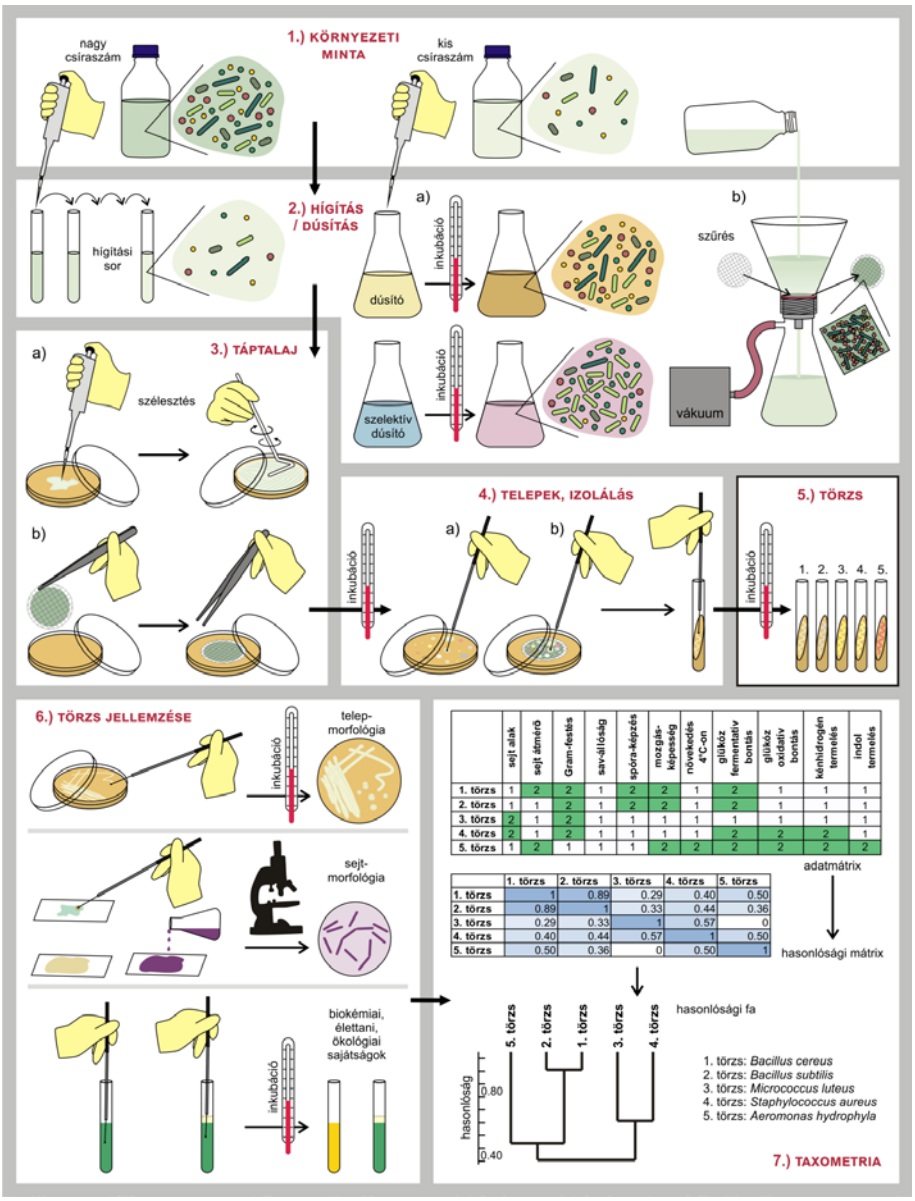
A környezeti (pl. talaj, Duna víz) minták legtöbbje nagy számban tartalmaz mikrobákat. A mikroszkópos elemzések szerint egységnyi tömegre, vagy térfogatra (g, mL) vonatkoztatva 10^4-10^7 nagyságrendben mutathatók ki sejtek bennük. Akad azonban arra is példa, hogy a sejtszám kicsi, akár a minta 100 mL térfogata sem tartalmaz mikrobát (pl. erőművek gőztermelő rendszereiben használt nagytisztaságú víz). Az még gyakrabban előfordul, hogy a vizsgálni kívánt baktérium (pl. kórokozó) sejtsűrűsége nagyon csekély az egyébként nagy sejtszám értékek mellett. Vagyis ahhoz, hogy táplemezeinken statisztikailag értékelhető és megbízhatóan kezelhető számú telepet nyerjünk (a 10 cm hasznos átmérőjű Petri-csészén mintegy 40 telep) legtöbbször hígításra van szükség. Ellenkező esetben a mintában fellelhető sejtek koncentrálását végezhetjük (pl. szűréssel), vagy célmikrobánk szelektív dúsítását választhatjuk.

A hígításhoz a minta viszonylatában izotóniás folyadékot célszerű alkalmazni (pl. steril csapvíz, Ringer oldat, húspepton tápleves), hogy minél kevesebb baktériumsejt szenvedjen ozmotikus stresszt, vagy legalábbis minél kevesebb sejt pusztuljon el. A gondosan megtervezett és szabályosan végrehajtott hígítást követően a hígítási sor megfelelő fokozataiból egységnyi térfogatokat (pl. 0,1 mL) több különböző összetételű táptalaj felületén mindig több párhuzamost alkalmazva szélesztünk.

A nagyon kis sejtsűrűségű minták koncentrálását változatos szűrési, vagy egyéb mechanikus eljárásokkal végeztetjük (pl. membránszűrő, tangenciális szűrés, centrifugális szeparálás). Munkánkat gyakorta megnehezíti, ha a minta a baktériumsejtek mellett kolloidális ásványi, vagy szerves részecskéket is tartalmaz. Különösen is érdemes figyelni arra, hogy a bakteriológiai vizsgálatra felhasznált mintarész a teljes mintával homogén legyen, hiszen a baktériumok gyakorta más, pl. inert részecskék felületére kitapadnak, ott akár biológiai bevonatot is képezhetnek.

A dúsítás során azt feltételezzük, hogy a minta baktériumközösségének tagjai a kedvező tápközeg hatására osztódásnak indulnak és a megfelelő hőmérsékleten történt 24-48 órai, vagy akár 1 hetes (stb.) inkubálást követően már nagy számban lesznek jelen. A szelektív dúsító közegekkel egy-egy baktérium élettani csoport, vagy akár egyetlen faj szaporodását várjuk. Pl. megfelelő ammónium ion koncentrációjú szervetlen puffer oldatba oltott mintánkból egy heti rázatást követően egyes ammónia oxidáló nitrifikáló szervezetek szaporodását várhatjuk. Vagy egy mannitolt és LiCl sót megfelelő koncentrációban tartalmazó szelektív dúsító tápközeg esetében a *Staphylococcus* fajok szaporodására számíthatunk miközben más mikrobák gátlódnak.

A törzstenyészetek létrehozásához alkalmazott legegyszerűbb eljárás során a hígított/dúsított/koncentrált mintát Petri csészékben megszilárdított tápagar lemezek felületén szélesztjük. A tápközeg összetételét a vizsgálni kívánt minta és baktériumok anyagcseréjének ismeretében állítjuk össze. Így legelőször is gondolkodnunk kell a tápforrások alkalmazni kívánt koncentrációjáról: oligokarbofil baktériumok tenyésztése során (pl. egy „tiszta" forrásvíz) kis szerves szénforrás koncentrációt alkalmazunk, míg koncentrált tápközegben szaporodó szervezetek (pl. romló lekvár) tenyésztése esetén nagy szerves szénforrás koncentráció indokolt. Ezt követően pedig a tápközeg összetételében a C forrás mellett, a N, S, P megfelelő vegyületben (szerves, vagy szervetlen; oxidált, vagy redukált formája) és



	sejt alak	sejt átmérő	Gram-festés	sav-állóság	spóra-képzés	mozgás-képesség	növekedés 4°C-on	glükóz fermentatív bontás	glükóz oxidatív bontás	kénhidrogén termelés	indol termelés
1. törzs	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1
2. törzs	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1
3. törzs	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
4. törzs	2	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1
5. törzs	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2

	1. törzs	2. törzs	3. törzs	4. törzs	5. törzs
1. törzs	1	0.89	0.29	0.40	0.50
2. törzs	0.89	1	0.33	0.44	0.36
3. törzs	0.29	0.33	1	0.57	0
4. törzs	0.40	0.44	0.57	1	0.50
5. törzs	0.50	0.36	0	0.50	1

7.2. ábra. A tenyésztésre alapozott baktérium faj azonosítás folyamatábrája.

töménységben történő alkalmazása és természetesen az egyéb tápelemek (Na, Ca, Mg, Fe, Mn stb., nyomelemek) megfelelő puffer oldat formájában történő biztosítása is fontos. Gondoskodni kell a kémhatás (pH) beállításáról és a szilárdító közegről. E célra leggyakrabban agar gélt alkalmaznak, de más szerves (pl. cellulóz, karragén) és szervetlen (szilikagél) szilárdító anyagok is alkalmasak. A táptalajokat nem feltétlen és szükségszerűen szilárdítjuk (gyakorta leveseket használunk), továbbá az összetételük alapján megkülönböztetünk komplex (alkotóelemeinek pontos kémiai összetételét nem ismerjük; pl. főtt burgonya) és szintetikus (pontosan ismert vegyületekből összeállított) közegeket, valamint a megcélzott baktériumok szerint általános (a lehető legtöbb baktérium szaporodását támogató), szelektív (speciális összetétele alapján, ill. gátlóanyagok stb. hozzáadásával csak bizonyos baktériumok számára megfelelő) és differenciál (megfelelő összetétele alapján egy-egy baktériumfaj, vagy csoport megkülönböztethető, különleges alakú, pigmentáltságú stb. telepet képez) tápközegeket.

A tápközeg felületén egyenletesen elterített (szélesztett) minta baktériumsejtjei, sejtkötegei, osztódásnak indulnak és optimális esetben egy-egy sejtre visszavezethető telepekké (kolónia) nőnek ki (klonális sejtszaporulat) az alkalmazott inkubáció során. Az önálló (más telepekkel nem összenőtt) kolóniákat a munka céljának megfelelően (pl. általános környezeti elemzés esetében véletlenszerűen, differenciál táptalajról csak a megfelelő morfológiát mutató telepeket) ferde tápközegre átoltva elkülönítjük (izolálás). Az izolátumokat egyértelmű jelöléssel látjuk el és munkánk minden eddigi (a mintavételtől a hígításon/dúsításon keresztül az alkalmazott tápközegekig stb.) és ezután történő lépését is laboratóriumi jegyzőkönyvben leírjuk, rögzítjük. Az izolátumokat ellenőrizzük (pl. mikroszkópos vizsgálattal), hogy tiszta tenyészetek-e, vagyis megfelelnek-e az előbbiekben már jelzett klonális sejttenyészet követelményének. Ennek hiányában tisztítást végzünk (pl. izolátumunk szélesztésével és ismételt izolálásával). Jó, ha tudjuk, hogy a tiszta tenyészetek kialakítása nem minden esetben érhető el: pl. az egyik baktérium igényli egy másik valamilyen anyagcseretermékét. (A bakteriofág vírusok is aligha fognak szaporodni gazdaszervezetük hiányában.) Az ily módon ellenőrzött izolátumokat ezután törzsek formájában tartjuk nyilván és folyamatosan fenntartjuk a most már lehetővé váló törzs jellemzéshez.

A baktériumtörzs olyan tenyészet, amely három elengedhetetlen jellemzőnek megfelel:
- ismert eredetű (tudjuk, hogy milyen mintából, hogyan izoláltuk);
- megkülönböztető jelzéssel ellátott (jelzése alapján minden a törzsre vonatkozó információt, vizsgálati eredményt nyilvántartunk);
- folyamatos át és továbboltással fenntartott (beleértve az alkalmanként metabiotikus, de élő állapotban tárolást is: fagyasztás, fagyasztva szárítás stb.).

Tisztában kell lennünk alkalmazott módszerünk „inherens" hibáival. Így pl. a baktériumok egy része az O_2 nagy koncentrációja miatt nem fog a táptalaj felületén szaporodni (és nem csak az obligát anaerob szervezetek). Az anaerob inkubálás az aerobokat fogja gátolni… Más baktériumokat a táptalaj szerves komponensei (akár a szilárdító agar szabad galaktóz tartalma) fognak gátolni (pl. litotróf szervezetek), vagy egyszerűen nem megfelelő a növekedésükhöz a tápközeg összetétele, az alkalmazott hőmérséklet stb.. Ismét más baktériumokat nem tudunk nyugvó állapotukból (pl. endospóra) vegetatív szaporodó sejtekké alakítani, vagy a manipulálás során olyan károsodást szenvedtek, amelynek a javítása a sejtanyagcserétől sok energiát, időt igényel stb.. Vagyis sok sejt a táptalaj felületén életképes, de tenyészetbe nem vonható, telepet nem képez (VBNC-viable, but non-culturable; Oliver, 2005). Hiába láttuk tehát mintánk mikroszkópos vizsgálata során az akár 10^4-10^7 nagyságrendű sejtszámot a minta megfelelő térfogatú, tömegű egységében, telepet képezni csak ezek töredéke fog. Ezt a jelenséget nevezzük telepszámlálási rendellenességnek (plate-count anomaly) az egyéb (pl. pipettázásból fakadó) számlálási hibák mellett (Staley és Konopka, 1985). A hígításos, szélesztéses („lemezeléses") eljárás nyomán kinőtt telepek számából ugyanis következtethetünk eredeti mintánk „csíraszámára", amelyet – jelen esetben – a minta meg-

felelő részére vonatkoztatott telepképző egység számmal fejezünk ki (TKE g^{-1}; TKE mL^{-1}; TKE 100 mL^{-1} stb.) Vagyis hiába nagy a fajlagos sejtszám egy közegben, a csíraszám esetenként ennek csak töredéke. Így pl. egy jó csapvíz milliliterenkénti sejtszáma akár 10^4-10^5 nagyságrendű is lehet, mégis a szabványos eljárásokkal tápközegeken meghatározott 37°C-os csíraszám értéke a rendeletben megadott (pl.) 20 TKE mL^{-1} értéket meg sem közelíti. Ez a „láthatatlan sokféleség" azonban a tenyésztéses eljárásokkal nem, vagy csak töredékesen megismerhető, új – nem tenyésztésre alapozott – módszerek bevezetését igényli (lásd pl. Bohus és mtsai, 2010).

[KG3] megjegyzést írt: Csak a rend kedvéért. A rendelet nem határoz meg összcsíraszám határértékeket, „Nincs szokatlan változás" a kritérium.

Megjegyezzük, hogy az egyes közegek jellemző sejtszámaihoz nagyságrendileg jobban közelítő csíraszámok nyerhetők a tápagarlemezek felületén történő tenyésztés más módszerekkel való helyettesítésével. Lehet ez az ún. lemezöntéses eljárás, amikor a hígított mintát felolvasztott és 50°C-ra visszahűtött szilárdított tápközegben keverjük el és tenyésztjük. Még nagyobb csíraszámok érhetők el, ha a mintát végig tápfolyadékban (tápleves) hígítjuk, tenyésztjük. A telepszámot ilyenkor helyettesíti a „határig hígított" mintából készített sok párhuzamos tápleves valamelyikében kialakuló zavarosodás által jelzett feltehetően klonális (egy sejt utódaiból kialakuló) tenyészet (legvalószínűbb csíraszám, határhígításos eljárás, MPN [most-probable-number] eljárás; McCrady, 1915). Ez utóbbi esetben a tiszta tenyészetek tápoldatokban történő kialakítása, valamint az azokkal történő további munka sokkal nehézkesebb, időigényesebb.

Törzstenyészetekre alapozott a bakteriológiában a faj meghatározása (amint azt már az előző fejezetben egy mondatban jeleztük). Az 1950-es években kialakult és mind a mai napig érvényes meghatározás szerint a baktériumfaj azon törzsek csoportja, amelyeknek tulajdonságai nagy hasonlóságot mutatnak és más fajt, fajokat alkotó törzsekétől jellegzetesen eltérnek (Stackebrandt és mtsai, 2002). Tulajdonságok alatt a legváltozatosabb fenetikus (vagyis megnyilvánuló) bélyegeket értjük és persze a molekuláris genetikai információt is. A fajhoz történő eljutás (a fajazonosítás) egyik módszereként a **7.2. ábrá**n a taxometriának nevezett eljárást mutatjuk be (Sneath és Sokal, 1963). Törzseinket először részletesen jellemezzük. Meghatározzuk telepmorfológiai, sejtmorfológiai jellemzőiket, biokémiai, élettani, ökológiai sajátosságaikat, kemotaxonómiai bélyegeiket, akár szerológiai tulajdonságaikat (antigén tipizálás). Törzseink vizsgálatával együtt végezzük már korábban faji szinten azonosított (identifikált), ún. autentikus törzsek, akár típustörzsek jellemzését is. A típustörzsnek a faj leírása (determináció) során karakterizált és törzsgyűjtemény(ek)ben a faj típus példányaként megjelölt, elhelyezett és fenntartott törzset nevezzük. Az autentikus törzsek pedig rendszertani elemzések tekintetében megbízható, „hivatásos" helyen adott fajjal azonosított és gyűjteményben fenntartott törzsek. A törzsek jellemzésének eredménye akár több száz bélyeget is tartalmazó tulajdonság táblázat lesz. A hasonlóságok feltárására a puszta szemrevételezés legtöbbször nem elegendő és nem is megbízható. Statisztikai eljárás (csoportelemzés [cluster analysis]) segítségével nyerhetünk megfelelő eredményt.

A csoport elemzés statisztikai eljárása négy nagy lépésre tagozódik. Legelőször a törzsek tulajdonság táblázatát statisztikai elemzésre alkalmas „adatmátrixszá" alakítjuk. A mátrix soraiban az egyes törzseket és azok adatait, jellemzőit tüntetjük fel számításra alkalmas formátumban (OTU - operational taxonomic unit). Itt az egyes tulajdonságokat legtöbbször binárisan (igen, nem) kódoljuk (vagyis, mutatja a kérdéses tulajdonságot – igen [1]; nem mutatja a kérdéses tulajdonságot – nem [2]). Törekedni kell, hogy nem értelmezhető, vagy eldönthetetlen, hiányos pozíció (nem meghatározott [0]) ne legyen. A mátrix egyes oszlopaiban pedig egy meghatározott tulajdonság vizsgálata során feltett kérdésre az egyes törzseknél nyert igen, vagy nem válaszok állnak. (Pl.: húspepton tápközegben a szabványos eljárással beoltott törzs növekedik-e és 48 órai 27°C-on történő inkubálás alatt termel-e annyi kénhidrogént, amit a táptalaj fölött 1 cm-rel elhelyezett ólom acetát reagens papír feketedéssel kimutat?).

A második lépésben a létrehozott adatmátrixon a hasonlóság számítás műveletét

végezzük el. Ennek során valamennyi OTU-t minden másik OTU-val összehasonlítjuk és valamilyen hasonlósági index alkalmazásával meghatározzuk hasonlóságukat. A bakteriológiában leggyakrabban az egyszerű hasonlóság értékét számítjuk ki: két törzs hasonlónak bizonyult bélyegeinek száma (akár igenek, akár nemek okozták a hasonlóságot) osztva valamennyi számításba vonható bélyeg számával (a nem értelmezhető eredményt tartalmazó pozíciók nem vonhatók számításba). Az eredmény egy az átlójára szimmetrikus hasonlósági mátrix lesz ahol az átlómentén 1 értékek állnak (100 % hasonlóság) a többi érték pedig 0 és 1 közötti szám (a 0-100 % közötti hasonlóságnak megfelelően). A következő, harmadik lépésben (csoportosítás) azt vizsgáljuk meg megfelelő matematikai eljárással, hogy az OTU-k közötti azonos mértékű hasonlóságok vajon azonos okokra vezethetők-e vissza. Egy-egy csoportba ekkor azok a törzsek (OTU-k) kerülnek, ahol a hasonlóság hátterében azonos bélyegek állnak. A bakteriológiában legtöbbször az ún. összevonó módszereket és azok között is az egyszerű lánc, vagy a nem súlyozott csoportátlag eljárásokat alkalmazzák e célra. Az eredményt legtöbbször hasonlósági fa formájában ábrázolják. Ekkor már világossá is válik, hogy Sneath miért nevezte el módszerét taxometriának. Az egyes hasonlósági csoportok, fenonok (százalékos) hasonlóságát megkapjuk és a bevont autentikus törzs egyúttal a csoport faji hovatartozást is kijelölheti.

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a bakteriológiai diagnosztikában sok területen a mai napig a tenyésztéses eljárást és a törzsek fenotipikai jellegzetességeire alapozott taxometria módszerét alkalmazzák feltételezett kórokozók azonosítására (pl. szelektív tápközegek és diagnosztikai gyors eljárások kombinálásával). Lényeges különbség azonban az, hogy az autentikus törzsek bevonása mellett/helyett az előzetesen, vagy korábban más által elvégzett vizsgálati eredményekből épített számítógépes adatbázis „memóriában tárolt" adatait is bevonják. Vagyis a törzsazonosítás a fizikailag párhuzamosan végzett laboratóriumi vizsgálatok eredményeinek összevetése helyett legtöbbször az adatbázisban fellelhető eredmények felhasználásával történik. Ez a (virtuálisan) vizsgálatba vont referencia (autentikus) törzsek akár több tízezres száma következtében egyrészt nagyobb biztonságot jelent, másrészt nagyobb odafigyelést igényel (pl. az adatbázis építése közben bevezetett módszertani változtatások hatását is figyelni kell).

Itt hívjuk fel arra is a figyelmet, hogy a tenyésztéses eljárások diagnosztikai célra történő alkalmazásának komoly nehézségét okozza a tenyésztés időigénye (bizonyos kórokozók esetében akár 1 hétre is szükség lehet). Márpedig a „beteg nem vár" a célzott terápiát minél hamarabb el kell kezdeni. A tenyésztéses eljárásos fejlesztésének egyik nagy kihívása az időszükséglet csökkentése. Eredményes területnek jelölhetjük meg az ún. kromogén szubsztrátok alkalmazását differenciál táptalajokban. A megfelelő fajt a tápközegbe, vagy a telepbe a differenciáló szubsztrátból felszabaduló pigment nagyon gyorsan jelezheti. Ugyanez az eljárás még érzékenyebbé tehető a pigment képződésének spektrofotometriai kimutatásával folyadék közegekben és akár mikroliteres térfogatokban (mikrofluidikai eljárások – rendszerek).

A negyedik lépésben kapott eredményt azután a mintázott környezet jellemzésére fel lehet használni a környezetfizikai, kémiai stb. paraméterek és a baktériumközösségek összetételének összehasonlító elemzése segítségével (pl. korrelációvizsgálat, főkomponens elemzés; Podani, 1997). A taxometria eredménye lehet az is, hogy új, a tudományra nézve még ismeretlen fajt jellemeztünk. Az új faj tudományos leírásához (determináció) megfelelő szabályok betartása mellett még egy sor molekuláris bélyeg vizsgálatára is szükség van. Ezek elsősorban kemotaxonómiai jellemzők, valamint molekuláris kronométer gének bázissorrendjének meghatározását jelentik.

Megjegyezzük, hogy a környezeti mikrobiológia gyakorta alkalmazott tenyésztéses technológiája a „mikrokozmosz" ~~alkalmazására~~ alkalmazása (pl. Mészáros és mtsai, 2013; Révész és mtsai, 2006). A mikrokozmoszokban a természethez nagyon hasonló környezetet

hozunk létre, de a folyamatokat mégis a laboratóriumban tudjuk tanulmányozni. Pl. talaj, agy vízmintát 100-500-5000 mL térfogatban megfelelő laboratóriumi edényzetben a természetes környezeti feltételeket (fény, oldott O_2, hőmérséklet stb.) megteremtve inkubálunk és figyeljük a közösségek változását, a közösségi anyagcsere folyamatát stb. Ilyen rendszer a Winogradsky-oszlop is (Makk, 2013).

A kemotaxonómia a múlt század 60-as éveiben kialakult rendszertani tudományág. Feladata a fajra jellemző megkülönböztető bélyegként felhasználható sejtalkotó, vagy a sejtanyagcsere végtermékeként a tápközegbe kiválasztott anyagok (pl. fermentációs végtermékek, másodlagos anyagcsere termékek – metabolomika) molekuláris szintű jellemzése. Ilyenek a baktériumok esetében a sejtfal szerkezet jellegzetességei (pl. a murein finomszerkezete, vagy a lipopoliszacharid jellemző cukormolekulái), a sejtmembránt alkotó lipidek zsírsav gyökei, a légzési lánc jellemző citokróm, vagy kinon típusai, hasonló módon a fototróf anyagcserében résztvevő pigmentek, a fermentációs anyagcsere végtermékei, egy sor másodlagos anyagcsere termék (pl. víz- és zsíroldható pigmentek, antimikrobiális anyagok) stb.. De kemotaxonómiai bélyeg a kromoszóma mérete, annak G+C bázis aránya, a riboszómális RNS-eket kódoló operonok száma a genomban stb..

Molekuláris kronométer géneknek nevezzük azokat a géneket, amelyek bázissorrendje, illetve annak megváltozása az egyes fajok között a törzsfejlődés menetére, irányára, sebességére vonatkozó információt hordoz (filogenetikai marker). Zuckerkandl és Pauling (1965) elméleti felvetése és Carl Woese (Woese és Fox, 1977) gyakorlati munkája (lásd Bevezetés fejezet) nyomán kiemelt szerepet kapott a riboszómák felépítésében kulcsszerepet játszó kis alegységi 16/18S rRNS. Az élővilágban jelenléte általánosan jellemző (univerzális) és megváltozása a törzsfejlődést tükrözi. Több-kevesebb mélységben (vagyis fajon belül törzsek között; egy-egy nemzetségben, vagy családban; csak a három birodalom [domén] szintjén stb.) filogenetikai célra a genom mag valamennyi génje használható. Az élővilág szintjén a genom magba a sejtes élet fenntartásához szükséges mintegy 600 kb méretű 4-500 gén tartozik. Egy-egy törzs jellemzésére ma már teljes genomját is használjuk, a fajokat pedig az alkotó törzsek genomjának összehasonlító elemzése alapján (mag genom, szükséges gének és nélkülözhető gének) jelölik ki.

A kemotaxonómiai bélyegek meghatározásáról a **7.5. ábra** ad áttekintést, míg az egyes gének bázissorrend elemzésére a **7.3. ábra** magyarázata során térünk majd ki. Nyilvánvaló ugyanakkor, hogy ezeknek a molekuláris jellemzőknek a vizsgálata környezeti (stb.) mintákban nem igényli a tenyésztést, sőt ezen bélyegek elemzése alapján nem pusztán a mintában levő fajokra következtethetünk, de az egyes fajok egyedszámára, abundanciájára is.

7.3. Nem tenyésztéses eljárások a baktériumok vizsgálatában

A tenyésztés általános menetének ismertetése során - az előző 6.2. fejezetben - már utaltunk rá, hogy a minták mikroszkópos vizsgálatával feltárt sejtszámoknak (**7.1. ábra**) akár csak a töredékét fogjuk csíraszámban tapasztalni. Ez a tenyésztési rendellenesség a puszta számoknál nagyobb gondot jelent, hiszen messze nem abból adódik, hogy valamennyi faj szaporodni fog a tápközegen, csak kisebb számban. Épp ellenkezőleg egyes fajok akár egyáltalában nem fognak szaporodni, míg mások erőteljes szaporodást mutathatnak az alkalmazott tápközegen. Vagyis a sok munkával elvégzett tenyésztéses közösség elemzés torz képet adhat a mintánk baktérium összletéről. Egy a mintában csekély sejtszámmal jelenlévő faj a tenyésztéses vizsgálat eredményeképp jellemző, domináns „fajjá válhat”, mert jól szaporodik az alkalmazott táptalajon. Míg egy másik a mintában nagy sejtszámmal jelen levő faj a tenyésztéses vizsgálat eredményéből akár hiányozhat is, ha nem szaporodik az alkalmazott táptalajon. Segítheti munkánkat többféle (sokféle) táptalaj alkalmazása, azonban megoldást a gyökeresen eltérő elven felépülő vizsgálati eljárások kombinálása hozhat.

A leghagyományosabb tenyésztést elkerülő eljárás a minták mikroszkópos vizsgálata (**7.1. ábra**) natív, vagy festéses eljárásokkal. A hagyományos áteső fényű vizsgálat segítségével sejtszámokat határozhatunk meg (pl. Bürker kamra alkalmazásával). A modern mikroszkópi képelemző számítógépes eljárásokkal jellemző alakokat és méreteket (hossz és átmérő) is meghatározhatunk, amiből a baktériumok egyszerű testeket (gömb, henger) utánzó alakja miatt könnyen számítható a sejttérfogat és sejttömeg (feltételezvén, hogy a baktériumok átlagos fajlagos tömegét 1-nek tekintjük). Lényeges többlet információt jelentenek ezek az értékek egy természetes víz jellemzése esetében, még ha a fajok legtöbbje így nem is azonosítható. Még további segítséget jelenthet az UV megvilágítás használata. A fototróf szervezetek pigmentjei (klorofillok, bakterioklorofill, fikoeritrin, bakteriorodopszin stb.) ugyanis eltérő „autofluoreszcenciával" jellemezhetők (UV fénnyel megvilágítva más és más színben fluoreszkálnak). Így lehetőségünk adódik egy minta fototróf sejtszámának, vagy sejttömegének becslésére is az összes sejtszám, teljes sejttömeg vonatkozásában. Csekély kiviteltől eltekintve (pl. néhány jellegzetes morfológiájú cianobaktérium faj) a változatosság faji szintje továbbra is rejtve marad előlünk, de még azt sem tudjuk megmondani, hogy a számba vett sejtek vajon éltek-e mintánkban, vagy elpusztult sejteket („vázakat") látunk. A mikroszkópos vizsgálatok új szintjét jelenti a molekuláris (nukleinsav alapú) eljárások és a fluoreszcens mikroszkópi eljárások együttes alkalmazása.

Itt e ponton csak egy meglehetősen lényeges „általános" mikroszkópi technikát emelünk ki (**7.1. ábra**). A DAPI festék (4', 6-diamidino-2-fenilindol) stabilan kapcsolódik a kettős szálú DNS-hez annak nagyobb árkába illeszkedve (Russell és mtsai, 1975). UV fényben megvilágítva (gerjesztési maximum 358 nm) 461 nm-es kék fényben fluoreszkál. Segítségével a mikroszkópban jól fogjuk látni a meg állományokat a sejtekben (a kicsiny sejtekben is), nagyon pontos sejtszámlálás végezhető (**7.4. ábra**). Az eljárás alkalmazható membránra szűrt minták felső megvilágítású vizsgálatára is („epifluoreszcens" elemzés). Vagyis a sejteket folyadékmintánkból megfelelő membránszűrőn koncentráljuk. Rögzítjük azokat (pl. paraformaldehid segítségével), majd DAPI festést végzünk. A festék csak a kétszálú nukleinsavhoz fog kötődni, vagyis szinte kizárólag a DNS-hez. A tárgylemezre helyezett festett mintát (szűrőpapír darabot) megfelelő optikai rendszer segítségével felülről, vagyis a vizsgálatra használt objektíven keresztül világítjuk meg. A fluoreszkáló sejteket az UV fényt kirekesztő „záró szűrő" alkalmazásával fogjuk látni. Megjegyezzük, hogy egy másik festék alkalmazásával arra is lehetőség nyílik, hogy az élő- és holt sejteket megkülönböztessük (Jones és Simon, 1975). Az akridin narancs festék ugyanis másképp fluoreszkál annak függvényében, hogy egyszálú, vagy kettős szálú nukleinsavakhoz kötődik. Vagyis RNS-hez kötődve (450 nm-en gerjesztve 650 nm-en) piros színben fluoreszkál, míg DNS-t festve (502 nm-en gerjesztve 525 nm-en) zöld fluoreszcenciát tapasztalunk. A pusztuló sejtekben az RNS rövid idő alatt lebomlik...

[KG4] megjegyzést írt: ?

7.3.1. A nukleinsav kivonásra alapozott baktériumközösség vizsgálat

Korábban már megállapítottuk, hogy a baktériumfajok azonosításában alkalmas filogenetikai bélyeg a 16S rRNS-t kódoló génszakasz bázissorrendje. Nukleinsavat (DNS-t, RNS-t) viszont nemcsak törzsekből nyerhetünk ki, hanem változatos egyéb környezeti, klinikai stb. mintából is (**7.3. ábra**). Az első lépés a minta szuszpendálása baktérium közösségének szabaddá tételéhez. Vagyis pl. szövetminta, vagy talaj megfelelő hígító oldatos homogenizálása. Ekkor a szövet nagy eukarióta sejtjeinek zöme feltárul, a talaj szilárd alkotóelemeiről a baktériumsejtek leválnak stb. Az így nyert vizes szuszpenzióból megfelelő eljárásokkal a baktériumsejteket dúsítjuk (pl. dekantálás, szűrés, centrifugálás). Megjegyezzük, hogy a minta típusa függvényében e lépés meglehetősen kritikus a továbbiakat illetően, hiszen a baktérium mentesnek tekintett, „elöntött" fázisokkal (pl. talajszuszpenzióból gyorsan ülepedő

ásványi részek [kvarchomok]) akár baktériumokat is eltávolíthatunk.

A következő lépés a baktériumsejtek feltárása és nukleinsav tartalmuk kinyerése, tisztítása. A sejtfeltárást mechanikus (pl. késes homogenizátor, kvarc szemcsékkel történő rázatás), kémiai (pl. nátrium-laurilszulfát [SDS] felületaktív anyag), biológiai (pl. lizozim mureinbontó enzim), vagy kombinált eljárások alkalmazásával végezzük, törekedve a legellenállóbb sejtfalak (pl. spórafal) felnyitására is. A nukleinsav tisztítására annak függvényében, hogy RNS-t, vagy DNS-t kívánunk kinyerni sok különböző módszer valósítható meg, illetve sok különböző nukleinsav tisztító készletet lehet a kereskedelemben elérni. Általánosan azonban ezek két stratégiát követnek. Hagyományosan legelőször a sejt homogenizátum zavaró nem nukleinsav komponenseit (pl. poliszacharid sejtfaltörmelék, fehérjék) távolítják el és a maradék lesz a tisztított nukleinsav. Sok esetben pedig kihasználva a nukleinsavak specifikus kötődési tulajdonságait (pl. a stabil negatív töltésüket) a sejthomogenizátumból „kihalásszák" a nukleinsavat és a többit elöntik.

