



**SOPRONI  
EGYETEM**

Dr. Heil Bálint  
ERDŐMÉRNÖKI KAR  
Környezet- és Természetvédelmi Intézet  
9400 Sopron, Bajcsy-Zsilinszky u. 4.  
+36 99 518 171 • heil.balint@uni-sopron.hu

## **KÖRNYEZETI MIKROBIOLÓGIA**

### **(oktatási segédlet)**

Ezen oktatási segédlet a Soproni Egyetem Erdőmérnöki Karának nappali tagozatos számára C-típusú fakultatív tantárgy anyagaként, valamint a Talajtani (Erdészeti Termőhelyismerettani) Szakmérnöki szakirányú továbbképzési szak hallgatói számára a *Talajbiológia* c. tárgyhoz történő felhasználásra készült.

Dr. Heil Bálint  
egyetemi docens

Sopron, 2023

## Tartalomjegyzék

Mikrobák a növénytermesztés szolgálatában.....	3
Barangolások a mikrobiológia világában.....	28
Barangolások a mikrobiológia világában (II. rész).....	34

## Mikrobák a növénytermesztés szolgálatában

A mezőgazdasági termelés növényvédőszer- és műtrágya-terhelésének mérséklését környezetvédelmi és közegészségügyi szempontok egyaránt indokolják. Korábban nagy várakozással fordultak a biológiai alternatíva felé: antagonista, hiperparazita, rovarpatogén, nitrogénmegkötő és foszfát mobilizációra képes mikroorganizmusok bevetésétől remélték a kémiai szerek felhasználásának jelentős csökkenését. Nem váltak be ezek a remények, mert csupán néhány mikroorganizmus, illetve mikroorganizmus-alapú készítmény bizonyult a gyakorlatban is használhatónak.

Javítani kell(ett) tehát a biopreparátumok, illetve a bennük foglalt mikrobiológiai hatóanyag eltarthatóságát, növelni kell(ett) a készítmények hatását, és fokozni kell(ett) szelektivitásukat. E feladatok megvalósítását egyrészt mikrobiológiai tömegtenyésztési és konzerválási eljárások tökéletesítésétől remélhetjük, másrészt, sőt nagyobb mértékben, a géntechnológiai beavatkozásokkal végzett törzsnemesítéstől.

### **I/1. Kísérletek PGPR baktériumok hatékonyságának javítására**

Ezen betűszó a *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* elnevezésből származik, amellyel a gyökérszónában élő és a növények növekedését (közvetett vagy közvetlen módon) serkentő, rendszertanilag nagyon vegyes baktériumcsoportot illetik.

E baktériumok közül a fluoreszkáló *Pseudomonas*ok képesek a leghatékonyabban korlátozni a talajlakó növénykórokozó mikrobákat. Többféle módon valósul meg a kórokozó populáció visszaszorítása:

- a) kompetíció;
- b) antibiózis;
- c) és szisztémás szerzett rezisztencia kiváltása révén.

*Pseudomonas* genus: A genus több mint 200 fajt foglal magába, melyek döntő többsége a talajban és természetes vizekben élő szaprofita. Gram-negatív, spórát és tokot nem képző, poláris csilló(ka)t hordozó pálcák. Mint ubikviter szaprofiták, növekedésükhöz nem igényelnek különleges feltételeket, egyszerű táptalajon jól szaporodnak. Nem fermentáló baktériumok, metabolizmusuk során az energiát oxidatív úton nyerik.

#### *1/1.a. Baktériumok kompetíciós képességének hasznosítása*

Bár a kutatók kérdéssel kapcsolatos elméleti ismeretei folyamatosan gyarapodnak, a gyakorlatban eddig nem bizonyult túl sikeresnek a rhizoszférában élő antagonisták használata. A gyakorlati biológiai védekezés – egyebek mellett – azért sem túl sikeres, mert egy-egy antagonista csupán egy vagy néhány kórokozó ellen hatékony. Gondokat okoz az is, hogy nem biztosítható az antagonista baktériumok tartós életben maradása természetes körülmények között. Előrelépést az jelenthetne, ha megfelelő *Pseudomonas* törzsek keverékével végeznék a kezelést, az egyik törzs a kompetíció, a másik az antibiózis, a harmadik a szisztémás szerzett rezisztencia kiváltása révén hatna. Igen ám, de az antagonista törzsek között is létezik a kompetíció, leginkább a vasért folyó versengés formájában.

A vasat ún. **sziderofórok** segítségével veszik fel ezek a baktériumok: a sziderofórok kis molekulatömegű, a vas ( $\text{Fe}^{3+}$ ) iránt nagy affinitást mutató, kelátképző anyagok, melyek segítségével a vas sejtbe való transzportja megvalósul. A fluoreszkáló *Pseudomonas*ok sárgászöld színű sziderofórokat termelnek és olyan membrán receptorokat, amelyek képesek a sziderofór+vas komplexum felvételére. Abból adódnak a bajok, hogy egyes *Pseudomonas* törzsek (pl. *Pseudomonas putida* WCS385) egy sor más baktérium sziderofóráját hasznosítják, az ő sziderofóráikat viszont (pl. a *pseudobactin* 385 néven ismert molekulát) mások nem tudják felvenni. E mohósága miatt a *P. putida* WCS385 törzs nem alkalmazható kombináltan egyetlen más *Pseudomonas*szal sem, pedig jó lenne, hiszen ez a törzs a fent említett, növényi kórokozók ellen ható mechanizmusok közül csak az egyiket birtokolja, a kompetíció képességét, de nem termel antibiotikumot, és nem vált ki szisztémás szerzett rezisztenciát a növényekben.

A *P. putida* egy másik ígéretes törzse, a WCS347 nagy hatékonysággal indukál szerzett rezisztenciát a növényben, a vas hasznosításában azonban gyöngye ez a baktérium: ha más törzsekkel kombináltan alkalmazzák, akkor kiszorul a rendszerből, mivel sziderofóráját mások felhasználják, ő maga viszont – a megfelelő receptor híján – nem képes a többi baktérium sziderofórájának felvételére. A WCS347 használhatóságát oly módon sikerült feljavítani, hogy a sziderofórok felvételéért felelős receptorfehérje (PupA) génjét a WCS385 törzsből átvitték a WCS347-be. Ennek a beavatkozásnak köszönhetően a WCS347 (új nevén WCS347pMR) versenyképessége megnőtt, s amikor együtt használták a WCS385-sel, fokozott védelmet értek el a retek hervadását okozó *Fusarium oxysporum* ellen. A szinergizmus abból a két tényezőtől adódott, hogy a WCS385 vashiányt idézett elő a rhizoszférában, amit a többi mikroorganizmus, köztük a *Fusarium* súlyosan megszenvedett (sikeres kompetíció).

Ugyanakkor, a PupA receptorral felvértezett, s így a vashiánnal immáron szembeszállni képes WCS347pMR pedig szisztémás szerzett rezisztenciát váltott ki a növényekben.

Az antagonisták **kompetíciós képességének** javítására a génmanipuláció mellett nemesítői munka is folyik. Egyes növénykórokozó gombák, pl. a *Pythium* fajok sporangiumai csak mag-exudátumok hatására csíráznak. Jelmolekulaként elsősorban illékony anyagok jönnek számításba: ammónia, etil-acetát, hosszú szénláncú-zsírsavak. Azok a mikrobák tehát, amelyek elhasználják a jelmolekulaként szolgáló exudátumokat, közvetett módon gátolják a *Pythiumok* csírázását. A jelmolekulákat „felfaló” rhizobaktériumok közül az *Erwinia chloacae* és bizonyos *Pseudomonas*-fajok a legjelentősebbek. A kutatók egyelőre addig jutottak, hogy kísérletesen bizonyították a jelmolekulák hasznosítása és a biológiai védekezésben való használhatóság közötti kapcsolatot. Amikor ugyanis *E. chloacae*-ben elrontották a linolénsav jelmolekula hasznosításáért felelős *fadB* gént, csökkent a baktérium antagonistá hatékonyága.

#### *1/1.b. Baktériumok antibiotikum termelő képességének hasznosítása*

Más kísérletek az **antibiotikus hatás** fokozására irányultak. A *Pseudomonas aureofaciens* és a *Pseudomonas fluorescens* különböző törzsei fenazinokat, oomycin A-t, pioluteorint, pirrolnitrin és poliketideket termelnek. Az elmúlt néhány évben sikerült tisztázni ezen metabolitok szintézisútját, és azonosították a kulcsfontosságú enzimeket kódoló géneket is. Az antibiotikum termelés szigorúan szabályozott folyamat, környezeti jelzések vagy a nagy egyedsűrűségről tudósító

szignálok hatására indul meg, és függ a baktériumsejt élettani állapotától. A környezeti jelzések vételét és közvetítését tipikus kétkomponensű szabályozó rendszer végzi a *P. fluorescens*-ben. Transzmembrán receptorfehérjék különböző kicsiny jelmolekulákat észlelve autofoszforilálódnak, konformáció változáson mennek keresztül, és a citoplazmában lévő (esetleg a citoplazma membránhoz kötött) kinázokat foszforilálnak. (Az ilyen enzimkapcsolt transzmembrán fehérjéknek a ligandkötő doménjük extracelluláris, a katalitikus vagyis enzimkötő doménjük pedig intracelluláris); foszforilált formában ezek a kinázok DNS-kötő doménjükkel kapcsolódni tudnak az antibiotikum bioszintézisét irányító gének promóter szakaszához, és megindítják a génexpressziót. A fenazin termelést irányító gének egy kétkomponensű szignál transzdukciós rendszer szabályozása alatt állnak.

