

Grażyna Dąbrowska, Katarzyna Hrynkiewicz, Katarzyna Janczak, Marta Żurańska

Zastosowanie zmodyfikowanych bakterii glebowych do poprawy skuteczności fitoremediacji środowiska zanieczyszczonego jonami metali śladowych

Niektóre pierwiastki śladowe, np. miedź i cynk, należą do grupy mikroelementów, które w niewielkich ilościach są niezbędne w wielu procesach fizjologicznych zachodzących w roślinach. Jednakże większa zawartość tych pierwiastków w środowisku może mieć toksyczne działanie na organizmy żywe. Inne metale śladowe, np. kadm, ołów czy rtęć, które nie uczestniczą w procesach fizjologicznych, mogą być toksyczne i zaburzać prawidłową gospodarkę już w bardzo małych ilościach. Dlatego też rośliny oraz inne organizmy wytworzyły w wyniku ewolucji szereg mechanizmów, które kontrolują i odpowiadają za pobieranie i akumulację zarówno tych istotnych do życia, jak i zbędnych pierwiastków śladowych. Do mechanizmów tych zalicza się chelatację i sekwestrację metali przez określone ligandy [1]. U roślin wiązanie jonów metali odbywa się między innymi z udziałem fitochelatyn i metalotionein (MT) [2]. Obecność sekwencji homologicznych do MT wykazano także u organizmów prokariotycznych, np. bakterii *Pseudomonas putida* czy *Mycobacterium tuberculosis* i cyjanobakterii [3, 4].

Metalotioneiny należą do rodziny białek niskocząsteczkowych, a ich sekwencje aminokwasowe bogate są w reszty cysteinowe. MT stanowią podstawę mechanizmu utrzymania homeostazy cynku i miedzi, a także detoksyfikacji jonów metali śladowych, takich jak ołów, nikiel, kadm i innych [1, 2]. Poziom transkryptów MT, w tym metalotioneiny typu 2 *Brassica napus* L. (*BnMT2*), jest uzależniony od wielu czynników abiotycznych, np. jonów cynku i kadmu [5] oraz biotycznych, np. obecności bakterii ryzosferowych [6] czy grzybów mikoryzowych [7]. Metalotioneiny u roślin ulegają zróżnicowanej ekspresji w zależności od organu [8], co znajduje swoje odzwierciedlenie w bogactwie elementów *cis*-regulatorowych obecnych w sekwencjach promotorowych genów MT roślinnych [9]. Wcześniejsze badania wykazały zdolność *BnMT2* do nadawania oporności komórkom bakteryjnym *Escherichia coli* [10] lub drożdżowym *Saccharomyces cerevisiae* [11] na zwiększoną zawartość pierwiastków śladowych w podłożu. Bakterie glebowe należące do grupy PGPR (plant growth-promoting

rhizobacteria) mają wiele specyficznych właściwości fizjologicznych, takich jak wiązanie azotu atmosferycznego, rozpuszczanie substancji mineralnych, synteza fitohormonów i sideroforów oraz transformacja związków pokarmowych, dzięki którym stymulują wzrost roślin. Niektóre z nich charakteryzują się również wysoką opornością na metale śladowe [12], skutkiem czego ich obecność w środowisku glebowym może niwelować niekorzystne warunki środowiska naturalnego [13, 14]. Wiele badań wykazało, że rośliny hiperakumulujące, do których zaliczany jest rzepak, dzięki bakteriom PGPR akumulują większe ilości pierwiastków śladowych [5, 15]. Ponadto obecność w podłożu bakterii PGPR stymuluje kiełkowanie i wzrost rzepaku w obecności metali śladowych [16].

Celem pracy była ocena wrażliwości bakterii PGPR na obecność pierwiastków śladowych w podłożu oraz uzyskanie zmodyfikowanych szczepów bakterii PGPR, zdolnych do wzrostu w warunkach zwiększonej ilości jonów ołowiu i kadmu w środowisku. Bakterie te mogą znaleźć zastosowanie w technologiach umożliwiających poprawę wydajności procesu fitoremediacji.