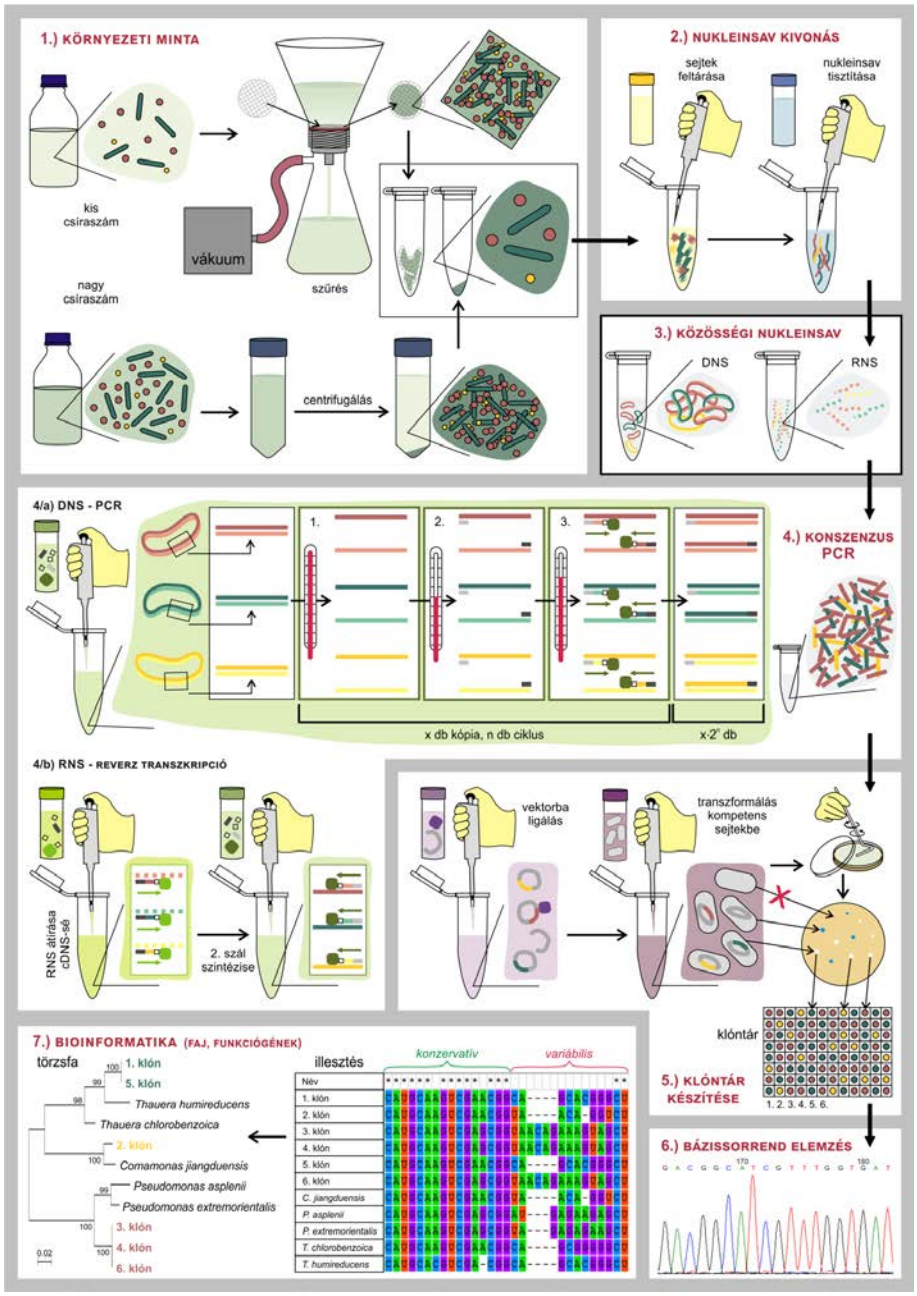
Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a DNS, ill. az RNS kivonása és tisztítása jelentősen különbözik egymástól. Ennek okát az RNS (DNS-hez viszonyított) csekély környezeti stabilitásában lelhetjük. A környezetben szinte mindenütt jelenlévő és meglehetősen tartós RNS bontó enzimek (RN-áz) ugyanis hamar lebontják. Emiatt azután a különleges, RN-áz aktivitást gátló eljárások során nyert RNS-t, amint csak lehetséges DNS-be másoljuk (complementary DNA, cDNS), RNS dependens DNS polimeráz enzim segítségével. Hogy mégis miért is vizsgáljuk az RNS-ekben rejtett információt, egy példán keresztül viszonylag egyszerűen megérthető. A nitrogén kötés kulcsenzimét, a nitrogenáz enzimet kódoló *nif*H gén kimutatása azt az információt közvetíti, hogy az adott fajban, vagy közösségben jelen van a nitrogénkötés *képessége*. Ha ugyanezt a hírvivő mRNS szintjén vizsgáljuk és annak jelenlétét ki tudjuk mutatni, akkor már azt is megállapíthatjuk, hogy a kérdéses baktériumok kötött N-ben hiányos környezetben élhettek, hiszen termelni kívánják (és feltehetően termelik is) az enzimet. Egy mennyiségi meghatározás (a kérdéses mRNS kópia száma) még az aktivitás mértékéről is tudósít. Megjegyezzük, hogy a N_2 kötés *tényéről* a transzláció eredményeképpen létrejött fehérje aktivitását mérve győződhetünk majd meg. A kérdéses esetben pl. megfelelő stabil N_2 izotóp sejtekbe beépülésének kísérletes vizsgálatával. Így megérthetjük, hogy a riboszómális RNS-t kódoló rrn operonban lelhető gén elemzése alapján pusztán arra következtethetünk majd, hogy egy így kimutatott faj a vizsgált közösségben jelen van. Ugyanakkor a riboszómális RNS segítségével ugyanezt elemezve már azt is kijelenthetjük, hogy az illető faj aktív a kérdéses közösségben (ha aktív, akkor szintetizál fehérjéket, márpedig ehhez szüksége van az rRNS-ekre, amelyre felépül a riboszóma; Nikolausz és mtsai, 2004).

Visszatérve a **7.3. folyamatábrá**hoz, mintánkból ún. közösségi DNS-t nyertünk. Ez a közösségi DNS (elméletben) a mintában található sejtarányoknak megfelelően tartalmaz kromoszómális DNS-t, vagy cDNS-t. Ha egy törzsből vontuk ki a kérdéses komponenseket, akkor csak egyféle kromoszómális DNS-t, és a fajra jellemző mennyiségű és fajtájú RNS-ekből képzett cDNS-t fog tartalmazni. (A háromféle „fő" riboszómális RNS másolatát, több mint 20 féle transzfer rRNS másolatát és többezres nagyságrendben hírvivő RNS-ek másolatát stb.)

Az 1980-as években általánossá vált eljárás rendjének megfelelően a vizsgálatra választott gént a bázissorrend elemzéshez szükséges mennyiségű nukleinsav létrehozásához polimeráz láncreakció (PCR) segítségével megsokszorozzuk. A konszenzus PCR elnevezés a filogenetikai, vagy diagnosztikai célra alkalmazható gének szaporításához használt kezdő

[KG5] megjegyzést írt: inkább „DNS-re írjuk át".

[KG6] megjegyzést írt: Ezt a cDNS-t nem értem. Elvben a cDNS-t reverz transzkripcióval állítjuk elő az RNS-ből, mit keres az elsődleges DNS-izolátumban?



7.3. ábra. A közösségi nukleinsav kivonásán és molekuláris kronométerek bázissorrend elemzése alapján végzett baktérium közösség vizsgálat folyamatábrája.

szekvenciákat (primer) és egységes módszereket (protokoll) jelenti. Esetünkben a faji összetétel kiderítéséhez a 16S rRNS-t kódoló gén szaporítását végezzük. Természetesen más molekuláris kronométerek, és más enzimaktivitásokat kódoló gének szaporítása is elvégezhető. A PCR eredménye tiszta tenyészetű törzs esetében homogén lesz, ugyanazon gén, vagy génrészlet akár $>10^{30}$ kópiában. (Itt nem tárgyaljuk a többes rrn operonok és egyéb polimorfizmusok [pl. SNP] kérdéskörét.). Amennyiben a kiindulási DNS heterogén volt – több, sok fajból származó -, akkor a PCR termék is vegyes lesz. A DNS bázissorrend elemzést azonban értelemszerűen homogén génszakaszon lehet elvégezni. A konszenzus PCR terméket ezért molekuláris klónozásnak vetjük alá, klóntárat készítünk. A molekuláris klónozás eredményeként nyert klónok már homogén formában tartalmazzák a vizsgált gént.

A bakteriológiai molekuláris kronométerekre alapozott klóntár előállítás során leggyakrabban az ún. kék-fehér szelekciós klónozó rendszereket alkalmazzuk (Palatinszky és mtsai, 2011). Ehhez olyan *Escherichia coli* törzset választunk, amelynek genomjából hiányzik a ß-galaktozidáz enzim (vagyis a laktóz diszacharidot nem tudja glukózra és galaktózra hasítani). Ugyanakkor ezt az enzimet egy plazmidban hordozza a sejt. A plazmid ezen kívül tartalmaz még valamilyen más „szelekciós markert" is. Legtöbbször ez antibiotikum rezisztencia gént jelent. Az *E. coli*ból kinyert plazmidot a ß-galaktozidázban található restrikciós hasító helyen felnyitjuk és a PCR segítségével nyert géntermék egy darabját beleépítjük (ligálás). A (ligáz enzimekkel) gyűrűvé zárt plazmidokat „üres" (plazmidmentes) *E. coli* sejtekbe transzformáljuk, majd megfelelő antibiotikumot és ß-galaktozidáz enzim szubsztrátot (X-gal) tartalmazó táptalajon szélesztjük. Az inkubálás során a sejtek „sorsa" háromféleképpen alakul. Egyes sejtek nem vettek fel plazmidot. Ezek a tápközegen nem fognak szaporodni és így telepet képezni, hiszen nincs megfelelő antibiotikum rezisztenciájuk. Más sejtek olyan plazmidot vettek fel, amelyikbe nem épült bele PCR termék. Ezek termelik a ß-galaktozidáz enzimet, és így bontják a táptalajhoz adott különleges szubsztrátot (X-gal). A szubsztrát bontás során képződő színanyag (kék) megkülönbözteti ezeket a telepeket azoktól, amelyekben a PCR termék beépülése elrontotta a ß-galaktozidáz enzimet (fehér).

A táptalajon kinőtt fehér telepeket izolálva külön-külön klón formájában fenntarthatjuk, vagy rögtön DNS-t izolálunk belőle és PCR-rel szaporítjuk a beépített kronométer gén darabot. A sok klónt (egy-egy ilyen vizsgálatnál több ezerről is szó lehet) klóntárba rendezzük. Ezt legtöbbször a beépített géndarab restrikciós mintázat-elemzése alapján végezzük (ARDRA vizsgálat; Márialigeti, 2008), majd az egy fajba tartozó klóncsoportok reprezentánsait vizsgáljuk tovább. Meghatározzuk a kronométer gén bázissorrendjét. A kronométer gének bázissorrendje hordozza a filogenetikai információt.

A 16S rRNS gén bizonyos szakaszai az egész élővilágban azonosak. Változatlanságukat az biztosítja, hogy az ezeket a szakaszokat érő mutációk letálisak. A gén más szakaszaiban változó gyakorisággal bekövetkezhetnek pontmutációk, mind transzverzió, tranzíció, mind pedig inverzió, vagy deléció. Ezek feltárása és megfelelő statisztikai elemzése (bioinformatika) segítségével kíséreljük meg rekonstruálni az evolúció menetét. A DNS bázissorrend elemzés módszerére e helyen nem térünk ki. Megemlítjük, hogy legjobban a DNS dependens DNS plimerázzal történő DNS szintézishez kapcsolódó bázissorrend elemzés módszerei terjedtek el (ilyen pl. a Sanger féle stopnukleotida módszer, vagy a piroszekvenálás).

Az egyes vizsgálatba vont klónok, törzsek (kronométer) gén bázissorrendjének bioinformatikai elemzése, összehasonlítása (a minőségellenőrzést követően) az illesztéssel kezdődik. A 16S rRNS-t kódoló gén az *E. coli* genomjában 7 kópiában található meg. A referenciaként szolgáló rrnB cisztron 16S rRNS génje (Brosius és mtsai, 1978) 1541 nukleotid méretű. Ehhez illesztünk, illetve a korábban már ehhez „elillesztett" törzsek, klónok autentikus referencia illesztéseit is felhasználjuk a különböző adatbázisokból. Talán a SILVA (www.arb-silva.de) riboszomális RNS adatbázis az egyik legmegbízhatóbb. Az illesztés az egyes nukleotidok OTU-k közötti azonos helyre (pozícióba, „helyi értékbe") állítását jelenti. A

munkát a hiperkonzervatív pozíciók, valamint a 16S rRNS térszerkezetének kényszerei segítik. Az illesztés nyomán kialakult adatmátrix a 7.2. fejezet végén bemutatott csoport elemzés módszerét alkalmazva használható faj, nemzetség szintű azonosításra. Nyilvánvalóan itt a kódolás nem bináris, hiszen egy-egy nukleotid pozícióban 4 bázis állhat, illetve hiányozhat is a kérdéses helyen a bázis. Másutt pedig „extra pozíciók", inzerciók is lehetnek. Az egyszerű hasonlóság eljárás segítségével nyert hasonlósági értékek és egyszerű lánc módszerrel létrehozott fenetikus hasonlósági (similarity) fák 16S rRNS-t kódoló gén esetében 95 % szinten nemzetség, 98-99,2 % szinten faji szintű azonosítást jelentenek (Stackebrandt és Goebel, 1994). Az adatokat – amint később látni fogjuk – homológiák vizsgálatával filogenetikai értékeléshez, törzsfejlődési farekonstrukciókhoz is használhatjuk. Az eredményt több kronométergén bázissorrend elemzésére alapozva (ott persze más hasonlósági értékeket kell alkalmazni) megerősíthetjük, a fajazonosítást biztossá tehetjük (MLSA - multi locus sequence analysis; több génre, génlókuszra alapozott bázissorrend elemzés). Az új generációs bázissorrend elemzés (NGS, next-generation-sequencing) segítségével akár a törzsek teljes genomját feltárva teljes genomok is összehasonlíthatóak. Ennek alapján kijelölhető egy-egy faj genomjának magja (minden törzsben egyaránt meglevő gének), a szükséges és a nélkülözhető gének csoportja (Goodfellow és mtsai, 2015).

A diagnosztikai, fajazonosító munka ezzel véget is ér. És itt a diagnosztika szót kettős értelemben használtuk, használhattuk. Vagyis jelenti a szisztematikusi/taxonómiai determináció/identifikáció szintjét, de feltétlen jelenti a fertőzések diagnosztikáját is. Egy-egy baktériumnév a megfelelő célzott terápia megkezdését jelenti, még akkor is, ha az antibiotikum rezisztencia fenotípusos megnyilvánulásának ellenőrzése tenyésztést igényel.

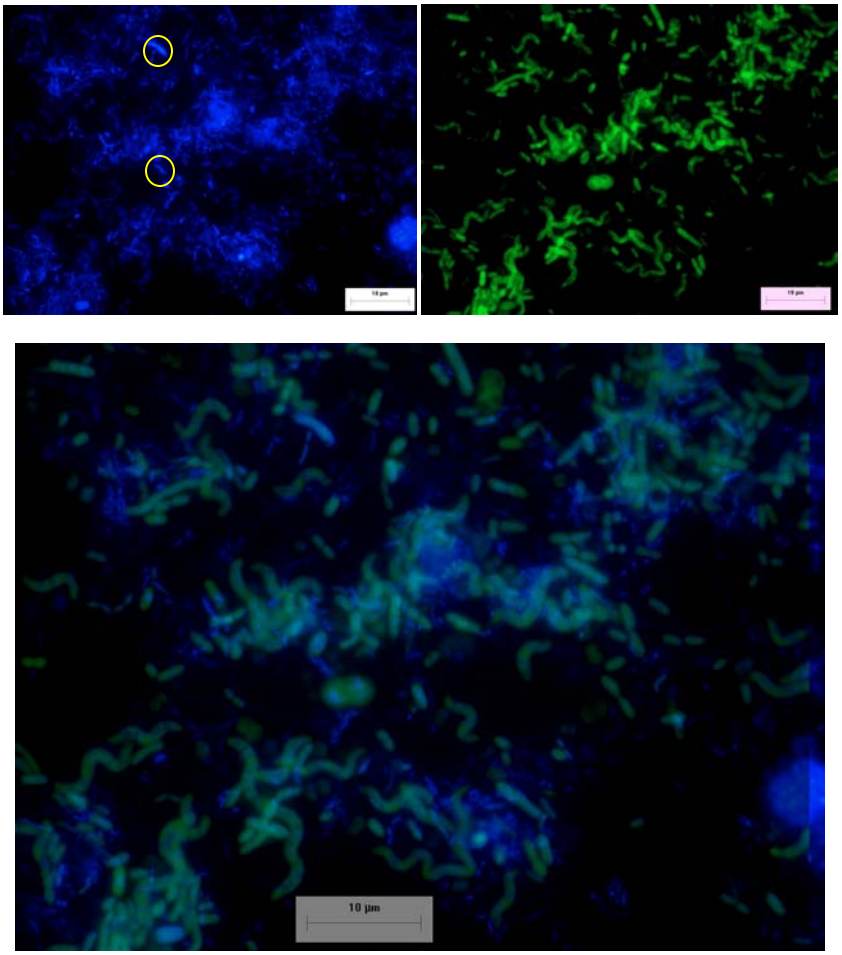
Megjegyezzük, hogy hasonlóan a tenyésztéses eljárásokhoz az előbbiekben ismertetett eljárások mindegyikének vannak torzításai, inherens hibái. Ezek következtében az az ideális állapot, amelyet a **7.3. ábrá**n színekkel, számokkal, százalékokkal feltüntettünk nem valósul meg. A minta sejtjeinek kivonásánál, dúsításánál már utaltunk arra, hogy a sejtek a minta különböző összetevőihez erősen kötődve esetleg a nukleinsav kivonási lépést megelőzően elveszhetnek. Ezen még csak-csak segíthetünk azzal, hogy a megfelelően aprított, homogenizált mintát a baktériumsejtek szelektálását kihagyva vetjük alá sejtfeltárásnak, nukleinsav izolálásnak. Ekkor jellemző hibaként számolhatunk egyes nehezen feltárható („kinyitható") sejtek nukleinsav arányának torzulásával, akár teljes hiányával. De a nukleinsav tisztítási eljárásoknak is van vesztesége nem is beszélve a cDNS előállítás komoly torzító hatásáról (egyik RNS-ből lesz, a másikból pedig nem cDNS termék az enzim „kegyeiért" versengő és egymást gátló rendszerben). A multitemplát PCR is torzít. A különböző G+C arányú és térszerkezetű DNS darabok eltérő sebességgel, vagy akár egyáltalán nem fognak szaporodni. És természetesen torzít/hibás a klóntár készítés is. Mindezekből a hibákból talán a legfontosabb és a legerőteljesebb torzulásokat a kezdő szekvenciák használata/kiválasztása okozza. Mintegy hasonlóan ahhoz, hogy tenyésztésnél több/sok különböző tápközeget kell alkalmazni, itt is javallott többféle primer alkalmazása. (Nikolausz és mtsai, 2005; Palatinszky és mtsai, 2011; Sipos és mtsai, 2007; Sipos és mtsai, 2010). Mindenesetre látnunk kell, hogy ezek a torzítások és hibák más természetűek és más jellegűek, mint a tenyésztés esetében tapasztaltak, vagyis tudásunk egy-egy minta közösségéről sokszorosára bővül az itt vázolt eljárás alkalmazásával a tenyésztéshez viszonyítva.

Korábban jeleztük már, hogy a 16S rRNS-t kódoló filogenetikai kronométer gén mellett más, fehérje kódoló gének vizsgálatára is lehetőségünk van az ismertetett eljárással. E gének egy része nemcsak fehérjeműködést (funkciót) kódol, de lehet egyben filogenetikai, fajhoz kötött információtartalma is. Vagyis a konzerváltabb funkciógének bázissorrend elemzésével legalább két információt nyerünk egyszerre: utalást a funkcióra, valamint a kérdéses funkciót ellátó és a közösségben jelen levő fajok azonosítását is elvégeztetjük egyben (pl. Táncsics és mtsai, 2010). Ha ugyanezt a vizsgálatot a minta rRNS, illetve mRNS tartalmára alapozva

végezzük, akkor az eredményeink azt is jelzik, hogy mely fajok voltak általánosságban, illetve a kérdéses funkciógén vonatkozásában a közösségben nem pusztán jelenlevőnek, hanem aktívnak tekinthető. Jelezzük, hogy a polimeráz láncreakciónak (PCR) ismerjük olyan kivitelezési módját is, amelynek segítségével meghatározható a PCR-hez felhasznált mintában a kérdéses gén kópiaszáma (qPCR, kvalitatív PCR). Ennek segítségével durva sejtszám becslés, illetve aktivitásszint becslés is végezhető. Ez utóbbi egyértelműen új, több és megbízhatóbb információ, a tenyésztéssel elérhetőhöz viszonyítva.

A molekuláris kronométereket felhasználhatjuk a mikroszkópos vizsgálatokkal nyerhető információ bővítésére, javítására is. A fluoreszcens in-situ hibridizáció (FISH, **7.1. ábra**) esetében mintánkban „in-situ" vizsgálhatjuk egyes fajok, génaktivitások meglétét. Legelső feladat fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotid próbák előállíttatása (vagy szokásos esetekben akár vásárlása). A 15-25 bázisnyi hosszúságú próbákat a kronométer, vagy funkciógén megfelelő specificitású részének (pl. csak egy adott fajra, esetleg törzsre, vagy nemzetségre, családra, specifikus, vagy valamilyen funkciót jelző) kiegészítő (komplementer) szálaként tervezzük meg és látjuk el megkülönböztethető módon fluoreszcens jelöléssel (eltérő színben fluoreszkáljanak, amennyiben együtt használjuk azokat). A rögzített mikroszkópi mintánkat sejtfallazító enzimekkel kezeljük, majd a preparátumhoz adjuk a próbákat és megfelelő puffer oldatot alkalmazva megvárjuk, amíg azok a sejtekbe diffundálnak. A próbák a sejtekben található rRNS, mRNS molekulákban a komplementer szakaszokhoz hibridizálnak. A felesleges próbát kimossuk és fluoreszcens mikroszkópban vizsgáljuk a preparátumot. Ha DAPI festést is végeztünk (lásd korábban) a megfelelő hullámhosszon a sejtek DNS állományát látjuk. A próbáknak megfelelő hullámhosszon, hullámhosszokon pedig a keresett fajok, aktivitások is láthatók. Ugyanazt a látóteret megfigyelve a különböző hullámhosszokon digitális képrögzítéssel készített felvételek a kiértékelésnél akár egymásra szerkesztve fedésbe is hozhatók. A színek alapján fajokra és aktivitásokra következtethetünk (**7.4. ábra**). Megjegyezzük, hogy a nukleinsav hibridizáció kihasználható elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzéséhez is. Természetesen ilyenkor a fluoreszcens jelölés helyett az elektronmikroszkópi vizsgálathoz alkalmas (pl. nehézfém) jelölést kell alkalmazni.

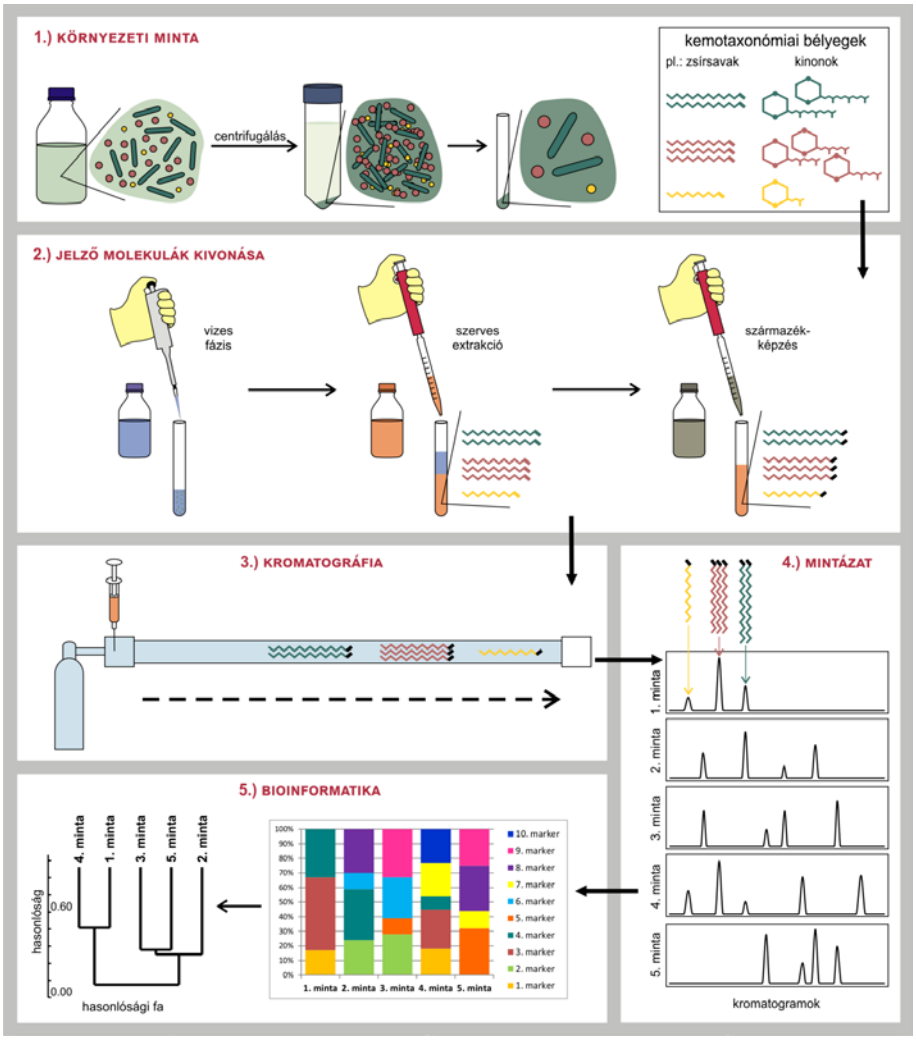
A bioinformatikai, statisztikai elemzés segítségével azonban a bázissorrend adatokból következtethetünk a vizsgálatba vont törzscsoportok, fajok filogenetikai viszonyára, evolúciós történetére is. De hasonló módon elemezhetővé válik a genomok, vagy részeik származása, esetleges horizontális génátadási jelenségek, genomi szigetek megjelenése, majd ezek fejlődése stb. Ekkor már nem pusztán és nem elsősorban az egyszerű hasonlóságot (similarity) keressük az egyes törzsek, klónok, OTU-k között, hanem az ennél mélyebb értelmű homológiát (funkcionális homológiát is) és annak időbeli változását. A csoport elemzés korábban ismertetett eljárása erre nem alkalmas. A törzsfejlődés útjait a Hennig, E.H.W. által 1950-ben bevezetett kladisztikai eljárás modern módszereivel tárhatjuk fel. Ő feltételezte, hogy az evolúció egyik általánosan érvényesülő hajtóereje az energetikailag hatékonyabb takarékosabb (parszimónia) anyagcsere-folyamatok, utak, enzimek, fajok kialakulása egy közös ősből. A fejlődést azonban csak divergens szétágazó módon képzelte el. A már említett horizontális génátvitel (akár kromoszóma méretekben) azonban merőben új lehetőséget is teremt. Korunk nagy kihívása a hálózatos evolúció szétváló és egymásba olvadó útjainak feltárása a gének, géncsoportok, kromoszómák szintjén és erre alapozva a fajok őseinek, evolúciójának felderítése.



7.4 ábra. Egy nyers szennyvíz FISH vizsgálati képe. Zöld szín (a., FITC-Eub 338 próba) a Bacteria doménbe tartozó sejteket jelöli. Kék szín (b., DAPI, a DNS-t festi) valamennyi sejtet mutatja. A fluoreszcens festéket, ill. próbát egyaránt kötött sejtek kékeszöld színben jelennek meg az egymásra illesztett képeken (c). Figyeljük meg a körökkel kiemelt részeket. A csak DAPI festődést mutató sejtek eukariótákat jelentenek (pl. protisták), vagy az Archaea domén tagjai.

7.3.2. Kemotaxonómiai és szerológiai- immunológiai baktérium közösség elemző és diagnosztikai eljárások.

A baktériumok faj-, vagy csoport specifikus kemotaxonómiai bélyegeire alapozott vizsgálat folyamatát a **7.5. ábrá**n mutatjuk be. A vizsgálat legegyszerűbb válfaját pl. a felszíni vizek minősítésében széleskörűen és gyakorta alkalmazzák. Ilyen eljárást hajtunk végre ugyanis a víz klorofill tartalmának meghatározása során. A módszertant így foglalhatjuk



7.5. ábra. Kemotaxonómiai bélyegek kivonásán és molekuláris elemzésén alapuló baktérium-közösség vizsgálat folyamatábrája.

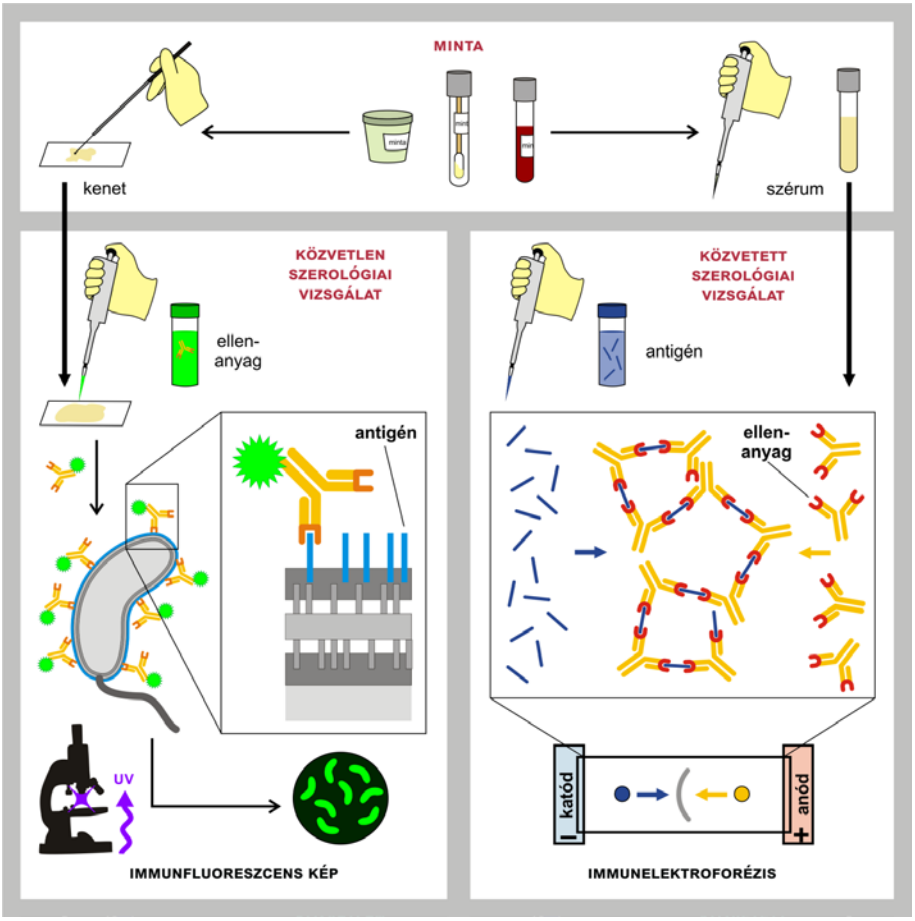
össze: meghatározott térfogatú vízmintát membránszűrőn koncentrálunk, majd a szűrőn összegyűlt sejtek pigment tartalmát forró metanollal vonjuk ki. Az a-klorofill mennyiségét spektrofotometriás méréssel határozzuk meg. A klorofill koncentrációja arányos a vízminta fototróf szervesanyag-termelő képességével (produkció), vagyis a fény hajtotta elektrontranszportlánccal rendelkező autotróf szervezetek (algák) mennyiségével (aktivitásával). Gondoljunk bele, ha meg tudjuk különböztetni a klorofill és a bakterioklorofill molekulák arányát valamilyen analitikai eljárással, akkor máris lehetőségünk terem a két fotorendszeres fotoautotrófok (klorofill, eukarióta algák és cianobaktériumok), valamint az egy fotorendszeres autotrófok (bakterioklorofill, anaerob fototróf baktériumok) szervesanyag-

termelésben betöltött szerepének becslésére.

Az előbbi példa alapján általánosítva első feladatunk a kérdéses környezet esetében vizsgálható és jellemző megfelelő kemotaxonómiai bélyeg kiválasztása, majd a mintavétel. Ezt követően a kemotaxonómiai bélyeg-molekulákat (pl. membrán zsírsavak, elektrontranszportlánc kinonjai, sejtfal jelzőmolekulák, különböző színanyagok) alkalmas szerves kivonó eljárással kinyerjük a mintából (Tóth és mtsai, 2004). A kemotaxonómiai jelző molekulák kivonatát az alkalmazni kívánt szerves elválasztás-technikai eljárás céljaira a módszer függvényében koncentráljuk/hígítjuk, illetve származékképzésnek vetjük alá. A membrán zsírsavak vizsgálata során pl. a lipidekből (foszfolipidek, trigliceridek stb.) először szappanosítással (lúgos hidrolízis) felszabadítjuk a zsírsavakat, majd a gázkromatográfiás elemzéshez zsírsav metil észter származékaikat állítjuk elő (FAME elemzés: fatty-acid-methyl-esther). A különböző kemotaxonómiai jelző molekulák kimutatására a legváltozatosabb kromatográfiás eljárásokat alkalmazzák. Törzsek sejtfal komponenseinek egyszerű elemzésében (pl. murein szerkezet) akár megfelelő papír, vagy vékonyréteg kromatográfia használható. Zsírsavak, kinonok, víz- és zsíroldható pigmentek elemzésében gázkromatográf (GC), nagyfelbontású folyadékkromatográf (HPLC), vagy változatos tömegspektrométeres (MS) és ún. kapcsolt eljárások (pl. GC-MS, HPLC-MS, GC-MC-MS), egyaránt használhatók. A törzsek vizsgálatának legmodernebb módszerei között találunk közvetlen teljes sejttömeg összetétel elemzési módszereket is (pl. MALDI-TOF). A kromatográfiás módszerekkel nyert mintázatokat a korábban már említett bioinformatikai statisztikai eljárások felhasználásával értékeljük. Törzsek esetében lehetőség nyílik faji szintű azonosításukra, míg környezeti stb. minták esetében a közösségek gyors összehasonlítását végezhetjük el, akár a főbb közösségalkotó komponensek azonosításával. Az eljárás egyébként lehetőséget teremt a(z) (közösségi) anyagcsere termékeinek elemzésére is (pl. hogyan bomlik le egy környezetszennyező anyag; Vargha és mtsai, 2005), vagy a puszta fajmeghatározáson túli diagnosztikai vizsgálatokra (pl. bizonyos típusú antibiotikum rezisztencia elemzése). Korunkban a teljes sejt kivonatokra alapozott ún. metabolomikai elemzések a hatóanyag kutatás új nagy hatékonyságú (high-throughput) módszerét jelentik.

A „nemtenyésztéses" eljárások hagyományos módszerei közé tartoznak a szerológiai, immunológiai vizsgálatok. Zömében diagnosztikai célra alkalmazzák (fertőzések kimutatása, **7.6. ábra**), de a kutatás, akár környezeti mikrobiológiai kutatás is haszonnal válogat a technikákból (Erdei, 2006). Még a durva részleteket is mellőzve az elemi logika alapján az állati, növényi „gazdában" levő fertőző baktériumok két módszerrel mutathatók ki: közvetlenül és közvetett eljárásokban. A közvetlen immunológiai vizsgálatban magát a kórokozót detektáljuk, pl. a **7.6. ábrán** jelzett mikroszkópos eljárással, míg a közvetett vizsgálat esetében a fertőzés hatására kialakuló ellenanyagválasz elemzése (általános/specifikus) tudósít(hat) a szervezet védekező reakciójáról, ill. esetenként a kórokozóról is. Ez utóbbi a növények esetében nem alkalmazható, vagy csak igen erős korlátokkal. Jelezzük, hogy ugyanez a technika elektronmikroszkópi vizsgálatoknál is bevethető alkalmas jelölések segítségével (immunogold eljárás).

A nemtenyésztéses alapeljárások ismertetésének befejeztével (hiszen a következő fejezetben a nukleinsav alapú eljárások egy új megközelítéséről lesz pusztán szó) két fogalommal még nagyon röviden meg kell ismerkedni. Az egyik fogalom azt az esetet jellemzi, amikor egy faj, vagy egy közösség vizsgálatát több alapjaiban eltérő módszer segítségével is elvégezzük (pl. tenyésztéssel, közösségi DNS alapon, valamint zsírsav metil észter elemzéssel). Ezek a polifázikus eljárások robusztusabb, megbízhatóbb eredményt adnak, hiszen az egyes eljárások hibái, torzításai a módszerek más és más szintjét, lépését érintve a fajmeghatározást, a közösség-összetétel elemzést másképp torzítják. Emiatt együtt alkalmazva egymást kiegészítik, hibáit korrigálják (pl. Felföldi és mtsai, 2010). Azt is



7.6. ábra. A közvetlen antigén kimutatáson alapuló és a közvetett, specifikus ellenanyag detektálását végző módszerek alapját bemutató folyamatábra.

észlelnünk kell, hogy valamennyi élőlény sejtjeinek felépítő anyagaiban (nukleinsav, vagy kemotaxonómiai bélyegek szintjén) fajra jellemző, de akár törzsre jellemző molekuláris bélyegek találhatók (valamennyi módszerünk erre épül). Vagyis ezek a bélyegek az illető szervezet azonosítására, felismerésére alkalmas ujjlenyomatok (fingerprint). A bakteriális közösség-elemzések módszertanában lényeges helyet foglalnak el az ujjlenyomat vizsgálati módszerek (pl. Székely és mtsai, 2009). Módszereink érzékenysége ma már akár egyetlen sejt jelenlétének kimutatását is lehetővé teszi (pl. FISH).

