

A *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 talajbaktérium mezőgazdasággal kapcsolatos kutatási eredményei 1986-tól napjainkig

Bevezetés

Az egyik leginkább kutatott rodokokkusz törzs a *R. erythropolis* NI86/21, melyet 1986-ban izoláltunk kukoricánövény gyökeréről a Gödöllői Agrártudományi Egyetemen (ma Szent István Egyetem) működő „Mikrobiológiai Műhely” keretei között. E törzs különlegessége, hogy egyedüli szén- és nitrogénforrásként tiokarbamát herbicideket (EPTC, butilát és vernolát) képes hasznosítani (NAGY et al., 1987a). Tenyészedény-kísérletekben megfigyeltük, hogy ezeknek a pre-emergens herbicideknek a kukorica tesztnövényre kifejtett fitotoxikus hatását a baktérium az alkalmazott sejtszámtól függően mérsékli, illetve teljesen kivédi úgy, hogy a növényvédő szer gyomirtó hatása közben megmarad. A későbbiekben kisparcellás szántóföldi kísérletek is bizonyították, hogy a baktérium mezőgazdasági méretekben is képes megvédeni a kukoricát e három tiokarbamát fitotoxikus hatásától (NAGY et al., 1987b). Az eljárásnak, illetve a baktériumnak a „bioantidótum” elnevezést adtuk.

A további munkák során kutatásaink célkeresztjébe a herbicidbontásért felelős gének izolálása és azonosítása került, de emellett alapvető fontosságú genetikai eszközöket, DNS-, RNS- és fehérjefeltárási módszereket is kidolgoztunk. Az eredeti cél elérése mellett egy *E. coli* – *Rhodococcus* klónozó vektort, és egy *Rhodococcus* mutációs rendszert is kifejlesztettünk, melyet MITANI és munkatársai (2006) fejlesztettek tovább. Azt is megállapítottuk, hogy a törzs nemcsak tiokarbamátokon, hanem triazin vegyületeken is képes szaporodni, és hogy a triazinok bontásáért is (csakúgy, mint a tiokarbamátok lebontásáért) a *CYP116* enzim és a hozzá tartozó redox rendszer a felelős (NAGY et al., 1995a,b). A herbicidbontó gének szekvenálása során az első eubakteriális proteaszóma géneket is megtaláltuk a *thcB* gén szomszédságában. Ez irányú vizsgálataink a *Rhodococcus* proteaszóma alegységszerkezetének, a negyedleges szerkezet kialakulásának, illetve az alegységszerkezet kialakulásáért felelős propeptid szerkezetének és hatásmechanizmusának a kiderítésére irányultak (TAMURA et al., 1995; ZUHL et al., 1997; KWON et al., 2004).

Összefoglaló munkámat Kecskés Mihály 75. születésnapja és a *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 törzs izolálásának 20. évfordulója alkalmából állítottam össze azzal a kettős céllal, hogy egyrészt megemlékezzek a „Gödöllői Mikrobiológiai Műhely” kutatási eredményeiről, másrészt, hogy a törzsnek és génjeinek a gyakorlati alkalmazási lehetőségeire rávilágítsak.

A *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 törzs bioantidótotum hatása

A tiokarbamát herbicideket preemergens gyomirtó szerként használják főleg egyszikű gyomok ellen (WARE, 1994). E herbicidesalád magában foglalja többek között az EPTC (S-etil-dipropil-tiokarbamát), butilát (S-etil-N,N-diizobutil-tiokarbamát), vernolát (S-n-propil-N,N-di-n-propil-tiokarbamát), cikloát (S-etil-N-etil-N-ciklohexil-tiokarbamát), diallát [S-(2,3-diklór-allil)-diizopropil-tiokarbamát], pebulát (S-propil-butyl-etil-tiokarbamát) stb. vegyületeket. Az EPTC-t egyéves és évelő egyszikű gyomok ellen használják különböző növénykultúrák, így a kukorica, a gyapot és a bab vegyszeres gyomirtására. Az EPTC és a butilát alkalmazási körének kiszélesítésében fontos lépés volt a diklormid (R-25788: N,N-diallil-2,2-dikloro-acetamid) vegyülettel történő együttes alkalmazás, amely mint antidótotum képes megvédeni a kukoricánövényt a tiokarbamátok fitotoxikus hatásától (PHILLIPS & MCDUGALL, 1993).

Az 1970-es évek végétől vált közismertté, hogy bizonyos peszticidek (melyek főleg a karbamátok, tiokarbamátok, fenoxi-ecetsavak, szerves foszfátok családjába tartoznak) hatástartama lerövidül azokban a talajokban, melyeknek kezelésére e vegyületeket több egymást követő évben használták. Az ilyen talajokat adaptált, vagy a vegyszeres gyomirtás szempontjából problematikus talajnak nevezték el (RAHMAN et al., 1979). A vizsgálatok bebizonyították, hogy a jelenség oka a mikroorganizmusok adaptációs képessége (GRAY & WEIERICH, 1968), mely alkalmassá teszi őket arra, hogy a környezetből érkező biokémiai és élettani kihívásoknak megfeleljenek, és akár az új, szintetikus peszticideket is szaporodásukhoz egyedüli szén- (és esetenként nitrogén-) forrásként hasznosítsák (BIRÓ & KECSKÉS, 1984). A tiokarbamát-családban a felgyorsult lebontás jelenséget az EPTC, vernolát és a butilát esetében figyelték meg, de a cikloáttal kapcsolatban ilyen tapasztalatok nincsenek. Az „adaptált talaj” jelenség, a kukorica vetésterületén bármely talajtípusban előfordulhat, ha a talaj mikrobiológiai aktivitása kellőképpen intenzív (OBRIGAWITCH et al., 1982; KÁTAI, 1997).