Mi a szignál-transzdukció?

A szó a sejtek közötti és sejten belüli kommunikáció folyamatainak összefoglaló neve. A sejt az őt ért kémiai jelzések szerint cselekszik: osztódik, specializálódik egy feladatra, fenntartja állapotát, fokozza vagy csökkenti anyagcseréjének mértékét. Ha fogunk egy sejtet és olyan környezetbe tesszük, ahol elviekben megvan minden, ami szem-szájnak ingere: glükóz, 36-37 Celsius fokos hőmérséklet, megfelelő koncentráció, a sejt a többi sejttől és a felsőbb szabályozó rendszerektől jövő molekula-jelek hiányában elpusztul. Tehát mindenképp szükség van ingerekre. A sejtársadalom abszolúte és rendkívül finoman szabályozott. Ebben a kommunisztikus rendszerben egy sejt működésének totális zavara végzetes lehet az egész szervezetre nézve.

Az egyedsűrűség változását transzkripciós aktivátorként működő ún. szigma faktorok közvetítik a gének felé. *In vitro* körülmények között történő antibiotikum termeltetés folyamatgörbéjéről tudjuk, hogy akkor

indul meg ezen faktorok szintézise, amikor a tenyészet az exponenciális növekedési fázisból a stacioner fázisba lép át. Így történik ez természetes (azaz *in vivo*) körülmények között is a *P. fluorescens*-ben: amikor csökken bizonyos szigma faktorok mennyiségének egymáshoz viszonyított aránya, akkor kezd emelkedni a pioluteorin és a 2,4-diacetilfluoroglucinol antibiotikumok termelésének szintje.

Miként lehet az antagonisták törzsek nemesítésében hasznosítani az újabb molekuláris biológiai ismereteket? Meg kell változtatni az antibiotikum szintézist irányító génekről történő transzkripció sebességét, és/vagy be kell csapni ezeket a géneket, el kell hitetni velük, hogy a sejtek már a stagnáló fázisba kerültek. A *P. fluorescens* oomycin-A termelését például úgy javították, hogy az ún. *tac* promóterre kapcsolták rá az oomycin-A bioszintézisét irányító géneket. (Ez a *tac* promóter általában nagyon jó hatáserővel hajt meg géneket a *Pseudomonas*-fajokban). Az így manipulált törzs üvegházi kísérletben is hatékonyan bizonyult a gyapot *Pythium ultimum* okozta palántadőlése ellen. A *P. fluorescens* BL915 törzsét pedig pirrolnitrit túltermelésre nemesítették, ezzel hatékonyan védelmet biztosítva az uborka palántadőlés ellen.

## **1/2. Géntechnológiai beavatkozás az *Agrobacterium radiobacter* kezelések biztonságosságának növelésére**

A biológiai védekezés egyik sikertörténete az *Agrobacterium radiobacter* K84 jelű törzsének alkalmazása a gyökérgolyvát okozó *Agrobacterium tumefaciens* ellen. Az *A. radiobacter* ugyanis egy bakteriocin, az **agrocin** termelésével, továbbá **kompetíció** révén és **szisztémás rezisztencia** indukálásával biztosít védelmet a gyökérgolyva okozója ellen. Már kereskedelmi forgalomban voltak a K84 törzset tartalmazó készítmények,



üzemi körülmények között használták ezeket, amikor veszélyt jelzett a tudományos megfontolás, és éppen a géntechnológiai beavatkozás tette lehetővé a veszély elhárítását. Az aggodalom oka az volt, hogy az *A. radiobacter* K84 törzse egy konjugatív plazmidon (pAgK84) hordozza az agrocin termelés kódját. Fennállt a veszélye (és ezt kísérletes körülmények között sikerült is igazolni), hogy a pAgK84 plazmid átkerül a gyökérgolyvát okozó *A. tumefaciens* törzsekbe, az így keletkező transzkonjugánsok agrocin rezisztensek lesznek, és nem hat rájuk többé az antagonistát tartalmazó preparátum. E kedvezőtlen jelenség megelőzésére olyan mutánst állítottak elő az *A. radiobacter* K84-ből, amelyből kiiktatták a plazmid átviteléért felelős Tra (transzfer) régiót, majd kísérletesen is igazolták, hogy e mutáns biztonságosan és hatékonyan alkalmazható az eredeti törzs helyett.

### **I/3. Antagonista, hiperparazita gombák nemesítése**

Ezek a gombák részben ugyanolyan mechanizmusok révén fejtik ki hasznos tevékenységüket, mint a PGPR-baktériumok, tehát antagonizmussal, kompetícióval és szisztémás szerzett rezisztencia kiváltásával. Ezen felül azonban képesek lehetnek közvetlen parazitizmusra is: extracitoplazmás hidroláz enzimeik (kitinázok, glükánázok, cellulázok, proteázok) segítségével bontják a célszervezet sejtfalát, aktív képleteket (appressóriumot, hausztóriumyszerű nyúlványokat) fejlesztve behatolnak a megtámadott növénykórokozó gombába, s felélik annak a micéliumát és egyéb struktúráit. Más hiperparaziták extrakromoszómás örökletes elemeik közreműködésével képesek virulens fajtársaikat korlátozni.

Az extracitoplazmás hidrolázokkal operáló hiperparazita gombák közül csak a *Trichoderma*-fajokon végeztek géntechnológiai beavatkozásokat. Főként a kitináz-aktivitás növelésére törekedtek. Első megközelítésként a *Serratia marcescens*ből származó kitináz gént építették be a *Trichoderma harzanium* genomjába. Bár ezzel a módszerrel néhány próbálkozás után sikerült fokozott kitináz-aktivitású transzformánsokat előállítani, amelyeket jól lehetett használni ipari léptékű kitináz termelésére, de biológiai védekezésre mégsem voltak alkalmasak ezek a törzsek, mert a kitináz termelésüket nem a természetes szubsztrátumuk (kitin, ill. kitin oligomerek) indukálták.

Kitinázgének kópiaszámának növelésével is sikerült fokozott (120-150%) hatékonyságú antagonista (*Trichoderma hamatum*) törzseket előállítani. Ennek a megközelítésnek az az előnye, hogy csak a kitin (természetes körülmények között a kitin sejtfalú gomba) észlelésekor termel érdemes mennyiségű kitinázt a hiperparazita.

A legtöbb gombában a kitin mellett a glükánok a fő sejtfal-alkotók. A hiperparaziták által kiválasztott glükánáz enzimeknek ezért a kitinázokhoz hasonló szerepük van abban, hogy a támadó behatolhasson a célgombába. *Trichoderma longibrachiatum*ban a  $\beta$ -1,4-endoglükánázt kódoló (egl1) gén kópiaszámát növelték, amivel sikerült az enzim túltermelését elérni. A transzformánsok többsége a szülő törzsnél hatásosabb védelmet biztosított uborka csíranövényeknek *Pythium ultimum* ellen.

A biotechnológia vívmányai között megemlíthetjük a természet egy újabb csodáját is. Az imént említett *Trichoderma harzanium* fajok igen hasznosak lehetnek például annak köszönhetően is, hogy természetes hiperparazitái a *Botrytis cinerea* gombának. Utóbbi a bogyósgyümölcsűek közül az eper, a málna, a szeder, a szeder málna és a szőlő bogyóit

károsítja. A kórokozó rendkívül veszedelmes, különösen esős időjárásban, a gyümölcsök elpusztításával tetemes kárt okoz. Egy magyar származású amerikai entomológus kutató (Joseph Kovach) jött rá arra, hogy a méhek számos mikrobát terjesztenek el a meglátogatott növényeken. Ehhez elegendő a kaptárjuk bejáratánál landolniuk, ahol lábukra, potrohukra tapadnak a mikrobák, s máris kezdenek a virágporgyűjtés céljából meglátogatott növények beoltását, biológiai védekezés céljából. Így a kaptárak bejáratánál elhelyezett, szürke por vivőanyaggal együtt egy-egy méh mintegy 100.000 *Trichoderma* T22 spórát szállít ki.

#### **I/4. Biológiai védekezés gombák ellen mikovírusok közvetítésével**

A gesztenye kéregrákosodását okozó *Cryphonectria parasitica* ellen a gyakorlatban is eredményes védekezést folytatnak a gomba olyan hipovirulens törzseivel, amelyek a bennük felhalmozódott kettősszálú RNS-elemek (dsRNS mikovírus) jelenléte miatt veszítették el virulenciájukat: gyöngült a sporulációs képességük, nem termelték jellemző színanyagukat és romlott lignocelluláz aktivitásuk is. A rákos sebekre kent hipovirulens törzs anasztomózis (hifák összeolvadása) révén képes a dsRNS-elemeket átadni a rákos sebet okozó, azokban tenyésző virulens törzsekbe. Ezek a törzsek a mikovírussal való fertőződés következtében elveszítik virulenciájukat, megáll a sebek terjedése, sőt megindulhat a spontán hegesezésük is. Abban az esetben azonban, ha a gyógyításra használt hipovirulens izolátum más anasztomózis csoportba tartozik, mint a „megszelídíteni” kívánt virulens izolátum (más szóval inkompatibilis a két partner), akkor nem történik meg a dsRNS-elemek átadása, eredménytelen a kúra. Valószínűleg az ember által alkalmazott sikeres biológiai védekezés következtében az évek során felszaporodtak

olyan, genetikailag izolált, a hipovirulens törzsekkel vegetatív inkompatibilis *C. parasitica* vonalak, amelyekbe anasztomózással nem sikerült átvinni a dsRNS-elemeket, így meg tudták őrizni a virulenciájukat. Csak biotechnológiai beavatkozással lehetett az ilyen, inkompatibilis törzsekbe bejuttatni a hipovirulenciát kiváltó genetikai információt. A *Cryphonectria* hipovírus genomjáról készített cDNS-t elektroporációval vitték be a vírusmentes törzsek protoplasztjába. A vírus genetikai információját tartalmazó cDNS beépült a gazdagomba genomjába, ami két következménnyel járt. Egyrészt a gomba vegetatív életszakaszában (amikor a károkat okozza) a sejtekben víruseredetű dsRNS íródott át a cDNS-ről, aminek következtében az eredetileg vírusmentes gomba vírushordozóvá, s egyben hipovirulenssé vált. Másrészt a szexuális rekombináció során az integrálódott cDNS olyan utódokba is bekerült, amelyek vegetatív inkompatibilisek a biológiai védekezésre alkalmas vírushordozó törzsekkel, tehát hagyományos úton nem voltak fertőzhetők. Más megközelítést alkalmazva sikerült elkészíteni a *Cryphonectria* hipovírus szintetikus, fertőzőképes transzkriptumát, ezt elektroporációval bejuttatták a vírusmentes törzsek protoplasztjaiba, és így módon sikerült áttörni a hipovirulenciát terjesztő vírus előtt tornyosuló természetes biológiai gátat, a vegetatív inkompatibilitást.