Materiał i metody

W doświadczeniach wykorzystano następujące szczepy bakterii: *Bacillus* sp., *Bacteroidetes bacterium*, *Flavobacterium* sp., *Luteibacter rhizovicina*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp., *Serratia entomophila*, *Variovorax* sp., które wyizolowano z gleb zanieczyszczonych metalami śladowymi oraz silnie zdegradowanych [17]. Szczepy hodowano na pożywce stałej R2A (Difco) w temperaturze 25°C przez dwie doby. Bakterie glebowe do elektroporacji przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w pracy [18]. Bakteryjny plazmid ekspresyjny pET21a (Novagen), zligowany z sekwencją kodującą otwartą ramkę odczytu genu metalotioneiny typu 2 *Brassica napus* L. (*BnMT2*), wprowadzono do bakterii z użyciem elektroporatora Gene Pulser® II (Bio-Rad) (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Po transformacji do bakterii dodano 1 cm³ pożywki SOC (super optimal broth with catabolite repression) i inkubowano przez 3 h w temperaturze 25°C. Następnie komórki bakteryjne odwirowano, a osad zawieszono w 80 µl pożywki SOC, wysiano na płytce z pożywką R2A i inkubowano przez 24 h w temperaturze 25°C.

W celu sprawdzenia obecności plazmidu pET21a-*BnMT2* w bakteriach wykonano reakcję PCR. Kolonie bakteryjne uzyskane po elektroporacji przeniesiono do

Dr hab. G. Dąbrowska, mgr M. Żurańska: Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Genetyki, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń, browsk@umk.pl

Dr hab. K. Hrynkiewicz: Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Mikrobiologii, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń, hrynk@umk.pl

Mgr K. Janczak: Instytut Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 55, 87-100 Toruń, k.janczak@impib.pl

próbówek zawierających 50 µl sterylnej wody, denaturowano przez 5 min w temperaturze 95 °C i odwirowano (1 min, 12 tys. obr./min). Do reakcji PCR jako matrycę wykorzystano 5 µl cieczy nadosadowej, którą dodano do 10 µl mieszaniny PCR Master Mix (Promega) zawierającej 3,5 U polimerazy GoTaq® oraz specyficzne startery: eBnMT2-for 5'-aaagaattcatgtctgtgtggtgga-3' i eBnMT2-rev 5'-aaactcgagttacaggtgcaaggatcac-3'. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w następujących warunkach: temperatura 94 °C – 10 min (94 °C – 45 s, 55 °C – 45 s, 72 °C – 45 s) × 40 cykli, temperatura 72 °C – 10 min. Uzyskane produkty reakcji PCR sprawdzono przeprowadzając elektroforezę w 1% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny przez 40 min przy napięciu 100 V.

Do przeprowadzenia testu funkcjonalnego, szczepy bakterii (zarówno te z plazmidem pET21a-BnMT2, jak i niezmodyfikowane) hodowano w pożywce płynnej R2A przez 24 h. Uzyskane hodowle bakterii rozcieńczono do gęstości optycznej równej wartości 0,2 zmierzonej przy długości fali 600 nm przy użyciu spektrofotometru (Bio-Rad). Następnie wykonano rozcieńczenia 10-, 100-, i 1000-krotne, z których po 5 µl suspensji bakterii naniesiono na płytki z pożywką R2A zawierającą ampicynę, 250 µM CdSO₄ lub 250 µM (CH₃COO)₂Pb. Płytki z wysianymi bakteriami inkubowano przez 1 d lub 4 d w temperaturze 25 °C. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki badań

W celu uzyskania bakterii zmodyfikowanych o zwiększonej tolerancji na pierwiastki śladowe, szczepy bakteryjne transformowano plazmidem ekspresyjnym niosącym sekwencję metalotioneiny typu 2 *Brassica napus* L. (*BnMT2*). Do transformacji wybrano szczepy bakterii ryzosferowych należących do grupy PGPR, co zostało potwierdzone we wcześniejszych badaniach [17].