Tenyészedény-kísérletek során észleltük, hogy az EPTC-vel előkezelt talaj jól antidotálja az EPTC, butilát és vernolát fitotoxikus tüneteit, az ilyen talajokban a kukoricánövény kevésbé károsodott. A kísérleteket négy tiokarbamátra terjesztettük ki, az EPTC-vel, butiláttal, vernoláttal és cikloáttal előkezelt talajokban a vegyszeres kezeléstől számított két hónap eltelte után kukorica teszt növény alkalmazásával tanulmányoztuk a tiokarbamátok lebomlási ütemét és kereszt antidotálási viszonyait is (1. táblázat a) és b) sorok), amelyek a következők szerint alakultak:

- az EPTC-vel előkezelt talaj az EPTC, a butilát és a vernolát fitotoxikus tüneteit 60–70%-ban,
- a butiláttal előkezelt talaj az EPTC, a butilát és a vernolát fitotoxikus tüneteit 66–88%-ban,
- a vernoláttal előkezelt talaj az EPTC, a butilát és a vernolát fitotoxikus tüneteit 78–84%-ban,
- a cikloáttal előkezelt talaj csak a cikloát fitotoxikus tüneteit enyhítette mintegy 50%-ban (NAGY, 1989).

A talajban kialakuló antidótotum tulajdonságot vizsgálva megállapítottuk, hogy az EPTC-vel kezelt talajokban mind a 17–18 °C-on, mind a 28 °C-on inkubált kezeléseken kialakul az antidótotum hatás, ami azonban autoklávval, vagy gamma-besugárással történő sterilizálás után eltűnik a talajból. Ez a tény tehát egyértelműen azt bizonyította, hogy a talaj antidótotum hatásáért a talaj mikrobiális aktivitása a felelős (NAGY, 1989).

1. táblázat

A tiokarbamátok ($6 \text{ l}\cdot\text{ha}^{-1}$) mikrobiális lebontásának (a) és a kukoricánövény biológiai antidótálhatóságának (b) a kapcsolatrendszere herbicidekkel kétszer előkezelt talajokban ($2\times$), valamint a *R. erythropolis* NI86/21 törzs tiokarbamát-bontó (c) és kukorica antidótáló (d) képessége $9,3\times 10^6$ sejt $\cdot\text{g}^{-1}$ talaj mennyiségben (NAGY, 1989)

Biológiai jelenség	Vizsgált herbicid ($6 \text{ l}\cdot\text{ha}^{-1}$)			
	EPTC	Butilát	Vernolát	Cikloát
a) Herbicidbontás talajban				
EPTC $2\times$	+	+	+	-
Butilát $2\times$	+	+	-	-
Vernolát $2\times$	+	+	+	-
Cikloát $2\times$	-	-	-	+
b) Talaj antidótum-hatás				
EPTC $2\times$	+	+	+	-
Butilát $2\times$	+	+	+	-
Vernolát $2\times$	+	+	+	-
Cikloát $2\times$	-	-	-	-
c) <i>A. R. erythropolis</i> NI86/21 törzs tiokarbamát bontása	+	+	+	-
d) <i>A. R. erythropolis</i> NI86/21 törzs kukorica antidótáló képessége	+	+	+	-

Az ilyen „bioantidótum” jelenséget az *R. erythropolis* NI86/21 törzsszel modellezni tudtuk: a talajba oltott törzs az EPTC és a butilát fitotoxikus tüneteit $3,3\times 10^4$ sejt $\cdot\text{g}^{-1}$, a vernolát fitotoxikus tüneteit $3,3\text{--}9,3\times 10^6$ sejt $\cdot\text{g}^{-1}$ mennyiségben kivédte, a cikloát fitotoxicitását viszont nem tudta mérsékelni (1. táblázat c) és d) sorok).

A *R. erythropolis* NI86/21 törzs a fentiek értelmében alkalmas arra, hogy a mezőgazdasági gyakorlatban antidótum-hatású vegyületek helyett használjuk az EPTC, a butilát és a vernolát herbicidekkel kombinációban, és ezzel csökkenthessük a környezetünkbe juttatott kemikáliák mennyiségét. Az eljárás másik fontos aspektusa az, hogy amíg a kémiai antidótálás során az antidótum vegyület a herbiciddel együtt a növénybe kerül és ott fejt ki hatását, addig a bioantidótum eljárásnál a baktérium-kezeléssel mintegy védőpajzsot vonunk a növény gyökerei köré, amely feltételezhetően meggátolja, hogy az aktív növényvédőszer-molekula a növénybe kerüljön. Az ilyen irányú kutatások fejlesztése ezért nemcsak a bioantidótum eljárások, hanem a fitoremediációs módszerek alkalmazását is elősegíthetné a xenobiotikumok (KECSKÉS, 1976) által szennyezett területeken.

A *R. erythropolis* NI86/21 törzs tiokarbamát metabolizmusa

A talajba juttatott tiokarbamátok lebontását mikrobák katalizálják, és ezek közül is néhány *Rhodococcus* fajról írták le azt a képességet, hogy a tiokarbamátokat egyedüli szén- és nitrogénforrásként tudják hasznosítani. A *R. erythropolis* NI86/21 törzsen kívül a *Rhodococcus* sp. TE1 (BEHKI & KHAN, 1990) és a *Rhodococcus* sp. JE törzsek EPTC

hasznosítását tanulmányozták részleteiben (ANKUMAH et al., 1995). A JE1 törzsben az EPTC lebontása az N,N-dialkil gyök α -propil szénatomjának hidroxilezésével kezdődik, majd a következő lépésben az instabil α -hidroxipropil EPTC propionaldehidre és N-depropil-EPTC-re bomlik. Ezek mellett még az EPTC-szulfoxid volt nyomokban kimutatható. A TE1 törzs viszont az EPTC bontása folyamán dipropilamint produkál, ami egy másfajta EPTC metabolizmust tükröz (BEHKI & KHAN, 1990).