## **I/5. Bioinszekticidek**

Több *Bacillus* fajról ismert, hogy képes rovarlárvák elpusztítására. A leghatékonyabb ilyen kórokozó a *Bacillus thuringiensis*, amely különböző rovarcsoportok lárváiban okoz végzetes mérgezést, intoxikációt. Sok száz, gondosan jellemzett *B. thuringiensis* törzset tartanak fenn különböző gyűjteményekben. A baktériumnak specializálódott változatai, törzsei vannak: egyesek Lepidoptera-lárvákat, mások Dipterákat, ismét mások

Coleoptera-fajok lárváit betegítik meg, de ismertek fonalférgekre szelektív törzsek is. A baktérium spóráképzése során egy kristályos fehérjét, ún. paraspórást hoz létre, amely valójában **protoxin**. Ez az anyag csak a rovarlárva belében alakul át toxinná, a lárva proteázainak bontó hatására. A toxin a bélhámsejtekhez kapcsolódik, a sejtmembránba ékelődve ioncsatornákat nyit, ami elektrolit kiáramlással, vészes víz- és tápanyagvesztéssel, végső soron a lárva pusztulásával jár. A toxinnak (amelyet **Bt-toxin**nak, Cry-fehérjének vagy  $\delta$ -endotoxinnak neveznek) mintegy 80 különböző változata ismert; e változatokat – nagyság, specifitás és hatékonyság alapján – négy családba sorolják.

Mint ahogy a *B. thuringiensis* és toxinja emlősökre, madarakra és halakra nem ártalmas, sőt az alkalmazott törzs helyes megválasztásával szelektív rovarirtást lehet vele végezni (méheket vagy árvaszúnyogokat megkímélve), számos sikeres BT-alapú biopreparátumot forgalmaznak, köztük a Dipelt, a Javelint, a Thuricide-et, a VectoBac-ot és másokat. Mint ahogy azonban a Bt-toxinnal szemben is kialakul rezisztencia a többször kezelt rovarpopulációkban, szükségesnek látszott e területen is törzsnemesítéssel javítani a hatékonyságot. Rekombináns Cry-plazmidokat szerkesztettek, helyspecifikus mutagenezist alkalmaztak, valamint kiméra-toxingéneket hoztak létre, és ilyen beavatkozásokkal sikeresen növelték a készítmények meghatározott rovarcsoportokkal (pl. Lepidoptera-lárvákkal vagy a *Spodoptera exigua*val) szemben mutatott hatékonyságát.

A rovarpatogén vírusok közül az endopterigóta fejlődésű ízeltlábúakra patogén bakulovírusokat alkalmazzák növényvédelmi célra. Szűk gazdaspecificitású kórokozókról van szó, amelyek nemcsak gerincesekre ártalmatlanok, de a legtöbb rovarfajt sem támadják meg. Mindez környezet- és természetvédelmi szempontból nagyon kedvező jelenség.

Ismertebb bakulóvírus alapú készítmények az Elcar™, a GemStar™ és a Spod-X™. Ezek a rovarpatogén vírusok azonban nem elég agresszívek, emiatt lassan épül fel az általuk kezdeményezett járvány, későn omlik össze a rovarpopuláció, vagyis tovább tart a rovarok kártétele. Gyorsabb hatású, genetikailag módosított bakulovírusokat állítottak elő oly módon, hogy skorpió-fajokból (*Androctonus australis*, *Leiurus quinquestriatus*) származó *scorpion* toxingéneket építettek be a rovarokba. (Előzetesen igazolták, hogy e gének termékei csak rovarokra mérgezőek). A természetes bakulovírus törzsek 5-15 nap alatt pusztították el a lárvákat, a toxingéneket tartalmazó konstrukciók pedig 2-3 nap alatt. További előnyös tulajdonságot is mutattak a genetikailag módosított bakulovírusok. Kiderült róluk ugyanis, hogy természetes körülmények között nem elég versenyképesek: hamar, 5-6 generáció után, eltűnnek a környezetből, mert a vad típusok kiszorítják őket.

## **I/6. Szimbiota nitrogénkötő baktériumok**

Az egész mezőgazdasági mikrobiológia legjobban kutatott csoportját ezek a baktériumok képezik. Több közel rokon Gram-negatív baktériumnemzetségben, a *Rhizobium*-, a *Bradyrhizobium*- és az *Azorhizobium*-nemzetségekben, valamint a Gram-pozitív *Frankia*-nemzetségben találunk olyan fajokat, amelyek a növényekkel szimbiózist alkotnak, és a légköri nitrogén megkötésével óriási hasznot jelentenek a mezőgazdaság, de egyben az egész élővilág számára. A *Rhizobiaceae*-fajok – amelyeket ezután gyűjtőnéven rhizobiumoknak nevezünk majd – csaknem kizárólag pillangósvirágúakkal alkotnak szimbiózist. Ritka kivételként említhetjük a szilfélék családjába tartozó *Parasponia* fajokat, amelyek szintén közösségre léphetnek bizonyos rhizobiumokkal. A *Frankia*-nemzetségbe tartozó aktinomyeták nem-pillangósvirágú zárvatermő növényekkel

(*Alnus glutinosa*, *Myrica gale*, *Hippophaë rhamnoides*, *Casuarina equisetifolia*) társulnak; e társulások egészen szélsőséges, gyakran félsivatagos körülmények között is lehetővé teszik a növények megtelepedését és a biomassza gyarapodását.

A rhizobiumok a pillangósvirágú növények gyökerein (*Sesbania* fajokon a száron is) jellegzetes gyökérgümőket indukálnak, s e gümők – rendes körülmények között – tele vannak kicsiny, pálcikaalakú vagy elágazó formájú bakteroidokkal. Ha a bakteroidokat megfelelő táptalajra visszük, mozgásképes Gram-negatív baktériumok alkotta telepeket kapunk. A különböző növényfajok gümőiből izolált baktériumok morfológiai és biokémiai tulajdonságok tekintetében nagyon hasonlóak, de gazdanövény affinitásuk változatos: csak meghatározott növényfajok (genotípusok) egyedein indukálnak nodulációt (gümőképződést). A noduláció hatékonysága (azaz a kialakult gümők száma és nagysága) is függ a gazdanövény és a szimbióta baktériumok kompatibilitásától.

A rhizobiumok egyedszáma talajtípustól és ökológiai viszonyoktól függően nagyon változatos. Előfordul, hogy bizonyos talajokon éppen azért nem fejlődnek megfelelően egyes pillangósvirágú növények, mert nincsenek jelen az endoszimbiotáik. A *Rhizobiumok* egyedszám-ingadozásának jellemzésére két adatot említünk: jó termőképességű talajban, búza után csupán 1-10 *Rhizobium*-sejt található grammonként, míg élénk fejlődésű pillangós állománnyal borított talajban ez az érték hét-nyolc nagyságrenddel nagyobb is lehet ( $10^7/g$ ).

Érzékeny és szigorúan specifikus molekuláris kommunikáció működik a gazdanövény és a a rhizobiumok között. A szimbiózis kezdeményezése és kiépülése során mindkét partnerben gének sorozata aktiválódik, amelynek eredményeként összehangolt jelcsere folyik.

A gazdanövény gyökérzete erős stimulust fejt ki a szimbiota baktériumokra, s ez a hatás a gyökerektől 10-20 mm távolságban is érződik; a baktérium méreteinek figyelembe vételével olyan ez, mintha egy magasabb rendű ragadozó 10-20 km távolságból megérezné a prédát.

A növény **flavonoid** típusú vegyületek (flavonok, flavononok, izoflavonok) kibocsátásával kezdeményezi a szimbiózist. Ezek az anyagok, bár viszonylag egyszerű molekulák, mégis fajlagos hatást tudnak kiváltani. Gyűrűs szerkezetük végálló szénatomjai ugyanis változatos módon díszíthetők acetát-, metil-, hidroxil- és egyéb csoportokkal, ráadásul mindig keverék formájában vannak jelen, tartalmaznak serkentő és gátló komponenseket egyaránt, s így valóban minden pillangósvirágú növényfaj „illata” egyedi lesz. Sőt, a flavonoid-keverék összetétele a növény korától, tápláltságától és élettani állapotától is függ.