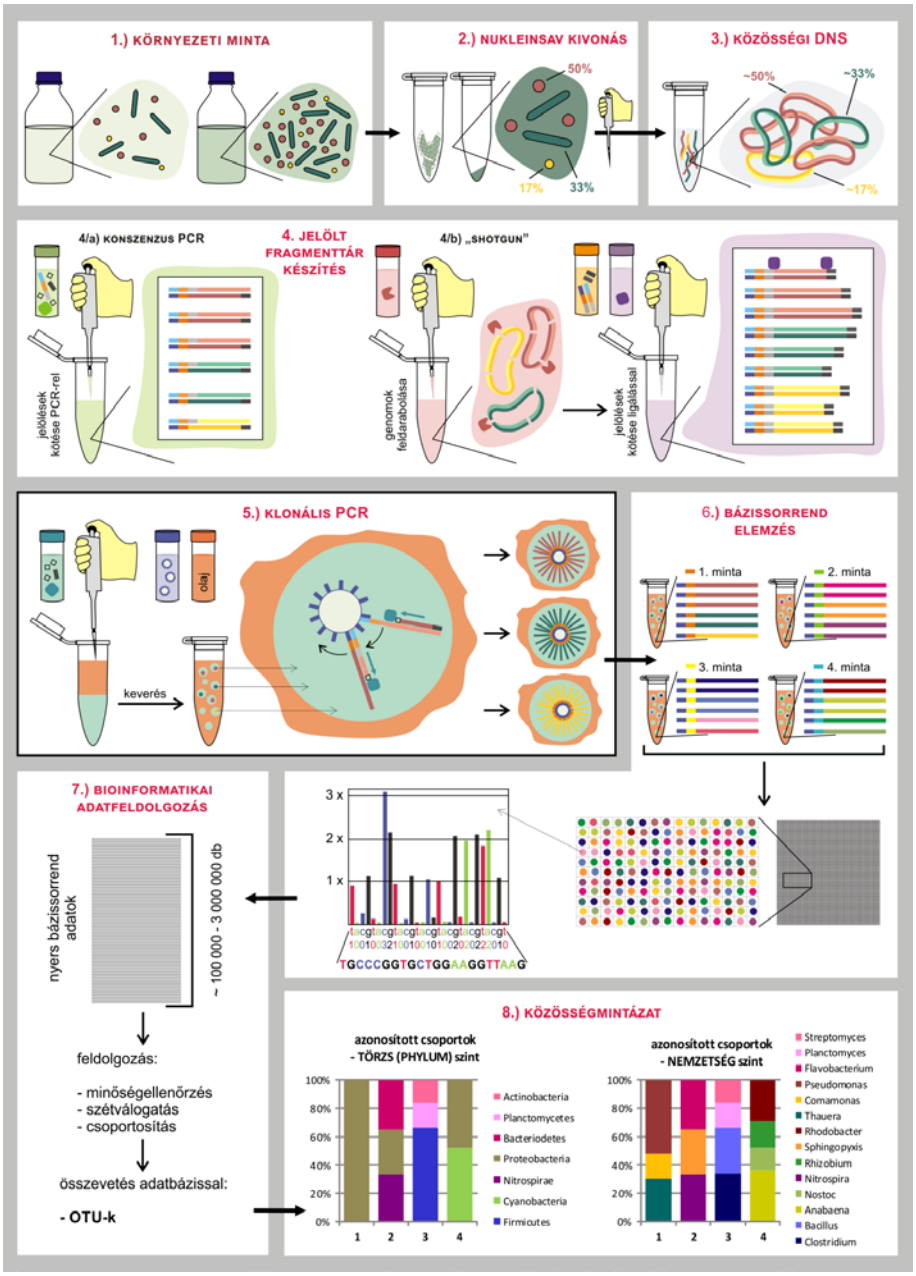
7.4. A molekuláris biológiai eljárások fejlődése, újgenerációs szekvenálás

A molekuláris kronométerek bázissorrend elemzésének eljárása, ill. általánosságban a PCR, a klónozás és a bázissorrend elemzés módszere lehetőséget teremt a baktériumok teljes genomjának, ill. egy-egy minta akár teljes genetikai állományának elemzésére. Ez utóbbi

esetben metagenom elemzésről beszélünk. Az egyes élőlények teljes genom, vagy egy-egy környezeti stb. minta metagenom elemzésének legáltalánosabb módja az ún. „shotgun sequencing" (Goodfellow és mtsai, 2015). Ez esetben a mintából kivont DNS-t mechanikus eljárásokkal véletlenszerűen a bázissorrend elemző rendszerek „leolvasási hosszának" megfelelő darabokra törjük. Leolvasási hossznak azt a nukleotidszámot nevezzük, amekkora oligonukleotidot egy „menetben" a bázissorrend elemző berendezés meg tud fejteni. Ez a mai berendezések esetén legfeljebb 500-1000 bázisnyi. A felaprított DNS-t méret szerint szelektálják (vagyis kiválogatják a kívánt hosszúságú darabokat) majd klónozzák. A klónokat nagyon nagy számban bázissorrend elemzésnek vetik alá. Olyan mennyiségű klónt elemeznek, hogy az elemzett genomot öt-tízszeres ismétlésben „lefedjék". A klónok megfejtett bázissorrendje alapján bioinformatikai elemzéssel összefüggő genomdarabokat állítanak össze (ún. kontig) az átfedések segítségével. A kontigokat pedig a megfejtett genomba rendezik össze. Ez utóbbi lépés gyakran igényel kiegészítő, célzott bázissorrend elemzést az esetlegesen hiányzó genomdarabokra.

Egy rövid számítással bemutatjuk a feladatot számokban is. Tételezzük fel, hogy egy 4,8 mb, vagyis 4.800.000 bázis méretű baktériumgenom teljes meghatározására vállalkozunk. A genomot átlagosan 800 bázisnyi darabokra törjük fel és átlagosan tízszeres ismétlésben kívánjuk a bázissorrend elemzést elvégezni. Ez azt jelenti, hogy 60.000 klónt kell elemzésnek alávetni (4.800.000 / 800 x 10 = 60.000). Ha mind a hatvanezer klón bázissorrendjét meghatároztuk és annak alapján a „kontigokat" a bioinformatikai elemzés segítségével összeállítottuk, akkor derül majd csak ki, hogy a „véletlen" mit eredményezett. Vagyis sikerült-e a genom minden részét megfejteni. A munka két legköltségesebb és legidőigényesebb feladata a klónozás és a bázissorrend elemzés. Számoljuk ki ugyanezt az értéket az emberi genom mintegy 3,235 x 10^9 bázisnyi mérete esetére! Gondoljunk abba is bele, hogy hány egyed genomját kell megismerni, hogy a genom változatosságát statisztikailag megbízhatóan megismerjük… És végezzünk számításokat arra is, hogy egy gramm szerves anyagban gazdag talaj baktériumközössége metagenomjának megismeréséhez hány klón bázissorrendjének megfejtésére lehet szükség.

Az 1980-as évektől kezdődően versenyfutás kezdődött a nagyon nagy teljesítményű bázissorrend elemzés megoldására és párhuzamosan ezzel a talán még munka- és költségigényesebb klónozás olcsó és gyors kivitelezésére. A versenyt kitűzött díjak is serkentették, de a cél az emberi genom gyors és olcsó meghatározása lehetőségének megteremtése és erre alapozva egyfajta új közegészségügy kialakítása. Mindkét területen az ezredforduló környékén jelentek meg a kereskedelmi forgalomban is hozzáférhető, megbízható automatizált rendszerek. A **7.7. ábrá**n több, lényeges pontokon eltérő eljárás közös elvét mutatjuk be. Már e ponton megjegyezzük, hogy a terület robbanásszerűen fejlődik. Évről-évre jelentenek be újabb és újabb eljárásokat és gyakorta még az egyes eljárások torzításainak, hibáinak pontos megismerése előtt a technológia „elavulttá" válik. A **7.7. ábrá**n láthatjuk, hogy a mintavételtől a közösségi DNS kinyeréséig nem változik a korábban már megismert feladatok sora. Itt már azonban legalább két irányba mehetünk tovább. Az egyik esetben a **7.3. ábrá**n követett utat választjuk: egy kronométer gén (pl. a 16S rRNS-t kódoló gén) vizsgálatát végezzük el új eljárással. Másik lehetőség, hogy teljes genom, ill. metagenom elemzést végzünk. Az előbbi esetben a PCR reakció biztosítja a bázissorrend elemzéshez szükséges méretű géndarabokat (az előbb említett 500-1000 bázisnyi hosszban). A másik esetben a tisztított közösségi DNS-t mechanikusan felaprítjuk és a



7.7. ábra. Példa az újgenerációs (NGS) bázissorrend elemzés eljárására. Az ún. DNS szintézissel történő bázissorrend elemzés jellemző eljárásai különböző kereskedelmi forgalomban kapható berendezések esetén sok tekintetben hasonlóan zajlanak.

megfelelő hosszúságú darabokat pl. speciális elektroforézissel dúsítjuk, kinyerjük. Ezután következne a klónozás hosszadalmas és költséges művelete. Ennek megoldását jelenti valamilyen „klonális PCR" eljárás.

A klonális PCR bevezető lépéseként a megfelelő méretű DNS darabok végére rákötünk általunk választott kapcsoló szekvencia darabokat, amelyek egyúttal kezdő szekvenciaként és a mintát azonosító ujjlenyomatként (feltévén, hogy párhuzamosan több mintát elemzünk) is szolgálnak. Ezt követően a kapcsolókkal kiegészített DNS darabot kicsiny, megfelelő kötőhelyeket tartalmazó gyöngyökre kötjük. Ideális esetben (megfelelő arányok biztosításával) 1-1 gyöngyön csak 1-1 DNS darab lesz. A következő lépésben három alkotó elemből emulziót készítünk („majonéz"). A három alkotó elem: i. a DNS-t megkötött gyöngyök; ii. a PCR puffer benne a szükséges enzimmel, nukleotid trifoszfátokkal, valamint; iii. olaj. A létrejött, olajban a puffer csepp, abban a DNS-t hordozó gyöngy emulziórendszer olyan, mintha milliónyi kicsiny PCR reakcióedény lenne az olajban. Az ezután elvégzett PCR eljárás eredményeképp jó eséllyel a legtöbb gyöngyön klonális PCR termék jön létre. A PCR-t követő centrifugálással visszanyerhetjük a DNS klónnal borított gyöngyöket.

A klonális PCR-t a bázissorrend elemzés folyamata követi. Az egyik eljárás-csokorban az akár csak 5-10 nm átmérőjű gyöngyöket elkülönítve „miniatűr reakcióedényekbe" juttatjuk. Egy-egy bázissorrend elemző „lapon" százezertől több millió ilyen zseb található. Ezt követően pedig a bázissorrend elemzéshez szükséges pufferben sorra egymás után a rendszerbe mossuk a nukleotid trifoszfátokat. DNS dependens DNS polimeráz enzim segítségével a klonális PCR terméket a kapcsolóktól elkezdjük szintetizálni. Minden egyes bázis beépülésekor valamilyen módszerrel detektáljuk, hogy azonosíthatóan hol és hány bázis épült be. Egyaránt létezik „fluoreszcens" eljárás és vezetőképesség változás mérésére alapozott eljárás is. A beépülés detektálását követően a reagenseket kimossák, majd következik egy másik bázis és így tovább, amíg a megfelelő hosszakat meg nem szintetizáltuk, ill. párhuzamosan le nem olvastuk.

A bázissorrend elemzés lépését ezúttal is a bioinformatikai statisztikai adatfeldolgozás követi. A végső eredmény konszenzus PCR esetében a közösség fajspektrumának nagyfelbontású megismerése. Egy-egy törzs teljes genom elemzése esetében a megfejtett genom. Egy-egy minta metagenom elemzése esetében pedig több, sok szinten elemezhetjük az eredményt. Nyilvánvalóan nyerünk taxonómiai (fajspektrum) adatokat. Ezzel párhuzamosan azonban az enzimaktivitásokat kódoló gének jelenlétét, változatosságát is feltárhatjuk. Ezek az adatok a közösségi anyagcsere jellemző útjait fogják bemutatni. A bázissorrend elemzések eredményét kontigokba is rendezhetjük. Egy-egy kontig – amennyiben tartalmazza a 16S rRNS-t kódoló gént is – „összeköti" a fajt és a funkciót, vagyis a közösségi anyagcsere esetében az is kiderül, hogy a jellemző folyamatokat mely fajok végzik. És természetesen mindez nem pusztán a baktériumokra igaz, de a minta egyéb mikro- és makro-szervezeteire más mikrobákra is (pl. gombák, egyéb eukarióták, vírusok).

Fenti leírás alapján elképzelhetjük azt a hihetetlen adattömeget, amelyet az új generációs bázissorrend elemzés a genomika, metagenomika révén nyújt. Hasonló vizsgálatok elvégezhetők azonban egy-egy faj, vagy vegyes minta mRNS állománya (stb.) vonatkozásában is. Az eredményt transzkriptomika, metatranszkriptomika szakterülete hozza létre, elemzi. A bakteriológia terepén maradva egy-egy traszkriptom elemzés az adott minta pillanatnyi enzimtermelési potenciáljáról tanúskodik. A valós enzimtermelést – teljesen más módszertant igénybe véve – a proteom, metaproteom vizsgálatok eredményeként mutathatjuk ki. Nevéből kikövetkeztetve itt egy-egy minta teljes fehérje spektrumát elemezzük. A hihetetlen adattömegek értelmezését pedig a bioinformatika új tudományának szakavatott művelői segítségével lehet elvégezni.

A korábbi fejezetekben jeleztük már, hogy valamennyi eljárás estében számolnunk kell torzításokkal, hibákkal. Az itt ismertetett NGS eljárások talán legnagyobb mértékű szelektivitását, torzítását a PCR változatlan szükségessége okozza. A PCR esetében a kezdő

szekvencia (primer) fogja ugyanis meghatározni, hogy rendszerünk „mit lát". Bármennyire is törekszünk, nincs valóban működő univerzális (az egész élővilágra általánosan alkalmazható) kezdőszekvencia. Az újgenerációs szekvenálási eljárások legfontosabb fejlesztési területe emiatt az érzékenység növelése, vagyis az egy DNS darabra (megsokszorozás nélkül) végrehajtható bázissorrend elemzés módszerének kidolgozása.

A proteomikai elemzések során a mintánkból kivont és tisztított vegyes fehérje állományt kétdimenziós nagyfelbontású gélelektroforézissel választjuk szét (az első dimenzió általában izoelektromos fókuszálás, a második ennek eredményére alkalmazott poliakrilamid gélelektroforézis). A fehérje foltok gélbeli eloszlása már információt hordoz (másik ilyen mintázattal összevethető), de az egyes fehérjék a „foltokból" kinyerhetők és részleges aminosav sorrend elemzés segítségével azonosíthatók (enzimcsaládokban sorolhatók). Az így nyert információtömeg a sejtek aktuális fenetikus állapotát (működését) mutatja be.

E fejezetben a nagy adattömegeket eredményező (high-throughput) eljárásoknak egy részét mutattuk be röviden. Feltételezzük, hogy ez alapján is elképzelhető az az adat és információ robbanás, amely ma a biológiát általában és a mikrobiológiát, benne a bakteriológiát különösen is jellemzi. Az adatbázisokból gének és genomok változatossága törzsfejlődési, evolúciós rendszere, gének szabályozó elemei, anyagcsere utak, szabályozási hálózatok, enzim állományok, közösségi rendszerek és anyagcsere hálózatok rekonstruálhatók. Az új felismerések és felfedezések özöne eddig nem tapasztalt lehetőséget jelent a biotechnológia számára. Bármily csekély arányú is a gyakorlati alkalmazásba vonható eredmény, ez is sokszorosa a korábbi évtizedekben tapasztaltnak. A megszerzett tudás egy része relatíve rövid idő alatt fordítható az emberiség hasznára, akár az élelmiszeripar, a gyógyszeripar, a környezetvédelem, vagy a mezőgazdaság stb. területén.

Ajánlott irodalom

Bohus, V., Tóth, E.M., Székely, A.J., 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. Water Research, 44, 6124-6132.

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4801-4805.

Erdei, A. 2006. Immunológiai módszerek. Medicina, pp. 556.

Felföldi, T., Székely, A.J., Gorál, R., Barkács, K., Scheirich, G., András, J., Rácz, A., Márialigeti, K. 2010. Polyphasic bacterial community analysis of an aerobic activated sludge removing phenols and thiocyanate from coke plant effluent. Bioresource Technology, 101, 3406-3414.

Goodfellow, M., Sutcliffe, I., Chun, J. 2015. New Approaches to Prokaryotic Systematics. Elsevier, Amsterdam, pp. 456.

Hennig, W. 1950. Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Deutscher Zentralverlag, Berlin, pp. 370.

http://www.arb-silva.de/ - **A comprehensive on-line resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data.** SILVA are the official databases of the software package ARB.

Jones, J.G., Simon, B.M. 1975. An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters. Journal of Applied Bacteriology, 39, 317-329.

Makk, J. A kén körforgalma. 2013. In: Márialigeti, K. Bevezetés a prokarióták világába. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, pp. 244-250.

Márialigeti, K. 2008. A nemtenyésztéses diverzitáselemző molekuláris eljárások haszna. Doktori értekezés, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, pp. 225.
Márialigeti, K., Romsics, Cs. 2012. Mintavételezés környezeti mikrobiológiai elemzésekhez. In: Óvári, M., Tatár, E. Környezeti mintavételezés. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Typotex, Budapest, pp. 125-144.
McCrady, M.H. 1915. The numerical interpretation of fermentation-tube results. J. Infect. Dis. 17, 183–212.
Mészáros, É., Sipos, R., Pál, R., Romsics, Cs., Márialigeti, K. 2013. Stimulation of trichloroethene biodegradation in anaerobic three-phase microcosms. International Biodeterioration & Biodegradation, 84, 126-133.
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. Journal of Microbiological Methods, 56, 365-373.
Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A., Márialigeti, K. 2005. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. FEMS Microbiology Letters, 244, 385-390.
Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. The Journal of Microbiology, 43, S, 93–100.
Palatinszky, M., Nikolausz, M., Sváb, D., Márialigeti, K. 2011. Preferential lligation during TA-cloning of multitemplate PCR products - A factor causing bias in a microbial community structure analysis. Journal of Microbiological Methods, 85, 131-136.
Podani, J. 1997. Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe. Scientia Kiadó, Budapest, pp. 412.
Révész, S., Sipos, R., Kende, A., Rikker, T., Romsics, C., Mészáros, É., Mohr, A., Táncsics, A., Márialigeti, K. 2006. Bacterial community changes in TCE biodegradation detected in microcosm experiments. International Biodeterioration & Biodegradation, 58, 239-247.
Russell, W.C., Newman, C., Williamson, D.H. 1975. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. Nature, 253, 461–462.
Sipos, R., Székely, A., Révész, S., Márialigeti, K. 2010. Addressing PCR Biases in Environmental Microbiology Studies. In: Cummings, S.P. (szerk.) Bioremediation. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, Humana Press, New York, pp. 99- 125.
Sipos, R., Székely, A.J., Palatinszky, M., Révész, S., Marialigeti, K., Nikolausz, M. 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene targeting bacterial community analysis. FEMS Microbiology Ecology, 60, 341-350.
Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. 1963. Principles of numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, pp. 218.
Stackebrandt, E., Frederiksen, W. Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. 2002. Report on the ad-hoc committee forr re-evaluation of the species definition in bacteriology. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 1043-1047.
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. International Journal of Systematic Basteriology, 44, 846-849.
Staley, J.T., Konopka, A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu. Rev. Microbiol., 39, 321-

346.
Székely, A., Sipos, R., Berta, B., Vajna, B., Hajdu, C., Márialigeti, K, 2009. DGGE and T-RFLP Analysis of Bacterial Succession during Mushroom Compost Production and Sequence-aided T-RFLP Profile of Mature Compost. Microbial Ecology, 57, 522-533.
Táncsics, A., Szabó, I., Baka, E., Szoboszlay, S., Kukolya, J., Kriszt, B., Márialigeti, K. 2010. Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. Systematic and Applied Microbiology, 33, 398-406.
Tóth, E.M., 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., Krištůfek, V., Elhottovám D,, Malým D. (szerk.) Present methods for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates. Institute of Soil Biology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, Ceske Budejovice, Csehország, pp. 31-37.
Vargha, M., Takáts, Z., Márialigeti, K. 2005. Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. Water Research, 39, 1560-1568.
Woese, C.R., Fox, G.E. 1977 Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, pp. 5088-5090.
Zuckerkandl, E. Pauling, L. 1965 Molecules as Documents of Evolutionary History. Journal of Theoretical Biology, 8, 357-366

8. AZ EMBER ÉS BAKTÉRIUMKÖZÖSSÉGE

8.1. Az emberi test baktérium partnereinek megismerése

Az emberi szervezethez köthető mikroorganizmusok jelenlétéről szóló első feljegyzések a XVII. századból származnak, amikor Antoni van Leeuwenhoek a saját maga készítette nagyító segítségével először figyelte meg és rajzolta le a fogkaparékban lévő parányi élőlényeket, amelyeket apró állatkáknak („animalcula") nevezett el. Bár tudományos feljegyzéseiről számos levélben beszámolt a Londoni Királyi Társaságnak, mégis felfedezéseinek fontossága hosszú ideig feledésbe merült. A XIX. század második felétől, a ma már hagyományosnak nevezett tenyésztési módszerek fejlődésével egyre több, bár elsősorban kórokozó mikroorganizmus tenyésztésbe vonására és tanulmányozására nyílt lehetőség (**8.1. táblázat**). Az egészséges emberi szervezet mikroba partnereinek megismerése a mikrobiológiai vizsgáló módszerek, pl. az anaerob tenyésztési technikák fejlődésével párhuzamosan a XX. században vett egyre nagyobb lendületet. A tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerek körének bővülése és alkalmazása hozta meg azt a napjainkban is tartó áttörést, ami a velünk együtt élő mikrobaközösségek összetételéről és szerepéről alkotott ismereteink korábban felbecsülhetetlen mértékű növekedéséhez vezetett.

Az USA-ban lévő National Institutes of Health (NIH) által alapított Humán Mikrobiom Projektet (HMP) 2008-ban azzal a céllal hozták létre, hogy lehetővé tegyék az emberi mikrobaközösség (mikrobiom) teljes körű feltárását és az ember egészségének és betegségének alakulásában játszott szerepének megismerését. A „mikrobiom" kifejezést először Joshua Lederberg alkalmazta 2001-ben annak az emberrel kommenzalista, mutualista és patogén kapcsolatban együtt élő mikrobaközösségnek a meghatározására, amelyikkel a szó legszorosabb értelmében megosztjuk testünket, és amelyiknek meghatározó szerepe van egészségi állapotunk szempontjából is (Lederberg és McCray, 2001). A hagyományos mikrobiológiai vizsgálatok a mintából izolált és laboratóriumi körülmények között fenntartott tiszta tenyészetek tanulmányozására irányultak. A mikroorganizmusok többségét azonban még napjainkban sem tudjuk tenyésztésbe vonni, például azért, mert azok természetes körülmények között olyan sajátos mikrokörnyezetben élnek, amit nem lehet vagy még nem sikerült kísérletes úton reprodukálni. A DNS bázissorrend elemzésén alapuló, tenyésztéstől független módszerek, pl. a metagenomika, új lehetőséget nyitottak a mikrobaközösségek széles körű vizsgálatára. A HMP keretében a tenyésztésbe vont törzsek genetikai elemzése a humán mintákból származó mikrobaközösségek közvetlen genomikai elemzésével kiegészülve az emberi mikrobiális közösségek ez idáig soha nem látott komplexitásának feltárását teszi lehetővé. A HMP által kitűzött legfontosabb célok a következők: 1) egy 3000 mikrobiális genom szekvenciából álló referencia adatbázis létrehozása; 2) 16S és teljes genom szekvencia adatok alapján az egyes testtájakra jellemző mikrobiális közösségek komplexitásának megismerése és a testtájakra jellemző „mag"mikrobiom létezésének igazolása; 3) a betegségek és a humán mikrobiomban bekövetkező változások közötti kapcsolatok feltárása; 4) egy adatelemző és koordináló központ (DAAC) létrehozásával a számítógépes elemzéshez szükséges új eszközök és technológiák fejlesztése; 5) a humán mikrobiom metagenomikai elemzésével nyert eredmények alkalmazására vonatkozó etikai, jogi és társadalmi következmények (ELSI) vizsgálata.

8.2. A humán mikrobiom

Az ember, mint gazdaszervezet számos mikroorganizmus számára kínál kedvező környezeti feltételeket, hiszen a kemoorganotróf mikroorganizmusok növekedéséhez és szaporodásához szükséges szerves tápanyagokban és növekedési faktorokban gazdag miliő,

ahol a környezeti feltételek (pl. pH, ozmotikus nyomás, hőmérséklet) szabályozottak. Ennek ellenére nem tekinthető egységes környezetnek, az emberi test egyes testrészeinek vagy szerveinek fizikai és kémiai tulajdonságai nagymértékben különböznek egymástól, és az így kialakuló változatos mikrokörnyezetek sokszínű és fajgazdag mikrobiótának adnak otthont.

8.1. táblázat. A legkorábban leírt emberi kórokozó baktériumok.

Tudós	Év	Kórokozó baktérium	Betegség
Hansen, Armauer	1873	*Mycobacterium leprae*	lepra
Neisser, Albert	1879	*Neisseria gonorrhoeae*	kankó (tripper)
Ogston, Alexander	1881	*Staphylococcus* sp.	
Friedländer, Carl	1882	*Streptococcus pneumoniae*	tüdőgyulladás
Koch, Robert	1882	*Mycobacterium tuberculosis*	tüdőgümőkór (tbc)
Fränkel, Albert	1884	*Klebsiella pneumoniae*	tüdőgyulladás
Löffler, Friedrich	1884	*Corynebacterium diphteriae*	torokgyík
Nicolaier, Arthur	1884	*Clostridium tetani*	tetanusz
Bruce, David	1887	*Bacillus melitensis*	máltai láz
Schaudinn, Fritz és Hoffmann, Erich	1905	*Treponema pallidum*	vérbaj (szifilisz)

Különféle mikroorganizmusok az emberi test számos részén képesek megtelepedni, hogy békésen velünk együtt élve kialakítsák az ún. normál mikrobiótát. Míg az emberi szervezet külső és belső felületei (pl. a bőr, a nyálkahártyák, a tápcsatorna) állandó kapcsolatban vannak a külső környezettel és különféle mikroorganizmusok által kolonizáltak, addig az egészséges ember belső szervei, szövetei (pl. az agy, a gerincvelői folyadék, a vér, az izmok) mentesek a mikroorganizmusoktól. Becslések szerint a humán mikrobióta alkotásában résztvevő sejtek száma megközelítően 10^{14}, ami körülbelül 10-szer több, mint az emberi testet felépítő sejtek száma. A baktériumsejtek kis mérete miatt a mikrobiális biomassza tömege az emberi test tömegének körülbelül 1-3%-a. Korábban az egészséges ember mikrobaközösségeit csak kommenzalista partnerekként tartották számon, ma azonban már tudjuk, hogy ezeknek a mikrobaközösségeknek a korai fejlődési szakaszokban éppúgy fontos szerepe van, mint később az egészség megőrzésében vagy a betegségekkel szembeni fogékonyság alakulásában.

A mikrobióta/mikrobiom nevezéktanban való eligazodás nem könnyű feladat, mert napjainkban ezek a fogalmak kissé összemosódtak. A hagyományos definíció alapján mikrobióta alatt az emberi szervezethez köthető mikrobiális taxonok összességét értjük, míg a mikrobiom az emberi szervezethez köthető valamennyi mikroorganizmust és annak teljes genetikai állományát is magában foglalja. Az ember normál mikrobiótájának az egyes testtájakra legjellemzőbb baktérium és gomba nemzetségeit az **8.2. táblázat**, ill. **8.1. ábra** összegzi.

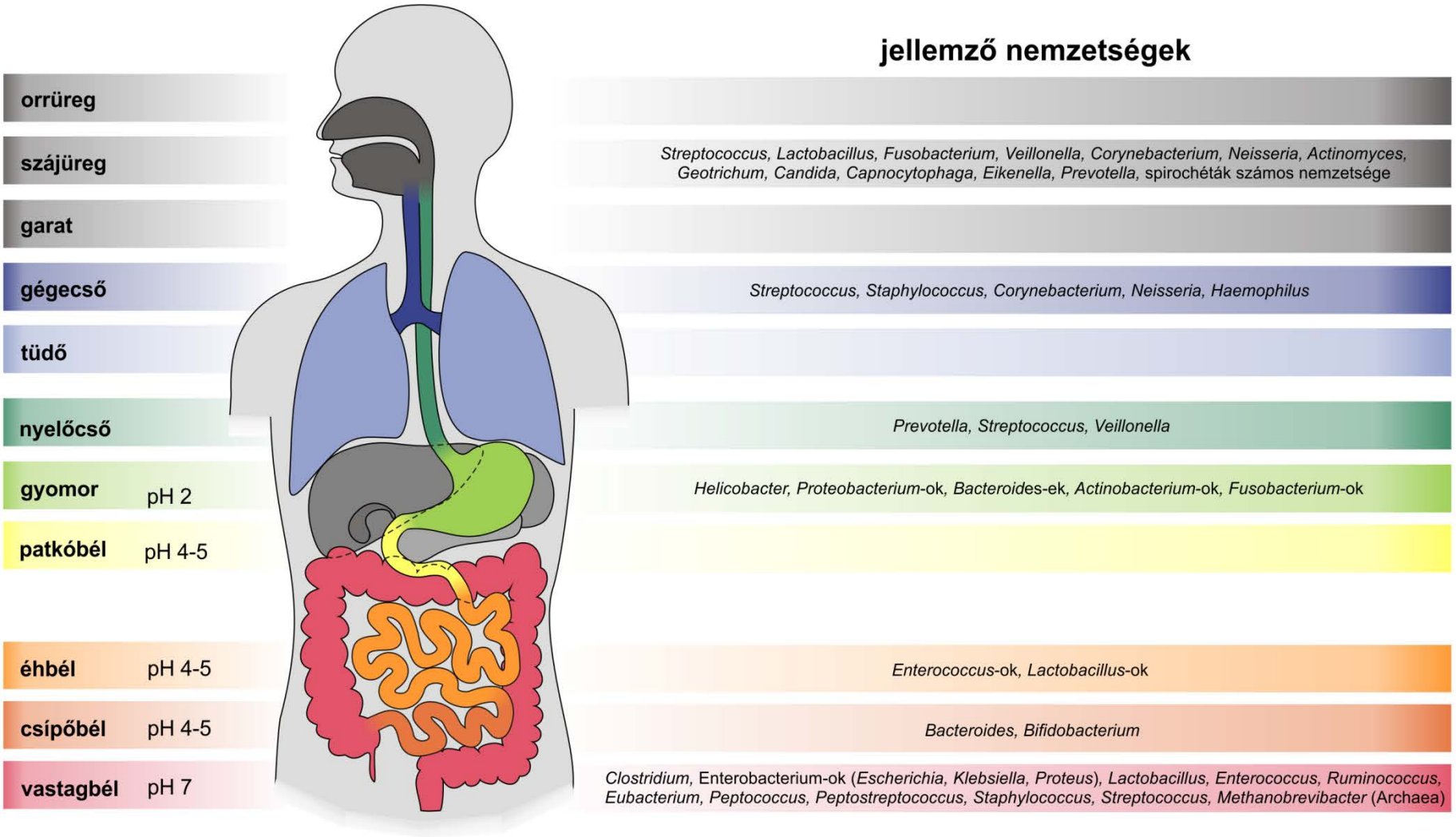
Ahhoz, hogy megismerjük, hogy milyen szerepet töltenek be a mikroorganizmusok a gazdaszervezet életében, a gnotobiotikus állatok tanulmányozása kiváló lehetőséget kínál. A normál és a gnotobiotikus állatok összehasonlításával feltárhatjuk a mikroorganizmusok és a gazdaszervezet közötti kölcsönhatásokat. A gnotobiotikus (gnotos: görög tudás; biota: élő közösség) kifejezésnek napjainkban többféle értelmezése létezik. Néhányan úgy gondolják, hogy a gnotobiotikus környezet, vagy állat esetében a teljes mikrobióta ismert, míg mások a teljes csíramentességet értik a fogalom alatt. Egy általánosabb értelmezés szerint a gnotobiotikus az előbbi két értelmezés kombinációjával olyan mikrobiológiailag ellenőrzött környezetre, vagy állatra vonatkozik, amelyik vagy csíramentes (axénikus), vagy amelynek a mikrobiótája teljesen ismert.

8.2. táblázat. Az emberi normál mikrobióta testtájanként legjellemzőbb nemzetségei ([g], gomba].

Testrész	Mikroorganizmus nemzetség vagy nagyobb taxonómiai csoport
Bőr	*Acinetobacter, Corynebacterium, Enterobacter, Klebsiella, Proteus, Micrococcus, Malassezia* (g), *Pityrosporum* (g), *Propionibacterium, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus*
Szájüreg	*Streptococcus, Lactobacillus, Fusobacterium, Veillonella, Corynebacterium, Neisseria, Actinomyces, Geotrichum* (g), *Candida* (g), *Capnocytophaga, Eikenella, Prevotella,* spirochéták (számos nemzetség)
Légzőrendszer	*Streptococcus, Staphylococcus, Corynebacterium, Neisseria, Haemophilus*
Gyomor-bélrendszer	*Lactobacillus, Streptococcus, Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Clostridium, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Enterococcus, Staphylococcus, Methanobrevibacter,* Gram-pozitív baktériumok, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria
Húgy- és ivarszervek	*Escherichia, Klebsiella, Proteus, Neisseria, Lactobacillus, Corynebacterium, Staphylococcus, Prevotella, Clostridium, Peptostreptococcus, Ureaplasma, Mycoplasma, Mycobacterium, Streptococcus, Candida* (g), *Torulopsis* (g)

Elsőként Luis Pasteur hívta fel a figyelmet arra, hogy az állatok nem képesek mikroorganizmusok nélkül élni. Az 1899 és 1908 között csíramentes csirkék felnevelésére tett kísérletei korlátozott sikerrel jártak, mivel az állatok rendszerint egy hónap alatt elpusztultak. Ennek alapján jutott arra a következtetésre, hogy a bélbaktériumok elengedhetetlenek a csirkék megfelelő táplálkozásához és egészségének fenntartásához. A normálishoz hasonló csíramentes csirkéket először 1912-ben sikerült életben tartani sajátos étrend biztosításával. Azóta a gnotobiotikus állatok és környezetek alapvető fontosságúak a mikroorganizmusok és az állatok közti kapcsolatrendszerek kutatásában, hiszen az így elvégzett kísérletek segítségével fontos ismeretek birtokába jutottunk. Megállapítást nyert, hogy a csíramentes állatok általában érzékenyebbek a kórokozókkal szemben, mivel a kommenzalista mikrobióta hiányában a kórokozók könnyebben meg tudnak telepedni és gyorsabban el tudnak szaporodni a gazdaszervezetben. Ezen kívül a csíramentes állatokban sokkal kisebb számú kórokozó is elegendő a fertőzés és a kóros állapot kialakításához, az immunsejtjeik száma és aktivitása is csökken. A baktériumoktól teljesen elzárt környezetben felnevelt kísérleti állatok immunrendszere súlyos hiányosságokat mutat, bélcsatornájuk fejlődése is elmarad a normálistól. Megfigyelték azt is, hogy a csíramentes állatokban nem alakul ki a fogfelszínen sem plakk képződés, sem fogszuvasodás. Ha azonban ezeket az állatokat beoltjuk a fogszuvasodást előidéző *Streptococcus mutans* és *Streptococcus gordonii* baktériumfajok törzseivel és szacharózban gazdag táplálékot biztosítunk számukra, a fogszuvasodás folyamata kiváltható.

A mikroorganizmusokkal élethosszig tartó kapcsolat kialakulása a születéssel kezdődik. A méhen belül az emberi magzat, csakúgy, mint a legtöbb emlősé, rendszerint mikroorganizmusoktól mentes. A magzat már a születés során kapcsolatba lép az anyai hüvely nyálkahártyájával, majd ezt követően az újszülött találkozik az anyai bőrön, a levegőben, illetve más nem steril tárgyak felületén lévő mikroorganizmusokkal. A természetes úton született újszülöttek mikrobiótája már 20 perccel a születést követően nagyfokú hasonlóságot mutat az anyai hüvely mikrobiótájával, míg a császármetszéssel világra hozott csecsemők mikrobiótája az emberi bőrre jellemző mikroorganizmusokat tartalmazza. A csecsemők kezdeti mikrobiótája már a születés utáni első két hétben stabilizálódik, testfelületének mikrobiótája kezdetben nagymértékben függ a környezetétől,



8.1. ábra. Az emberi test jellemző baktériumközösségei.

hiszen annak elsődleges forrását az őt gondozók, a vele együtt élők jelentik. A mikrobiális kolonizáció szempontjából az újszülött gyomor-bélrendszere is teljesen új környezetnek tekinthető. A kezdetben steril bélrendszer mikroorganizmusokkal történő benépesülése közvetlenül a születést követően kezdődik, és az egymást követő mikrobapopulációk szukcesszója egészen addig tart, míg a felnőtt egyénre jellemző stabil mikrobaközösség ki nem alakul. A korai kolonizálók eredete nem teljesen tisztázott, bár egyes mikroba fajok egyértelműen az anyáról kerülnek a csecsemőre. A szoptatott csecsemők bélmikrobiótájának több mint 90%-át bifidobaktériumok alkotják, mellettük még az Enterobacteriaceae család tagjai és enterokokkuszok fordulnak elő kisebb arányban. Mivel a mesterségesen táplált csecsemők bélmikrobiótájában a bifidobaktériumok sokkal kisebb arányú jelenléte jellemző, valószínűsíthető, hogy az anyatej egyfajta szelekciós tényezőként hat a nem kórokozó baktériumok megtelepedésének elősegítésében. A kisgyermek bélmikrobiótájában a következő változás az anyatejről a tehéntejre, illetve a szénhidrátokban gazdag szilárd táplálékokra való áttéréssel kezdődik meg, ami a bélmikrobiótában a bifidobaktérium túlsúly elvesztésével és az Enterobacteriaceae, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* és *Clostridium* taxonokba tartozó baktériumok mennyiségének növekedésével jár együtt. A felnőtt étrendre való áttérés azonban nem csak a mikrobióta összetételének a változását eredményezi, hanem pl. a poliszacharidok lebontásáért és egyes vitaminok bioszintéziséért felelős gének aktivitásának fokozódásával is együtt jár. A felnőttekre jellemzőhöz hasonló bélmikrobióta a vizsgálatok alapján legkorábban 1 éves kor körül alakul ki.

