

Szénhidrogént bontó sejtek számának meghatározása

Elméleti bevezető

Készítette: Feigl Viktória, 2010.

1. A biodegradáció

A **biodegradáció** aerob vagy anaerob folyamat, melynek során a talaj mikroorganizmusai feltárják és mineralizálják, vagyis a növények számára ismét felvehető szerves állapotba hozzák azokat a biogén elemeket, amelyek részt vesznek a szerves anyagok felépítésében, az energia raktározásában és transzportjában. A szerves szennyezőanyagokat a heterotróf mikroorganizmusok elektron transzport folyamatban oxidálják, s ha a szénhidrogén-degradáció teljesen végbemegy, akkor végtermékként CO₂, víz és biomassa keletkezik. Ha nem tökéletes a bontás, akkor köztitermékek keletkezhetnek, melyek akár az eredeti vegyületnél toxikusabbak is lehetnek.

A biodegradáció nagy jelentőséggel bír a hulladékok kezelésében és ártalmatlanításában, a környezet-szennyeződések biológiai úton történő eltávolításában, a környezet öntisztulásában és természetes helyreállításában.

Egy szennyező vegyi anyag általános és lokális (helyspecifikus) biodegradálhatósága nagymértékben eltérhet a **mikroflóra adaptálódása** miatt. Ezért a kockázat felmérése esetén mindig a lokális, pl. a helyszínen található szennyezett talajból mért biodegradációból kell kiindulni. Különösen fontos ez, ha szennyezett területek öntisztulását, vagy *in situ* remediációs technológiákat kívánunk tervezni vagy követni.

A biodegradáció nyomon követésére, mértékének megállapítására szolgáló módszerek legtöbbször olyan detektálási technikák, amelyek direkt vagy indirekt módon mérik a szerves szén oxidációját.

A mikroorganizmusokban szerves szennyezőanyagok bontásához gyakran nem szükségesek különleges enzimek, mások viszont speciális enzimrendszerek meglétét feltételezik. Egyszerű szénhidrogének bontásához például általában inkább a hozzáférhetőséget növelő, pl. felületaktív anyagokat termelő törzsek jelenléte szükséges.

Gyakran a talajban kis arányban előforduló fajok feldúsulása elegendő a könnyen biodegradálható szennyezőanyag szubsztrátként való hasznosulásához, más esetekben specifikus gén, vagy gének kombinációi szükségesek (pl. klórozott szénhidrogének, egyes peszticidek, kometabolizmussal bomló szerves vegyületek). Ezek a génkombinációk vagy képesek spontán kialakulni mutációk és *in situ* genetikai rekombinációk sorozatán keresztül, vagy nem.

2. Adaptáció

A talajba kerülő szennyezőanyag hatására **adaptációs folyamatok** zajlanak le. Ennek során az ott élő baktériumpopuláció, illetve több baktérium vegyes tenyészeté olyan anyagcsere folyamatra kényszerül, amelyre eredetileg képtelenek voltak. A kényszerítő erő a **szelekciós nyomás**. Ilyenkor felgyorsult **evolúciós folyamatok** játszódnak le.

3. Baktériumok változékonyságának háttere

A baktériumok változékonyságának legalapvetőbb mechanizmusa a baktériumok genetikai anyagának megváltozása, vagyis a **genotípus¹ változása**. Néhányszor azonban csak a **fenotípus² változik**, genetikai módosulások nélkül.

¹ Genotípus: genetikai állomány összessége, melyet az organizmus a szülőktől vesz át.

² Fenotípus: a külső és belső bélyegek teljes komplexuma, az összes megnyilvánuló sajátosság: alak, méret, szín, kémiai összetétel, viselkedés, biokémiai, mikroszkópikus és makroszkópikus tulajdonságok

3.1. Fenotípusos változások

A baktériumoknál a **fenotípus megváltozását** a sejtek fiziológiai tulajdonságainak vagy életkörülményeinek megváltozása váltja ki. Ezeknek a fenotípusos adaptációs jelenségeknek a háttérben gyakran a gén³-repressziók⁴ és derepressziók bonyolult szabályozási mechanizmusa rejlik. A fenotípusos flexibilitás, vagyis a baktériumok nagymértékű adaptációs képessége a genom információkészletének flexibilis és energiatakarékos felhasználását ill. működését tükrözi. Fajtái:

Kényszerű módosulások - alakváltozások (például):

- nem optimális tápközegben tokképzés, alak megváltozása (pl. hosszú vagy rövid láncok), esetleg csilló nélküli formák,
- lizozim⁵ hatására sejtfa nélküli formák.