A növény által kibocsátott jelet a NodD fehérje fogja a rhizobiumokban. Ez a fehérje, amely meggyőző homológiát mutat magasabb rendű szervezetekből ismert receptor fehérjékkel, a baktériumos válaszjel (az ún. **nod-faktor**) termelését irányító gének (gyűjtőnéven *nod* gének) működését szabályozza. A sok növényen szimbiózisra képes, ún. széles gazdaspecifitású rhizobiumok NodD fehérjéjét sokféle flavonoid aktiválhatja, a szűk gazdaspecifitású baktériumokét viszont kevés, s a gátló hatás tekintetében is ugyanilyen válogatás érvényesül. A *nodD* gének baktériumfajtól függően 1-5 kópiában vannak jelen a genomban, termékeik flavonoidspecifitása különböző lehet, s így finom kölcsönhatások érvényesülhetnek a növényi jelemolekula elfogadásában.

A *nod* gének operonokba szerveződnek, és négy csoportjuk van:

- 1) közös *nod* gének;
- 2) gazdaspecifikus *nod* gének (**hsn** = *host specific nod* gének);



- 3) fajtaspecifikus *nod* gének (**CSN**-gének = *cultivar specific nod* gének), és
- 4) genotípus specifikus *nod* gének (**GSN** = *genotype specific nod* gének).

A közös *nod* gének minden rhizobiumban jelen vannak, az ún. *nodABC* operonba szerveződtek, és hiányuk a szimbiózisra való képesség elvesztését jelenti. Olyan nagyfokú homológia van a különböző Rhizobiaceae-fajok *nodABC* génjei között, hogy az egyik faj hiánymutánsa komplementálható a másik faj génjével. Ezek a gének kódolják a *nod*-faktor alapvázát szintetizáló enzimeket. Maga az alapváz egy 3-5 *glükózamin* alegységből álló oligoszacharid molekula. Ezt az alapvázat zsírsavláncokkal és szulfát-csoportok beépítésével, fukozilálással, arabinozil-módosítással teszik faj- és törzs-specifikussá a CSN- és a GSN-gének által kódolt enzimek, más gének pedig a *nod*-faktor kiválasztásában játszanak szerepet. Ha CSN- és GSN-géneket egyik rhizobium törzsből a másikba átvisznek, akkor megváltozik a recipiens törzs gazdanövény specificitása: olyan növényeken is képes lesz nodulációt kiváltani, amelyek eredetileg a donor gazdanövénykörébe tartoznak.

A *nod*-faktorok specifikus **nodulin-géneket** aktiválnak a gazdanövényben. E gének vezérlik azokat a morfológiai és biokémiai változásokat, amelyek a szimbiózis kiépüléséhez, fennmaradásához és működtetéséhez szükségesek. Megkülönböztetünk korai nodulin-géneket (ENOD = early nodulin), amelyek a nitrogénkötés megindulása előtt lépnek működésbe, és késői nodulin-géneket, amelyek a nitrogénkötés alatt fejeződnek ki. A korai nodulin-gének működése következtében deformálódnak a szimbioták befogadására készülő gyökérszőrök, kifejlődik az infekciós

szál (amelyen keresztül a baktériumok behatolnak a növényi szövetbe), megváltozik a gyökér kéregsejtek osztódásának üteme (ami a gümő kialakulásához vezet), kialakul a gümő-metisztéma (amely biztosítja a szervecske működését). Ilyen gének működése vezet továbbá azon struktúrák (pl. hidroxiprolinban gazdag glikoproteinek) kiépüléséhez, amelyek a növényi szövetek és a szimbióta baktériumok közötti gátat, illetve a két partner közötti szelektív anyagtranszportot biztosítják. A késői nodulinok közül a leghemoglobinnak (LH) az a funkciója, hogy biztosítsa a megfelelő oxigénszintet a gümőben: ez kényes feladat, hiszen a baktérium aerob, maga a nitrogén megkötés energiaigényes folyamat (sok ATP-t használ fel), de a nitrogenáz enzim érzékeny az oxigénre. Mindkét igénynek megfelelő mikroaerob körülményeket kell tehát teremteni, amire a nagy oxigén-affinitású LH alkalmas. Más késői nodulinok a nitrogénkötés eredményeként képződő ammónia beépítésében vesznek részt, ilyenek a glutamin-szintetáz (GS), a glutamát-szintetáz (GOGAT) vagy az aszpartát-szintetáz (AS). Ismét mások a szénanyagcserében (pl. szacharóz-szintetáz), illetve a dikarbonsavak transzportjában vesznek részt, így biztosítva a baktérium táplálását.

A gümőkben mozgásképtelen, nem szaporodó bakteroid-formában találhatjuk a rhizobiumokat. Ebben az állapotban nagyon fontos küldetést teljesítenek: megkötik a légköri nitrogént, annak ammóniává történő redukálásával. Ezt a redukciót a nitrogenáz enzim-komplexum katalizálja az alább – egyszerűsített – egyenlet szerint:



A nitrogénkötést a *nif* és a *fix* gének irányítják. Az előbbieket (illetve homológjaikat) szabadon élő nitrogén-megkötő baktériumokban

(*Azotobacter*, *Klebsiella*) is megtalálhatók, az utóbbiak viszont csak a szimbiontákból vannak jelen.

A rhizobiumok hasznos tevékenységét – természetes körülmények között – két tényező gátolhatja:

- 1) az adott gazdanövény számára optimális baktérium partner hiánya és/vagy
- 2) a nodulációs versengés.

Hazai talajainkban például gyakran hiányzik a szója szimbiontája, a *Bradyrhizobium japonicum*. A nodulációs versengés is sok helyütt jelentkezhet: ez abban áll, hogy az adott talajban élő őshonos rhizobium flóra dominál, e flóra tagjai kezdeményezik a szimbiózist az elvetett pillangós állományban, de mert gümő-indukáló vagy nitrogén-megkötő képességük gyenge, kevés ammóniát adnak át a gazdanövénynek, ami végül is termésveszteséggel jár.

A szimbiózis kialakulásának elősegítésére és a nodulációs versengés kiegyenlítésére már a múlt század húszas éveiben elkezdtek a talaj- és magoltást, gümőképző nitrogén-megkötő baktériumok mesterséges kijuttatását, s ez a módszer mára sok országban az üzemi gyakorlat rutinelemévé vált. Hamar elkezdődött továbbá a kiemelkedően jó szimbionta partenrek szelektálása és nemesítése. Géntechnológiai beavatkozásokra is mód nyílt immár a rhizobium és a gazdanövény közötti kapcsolat molekuláris hátterének ismeretében. Lássuk e törekvések néhány jelentős példáját!

Konstitutívan expresszázó *nodD* gént szerkesztettek, amely nem igényelte flavonoidok jelenlétét megnyilvánulásához, és működését nem

befolyásolták a flavonoid indukciót gátló inhibitorok sem. Az ilyen gént hordozó törzsek nitrogénáz aktivitása is nőtt.

A nitrogénáz aktivitást fokozták a *nifA* gén kópiaszámának növelésével. Az ilyen törzsek nemcsak fokozott nitrogénáz aktivitásukkal tűntek ki, de nodulációs képességük is javult.

A *Sinorhizobium fredii* USDA257 törzsében a *nodC* gén inaktiválásával (amit a Tn5 transzpozonon történő inszerciós mutagenézissel hajtottak végre) kiterjesztették a törzs nodulációs aktivitását egy sor köztermesztésben lévő szójafajtára is. Ugyanilyen eljárással végeztek finom mutációs beavatkozásokat a *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU834 törzsének *hsnA* régiójában, ami azzal járt, hogy az egyébként földiherére specializálódott törzs borsón is képessé vált nodulációra.

Ismeretesek, ún. pozitív hatású *hsn*-gének is a rhizobiumokban; ezek birtokában szélesebb gazdanövényköre lesz az adott törzsnek. Ilyen gép pl. *B. japonicum*-ban a *nod-1*, amelynek más törzsekbe való átvitelével sikerült kiterjeszteni a recipiensek gazdanövénykörét szubtrópusi pillangósokra (pl. tehénborsóra).

Értékes szimbionták versenyképességét sikerült növelni bakteriocint kódoló gén bevitelével. A *R. leguminosarum* bv. *trifolii* T24 törzse termel egy ilyen bakteriocint, a trifolitoxint, amely kis koncentrációban is gátolja a kompetícióra képes vad rhizobiumokat, de nincs hatással más baktériumokra (pl. *Pseudomonas*-, *Xanthomonas*-, vagy *Bacillus*-fajokra). Maga a T24 törzs ugyanakkor nem köt nitrogént. Amikor a trifolitoxint kódoló *txf* gént beépítették a jó nitrogénkötő TA1 törzsbe, jelentősen nőtt a transzkonjugánsok versenyképessége.

A noduláció hatékonyságát egyéb tulajdonságok is befolyásolják, így a mozgékonyág és a sejtfelszíni struktúrák. Mozgékonyabb törzsek

versenyképesebbek és gyorsabban fejlesztenek gümőt, csakúgy mint azok a törzsek, amelyek erőteljes EPS (extracelluláris poliszacharid) termelésre képesek. E tulajdonságok tekintetében kiváló törzseket hagyományos törzsszelekcióval is lehet nyerni.