Egy átlagos felnőtt ember testét körülbelül 2 m^2 bőr borítja, és ez a felület megközelítőleg 10^{12} baktériumsejtnek ad otthont. Hangsúlyozni kell azonban, hogy a bőr a mikrobás invázió számára erős mechanikai gátat képez, mivel csak néhány mikroorganizmus képes a többrétegű elszarusodó és egymással szorosan záródó hámsejteken áthatolni. Ezen kívül a bőrfelszíni sejtek folyamatos hámlása is hozzájárul a bőr felületéhez tapadt mikroorganizmusok eltávolításához. A bőr felszíne az enyhén savas pH, a viszonylag nagy NaCl koncentráció, faggyúmirigyek aktivitása révén lipidekben gazdag, a sok helyütt megfigyelhető kis vízaktivitás (a fizikailag és kémiailag szabad, a mikroorganizmusok számára hozzáférhető víz mennyisége) és bizonyos bakteriosztatikus, vagy baktericid vegyületek jelenléte miatt összességében nem a legalkalmasabb hely a mikrobiális kolonizációra. A bőr kémiai környezete és nedvességtartalma a test különböző részein jelentősen eltérő, ezért a bőrön számos különböző mikrokörnyezet alakul ki, ami a normál mikrobióta összetételében is tükröződik. Jellegzetes nedves bőrfelszíni mikrokörnyezetek találhatók az orrüreg, a hónalj, a könyökhajlat, a térdhajlat, a köldök vagy az ujjak közti területeken, melyek esetenként néhány centiméternyi távolságban találhatók az olyan száraz mikrokörnyezetektől, mint amilyen pl. az alkar vagy a fejbőr. Az előbbiektől nagymértékben eltérő mikrokörnyezetet képeznek a faggyú- és verejtékmirigyek.

Egy napjainkban metagenomikai megközelítéssel, a 16S rRNS gén bázissorrendjének meghatározásával végzett kutatás, 10 önként jelentkező egészséges felnőtt ember 20 különböző bőr régió mikrobiomjának összehasonlító elemzésével összesen 19 különböző bakteriális phylum (filogenetikai törzs) jelenlétét tárta fel, melyek közül 4 (Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria és Bacteroidetes) tette ki az elemzett szekvenciák 99%-át. Az azonosított baktérium nemzetségek száma meghaladta a 200-at, de közülük mindössze háromba (*Corynebacterium, Propionibacterium, Staphylococcus*) tartozott a szekvenciák több mint 60%-a. Mindhárom korábban említett bőr mikrokörnyezet saját jellemző mikrobiótával rendelkezett. A száraz területek vegyes mikrobiótájában a Betaproteobacteria, Corynebacteria és Flavobacteriales taxonómiai csoportok képviselői fordultak elő a legnagyobb arányban. A nedves területeken a korinebaktériumok és a sztafilokokkuszok, míg a mirigyes területeken a propionibaktériumok és a sztafilokokkuszok voltak dominánsak.

A bőr mikrobiótáját alkotó legtöbb baktérium a felszíni vagy az elhalt sejteket kolonizálja, illetve a verejték- és faggyúmirigyeket népesíti be. A mirigyek által termelt váladék biztosítja a tápanyagként szolgáló vizet, aminosavakat, karbamidot, elektrolitokat és specifikus zsírsavakat elsősorban a *Staphylococcus epidermidis* és az aerob korinebaktériumok számára. Gram-negatív baktériumok általában a nedvesebb bőrfelszíneken fordulnak elő. A *Pityrosporum ovale* és a *P. orbiculare* élesztők a fejbőrön jellemzőek, ahol szerepet játszanak a korpásodásban. A faggyúmirigyekben a Gram-pozitív, anaerob, lipofil, pálca alakú *Propionibacterium acnes* a legelterjedtebb baktérium. Ez a rendszerint ártalmatlan baktérium közrejátszik az acne vulgaris bőrbetegség kialakulásában is. A bőrbetegség tünetei rendszerint a serdülőkorban jelentkeznek, amikor az endokrin rendszer működése fokozódik. A hormonális aktivitás serkenti a faggyúmirigyekben a faggyú túltermelését és felhalmozódását, ami kedvező feltételeket teremt a *P. acnes* elszaporodásának, segíti a gyulladáskeltő szabad zsírsavak termelését. Bizonyos egyénekben a faggyútermelés, majd az irritáló és gyulladáskeltő hatású szabad zsírsavak mennyiségének fokozódása először csak mikroszkóposan megfigyelhető fiziológiás, majd szabad szemmel is látható kóros elváltozásokat idézhet elő, ami végül az acne vulgaris kifejlődését eredményezheti. A mitesszereknek vagy pattanásoknak nevezett gyulladásos elváltozások akkor alakulnak ki, amikor szarusejtekből, faggyúból és baktériumsejtekből álló, komedónak nevezett dugók képződnek a mirigyek kivezető csatornáiban. Az acne vulgaris nem fertőző betegség, annak ellenére, hogy kialakulásában *P. acnes* baktériumnak jelentős szerep tulajdonítható. Antibiotikummal (pl. tetraciklinnel) történő kezelése általában hatásos.

A verejtékmirigyek pl. lizozimot (muramidáz enzimet) termelnek, ami a Gram-pozitív baktériumok (pl. a *Staphylococcus epidermidis*) sejtfalának legnagyobb részét képező mureinben az N-acetil-glükózamin és az N-acetil-muraminsav közti glikozidos kötést hasítja, ezáltal a sejtek pusztulását idézi elő. A verejtékmirigyek ezen kívül a bakteriális sejtmembránban pórusokat képző, katelicidinnek nevezett anitmikrobiális fehérje szintézisével védekeznek pl. a fertőző mikroorganizmusokkal szemben. A faggyúmirigyekben szintetizálódó komplex lipideket egyes Gram-pozitív baktériumok (pl. a *Propionibacterium acnes*) enzimeik segítségével részben lebontják. A lipidek helyébe lépő telítetlen zsírsavaknak (pl. olajsav) erős antimikrobiális hatása van a Gram-negatív baktériumokkal és bizonyos gombákkal szemben. A képződő telítetlen monokarbonsavak egy része jellegzetes szagú illó zsírsav, aminek a testszag kialakulásában is szerepe van. Sok dezodor tartalmaz olyan antimikrobiális hatású vegyületet, amelyik szelektíven a Gram-pozitív baktériumok szaporodásának gátlásával csökkenti az illékony zsírsavak termelését és a testszag kialakulását.

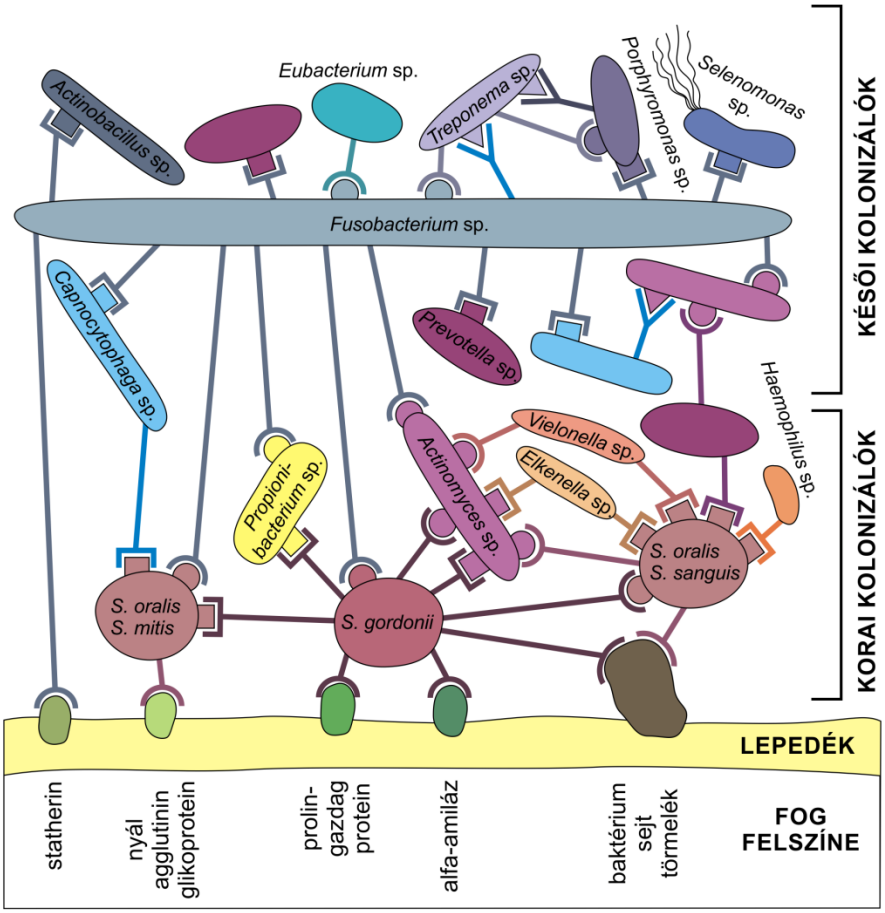
Táplálkozás szempontjából az ember az együregű gyomrú, mindenevő állatokhoz hasonlít. A felvett táplálékon az ember és az emésztőrendszerét kolonizáló mikrobióta tagjai osztoznak. A szájüreg összetett és heterogén élőhelyet kínál a mikroorganizmusok számára. Bár a nyál is tartalmaz a mikroorganizmusok számára hasznosítható tápanyagokat, mégsem igazán alkalmas tápközeg a szaporodásukhoz, mert benne antibakteriális hatású anyagok is megtalálhatók. Ilyen pl. a lizozim enzim, amelyik a mureinben lévő glikozidos kötés hasításával a bakteriális sejtfalat gyengíti, majd végső soron a sejtek lízisét idézi elő. A tejben és a nyálban is megtalálható laktoperoxidáz enzim pl. reaktív oxigéngyök (ROS) felszabadításával járul hozzá a baktériumsejtek pusztulásához.

A szájüregben lévő antibakteriális enzimek hatása ellenére a fogak és az íny felületén a nagyobb mennyiségben felhalmozódó tápanyagok kedvező feltételeket teremthetnek a mirobiális kolonizáció, ezáltal a szövetkárosítás, valamint a fog és ínybetegségek kialakulása számára. A fogkoronát kívülről a kristályos kalcium-foszfátból felépülő zománcréteg borítja, mely alatt található a dentin és a fogbél (pulpa). A csecsemők szájüregében az első fogak megjelenése előtt főként aerotoleráns anaerob *Streptococcus* és *Lactobacillus* fajok jelenléte a meghatározó, de emellett aerob baktériumok is előfordulnak. Az első fogak áttörésével a

szájüreg mikrobiótája a fogak és a fogíny hasadékokban megtelepedő anaerobok irányába tolódik el. A metagenom vizsgálatok eredményei alapján a felnőtt emberi szájüregből >600 baktériumfajt azonosítottak. Közöttük a legnagyobb arányban előforduló nemzetségek az *Actinomyces* (4%), *Bacteroidees* (2,4%), a *Capnocytophaga* (2,6%), a *Lachnospira* (2,4%), a *Lactobacillus* (3,4%), a *Leptotrichia* (3,2%), a *Neisseria* (3,2%), a *Prevotella* (8,9%), a *Selenomonas* (3,6%), *Streptococcus* (6,6%), és a *Treponema* (7,9%) voltak. A szájüreg mikrobiótájának komplexitására utal, hogy a felsorolt leggyakoribb nemzetségek képviselői a teljes mikrobióta <50%-át teszik ki.

A fogak felszínének bakteriális kolonizálása a baktériumsejteknek a fogak felületén történő megtapadásával kezdődik. Még a frissen mosott fogak felülete sem tekinthető teljesen tisztának, hiszen azt a nyálból származó savas glikoproteinekből, valamint lipidekből és fehérjékből álló hártya borítja. Ehhez a néhány mikrométer vastagságú szerves anyagokból álló bevonathoz kötődnek az elsődleges kolonizáló baktériumsejtek. A fogak felszínén kialakuló biofilmben először különböző *Streptococcus* fajok (*S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, és *S. mitis*) telepednek meg, melyek szaporodásának eredményeképpen a fogak felszínén megkezdődik a dentális plakknak nevezett, különféle baktériumokból álló, több sejtrétegű és összetett bevonat kialakulása **(8.2. ábra**). Az elsődleges kolonizáló *Streptococcus* sejtek által termelt nyálkás polimer mátrixba ágyazódnak be később pl. az anaerob anyagcserét folytató *Fusobacterium* nemzetség képviselői. Ezek a fog felszínével párhuzamosan elhelyezkedő, fonalas morfológiájú baktériumok híd szerepet töltenek be az elsődleges és a késői kolonizálók (pl. Gram-pozitív pálcák és Gram-negatív kokkuszok) között, melyek sejtfelszíni adhezinek és receptorok által specifikus sejt-sejt kapcsolatok révén kötődnek egymáshoz. A kialakult vastag biofilmben rendszerint az obligát anaerob *Actinomyces* fajok jelenléte lényeges. Az anoxikus környezet a fogak felszínén megtelepedő fakultatív anaerob baktériumok szerves anyag bontó anyagcsere folyamatának a következtében alakul ki, ugyanis a polimer mátrixba ágyazott több sejtrétegű biofilmben az oxigén diffúziója a fogfelszín irányába erőteljesen lecsökken. A kialakult dentális plakk belsejében a bakteriális fermentáció szerves savak felhalmozódását eredményezi, ami a fogzománc oldódásához, majd fogszuvasodáshoz vezethet. A viszonylag sima, ásványos fogfelszínek könnyen tisztíthatók, így ott a dentális plakkok kifejlődése megakadályozható. A fogak közötti résekben, valamint a fogak és az íny találkozásánál az összegyűlő ételmaradékok ugyanakkor nagymértékben hozzájárulhatnak a dentális plakkok, illetve a fogszuvasodás kialakulásához. A táplálkozási szokások, így pl. a szacharózt (kristálycukrot) nagy mennyiségben tartalmazó ételek fogyasztása is kedvez a fogszuvasodásnak. A szacharózt és más cukrokat bontó tejsavas baktériumok (*S. sobrinus* és *S. mutans*) fermentációjuk során a fogzománc kalcium-foszfátjának oldására képes tejsavat, továbbá a sejtek közötti mátrixban lévő fehérjék bontására képes proteolitikus enzimeket állítanak elő. A *S. sobrinus* sejtek elsősorban a fogzománc sima felületén kialakuló dentális plakkok képződésében vesznek részt, mivel nagy affinitással kapcsolódnak a fogfelszíni savas glikoproteinekhez. Ezzel szemben a főként a fogfelszíni hasadékokban és repedésekben előforduló *S. mutans* a szacharózból dextránszacharáz enzime segítségével dextránt, egy erős adhezív poliszacharidot képez, amit a fog felületéhez történő megtapadásához használ fel. A fogbetegségekkel szembeni érzékenység a különböző humán populációkban eltérő, és az egyének genetikai tulajdonságai éppúgy hatással vannak rá, mint a táplálkozási szokások vagy egyéb külső tényezők. A fejlett országokban élő népesség táplálékának jelentős hányadát képező szacharóz a fent említett bakteriális anyagcsere folyamatok serkentésével jelentősen hozzájárul a fogszuvasodáshoz. A kariogén (fogszuvasodást előidéző) sztreptokokkuszok szájüregi megoszlásával kapcsolatban végzett felmérések alapján közvetlen összefüggést lehetett kimutatni a *S. sobrinus* és *S. mutans* előfordulása valamint a fogszuvasodás mértéke között. Az USA-ban és Nyugat-Európában élő népesség 80-90%-ában a *S. mutans* kimutatható a szájüregben, és ugyanitt a fogszuvasodás is általánosnak mondható. Ezzel szemben a csaknem

teljesen szacharóz mentes táplálékot fogyasztó tanzániai gyerekek dentális plakkjában nem volt jelen a *S. mutans*, és ott a fogszuvasodás sem volt jellemző. A fogszuvasodás megelőzésére a szakemberek a fejlett országokban mindenekelőtt a rendszeres fogmosást és a fluorid sók bevitelét javasolják fluoridos fogkrémek használatával illetve kezelt hálózati ivóvíz vagy fluorid tartalmú ásványvíz fogyasztásával. A rendszeres és alapos fogmosás elsősorban a fogfelszíni szerves anyag bevonat létrejöttét és a plakk képző baktériumok megtelepedését gátolja, míg az antibakteriális hatású fluorid a fogszövet állományába épülve (fluor-apatit képződésével) ellenállóbbá teszi azt a fogszuvasodással szemben.



8.2. ábra. Az érett fogplakk szerkezete, baktériumközössége.

Az emberi gyomor, vékony- és vastagbél fő funkciója a felvett táplálék megemésztése, a tápanyagok felszívása, valamint a normál mikrobióta tápanyag ellátásának biztosítása. Az emberi emésztőrendszerben előforduló mikroorganizmusok mennyiségi és taxonómiai eloszlása az egyes tápcsatorna szakaszokban nagymértékben különbözik egymástól.

A gyomor a gyomornedv erősen savas (pH 2) kémhatása miatt egyfajta kémiai gátat jelent a táplálékkal felvett és a szájüregből származó mikroorganizmusok számára a bélrendszerbe való továbbjutás szempontjából. Ennek ellenére számos mikroorganizmus képes alkalmazkodni a gyomor meglehetősen barátságtalan környezeti feltételeihez. Biopsziával nyert minták 16S rRNS gén alapú molekuláris biológiai elemzése alapján a gyomor mikrobiótájának összetétele nagymértékű egyedi eltéréseket mutatott, ugyanakkor bizonyos Gram-pozitív baktériumok (pl. *Streptococcus* és *Veilonella* fajok), továbbá a Proteobacteria, a Bacteroidetes, az Actinobacteria és a Fusobacteria törzsek képviselői a gyomor mikrobióta rezidens tagjaiként voltak jelen.

A *Helicobacter pylori* a gyomorfal nyálkahártyáját kolonizáló mikrobióta leggyakoribb tagja, az egyetlen olyan baktérium, ami az arra érzékeny egyénekben gyomorhurut, fekély vagy akár gyomorrák kialakulását is okozhatja. Jelenlétét először 1983-ban mutatták ki humán bélbiopsziával nyert mintából (Warren és Marshall, 1983). A krónikus *H. pylori* fertőzöttség mértéke a fejlődő országokban a gyomorfekélyben szenvedő betegeknél elérheti a 80%-ot, míg a tünetmentes felnőtteknél az 50%-ot. A baktériumfertőzés kialakulásának feltételezett módja a fertőzött egyénnel történő személyes kontaktus, illetve fertőzött étel vagy ivóvíz fogyasztása. Ezt támasztja alá a családon belüli nagyobb arányú incidencia (új megbetegedések előfordulása), továbbá egyes esetekben a járványos gócok kialakulása, ami a közös forrásból származó élelmiszer vagy ivóvíz fogyasztására utal. Habár a *H. pylori* esetében nincs tudomásunk nem humán rezervoárok létezéséről, a baktériumot esetenként macskákból is kimutatták, ami alapján arra következtethetünk, hogy a kórokozó az emberrel szoros kapcsolatban élő házi kedvencekként tartott állatokra vagy azokról az emberre is átkerülhet. A teljes népességben a *H. pylori* fertőzöttség prevalenciája (előfordulási gyakorisága) az életkor előrehaladtával növekszik. A *H. pylori* által okozott gyomorfekély ma már megelőzhető és kezelhető. A *H. pylori* 1,5-10 µm hosszú és 0,3-1,0 µm széles spirális alakú, csillókkal aktív mozgásra képes, Gram-negatív festődésű baktérium, mely a gyomor nyálkahártya rétegében telepszik meg, ahol védve van a gyomorsav hatásától. A bakteriális kolonizációt követően a kórokozó anyagcseretermékei és a gazdaszervezet válaszreakciója együttesen idézik elő a gyomornyálkahártya gyulladásos folyamatát, a szöveti károsodást, majd a gyomorfekély kialakulását. A *H. pylori* az anyagcseréje során képződő ureáz enzim segítségével a gyomorban a karbamidból ammóniát szabadít fel, és ezzel a túlélését elősegítő lokális pH emelkedést idéz elő. Emellett a szöveti károsodásban szerepet játszó vacA citotoxint is termel. A *H. pylori* fertőzés és a gyomorfekély közötti kapcsolat feltárása a betegség antibiotikummal történő kezelésével kapcsolatos. A betegek többségénél a gyomorfekély hosszan tartó antiacidum (protonpumpa gátló) készítménnyel való kezelése ellenére 1 éven belül visszaesés következett be. Amikor azonban a fekélyt, mint fertőző betegséget kezelték, a gyomorfekély gyógyítható vá vált. Ez rendszerint 14 napig tartó kombinált szerterápia, antibakteriális hatású metronidazol, továbbá tetraciklin vagy amoxicillin antibiotikum és bizmut-tartalmú savlekötő készítmények együttes alkalmazásával történt. Az ausztrál Robin Warren és Barry Marshall kutatók 2005-ben orvosi-élettani Nobel díjat kaptak ennek az összefüggésnek a feltárásában végzett munkásságukért.

A vékonybélben a mikrobióta összetételét számos tényező befolyásolja. A gyomorral szomszédos patkóbélben, a vékonybél kezdeti szakaszán, annak savas kémhatása miatt a mikrobióta összetétele a gyomoréhoz hasonló. A patkóbéltől (duodenum) a csípőbélig (ileum) a béltartalom kémhatása és ezzel párhuzamosan a baktériumszám is fokozatosan emelkedik. A patkóbélben az áthaladó elfogyasztott táplálék és a benne lévő mikroorganizmusok emésztő enzimekkel, az epével és bikarbonáttal keverednek. A vékonybélbolyhok között szórtan elhelyezkedő ún. Paneth sejtek pedig egy a Gram-pozitív baktériumok ellen ható angiogenin-4 nevű antimikrobiális peptidet termelnek. Ennek ellenére a csípőbél alsó szakaszán a béltartalom grammnyi mennyiségére vonatkoztatott sejtszám már 10^5-10^7 is lehet. A vékonybél mikrobióta tipikus tagjai a bélfalhoz kapcsolódó és anaerob anyagcserét folytató fusiform baktériumok. Az étel a lenyelést követően mintegy 1-4 órával eléri a vastagbelet, ekkorra a kémhatása semleges körüli lesz. A vastagbélben a vékonybélhez képest a baktériumok száma tovább emelkedik, és a távolabbi vastagbéltartalomban elérheti a 10^{11}-10^{12} sejtszám/g értéket. A vastagbél olyan anaerob kemosztát rendszernek tekinthető, melyben a bélmikrobióta rezidens tagjai (pl. a *Bacteroides* és *Clostridium* fajok) a táplálékkal felvett és még emésztetlen (főként növényi eredetű) tápanyagoknak a lebontását elsősorban anaerob fermentációval végzik. Az ember emésztőrendszerében a tápanyagok és velük együtt a normál mikrobióta egy részének

áthaladási ideje általában 24 óra, melyhez a lumenben élő baktériumok napi 1-2-szeres megkétszereződéssel alkalmazkodnak.

Bár a vastagbél mikrobiális közösségének alkotásában fakultatív anaerob anyagcserét folytató baktériumok (pl. *E. coli*) is jelen vannak, mennyiségük a szigorúan anaerobokéhoz képest elhanyagolható. Ennek ellenére fontosak, mert az oxigén elhasználásával hozzájárulnak a vastagbélre jellemző anoxikus környezet kialakításához. Az anaerob mikrobiális fermentáció során egyebek mellett különböző szerves savak (pl. ecetsav, propionsav, vajsav) keletkeznek. Az intesztinális traktusban élő mikroorganizmusok számos a gazdaszervezet számára fontos anyagcsere folyamatban és különböző létfontosságú vegyületetek (pl. B1, B2, B6, B12 és K vitaminok) előállításában is részt vesznek. Ezen kívül a májban termelődött szteroidok, amelyek az epehólyagból epesavakként kerülnek a bélbe, a vastagbél mikrobióta tagjainak enzimaktivitása révén alakulnak át, majd a módosított (észterezett, dehidroxilezett, oxidált vagy redukált) bioaktív szteroid vegyületek a bél falán keresztül felszívódnak. A bélmikrobióta tagjai a gáz halmazállapotú anyagcsere végtermékek (pl. CO_2, CH_4, H_2) előállításával a gazdaszervezet normális bélműködésének (perisztaltikájának) fenntartásában is közreműködnek. Az egészséges emberi szervezetből a bélrendszeren keresztül naponta több 100 ml gáz távozik, melynek körülbelül a fele a lenyelt levegőből származó elemi nitrogén. A bélben zajló mikrobiális fermentációs folyamatok eredményeként a szerves savak mellett szén-dioxid és hidrogén (CO_2 és H_2) is keletkezik. Az emberi populáció több mint harmadának a bélmikrobiótájában metanogén ősbaktériumok is előfordulnak, amelyek a gáz halmazállapotú fermentációs anyagcsere végtermékek felhasználásával állítanak elő metánt (CH_4). Emellett egyes jellegzetes szagú anyagcsere végtermékek (pl. H_2S, NH_3, aminok, indol, szkatol, vajsav) képződése is a bélmikrobióta anyagcsere tevékenységének eredménye. A keletkező anyagcsere termékek típusa és mennyisége a mikrobióta összetételétől és a gazda táplálkozási szokásaitól függően is változó. A bélmikrobióta összetételének kialakításában a bakteriális kemotaxisnak (kémiai inger hatására végbemenő aktív mozgásnak) illetve a gazdaszervezet anyagcseréjének is fontos szerepe van. Az emberi bélben élő mikroorganizmusok, pl. a *Bacteroides* nemzetség tagjai nagyszámban termelnek olyan enzimeket, melyek segítségével a táplálkozás során felvett összetett szénhidrátok először monoszacharidokká, majd fermentációs végtermékekké alakulnak. A bélmikrobióta tagjai a gazdaszervezet nitrogén anyagcseréjében is részt vesznek. A 20 féle aminosav közül 10 létfontosságúnak nevezhető, mivel azokat az emberi szervezet nem képes a számára szükséges mennyiségben előállítani. Bár ezeknek az aminosavaknak, pl. a lizinnek egy részét a táplálékkal magunkhoz vesszük, termelésükhöz a bélben élő mikroorganizmusok is hozzájárulnak. A bélben megtelepedő mikroorganizmusok részt vesznek a gyomor-bél rendszer természetes „érési" folyamatában is. Ez magában foglalja a bél epitéliális sejtekben a tápanyagok felvételéért és metabolizmusáért felelős gének átíródását, és a posztnatális fejlődés korai szakaszában az immunrendszer beindítását. Ily módon az felismeri a normál mikrobióta tagjait, és fejlődése révén megakadályozza az idegen mikroorganizmusoknak a nyálkahártyában való megtelepedését.

A gyomor és bélrendszeren áthaladó táplálék víztartalma a felszívódás hatására fokozatosan csökken, míg végül az emésztetlen maradék fécesszé alakul. A fécesz nedves tömegének közel egyharmadát teszik ki a baktériumok, így az emberi szervezetből a fécesszel naponta körülbelül $3x10^{13}$ baktériumsejt ürül ki.

Ahogy azt mára a legtöbb mikrobaközösség esetében felismerték, a hagyományos tenyésztésen alapuló diverzitás elemzések igencsak alábecsülték a bélrendszerben megfigyelhető valódi sokféleséget. Példaként említhetjük, hogy korábban az *E. coli*-t jelentős bélbaktériumként tartották számon, holott a bélben az *E. coli*-t is magába foglaló Gammaproteobacteria osztály képviselőinek az aránya kisebb, mint 1%. A félreértelmezés arra vezethető vissza, hogy a fakultatív anaerob anyagcserére képes *E. coli* kiválóan alkalmazkodik a laboratóriumi körülményekhez, és még akkor is könnyen tenyésztésbe vonható, amikor a

kiindulási mintában igen kis gyakorisággal fordul elő. Ennek ismeretében igen meglepő, hogy a molekuláris biológiai vizsgálatok alapján az emlősök bél mikrobiótájának tagjait mindössze néhány filogenetikai törzs képviselőiként azonosították. Az emberi bélre jellemző filotípusok döntő többsége (98%-a) a Firmicutes (64%), a Bacteroidetes (23%), a Proteobacteria (8%) és az Actinobacteria (3%) filogenetikai törzsekbe sorolható. A korlátozott mértékű törzs szintű filogenetikai diverzitás hátterében ugyanakkor nemzetség- és faji szinten elképesztő sokféleség rejlik. Az egyik legutóbbi felmérés során, mely több mint 50000 bakteriális 16S rRNS gén bázissorrend elemzése alapján készült, a humán bél mikrobiótából legalább 1800 nemzetséget, 16000 fajt és több mint 36000 filotípust azonosítottak. További érdekesség, hogy az emberi bél mikrobaközösségeket alkotó fajok abundanciájára igen nagyfokú egyéni változatosság jellemző. 27 és 94 éves kor közötti egészséges férfiak és nők vizsgálatának eredményei arra mutattak rá, hogy a humán bélből feltárt több ezer különböző baktériumfaj közül az egyes személyek béltraktusában előforduló baktériumfajok száma néhány száztól legfeljebb ezerig terjed, és hogy az adott személyre jellemző mikrobióta faji összetétele viszonylag hosszú ideig stabilnak mondható. Az összehasonlító elemzések arra is rávilágítottak, hogy az emberi populációban több közös baktérium nemzetség található, mint az emberek és más emlősök között, vagyis úgy tűnik, hogy a legtöbb egészséges emberben létezik a velünk együtt élő baktériumfajoknak egy közös, ún. „mag csoport”-ja.

Úgy tűnik, hogy a bélmikrobióta a kóros elhízásban is fontos szerepet játszik. Napjainkban az elhízás kiemelt egészségügyi kockázatot jelent, hiszen hozzájárul a magas vérnyomás, a szív- és érrendszeri betegségek, továbbá a cukorbetegség kialakulásához.

Csíramentes egerekben bizonyos baktériumfajokkal és komplex mikrobaközösségekkel végzett kolonizációs kísérletek eredményei igazolták, hogy a mikrobiális kolonizáció a csípőbélben kiváltja a glükóz felvételéért, valamint a zsírok felszívódásáért felelős gének átíródását. Azonos táplálék adagot fogyasztó egérpopulációk esetén, a kolonizációs kísérletben résztvevők 40%-kal több teljes testzsírt halmoztak fel, mint azok, amelyeket csíramentes körülmények között tartottak. Ha a csíramentes egereket normál állatok vakbéltartalmával oltották be, akkor azokban is kifejlődött a normál mikrobióta, és annak ellenére nőtt a teljes testzsírtartalmuk, hogy a táplálékbevitelükben nem történt változás. A vizsgálatok során azt is megállapították, hogy az elhízott egerek bélmikrobiótája eltért a normális egerekétől, bennük a Bacteroidetes törzsbe tartozó szervezetek aránya 50%-kal kisebb volt, ugyanakkor a Firmicutes képviselőinek jelentős részaránybeli növekedése és a metanogén ősbaktériumok számának emelkedése volt megfigyelhető. A bélben élő metanogének a hidrogén felhasználásával, a kérődzők bendőjében lejátszódó folyamatokhoz hasonlóan, feltehetően elősegítik a fermentálható szubsztrátumok mikrobiális átalakításának hatékonyságát. A hidrogén eltávolítása ily módon serkentően hat a mikrobiális fermentációra, a gazdaszervezet ezáltal több tápanyagot tud felszívni, ami hozzájárul elhízásához. Mikrobióta összetétel hatására bekövetkező fenotípus váltást egy másik, ún. „TLR5 knockout” egér modell kísérletben is megfigyeltek, amelyben 5-ös típusú Toll-like (patogén asszociált molekuláris mintázatot felismerő) receptor nélküli génmódosított egeket vizsgáltak. A kísérletek során az egerek egyik részénél szintén elhízást lehetett megfigyelni, míg másokban vastagbélgyulladás alakult ki. A TLR5 egerekben kialakult elhízás is átvihető volt, annak ellenére, hogy ezekben az állatokban a vad típusúakhoz képest nem volt kimutatható különbség az energiafelhasználás hatékonyságában. Ezzel szemben a TLR5 egerekben a megváltozott összetételű mikrobióta hatására fokozódott az egerek éhségérzete, és ezáltal megnőtt a felvett táplálék mennyisége, és ez vezetett az elhízásukhoz. Ezt a fajta elhízást a táplálék mennyiségének korlátozásával és antibiotikum kezeléssel gyógyítani lehetett.

A HMP keretében végzett kutatások az ember esetében is feltárták, hogy a mikrobaközösségek összetételéhez társuló zsírfelhalmozás képessége az egymást követő generációk esetében továbbvihető. A humán bélmikrobióta közösségek összetétele és a

gazdaszervezet genotípusa, vérzsír szintje, valamint a környezet közötti kapcsolatot vizsgáló metagenomikai kutatásba összesen 154 felnőtt személyt, egypetéjű és kétpetéjű ikreket és édesanyjukat vontak be. A vizsgált egyénekben az elhízás minden esetben együtt járt a bél mikrobióta filogenetikai törzs szintű részarányának változásával és a mikrobiális diverzitás csökkenésével, ahogy az korábban az egerekkel végzett kísérletek eredményeiből is látható volt. Az elhízott személyekben a Bacteroidetes törzs képviselőinek részaránya csökkent, míg a Firmicutes törzs tagjaié emelkedett. A kutatás arra is rávilágított, hogy az elhízás kialakulásában az anyai mikrobióta tagjainak az utódokba történő továbbvitele jelentősebb tényezőnek bizonyult, mint a gazdaszervezet saját genotípusa. Az a felfedezés tehát, hogy a bél mikrobióta összetétele befolyással van az elhízásra, egy lehetséges nem genetikai magyarázatot szolgáltat arra is, hogy az elhízás gyakran miért tekinthető „családi vonásnak". Bár a bél mikrobióta pontos szerepe az elhízás folyamatában ma még nem ismert, az valószínűsíthető, hogy a bél mikrobióta meghatározó szerepet játszik abban, hogy a táplálékkal felvett tápanyagok milyen mértékben hasznosulnak a gazdaszervezet anyagcseréjében. A mikrobióta összetétele és az elhízás közötti összefüggés legjobban egy testtömeg csökkentésre irányuló vizsgálat eredményeivel szemléltethető. A kísérletben résztvevő különböző személyek vagy zsírokban, vagy szénhidrátokban szegény ételeket fogyasztottak. A testtömeg csökkenésével párhuzamosan bélmikrobiótájuk összetétele is megváltozott, a Bacteroidetes törzsbe tartozó szervezetek abundanciája nőtt, vagyis az „elhízott" típusú mikrobiótáról „sovány" típusú mikrobiótára álltak át. Ez a szervezetben végbemenő mikrobióta változtatási képesség egy új terápiás lehetőséget nyit meg az elhízott betegek fogyásának, vagy éppen a kórosan sovány gyerekek súlygyarapodásának elősegítésében.

Napjainkban már az is bizonyítást nyert, hogy a mikrobák egy része, melyeket a táplálékkal együtt veszünk magunkhoz, egyúttal a bélmikrobióta tagjaivá válhatnak. Ily módon a mikrobiom részévé vált új gének segítségével újfajta élelmiszerek megemésztése is lehetővé válik. Felmerül tehát a kérdés, hogy mikrobiológiai szempontból is igazolható az a mondás, miszerint azok vagyunk, amit megeszünk? A kutatás, mely a fentiekben leírt felismeréshez vezetett, azon alapult, hogy a glikozid-hidrolázok egy új típusának a génjét mutatták ki humán széklet mintákban lévő *Bacteriodes plebeius* baktériumfajból. A glikozid-hidroláz enzim egy a vörös algákban gyakori poliszacharid, a porfirán lebontásában vesz részt. A székletminták metagenomikai vizsgálatával kapott adatok alaposabb elemzése alapján kiderült, hogy a porfirán emésztésével összefüggésbe hozható gének csak japán személyekben fordultak elő és az USA-beli személyeknél nem. Mindezek alapján a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a japánok által elfogyasztott tengeri moszat lehetett a közvetítő, ami az amerikaiak táplálékában nem, de az ázsiaiakéban jelen volt, és így a tengeri moszat elfogyasztása révén váltak a glikozid-hidroláz génnel rendelkező baktériumok a bélmikrobióta tagjaivá.