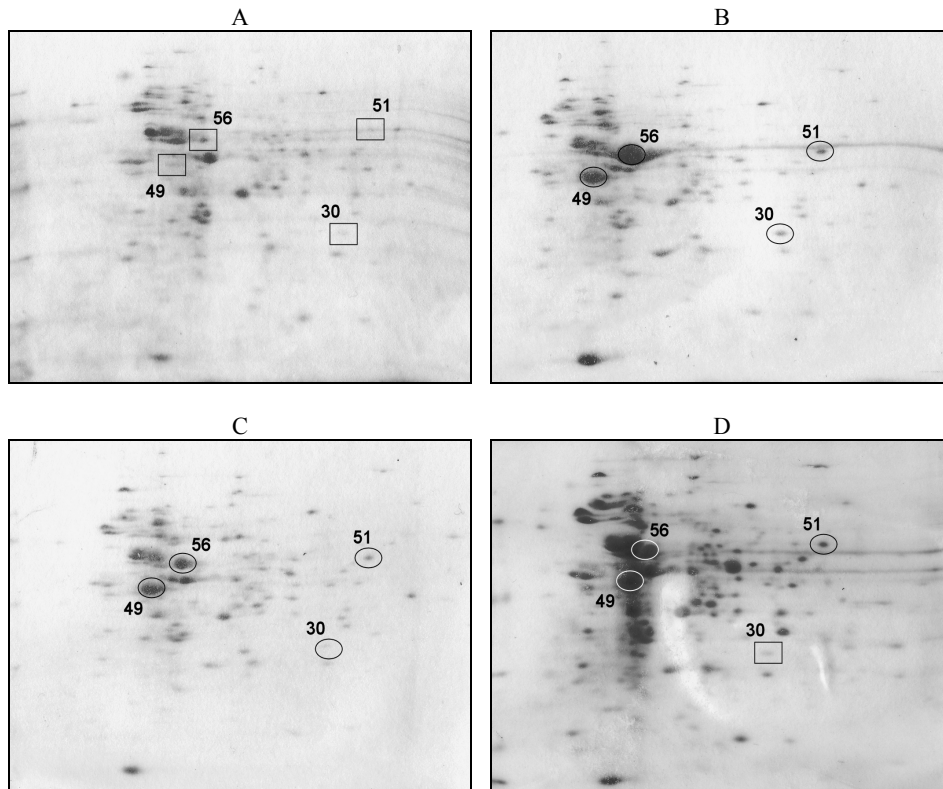
Az NI86/21 törzs a tiokarbamátok metabolizmusa során N-dealkilált és hidroxilált metabolitokat is termel. A GC-MS vizsgálataink N-depropil EPTC-t és β -hidroxipropil vernolátot mutattak ki (NAGY et al., 1995b,c) mint fő bomlástermékeket, de nyomokban EPTC-szulfoxid, és dipropilamin is megtalálható volt. Ezek az eredmények azt tükrözik, hogy az NI86/21 törzsben mind a két – rodokokkusokban megtalálható – tiokarbamát anyagcsere folyamat működik.

A *R. erythropolis* NI86/21 törzs tiokarbamát-bontó enzimei

Az EPTC bomlástermékeinek vizsgálata után az EPTC lebontását katalizáló géntermékek azonosítását tekintettük alapvető feladatunknak. Ebben a munkánkban egy ma már rutinszerűen használt módszert, a proteom analízist választottuk első lépésnek. Az alapsóoldatban EPTC-én és ecetsavon szaporodó *R. erythropolis* NI86/21 sejtekből kivont fehérjéket kétdimenziós poliakrilamid-gélelektroforézis technikával választottuk szét és azt figyeltük meg, hogy az ecetsavon szaporodó sejtekhez képest mely proteinek szintje emelkedett meg az EPTC-én tenyésztett sejtekben. E módszerrel négy proteint sikerült kimutatni, melyek molekulatömege 56, 51, 49 és 30 kDa volt. Ezek közül kettő (56 és 49 kDa) az EPTC-én és butilátion növekvő sejt legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjéje volt (1B. és 1C. ábra). Mind a négy fehérjét izoláltuk és N-terminális aminosav sorrendjüket Edmann-degradációval meghatároztuk (NAGY et al., 1995b).

A kapott eredmények alapján degenerált oligomereket szintetizáltattunk. Ezeket P³⁴-gyel, vagy digoxigeninnel jelöltük és Southern-hibridizációs kísérletekben a különböző restriktív endonukleázokkal emésztett és agaróz gélben elválasztott *R. erythropolis* NI86/21 DNS-hez hibridizáltuk. Ezek alapján kiválasztottuk a megfelelő nagyságú (4 – 10 kb) DNS szakaszt, melyek az EPTC-bontásért felelős gént is tartalmazták, és *E. coli*-ban – pUC18 vektor segítségével – klónoztuk őket. E mini génekönyvtárból egy második hibridizációval kiválasztottuk a pozitív klónokat, majd meghatároztuk az inszert DNS szekvenciáját. A nagyobb méretű DNS darabokat (14–23 kb) LambdaT4 fágban klónoztuk, és fág hibridizációs kísérletekben kiválasztottuk a pozitív klónokat. Ezekből alkönyvtárat készítettünk pUC18 plazmidban és meghatároztuk a DNS szekvenciákat. Ezeket a BLAST program segítségével azonosítottuk. Azonosítottunk azokat a gént/szekvenciákat tekintettük, amelyeknél a transzláció során kapott aminosav szekvencia teljesen megegyezett az Edmann-degradációval kapott N-terminális aminosav sorrenddel.