Géntechnológiai beavatkozások alkalmazása esetén különleges gonddal kell eljárni, és figyelembe kell venni egy sor járulékos tényezőt. Vannak, akik úgy tartják: kockázatos a recipiens törzs plazmidjába beépíteni valamilyen új tulajdonság kódját, hiszen a plazmidon kódolt tulajdonság tovább adását nem tudjuk szabályozni, s előfordulhat, hogy nem kerül át plazmid, vagy nem kellő számban kerül át az utódokba. Még nagyobb gondot jelenthet, ha vad törzsekbe kerül, s ezáltal éppen azok versenyképessége fog fokozódni. Van ugyan – mint alant látni fogjuk – bizonyíték arra, hogy bizonyos rhizobiumok gyakorlatilag nem vesznek fel idegen plazmidot, de ez a „tartózkodás” erősen törzsfüggő, ezért indokoltak az aggályok. Új genetikai információt lehetőleg szimbiózisos értelemben közömbös régiókba kell beépíteni, és arra is ügyelni kell, hogy ne jelentsen túl nagy terhet a recipiensnek az idegen információ bevitele. A nem kívánatos genetikai túlterhelés egyik példája az volt, amikor *Salmonella typhimurium*-ból származó erős promóter, a *trp* vezénylete alatt próbáltak kompetíciót fokozó géneket beépíteni rhizobiumokba; a *trp* olyan erősen „meghajtotta” a transzgéneket, hogy belőlük a kívánatosnál lényegesen több transzkriptum képződött, ami súlyosan megterhelte a sejt anyagcseréjét, s végső soron a szimbiózis szempontjából kívánatos tulajdonságok gyengülését hozta. Mindenképpen kerülni kell továbbá az antibiotikum rezisztenciagéneket tartalmazó konstrukciók alkalmazását, mert az antibiotikum-rezisztencia elsodródása kiszámíthatatlan következményekkel jár.

## **I/7. Kísérlet a szimbionta és az antagonista tulajdonságok egyetlen mikrobába történő egyesítésére**

Amerikai kutatók a kitináz enzim termelésére képtelen (s így gombákra ártalmatlan) *Sinorhizobium melilotis*-ba vittek be kitinázgént egy másik baktériumból, a *Serratia marcescens*-ből. Az így transzformált *Sinorhizobium* változatlan hatékonysággal lépett szimbiózisba a lucernával, töretlen lendülettel folytatta a légköri nitrogén megkötését. E minden tekintetben szabályos szimbiotaként működő baktérium ráadásul még kitináz is termelt, és ennek segítségével távol tartotta a kitin-sejtfalú kórokozó gombákat a gazdanövénytől.

## **I/8. A növények társulása gyökérszimbionta gombákkal (mykorrhiza)**

Szimbionta gombákkal számtalan növényfaj gyökerei társulnak. Frank (1885), aki a mérsékelt övi erdők fafajain elsőként tanulmányozta ezt az együttélést, és "gombagyökérnek", mykorrhizának nevezte el. Feltételezte, hogy a gombák hifafonalai a gyökér funkcióját töltik be. Azóta a mykorrhiza fogalmát kiszélesítették, és ma így jelölünk minden, a növények föld alatti szervei és gombák között létrejött szimbionta kapcsolatot.

Annak ellenére, hogy növényfajainknak közel 90%-a mykorrhiza kapcsolat kialakítására képes, ez a társulás korántsem olyan ismert, mint például a pillangósvirágú növények gyökere és *Rhizobiumok* között létrejövő szimbiotikus kapcsolat. Ennek magyarázata lehet, hogy a gyökérgümő szemmel látható, ugyanakkor a mykorrhiza szimbiózis gyakran nem okoz szabad szemmel látható változást, tanulmányozása csak a gyökerek szövettani festése után lehetséges. A mikotrófia, azaz a növényi gyökér szimbionta gombákkal történő együttélése hosszú evolúció eredménye. A

gazdanövény fennmaradása a zavartalan tápanyag- és vízellátástól függ, amit a gyökérszimbionta gombapartner kedvezőtlen ökológiai feltételek között képes elősegíteni. Ugyanakkor a gomba, mint heterotróf szervezet, szerves tápanyagforráshoz juthat a növény gyökérzete révén.

A szimbiózis kialakulása nagymértékben függ a talaj sajátosságaitól. Gazdag tápanyagtőkés talajokban a mykorrhiza-szimbiózisra a növény kevésbé van ráutalva, mint tápszegény talajokban. A valódi szimbiózisban részt vevő gombák azonban nem tudnak megélni a növénytől függetlenül.

A természetben a mikotrófiás szimbiózis különböző típusaival találkozhatunk, melyek közül mezőgazdasági jelentőségük miatt kiemelkedik az arbuskuláris típusú endomikorrhiza.

#### *1. Arbuskuláris típusú mykorrhizák (AM), endomikorrhizák.*

Az 1987-ig felfedezett 120 AM-faj mind egy családba, az *Endogonaceae* tartozik; e család hét nemzetsége közül hatban vannak olyan fajok, amelyek képesek erre a mikotrófiás szimbiózisra: *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glaziella*, *Glomus*, *Modicella* és *Sclerocystis*.

A korábbi elnevezés szerint az AM szimbiózisnak a vezikuláris-arbuskuláris mykorrhiza nevet adták, mert a gombahifák a gyökérszövet endodermiszébe behatolva sajátos képleteket, arbuskulumokat és vezikulumokat hoznak létre. Az arbuskulumok, melyek a hifa többszörös elágazódásából jönnek létre, leginkább a tüdőhólyagokra hasonlítanak. Annak ellenére, hogy a növényi sejt belsejében keletkeznek, sohasem hatolnak be a citoplazmába. A sejtbe benyomuló hifaelágazás kesztyűujjszerűen veszi körbe a citoplazma membránját, melynek a gomba és növény közötti tápanyagforgalom lebonyolításában van szerepe. Az arbuskulumok 4-15 nap múlva visszafejlődnek, ekkor sötét masszaként mutatkoznak az eredeti behatolási pont közelében.

A vezikulumok hólyagszerű képletek és raktározó szerepet töltenek be. Mivel a vezikulumok jelenléte nem minden AM endomykorrhiza kapcsolatban mutatható ki, szükséges volt a korábbi elnevezés (vezikuláris- arbuskuláris) arbuskuláris mykorrhizára (AM) történő módosítására.

Az AM gombák hifái nemcsak a gyökérben fejlődnek, hanem a gyökérközeli talajt is behálózzák. Ezeknek a gyökéren kívül elhelyezkedő ún. externális hifáknak köszönhetően a talaj olyan régiójának a "feltárása" is megtörténik, mely a gyökerek által hozzáférhetetlen. Az externális hifáknak hajszálgyökereknél kisebb átmérője (~8  $\mu\text{m}$ ) többféle előnnyel szolgál. Biztosítják a talaj olyan kis aggregátumaiba történő bejutást, mely hajszálgyökerekkel nem érhető el, valamint a kisebb méret relatíve nagyobb felületet biztosít, megnövelve a tápelemek és víz felvételére szolgáló abszorbeáló felület nagyságát.

Számos tapasztalati tény utal arra, hogy a mykorrhiza-szimbiózis a gazdanövény tápanyag- és vízháztartásának befolyásolásán kívül növeli a növény betegségek elleni rezisztenciáját is. Ennek a jelenségnek a pontos magyarázata még nem ismert, de feltételezhető, hogy a mykorrhiza növényre gyakorolt közvetlen hatása mellett a közvetett, a rizoszférapopulációt befolyásoló tevékenységével éri ezt el.

## *2. Ektotróf vagy ektomykorrhizák.*

Ez a társulási forma főleg a mérsékelt égövi fák gyökerein figyelhető meg. A csoport elnevezése onnan adódik, hogy a gombafonalak a gyökér epidermiszének legkülső rétegének sejtjei közé hatolnak be, így ektotróf mykorrhiza másodlagosan megvastagodott gyökereken nem tud



kifejlődni. Az ektotróf mykorrhizát hordozó fák legismertebb képviselője a fenyő (*Pinus*-fajok).

Az ektotróf mykorrhiza gombák többsége (*Boletus*, *Laccaria*, *Russula*, *Lactarius*) a Basidiomycetesbe, az *Agaricales* rendbe tartozó nagygomba. Az Ascomycetesbeli, *Tuberales* rendbe tartozóak közül legismertebb a *Tuber melanosporum*, mely a *Quercus* és *Corylus* egyes fajainak gyökereivel társul.

További három mykorrhizatípust - az *Orchidaceae*-család mykorrhizáit, az *Ericales* rend mykorrhizáit, valamint az ektendomykorrhizát - tartanak még nyilván, de ezek részletes ismertetésétől eltekintünk, hiszen mezőgazdasági jelentőségük csekély.

A mykorrhiza szimbiózis környezetvédelmi vonatkozásai is ismertek. Savasabb talajokban, illetve ahol a mezőgazdasági növények foszforellátása nem kielégítő, a foszforműtrágyázás adagjának csökkentését, illetve részleges kiváltását érhetjük el mykorrhizaoltással. A mykorrhizaoltás előnyösnek bizonyulhat számos kórokozó gomba, többek között *Phytophthora*-, *Pythium*-, *Rhizoctonia*- és *Fusarium*-fajok által előidézett növénybetegségek megelőzésében is. Segítségükkel lehetőség nyílik a kórokozók ellen alkalmazott fungicid-kezelések mérséklésére. Talajtani szempontból sajátos probléma a holt kőzetek, hányóföldek, valamint a toxikus nehézfémek, és nagy kén tartalommal jellemezhető ipar által roncsolt talajfelszínek talajmikrobiológiai rekolonizációja. Újabb vizsgálatok egyértelműen bebizonyították, hogy a mykorrhizaoltás előnyösen alkalmazható toxikus elemek lebontásának elősegítésére, valamint az ipar által tönkretett területek vegetációjának az újraélesztésében is.