A felső légutak (orr- és szájüreg, garat és gége) nyálkahártyáján élő mikroorganizmusok elsősorban a légzés során kerülnek az emberi szervezetbe. A levegőből származó mikroorganizmusok legnagyobb része megreked az orr- és szájüregben, és onnan vagy kiürül az orrváladékkal, vagy nyelés során az emésztőrendszerbe kerül. Kisebb részük azonban minden emberben a nyálkahártya kolonizálójává válik. Közöttük a sztafilokokkuszok, a sztreptokokkuszok, a difteroid pálcák és a Gram-negatív kokkuszok a leggyakoribbak. Ugyanakkor még az egészséges ember nyálkahártyájának természetes mikrobiótájából is kimutathatók olyan potenciálisan patogén baktériumok, mint a *Staphylococcus aureus* vagy a *Streptococcus pneumoniae*. Ezek a személyek azonban rendszerint csak hordozói a kórokozóknak, bennük betegség nem alakul ki, mert a rezidens mikroorganizmusok sikeresek a kórokozókkal szemben a tápanyagokért és az erőforrásokért folyó versenyben, így korlátozzák azok aktivitását. Ezen kívül a veleszületett és az adaptív immunrendszer elemei, pl. az IgA antitestek különösen hatékony védelmet biztosítanak a nyálkahártya felületeken a kórokozók növekedésének és inváziójának megakadályozásában. Az alsó légutak (a légcső, a

hörgők, a hörgőcskék és a tüdőhólyagocskák) területén egészséges felnőttekben annak ellenére sem alakul ki normál mikrobióta, hogy légzés során számos mikroorganizmus képes eljutni ezekre a helyekre is. A meglehetősen nagyméretű porszemcsék általában a felső légutakban kiülepednek. Az alsó légutakba jutó levegő áramlási sebessége jelentősen csökken, így a benne lévő mikroorganizmusok kiülepednek a légutak falára. A légutakat borító csillós hámsejtek ugyanakkor a nyálkahártyára került baktériumokat és más részecskéket a felső légutak irányába hajtják, ahonnan a már említett módon kiürülnek. A tüdőket rendszerint csak a 10 μm-nél kisebb átmérőjű részecskék (baktériumok, vírusok) érik el, melyek ott tüdőgyulladást okozhatnak. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy kutatók mikrobiális DNS jelenlétét igazolták egészséges egyének tüdőszövetéből biopsziával nyert mintákból molekuláris biológiai módszerekkel.

Az egészséges felnőtt emberben a vese és a húgyhólyag steril, de a húgycső távolabbi szakaszát borító hátsejteket rendszerint fakultatív aerob Gram-negatív pálcák és kokkuszok kolonizálják. Kis számban potenciálisan patogén baktériumok (*Escherichia coli* és *Proteus mirabilis*) is jelen lehetnek, melyek a húgycsőben a környezeti feltételek (pl. a pH értékének) megváltozásakor elszaporodhatnak, és kórokozóvá válhatnak. Ilyen típusú húgyúti fertőzések különösen nőknél gyakoriak.

Az egészséges szülőképes korú nők hüvelyének kémhatása enyhén savas (pH 4,4-4,6), aminek létrehozásáért és fenntartásáért a hüvely rezidens mikrobiótájának domináns tagjai a *Lactobacillus* baktériumok (pl. *L. crispatus, L. iners, L. jensenii, L. gasseri, L. acidophilus*) a felelősek. Ezek a Gram-pozitív pálcika alakú baktériumok, melyeket a nőgyógyászatban Döderlein baktériumokként tartanak számon, a hüvelyben a glikogén fermentációja során tejsavat állítanak elő, ezzel járulnak hozzá a pH csökkenéséhez.

Ha tekintetbe vesszük, hogy az emberi testen vagy éppen testben nagyon változatos élőhelyek állnak rendelkezésre a velünk együtt élő mikroorganizmusok számára, akkor akár az emberi szervezet mikrobiális ökológiájáról is beszélhetünk. Ily módon az ökológiai elvek alkalmazása hozzájárulhat a gazda mikroba kapcsolatrendszer megértéséhez. A gazdaszervezet és a mikroorganizmusok közötti kölcsönhatások térben és időben is változnak, ami a rendelkezésre álló niche-eket betöltő mikroorganizmusok számára lehetővé teszi, hogy maximalizálják előnyüket. Az emberi szervezet normál mikrobiótájának kialakulása tehát szelektív folyamat eredménye, amire számos tényező, pl. a celluláris receptorok, a felületi tulajdonságok, vagy a kiválasztott anyagcseretermékek is hatással vannak. A mikroorganizmusok számára megnyíló niche-ek az életkortól, a nemtől, a táplálkozási szokásoktól, a gazdaszervezet fejlődési állapotától függően is változnak. A gyerekek a felnőttekhez képest sokkal változatosabb összetételű és potenciálisan patogén Gram-negatív baktériumokat is tartalmazó bőr mikrobiótával rendelkeznek. A felnőtt ember normál mikrobiótája zavartalan körülmények között viszonylagosan állandó összetételű, ugyanakkor a környezetben vagy a gazdaszervezetben bekövetkező változások a mikrobióta összetételére is hatással vannak. Az időjárás változása, pl. a testhőmérséklet és a bőr nedvességtartalmának emelkedése a bőr mikrobiótáját alkotó populációk egyedszámának növekedését eredményezi. A személyes higiénia hatása sem elhanyagolható a mikrobióta összetételének alakulásában.

Az emberi szervezet mikrobiótája és a környezet közötti kapcsolat dinamikusan változik, a velünk együtt élő mikroorganizmusok az emberről szabadon áramlanak mindazon felületekre, amelyekkel nap, mint nap kapcsolatba kerülünk. Jól példázza ezt az a vizsgálat, amelyben az emberi ujjbegyen lévő mikrobiótának a számítógépes billentyűzetre való átjutását tanulmányozták. A vizsgálatok során megállapították, hogy a bőr felszíni mikrobaközösségek összetétele nagyfokú egyéni különbségeket mutat, vagyis minden vizsgált egyén rá jellemző ujjlenyomat közösséget hagy az általa használt billentyűzeten. A mikrobiális közösségek összetételének elemzése alapján azonban nem csak azt lehetett megállapítani, hogy a vizsgált személyek közül ki melyik billentyűzetet használta, hanem azt is, hogy a kérdéses személy

melyik billentyűn melyik ujjával gépelt. A kísérletek révén még arra is lehetőség nyílt, hogy a számítógépes egeret használó személy kezét 95%-os pontossággal azonosítsák a számítógépes adatbázisban lévő kéz mikrobióta tagjai közül.

Ma már közismert tény, hogy a humán mikrobióta összetétele a viszonylagos stabilitás ellenére külső erők, pl. antibiotikum kezelés hatására jelentős változásokon mehet keresztül. A kórokozó szervezetek elleni küzdelemben napjainkban alkalmazott antibiotikumok többsége ugyanis széles spektrumú, vagyis ezek a szerek hatásukat nem csak a kórokozó szervezetek ellen fejtik ki, hanem a normál mikrobióta arra érzékeny tagjaira is hatással vannak. Ily módon az antibiotikumok nagymértékben befolyásolhatják a gazdaszervezet normál mikrobiótáját is. Egy vizsgálatban, 3-4 nappal a ciprofloxacin széles spektrumú antibiotikum kezelést követően, a vizsgált egyénekben a bélmikrobióta fajgazdagságában és egyenletességében is csökkenést lehetett kimutatni, ugyanakkor a változás mértékében nagyfokú egyének közötti eltérés tükröződött. Amíg a bél mikrobióta összetétele egy héttel az antibiotikum kezelés után a kezelést megelőzőhöz kezdett hasonlítani, addig az egyének közti különbségek megmaradtak a tekintetben, hogy a kezelést megelőző és követő közösségszerkezet mennyire hasonlított egymáshoz. Egyes baktériumfajok esetében az antibiotikum kezelést követően a visszarendeződés jóval hosszabb időt, akár éveket is igénybe vett. A vizsgált személyek, sőt akár az egyes testrészek közti eltérések vonatkozásában más antibiotikumokkal végzett vizsgálatok is hasonló eredményre vezettek. Mivel az antibiotikumok hatását nagyobb populációk esetében nem vizsgálták, hiszen egészséges személyek antibiotikumokkal történő kezelése az egészségügyi kockázat mellett etikai problémákat is felvet, az antibiotikum kezelésre adott egyéni különbségek hátterében lévő történések még nem tisztázottak. Ennek ellenére a normál bélmikrobióta antibiotikum kezelést követően végbemenő általános visszarendeződési folyamata arra utal, hogy a közösségben léteznek olyan biotikus és abiotikus tényezők, amelyek hozzájárulnak a teljes közösség alkalmazkodóképességének biztosításához és fenntartásához.

Az orális (szájon át történő) antibiotikum kezelés során a normál bélmikrobióta érzékeny tagjainak elpusztulását jelző gyakori tünet a laza széklet vagy a hasmenés kialakulása. Irodalmi adatok alapján a *Clostridium difficile* ez a Gram-pozitív, endospóra-képző, obligát anaerob fermentatív anyagcserét folytató, A entero- és B citotoxint vagy csak B citotoxint termelő baktérium tehető felelőssé az antibiotikum használattal összefüggésben kialakuló hasmenéses megbetegedések mintegy 25%-áért, melyek súlyos esetekben álhártyás vastagbélgyulladással párosulnak. Az iparilag fejlett országokban a *C. difficile* fertőzés (CDI) incidenciája és súlyossága az utóbbi években ugrásszerűen megemelkedett, pl. az USA-ban évente megközelítően 3 millió regisztrált CDI eset fordul elő. A fertőzés valószínűségét a hosszan tartó antibiotikum kezelés mellett a kórházi tartózkodás ideje és az előrehaladott életkor is növelheti. A CDI kezelésére általában orális antibiotikum terápiát alkalmaznak, enyhe esetben metronidazollal, mérsékelten súlyos és tartós fertőzés esetén vankomicinnel, újabban fidaxomicinnel. A hatékony antibiotikum terápia ellenére azonban egyre nő a valószínűsége a CDI egyszeri vagy akár többszöri kiújulásának is (Rupnik, 2015). Az USA-ban elsősorban az ilyen esetek kezelésénél kezdték el sikerrel alkalmazni a széklet mikrobióta transzplantációt (FMT). A donorokat az FMT-hez elsősorban a családtagok közül választják, ezek hiányában egészséges önkéntesek közül kerülnek ki. A közeli rokonok donorként történő alkalmazásának az az előnye, hogy bélmikrobiótájuk összetétele nagyobb hasonlóságot mutat a betegével, mint egy idegené. A rokoni kapcsolat hátránya ugyanakkor, hogy a családtagok nagyobb valószínűséggel lehetnek tünetmentes *C. difficile* hordozók. Az FMT-t rendszerint kolonoszkópiával, a donortól származó friss széklet szuszpenziónak a beteg csípőbelébe és vakbelébe történő bejuttatásával végzik. Sikeres kezelés esetén a hasmenés rendszerint 48 órán belül megszűnik. A gyógyulási folyamatot *Saccharomyces boulardii* probiotikum kúra alkalmazásával segítik elő.

A normál bélmikrobiótát alkotó mikroorganizmusok az egészséges emberi szervezetben sikeresek a kórokozókkal szembeni versenyben, megakadályozzák azoknak a szervezetben való megtelepedését és elszaporodását. A bélmikrobióta tagjai emellett hatékonyan részt vesznek a táplálék megemésztésében és az ember számára nélkülözhetetlen tápanyagok előállításában is. Ez vezetett annak a lehetőségnek a vizsgálatához, hogy táplálkozás révén módosítsuk vagy szabályozzuk a normál mikrobióta összetételét annak érdekében, hogy fokozzuk az egyes baktériumok által az emberi szervezetre kifejtett pozitív élettani hatást. Elméletben egyes kiválasztott mikroorganizmusok elfogyasztása alkalmas lehet arra, hogy ezáltal megváltoztassuk vagy helyreállítsuk az emésztőrendszer normál mikrobiótáját, különösen olyan egyéneknél, akiknél betegség (pl. *H. pylori* által előidézett gyomorfekély, irritábilis bélszindróma, *C. difficile* fertőzéssel összefüggésbe hozható álhártyás vastagbélgyulladás), műtét vagy más orvosi beavatkozások, esetleg egyéb okok (pl. a nem megfelelő táplálkozás) miatt a normál mikrobióta jelentős változásokon ment keresztül. Erre a célra alkalmasak lehetnek az ún. funkcionális élelmiszerek, melyek a táplálkozás-élettani hatások mellett a szervezet jobb egészségi állapotát vagy kedvezőbb közérzetét elősegítő bizonyított pozitív hatással rendelkeznek. Egy-egy élelmiszert többféle módon tehetünk funkcionálissá. Ezek között szerepel olyan összetevőknek az élelmiszerekhez történő adagolása, melyek általában nincsenek jelen az élelmiszerekben, de jótékony hatásuk bizonyított (pl. pro- és prebiotikumok alkalmazása).

A latin „pro” és a görög „bios”szavak egyesítéséből származó probiotikum kifejezés használata a XX. század második felétől terjedt el. Jelentésének tartalma fokozatosan bővült, és ma olyan a gazdaszervezet egészségi állapotára jótékony hatással rendelkező élelmiszereket értünk rajta, amelyek élő mikroorganizmusokat tartalmaznak. A probiotikumokkal kapcsolatos első megfigyelések a XIX. század második felében az orosz származású Ilja Mecsnyikov munkásságához köthetők, aki összefüggésbe hozta a kaukázusi pásztorok hosszú átlagéletkorát az általuk rendszeresen és nagy mennyiségben fogyasztott joghurttal. Úgy vélte, hogy az öregedési folyamatban a bélben élő méregtermelő baktériumoknak jelentős szerep tulajdonítható. A joghurt fogyasztása a benne lévő tejsav baktériumok anyagcseréje során keletkező tejsav termelése révén a méregtermelő baktériumok pusztulását eredményezi, így elősegíti az egészség megőrzését. A probiotikumok ismert jótékony élettani hatásai között tartják számon a fertőzésekkel szembeni ellenálló képesség fokozását, az immunrendszer működésének serkentését, a laktóz intolerancia mérséklését, a rákos megbetegedések kialakulásának késleltetését vagy megelőzését. A probiotikus tulajdonságokkal rendelkező legtöbb ismert baktériumtörzs a *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium* nemzetségekbe tartozik, emellett a *Saccharomyces*, a *Lactococcus*, az *Enterococcus* és a *Streptococcus* nemzetségekben is találunk probiotikus törzseket. A probiotikumot tartalmazó élelmiszerek között napjainkban is a tejtermékek a legszélesebb körben elterjedtek és a legnépszerűbbek.

A prebiotikumok olyan az élelmiszerekben előforduló, az ember emésztőnedvei által nem emészthető összetevők, amelyek a vastagbélben szelektíven támogatják a jótékony hatású baktériumok szaporodását és aktivitását, és ezáltal járulnak hozzá az ember egészségének megőrzéséhez. A prebiotikumok többsége 3-10 egyszerű cukorból felépülő oligoszacharid, de előfordulnak közöttük fehérjék és lipidek is. A prebiotikumok közül azokat, melyek a probiotikus bifidobaktériumokra hatnak bifidogén faktoroknak is szokták nevezni. Prebiotikumok számos élelmiszerben megtalálhatók, így például a vörös-, a póré- és a fokhagymában, a babban, a borsóban, a csicsóka- és cikóriagyökérben, az articsókában, továbbá a búzában, a zabpehelyben, a banánban, a tejben és az érett sajtokban is. A prebiotikumok szempontjából az anyatej szerepe sem elhanyagolható, ugyanis benne a laktóz mellett a bifidogén hatású oligoszacharidok mennyisége a legnagyobb, melyek jelentősen előmozdítják az anyatejjel táplált csecsemők bélrendszerében a *Bifidobacterium* dominancia kialakulását.

Napjainkban a táplálék kiegészítők között egyre nagyobb szerepet kapnak a szinbiotikumok, melyek a prebiotikumokat probiotikumokkal együtt tartalmazzák, és jótékony hatásukat szinergista együttműködés révén fejtik ki. Az ún. integrált szinbiotikumban a probiotikum mellett olyan prebiotikus pl. frukto- vagy galakto-oligoszacharidok találhatók, amelyeknek a szintézise a probiotikus törzs enzimeinek segítségével történik.

A fentebb leírtak ellenére azonban hangsúlyoznunk kell, hogy nincs olyan reprodukálható tudományos bizonyíték, amelyik meggyőzően igazolja, hogy a pro- és prebiotikumok fogyasztása az egészséges emberi populációkban a kommenzalista mikrobióta összetételében jelentős, tartós és pozitív egészségügyi változást idéz elő.

8.3. Kórokozók és virulencia

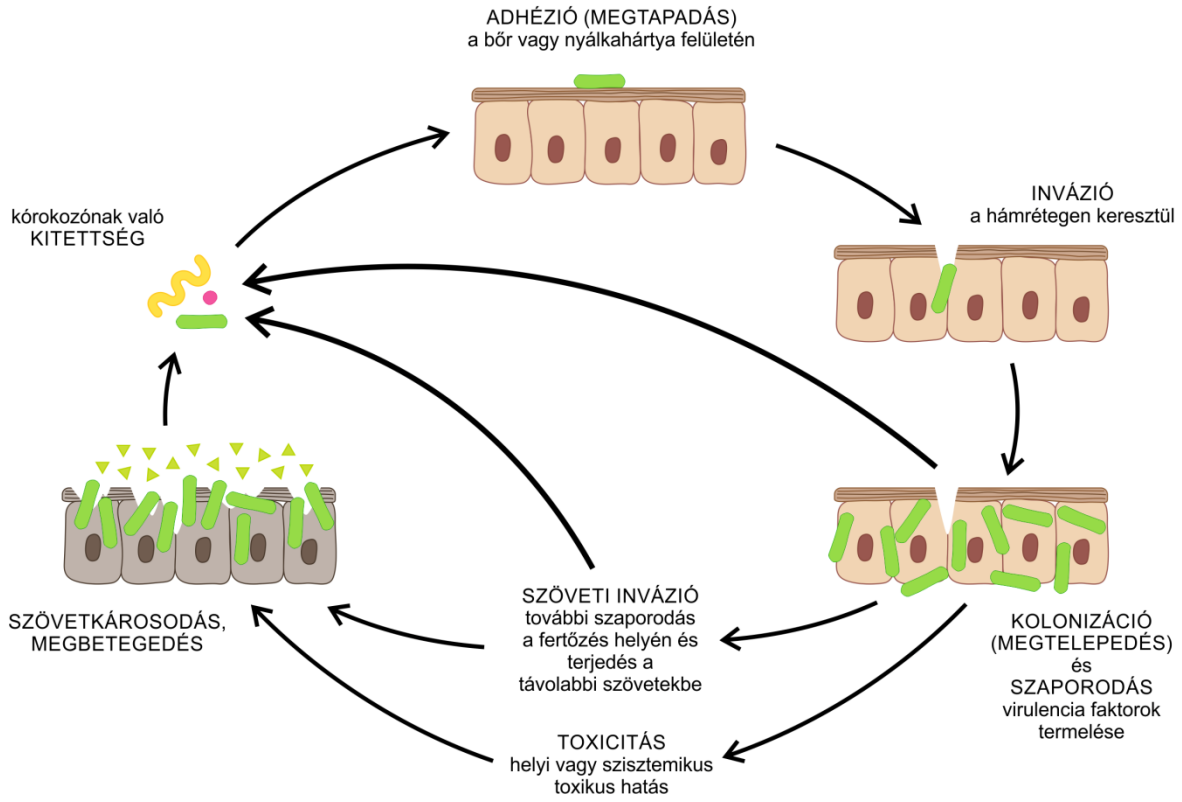
A gazdaszervezet, így az ember túlélése nagymértékben függ attól a normál mikrobiótának nevezett mikroorganizmusok alkotta bonyolult hálózattól, amely megakadályozza a kórokozó mikroorganizmusoknak és más idegen anyagoknak a testbe való bejutását. Amennyiben azok mégis sikerre jutnak, a szervezet további védekező rendszereinek a feladata, hogy megakadályozzák az új, parazita típusú kapcsolatrendszer kialakulását.

Gazdának azt a szervezetet vagy annak szövetét, sejtjét nevezzük, ahol a patogén, más néven kórokozó szervezet megtelepedhet és betegséget idézhet elő. A gazda-kórokozó kapcsolat kimenetele a patogenitástól függ. A patogenitás a kórokozónak az az általános tulajdonsága, hogy a gazdaszervezetben kóros elváltozásokat vagy betegségeket képes előidézni. A potenciálisan patogén szervezetek kórokozó képessége csakúgy, mint a gazdaszervezet védekezőképessége vagy fogékonysága nagymértékben különböző lehet. A patogenitás mértékének kifejezésére a virulencia fogalmát használjuk. A virulenciát számszerűen általában azzal a kórokozó törzsre jellemző sejtszámmal fejezzük ki, ami a fertőzött, érzékeny gazdaszervezetek 50%-ában megbetegedést (ID_{50} – infektív dózis) vagy pusztulást (LD_{50} – letális dózis) idéz elő. Az infektív dózis a különböző kórokozók esetében nagyon eltérő, a vérhast előidéző *Shigella* sp. esetében 10^1-10^2, a *Salmonella* fajok esetében 10^5, míg a *Vibrio cholerae* esetében 10^6 nagyságrendű sejt szükséges a fertőzési folyamat megindulásához. A gazda-kórokozó kölcsönhatás azonban olyan a két szervezet között létrejövő dinamikus kapcsolat, amelyre a patogénben, a gazdaszervezetben vagy a környezetben bekövetkező változások is hatással vannak. Ennek közvetlen következménye, hogy sem a patogén virulenciája, sem a gazdaszervezet ellenálló képessége nem tekinthető állandónak.

A fertőzési folyamatok gyakori kiinduló helye a test számos részét (pl. az emésztő- és légző rendszert, az urogenitális traktust) borító nyálkahártya, mely egymással szorosan kapcsolódó egy- vagy többrétegű hámsejtekből áll, és állandó kapcsolatban van a külső környezettel. A nyálkahártya felületét gyakran az epitéliális sejtek által termelt mukózus (nyálkás) váladék borítja, mely a nedvesség megőrzését elősegítő és a mikroorganizmusok inváziójét befolyásoló vízoldékony glikoproteineket és fehérjéket tartalmaz. A gazdaszervezet különféle szöveteivel kapcsolatba lépő mikroorganizmusok többsége csak lazán kötődik a nyálkahártya felületéhez, majd onnan fizikai folyamatok hatására leválik. A kórokozó és a gazdaszervezet epitéliális sejtje között azonban szoros kapcsolat is kialakulhat specifikus sejtfelszíni kötődés eredményeképpen. Az ily módon fertőzött szövet nyálkahártyáján kialakuló sérülések mentén, mint fertőzési kapukon keresztül a mikroorganizmusok a mélyebb, szubepitéliális szöveteket is elérhetik. Fertőzés fennállásáról beszélhetünk minden olyan esetben, amikor egy patogén a gazdaszervezetben megtelepszik és szaporodik, függetlenül attól, hogy hatására a gazdaszervezetben kialakul-e a betegség vagy sem. Betegség akkor jön létre, amikor a fertőzés következtében a gazdaszervezet életműködését károsan befolyásoló hatások jelentkeznek. Ennek értelmében bár a normál mikrobióta tagjai is „megfertőzik” a gazdaszervezetet, abban mégis ritkán idéznek elő betegséget. Ugyanakkor a normál mikrobióta

egyes tagjai, melyeket opportunista patogéneknek hívunk, a gazdaszervezet normális védekezőképességének csökkenésekor vagy annak hiányában (pl. rákos megbetegedések vagy szerzett immunhiányos szindróma [AIDS] esetében) előidézhetnek betegségeket.

A kórokozó mikroorganizmusok által kiváltott fertőzési ciklus rendszerint az alábbi egymást követő lépések sorozatán keresztül valósul meg (**8.3. ábra**). A folyamat a gazdaszervezet kórokozó jelenlétének való kitettségével kezdődik, ezután következik a kórokozó megtapadása a gazdaszervezet nyálkahártyáján vagy bőrének felületén, majd a kórokozó inváziója, megtelepedése és szaporodása zajlik a gazdaszervezetben, a továbbiakban a kórokozó virulencia faktorok termelése révén elhárítja a gazdaszervezet védekező mechanizmusait, végül a gazdaszervezet elhagyásával alkalmassá válik egy újabb fogékony egyénnel való kapcsolat kialakítására.



8.3. ábra. A kórokozó által kiváltott fertőzési ciklus lépései.

A legtöbb kórokozó mikroorganizmus az emberi test meghatározott régiójában, adott sejt felszínéhez kapcsolódik specifikus sejtfelszíni kötődés révén. A *Streptococcus pyogenes* sejtjei például két a sejtfalhoz kapcsolódó molekulát, az M-proteint és a lipoteichosavat használják arra, hogy a gazdasejthez való kapcsolódást elősegítő mikrofibrillumokat képezzenek. Az M-protein ezen kívül a kórokozónak a neutrofil granulociták fagocitózisával szembeni ellenálló képességet is meghatározza. A sejtfelszíni kapcsolódásáért felelős makromolekulák egy része azonban nem kötődik kovalensen a baktériumok felületéhez. Ilyen például a glikokalix (más néven tok vagy nyák), amelyik a baktériumok által szintetizált és gyakran poliszacharidokból felépülő külső burok a sejt körül. A *S. pneumoniae* által termelt tok pl. a tüdőben megtelepedő sejtek számára biztosít védelmet a fagocitózissal szemben. A fimbriák és a pilusok a baktériumsejtek fehérjékből felépülő sejtfelszíni képződményei, melyeknek szintén szerepe van a gazdasejtek felületén található glikoproteinekhez való kapcsolódásban. A hosszabb fimbriák általában nagyobb számban találhatók a baktériumsejtek

felületén, mint a rövidebb pilusok, A baktériumsejtek felületén szórtan elhelyezkedő fimbriák közül az Enterobacteriaceae család (*Escherichia, Klebsiella, Salmonella* és *Shigella* nemzetségek) képviselőinek 1-es típusú fimbriáiról rendelkezünk a legtöbb ismerettel.

A kórokozó mikroorganizmusok fertőzési dózisa általában nem elég ahhoz, hogy annak hatására a gazdaszervezetben kialakuljon a betegség. Ehhez a patogénnek a gazdaszervezet által biztosított tápanyagok felhasználásával és környezeti feltételek mellett el kell szaporodnia. A patogén mikroorganizmusok növekedéséhez és szaporodásához szükséges vitaminok és növekedési faktorok nem mindig és a gazda szervezetének nem minden szövetében állnak rendelkezésre. A *Brucella abortus* például a szarvasmarha méhlepényében szaporodik a leggyorsabban, mert ott nagy mennyiségben található a kórokozó baktérium által könnyen hasznosítható eritritol nevű cukoralkohol, mely elősegíti a *B. abortus* szaporodását, és aminek a szarvasmarha vetélése a következménye. A nyomelemek, közülük is a vas mennyisége a kórokozó mikroorganizmusok növekedésének egyik fontos szabályozója. A gazdaszervezetben a vasat nagy affinitással kötő fehérjék (pl. a transzferrin és a laktoferrin) a szabad, hozzáférhető vas mennyiségének korlátozásával járulnak hozzá a kórokozókkal szembeni védekezéshez, ugyanakkor pl. a fertőzött gazdaszervezetben a táplálék kiegészítőkkel bevitt vas felesleg nagyban hozzájárulhat a kórokozók virulenciájának fokozódásához. Bizonyos kórokozók (pl. az *Escherichia coli*) azonban képesek olyan sziderofórok (vaskelát képző vegyületek) szintézisére, amelyekkel (pl. egy plazmidon kódolt sziderofór, az aerobaktin segítségével) akár a transzferrinből is képesek vasat felszabadítani.

Egyes kórokozók a gazdaszervezetbe való belépést és szaporodást követően annak meghatározott helyén hoznak létre fertőzési gócot (ilyen pl. a *Staphylococcus aureus* által előidézett bőrbetegség), míg mások a nyirokereken keresztül a nyirokrendszerbe kerülhetnek. Bakterémia során a kórokozó baktériumok a véráramba kerülnek. Ha ezek a baktériumok a vérárammal szétterjednek a gazdaszervezetben, és abban szisztémás gyulladásos folyamatot idéznek elő, akkor szepszisről beszélünk, ami szeptikus sokkhoz és akár halálhoz is vezethet. A bakterémia és a szepszis is csaknem mindig egy adott szervre, pl. a bélre, a vesére vagy a tüdőre jellemző lokális fertőzéssel veszi kezdetét.

Egy patogén virulenciája a kórokozó toxicitásának és invazivitásának köszönhető. Az inváziő a patogénnek az a képessége, hogy a gazdaszervezet sejtjébe vagy szövetébe belépve, ott szétterjed és betegséget okoz. Ehhez a patogénnek rendszerint át kell hatolnia a hámrétegen, de a szaporodás megkezdődhet az ép nyálkahártya felületén is, különösen akkor, amikor a normál mikrobióta megváltozik, pl. egy antibiotikum kezelés következtében. A kórokozók megtelepedése és szaporodása a korábban említett feltételek esetén (a vér vagy a nyirokrendszer közvetítésével) a belépési ponttól távoli helyeken is megtörténhet.

A kórokozók a betegség kialakításához különféle virulencia faktorokat termelhetnek, melyek közül a legfontosabbak az adhezinek, az invazinok, a toxinok és a szervezet védekező rendszere ellen ható faktorok. Az adhezinek a fertőző mikrobasejt olyan korábban bemutatott sejtfelszíni képződményei (pl. sejtfal alkotórészek, glikokalix, fimbriák, pilusok), amelyek segítségével a mikroorganizmus a gazdasejt meghatározott receptoraihoz képes kapcsolódni. Az invazinok segítségével elsősorban a szigorúan intracelluláris kórokozók úgy képesek inváziót kiváltani, hogy a gazdasejt citoszkeletonjával (sejtvázával) kapcsolatban lévő sejtfelszíni receptorhoz kötődnek, ami a mikrobasejt bekebelezéséhez, majd a gazdasejten belüli elszaporodásához vezet. A toxinok főként kórokozó baktériumok által termelt méreganyagok, melyek segítségével gátolják a gazdasejt funkcióját vagy elpusztítják azt. A bakteriális toxinoknak hagyományosan két csoportját különítjük el, a fehérje természetű exotoxinokat, amelyeket a baktériumsejtek aktív szintézis folyamataik során választanak ki a környezetükbe, és az endotoxinokat, amelyek a Gram-negatív baktériumok sejtfalának részét képező lipoposzacharidok (lipid-A). Az exo- és endotoxinokra jellemző legfontosabb tulajdonságokat az **8.3. táblázat** mutatja be. Az exotoxinok között rendszerint a citolitikus

toxinok, az AB toxinok és a szuperantigén toxinok csoportját különítik el. A citolitikus toxinok (pl. a *Streptococcus pyogenes* által termelt hemolizin, vagy a *Clostridium perfringens* α-toxinja) a gazdasejtben a citoplazma membrán épségének megbontásával idézik elő annak pusztulását (lízisét). A két alegységből felépülő AB toxinok (pl. a *Corynebacterium diphtheriae* által termelt diftéria toxin) működése azon alapul, hogy a toxin a B alegység segítségével a gazdasejt specifikus receptorához kötődik, majd ennek a kapcsolódásnak révén az A alegység bejut a célsejtbe és ott kifejti toxikus hatását. A szuperantigén toxinok (pl. a *Staphylococcus aureus* által termelt toxikus sokk szindróma toxin) úgy hatnak, hogy igen nagyszámú T-sejt aktiválásával kiterjedt gyulladásos folyamatot és szöveti károsodást idéznek elő. Azokat az exotoxinokat, amelyek a vékonybél hámsejteket támadják meg, és hányással, hasmenéssel járó tüneteket okoznak, enterotoxinoknak nevezzük és általában fertőzött élelmiszer vagy ivóvíz fogyasztásával kerülnek a szervezetbe. Számos baktérium (pl. az ételmérgezést okozó *Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens* és *Bacillus cereus*, vagy az emésztőrendszerre ható patogén *Vibrio cholerae, Escherichia coli* és *Salmonella enterica* serovar Typhimurium) képes enterotoxin termelésre. Az enterotoxinok hatásukat tekintve lehetnek citolitikus, AB vagy szuperantigén toxinok. A toxinokon kívül számos patogén termel olyan enzimeket, amelyek szintén, mint virulencia faktorok hozzájárulnak azok gazdaszervezetben való megtelepedéséhez és szaporodásához. Ilyen pl. a sztreptokokkuszok, a sztafilokokkuszok és bizonyos klosztridiumok által termelt hialuronidáz enzim, mely az emberi szervezet szöveteiben a sejt-sejt kapcsolatok kialakulásában fontos szerepet játszó poliszacharid, a hialuronsav bontásával a kórokozók terjedését segíti elő. A gáz gangrénát okozó klosztridiumok pl. K-toxint és kollagenázt termelnek, utóbbi a kollagén rost hálózat lebontásával teszi lehetővé a kórokozó szétterjedését a gazdaszervezetben. Ezen kívül számos patogén sztreptokokkusz és sztafilokokkusz szintetizál virulencia faktorként szolgáló különféle proteáz, nukleáz és lipáz enzimeket.

A gazdaszervezetben a kórokozókkal szembeni ellenálló képességet számos kockázati tényező befolyásolja. Ezek egy része, pl. a táplálkozás, a stressz, vagy a kórokozókkal szembeni kitettség kontrollálható, míg mások, pl. az életkor vagy a genetikai állomány nem. Az étrend fontos szerepet játszik a gazdaszervezet kórokozókkal szembeni érzékenységének alakulásában. Alacsony fehérje- és kalória tartalmú, nem megfelelő ételek fogyasztása az emésztőrendszer normál mikrobiótájának átalakulásához vezet, ami lehetővé teszi az opportunista patogének nagyobb arányú elszaporodását, és hatásukra fertőzési folyamatok létrejöttét. Megfigyelték azt is, hogy alultáplált, fertőzésnek kitett személyekben pl. a kolera kialakulásához szükséges *Vibrio cholerae* sejtek száma (infektív dózis) sokkal kisebb, mint az egészséges embereknél. Közismert tény, hogy a stressz fogékonyabbá teszi a szervezetet a betegségekkel szemben. Egerekkel és patkányokkal végzett kísérletek eredményei rámutattak arra, hogy olyan élettani stresszorok, mint pl. a fáradtság, a megterhelés, a rossz táplálkozás, a kiszáradás vagy a drasztikus klímaváltozás megnövelték a fertőző betegségek előfordulási gyakoriságát és súlyosságát. Ennek egyik oka lehet, hogy bizonyos stressz hatására termelődő hormonok (pl. a kortizol), gyulladás gátló hatásúak, és a fagociták aktivitásának

8. 3. táblázat. Az exo- és endotoxinok legfontosabb tulajdonságai.

Tulajdonságok	Exotoxinok	Endotoxinok
Kémiai sajátosságok	gyakran két (A és B) alegységből felépülő fehérjék	a sejtfal LPS rétegének lipidA része
Hőmérsékleti stabilitás	többségük hőérzékeny, 60-80°C-on inaktiválódnak	rendkívüli mértékben (250°C-ig) hőstabilak
Előfordulás	Gram-pozitív vagy Gram-negatív baktériumokban	kizárólag Gram-negatív baktériumokban
Megjelenés	élő baktériumsejtek választják ki	a sejtfal szétesésekor szabadulnak fel
Hatásmechanizmus	specifikus	nem specifikus
Betegségek	botulizmus, diftéria, tetanusz	Gram-negatív fertőzések, meningococcémia
Tünetek	specifikusak	általánosak (láz, hasmenés, hányás)
Toxicitás	erősen toxikusak, nanogrammnyi mennyiségük halálos	kevéssé toxikusak, szeptikus sokkot okozhatnak
Toxoid termelés	antigénné, nem toxikus toxoiddá átalakíthatók	nem lehetséges
Immunválasz	erős immunogének, hatásukra a gazdaszervezetben fokozódik az ellenanyag termelés	gyenge immunogének, a gazdaszervezet immunválasza nem elegendő a toxin neutralizásához

mérséklésével gátolják a kórokozók ellen kialakuló normális immunválaszt. Az életkor is fontos kockázati tényező lehet a fertőző betegségek szempontjából, hiszen azok gyakorisága csecsemőknél és időskorban rendszerint nagyobb. Az újszülöttek bélmikrobiótája bár gyorsan fejlődik, de mégsem egyezik meg a felnőttekével, ezért pl. az 1 évesnél fiatalabb gyermekekben bizonyos opportunista kórokozók, pl. az enteropatogén *Escherichia coli* törzsek által okozott hasmenéses megbetegedések aránya magasabb. Az életkor előrehaladtával bekövetkező anatómiai változások is hozzájárulhatnak egyes fertőzések kialakulásához. Az 50 év feletti férfiak körében gyakori jóindulatú prosztata megnagyobbodás, mely a vizelet elválasztás csökkenését eredményezi, egyúttal elősegítheti a vizelet elvezető rendszerben a kórokozók megtelepedését, és a húgyutak fertőzésének kialakulását. Helyi vagy akár általános fertőzések az egészségügyi ellátással összefüggésben is kialakulhatnak alapvetően nem fertőző, pl. rákos vagy szív- és érrendszeri betegséggel kezelt személyekben. Az ilyen típusú fertőzéseket, melyek járványokat is okozhatnak, nozokomiális fertőzéseknek hívjuk.

8.4. Kórokozók a lakásban és tágabb környezetünkben

Napjainkban a fertőző betegségek terjedésének egyik lényegi meghatározója a „városlakó” életmód, aminek egyebek mellett jellemző megnyilvánulása, hogy a napi 24 órából rendszerint kevesebb, mint 1 órát töltünk szabad levegőn, a fennmaradó időben zárt térben, otthon, a munkahelyen, vagy közlekedési eszközökön tartózkodunk. A hosszú idejű zárt térben való időtöltés számos (pl. fizikai, kémiai, biológiai és pszichológiai) tényezőre visszavezethető ok miatt megnöveli a kockázatát az épülettel összefüggésbe hozható betegség szindróma (angolul Sick Building Syndrome, SDS) kialakulásának.