Az 56 kDa nagyságú fehérje NAD⁺-függő aldehid dehidrogenáznak bizonyult, s számított molekulatömege 54,863 kDa-nak adódott. A legnagyobb aminosav-szekvencia hasonlóságot az *Alcaligenes eutrophus* (PRIEFERT et al., 1992) és a *Vibrio cholerae* (PARSOT & MEKALANOS, 1991) aldehid dehidrogenázaival mutatta, az azonosítás 73, ill. 60% volt. Ezek az enzimek az acetaldehidet alakítják át ecetsavvá. Az *A. eutrophus* enzim az acetoin etilalkohollá történő átalakításában játszik szerepet, míg a



1. ábra

A különböző szénforrásokon (A. ecetsav, B. EPTC, C. butilát, D. atrazin) tenyésztett *R. erythropolis* NI86/21 törzs kétdimenziós poliakrilamid elektroforetogramjának (2D-PAGE) fehérje analízise. Az 56 kD (ThcA), 51 kD (ThcF), 49 kD (ThcB) és 30 kD (ThcE) fehérjék jelenlétét ovális, a hiányukat négyyszög jelzi. A tiokarbamát és atrazin herbicideken tenyésztett sejtekben az 56 kD és 49 kD fehérjék domináns jellege feltűnő

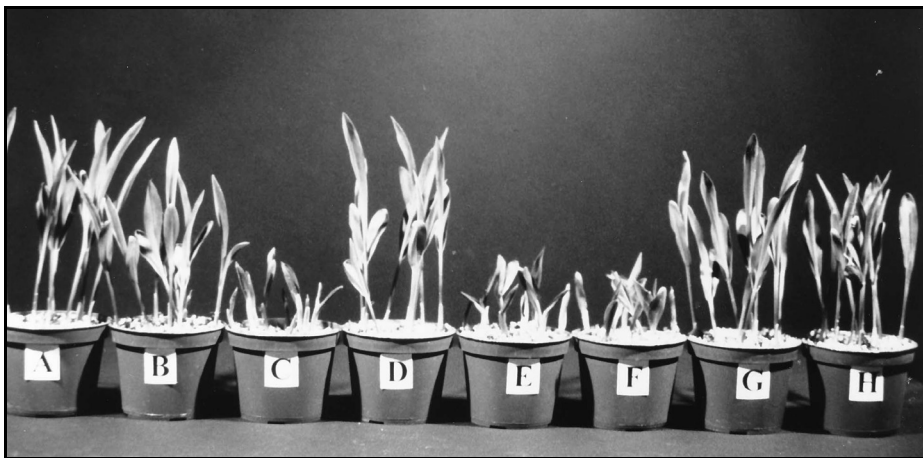
V. cholerae metabolikus funkciójáról keveset tudunk. A ThcA enzim hosszú szénláncú alifás aldehideken a legaktívabb (a formaldehidet nem képes konvertálni), és enzim specifikusában az *Amycolatopsis methanolica* aldehyd dehidrogenázához hasonlít legjobban (NAGY et al., 1995b).

Azzal is foglalkoztunk, hogy a *thcA* gén szomszédságában vannak-e EPTC által indukálható fehérje szekvenciák. Mivel az azonosított proteinek szekvenciája közül egyiket sem találtuk meg a *thcA* gén közelében, vizsgálatainkat más klónok analízisére irányítottuk. Ezek közül elsőként a LambdaFAJ2028 jelű fág szekvenciáját határoztuk meg. Ezen a klónon be tudtuk azonosítani a 49 kDa nagyságú fehérjét kódoló gént, melynek analízise egy új típusú citokróm P450-t (ThcB) mutatott ki. A bakterialis CYP450 enzimek szekvenciájának összehasonlító analízise azt is bizonyította, hogy enzimünk az új *CYP116* család első tagja (NAGY et al., 1995b).

A különböző rodokokkusz fajokból származó DNS-DNS hibridizációs kísérleteink kimutatták, hogy a *thcA* gén mindegyik vizsgált rodokokkusz törzsben, a *thcB* gén vi-

szont csak az NI86/21 törzsből van jelen. Ezért feltételeztük, hogy a ThcA enzim az EPTC bontás közbense – a ThcB által indukált – termékeit bontja tovább. A ThcB enzim lényegi szerepét az EPTC lebontásban úgy igazoltuk, hogy az EPTC lebontásában valószínűsíthetően szerepet játszó génekkel transzformáltuk az EPTC-t nem bontó és bioantidótum hatással nem rendelkező *R. erythropolis* SQ1 törzset. Az SQ1 transzformánsok bioantidótum hatását EPTC-vel kezelt talajba vetett kukoricánövényen tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy csak az a klón, mely a teljes *thcB* operont (*thcB*), rhodocoxin (*thcC*) és rhodocoxin redukáz (*thcD*) tartalmazta (pFAJ2309) volt képes megvédeni a kukoricánövényeket az EPTC fitotoxikus hatásától (2. ábra). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy e törzs EPTC (100 mg·l⁻¹) bontása igen lassú (12 nap) volt az NI86/21 törzshöz (2 nap) viszonyítva. Ez a lassú folyamat az alacsony ThcB szintnek (9,7 pmol·mg⁻¹ proteintartalom) köszönhető, ami 18-ad része volt az NI86/21-ben találhatóak.

Azok a transzformánsok, melyek nem tartalmazták a *thcB* gént hatástalanok voltak, csakúgy mint a *thcB* gén, ha a *thcC* és *thcD* gének nem voltak a plazmidon. Ez azt jelzi, hogy a *thcC* és *thcD* gének lényegi szerepet játszanak egy jól működő elektrontranszferlánc kialakításában, a redox rendszer regenerálódását biztosítva. Egy másik kísérletben az EPTC mínusz NI86/21 mutánsba (FAJ2027) csak a *thcB* gént tartalmazó plazmidot vittük be (pFAJ2350), és ez egymagában visszaállította az EPTC bontó hatást (2. ábra). Ez arra bizonyíték, hogy a mutáció e törzs esetében a *thcB* génben történt, és a rhodocoxin-rhodocoxin redukáz rendszer érintetlen maradt.