## **I/9. Foszfórodó mikroorganizmusok**

A mikroorganizmusok a foszfor körforgalmának alapvetően fontos aktivátorai. Azon kívül, hogy a foszfort szerves kötéseiből felszabadítják, szaporodásuk során a szerves foszfort ismét immobilizálhatják. A sejtek, illetve a gyökérszövet számos foszforforma felvételére alkalmas, bár legnagyobb része  $\text{HPO}_4^{2-}$ - és  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ - formában adszorbeálódik.

A talaj oldható foszforkészletének a kimerülése után több lehetőség van a növények által felvehető foszfor mennyiségének növelésére, oldhatatlan foszforvegyületek mozgósítására. Számos rizoszféramikroorganizmus képes oldhatatlan szerves foszforvegyületek oldhatóvá tételére, nem enzimikus úton. Ezeknek az ún. "foszforbaktériumok"-nak a rendszertani hovatartozása igen tág, képviselőik megtalálhatók mind a gombák, mind pedig a baktériumok között. Leggyakoribbak a Gram-pozitív, spórás baktériumok, sztreptomicészek, valamint gombák közül a *Penicillium*- és *Aspergillus*-fajok. Ezek a mikroorganizmusok különböző szerves savak képzésével, közülük többen 2-ketoglukonsav segítségével fejtik ki foszformobilizáló hatásukat. A szerves és szerves savképzésen kívül egyes foszforbaktériumok komplex vegyületek, vagy  $\text{H}_2\text{S}$  gáz képzésével végzik a foszfor oldását. A foszfátoldó mikroorganizmusok a rizoszféra populációnak csak néhány százalékát adják, de jelentőségük kis mennyiségük ellenére is igen nagy.

Más mikrobák szerves foszforvegyületek, valamint szerves piro- és metafoszfátok enzimikus bontásával vesznek részt a foszfor mobilizálásában. Az enzimikus bontásban a foszfátáz enzimek játszanak nagy szerepet, melyek C-O-P észterkötések hidrolízisét végzik. Az enzimek pH-optimuma alapján megkülönböztetünk savas és bázikus közegben működő foszfátázokat. (A bakteriális foszfátázok általában

savas foszfatázok). Foszfatázok képzésére a növény gyökerein kívül elsődlegesen a gombák, az aktinomicéták és egyéb Gram-pozitív baktériumok képesek. Képződésüket a talaj foszfor- és szervesanyag-tartalma jelentősen befolyásolja.

Az ektomykorrhizák foszfatáztermelése ismert, s valószínűleg az endomykorrhizák is képesek az enzim szintézisére, elősegítve a mykorrhizált növény foszfortartalmának gyarapodását.

A foszfátoldó baktériumok megismerése után egyre több próbálkozás történt ezen mikroorganizmusok oltóanyagként történő felhasználására. Indiában például foszFOBakterin néven *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* tenyészeteket használtak a talaj foszforvegyületeinek oldhatóvá tételére, a foszforműtrágyázás mértékének csökkentése céljából. A több-kevesebb sikerrel alkalmazott oltóanyag mellett *Bacillus polymyxa*, valamint *Pseudomonas striata* keverék tenyészetekkel is történtek hasonló kísérletek. Egy másik változatot Új-Zélandban próbáltak ki, ahol a foszfátoldó baktériumokkal (PS) együtt elemi ként is adagoltak a talajhoz.

A következő sematikus ábrán figyelhetjük meg ezt a jelenséget:

$2S + 2H_2O + 3O_2$

$\square$  Thiobacillus  $\square$   $H_2SO_4$

$H_2SO_4 + PS$

$\square$   $\square$   $\square$   $\square$

MCP + DCP + PS

ahol MCP , DCP: mono- és dikalciumfoszfát

### 1. Biofilmek

Plakkokat képeznek a fogakon, nyálkát a folyók, patakok kövein, és betegséget okozhatnak, kilukaszthatnak csöveket, vezetékeket, vagy segíthetnek a veszélyes hulladékok ártalmatlanításában. Ezek az ún. **biofilmek** a különböző felszínekhez tapadt baktériumoknak jól szervezett, rétegzett rendszerei. A biofilmek sajátos működésének megértése sok probléma megoldásában segíthet, egészségügyi kérdésekben és ipari alkalmazásoknál egyaránt.

A legújabb kutatások rámutattak, hogy a biofilmekben élő baktériumok teljesen máshogy viselkednek, mint az egyedül, szabadon élő társaik. Így például a talajokban élő *Pseudomonas putida* sejtjei egyedül élve a talajpórusok vízfilmjeiben vidáman úszkálnak propeller-szerűen működő flagellájukkal. Amint beágyazódnak egy biofilmbe, kikapcsolják a flagelláris fehérjék termelésért felelős génjeiket, s helyettük pilusok termelésébe kezd. Utóbbiak ugyan szintén fehérjéből épülnek fel, de szerepük egészen más, a megtapadást segítik különböző felszíneken. Ezen felül a biofilmben élő *P. putida* sejtjeiben jóval aktívabbak lesznek az antibiotikum rezisztenciáért felelős gének is, mint a szabadon élő fajtársaikban.

A biofilmek baktériumai különböző kémiai üzenetekkel kommunikálnak egymással, hogy könnyebben alakíthassanak ki megfelelő háromdimenziós struktúrákat. Az így képzett „építmények” aztán olyan szintű védelmet biztosítanak a sejtek számára, amelyben a szabadon élő baktériumok nem részesülhetnek. A biofilmek belsejében beálló alacsonyabb oxigénkoncentráció például csökkenti néhány antibiotikum hatékonyságát. Mivel egyszerre többféle baktérium faj is jelen van a

biofilmben, ezért természetesen nagyobb lesz az esély arra, hogy néhány közülük rezisztens lesz egy-egy antibiotikummal szemben.

Minél jobban megértjük a biofilmek működését, annál jobban csökkenthetjük az ember számára káros hatásait, vagy annál jobban kihasználhatjuk a tőlük tanultakat. A biofilmek az emberek bakteriális fertőzéseinek mintegy 2/3-áért felelősek, többek között a fogak romlásáért és a cisztás-fibrózissal járó, veszélyes tüdőgyulladásokért. A biofilmek okoznak számos ipari problémát is, a csővezetékek korróziójától kezdve az eltömődött vízsűrőkig, milliós/milliárdos károkat okozva ezzel. Szerencsére nem minden biofilm kártékony, néhány például hasznosnak bizonyult a különböző környezeti szennyeződések megelőzésében és elhárításában.

## **2. Miért nem tudjuk megemészteni a faanyagot?**

Miért van az, hogy a természet meg tudja emészteni a faanyagot, míg az emberek nem? A válasz az eltérő biokémiánkban rejlik, de egyben baktériumokra is visszavezethető.

A fa főleg cellulózból, a növényi sejtfal egyik fő összetevőjéből áll. A cellulóz, növényi keményítő és az állati glikogén szerkezetének összehasonlítása rámutat arra, hogy a cellulózban a glükóz monomerek ún.  $\beta$ -1,4 kötésekkel kapcsolódnak, míg a keményítő monomerjei  $\alpha$ -1,4 és  $\alpha$ -1,6 kötésekkel. Az amiláz, amilopektin és a glikogén a fő állati és növényi tápanyag raktározási formái a szénhidrátoknak. Az amilázban csak  $\alpha$ -1,4, míg a glikogénben és az amilopektinben  $\alpha$ -1,4 és  $\alpha$ -1,6 kötések is vannak.

A kétféle, csak kissé eltérő kötésekkel tartalmazó poliszacharidok térszerkezete között az a lényeges különbség, hogy a keményítő és

glikogén esetében a molekula inkább helikális (csavart) lesz, mint hosszú, egyenes pálca, ahogy azt a cellulóznál láthatjuk. Ezek a csavart molekulák sokkal könnyebben formáznak hidrogén-kötéseket vízmolekulákkal, ezáltal könnyebben emészthetők lesznek az állatok és növények számára.

Az állatoknak tehát olyan enzimeik vannak, amelyek az alfa-kötéseket képesek csak bontani, de nincs nekik *celluláz* enzimük, amely képes a  $\beta$ -1,4 kötések alakjához csatlakozni. Így az állatok, valamint az emberek nem képesek megemészteni a cellulózt.

Hogyan tudnak mégis megélni a természetek a faanyagon, és a növényevő állatok, mint a lovak és szarvasmarhák fűvel táplálkozni, ha ezen anyagok legfőbb összetevője a cellulóz? Az ő emésztőrendszerük ill. bendőjük ugyanis ideális életteret jelent cellulózt emészteni képes baktériumok számára, amelyek magukból celluláz enzimet választanak ki. Utóbbi aztán glükózra bontja a cellulózt, amit már az állatok is könnyen hasznosítani képesek.

### **3. A jövő „okos” sebtapasza**

Képzeljünk el egy olyan sebtapaszt, amelyik nem csak lefedi az ujjunkon a vágást, de egyben azt is megállapítja, hogy Gram-pozitív vagy Gram-negatív baktériumok telepedtek-e meg a sebben. Az ilyen intelligens sebtapaszok már a közeljövőben piacra kerülhetnek. A Rochesteri Egyetem kutatói ugyanis kifejlesztettek egy olyan miniatűr szenzort, amelyik képes a Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumok megkülönböztetésére, még hozzá megbízhatóbban, mint a hagyományos Gram-festés. A szenzor egy olyan porózus szilikon-chip, amely képes felismerni a lipid-A jelenlétét, mely molekula csak a Gram-negatív sejtek sejtfalának külső régiójában található meg. Ha a lipid-A molekulák

rákapcsolódnak a szenzor szerves összetevőire, azt színváltozás jelzi. Bár jelenlegi formájában a tapasz még nem alkalmas a házi felhasználásra való sorozatgyártásra, várhatóan a jövőbeli továbbfejlesztésével beépíthető lesz sebtapaszkba, amelyekkel gyorsan megállapítható lesz a fertőző bacik jellege, vagy akár élelmiszer-csomagolásban jelezheti majd az esetleges baktériumszennyezések bekövetkezését.