A XXI. század urbanizált világában széles körben elterjedt a klíma-berendezések használata, ami bizonyos fertőzéses megbetegedések kockázatának emelkedéséhez vezetett. A *Legionella pneumophila* baktériumfajt, mint a kórokozót 1976 nyarán az USA-beli Philadelphiában tartott Amerikai Légionárius találkozón kitört tüdőgyulladás során fedezték fel (Fraser és mtsai, 1977). A *L. pneumophila* Gram-negatív, pálcika alakú sejtekkel rendelkező, obligát aerob kórokozó. Kisebb számban előfordul tavakban, patakokban és talajokban is

szabadon vagy biofilmek alkotójaként, de jellemzően a hűtőtornyokban és a légkondicionáló rendszerek párologtató kondenzátoraiban dúsul fel, mivel a melegítéssel és a hűtéssel, valamint a klórozással szemben is viszonylag ellenálló, továbbá képes az itt előforduló amőbákkal intracelluláris szimbiózis kialakítására. A *L. pneumophila* által kiváltott fertőzés emberről emberre nem terjed, a kórokozók a levegőbe kerülő vízcseppek (aeroszolok) révén kerülnek az ember légző rendszerébe. Ennek egyik bizonyítéka, hogy a legionellózis jellegzetes éves dinamikát mutat, rendszerint a nyári hónapokban éri el a maximumát, ami egybeesik a légkondicionáló berendezések használatának maximumával. A *L. pneumophila* jelenlétét azonban újabban meleg (35-48°C) vizű tartályokból, továbbá pezsgő- és élményfürdőkből is kimutatták, így a zuhanyzás vagy fürdőzés során képződő aeroszol belégzésével terjedő járványok ma már az év bármely időszakában felbukkanhatnak. Hazánkban jelenleg még nincs jogszabályi kötelezettség a *Legionella* baktériumok jelenlétének vizsgálatára annak ellenére, hogy a fokozott aeroszol képződés miatt a pezsgőmedencék üzemeltetése és használata komoly közegészségügyi kockázatot jelent. Meg kell azonban jegyezni, hogy a *Legionella* baktériumok jelenlétének detektálása egy környezeti mintában önmagában nem utal fertőzésre, hiszen annak kialakulását a korábban leírtak alapján számos egyéni tényező is befolyásolja (Barna és mtsai, 2011).

Ajánlott irodalom

Barna, Zs., Bánfi, R., Horváth, J.K., Kádár, M., Szax, A., Vargha, M. 2011. *Legionella* előfordulása különböző eredetű hálózati vízmintákban. Egészségtudomány, LV, 63-76.

Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., Mcdade, J.E., Shepard, C.C., Brachman, P.S. & Field Investigation Team. 1977. Legionnaires' disease. Description of an epidemic of pneumonia. New England Journal of Medicine, 297, 1189.

HMP 2008. http://hmpdacc.org/ - Data Analysis and Coordination Center (DACC) for the National Institutes of Health (NIH) Common Fund supported Human Microbiome Project.

Lederberg, J.; McCray, A.T. 2001. 'Ome Sweet 'Omics—a genealogical treasury of words. Scientist 15, 8-12.

Rupnik, M. 2015. Toward a True Bacteriotherapy for *Clostridium difficile* Infection. N Engl J Med 372, 1566-1568.

Warren, J.R., Marshall, B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, 1 (8336), 1273–1275.

9. A baktériumok gyakorlati alkalmazásának lehetőségei

Bizonyos mikrobákat, vagy mikrobiális hatásra megváltozott ízű terméseket stb. (pl. gomba termőtest, erjedt gyümölcs) az emberiség az írott történelmet megelőző időktől fogyasztott tápforrásként, vagy kultikus célra. Gál (2004) így fogalmaz: „A toxikus italok rituális fogyasztása, az eufórikus állapot teológiai fontossága, valamint az ilyen italok által kiváltott, „magatartászavarok" egymástól elválaszthatatlan jelenségek." A jó ízű és jól eltartható termékek esetében hamarosan kialakulhatott az „átörökíthető technológia" is, vagyis fermentációs biotechnológiai mesterséggé nemesedett a természettől ellesett tudás annak ellenére, hogy a fermentációs folyamatok okát, a hátterében álló folyamatokat nem ismerték. Az ókori Egyiptomban a kenyeret és a sört napi rendszerességgel fogyasztották (hiszen a sör a gyakorta fertőző vízzel szemben kevésbé volt veszélyes), de ismerték az ecet, a bor, aludttej (joghurt), sajt készítésének módozatait is. Az 5. dinasztia korában élt Ti (kb. Kr.e. 2480-2350) sírjában felfedezett dombormű ábráiból és feliratából még arra is következtetni lehetett, hogy a kenyér esetében biztosan használtak kovászt, de feltehetően a sör előállításánál is éltek a kovász alkalmazásával (Gaál, 1988). Vagyis használtak indító tenyészettel (starter kultúra) történő oltást. Megjegyezzük, hogy későbbi leírások alapján savanykás komponense is volt az egyiptomi sörnek, vagyis tejsavas baktériumokat is tartalmazhatott a kovász.

Az előbb említett fermentációs eljárások elterjedését feltehetően megkönnyítette (a termék élvezeti értékén túl) az alkalmazott tápközeg viszonylagos szelektivitása. Vagyis az alapanyag nagy cukortartalma (ozmotikus stressz), és az erjesztés során a növekvő alkohol, vagy savtartalom stb. A fermentáció tudománya – amint az könyvünk bevezetéséből kiderül – Pasteur és kortársai (Kühne, Wilhelm; Traube, Moritz; Büchner, Eduard) munkássága során alakult ki, és együtt fejlődött a mikrobiológiával. A fermentációs ipari biotechnológia az I. Világháború során, nyomán alakult ki. A biotechnológia elnevezést Ereky Károly (1878-1952) használta először és fogalmát így határozta meg: „Biotechnológia minden munka, amellyel alapanyagokból termékeket állítunk elő élő organizmusok segítségével." Ma a biotechnológia a mikrobiológia, a biokémia, a molekuláris biológia és a műszaki tudományok együttes felhasználását, alkalmazását jelenti gazdasági haszonnal járó ipari termékek előállítására. Vagyis az ipari mikrobiológia - mai értelmezése szerint - attól válik biotechnológiává, hogy nem pusztán élőlényeket, hanem gyakran enzimeket, genetikailag módosított szervezeteket is felhasznál a termék előállítására.

Az ipari méretű (mikro)biológiai technológia terméke gyakorta maga a sejttömeg (pl. sütőélesztő, oltótenyészet, termesztett gomba), azon túl pedig az anyagcsere termékei (pl. alkohol, tejsav, vitaminok, aminosavak, antibiotikumok). A termelő élőlények hagyományosan mikroszkópos gombák (pl. *Saccharomyces* élesztő: alkohol; *Aspergillus*, *Penicillium* spp. fonalas gomba: citromsav, penicillin), baktériumok (pl. *Lactobacillus* fajok: tejsav; *Streptomyces* fajok: sztreptomicin, eritromicin; *Corynebacterium* fajok: glutamin sav) és legújabban növényi és állati sejtek (pl. alkaloidok előállítása növényi sejttenyészetben, vagy „mabthera" monoklonális ellenanyag termeltetése megfelelő limfocita tenyészetben). A továbbiakban csak a baktériumok alkalmazását tárgyaljuk.

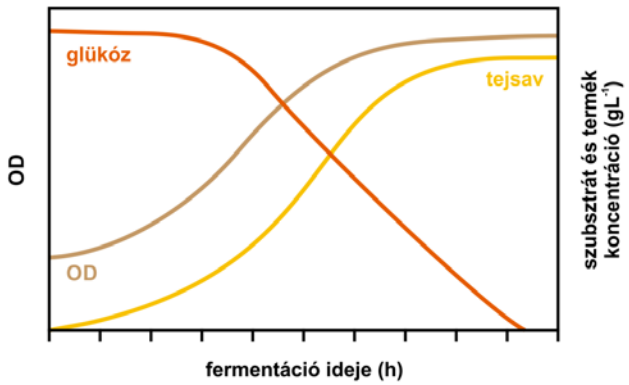
A baktériumok ipari célú felhasználása, ill. felhasználhatósága több tulajdonságuk együttes előfordulásának a függvénye. Vagyis hiába mutatjuk ki laboratóriumi szinten, hogy egy baktériumtörzsünk valamilyen értékes hatóanyagot termel, ha a törzs nem vonható tömegtenyésztésbe. A tömegtenyésztés lehetősége mellett lényeges, hogy a kérdéses hatóanyag előállítását képesek legyünk túltermeltetni (a törzsnemesítés, fejlesztés során létrehozott nagy hozamú mutánsokkal pl.). A túltermelés során az élettanilag indokolt mennyiségnél többet termel a kérdéses anyagból a törzs (elsősorban másodlagos anyagcsere terméket; lásd később). E tekintetben az is hasznos, ha a fajra vonatkozóan jól használható genetikai módosítási rendszerek állnak rendelkezésünkre (pl. plazmidok, transzdukciós rendszerek). A penicillin

termeltetése esetében éppen ezért az eredeti *Penicillium notatum* törzs használatáról nagyon hamar átváltottak egy *Penicillium chrysogenum* törzsre. A törzsfejlesztés eredményeképp itt a korai 1-2 g L^{-1} termékről a >20 g L^{-1} termékmennyiségig jutottak el. Fontos, hogy törzsünk ipari méretekben is gyorsan szaporodjon, valamint könnyen lehessen belőle oltóanyagot előállítani. Vagyis pl. legyen kitartó képlete, vagy hasznos, ha könnyen fagyasztható, liofilizálható. E mellett gyors növekedésével és akár más mikrobákat gátló anyagokkal „segítse" a tömegtermelést. Nagyon nehéz ugyanis megakadályozni, hogy az akár több száz köbméter hasznos térfogatú fermentorokba a többhetes futások során fertőző mikroba ne kerüljön be. Hasznos, ha a tömegtermesztés során a legolcsóbb szubsztrátokon, ipari melléktermékeken, hulladékon is jól szaporodik (pl. tejsavó, melasz, malátakivonat). Azt is figyelembe kell venni, hogy a kérdéses baktérium ne legyen (különleges eseteket kivéve, pl. oltóanyag előállítás) kórokozó sem emberre, sem pedig a haszonállatokra és növényekre.

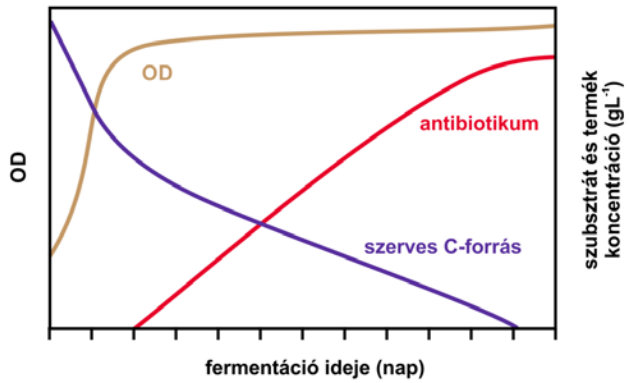
A baktériumok ipari méretű előállítására zárt, illetve folyamatos, nyílt tenyésztés alkalmas (Felföldi, 2013). A legegyszerűbb az ún. szakaszos fermentáció (batch), vagy a rátáplálásos szakaszos eljárás (feed-batch) alkalmazása, amikor megfelelő térfogatú sterilizált tápszubsztrátot oltunk be, majd a termékképződés csúcsáig ideális körülményeket teremtünk a baktérium szaporodásnak (hőmérséklet, pH, keverés, O_2 ellátás stb.). Ekkor leállítjuk a folyamatot és kinyerjük, tisztítjuk stb. a terméket. A rátáplálásos szakaszos eljárásnál a fermentlé mintegy 10%-át meghagyva friss tápközeggel hozzuk össze és a folyamat elölről kezdhető ezzel a következő tápközeg adaggal. A rátáplálás mindaddig megismételhető, amíg a rendszer nem válik oly mértékben fertőzötté, hogy a termelést le kell állítani. Ekkor a termelő törzs segítségével újra indítjuk a folyamatot a laboratóriumi „kémcső szintről" a „10%-os oltási ökölszabályt" figyelembe véve (vagyis 10 mL tenyészettel 100 mL táptalajt, majd az ebben kialakult tenyészettel 1 L térfogatot és így tovább oltunk). (Megjegyezzük, hogy a térfogatnövelés – léptéknövelés [scale-up] megfelelő módszerének kialakítása, az egyes térfogatokon alkalmas tápközegek, tenyésztési paraméterek megválasztása időigényes és bonyolult folyamat.) Félfolytonosnak nevezzük a folyamatot, ha a rátáplálásos szakaszos eljárást nem kell megszakítani, hanem számtalan cikluson keresztül végezhető. A folyamatos fermentáció során már a termékképződés maximumán tartjuk a rendszerünket, miközben friss tápforrással hígítjuk a tömény fermentlevet, amiből el is veszünk közben. Az egész rendszert pedig kemosztát, turbidosztát stb. elven szabályozzuk.

A zárt tenyészetben tapasztalható növekedési görbét a **9.1. ábrá**ban mutatjuk be (egyszerűsítve) a homofermentatív tejsav baktériumok példáján. Láthatjuk, hogy a szubsztrát bontásából termelt energiából és a szubsztrát szénforrásából épül fel a tejsavbaktériumok sejttömege (amit itt a tápközeg optikai denzitásának változásával mutatunk be). A szubsztrát fogyása arányos a sejtszám növekedésével (optikai denzitás növekszik). A sejtszám növekedésével párhuzamosan termelődik a tejsav végig az exponenciális fázis során, míg a stacioner fázisban a tejsavtermelés is leáll. Ez a jellegzetessége az elsődleges anyagcseretermékek képződésének. Az elsődleges anyagcseretermékek előállítása közvetlenül kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, ill. növekedéséhez.

A **9.2. ábrá**n egy *Streptomyces* törzs növekedését és sztreptomicin termelését mutatjuk be. Láthatjuk, hogy a sztreptomicin antibiotikum termelődése csak a logaritmikus fázis legvégén indul meg és a hosszan fenntartott stacioner szakaszban folyamatosan növekszik mennyisége (koncentrációja) a szerves C források, valamint egyéb szubsztrátok elfogyásáig. A sztreptomicin másodlagos anyagcseretermék, amelynek termelése az exponenciális sejtosztódáshoz már nem kellő környezeti feltételek mellett indul meg. A termék előállítása nem vesz részt a közvetlen energetikai anyagcserében, inkább egyes káros anyagcseretermékek eliminálására szolgál, vagy a tápközegben a megfelelő tápelem arányok fenntartását segíti (pl. C/N arány) elő.



9.1. ábra. Tejsavbaktériumok szaporodása és tejsavtermelése glukóz szubsztráton. A görbék csak a folyamatok irányát mutatják be.



9.2. ábra. A sztreptomicin antibiotikum termelése fermentációs technológiával. A görbék lefutása a folyamatok irányát mutatja be.

Megjegyezzük, hogy a másodlagos anyagcsere termékek legtöbbször kémiailag nagyon hasonló molekulák keverékei formájában termelődnek, optimális esetben az értékes (aktív) termék nagy mennyiségben, mintegy túltermelés formájában jön létre. Érdekesség, hogy a legtöbb jó másodlagos anyagcsere termék előállító baktérium spórás és a kérdéses anyagcseretermékek gyakorta a spórafal alkotóelemeinek homológjai.

Az előző bekezdésből láthatjuk, hogy akár a sejttömeg, mind az elsődleges, mind a másodlagos anyagcseretermékek stb. előállítása folyamatosan ellenőrzött és pontosan szabályozott körülményeket igényel. Az e célra szolgáló edényeket, rendszereket fermentornak nevezzük és a fermentáció szót ebben az összefüggésben, nagyléptékű (mikro)biológiai folyamatok kivitelezésének elnevezésére alkalmazzuk. (A fermentáció szó biokémiai értelemben a kemoorganoheterotróf mikrobák egyik energiatermelő anyagcsere folyamata [vö. 6.2. fejezet].) Méretüket illetően a pár száz milliliteres laboratóriumi üvegeszközöktől a több száz köbméteres rozsdaálló acélból készült tartályokig a legváltozatosabbak lehetnek. A fermentor rendszerek általános felépítését, a leggyakrabban ellenőrzött, ill. szabályozott paramétereket, valamint az elektronikus adatgyűjtő és beavatkozó rendszer blokksémáját a **9.3.**

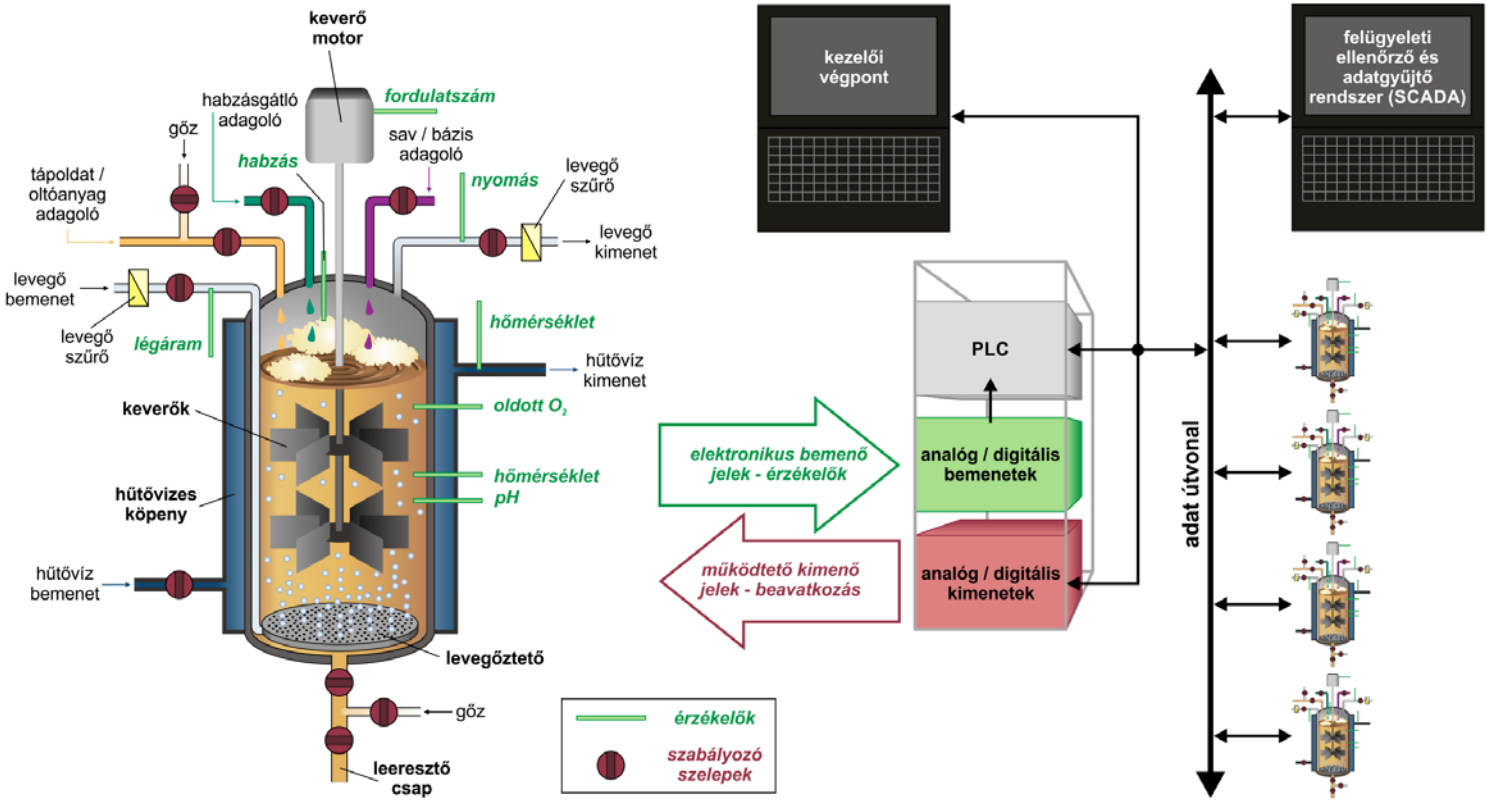
ábrában mutatjuk be.

A fermentor rendszereknek alkalmasnak kell lenniük a sterilizálhatóságra, ill. a steril körülmények hosszú távú fenntartására. A laboratóriumi méretű fermentorokat gyakorta táptalajjal feltöltve helyezik be nagy autoklávba és együtt sterilizálják, míg a nagy térfogatok esetén a rendszer falába és terébe vezetett gőz segítségével történik a csíramentesítés. Az oltás az edény oltócsonkján keresztül történik. Ugyanez a nyílás szolgálhat folyamatos fermentációnál a tápközeg pótlásra, minta és termék elvételére stb. A fermentáció során gondoskodni kell a megfelelő hőmérséklet tartásáról. Ezt az edény köpenyében áramoltatott termosztált vízzel, ill. a belső térben elhelyezett csőkígyó alkalmazásával végzik. A tápközeget megfelelő rendszerekkel kevertetni kell, valamint legalapvetőbb paraméterként (a hőfok szabályozása mellett) szabályozzák a levegőztetést (oldott oxigén koncentráció), a pH-t (sav és/vagy lúg adagolása) és ellenőrzik/gátolják a gyakorta jellemző habosodást. Az egyedi termékek előállítása függvényében ezeken túl további paraméterek is ellenőrizhetők, ill. szabályozhatók (pl. ammónium ion koncentráció). Természetesen mindezt a sterilitás feltételeinek fenntartásával kell elvégezni.

A modern fermentorok esetében a futási jellemzőket (hőfok, pH, DO, fordulatszám, levegőztetés, habgátlás stb.) megfelelő érzékelő rendszerekkel folyamatosan mérik és számítógépes adatgyűjtő rendszerekben tárolják, bemutatják. A számítógépes rendszerek nem pusztán adatgyűjtésre alkalmasak, de megfelelő programok segítségével az előre beállított igényeknek megfelelően be is avatkoznak. Vagyis szabályozzák a fordulatszámot (kevertetést), DO-t (levegőztetést), sav- vagy lúg adagolást (pH), tápközeg hőfokát stb. Ipari méretekben az adatgyűjtő és felügyeleti rendszer több fermentort szolgál ki, bár a szakértői személyes felügyeletre még ma is szükség van.

A fermentáció ipari fejlődése párhuzamos, bár összefüggő ágakon zajlik. Az előző bekezdések alapján el tudjuk képzelni, hogy milyen tág tere van a mérnöki fejlesztéseknek (pl. oxigén bevitelt optimáló áramlási rendszerek tervezése, a csíramentes beavatkozások megoldása, automatizálás). Hasonlóan széles a lehetőségek köre a biológiai fejlesztéseknek. A hagyományos törzsfejlesztés (mutáció, mutánsszelektálás) mellett a transzgénikus megoldások terjednek (pl. anyagcsere utak kiegészítése), ma már szintetikus genomok alkalmazásáról is gondolkodnak. Kihívás a színtenyészetek mellett/ helyett 2-3 mikrobafaj, együttes tenyésztésének (kokultúra) megoldása. E célra is, de az értékes termelő szervezet sejttömegének „visszatartására" immobilizált sejtrendszereket alakítanak ki (pl. a sejtek felületekhez kötésével, vagy hordozókba zárásával, önaggregációjuk elősegítésével, vagy akár membránokkal határolt kettős fermentor terek kialakításával). A tömegtenyésztés megoldását gyakorta a szilárd fázisú fermentálás jelentheti bonyolult technológiai megoldásai ellenére. Különleges területe a fermentációs iparnak az ún. biokonverziós eljárások fejlesztése, alkalmazása. Ilyen esetekben egy ipari termék-előállítás valamilyen köztes lépését mikrobák segítségével végezzük szerves vegyipari eljárás alkalmazása helyett. Jellemző a „félszintetikus antibiotikumok" előállítása esetében, vagy szteroid gyógyszerhatóanyagok termelésénél.

A hihetetlenül változatos ipari méretű bakteriális gyakorlati fermentációs alkalmazások körét a **9.1. táblázat**ban az előállított termék elsődleges formája szerint csoportosítva (sejttömeg, elsődleges és másodlagos anyagcseretermékek, enzimek, különleges termékek) villantjuk fel a legnagyobb tömegben előállított termékek sorrendjében. Megjegyezzük, hogy nem mindig választható el élesen a baktériumok, gombák stb. mint termelő szervezetek alkalmazása. Ugyanazt az anyagot, terméket üzem építésének időpontja szerint párhuzamosan más és más termelő szervezettel is előállíthatják. A következő



9.3. ábra. Ipari fermentor és szabályozásának vázlata.

fejezetekben pedig néhány jellemző és fontos termék előállítását, felhasználását mutatjuk be.

9.1. Baktériumok az élelmiszeriparban

A legtöbb ember napi rendszerességgel fogyaszt baktériumok segítségével, vagy bakteriális fermentációs termékekkel előállított élelmiszereket, mi több korunkban újból „divattá" vált e termékek házi elkészítése. A tejsavas erjesztéssel előállított tejtermékek, húsáruk, savanyúságok mind ilyenek. Megjegyezzük, hogy ezeket az ősi időkre visszanyúló technikákat a természeti népek folyamatosan használják. A fejlett országokban a városiasodás, a tömegtermelés megjelenése, az élelmiszerhigiénia előírásainak betartása stb. fokozatosan szorította ki őket a háztartásokból. Az emlős állatok egyébként a törzsfejlődés során „kötöttek szövetséget" a tejsavas erjesztést végző baktériumokkal, amelyek a külső és belső hámfelszínek domináns kolonizálói és ezáltal az egészséges állapot fenntartói (lásd 5.1. fejezet). Ily módon a tejsavas baktériumok bizonyos fajainak, a velük készült termékek fogyasztása egyben a gyomor-bélrendszer újraoltását mikrobiótájának kiegészítését is jelenti. Az élelmiszeripar ezeket a baktériumokat probiotikumnak, a velük készült termékeket probiotikus élelmiszernek nevezi. Megjegyezzük, hogy élelmiszereink gyakorta tartalmaznak olyan szerves anyagokat (pl. xilóz), amelyek gyomor-bélrendszerünkben a „hasznosnak" minősített baktériumok szaporodását, térnyerését támogatják. Az ilyen anyagokat prebiotikumnak nevezzük. A pro- és prebiotikumot egyaránt tartalmazó élelmiszert a táplálkozás tudomány szinbiotikumként jelöli meg.

Vegyük szemügyre először a házi tejfeldolgozás lépéseit és a kapcsolódó bakteriológiai folyamatokat. A feldolgozásra szánt lefejt tejet bő szájú edényekben hűvös helyen tárolják. A tej tetején már pár óra múltán összegyűlik egy tejzsírfrakció, a tejszín. Ezt külön összegyűjtik és amíg „édes" alkalmas tejszínhab előállítására, de a tejszín legnagyobb részét köpüléssel vajra és íróra választják szét. A tejszín tejzsír emulziója esik szét a zsíros vajra és a vizes íróra. Megjegyezzük, hogy savanyú tejszínből is készíthető vaj, ezt hagyományosan írós vajnak nevezik. Az ottmaradt tej lassan megalszik, aludttej lesz belőle. A tej tejcukor – laktóz – tartalmát ugyanis a tejsavas baktériumok (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. stb.) tejsavvá alakítják, és lassan a tej pufferoló Ca^{2+} ion tartalmát kimerítve megsavanyítják. Már pH = 5 körüli értéken a tejfehérjék kicsapódnak, a tej megalszik. A tetején pedig összegyűlik a tejföl. (Az édes tejszín is tejföllé savanyítható.) Ugyanezzel a folyamattal – aludttej készítés – oltótenyészetek segítségével, nagyobb hőfokon (30-37°C) kefirt (pl. *Lactobacillus delbrueckei* subsp. *bulgaricus*), vagy joghurtot (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. stb.) állítanak elő. Ha az aludttejet tovább állni hagyjuk, akkor szétválik savóra és túróra. Ekkor az alvadék micella szerkezete változik meg. A folyamat felgyorsítható az aludttej legfeljebb 60°C hőmérsékletre melegítésével. A felesleges savó szűréssel még jobban eltávolítható. Az így készült savanyú túró sokféle élelmiszer alapanyaga, magában is fogyasztjuk. A túró tovább érlelve, vagy akár más oltótenyészetekkel beoltva a sajtkészítés alapjául is szolgál. A sajtkészítés során a maradék tejcukor vegyes savas erjedése (a tejsav mellett pl. propionsav, vajsav), vagy a tejfehérje átalakulása, akár bomlása (peptonizáció) következik be. A hagyományos gazdálkodásban a savót és az írót állatok takarmányozásánál használják. E mellett gyakori, hogy a savó, ill. író forralásával, esetleg citromsav hozzáadásával a maradék tejfehérjét is csapadékba viszik, leszűrik. Ez az orda, amely „semleges" ízével sós és édes ételekhez egyaránt használható, vagy egyéb tejtermékek készítésébe (pl. krémsajtok) vonható.

A tejet azonban enzimatikus eljárással is meg lehet alvasztani, oltó, oltóenzim használatával. A hagyományos oltó szopós kérődző állatok (borjú, juh, kecske) oltógyomor benneke, de alkalmaznak növényi enzimeket is (pl. a tejoltó galaj [*Galium verum*], mezei sóska [*Rumex acetosa*], fehértejű keserűgomba [*Lactarius piperatus*]), illetve legújabban az

9.1. Táblázat. Ipari méretekben fermentációs, vagy biokonverziós eljárásokkal termelt bakteriális termékek.

„Termék”	(Termelő) baktérium	Felhasználás, alkalmazás	Megjegyzés
Sejttömeg előállítás			
Tejsavas erjesztő baktérium oltóanyag	*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Pediococcus* spp.	Fermentált élelmiszerek (tej- és hústermékek, kovászolt zöldségek) előállítása, valamint táplálék kiegészítők, takarmányok előállítása.	Élelmiszerekkel, de önmagukban is fogyasztják (pl. széles spektrumú antibiotikum fogyasztása esetén).
Mikrobiális peszticid	*Bacillus thuringiensis* törzsek	Csípős szúnyogok, kukoricabogár stb. kontrolljára spórakészítmény	Spóratömeget és toxinkristályt is alkalmaznak.
N_2 kötő baktérium oltóanyag	*Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp.	Pillangósvirágúak gyökérgumó képzését elősegítő készítmény.	Talaj vagy mag oltásra alkalmazzák.
Növényi növekedést serkentő oltóanyag	*Azospirillum* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. stb.	A növények gyökerén szaporodva N_2 kötéssel, tápelemek (P, Fe, Mn) szolgáltatásával, növényi hormontermeléssel javítja a termésbiztonságot	Talajoltó készítmény formájában vetés előtt közvetlenül juttatják ki.
Bioaugmentációs oltóanyag	*Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp., *Dehalococcoides mccarthyi* stb.	Szénhidrogén környezetszennyezések (benzin, gázolaj, poliaromások) klórozott származékok, növényvédőszerek stb. bioremediációja.	Változatos in-situ és on-site technológiákban alkalmazzák.
Egysejtfehérje (SCP)	*Spirulina* spp., *Methylococcus* spp., stb.	Takarmányozási célú baktérium sejttömeg előállítás.	Bakteriális fehérje alapú élelmiszereket is előállítanak.
Plazmid vektorokat tartalmazó sejtek	*Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* stb.	Laboratóriumi transzgénikus eljárások	Az *A. tumefaciens* segítségével növényekbe vihető be genetikai információ.
Ökotoxikológiai tesztekhez sejttömeg	*Vibrio fischeri*, *Azotobacter vinelandii*, *Erwinia herbicola* stb.	Bioszenzorok - Környezeti minták citotoxikus anyag tartalmának, nehézfém koncentrációjának stb.	Riporter gén (pl. bioluminescencia, fluoreszcencia) bevitellel is.

formázott: Betűszín: Vörös

		kimutatása.	
Szájszagot és fogszuvasodást kontrolláló termékek	*Streptococcus salivarius* törzsek	A szuvasodást elősegítő *Streptococcus* fajok helyett kötnek a fogakhoz.	Sok vitát kiváltó termék
Elsődleges anyagcseretermék előállítás			
Szerves savak	*Lactobacillus delbrückii, Lactobacillus casei* stb., *Lactococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Gluconobacter suboxydans, Zymomonas mobilis, Propionibacterium* spp., *Escherichia coli*	Tejsav, glukonsav, borostyánkősav és termékei az élelmiszeriparban és gyógyszeriparban használják (pl. savanyító és tartósítószer, ízfokozó, felületaktív anyag gyártás), valamint a polilaktát biodegradábilis „plasztik" alapanyag gyártása.	Több terméket jellemzően fonalas gombák segítségével állítanak elő.
Enzimek	*Bacillus licheniformis, Streptomyces rubiginosus, Bacillus subtilis, Bacillus alcalophilus, Pseudomonas* spp., *Thermus aquaticus, Pyrococcus furiosus* stb.	Legnagyobb mennyiségben amiláz, proteáz, glukóz-izomeráz, celluláz és a molekuláris biológiában alkalmazott enzimeket állítják elő baktériumokkal. Sok gyógyszeripari konverziót enzimekkel végeznek.	Az enzimek jeles részét gombákkal termeltetik. Különösen fontosak az extrém környezeti feltételek mellett is aktív enzimek (pl. forraló mosásban).
Aminosavak	*Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum, Escherichia coli, Serratia marcescens* stb.	L-glutamát, L-aszpartát, L-alinin, glicin, L-cisztein, L-triptofán, L-hisztidin, L-lizin, DL-metionin, aszpartám a leggyakoribb élelmiszeradalékok.	Több terméket jellemzően fonalas gombákkal állítanak elő.
Vitaminok	*Propionibacterium freudenrechii, Pseudomonas* spp.	B-12 vitamin, riboflavin a legnagyobb mennyiségben előállított, gyógyszerként, ill. élelmiszeradalékként felhasznált vitaminok.	Több terméket jellemzően fonalas gombákkal állítanak elő.
Ecetsav	*Acetobacter aceti, Acetobacter pasteurianus, Acetobacter europaeus stb., Clostridium aceticum* stb.,	Az élelmiszeripari borecetgyártás mellett az ecetsavat vinilacetát, cellulóz acetát polimerek stb. előállítására	Az ecetsav legnagyobb részét ma szerves szintézisekben termelik.

	Acetobacterium woodi, Sporomusa spp.	használják.	
Etilalkohol	*Zymomonas mobilis, Geobacillus* spp., *Escherichia coli* törzsek	Néhány különleges alkoholos ital mellett az üzemanyag célú felhasználásra előállított etanol termeltetésre tervezik alkalmazni.	Egyelőre *Saccharomyces cerevisiae* a termelő szervezet.
Szerves oldószerek	*Clostridium acetobutylicum, Clostridium pasteurianum, Clostridium beijerinckii, Bacillus macerans, Methylosinus trichosporium* stb.	Aceton, izopropanol, butanol, propándiolok, butándiol előállítása.	Ma legnagyobb mennyiségben szerves szintézissel állítják elő.
Poli-hidroxi-alkanoátok	*Ralstonia eutropha, Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp., *Chromobacterium violaceum* stb.	A poli-hidroxi-vajsav, poli-hidroxi-valeriánsav, stb. jellegzetes bakteriális C tartalék komponensek. Egyúttal a poli-hidroxi-alkanoátok hőre lágyuló polimerekként is felhasználhatók.	Biológiailag bontható polimerek előállítása.
Másodlagos anyagcseretermék előállítás			
Antibiotikumok	*Streptomyces* spp., *Amycolatopsis mediterranei, Actinoplanes teichomyceticus, Paenibacillus polymyxa* stb.	Pl. griseofulvin, rifampicin, kloramfenikol, tetraciklin, linkomicin, vankomicin, kasugamicin, monensin antibiotikumok gyógyászati, ill. mezőgazdasági célra	A *Penicillium* és a *Cephalosporium* gombanemzetségek fajai is fontos antibiotikumokat termelnek (penicillin, cefalosporinok).
Immunszuppresszáns szerek és antitumor ágensek	*Streptomyces hygroscopicus, Streptomyces peucetius*	A rapamicin, dexorubicin (daunomicin) talán a legismertebbek.	Vannak fonalas gombák segítségével előállított szerek is.
Féreg és rovarölő szerek	*Streptomyces avermitilis*	Az avermektin széles körben használt állatgyógyászati antiparazitikum.	Alapvetően antibiotikum.
Poliszaccharidok	*Xanthomonas campestris, Leuconostoc mesenteroides, Streptococcus mutans, Azotobacter vinelandii, Pseudomonas elodea* stb.	A xantán, dextrán, alginát, gellán élelmiszerekben, gyógyszerekben felhasznált poliszacharidok.	Az alginátot leggyakrabban barnamoszatokból (pl. *Laminaria* spp.) állítják elő.
Felületaktív anyagok	*Rhodococcus* spp. stb.	Pl. ramnolipidek alkalmazása a kő	A felületaktív anyagok

		olajkitermelésben.	kármentesítések során is hasznosan alkalmazhatók.
Peszticidek	*Bacillus subtilis*	Az oligopeptid, lipopeptid, stb. anyagcseretermékek a gyümölcsök, könnyen romló zöldségek stb. esetében tág spektrumú fungicidek.	Használatuk nem minden országban engedélyezett.
Különleges fermentációs termékek			
Terápiás fehérjék	Rekombináns *Escherichia coli* törzsek	Pl. humán hormonok (szomatotropin, inzulin, follikulus stimuláló hormon stb.), immunmodulátorok (interferonok, interleukinok, tumor nekrózis faktor stb.), vérfehérjék (végalvadási faktorok, szöveti plazminogén aktivátor stb.).	Több próbálkozás folyik állatokkal, állati sejtekkel történő előállításra.
Vakcinák és rekombináns vakcinák	*Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani, Vibrio cholerae, Bordatella pertussis, Salmonella typhi, Mycobacterium bovis, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* stb.	Oltóanyagok gyermekek és felnőttek részére, állatgyógyászati oltóanyagok.	Kísérleteket végeznek növényi ehető vakcinák előállítására is.