2. ábra

Különböző *Rhodococcus* törzsek bioantidótum hatása EPTC-vel kezelt kukoricánövényeken. A kezelések sorrendje: A. Kezeletlen kontroll. B. Alirox 80 EC (EPTC 72% + 8% AD-67 kémiai antidótum). C. EPTC antidótum nélkül (Witox 72 EC). D. *R. erythropolis* NI86/21 oltás. E. *R. erythropolis* SQ1. F. EPTC-negatív mutáns NI86/21 törzs (FAJ2027). G. A pFAJ2309 plazmiddal transzformált *R. erythropolis* SQ1. H. A pFAJ2350 plazmiddal transzformált FAJ2027 törzs. Az eredményeket az EPTC jelenlétében növekvő kukoricánövényen (C), a vetéstől számított tizedik napon értékeltük (NAGY et al., 1995b). A plazmidok a következő géneket hordozták: pFAJ2350 (*thcB*), pFAJ2309 (*thcBCD*)

Elmondhatjuk tehát, hogy a *R. erythropolis* NI86/21 I. típusba tartozó CYP450 enzim a hozzá tartozó redox rendszerrel együtt egy működő elektrontranszfer-láncot alkot, mely az EPTC lebontását specifikusan katalizálja. Az általános sémát (NADH–FAD reduktáz–Fe/S redoxin–P450–szubsztrát) követve, esetünkben az elektronok a NADH–ThcD–ThcC–ThcB–EPTC irányba vándorolnak. Az enzimhasítás következményeként depropil-EPTC és propionaldehid keletkezik. Ez utóbbit az aldehid dehidrogenáz enzim (ThcA) alakítja tovább a megfelelő savvá, mely aztán belép a központi anyagcsereútba. Nagy valószínűséggel a depropil-EPTC is tovább bomlik, minthogy az NI86/21 törzs nitrogénmentes táptalajon is képes szaporodni EPTC-n, ami a vegyület mineralizálódását jelenti.

A harmadik EPTC által indukált fehérje (30 kD), melyet proteom analízissel és az azt követő szekvencia meghatározással azonosítottunk, egy haloperoxidáznak bizonyult, és 71% aminosav homológiát mutatott a *Pseudomonas pyrrocinia* kloroperoxidázával (WOLFFRAMM et al., 1993) és a ThcF triviális nevet kapta. A poliklonális antitest – melyet *P. pyrrocinia* kloroperoxidáz ellen termeltettek – keresztreakciót adott a ThcF-fel, ezzel is alátámasztva a hasonlóságot. Későbbi kutatások kimutatták, hogy a ThcF a többi kofaktor nélküli haloperoxidázzal szemben indukálható, és az eredeti hipotézis, hogy a bakteriális haloperoxidázok halogénezett vegyületek szintézisében játszanak szerepet megváltozott, így a haloperoxidáz elnevezés nem helytálló. Katalitikus aktivitásuk az „SDH” katalitikus triádon alapszik, mely a szerin-hidrolázokra jellemző, ezért e családba történő besorolásuk megalapozott. A szerin-hidrolázok családjába észterázok, proteázok, lipázok és hidrolázok tartoznak, és jellemző rájuk az α/β hidroláz szerkezet. A ThcF génterméknek mind hidroláz, mind észteráz aktivitását kimutattuk, mely aktivitásokat hidroláz inhibitorokkal sikerült blokkolni, ami az „SDH” katalitikus triád aktivitására utal. E tulajdonságok alapján a ThcF-t az első hidroláz/észteráz aktivitással rendelkező haloperoxidáznak tekinthetjük a mikolinsavat termelő aktinomicétáknál (DESCHRIJVER et al., 1997).

A rekombináns ThcF enzim aktivitását tiokarbamátokon is megvizsgálták és megállapították, hogy a ThcF H_2O_2 - és acetátionok jelenlétében a tiokarbamátokat oxidálják és tiokarbamát-szulfoxidokat termelnek (DESCHRIJVER et al., 1997; DE MOT et al., 2003). Más szerin-hidrolázok esetében is leírták, hogy természetes hidrolitikus hatásuk mellett képesek hidrogén-peroxidot használni perhidrolitikus reakciók kivitelezésére. Valószínű, hogy a ThcF is hasonló reakciót katalizál tiokarbamátok esetében, bár azt még nem tisztáztuk, hogy az NI86/21 sejtekben a ThcF vagy a ThcB felelős az EPTC-szulfoxid szintetizálásáért, minthogy elvileg mindkét enzim képes a reakció kivitelezésére.

A negyedik tiokarbamátokkal indukálható fehérje génjét is klónoztuk és jellemeztük, és a fehérje a ThcE jelzést kapta. A rekombináns fehérje inaktív, szerkezet nélküli formában termelődött, ezért enzimaktivitását nem sikerült meghatározni. Megállapítottuk viszont, hogy expressziója a tiokarbamátokon kívül atrazinnal, etanollal, propanollal, propionaldehiddel és etanolaminnal is indukálható az NI86/21 sejtekben. Aminosav szekvenciája nagy hasonlóságot mutat az *Amycolatopsis methanolica* homodekamer negyedleges szerkezetű, N,N'-dimetil-4-nitrozoanilin-függő alkohol reduktázával (MNO) (NAGY et al., 1995c). Az enzim funkciójáról pontos adatokkal nem szolgálhatunk, azt viszont joggal feltételezhetjük, hogy nem az EPTC-lebontás első lépéseit katalizálja, hanem valamely egyszerűbb bomlástermékét, mivel propionaldehiddel (az EPTC egyik bomlástermékével) is indukálható az expressziója.