Tényleges alkalmazkodás (például):

- nagy sókoncentrációhoz,
- antibiotikumokhoz,
- toxinokhoz,
- extrém pH értékhez.

Az extrém körülmények közül ismét optimális körülmények közé kerülve, néhány generáció után visszatér a tolerancia az eredeti intervallumra.

Adaptív enzimképzés:

Az indukálható (beindítható) transzkripció⁶ és transláció⁷, mely bizonyos szabályozó vegyületek megjelenésének, vagy éppen eltűnésének a következménye (ökonómikus anyagcsere).

3.2. Genotípusos változások

A **genotípus módosulása esetén** mindig a genom kémiai megváltozásáról van szó. A genom kémiai megváltozása létrejöhet fizikai hatásra, ill. kémiai ágensek hatására, vagy más DNS molekulákkal történő kölcsönhatásra.

A fizikai, vagy kémiai hatásra bekövetkező maradandó módosulásokat a genomban, **mutációknak** nevezzük. A DNS-DNS kölcsönhatásból eredő genom módosulásokat **DNS-rekombinációnak** nevezzük.

3.2.1. A mutáció

Amikor a baktériumok új anyagcsere-funkciókra tesznek szert, ennek mechanizmusa általában mindössze egyetlen, vagy néhány mutációs lépést jelent, melyek vagy már meglévő enzimek⁸ produkciós sebességét befolyásolják, vagy korábban is létező, de nyugvó gének megnyilvánulására hatnak, esetleg az enzimek felépítését, vagy a transzportrendszerek specifikitását érintik.

Az ilyen mechanizmusok útján szerzett új tulajdonságok, anyagcsere funkciók megjelenésének az az alapja, hogy a genomban már eleve olyan genetikai információk vannak jelen, melyek már közel megfelelnek a megoldandó feladatnak. Ilyenkor a genetikai kódban már viszonylag kicsiny változások a szervezet anyagcsere kapacitásának lényeges

³ Egy gén általában egy fehérjét (polipeptidláncot) kódol, és egyetlen tulajdonságot határoz meg.

⁴ Represszió (elnyomás, gátlás): a gén működésének gátlása, mRNS-sé történő átíródásának gátlása.

⁵ Lizozim: a Gram-pozitív baktériumok sejtfalának roncsolására képes enzim.

⁶ Transzkripció: Az a folyamat, amelynek során a DNS-ről mRNS másolat készül.

⁷ Transzláció: Az a folyamat, amelynek során az rnRNS-en tárolt genetikai információ alapján a fehérjék szintetizálódnak.

⁸ Enzim: Egyes biokémiai folyamatokat katalizáló fehérje.

módosulását válthatják ki. Ezek a mechanizmusok főleg a finomabb környezeti változásokhoz való alkalmazkodást teszik lehetővé.

A környezet szelektív nyomása hatására létrejött azon genetikai változások esetén, melyek során egy új szubsztrát hasznosításának, vagy valamely toxikus anyag túrésének képessége jelenik meg, mind a szabályozó szakaszokat, mind pedig a struktúrgéneket⁹ érintik a változások.

A **mutáció molekuláris szintű értelmezése** során a gén nukleotidszekvenciájában¹⁰ bekövetkező változásról beszélünk, mely a kódolt fehérje strukturális (szerkezeti) és működésbeli megváltozását vonja maga után. Ha akárcsak egyetlen nukleotid felcserélődik, az már az aminosavat kódoló triplet¹¹ megváltozását vonja maga után. A mutációkat többféle szempontból lehet csoportosítani.

Mutáció mértéke:

- **Pontmutáció:** egy vagy több bázist érintő változás. Kialakulhat bázis kiesése, betoldás vagy csere.
- **Nagyobb DNS szakaszra kiterjedő mutáció:**
 - Deléción: DNS szakasz kiesése, törlődése.
 - Inverzió: DNS szakasz megcseréli irányát.
 - Transzlokáció: DNS szakasz áthelyeződik a genom másik területére.
 - Duplikáció: DNS szakasz megkettőződése.

Mutációt kiváltó tényezők alapján:

- **Spontán mutáció:** ok nélkül, látszólag magától kialakuló mutáció. Általában pontmutáció jön létre. A fő szerepet a bázisok tautomer átalakulása¹² játssza.
- **Indukált mutáció:** mutagén ágensek okozzák, melyek vagy a bázisok tautomerizációjának mértékét növelik meg, vagy más módon idézik elő a replikáció során a normálisan össze nem illő bázispárok összekapcsolódását.
 - Alkilezőszerek: a bázisokat alkilezése¹³ révén okoznak téves párosodást. Például: nitrozo-guanidin, mustárgáz.
 - Akridinfestékek: a DNS bázispárjai közé ékelődve új bázispárok beépülését idézi elő.
 - Sugárzások: gyakori a pirimidinbázisok között kialakuló kovalens kötések, melyek hiányokat okoznak a kiegészítő fonál szintézisében. Például: UV és röntgensugárzás.