Aspergillus niger var. *awamori* gombafajjal termeltetik. A rennin (kimozin) proteáz enzim a tej kazein-k fehérjéjét hasítja és így „megalvasztja" a tejet. Az eredmény természetesen édes túró és édes savó. Az édes túróból készült sajtok esetében a nagyobb tejcukor tartalom változatos oltó baktériumkultúrák használatával sokféle ízű, állagú sajt előállítását teszi lehetővé. Ne feledjük el természetesen, hogy a sajtokban a tejzsír is benne van (sőt a túróhoz „vaj" adagolásával mennyisége növelhető), egyes keménysajtok szárazanyagának zsírtartalma akár 50 % is lehet.

A tejsavas erjesztő baktériumok mellett az „emmentáli" típusú sajtok aromáját, jellegzetes nagy lyukas szövetét *Propionibacterium* fajok (*P. shermanii*) is befolyásolják. A „rúzzsal" érő sajtok felületén kialakuló sárgás-rózsaszín bevonatot *Brevibacterium* fajok segítségével történő fürdetéssel, érleléssel állítják elő (*B. linens*). A sajtgyártásban változatos fonalas gombákat is használnak (pl. márványozott sajtok – *Penicillium requefortii*; fehérpenészes lágy sajtok – *Penicillium candidum* stb.).

A fermentált húsáruk, pl. szárazkolbász, szalámi esetében hagyományosan a húsfeldolgozás során fertőződik a „töltelék". Részben az állat bélbaktériumai (bélbe töltik, még ha tisztított is), de a külhám felülete is forrása a tejsavas, propionsavas erjesztő fajoknak. A szelektív közeget a sózás, és egyébként is a kis víztartalom (nagy zsírtartalom) (kis vízaktivitás), valamint megfelelő fűszerek használata biztosítja, no meg a relatíve hideg környezet. (A sertés feldolgozás hagyományos ideje – részben az ünnepekhez kapcsolódva – a leghidegebb tél.) A bakteriális aktivitás fokozódását és egyben az élelmiszer külső felületének antimikrobiális anyaggal történő kezelését a füstöléssel érik el. A füst – módszertől függően – 20-40^{o}C hőmérsékletre melegíti fel a hústerméket, amelyben a baktériumok (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Pediococcus* spp., stb.) szaporodni kezdenek és savat termelnek. Ezzel párhuzamosan a termék vizet is veszt (izzad) és külső felületébe a füst polifenolos és egyéb antimikrobiális anyagai belediffundálnak. Az eredmény a száraz, hűvös helyen akár több évig is eltartható húsáru lesz. Megjegyezzük, hogy a sonka esetében hasonló folyamatok zajlanak le. Itt azonban a nagy térfogatú egybefüggő izomszövet tartósításához elengedhetetlen a megfelelő ideig páclében történő áztatás. A pác összetevői azonosak a töltött húsáruk esetében használt sóval és fűszerekkel, de kiegészíti a salétrom (KNO_3) használata. A páclében akár 3-4 hétig is áztatni kell a húst, hogy a só, fűszerek mindenütt egyenletesen „átitassák". A salétrom (vagy újabban kálium, vagy nátrium nitrit) szerepe az izom mioglobinjához kötődve szép pirosas színének megtartása és egyben néhány romlást okozó baktérium (pl. *Clostridium* spp.) gátlása. Megjegyezzük, hogy a nitrát és nitrit ionok nagyobb mennyiségben toxikus hatásúak, a hemoglobin O_2 szállítását gátolják (methemoglobin képződés miatt). Ez okból a nitrites, nitrátos pácok használatánál figyelmi kell a megengedett koncentrációk alkalmazására.

A kovászos uborka házi készítése még városokban is meglehetősen általános. Feltehetően mindenkinek megvan a saját receptje a készítéshez, mi csak azt vesszük szemügyre, hogy honnan származnak a baktériumok és mitől lesz kellően szelektív a környezet a tejsavas erjesztő fajok elterjedéséhez. A *Lactobacillus* fajok (elsősorban *Lactobacillus plantarum*) magáról az uborkáról, de a fűszerezéshez használt kaporról, vagy az oltóként alkalmazott meggyágakról származik. A szelektív környezetet pedig az adagolt só (mintegy 5%) okozza, valamint az uborka jellegzetes poliszacharidjai, így pl. a pektin és a forralt víz. A forralással ugyanis kiűzzük a gázokat a vízből, így az oxigént is. Vagyis anaerob is lesz a közeg. A meleg, 30-40^{o}C-os helyre tett uborka 4-5 nap alatt kellően savanyú lesz, azonban nem tartható el hosszabb ideig, „megpimpósodik". Más zöldségek, és káposzta is savanyítható hasonló gyors, nyári módszerrel. A jóval hosszabb ideig, akár fél-egy évig is hűvös helyen eltartható savanyú káposzta, vagy más savanyított zöldségek („téli káposzta") esetében az érlelés kisebb hőfokon (15-20^{o}C) zajlik és jóval hosszabb ideig (4-6 hét) tart. Lényeges az is, hogy akkor a káposztának csak a saját levét használjuk, nem adunk hozzá vizet. Figyelni kell az anaerob viszonyok kialakítására és fenntartására a kellő tömörítéssel és a tömörített káposzta „lesúlyozásával". Az

erjedés végén jóval nagyobb lesz a savtartalom a nyári gyors érleléshez viszonyítva. Az erjedés kezdetén fakultatív anaerob baktériumok termelnek savat és fogyasztják el az oxigén maradékát (pl. *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.) Ezt követően a *Leuconostoc mesenteroides* és *Weissella* fajok veszik át az erjesztés feladatát, míg végül a *Lactobacillus* fajok (*Lb. brevis, Lb. plantarum*) a pH-t 3-as értékig csökkentik. Ez a pH érték akadályozza meg a romlást. Sajnos a tömegtermelés gyakorta a fermentációs iparban előállított tejsavat veszi igénybe a savanyított áruk előállításánál a munkaigényesebb és időnként rosszul is sikerülő (pimpósodás) mikrobiológiai folyamatok helyett. A pimpósodás során a káposzta, uborka stb. tetején bevonatot képezve szaporodnak el aerob ecetsavképző fajok, amelyek még más anyagcsere termékeikkel is (íz) romlást okoznak.

A tejsavas erjedéssel előállított termékek sorában – legalább az említés szintjén – a silótakarmányt is meg kell jelölni. Ez a technológia a virágzás, vagy legkésőbb a magkötés előtt levágott nagy fehérje és cukortartalmú takarmánynövények tejsavas erjesztéssel történő tartósításra szolgál. A legtöbb haszonállat fontos kiegészítő – elsősorban téli – takarmánya. Előállítása nem „időjárásfüggő", mint a széna szárítása.

Az élelmiszertermékek két nagy csoportját, a kelesztett sütőipari termékeket (pékáruk), illetve a legkülönbözőbb alkoholos italokat elsősorban élesztők segítségével állítják elő. Míg a kenyér esetében az alkoholos erjedés során keletkezett CO_2 gáz a tésztát lyukacsossá, könnyűvé tevő hatására számítunk (az alkohol sütés közben elillan), addig az italok esetében pont az alkoholos erjedésben keletkezett etilalkohol adja az élvezeti értéket, természetesen sok más íz adó mikrobiális fermentációs termék mellett (savak, észterek stb.). Néhány kivételtől eltekintve ezekben az esetekben a baktériumok elszaporodása inkább ún. termékbetegségeket okoz. Üdítő kivételt jelent a kenyér esetében annak enyhe savanyúsága. Bizonyos rozskenyerek, teljes kiőrlésű gabonából készített különleges kenyerek esetében ez akár meghatározó íz is lehet. A kovásszal ilyenkor tejsavbaktériumok is kerülnek a kelő tésztába és ezek a *Lactobacillus* és *Streptococcus* fajok felelősek a megfelelő savanyúság kialakításáért. A tejsav forráspontja 122ºC (szemben az etanol 78ºC-os értékével) vagyis sütésnél nem illan el teljes mennyiségében.

Az alkoholos italok előállítása során csak ritkán használnak baktériumokat. A *Zymomonas mobilis* segítségével erjesztik a pálmabort, vagy a Közép-amerikai - bizonyos agave fajok leveleinek levéből előállított – csekélyebb alkohol tartalmú „pulque" italt. Ugyanakkor a tejsavas baktériumok hozzájárulhatnak az italok savtartalmának kialakításához. A nagy almasav tartalmú (elsősorban vörös) szőlőfajtákból készült borok esetében a palackozást, fogyasztást megelőzően ún. malolaktikus fermentációval a szelídebb ízű tejsavvá konvertálják az almasavat. Az almasav csípősen savanyú és kesernyés íze (a csersavakkal együtt fanyar, összehúzó hatású) nagyobb töménységben ihatatlanná teszi az italt. Ezen segít a *Lactobacillus, Pediococcus* és *Oenococcus* fajok tevékenysége.

Az alkoholos italok előállítása során ugyanakkor a baktériumok megjelenése, tevékenysége inkább kárt okoz. A borbetegségek jellegzetes sorát okozzák. A teljesség igénye nélkül ilyenek az egér íz, keserű íz, talaj- és/vagy dugó íz, a bor virágosodása, nyúlósodása, tejsavas erjedése és ecetesedése. Az egyes rossz ízeket gyakorta bakteriális anyagcseretermékek okozzák: egéríz – 2-acetil,-3,4,5,6-tetrahidroxipiridin (*Lactobacillus brevis, Lb. fermentum, Lb. hilgardii*); keserű íz – a glicerinből képződő akrolein (*Pediococcus* spp., *Oenococcus* spp., *Lactobacillus* spp.); talaj- ép/vagy dugó íz – geozminok (*Streptomyces* spp.); virágosodás – a bor felületén kialakuló baktérium bevonat (pimpó) gyakorta ecetsav termelő fajok; nyúlósodás – *Leuconostoc* és *Pediococcus* fajok által termelt exopliszacharidok, így dextrin; tejsavas erjedés – nagy cukor és almasav tartalom esetén nagyobb hőmérsékleten (>25ºC). Utolsónak soroltuk fel az esetesedést, ami a kisebb alkoholtartalmú, melegben és aerob viszonyok között tárolt borok esetében fordul elő. Bár az ecetsavas bor beteg, ezt a folyamatot egy meglehetősen fontos élelmiszer előállító területen tudatosan alkalmazzák: (bor) ecetgyártás,

A borecet előállítása ízesítési, tartósítási stb. célra az emberiség hihetetlenül régi

„tudománya”. Korai babiloni írások (Kr.e. 4000) a datolyaborból készült ecetről tanúsítanak. Egészen a XVII. századig a bortároló edényekben, hordókban hozták létre a jó ecetet kisebb alkoholtartalmú (8-10 %) borokból egyszerűen az edény kinyitásával, levegőztetésével. Az O_2 hatására a boron bevonat alakult ki *Acetobacter* fajokból, amelyek az etilalkoholt ecetsavvá oxidálják. Később bükkfából készült álló tartályokban bükkfagyaluforgács ágyon csörgedeztették a bort, vagy 12% etilalkohol tartalmú vizes oldatot. Így az alkohol 98%-ának oxidálása mellett 5-12 %-os ecet nyerhető. Ezt az eljárást ma már a kisebb üzemekben is felváltotta a levegőztetett „alámerített”, vagyis folyadékban történő inkubálás *Acetobacter aceti* faj segítségével. Az ipari méretű fermentációs ecetgyártás során közvetlenül a glukóz (vagy más egyszerű cukor) tartalmú alapanyagból indulnak ki és acetogén *Clostridium* fajok állítják elő, leggyakrabban a *Cl. thermoaceticum*.

A fentiekben leírt nagy tömegben előállított és fogyasztott termékek mellett az élelmiszeripar sok egyéb fermentációs terméket is használ adalékanyagként, táplálék kiegészítőként, édesítőszerként, tartósítószerként stb. Talán a legnagyobb tömegben az aszpartám édesítőszert gyártják, amely aszpartil-fenilalanin-metilészter dipeptid, vagyis az L-fenilalanin és az L-aszparaginsav aminosavakból állítják elő. Lényegesek ezen túl az élelmiszerekhez adatolt esszenciális aminosavak, vitaminok is. Jeles mennyiségben használják még az élelmiszerek állagát befolyásoló anyagokat. Kiemeljük közülük a bakteriális fermentációs termék xantánt (*Xanthomonas campestris* használatával állítják elő) éves becsült mintegy 700 m USD globális forgalmával, amelynek felét adja az élelmiszeripar. A tartósítószerek közül a *Lactococcus lactis* baktérium által termelt Nisin antimikrobiális peptidre (bakteriocin) hívjuk fel a figyelmet, amely sok élelmiszerromlást okozó Gram-pozitív baktérium (*Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. stb.) szaporodását gátolja. Nem hagyhatjuk ki az ipari enzimeket sem. Egyedül a gyümölcslevek előállításánál fontos pektinázokat emeljük ki. A sort hosszan lehetne még folytatni a világ élelmiszer ellátásának különlegességeivel, ill. azok mikrobiológiájával (pl. 100 napos kacsatojás, kumisz, kimcsi), ez azonban már nem célunk. Hasonlóképen nem célunk az élelmiszerek romlását okozó, vagy élelmiszerekkel terjedő kórokozó baktériumok (összességében az élelmiszerbiztonság) szerteágazó körének bemutatása.

9.2. Prokarióták felhasználása a gyógyszeriparban

2009-ben az antibiotikumok világpiacát 42 md USD értékűre becsülték, amely az előrejelzések szerint 2015-re mintegy 80 md USD értékre nő. Ez a fermentációs termékek világpiacának legnagyobb részét teszi ki.

A ma forgalomban levő antibiotikumok (másodlagos anyagcseretermék) legnagyobb részét baktériumgátló anyagok adják. Ugyanakkor pontosan a baktériumok elleni hatásos védekezés miatt megnő az antibiotikum rezisztens bakteriális kórokozók aránya és – érthető módon – az ilyen szerekre eleve rezisztens gombakórokozók által keltek betegségek száma. Nagy az igény napjainkban a hatásos antimikotikumokra. A mikrobák az antibiotikumokat sok esetben a fajok közötti versengés, gátlás céljából állítják elő. Igazolni látszik ezt az a tény, hogy sok faj berendezkedett az antibiotikumok elleni védekezésre. Vagyis természetes körülmények között is a másik faj gátlása az antibiotikumok a feladata. Más esetekben az antibiotikumok jelző molekula szerepet töltenek be, vagy a mikrobák anyagcsere-egyensúlyának fenntartásában töltenek be szerepet (pl. felesleges C „süllyesztése”). Antimikrobiális hatásuk alkalmanként gyenge, a gyógyászati célú felhasználáshoz mesterségesen módosítani kell a molekulát (pl. egyes félszintetikus szerek).

Az antibiotikumok csoportosítása kémiai szerkezetük (pl. ß-laktámok, makrolidek, tetraciklinek, peptidek, aminoglikozidok), vagy hatásmechanizmusú (pl. sejtfalszintézis gátló, DNS szintézis gátló, fehérje szintézis gátló, penicillináz gátló), hatásspektrumuk alapján

szokásos. Részletes ismertetésük nem feladatunk, ugyanakkor az antibiotikumok, ill. termelő szervezeteik szokásos szűrési eljárását röviden bemutatjuk.

A baktériumok által termelt antibiotikumok legnagyobb részét az Actinobacteria törzs (filum) tagjainak segítségével állítják elő. Így azután elsősorban ezeknek a Gram-pozitív baktériumoknak az izolálása, tesztelése a gyógyszerfejlesztők célpontja. A legváltozatosabb környezetekből származó talaj, víz stb. mintákat szelektív táptalajra szélesztik (lásd 4.2. fejezet) majd az aktinobaktériumokat válogatás nélkül nagy számban izolálják. Az izolátumokat megfelelő táptalajon tesztbaktériumokkal hozzák össze. A kialakuló gátlási zónák alapján kiválogatják a további vizsgálatra szánt antimikrobiális anyag termelő törzseket. Ezeket kistérfogatú rázatott tenyészetben is előállítják és a tápoldatból kémiai analitikai eljárásokkal megvizsgálják a termelt antibiotikum típusát. A legtöbb esetben sajnálatos módon már ismert antibiotikumra lelnek. A baktériumtörzs ilyenkor csak akkor érdekes, ha kivételesen nagy mennyiségben állítja elő a kérdéses anyagot, vagy annak új termelő faja. Az új szerek esetében viszont, már olyan mennyiségben is termeltetik, hogy az elegendő legyen a kémiai szerkezet meghatározásához, a toxikusság elemzéséhez és természetesen állatkísérletek segítségével a gyógyító alkalmazás modellezésére. Az a néhány szer, amelyik még ezeknek a vizsgálatoknak, az esetében is használhatónak bizonyul, hosszadalmas és bonyolult klinikai teszteken kell megfeleljen, hogy a megfelelő hatóságok használatát, forgalmazását jóváhagyják. Természetesen ez csak a fejlesztőmunka egyik, bár talán leglényegesebb része. Meg kell oldani ugyanis még a termelő szervezet tömegtenyésztését és a hatóanyag termelést, kivonást, tisztítást, formulázást ipari méretekben. A fejlesztés különleges nehézségét jól szemlélteti annak több évtizedes időigénye és akár több százmilliárd forintos költségigénye.

Az előző fejezetben vázolt laboratóriumi fejlesztési rendszereket kiegészíti és felgyorsítja az informatikai, molekula szerkezet és kölcsönhatás modellező rendszerek alkalmazása. Ezek segítségével nem pusztán a hatóanyag célpontok in-silico, vagyis számítógépes kiválasztása válik lehetővé, de a megfelelő gátló molekulák megismerése, optimális szerkezetének megbecslése is. A mikrobiológusok ezek után már a kérdéses molekulák természetes analógjainak kiválasztására, enzimatikus reakciók segítségével kívánt módosítására összpontosíthatnak.

Az antibiotikum kutatás mintegy hasznos melléktermékeként egy sor antibiotikumnak alkalmatlan bakteriális hatóanyagról kiderült azok egyéb gyógyászati hasznosíthatósága: immunszuppresszáns, antitumor, proteáz gátló stb. hatása. Bakteriális termék a különböző rákos megbetegedések gyógykezelésében felhasznált daunorubicin és doxorubicin, vagy daktinomicin, bleomicin (termelő mikrobák: *Streptomyces peucetius, Streptomyces verticillus*). Az immunszuppresszáns szerek közül a rapamicint a *Streptomyces hygroscopicus* faj termeli stb.

Ki kell emelni a gyógyászati célra használt fehérjék közül azokat, amelyeket rekombináns *Escherichia coli* baktériumokban termelnek (pl. növekedési hormon - szomatotropin, véralvadási faktorok, interferonok). Ez a robbanásszerűen fejlődő terület napjainkban már nem pusztán a humán fehérjével azonos szerkezetű és hatású anyagelőállítását teszi lehetővé, de a fehérje módosításával annak hatásspektrumát, aktivitását is befolyásolhatják. Pl. a szomatotropin hormon nem csak a növekedésre hat serkentőleg, de a tejelválasztást is befolyásolja. Ez utóbbi hatás mellékhatásként jelentkezik a növekedési hormonnal kezelt betegek esetében. A prolaktin receptorhoz való kötődést néhány aminosav cseréjével ki lehetett küszöbölni (helyspecifikus mutagenezis alkalmazásával). Az így előállított szomatotropin hormonfehérje növekedési hormonként terápiás célra sokszorosan alkalmasabb.

A gyógyszerek különleges csoportját alkotják a vakcinák. Alkalmazásuk a mikrobák okozta megbetegedések – fertőző megbetegedések – megelőzésének leghatásosabb módja. Ráadásul sokkal olcsóbb eljárás, mint a betegek kezelése. A hagyományos vakcinák előállítása

két úton történik. Az élő vakcina esetében az eredetileg betegséget okozó törzset gyengítik az attenuálás folyamatában. Az attenuálás legtöbbször tapasztalati eljárással történik Pasteur eredeti eljárása nyomán (gyakori átoltás, nem kedvező növekedési feltételek biztosítása stb.). Az elölt kórokozókat is használják vakcinálásra. Ekkor akár a teljes elpusztított bakteriális sejt, akár annak valamilyen módon inaktivált toxin komponense szóba jöhet. Mindkét esetben a kórokozó vakcina törzsének tömegtenyészetével kezdődik a gyártás folyamata. Hihetetlenül veszélyes ez a lépés, mert a tömegtenyésztés során előfordulhatnak olyan mutációk is, amelyek a patogenitás fokozódásával járhatnak. Nagyon komoly és felelősségteljes munkát igényel ezt követően a sejtek tisztítása és ellenőrzése, hogy semmi szükségtelen immungén anyagot nem tartalmaznak. A vakcina még ezt követően is eltérő hatást gyakorolhat a különböző humán populációkra, és vannak egyéni érzékenységi különbségek is. Az elpusztított sejtek, toxinpreparátumok esetében meg kell győződni arról, hogy egyetlen élő sejtet sem tartalmaznak, valamint, hogy a célvegyületen túl semmi egyéb toxikus anyagtartalma sincs a preparátumnak. A vakcinálás ilyen és hasonló okok miatt nagyon kis arányban járhat mellékhatásokkal. A biotechnológiai fejlesztések egy része ezek leküzdését célozza. Megjegyezzük még, hogy egy sor kórokozó estében nincs hatásos vakcina ma sem (például egy sor hasmenéses megbetegedést okozó mikrobára).

Amennyiben a kórokozó, ill. a vakcina vizsgálata során sikerül azonosítani a pontos molekulát (antigént), amely a specifikus immunválasz kiváltásáért felelős közelebb juthatunk a biztonságosabb vakcinálási megoldáshoz. A kérdéses molekulát ekkor ugyanis specifikus tisztítási eljárások segítségével lehet nagy tisztasággal előállítani. Az is elképzelhető, hogy a molekulát rekombináns technológiával is termeltetni tudjuk nem patogén mikrobában (pl. *Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae*). Ez utóbbi megoldás olyan esetekben is használható, amikor a patogén szervezet akár nem is tenyészthető. Az ily módon előállított vakcinákat „alegység vakcinának” nevezik. A „konjugált” vakcina megjelölés esetében a kellőképpen tisztított antigént megfelelő fehérjéhez kötik a kellő erősségű immunválasz kiváltására. Az alegység vakcinák nem mindig váltanak ki kellő mértékű immunválaszt, mert ahhoz a patogén más molekulái (pl. bakteriális sejtfalelemek) szükségesek, vagy az antigének több molekulája megfelelő térbeli orientációban (akárcsak a baktériumsejt felületén). Ezek a gondok célszerűen választott adjuváns rendszerek segítségével, vagy ártalmatlan hordozó mikrobák bevetésével kiküszöbölhetőek.

A legutolsó évtized ígéretes fejlesztései közé tartoznak a peptid vakcinák, amelyek az antigén fehérjének csak az ellenanyag termelést kiváltó epitópját (epitóp vakcina; speciális térszerkezetű részét) tartalmazzák, megfelelő hordozóhoz kötve. Egy másik megközelítésben az antigént kódoló DNS-t juttatják be a szervezetben a kifejeződést előidéző promoterrel együtt. Ezek az ún. DNS vakcinák ma még emberben nem hatékonyak.

A baktériumok közreműködésével létrehozott hihetetlenül változatos humán és állatgyógyászati termékek tömege ellenére nagyon sok az évszázadok óta ismert kórokozó/betegség, amelyre nem sikerült hatásos gyógymód, vagy megelőzés kifejlesztése. A mikrobiológia-biotechnológia számára ma is kihívást jelent pl. a tuberkulózis, vagy az úgynevezett újból felbukkanó (ismert, de új patogenitási faktorokkal felvértezett) kórozók köre.

9.3. A baktériumok haszna a mezőgazdaságban

A mezőgazdaság hihetetlenül tág területeinek (pl. állattenyésztés, növénytermesztés, erdő- és vadgazdálkodás) teljes körű áttekintése e téren meghaladja könyvünk lehetőségét. Néhány világszerte alkalmazott eljárás, ill. az Európai Unióban is és hazánkban is alkalmazott eljárás segítségével adunk legalább betekintést a lehetőségek tárházába. Az állattenyésztésben felhasználható baktériumok segítségével létrehozott termékek köréről – legalábbis az állatgyógyászatot illetően – némi elképzelést alkothatunk a prokarióták gyógyszeripari

felhasználása fejezetben írtak segítségével (9.2. fejezet). Az antibiotikumok, a rekombináns fehérjék, a vakcinák itt is hasonlóan fontos szerepet töltenek be. Figyelembe kell azonban vennünk, hogy az állattenyésztésben sok emlős faj, más gerincesek (pl. madarak, halak), sőt akár ízeltlábúak (pl. rákok) „egészségügyi" problémáival egyaránt foglalkozni kell. Ráadásul az állattartás járványtani szempontból a nagy létszámú állatállomány szoros összezártsága miatt (gondoljunk csak egy húsbaromfi telepre) különleges kihívásokat is rejt. Baktériumokkal előállított termékeket használnak ezen túlmenően a takarmányozásban is. A silótakarmány, a tejsavas erjesztéssel tartósított zöld növényi anyag a kérődzők, más növényi táplálkozású haszonállatok kedvelt tápláléka. A takarmány hasznosulása még fokozható különböző enzim adalékokkal, esszenciális aminosav készítményekkel. A fitáz enzim adagolásával az inozitol-foszfátok formájában sok állat számára (pl. sertés) nem hozzáférhető növényi eredetű foszfor felszabadítása biztosítható. De a takarmányokhoz adagolt proteáz, amiláz, endoglukanáz stb. enzimek is jelentősen hozzájárulnak a fehérjék, keményítő, egyéb poliszacharidok hasznosulásához.

A takarmányozás kapcsán nem hagyható ki a takarmányokhoz adagolt antimikrobiális anyagok, antibiotikumok használatának megemlítése. Bár az Európai Unióban a (humán és állatgyógyászati célra alkalmazott) nem gyógyászati célú alkalmazása tiltott, sok más országban (pl. USA) használják. A Monensin más hasonló szerekkel együtt (Salynomicin, Lasalocid) a poliketid antibiotikumok csoportjában a poliéter ionofórok közé tartozik. A *Streptomyces cinnamonensis* baktériumokkal termeltetik. A szarvasmarha (esetleg birka) takarmányhoz adagolva megfigyelték, hogy a takarmány hasznosulása fokozódik és emiatt az állatok súlygyarapodása nő. Közismert, hogy a kérődzők – így a szarvasmarha – bendő mikrobaközösségei a takarmány szénhidrát tartalmának, elsősorban cellulózának „fermentációja" révén szaporodnak (sejttömeget termelnek) és illékony rövid szénláncú zsírsavakat (elsősorban ecetsav, propionsav, tejsav és vajsav) állítanak elő. A szarvasmarha a bendő falán keresztül ezeket az illékony zsírsavakat veszi fel és hasznosítja energiatermelésre. Összetett gyomra további részeiben a bakteriális sejttömeget, elsősorban fehérjéket is hasznosítja. A közösségi anyagcsere során H_2 és ammónia is képződik, valamint a hidrogénre, ecetsavra és hangyasavra (mint elektron donorokra) alapozva metanogén szervezetek is szaporodnak a bendőben. A metántermelés egyértelmű és elég érzékeny C veszteséget jelent. A monensin antibiotikum elsősorban a Gram-pozitív szervezetekre hat. A bendőben a Gram-pozitív hidrogén termelő baktériumokat gátolja, amelyek anyagcseréje során egyébként az ecetsav, a hangyasav és a vajsav zöme is termelődik. Ennek eredményeképp visszaszorulnak a metanogének, valamint fokozódik a bendőben a propionsav és a borostyánkősav termelése, vagyis kevesebb C megy veszendőbe a metanogenezis miatt és nő a szarvasmarha által értékesíthető (vegyületek aránya (elsősorban a propionát). Mellékesen a monensin gátolja az aminosavakat fermentáló baktériumokat is, ezáltal kevesebb ammónia termelődik és a szarvasmarha több fehérje-nitrogént hasznosíthat. Megjegyezzük, hogy a takarmányhoz adagolt antibiotikumok a szarvasmarhánál mintegy mellékhatásként, más esetekben elsősorban, csökkentik a parazita (pl. coccoidiózis) és bakteriális megbetegedések arányát ezzel is hozzájárulva az állomány gyorsabb súlygyarapodásához.

A mezőgazdasági antibiotikum használatot (takarmány-additiv antibiotikumok, vagy a növényvédelemben alkalmazott antibiotikumok, így sztreptomicin, kasugamicin) az Európai Unióban annak egyik közismert „mellékhatása" miatt tiltják. Nevezetesen az antibiotikum rezisztencia terjedéséhez e szerek is hozzájárulnak. A rezisztencia elemek sokszor más virulencia faktorokkal együtt patogenitási szigetek formájában horizontális géntranszfer segítségével a prokarióták fajai között átadódva gyorsan elterjedhetnek. Ez azután a humán gyógyászatban is jelentős gondokat okozhat. Vagyis a mezőgazdaság területén elért haszon (nagyobb terméshozamok) a nemzetgazdaság más területén komoly veszteségeket okozhat (kieső munkaerő, táppénz stb.), nem is említve az ennek következtében akár megnövekvő

halálozást.

Utolsó példaként e helyen visszautalunk a szomatotropin (növekedési hormon) ill. más hormonok rekombináns előállítására (9.2. fejezet). A szarvasmarha szomatrotiopin annak prolaktin hatását kihasználva fokozza a tehenek tejtermelését, bár alkalmazásra mellékhatásként reprodukciós zavarokhoz, vagy egyes fertőző betegségek (elsősorban tőgybetegségek) gyakoribb megjelenéséhez vezet. Megjegyezzük, hogy más hormonok felhasználásával beavatkoznak pl. az állatok szaporodási ciklusába és ezzel „irányíthatóvá" teszik a „termelést".

Hasonlóan ahhoz, ahogyan az állatok egyfajta állat-mikroba kapcsolatrendszerben (szimbiózis) élnek, a növények is – így a gazdasági növények is – a termesztő közeg talajjal fejlett növény-mikroba kapcsolatrendszeren keresztül érintkeznek. A mikrobák nemcsak a gyökér felületet népesítik be, de jelen vannak a növény föld feletti részeinek, szerveinek felületén is, sőt magukban a szövetekben. A növénytermesztés eljárásainál nem egyszerűen tudnunk kell erről, vagy figyelembe kell venni e tényt, de érdemes élni ezzel a lehetőséggel. Tovább menve, ki kell használni a baktériumközösségek befolyásolásának lehetőségét a terméseredmény fokozására. Annál is nagyobb a felelősségünk e téren, hiszen az állattenyésztés is a növénytermesztésen alapszik. Földünk lakosságának élelmiszer ellátása a növények és egyéb fényhasznosító szervezetek (pl. cianobaktériumok) fotolitoautotróf anyagcseréjére, biomasszájára (3.2.-3.4. fejezetek) épül.

Malthus, T. R. (1766-1834, demográfus) először 1798-ban közzétett tanulmányában azt a megállapítást tette, hogy az emberiség létszáma (a népesség) mértani haladvány szerint nő, ugyanakkor az élelmiszertermelés csak számtani haladvány mértékében tud változni. Az általa elképzelt társadalmi következményeket (éhínségek, háborúk stb.) most nem részletezve meg kell állapítanunk, hogy említett alaptézise nem bizonyult helytállónak. A népesség még az általa elképzeltnél is nagyobb mértékben nőtt (mára meghaladta a 7,3 milliárdot), azonban a gazdasági növények (elsősorban búza, kukorica) hektáronkénti terméshozama a világátlagot tekintve a népesség növekedését meghaladóan emelkedett. (Az elsősorban a fejlődő világban jellemző éhezés és alultápláltság az élelmiszertermelés és eloszlás egyenlőtlenségeire, gazdasági, társadalmi hibákra vezethető vissza.) Az okot a gyakran „zöld forradalomnak" elnevezett fajtaváltásokban, valamint a hatékony növényvédelemben, tápanyagpótlásban (műtrágya) lelhetjük meg: a hagyományos fajtákat felváltották egyre nagyobb termőképességű fajták és míg régen a betakarítás előtt a szántóföldön, vagy a tárolt termésnek akár 90%-a is veszendőbe ment (gombafertőzések, állati kártevők stb.), ma ez az érték töredékére esett. Az intenzív mezőgazdasági termelésnek sokféle negatív hatása is van. Így pl. a biodiverzitás csökkenése elsősorban az agroökoszisztémákban, talajaink szerves anyagkészletének (humusz) csökkenése, a műtrágyázás miatti talajsavanyodás, vagy a felhalmozódó szermaradványok. Vagyis a fenntarthatóság Malthus által felvetett kérdését továbbra sem lehet lekicsinyelni. E téren ad jól hasznosítható, környezetbarát lehetőségeket a mikrobiológia (bakteriológia) tudománya.

A kérődzők emésztésének bakteriológiai vonatkozásaihoz hasonlóan régóta ismert a N_2 kötő szimbiózisok területe. A pillangósvirágúak terméseredményének növelésére háromnegyed évszázada használnak bakteriális oltóanyagokat eredményesen és anélkül, hogy ennek kedvezőtlen hatásait észlelték volna. A növényi biomassza előállításának kulcskérdése, hogy a talajban megfelelő mennyiségben álljon rendelkezésre kötött nitrogén (elsősorban szervetlen formában: NH_3, NO_3^-). Hiányát hivatott pótolni az intenzív mezőgazdasági művelésben a N műtrágyázás. Több baktériumfaj azonban növényekkel társulva szolgáltat számukra kötött nitrogént. A légköri nitrogén megkötése a baktériumok kizárólagos képessége (Borsodi, 2013). A pillangósvirágúak esetében a gyökérgumók rizóbium szimbiózisa (szója – *Bradyrhizobium japonicum*; lóhere – *Mesorhizobium loti*; lucerna – *Sinorhizobium meliloti*; akác -. *Rhizobium leguminosarum*; csicseriborsó – *Mesorhizobium ciceri*; bab – *Rhizobium etli*; csillagfürt –

Bradyrhizobium lupini; *Acacia* spp. – *Sinorhizobium tarangae*, *Sesbania* spp. – *Sinorhizobium saheli* stb.) juttat a gazdanövénynek kötött nitrogént (ammónia, glutaminsav, glutamát) a baktérium energetikai anyagcseréjének „fönntartása fejében" (a növény cukrokat, O_2-t, vasat és molibdént szállít a baktérium számára). Az előző felsorolásból láthatjuk, hogy jelen esetben takarmánynövényekről (a biomasszájukért termesztett), termésük miatt termelt és akár fájáért termesztett (erdészeti) növényekről egyaránt szó lehet. Az oltóanyagok használatával lehetővé válik a kérdéses mezőgazdasági területen nem őshonos növény termesztése (pl. hazánkban a szója, bivalyborsó), vagy az őshonos növényfaj terméshozamának fokozása. Megemlítjük még, hogy az égerfa is gyökérgumó képző, a gumókat *Frankia* aktinobaktérium szimbiózis alakítja ki. Megfelelő vízellátás mellett pionír fajként, pl. rekultivációra is alkalmazható emiatt.

Az egyszikűek esetében a növényi gyökerek körzetében ún. asszociatív nitrogénkötő mikrobák szaporodása jellemző. A jelenség fontosságát cukornád esetében Johanna Döbereiner mutatta ki az 1970-es években (Döbereiner és Pedrosa, 1987). Az *Azospirillum brazilense* faj gyökér/talajoltásával a cukornád esetében műtrágyázás nélkül is jelentős biomassza növekmény és szacharóz tartalom volt elérhető. (Brazília ma a világ második legnagyobb etanol termelője évi mintegy 24 milliárd literrel.) Az *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter* stb. nemzetségek más egyszikűek gyökérkörzetében, így a legfontosabb takarmánynövényeken (kukorica, búza, rizs stb.) is megtalálhatók. Célszerű talajoltással elsősorban rosszabb tápanyag ellátottságú termőterületeken növelhető a termés biztonság és a terméshozam.