A ThcF fehérjének egy más jellegű, de a mezőgazdasággal összefüggő szerepéről is be kell számolnunk. Először a *Pseudomonas pyrocinia* kloroperoxidázról (CPO-P) mutatták ki, hogy H₂O₂ felhasználásával az alkil savakat a megfelelő peroxidokká oxidálja. E peroxidok potenciális gombaölő szerek, mint azt a perecetsav esetében sikerült bizonyítani. Azt, hogy az enzim meg tudja-e védeni a növényt gombapatogénekkal szemben úgy vizsgálták, hogy a *cpo-P* génnel (JACKS et al., 2000) dohánynövényt transzformáltak. Eredményül azt kapták, hogy a genetikailag módosított dohány rezisztens lett az *Aspergillus flavus* ellen, és ez a hatás nem az enzim peroxidáz, hanem hidroláz aktivitásával volt összefüggésben. A *R. erythropolis* NI86/21 *thcF* génjének hatását (SELS, 2003) és (VELGHE, 2004) vizsgálták *Arabidopsis thaliana* növényben. A növény sikeres transzformálása után megállapították, hogy a növény levelének kivonata erőteljesebb gombaölő hatást mutat *Fusarium culmorum* ellen, mint a kontrollnövény. Azt is megállapították, hogy e hatásért nem valamilyen fehérje, hanem egy máig azonosítatlan vegyület a felelős. Ennek a vegyületnek az azonosítása és további vizsgálata szükséges ahhoz, hogy stabilitását, valamint szintetikus formájának gyakorlati alkalmazási lehetőségeit megállapíthassuk.

A *R. erythropolis* NI86/21 törzs atrazin metabolizmusa

Munkánk során tanulmányoztuk azt is, hogy a tiokarbamát-bontó gének/enzimek szerepet játszanak-e más herbicidek lebontásában is? E kísérletekben az atrazinra összpontosítottunk, mivel a *Rhodococcus* sp. TE1 törzsről leírták, hogy nemcsak az EPTC-t, hanem az atrazint is képes N-dealkilezni (BEHKI et al., 1993). Az NI86/21 törzs atrazin metabolizmusát különböző feltételek mellett vizsgáltuk. Alapsóoldatba 55 µg·ml⁻¹ atrazint oldottunk be és 30 °C-on, rázatott kultúrákban inkubáltuk a mikrobát. Az atrazinlebontást gázkromatográfiás szermaradvány vizsgálattal, 24 órás időközönként, 96 óráig követtük. Néhány kísérletben az alapsóoldatból az ammónium-nitrát N-forrást kihagytuk, vagy extra szénforrásként 1 g·liter⁻¹ fruktózt adtunk. A legtöbb kísérletben nagy sejtkoncentrációt (20 g·liter⁻¹) alkalmaztunk, de megvizsgáltuk 30-szoros sejtszám hígítású kultúrák (OD₆₀₀ 0.19) atrazin lebontását is. A kontrollkísérletekben az atrazinszint nem változott, ezzel szemben az NI86/21 törzs az atrazint 96 óra alatt eltüntette a tápoldatból. A nitrogénforrás megvonása felgyorsította a vegyület lebontását (48 h), de még ennél is intenzívebb hatást mértünk, ha extra szénforrást juttattunk a tápoldatba. Ebben az esetben a 0,19 OD₆₀₀ sejtkoncentrációjú kultúra is 96 óra alatt lebontotta az atrazint (NAGY et al., 1995a) (2. táblázat I. sor)

Megállapítást nyert az is, hogy három bomlástermék a de-izopropilatratin, a de-etilatratin, és a hidroxizopropilatratin halmozódik fel a táptalajban. Ezek a végtermékek tovább nem voltak bonthatók az NI86/21 törzs által, deklórozott termék nem keletkezett és a triazin gyűrű hasítása sem történt meg. Bár az NI86/21 törzs nem tudja az atrazint teljes mértékben lebontani, a végtermékek szubsztrátként szolgálnak más mikroorganizmusok számára, melyek teljessé teszik a lebontást. A *R. erythropolis* NI86/21 atrazin metabolizmusának folyamatát más mikrobiális atrazinlebontási utakkal együtt a http://umbbd.ahc.umn.edu/atr/atr_map.html web oldalon lehet megtekinteni.

2. táblázat

A *R. erythropolis* NI86/21 törzs atrazinbontása és a tiokarbamát-bontó génekkel transzformált FAJ2027 (mutáns NI86/21) és a *R. erythropolis* SQ1 törzsek atrazinbontása alapsóoldatban (NAGY et al., 1995a)

Törzs	Tápanyag ^a	Atrazinmaradvány (%) ^b az idő függvényében:			
		24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
I. NI86/21	BSM	48,0	18,0	11,0	10,0
	BSM (-N)	60,0	23,0	4,0	0,0
	BSM (+C)	11,0	0,0	ND ^c	ND
	BSM (+C) ^d	43,0	14,0	ND	10
II. FAJ2027(pFAJ2350)	BSM	ND	63,0	ND	40,0
III. FAJ2027(pFAJ2308)	BSM	ND	20,0	ND	7,0
	BSM (+C) ^d	42,0	10,0	0,0	ND
IV. SQ1(pFAJ2309)	BSM (+C)	100,0	86,0	69,0	64,0

Megjegyzés: ^a BSM, basal salt medium (alapsóoldat); BSM (-N): BSM ammónium-nitrát nélkül; BSM (+C): BSM + 1g·liter⁻¹ fruktóz; ^b Az értékek három párhuzamos minta átlagai. A kezdeti atrazinkoncentráció 230 µmol volt. ^c ND, nem meghatározott érték. ^d Az eredeti sejtszámot (20 g·liter⁻¹) harmincszorosára (OD₆₀₀ 0,19) hígítottuk, az atrazinkoncentráció 135 µM volt. A plazmidok a következő géneket hordozták: pFAJ2350 (*thcB*); pFAJ2308 (*thcBCD+orf5*), pFAJ2309 (*thcBCD*)