#### **4. Woese taxonómiai forradalma**

Carl Woese hosszú éveken át kutatta a prokarióta sejtek rendszerezésének összefüggéseit. A morfológiai (alaki) és biokémiai tesztek nem adtak elég információt a prokarióták teljes igényű rendszerezéséhez, így Woese több mint egy évtizeden keresztül fáradtságos munkával szekvenálta a prokarióták riboszómális RNS-ét (rRNS) a kérdés megoldására.

Aztán 1976-ban a prokariótáknak egy olyan különleges csoportjánál végzett rRNS analízist, amelynek tagjai metánt képeznek az anyagcseréjük melléktermékeként. Woese meglepetten tapasztalta, hogy rRNS-ük nem tartalmazta azon génszekvenciákat, amelyeket a többi baktériumra egyöntetűen jellemzőek. Először azt hitte, hibázott a minták kezelésében, de megismételve vizsgálatait rájött, hogy a metanogének, ahogy ezen fajokat nevezzük, különböznek minden más prokarióta és eukarióta sejttől. Ők alkották az élőlények egy új, harmadik nagy csoportját, melyet ma Archea-nak, azaz Ősbaktériumoknak hívunk. Woestet követve a tudósok olyan hétköznapi anyagokat vizsgálva, mint az emberi nyál, víz, talaj és sziklák, számos új nukleotid szekvenciát találtak. Ezeket összevetve a korábbi, számítógépes adatbázisokban tárolt ismeretekkel, kiderült, hogy mikrobás életformák sokasága létezik még,

amelyet nem sikerült soha kitenyésztetni laboratóriumban, megvizsgálni és leírni.

## 5. „Izzó” baktériumok

A *Photobacterium* nemzetségbe tartozó baktériumok egy olyan érdekes elektrontranszport láncsal rendelkeznek, amely ATP helyett fényt termel. Ezek a szervezetek át tudnak váltani a normál elektrontranszport láncról (amely citokrómokból, proton pumpából, és végső elektron akceptorként O<sub>2</sub>-ből áll) egy alternatív elektronláncra. Míg a hagyományos elektrontranszport lánc proton-koncentrációgrádienszt állít elő, mely ATP termelésre fordítható, addig az alternatív út szétválasztja az elektrontranszportot és az ATP-termelést. Az elektronok ebben az esetben ugyanis a proton-pumpa helyett a flavin-mononukleotid (FMN) koenzimre továbbítják. Ezt követően, a luciferáz enzim és egy hosszú szénláncú szénhidrogén jelenlétében fénykibocsátásra kerül sor, miközben elektronok kerülnek O<sub>2</sub>-molekulákra.

Érdekes módon a szabadon élő *Photobacterium*-ok általában nem végeznek biolumineszcenciát. A fénykibocsátásuk leginkább csak akkor következik be, amikor ezek a baktériumok kolonizálják egyes tengeri állatok bőrét, például tintahalét vagy halakét. Ezek az állatok hasznot húznak abból, hogy a baktériumok által termelt fény csalogatóként hat az ellenkező ivarú fajtársaikra, vagy éppen elijeszti az ellenséges ragadozókat. A lámpáshalak családjába tartozó *Photoblepharon palpebratus* egyedeinek a szája közelében egy különleges szervük található, amely különösen alkalmas a biolumineszkáló baktériumok tenyésztésére. A bennük található baktériumok millió elég fényt termelnek ahhoz, hogy a halak navigálni tudjanak a korallzátonyok mentén éjszaka is, miközben zsákmányállataikat is magukhoz vonzzák. A



világítószerv még egy olyan membránnal is rendelkezik, amely szemhéjhoz hasonlóan képes a kibocsátott fény mennyiségének kontrollálására.

Arra, hogy a baktériumoknak milyen előnyei származnak az együttélésből, még nem teljesen derült fény. Vélhetően védelmet és tápanyagokat kapnak a halaktól cserébe azért a hatalmas energiaigényű tevékenységért, amit a fénykibocsátásáért ATP-veszteségként szenvednek el.

## **6. Mitől bűzlik a hal?**

Vajon miért olyan különlegesen bűdös a romlott hal? Az ok a baktériumok metabolizmusában rejlik.

A halak metabolizmusában a trimetilamin-oxid (TMAO) egy nitrogéntartalmú melléktermék, amely arra szolgál, hogy megszabaduljon az aminosavak lebontásakor (amino-csoportok formájában) jelentkező nitrogénfeleslegtől. A TMAO egy szagtalan termék, ami nem befolyásolja a bolti pultokra frissen kerülő halak szagát, megjelenését vagy ízét. Azonban ezt a trimetilamin-oxidot néhány baktériumfaj képes terminális elektron-akceptorként hasznosítani anaerob anyagcseréjükben, trimetilaminná (TMA), mely vegyületnek nagyon jellegzetes – és a legtöbb ember számára kellemetlen – szaga van. Az emberi orr már néhány molekulányi mennyiségét is képes felismerni. Mivel a bakteriális lebontás és a TMA termelése a hal elpusztulása után azonnal megindul, a friss illatú hal tényleg friss is kell, hogy legyen, vagy még frissen le kellett legyen fagyasztva.

### 1. Aranybányász mikrobák

Az arany a természetben két formában fordul elő: aranyerekben ércként lerakódva a Földkéregben, másrészt vízben oldott formában, hőforrásokban és tengervízben. Az oldott arany (amely annak oxidált formája) lényegében hasznosíthatatlan az ember számára; nem alakítható át egyszerűen vagy megfelelően kis költséggel szilárd arannyá (ez a redukált formája), amelyből oly értékes tárgyakat készítünk. Ugyan az arany mindkét formájában toxikus hatású az élőlényekbe jutva, a tudósok mégis felfedeztek olyan baktériumokat, amelyek biofilmet képeznek az aranyérc felületén, ill. amelyek az oldott aranyat metabolizálni képesek.

A tudósok már régóta tudták, hogy a prokarióták egy része képes elektront átvinni egy elektrondonorról (általában hidrogénről) olyan fémekre, mint a vas és az uránium, a folyamat során redukálva ezen fémeket. Ezen ismeretek arra ösztönöztek egyes tudósokat, hogy arannyal is próbálkozzanak. Ausztráliai aranybányák (2 helyszín, 11 talajminta) kőzetanyagából DNS mintákat vettek aranszemcsék felületéről. Az ott észlelt biofilm DNS profilja mintegy 30 baktériumfaj jelenlétét igazolta, köztük csupa olyan fajról lévén szó, amelyek a környező talajban nem voltak megtalálhatóak. A fajok egyike, a *Ralstonia metallidurans* nevű baktérium, mindkét vizsgált helyszínen, az összes aranszemcsén előfordult.

Következő lépésként laboratóriumban kitenyésztették a *R. metallidurans*-t, oldott arany jelenlétében, amely más mikroorganizmusokra erősen toxikus. A vizsgálat azt mutatta, hogy az arany egy része kicsapódott. A

baktérium tehát életképes maradt olyan magas oldott-arany koncentráció mellett is, amely mellett a legtöbb más mikroba már elpusztult volna.

Az ausztráliai példához hasonlóan a massachusetts-i egyetem kutatói a vas redukálására képes mikrobákkal tettek ilyen kísérletet. A *Picrobaculum islandicum*, *Pyrococcus furiosus* (archea),

*Thermotoga maritima* és a *Shewanella algae* (bacteria) fajokról ki is mutatták, hogy ezek is képesek voltak oldott arany redukálására.

Mindezen eredmények új lehetőségeket jelentenek az aranybányászati technológiák fejlesztésében. Természetesen nem szabad azt hinnünk, hogy nagy remény van arra, hogy így módon óriási mennyiségben állítsanak elő szilárd aranyat, hiszen egyrészt a hőforrásokban és a tengervízben amúgy is nagyon alacsony koncentrációban fordul csak elő az oldott formája, másrészt ha hirtelen nagy mennyiségben kerülne piacra arany, akkor az értéke is drasztikusan csökkenne.

## **2. Hipertermofil baktériumok**

A hipertermofil baktériumok extrém magas hőmérsékletű környezetekben élnek, egyesek közülük még 100 °C fölött is előfordulnak. A hőálló lipidjeik, nukleinsavuk és fehérjéik lehetővé teszik számukra a túlélést olyan magas hőmérsékleten is, ahol a mezofil mikroorganizmusok rövid idő alatt elpusztulnának.

De pontosan hogyan is képesek erre? Sejtjeik, makromolekuláik felépítése az, ami ezt lehetővé teszi:

- A citoplazma membránjuk nem tartalmaz zsírsavakat, amelyek a magas hőmérsékleten elolvadnának. Helyette egyrétegű a membránjuk, és olyan szénhidrogén láncok alkotják, amelyekben 40 C-atom található glicerín-foszfáthoz kapcsolódva;
- A hipertermofilek nukleinsavát különleges enzimek stabilizálják azáltal, hogy hőálló szupercoil (többszörösen felcsavart) szuperszekunder szerkezetűvé alakítják azt, amikor magas K-ion koncentráció mellett hőálló fehérjék csatlakoznak a DNS-lánca;
- A hipertermofilek enzimeik is hőállóak; több hidrofób aminosavat tartalmaznak, mint a mezofilek, és az aminosav építőegységek közötti keresztkötések száma is magasabb bennük.