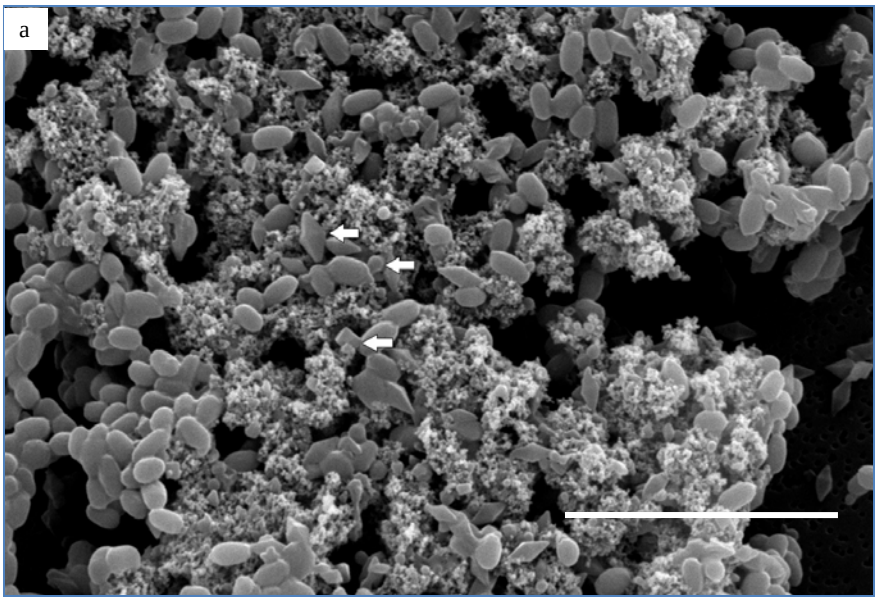
A termésbiztonság és a terméshozam növelése nem pusztán a nitrogén pótlásával érhető el. A növényi növekedést serkentő gyökérbaktériumok (PGPR – plant growth promoting rhizobacteria) a kötött nitrogén biztosításán túl segítik a növény foszforfelvételét, vas és egyéb ion és nyomelem ellátását (pl. Mn, Va, Mg), növényi hormonokat, vagy hormon analógokat termelnek (pl. etilén, indolecetsav), antimikrobiális anyagokat állítanak elő termelnek (pl. szalicilsav, HCN) és egyúttal lehetetlenné teszik a gyökérkórokozók (pl. *Agrobacterium*, *Erwinia* fajok, fonálférgek) elterjedését, kártételét. Az ilyen hatású baktériumokból (pl. *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Azospirillum* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. stb.) a növényfaj és a talajadottságok figyelembe vételével összeállított oltóanyagok tagjai részben megtelepednek a gyökéren, részben átalakítják a gyökérfelület (rizoplán) mikrobaközösségét. Hatóanyagaik erősebb gyökér elágazódást és hossznövekedést okozva, a tápelem ellátottság javításával és a kórokozók szaporodásának akadályozásával járulhatnak hozzá a cukorrépa, burgonya, vagy kertészeti növények (paprika, paradicsom, uborka) növekedéséhez, nagyobb terméséhez, és az ún. abiotikus stressz tényezők (aszály, vagy éppen túlzott vízmennyiség, hőhatás stb.) hatásának leküzdéséhez. (Nagymáté és mtsai, 2015).

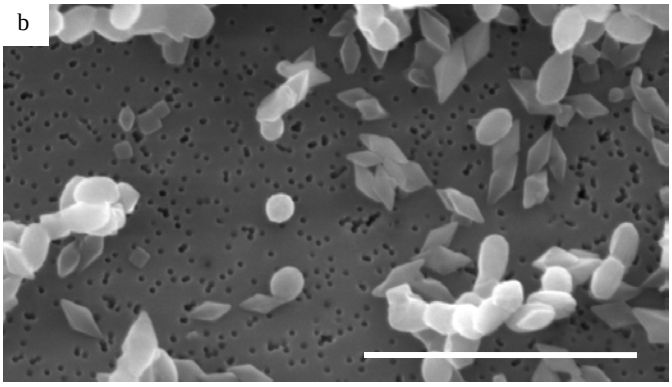
A termésbiztonság növelhető a föld feletti szervek mikrobiótájának (levél, virág stb.) befolyásolásával is. Így pl. a növények fagykárosodását fokozhatják a *Pseudomonas syringae* baktérium olyan törzsei, amelyek a jégmag képző Ice fehérjét termelik. A kérdéses fehérje hatására alig 0°C alatti hőmérsékleteken is jég képződhet az egyébként nagyobb cukortartalmú növényi oldatokban. Vagyis az Ice fehérje fagyáspont emelkedést okoz az egyébként fagyáspontcsökkentő hatású anyagokat (cukrok, szerves savak stb.) tartalmazó szállító nyalábokban, levelekben. A *Pseudomonas syringae Ice* génjét kiütve létrehozott, vagy megfelelő közelrokon *Ice Pseudomonas fluorescens* baktériumok tömegenyészetével végzett permetezéssel bizonyos növénykultúrák esetében (pl. eper) megelőzhető a fagykár. Hasonló lehetőséget jelent bizonyos *Bacillus subtilis* törzsek alkalmazása gombakártevők ellen. Megfelelő *B. subtilis* törzsek antimikrobiális peptidek, lipopeptidek (surfactin, agrastatin stb.), felületaktív anyagok, vagy keláló szerek és proteázok tág változatait termelik. A levelekre kipermetezve megakadályozza a patogén gombák, más kórokozók elterjedését, ill. elpusztítja a már jelenlevő gombasejteket. Egyfajta „biofungicid" szerként forgalmazzák egyes országokban. Fungicid, de egyben rovarölő hatást is kifejthetnek a kitinbontó enzimeket termelő baktériumok, hiszen a rovarok vázát, ill. sok növénypatogén gomba sejtfalát kitin (poli-

N-acetil-glukózamin) alkotja. Biztató kísérleteket folytatnak egyes *Vibrio, Serratia, Streptomyces* fajokkal e téren. Megemlítjük még, hogy az alma és körtefélék, de más rózsaféle esetében is jeles kártételt okozó tűzelhalás betegség kórokozója, az *Erwinia amylovora* baktérium elleni védekezésben is biztató eredményeket értek el *Photorhabdus* és *Xenorhabdus* baktériumok tenyészeteinek, illetve fermentleveinek alkalmazásával azok antimikrobiális anyag termelését kihasználva (Lengyel, 2007).

Az előző bekezdésben a növényi növekedésserkentés, tápanyagellátás területétől eljutottunk a biológiai védekezésig, a különböző (növényi) kártevők (ízeltlábúak, gyomok, növényi kórokozók) ellenőrzéséig. Az inszekticideket illetően a legrégebb óta alkalmazott faj, illetőleg toxintermék a *Bacillus thuringiensis*hez köthető. A faj 1900-as évek eleji leírása óta nagyon sok törzset izoláltak és gyakorlati alkalmazása az 1970-es évek második felében nyert teret (Stahly és mtsai, 2006). A kérdéses baktériumot betegségtüneteket mutató (megváltozott színű, petyhüdt, mozdulatlan) selyemhernyó, lisztmoly stb. lárvákból izolálták eredetileg. Az egyes törzsek azonban nemcsak a lepkékre kórokozók, de vannak kétszárnyú (légy [beleértve a csípőslegyeket is], szúnyog), vagy bogárpatogének is, azon belül is tágabb, vagy szűkebb fajspektrumot fertőznek. A patotípusokat a fajnevet követő varietas megjelöléssel különböztetik meg, pl. *B. thuringiensis* var. *berliner* – lepkék kórokozója, *B. thuringiensis* var. *israelensis* – kétszárnyú patogén, *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* – bogár kórokozó stb. A *B. thuringiensis* Gram-pozitív endospóraképző faj. Endospórája mellett még ún. spórakristályt is fejleszt (**9.4. ábra**), amely a δ-endotoxinnak elnevezett protoxin fehérjéből áll. Amikor a rovar elfogyasztja a spórakristályt, illetve a spórákat a középbélben uralkodó lúgos pH hatására a kristály feloldódik, a bél proteázok pedig a protoxint hatásos fehérje toxinra bontják. A toxin beleül a bélnyálkahártya sejtek citoplazma membránjába és kation pórusokat alkot. Ezen protonok és más pozitív töltésű ionok is kiáramolnak, majd ezt követi a víz is. Az ionháztartás felborulása a bélműködés leállása mellett a rágószervek bénulását is előidézi. Közben a spórák csírázásával kifejlődő baktériumtenyészet elárasztja a rovar testét. Ezzel újabb toxintermelés indul el és a rovar elpusztul pár nap alatt. Megjegyezzük, hogy a kristályfehérjéknek ma több száz változata ismert a Cry (kristály) és a Cyt (citolitikus) toxin családokon belül. A mezőgazdasági kártevők közül legismertebb a burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata*), vagy egyes molykártevők ellen kifejlesztett készítmény. Használatát nem kellő specificitása miatt az USÁ-ban és Európában nem engedélyezik. Engedélyezett azonban a csípős szúnyogok, ill. a feketelégy (ún. púpos szúnyog) ellen kifejlesztett „Bt"szerek alkalmazása. Az előzőt hazánkban is permetezik. A biológiai és a kémiai rovarirtószerek váltott használata csökkenti a kártevő rezisztencia kialakulásának esélyét. Megjegyezzük, hogy az Európába a balkáni háború idején behurcolt kukoricabogár (*Diabrotica virgifera*) kártételének mérséklésére reményt keltő *Bacillus thuringiensis* törzs és toxin fejlesztés zajlik hazánkban.

A *Bacillus thuringiensis* endotoxin génjének növényekbe történő beépítésével alkották meg az ún. első generációs transzgénikus növényeket (Bt kukorica, szója, gyapot, burgonya, repce stb.). A növények – szervspecifikusan – termelik a toxint és a növényt elfogyasztó kártevők elpusztulhatnak, így jelentősen csökken a kártétel, a terméskiesés. A génmódosított növények használata, termesztése világszerte élénk tudományos és társadalmi vitát váltott ki,





9.4. ábra. Egy B*acillus thuringiensis* törzs spórapreparátumának pásztázó elektronmikroszkópos felvétele. a) A nyilak a különböző alakú spórakristályokra (bipiramis, kocka és gömb) mutatnak a rövid pálca alakú spórák mellett. Az amorf anyag sejttörmelék. b) Spórakristályok nagy tömegben. Mérték = 10 µm. Makk Judit felvételei.

amely még ma sem jutott nyugvópontra. Ennek ellenére a transzgénikus növények termesztése világszerte több százmillió hektáron folyik. Magyarország Alaptörvényében is deklarálta a mezőgazdaságunk GMO mentességét. Megjegyezzük, hogy a Bt toxin más eljárásokkal is termeltethető növényekben. A *Leifsonia xyli* baktérium a cukornád, ill. más egyszikűek törpülését okozó patogén. A növények szállítórendszerében terjednek el ezek a baktériumok és

vannak betegséget nem okozó törzsei is. Amennyiben egy ilyen baktérium genomjába visszük be a Bt toxin génjét, majd a rekombináns baktériummal fertőzzük az egyszikű növényt, hasonló hatás érhető el, mint a transzgénikus növények esetében. Az alkalmazást illetően egy- és kétszikű növényekre egyaránt bíztató kísérletek folynak.

Megemlítjük még a rovarpatogén fonálférgek lehetséges bioinszekticid használatát. Egyes *Steinernema* és *Heterorhabditis* fonálférgek aktív mozgással keresik fel a tápforrásul és szaporodási környezetül szolgáló rovarokat, amelyekbe természetes testnyílásaikon keresztül (pl. száj, légnyílás) jutnak be (Szállás és mtsai, 1997). A rovar testében azután kibocsátják saját szimbionta baktériumaikat, a Gram-negatív *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* fajokat. Ezek elárasztják a rovar testét és színtenyészetük a fonalféreg gazdájuk tápforrását jelenti. A rovar a baktériumtoxinok és enzimek hatására elpusztul, majd a testében elszaporodott fonálférgek kitartó lárvái is kiszabadulnak és újabb „áldozatot" keresnek fel. Hazánkban is alkalmaznak a termesztett gombák rovarkórokozói (gombalegyek) ellen kifejlesztett specifikus készítményt. Ígéretes fejlesztések zajlanak a májusi cserebogár (*Melolontha melolontha*), vagy más rokon, lárváikkal gyökereken károsító bogarak elpusztítására a specifikus hármas szimbionta rendszer kihasználásával.

9.4. Baktériumok a környezetvédelem szolgálatában.

Az előző fejezetekben már több olyan eljárásról is olvashattunk, amely amellett, hogy egy specifikus problémát megold, egyben környezetbarát eljárás is. Így pl. a „biopeszticidek" alkalmazása csökkenti a környezetünk idegen anyagokkal (xenobiotikum) való terhelését, vagy a műtrágyák akár részleges kiváltása növényi növekedést serkentő baktérium készítményekkel hasonlóan környezetbarát eljárás. Földünk, a bioszféra öntisztuló képessége alapvetően a mikroorganizmusok, elsősorban is a baktériumok hihetetlen lebontó képességének, elképesztően változatos anyagcseréjének és új kihívásokhoz alkalmazkodni tudásának köszönhető. Az ember és az emberi tevékenység okozta környezetterhelés leküzdésének, valamint – előre nézve - csökkentésének alapfeltétele a baktériumok „képességeinek" kihasználása, felhasználása. Elegendő, ha csak a talán legnagyobb tömegű környezetszennyező anyagokra, hatásokra gondolunk. Elsősorban a települési és technológiai szennyvizekre, hulladékokra, a vegyipar által előállított számtalan xenobiotikumra, vagy a bányászat környezeti hatásaira és felsorolunk, röviden megvizsgálunk a kérdéses területeken csak egy-egy jól bevált eljárást. A baktériumoknak ez a bioszféra öntisztulását lehetővé tevő felfoghatatlan mértékű anyagcsere változatossága azzal kapcsolatos, hogy az élet hajnala óta, mintegy 3,8 md éve együtt fejlődtek a bioszférával.

A szennyvíztisztítás komplex rendszerében a biológiai eljárások a mérsékelt égöv területén (télen is megfelelő hőmérséklet) a kezdetektől jellemzőek voltak. A biológiai reaktorok feladata, hogy a szennyvízben levő oldott szennyezőanyagokat (DOM) részben lebontsa, részben a baktériumok testanyagába beépítve oldhatatlan, „szilárd" anyaggá (partikulált szerves anyag, POM), szennyvíziszap alakítsa:

$$DOM + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + NO_3^- + SO_4^{2+} + PO_4^{3+} + POM \quad (1)$$

$$DOM \rightarrow CH_4 + H_2O + NH_3 + S^{2-} + PH_3 + H_2 + CO_2 + POM \quad (2)$$

Az (1) egyenlet az aerob folyamatok nagyon egyszerű lefolyását mutatja be települési szennyvíz esetében. Az oldott szerves anyagok bomlásából a széndioxid mellett jóval kisebb arányban egyéb jellemző biogén elemek is felszabadulhatnak oxidált ionjaik formájában, bár ezek zöme a POM sejttömegében jelenik inkább meg. Anaerob környezetben (rothasztás) a közösségi szerves anyag lebontó anyagcsere végső terméke széndioxid, hidrogén és metán (biogáz) lesz

(3.3. – 3.4. fejezetek), valamint mellette ugyancsak keletkeznek a többi biogén elemek redukált formái. Ezúttal azonban meglehetősen nagy tömegben, mert a kisebb energiatermeléssel járó anaerob folyamatoknál arányaiban több szerves anyagot kell elbontani azonos mennyiségű energia, ill. sejttömeg termeléséhez.

Láthatjuk tehát, hogy alapvetően kétféle rendszert alkalmaznak (aerob, ill. anaerob) a szennyvíz DOM terhelésének függvényében. Minél nagyobb ugyanis a szennyvíz oldott szerves anyag terhelése, annál többe kerül (több energiát igényel) a megfelelő oldott oxigén utánpótlás biztosítása. A bakteriális sejttömeg előállítására (vagyis az (1) és (2) egyenletek szerinti folyamatok végzésére) leggyakrabban két alap reaktor típust alkalmaznak. Az eleveniszapos kevertetett rendszerekben a POM optimális esetben jól ülepedő kicsiny pelyheket alkot, míg a rögzített biológiai bevonatos rendszerekben a reaktoredényt valamilyen nagy felületű hordozóanyaggal töltik meg. Ennek felületén nő a baktériumtömeg és szerkezete pedig biztosítja a szennyvíz, ill. a gázok áramlását. A vastagodó bevonatot azután a folyadék, ill. gázáramlás során ébredő nyíróerők jól ülepedő iszap formájában darabokban letépik a felületről. A biológiai egységet követő ülepítőben a megtermelt szerves anyag szennyvíziszap formájában kiülepíthető.

A települési szennyvíz tisztítását végző mikrobaközösségek tagjai a háztartásokból származó változatos szennyanyagok (pl. emberi ürülék, élelmiszer maradékok) mikrobiótájából szelektálódnak ki. A jó szennyvíztisztító képesség fenntartását a rendszer fizikai-kémiai jellemzőinek mérésével, szabályozásával végzik (így pl. kevertetés, oldott oxigén, esetleg pH, lejövő szennyvíz szervesanyag tartalma). E mellett lényeges a rendszer oltása is a képződött iszap segítségével. Ezt nevezik iszap visszaforgatásnak (iszap recirkuláció). A visszaforgatott iszap minimális mennyisége a beérkező friss tisztítatlan szennyvíz térfogatának legalább 10 %-a (lásd 9. fejezet eleje; 10 % szabály). Ugyanakkor egy-egy szennyvíztelep elindításához más jól működő telepről hoznak iszapot.

A különböző termelő eljárások, ipari- és mezőgazdasági technológiák során képződött szennyvizek (technológiai hulladék vizek) (pl. kokszoló művi, forgácsoló üzemi, állattartási, papírgyártási, konzervüzemi szenny- és technológiai vizek) kezelése már különlegesen szelektált, akár oltótenyészetek segítségével létrehozott mikrobaközösségeket igényel. A közösség tagjainak olyan anyagcsere képességű fajokból kell állnia, amelyek akár magukban, de gyakrabban közösségi anyagcsere folyamatában a szennyező komponenseket lebontják. Ilyen esetekben gyakorta arra is szükség van, hogy az eredetileg nem kiegyensúlyozott tápelem tartalmú szennyvizet a megfelelő tápelemekkel kiegészítsék. Pl. egy burgonya feldolgozó üzem szennyvize sok keményítőt fog tartalmazni, de N és P stb. koncentrációja aránytalanul kicsi lesz. A jó biológiai tisztítás eléréséhez a vízhez ezeket a tápelemeket szervetlen ionjaik formájában (vagy más, pl. települési szennyvízzel) megfelelő mennyiségben hozzá kell adni. Az is gyakori, hogy egy-egy szennyező anyag bontása nagyon lassú folyamat. Ilyenkor segíthet a visszaforgatott iszap arányának megnövekedése, akár a bejövő friss szennyvíz térfogatának többszöröse mennyiségben (pl. 200-300 %) (Felföldi, 2010).

Az előbb említett biológiai tisztításon átesett és ülepítéssel megtisztított víz (akár települési, akár más szennyvízről legyen is szó) még nem feltétlenül alkalmas a befogadóba (természetes víz) történő bebocsátásra. Az egyes országok törvénykezése szabályozza, hogy milyen feltételek mellett tehető meg a tisztított víz természetes vízbe vezetése. Kommunális szennyvíz esetében leggyakrabban az összes N, ill. az NH_3 tartalom, valamint az összes P, ill. az oldott ortofoszfát anion (ún. reaktív foszfát) koncentrációja jelent gyakorta akadályt a tisztított víz patogén baktérium tartalma mellett. Ilyen esetekben további bakteriális aktivitásokat kihasználó biológiai reaktorokban kezelik (harmadlagos kezelések) és tovább tisztítják a vizet (természetesen itt is alkalmazhatók fizikai-kémiai eljárások). Az ammónia eltávolítását nitrifikáló (Székely, 2008) és denitrifikáló baktérium tenyészetekkel (3.2. fejezet) (ANAMOX, pl. candidatus *Brocadia anamoxydans*). A felesleges foszfortól ún. „BPR”

(biological phosphorus removal) reaktorok segítségével szabadulhatunk meg. Egyes baktériumok megfelelő fizikai-kémiai paraméterek alkalmazásával polifoszfátot halmoznak fel (pl. candidatus *Accumulibacter phosphatis*, *Propionibacter pelophilus*).

A szennyvíziszapok kezelése különböző bakteriológiai eljárásokkal is megoldható. Kezelésükre több okból is szükség van (így a még mindig nagy víztartalom csökkentése, a patogének elpusztítása, valamint a biológiai instabilitás [romlás] megakadályozása). Stabilizálni és kondicionálni szokták sűrítése mellett. A két meghatározó bakteriológiai folyamat e téren az aerob komposztálás és az anaerob rothasztás. Míg az első esetben a szennyvíziszap anyagainak talajok tartós szerves anyagutánpótlásra alkalmas „komposztfölddé alakítása a cél, a rothasztás során az energia termelésre is alkalmas metán (biogáz) nyerése a legfőbb szempont. Megjegyezzük, hogy a szennyvíziszapok e kétféle biológiai kezelése technológiai tekintetben nem különbözik a települési, vagy egyéb nagy bontható szerves anyag tartalmú szilárd hulladékok kezelésétől. Ez esetben is hasznosítható komposzt, vagy „depóniagáz" előállítása az elsődleges cél. Marad azután a szennyvíztisztításnak, szennyvíziszap kezelésnek olyan hulladékfrakciója, melléktermék is, amelytől megszabadulni pl. égetéssel (energetikai hasznosítás) lehet, vagy hulladéklerakóban kell elhelyezni (pl. nehézfém tartalmi anyagok).

A xenobiotikumok, idegen kémiai anyagok eredeti elnevezése a természetben ritkán előforduló biológiai anyagcseretermékeket jelent, vagy a természetestől eltérően nagyon nagy koncentrációban felhalmozódó természetes szerves anyagokat. Így pl. xenobiotikum egy antibiotikum, bár mikrobiális termék. Vagy xenobiotikum a nyersolaj, ill. származékai, annak ellenére, hogy eredetileg biológiai eredetű (pl. metanogén baktériumok biomasszája). Ma ugyanakkor leggyakrabban a szerves vegyipar által előállított új anyagokat, vagy azok gyártási közti termékeit, bomlástermékeit nevezik így. Vagyis xenobiotikumok pl. növényvédőszerek, műanyagok, gyógyszerek, halogénezett szénhidrogének. Kikerülésük a környezetbe leggyakrabban tudatos (pl. növényvédőszerek), máskor elkerülhetetlen (pl. gyógyszerek kiürülése a szervezetből) és persze sokszor balesetek, hanyag kezelés okozza (pl. üzemanyagok szállítása, átfejtése során). A xenobiotikumok jó része a környezetben nehezen, vagy csak részlegesen, esetleg egyáltalán nem bomlik le. Ismét más esetekben akár újabb vegyületek képződése során átalakul. A xenobiotikumok változatos biológiai hatást fejtenek ki. Körükben mérgező (toxikus), rákkeltő (karcinogén), vagy mutagén, ill. az utódgenerációkban fejlődési rendellenességeket okozó teratogén anyagok is vannak. Tejes biológiai lebontásuk, mineralizációjuk ezért a környezeti mikrobiológia kiemelt feladata. A megfelelő eljárások megtalálását, kifejlesztését a bonthatóság kérdésén túl különösen nehézzé teszi, hogy egyes anyagok igen kis koncentrációban is nagy biológiai hatást okozhatnak (pl. hormonhatású anyagok). Lebontásukhoz emiatt koncentrálni kell azokat a szennyezett környezetből, vagy obligát (kizárólagos) bontó szervezeteket kell felkutatni. A xenobiotikum bontás ideális végrehajtói a változatos anyagcseréjű baktériumok. Nem vállalkozhatunk a terület akár csak részleges bemutatására sem, pusztán a nagyobb szennyezőanyag koncentrációkkal jellemezhető szennyezett területek talajának, talajvizének, felszíni víz, üledék bioremediációjáról adunk rövid áttekintést.

A remediáció olyan kármentesítési folyamat, amelyben a természet öntisztuló képességének a működésére is számítunk a természetkárosító, ökotoxikus és emberre veszélyes hatások, szennyezés leküzdésében. A korábban részletezett okokból az öntisztulás folyamata nagyon lassú lehet, ugyanakkor a szennyezés pedig feltehetően (és leggyakrabban) folyamatosan terjed veszélyeztetve korábban nem érintett – érzékeny – területeket (pl. ivóvíz bázis). Emiatt leggyakrabban különböző eljárásokkal segítik a természetes folyamatokat. A két leggyakrabban alkalmazott biológiai eljárás e célra a (bio)stimuláció és a bioaugmentáció. A stimuláció esetében elektrondonorok, vagy akceptorok, ill. kiegészítő tápelemek biztosításával járulnak hozzá a lebomlás gyorsításához. Az alifás szénhidrogén szennyezések bontása pl.

felgyorsítható az aerob bomláshoz szükséges O_2 terminális elektron akceptor megfelelő biztosításával. Másrészt a megtermelt energiát a bontó baktériumok (pl. *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp.) sejtanyagaik szintézisére fordítanák. A szénhidrogén szennyezés C forrást mindenképpen jelent, de ha a környezetben nem áll rendelkezésre a felépítő anyagcseréhez kellő mennyiségben kötött nitrogén, vagy foszforforrás, akkor a bontás is le fog állni. Megfelelő N, P, nyomelem pótlás biztosítása segíti a gyors lebontást. A szennyezőanyagból a szennyvíztisztítás ismertetésénél jelzett (1) képlet szerint sejttömeg jön létre. Vagyis a xenobiotikum ártalmatlan sejttömeggé alakul át. Ez a kérdéses környezetben létrejött felesleges sejttömeg pl. további levegőztetéssel lebontható…

A bioaugmentáció esetében a szennyezett területen levő baktériumközösséget kiegészítjük, kibővítjük. Ez a beavatkozás történhet a baktériumfajok szintjén, vagy pedig a genetikai állomány, a génkészlet tekintetében. Az első esetben akár a konkrét bontó szervezet hiányozhat a közösségből, akár a működését megfelelő anyagok termelésével (pl. elektrondonor, vitaminok, kofaktorok) lehetővé tevő, a bontásban közvetlenül részt nem vevő baktériumfaj. A genetikai állomány kiegészítése a szennyezett közegből izolált pl. részleges bontóképességű fajba bevitt hiányzó génekkel lehetséges. De elképzelhető akár teljes anyagcsere utak extrakromoszómális elemeken (plazmid) történő baktériumsejtekbe juttatásával. Akármelyik megoldást is választjuk, a bioaugmentáció végrehajtásához bakteriális oltóanyagokra van szükség, amelyek szokásos alkalmazásokra kereskedelmi forgalomban is beszerezhetők. A kijuttatást megelőzően az oltóanyag és/vagy a stimuláció hatását mindenképpen érdemes mikrokozmoszok alkalmazásával tesztelni is. Természetesen a kijuttatott oltóbaktériumok működésének, szaporodásának biztosításához nemcsak stimulációs beavatkozásra, de célszerűen összeállított mikrobiológiai és fizikai-kémiai folyamat ellenőrző rendszerekre is szükség van (Mészáros, 2015).

Az előbbiekben jelzett két legfontosabb bioremediációs eljáráson túl gyakorta alkalmazzák a bioakkumuláció eljárását. Az élőlények jellegzetessége, hogy testfelépítésük során bizonyos elemeket, anyagokat a környezeti koncentrációjukhoz viszonyítva nagyobb mennyiségben felhalmoznak. Extrém esetekben ez a felhalmozás akár a sejt szárazanyagának többszöröse is lehet. A bioakkumuláció folyamata végbemehet spontán, de változatos energiaigényes folyamatokban is. Segítségével egyes baktériumokban leggyakrabban fémek, de más elemek, vegyületek is felhalmozódhatnak, (pl. a korábban már emlegetett P) ezáltal a környezetből kivonhatók. Mindenképpen meg kell még emlékeznünk az enzimek bevetésével segített remediációs eljárásokról.

A bányászat a legjelentősebb környezet átalakító tevékenység, amely nagyon sokszor erőteljes környezetkárosító, természetpusztító hatással bír. Elég csak az évszázadok óta művelt szénbányák, vagy vas- és egyéb ércbányák területét felkeresni, hogy az állítás igazáról meggyőződjünk. A fedő és meddő kőzetek gigantikus hányói, majd pedig a felhasználás, égetés, dúsítás, kohósítás, bugagyártás melléktermékeinek és hulladék anyagainak (salak, pernye stb.) környezetszennyező jelenléte a laikus számára is feltűnik. A figyelmes szemlélő észreveszi a környezeti károkat is, a kiporzás, a növényzet hiánya, a tág tűrőképességű özönnövények esetleges megjelenése egyaránt feltűnhet. A terepi műszerek segítségével már a felszíni vizek állapotáról is meggyőződhetünk: akár extrém savas pH, nehézfémek jelenléte stb. Bakteriális technikák az ilyen környezetekben is segítségükre lehetnek. Részben a kárelhárításban, vagy esetleg a kérdéses erőforrás (elsősorban fosszilis tüzelőanyag) helyettesítésében.

Ahogyan a szén, mint fosszilis energiahordozó helyét sok területen átvette a földgáz, illetve a kőolaj (bár még mindig fosszilis) egyre több bakteriológus veti fel egy újabb csere lehetőségét. A „bio-based-economy”, a biológiai folyamatokra alapozott gazdaság e téren a megújuló energiaforrások felhasználását kínálja: biomassza, etanol, metán, növényi olajok, zsírok stb.. A baktériumok szerepe két területen megkerülhetetlen. Bár az ipari etanol előállítása ma még elsősorban élesztők felhasználásával és leginkább cukrokra alapozva (szacharóz)

zajlik, már építik a *Zymomonas mobilis* baktérium felhasználásával működő etanol üzemeket. A másik „megújuló" üzemanyag a metán (biogáz). Ez utóbbi egyértelműen bakteriális energetikai anyagcsere terméke. A technológiai kutatások alapkérdésévé egyértelműen a növényi lignocellulóz hulladékok felhasználhatósága, etanollá, metánná konvertálhatósága vált. Gőzerővel elemzik a mikrobiális cellulóz, ligninláz enzimrendszereket, ipari méretű alkalmazhatóságukat. A közismert etanol és metán mellett megemlítjük még a biológiai úton termelt molekuláris hidrogén (H_2) lehetséges jövőbeli kiemelt szerepét. A kutatások ezen a területen is világszerte folynak (Bagi és mtsai, 2014).

A fosszilis energiahordozók adják azonban a szerves vegyipar alapanyagát is. Elegendő, ha csak a mindennapjaink részévé vált változatos „műanyagokra" emlékeztetünk. Negatív környezeti hatásaik közül közhelyszámba megy környezeti stabilitások említése (legtöbbjük nem, vagy hihetetlenül lassan bomlik biológiai úton). Már jóval kevesebben ismerik előállításuk környezeti hatását, vagy akár égetéses „megsemmisítésük" nehézségeit (pl. a PVC égetése során sósavgáz is képződik). A bio-based-economy erre is kínál megoldást az új biodegradálható „műanyagok" sorának előállításával, fejlesztésével. Talán a két legígéretesebb anyag a polilaktát (a tejsav polimerje), illetve a poli-hidroxi-alkanoát vegyületek, így a poli-hidroxi-vajsav, vagy a poli-hidroxi-kapronsav alapú anyagok. Ipari méretű előállításuk elsősorban a fermentációs folyamat hatékonyságán, költségességén múlik (**9.2. táblázat**).

9.2. Táblázat. Két hagyományos műanyag alapvető fizikai kémiai tulajdonságainak összehasonlítása a polilaktát és poli-hidroxi-vajsav hőre lágyuló polimerekkel.

Tulajdonság	Polisztirol kopolimer	Polipropilén	L-laktid/kaprolakton (95/5) kopolimer	Poli(3)hidroxi vajsav
Moláris tömeg (jellemző)		$2{,}2\text{-}7 \times 10^5$	$1\text{-}7 \times 10^4$	$1\text{-}8 \times 10^5$
Olvadáspont ^oC	240	171 – 186	133	171 - 182
Sűrűség g cm^{-3}	1,08	0,905 – 0,940	1,26	1,23 – 1,25
Szakítószilárdság MPa	20 – 50	39	30 – 50	40
Biodegradálhatóság	-	-	jó	jó

Segíti, segítheti ugyanakkor a bakteriális aktivitások használata a fosszilis energiahordozók, elsősorban a barnakőszén és a lignit kevésbé környezetszennyező égetését is. Gyakori gond ugyanis ezeknek az energiahordozóknak a nagy kéntartalma főképp, ha ez a kén szerves kötésben, vagy redukált, ill. elemi formában található bennük. A redukált kénformák eltávolítása baktériumok (elsősorban *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus* fajok) segítségével is megoldható: a redukáltabb kénformákat oxidálva szulfáttá alakítják, amely (kénsav formájában) kimosható a megfelelő szemcseméretre aprított szénből. Megjegyezzük, hogy ennek hatására a toxikus (nehéz)fémek egy része is eltávolítható, hiszen oldatba mehet.

A biológiai kénkörforgalom és a fémek biogeokémiai ciklusainak meglehetősen szoros összefüggése ad lehetőséget a biológiai bányászkodás (biomining) területének kifejlődésére. A baktériumok különböző csoportjai hajlamosak ugyanis változatos fémvegyületeket energetikai anyagcseréjükben elektron donorként, vagy elektron akceptorként hasznosítani. Ugyanez igaz a fémekkel gyakran vegyületet alkotó kénformákra (szulfátok, szulfidok) is. Ráadásul a baktériumok egy része fémek akkumulációjára is képes változatos vegyületeik, ásványaik formájában. Márpedig az oxidációs számok megváltoztatásával (oxidáció, vagy redukció) a kérdéses vegyületek, ásványok nem pusztán átalakulnak, de oldhatóságuk is megváltozik. Pl. a pirit (FeS_2) kéntartalmának bakteriális oxidációja szulfáttá oldatba viszi és megmozdítja a vasat is. Az oldatba vitel, a csapadékképzés és az akkumuláció bakteriológiai folyamatainak

alkalmazásával lehetőségünk nyílik bányanyitás nélkül érceket kitermelni, dúsítani, tisztítani stb. A lehetőségek széles tárházáról nagyszerű összefoglalást találunk Szabó (1989) munkájában.

Ajánlott irodalom

Bagi, Z., Maróti, J., Maróti, G., Kovács, K.L. 2014. Enzymes and Microorganisms for Biohydrogen Production. Current Biochemical Engineering, 1, 106-116.

Borsodi, A. 2013. A nitrogén körforgalma. In: Márialigeti, K. Bevezetés a prokarióták világába. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, pp. 236-244.

Döbereiner, J., Pedrosa, O.F. 1987. Nitrogen-fixing Bacteria in Nonleguminous Crop Plants. Science Tech Publishers, WI, USA, pp. 156.

Felföldi, T. 2013. A szaporodási görbe. In: Márialigeti, K. Bevezetés a prokarióták világába. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, pp. 84-86.

Felföldi, T., Székely, A.J., Gorál, R., Barkács, K., Scheirich, G., András, J., Rácz, A., Márialigeti, K. 2010. Polyphasic bacterial community analysis of an aerobic activated sludge removing phenols and thiocyanate from coke plant effluent. Bioresource Technology, 101, 3406-3414.

Gaál, E. 1988. A sör. Gondolat, Budapest, pp. 128.

Gaál, E., 2004. Az óegyiptomi borról. Ókor, 3, 69-77.

Lengyel, K. 2007. Antibiotikum termelő rovarpatogén baktériumok azonosítása és jellemzése. Doktori Értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, pp. 146.

Malthus, T.R. 1798. An Essay on the Principle of Population. Johnson, London, pp. 218.

Mészáros, É. 2015. Tetra- és triklóretén talajvíz-szennyezők lebontásában résztvevő anaerob mikrobaközösségek vizsgálata. Doktori értekezés. Eötvös Loránd Tudományegyetem, pp. 139.

Nagymáté, Zs., Pohner, Zs., Kari, A., Rodrigues, C.Y., Bordinassi, M.A., Romsics, Cs., Kutasi, J., Puspán, I., Kárpáti, É., Kovács, R., Márialigeti, K. 2015. Monitoring the survival and effect of plant growth Promoting rhizobacteria applied on acidic Agricultural soil. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 62, suppl., 189-190.

Stahly, D.P., Andrews, R.E., Yousten, A.A. 2006. The Genus *Bacillus* - Insect Pathogens. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt. E. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Springer, New York, pp. 563-608.

Szabó, I.M. 1989. A bioszféra mikrobiológiája. III. Akadémiai, Budapest, pp. 911.

Szállás, E., Koch, C., Fodor, A., Burghart, J., Buss, O., Szentirmai, A., Nealson, K.H., Stackebrandt, E. 1997. Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photorhabdus luminescens*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 402-407.

Székely, A. 2008. Bakteriális diverzitás vizsgáló eljárások alkalmazása a szennyvíztisztítás mikrobiológiai kutatásában. Doktori értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem, pp. 147.