A *R. erythropolis* NI86/21 törzs atrazinbontó enzimei

Az atrazinon tenyésztett NI86/21 törzsből izolált fehérjemintát kétdimenziós proteom analízissel elemeztük, és megállapítottuk, hogy a ThcA, ThcB, és ThcE proteinek nagy mennyiségben termelődtek, csakúgy, mint az EPTC-én tenyésztett sejtekben, viszont a ThcF nem termelődött (1D. ábra). Megvizsgáltuk az EPTC-t nem bontó mutáns törzs (FAJ2027) atrazinlebontó képességét is és azt találtuk, hogy az SQ1 törzshöz hasonlóan ez sem képes az atrazin bontására. Az EPTC-bontásért felelős *thcB*, *thcC*, és *thcD* gének bejuttatása ugyanakkor alkalmassá tette mindkét törzset az atrazin degradációjára, de a transzformált SQ1 törzs esetében ez a folyamat sokkal lassabb volt (2. táblázat II., III és IV. sorok) (NAGY et al., 1995a). E kísérletsorozat eredményeivel bizonyítottuk, hogy mind a tiokarbamátok, mind az atrazin lebontásáért (a *thcF* kivételével) ugyanazok a gének felelősek.

Eddigi ismereteink alapján a tiokarbamátok lebontását főleg *Rhodococcus* fajok katalizálják, a triazinok lebontására viszont mikrobiális közösségek és tiszta kultúrák is képesek. Jellemző, hogy a tiokarbamát-bontó *Rhodococcus* fajok triazinokat is tudnak bontani, bár sok esetben a bontás csak részleges (DE SCHRIJVER & DE MOT, 1999). Az atrazin lebontásában a két leghatékonyabb mikrobának a *Pseudomonas* sp. és a *Ralstonia brasiliensis* M91-3 bizonyult, mely baktériumok a molekulát teljesen mineralizálják (MANDELBAUM et al., 1995; STAMPER et al., 2002). Ennek ellenére a hosszú távú bioremediációs kísérletekben a *R. erythropolis* NI86/21 törzset kezdték el vizsgálni (VANCOV et al., 2005), mert a törzsnek olyan hasznos tulajdonságai vannak (pl. ellenálló sejtfal, túlélés extrém környezeti feltételek mellett), melyek sokkal előnyösebbé teszik alkalmazását. Kísérleteikben új módon kapszulázott NI86/21 sejteket hasz-

náltak, és bebizonyították, hogy az élő sejtek lassan, folyamatosan, hosszú időn keresztül szabadulnak ki a talajba vagy a felszíni vizekbe és ezáltal képesek a kis mennyiségben jelen lévő gyomirtószer-maradványokat is lebontani. Ennek eredményeként az atrazin nemkívánatos környezeti hatásai – melyek engedélyeztetését veszélyeztetik – a minimumra csökkenthetők.

Összefoglalás

A *Rhodococcus* fajok változatos metabolikus képességeik, robosztus sejtfelépítésük, és hidegtűrésük révén meghatározó környezetvédelmi, ipari és biotechnológiai objektumokká kezdenek válni. Kiemelkedő szerepük van az aromás szénhidrogének, klórozott fenolok, szterolok, peszticidok, valamint a lignin, a kőszén, és a nyersolaj atalakításában, lebontásában. E különleges szubsztrátok átalakításában az oxigenáz (CYP450), dioxygenáz, dehidrogenáz, hidroxiláz, hidroláz, dehalogenáz stb. enzimek nagy mennyiségben és variációban történő előfordulása játszik lényegi szerepet, de nem elhanyagolható a rodokokkuszok rendkívüli oldószer-toleranciája, és az egy sejten belül megsokszorozódott gének ko-regulációjának, és néhány természetes emulgeátor szintézisének a képessége sem.

Jelen közleményben a *R. erythropolis* NI86/21 talajbaktérium mezőgazdasági biotechnológia/mikrobiológia tárgyú kutatásainkat foglaltam össze. Ezek közül három téma mutatkozik a gyakorlatban is hasznosíthatónak. A bioantidótum és az ehhez rokon fitoremediációs eljárások a peszticidok és az ipari szennyező anyagok által okozott környezeti terhelést csökkentik. A másik ígéretes terület a *R. erythropolis* NI86/21 *thcF* génjével transzformált *Arabidopsis thaliana* növényben termelt természetes fungicid tanulmányozása, mely azt hivatott eldönteni, hogy e (máig azonosítatlan) vegyületnek van-e létjogosultsága a mezőgazdasági gyakorlatban. A harmadik, inkább ipari/bioremediációs jellegű kutatási irány a rodokokkuszok kapszulázása és felhasználása olyan szennyezett talajok és felszíni vizek tisztítására, ahol a szennyező anyagok kis koncentrációban, de folyamatosan kerülnek a környezetbe, és ennek megfelelően arra van szükség, hogy a rodokokkusz sejtek állandóan jelen legyenek a biotópban.