A hipertermofilek enzimeik nagy szerepet játszanak a modern biotechnológiában. Így pl. a Yellowstone Nemzeti Park hőforrásaiból izolált *Thermus aquaticus* nevű baktériumnak, valamint a *Thermococcus litoralis* nevű mélytengeri baktériumnak a hőálló DNS-polimeráz enzimeit használják a polimeráz láncreakcióban (Taq-polimeráz; PCR=polymerase chain reaction), amellyel korlátlan mennyiségben lehet a kiindulási anyaggal teljesen megegyező összetételű DNS-t előállítani.

Más thermofilekből származó enzimeket az ipari fermentáció azon folyamataiban hasznosítanak, melyeknek 50-100 °C közötti a hőmérsékleti optimumuk.

### **3. Betegségek terjedésének megakadályozása a génexpresszió szabályozásával**

A gének transzkripciós folyamatainak részletesebb megismerése új eszközöket adhat a kezünkbe a baktériumok okozta betegségek kezelésében és megelőzésében.

Így pl. a *Staphylococcus* nevű baktériumnemzetség több olyan faja ill. törzse, amelyek ételmérgezést vagy különböző betegségeket (pl. fülgyulladásokat, toxikus sokk-szindrómákat) okoznak, rezisztensek a penicillinre. Ilyen penicillinrezisztenciát kölcsönözhet a baktériumsejteknek a béta-laktamáz nevű enzimfehérje, amely a penicillinmolekulákat kettéhasítja. Alapesetben a béta-laktamáz enzim génje represszált állapotban van, de penicillin jelenlétében aktiválódik és megindul a béta-laktamáz termelése.

A legújabb kutatások fényt tártak ennek a folyamatnak a mechanizmusára. A penicillin rákapcsolódik a *Staphylococcus* baktérium egy a sejtmembránban ülő receptor-fehérjéjére, ami beindítja annak enzimátikus aktivitását. Az újonnan képzett enzim lebontja a béta-laktamáz génjének szupresszor molekuláját, így megindulhat a béta-laktamáz szintézis.

A penicillin rezisztencia ilyen megnyilvánulásának pontos megismerése a jövőben segíthet majd újfajta gyógymódok kidolgozásához a *Staphylococcus* baktérium elleni küzdelemben, ha pl. egy a receptorfehérjére kapcsolódó anyaggal blokkolni tudjuk annak enzimátikus aktivitását és ezáltal a béta-laktamáz szintézist is.

#### 4. Építsünk „jobb moszkítót”

Mi lenne, ha a tudósok képesek lennének olyan génmódosított moszkítók előállítására, amelyek nem tudnák továbbítani halálos betegségek kórokozóit, mint pl. a maláriát vagy a sárgalázatot? A kutatók éppen erre készülnek!

A lehetséges stratégiák egyike a transzpozonok felhasználása arra, hogy olyan géneket vigyünk be a moszkítókba, amelyek jelentősen megnövelnék azok védekező-fehérje szintézisének aktivitását, melyekkel ezeket a patogéneket elpusztíthatják. A moszkítók természetes körülmények között is szintetizálnak ilyen fehérjéket, de nem elég nagy mennyiségben ahhoz, hogy azok elpusztítsanak minden patogén mikrobát. A tudósok abban bíznak, hogy génmanipuláció révén olyan moszkítókat lesznek képesek előállítani, amelyek már elegendő ilyen fehérjét szintetizálnak ahhoz, hogy az összes patogént elöljék. Ezek aztán kiengedve a természetbe kereszteződnének a vadon élő populációkkal, és olyan új állományok jönnének létre, amelyek már nem terjesztenék a fertőző betegségeket.

A jelenlegi állás szerint a tudósok már sikerrel juttattak be transzpozonokkal ilyen géneket olyan *Aedes* moszkítókba, amelyek a sárgalázat terjesztik. Bár ez biztató fejlemény, az *Aedes* csak egyike a mintegy 100 betegség-terjesztő moszkító fajnak. Azok a rekombináns géntechnológiák, amelyek működtek az *Aedes* esetében, nem biztos, hogy pl. az *Anopheles gambia* moszkító esetében is beválnak majd, pedig utóbbi a malária leghalálosabb formájának legfőbb terjesztője. Más tudósok amiatt aggódnak, hogy milyen káros következményei lehetnek majd az ilyen génmanipulált moszkítók szabadon eresztésének.

Mivel a malária évente jelenleg is mintegy 2 millió ember halálát okozza, a kihívás, amelyet az ilyen „biztonságos” moszkítóok előállítása jelent a tudósok számára, továbbra is megmarad.

## **5. A humán genom felhasználása patogén mikrobák felfedezésére**

Okozhatnak-e beazonosítatlan mikrobák krónikus autoimmun betegségeket, mint pl. lupus erythematosus-t (vörös farkas) vagy a szklerózis multiplexet? Ha újfajta fertőző betegségek jelentkeznek – mint az utóbbi évtizedekben a HIV, Ebola, hantavírus és a Nyugat-Nílusi láz vírusa – akkor hogyan fogjuk beazonosítani ezek kórokozóját?

A tudósok nemrégiben egy izgalmas újfajta technikát fejlesztettek ki e kérdés megválaszolására: az emberi genomot használták fel eszközüül.

A Humán Genom Projektet 1990-ben indították el két ambiciózus céllal: egyik cél az összes emberi gén azonosítása volt, a másik a mintegy 3 millió bázispáros szekvenciájának meghatározása. 2000 júniusában az egész világot bejárta a hír: a tudósok bejelentették, hogy végeztek az emberi genom feltérképezésével. Egy évvel később pedig elmondták, hogy az emberi génállomány mindössze 26.000-40.000 gént tartalmaz, alig kétszer vagy háromszor többet, mint a gyümölcslégy (*Drosophila melanogaster*), melynek mintegy 13.000 génje van. Összehasonlításként, az *Escherichia coli*-nak 5.416 génje van.

A Humán Genom Projektből nyert adatokat felhasználva a Dana-Farber Rákkutató Intézet tudósai újfajta technikát fejlesztettek ki, amelyet „computational subtraction”, azaz „számítógépes kivonás” névre kereszteltek el. Ennek során egy betegség által megtámadott emberi szövetmintát szekvenálnak meg első lépésben, majd ezt összehasonlítják

a teljes humán genom szekvenciáival. Az azonosságokat eliminálják, majd a „maradék” DNS-szakaszokat vizsgálják meg külön azért, hogy kiderítsék, azok tartalmazzák-e az újfajta kórokozó mikroorganizmus génjeit.

A módszert olyan szövetmintán tesztelték, amelyről tudták, hogy a rákkeltő humán papillomavírust tartalmazza. A technika bevált, az azonosítás után visszamaradó DNS-rész megegyezett a humán papillomavírus ismert szekvenciáival. A tudósok abban bíznak, hogy ezzel a módszerrel képesek lesznek eddig beazonosítatlan kórokozók vagy újonnan jelentkező veszélyes vírusok DNS-ének azonosítására és feltérképezésére is.

## **6. Vaccinák az étlapon**

Nem lenne nagyszerű, ha a fájdalmas influenza elleni oltás helyett egyszerűen elfogyaszthatnánk a vakcinát csokoládéba ágyazva. Bár itt még nem tartunk, de a tudósok egyre közelebb kerülnek a genetikailag módosított orális vakcinák kifejlesztéséhez.

Az egyik ilyen kutatási projektben a tudósok egy növényi alapú orális vakcinával kísérleteznek, amellyel a szarvasmarhákat akarják megvédeni a pneumóniás pasztórellózistól, más nevén a szállítási betegségtől, amely a teheneknél a szállítás alatt elszenvedett stressz hatására jelentkezik. A *Mannheimia* (korábban *Pasteurella*) *haemolytica* baktérium okozta légúti betegség a fertőzött állatok étvágycsökkenésével, lázzal és orrfolyással jár. Injekcióval beadható vakcina létezik ellene, de drága és munkaigényes a beadása, valamint a tehenek olyan erős stresszet szenvednek el általa, ami néha még ronthatja is az állapotukat.



A kanadai Guelph város egyetemének kutatói sikerrel ültették be a *M. haemolytica* egy génjét fehér lóherébe, miáltal a növényben megtermelődik a baktérium egy fehérjéje. Ehhez első lépésként beazonosították a baktérium egyik fő virulencia faktorát, a leukotoxint (Lkt). Ennek a leukotoxint termelő génnek egy módosított változatát (Lkt50) aztán beágyazták egy zölden fluoreszkáló fehérje génjébe (GFP), amelyet markerként alkalmaztak. Végül ezt a fuzionált (Lkt50-GFP) gént ültették be a lóherébe, amikor is a beültetés sikerét az igazolta, hogy a növény zöld fényt bocsátott ki.

Az alapötlet szerint a teheneket ilyen genetikailag módosított lóherével etetve a bakteriális fehérjék antigénként funkcionálnak, ezzel kicsalva a tehenekben a *M. haemolytica* elleni immunreakciót. Ennek a vakcinának az előállítását egyszerű, a molekula stabilan fennmarad a száraz szénában több napon keresztül. Az is előnyére válik a módszernek, hogy a tehenek kérődzésük során újra és újra felöklendezik és megrágják az ételt, így az emésztőtraktusukban található immunsejtek intenzív kontaktusba kerülhetnek az említett fehérjével. Mára már sikeresen alkalmazták a módszert laboratóriumi állatoknál (először nyulaknál): a terepi kísérleteket 2002-ben kezdték meg.