A mutáció **fenotípusra gyakorolt hatása** alapján:

- **Nyereséges mutáció:** például egy addig nem termelődött enzim termelő képességét idézi elő. A változás késés nélkül megjelenik a fenotípusban.
- **Veszteséges mutáció:** például egy enzim termelésének megszűnése. Ez csak késve mutatkozik meg, a korábban megszüntetett enzimentartalék megvan, aktív, és a sejtek osztódása alkalmával feleződik, tehát a szaporodás során kihígul, hat generáció után kb. az eredeti koncentráció 1 %-a lesz jelen az utódokban. Mindig van tehát időeltolódás a genotípusban kialakult helyzet és a fenotípusban megmutató tulajdonság között.

⁹ Struktúrgén: A génnek az a szakasza, amely az adott fehérjében is megjelenik (persze „fehérje-nyelvre” fordítva).

¹⁰ A bázisok (adenin, timin, guanin, citozin) sorrendje a DNS-en. A bázissorrend határozza meg, hogy a gén által kódolt fehérjében az aminosavak milyen sorrendben következnek egymás után.

¹¹ Triplet: három darab bázispár egymás után, egy triplet egy aminosavat kódol.

¹² Két izomer (azonos összetételű, de eltérő szerkezetű) molekula egymásba történő átalakulása.

¹³ Alkilezés: alkilcsoport (C_nH_{2n+1}) bevitele egy molekulába.

Az antimutagenézis összefoglaló néven a mutációk ellen ható tényezők és történések összességét értjük, pl. a hibajavító rendszerek működését, vagy a mutáció fenotípusban való megjelenését akadályozó okokat. Antimutagenézisről beszélünk akkor, is, ha a egy anyag, vagy hatás a mutációk számát csökkenti.

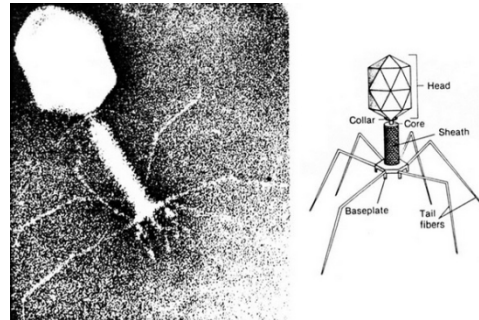
Megkülönböztethető **fiziológiai és genetikai antimutagenézis**. Első esetben a sejtek olyan fiziológiai állapotúak, hogy nem képesek mutálódni, pl. nem szaporodnak. A második esetben valódi, genetikai szinten végbemenő történésekkel állunk szemben, például hibakiküszöbölő gének működésével.

Antimutagén ágensek (fiziológiai antimutagenézis) a purinnukleozidok, a koffein, a mangánionok, az L-metionin, spermin és más poliaminok, aktinomycin-D, bázikus fukszin. A gének represszált állapota is antimutagén hatásnak tekinthető. Genetikai háttérű antimutagenézis a sejtekben működő hibakiküszöbölő mechanizmusokra vezethető vissza.

3.2.2. DNS rekombináció

A baktériumok képesek egymásnak géneket átadni, ennek alapvetően három féle folyamata létezik. A géncserénél minden esetben donor-recipient kapcsolatáról beszélhetünk. Általában a donor a genomjának csak egy részét adja át a recipientnek, a teljes genom átvitele ritka.

1. Idegen DNS-ek sejtmembránon át történő felvételére visszavezethető **transzformáció**,
2. Bakteriofágok¹⁴ (képen) segítségével a géneknek a donorsejtből a recipientbe történő **transzdukciója**,
3. **Szexuális** folyamatokkal analóg és plazmidok (F-faktor) segítségével végbemenő géncsere (**konjugáció**).



3.2.2.1. A transzformáció

A transzformáció során a sejt a környezetéből idegen DNS-t vesz fel és a rajta elhelyezkedő gént vagy géneket beépíti a saját genetikai anyagába. A felvett DNS lehet lineáris DNS fragmentum vagy plazmid¹⁵. A transzformáló DNS-t egyes fajok spontán bocsátják ki, pl. nyálkaanyagukban, de gyakoribb, hogy az elpusztult sejtekből válnak szabaddá.