Irodalom

- ANKUMAH, R. O. et al., 1995. Metabolism of carbamothioate herbicide, EPTC, by *Rhodococcus* strain JE1 isolated from soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **59**. 1071–1077.
- BEHKI, R. M. & KHAN, S. U., 1990. Degradation of [1-C-14-propyl]EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) by a soil bacterial isolate. *Chemosphere*. **21**. 1457–1463.
- BEHKI, R. M. et al., 1993. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**. 1955–1959.
- BIRÓ, B. & KECSKÉS, M., 1984. Herbicide sensitivity of *Coronilla Rhizobium* and *Pseudomonas* rhizobacterium strains. *Acta Microbiol. Hung.* **31**. 302–303.
- DE MOT, R. et al., 2003. The thiocarbamate-inducible *Rhodococcus* enzyme ThcF as a member of the family of alpha/beta hydrolases with haloperoxidative side activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**. 197–203.
- DE SCHRIJVER, A. & DE MOT, R., 1999. Degradation of pesticides by actinomycetes. *Crit. Rev. Microbiol.* **25**. 85–119.

- DE SCHRIJVER, A. et al., 1997. Thiocarbamate herbicide-inducible nonheme haloperoxidase of *Rhodococcus erythropolis* NI86/21. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**. 1911–1916.
- GRAY, R. A. & WEIERICH, A. J., 1968. Behavior and persistence of thiocarbamate herbicides in soils under different environmental conditions. *Proc. 9th Brit. Weed Control Conference*. 94–101. British Crop Production Council. Brighton.
- JACKS, T. J. et al., 2000. Antifungal and peroxidative activities of nonheme chloroperoxidase in relation to transgenic plant protection. *J. Agric. Food Chem.* **48**. 4561–4564.
- KÁTAL, J., 1997. The effect of herbicides on the abundance and activity of microbes in the soil. In: *Soil Pollution*. (Ed.: FILEP, GY.) 159–167. Rexpo Ltd. Debrecen.
- KECSKÉS M., 1976. Mikroorganizmusok, magasabbrendű növények és xenobiotikumok közötti kölcsönhatások értékelése. Akadémiai doktori értekezés és tézisei. Budapest.
- KWON, Y. D. et al., 2004. Crystal structures of the *Rhodococcus* proteasome with and without its pro-peptides: Implications for the role of the pro-peptide in proteasome assembly. *J. Mol. Biol.* **335**. 233–245.
- MANDELBAUM, R. T. et al., 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the S-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**. 1451–1457.
- MITANI, Y. et al., 2006. Gene expression analysis using a modified HiCEP method applicable to prokaryotes: A study of the response of *Rhodococcus* to isoniazid and ethambutol. *J. Biotechnol.* **123**. 259–272.
- NAGY I., 1989. Extenderek, tiokarbamát herbicidek, mikroorganizmusok és növények közötti kölcsönhatások. Kandidátusi értekezés. Gödöllői Agrártudományi Egyetem. Gödöllő.
- NAGY, I. et al., 1987a. Decomposition of EPTC by soil microbes in two soils. In: *Proc. British Plant Protection Conference, Brighton – Weeds*. **I**. 525–530. Lavenham Press Ltd. Lavenham, UK.
- NAGY, I. et al., 1987b. Process for preparation and use of antidote carrying micro- and macro-organisms, useful for covering the cultivated plant-damaging effect of thiocarbamates and chloroacetanilides. North Hungarian Chemical Works. Hungarian Patent 202058.
- NAGY, I. et al., 1995a. A single cytochrome-P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**. 2056–2060.
- NAGY, I. et al., 1995b. Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl dipropyl-carbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome-P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **177**. 676–687.
- NAGY, I. et al., 1995c. Characterization of the *Rhodococcus* sp. NI86/21 gene encoding alcohol - N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase inducible by atrazine and thiocarbamate herbicides. *Arch. Microbiol.* **163**. 439–446.
- OBRIGAWITCH, T. et al., 1982. The influence of temperature, moisture, and prior EPTC application on the degradation of EPTC in soils. *Weed Science*. **30**. 175–181.
- PARSOT, C. & MEKALANOS, J. J., 1991. Expression of the *Vibrio cholerae* gene encoding aldehyde dehydrogenase is under control of *toxR*, the cholera-toxin transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **173**. 2842–2851.
- PHILLIPS, M. & MCDUGALL, J., 1993. Carbamate herbicides. In: Wood-McKenzie Report. Part 1. Wood Mackenzie Consultants Ltd. Edinburgh.
- PRIEFERT, H. et al., 1992. Identification and molecular characterization of the gene coding for acetaldehyde dehydrogenase-Ii (Acod) of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **174**. 899–907.
- RAHMAN, A. et al., 1979. Eradicane causes problems. *New Zealand Journal of Agriculture* **139**. 47–49.
- SELS, J., 2003. Studie van de activiteit in *Arabidopsis thaliana* planten getransformeerd met een bacterieel esterase-gen, Katholieke Universiteit Leuven. Belgium.
- STAMPER, D. M. et al., 2002. *Ralstonia basilensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using S-triazines as nitrogen sources. *Can. J. Microbiol.* **48**. 1089–1098.

- TAMURA, T. et al., 1995. The first characterization of a eubacterial proteasome – the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr. Biol.* **5**. 766–774.
- VANCOV, T. et al., 2005. Atrazine degradation by encapsulated *Rhodococcus erythropolis* NI86/21. *J. Appl. Microbiol.* **99**. 767–775.
- VELGHE, I., 2004. Karakterisatie van de antifungale componenten uit *Arabidopsis thaliana*-planten getransformeerd met een bacterieel esterase-gen, Katholieke Universiteit. Leuven.
- WARE, G. W., 1994. *The Pesticide Book*. 4th ed. Thomaspublications. California.
- WOLFFRAMM, C. et al., 1993. Chloroperoxidase encoding gene from *Pseudomonas pyrrocinia* – Sequence, expression in heterologous hosts, and purification of the enzyme. *Gene*. **130**. 131–135.
- ZUHL, F. et al., 1997. Subunit topology of the *Rhodococcus* proteasome. *FEBS Lett.* **400**. 83–90.

Érkezett: 2006. szeptember 6.

NAGY ISTVÁN

Max-Planck Biokémiai Intézet, Martinsried
Németország