A genetikai rekombináció feltétele, hogy a résztvevő sejtek közeli rokonok legyenek, hogy a restriktív modifikációs enzimszisztémák¹⁶ kompatibilis legyen és hogy a rekombinációhoz szükséges DNS párosodás, vagyis a homológ¹⁷ DNS szakaszok szoros összetapadása megtörténhessen. A DNS párosodás nagyfokú homológitást tételez fel. Csak ezután következhet a gének kicserélődése.

¹⁴ Bakteriofág: baktériumok megfertőzésére képes vírus.

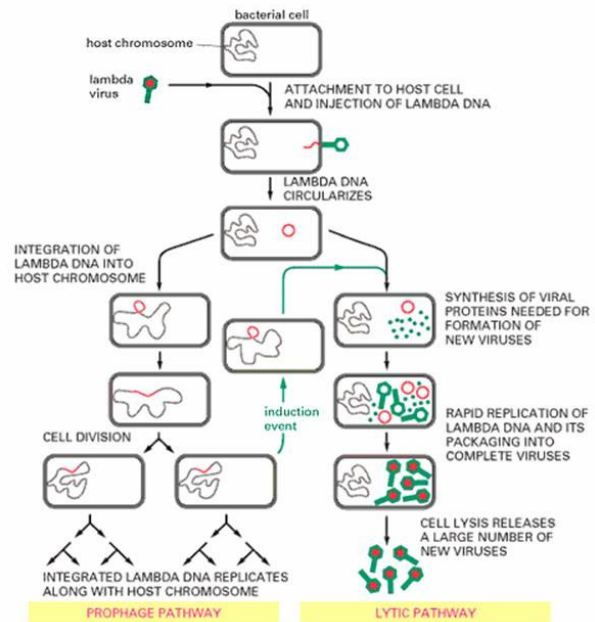
¹⁵ Plazmid: olyan önállóan replikálódó, gyűrűs DNS molekula, amely nem kapcsolódik a sejt kromoszómájához. Önálló genetikai egység.

¹⁶ Restriktív enzimek: olyan enzimek, melyen a DNS szálát egy adott nukleotidszekvenciánál képesek elvágni. A sejtbe bekerült idegen DNS-t feldarabolják, ugyanakkor a sejt saját DNS-e a restriktív helyeken metilálás által védve van. E két folyamatot együtt nevezzük a restriktív modifikációs rendszernek.

¹⁷ Homológ DNS szakaszok: a két szál egymást kiegészíti, egymáshoz kapcsolódni képes.

3.2.2.2. A transzdukció

A transzdukció bakteriofág által közvetített géntranszfer baktériumokban. A fág fertőzés kétféle kimenetelű lehet: lítikus és lizogén. A **lítikus** ciklus esetén a fág a sejtet a saját DNS-ének szintézisére kényszeríti, melynek végén a kész bakteriofágok kiszabadulnak a sejtéből, és a sejt elpusztul. **Lizogén** ciklus esetén azonban a fág DNS beépül a gazdasejt kromoszómájába és a baktérium osztódásakor a bakteriális DNS-sel együtt megkettőződik. Később a folyamat lítikussá válhat, ekkor a fágfejbe a baktérium DNS-ének egy darabja is bekerülhet. Ilyenkor a fág a saját genomján kívül magával viheti a baktériumgenom egy részét a másik baktériumba, ahol az integrálódhat a recipiens genomjába.



3.2.2.3. A konjugáció

A konjugáció alkalmával az egyik baktérium, a „hím jellegű” donor (F^+) ad át tulajdonságokat a „női jellegű” recipiensnek (F^-). A donor tulajdonságért egy plazmid, az F -plazmid felelős. Amikor a két sejt kapcsolatba kerül, közöttük egy keskeny, fehérjefonatokból álló plazmahíd alakul ki. Ezen keresztül jut át az F^+ baktériumból a plazmid az F^- recipiensbe. A folyamat során magával viheti a donor kromoszómájának egy részét és az átvitt tulajdonságok megjelenhetnek a recipiensben.

Források:

Gruiz Katalin: Baktériumok változékonysága, a genom evolúciója, Környezeti mikrobiológia és biotechnológia laborgyakorlat jegyzet.

Gruiz Katalin, Horváth Beáta, Molnár Mónika: Környezettoxikológia, Műegyetemi Kiadó, Budapest, 2001.

Dubinyin, N.P.: Általános genetika, Tankönyvkiadó, Budapest, 1975.

Nász István: Mikrobiológia és immunitástan, Medicina könyvkiadó, Budapest, 1982.

Szabó István Mihály: A bioszféra mikrobiológiája, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1988.

Watson, J.D., Toose, J.: A rekombináns DNS, Mezőgazdasági Könyvkiadó Vállalat, Budapest, 1988.

<http://hu.wikipedia.org/>