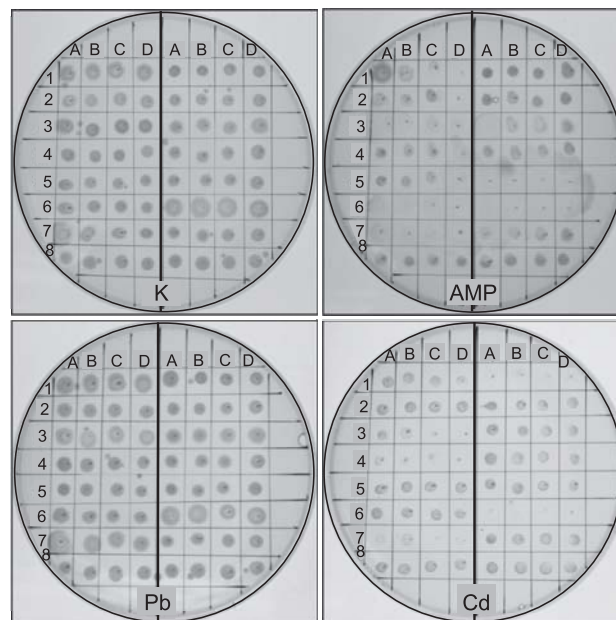
Sprawdzenie obecności plazmidu pET21a-BnMT2 w transformowanych bakteriach

W pierwszym etapie badań transformowane szczepy bakterii *Bacillus* sp., *B. bacterium*, *Flavobacterium* sp., *L. rhizovicina*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp., *S. entomophila* i *Variovorax* sp. hodowano na pożywce R2A zawierającej jony ołowiu. Po trzecim pasażu bakterie transformowane konstruktem pET21-BnMT2 pobrano i przeprowadzono reakcję PCR. Analiza potwierdziła, że wszystkie badane w doświadczeniu szczepy zawierały sekwencję wielkości około 300 pz, odpowiadającą wielkości amplifikowanego transgenu *BnMT2*, który był utrzymywany podczas kolejnych pasażów. Transformowane bakterie zostały wykorzystane do dalszych badań.

Analiza wzrostu bakterii na podłożu niezawierającym jonów pierwiastków śladowych

Transformanty uzyskane dla wszystkich analizowanych szczepów bakteryjnych hodowano na pożywce R2A i na podłożu zawierającym jony ołowiu. Wyniki wzrostu bakterii analizowano po pierwszej i czwartej dobie inkubacji (tab. 1). Stwierdzono, że wszystkie z ośmiu badanych szczepów bakteryjnych charakteryzowały się silnym wzrostem po pierwszej dobie inkubacji na pożywce stałej R2A niezawierającej jonów metali śladowych (tab. 1, rys. 1). W czwartej dobie zaobserwowano, że bakterie kontrolne (nie-transformowane) szczepu *B. bacterium* tworzyły większe

kolonie w porównaniu z bakteriami transformowanymi we wszystkich zastosowanych rozcieńczeniach. Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku bakterii *P. fluorescens*. Transformowany szczep *P. fluorescens* tworzył większe kolonie niż bakterie niezmodyfikowane. W przypadku pozostałych szczepów nie stwierdzono widocznych różnic we wzroście pomiędzy wariantami transformowanymi i nietransformowanymi (rys. 1).



Rys. 1. Bakterie PGPR po 96 h wzrostu na pożywce R2A (A – inokulacja nierozcieńczoną zawiesiną bakteryjną; B, C, D – kolejno 10-, 100-, 1000-krotne rozcieńczenia wyjściowej suspensji bakterii; szczepy bakterii: 1 – *B. bacterium*, 2 – *S. entomophila*, 3 – *Flavobacterium* sp., 4 – *L. rhizovicina*, 5 – *Pseudomonas* sp., 6 – *P. fluorescens*, 7 – *Variovorax* sp., 8 – *Bacillus* sp.; lewa strona płytki – bakterie nietransformowane, prawa strona płytki – szczepy transformowane mające sekwencję *BnMT2*)

Fig. 1. PGPR bacteria after 96 hours of growth on R2A medium (A – inoculation with undiluted bacterial suspension; B, C, D – respectively 10-, 100-, 1000-time dilutions of initial bacterial suspension; bacterial strains: 1 – *B. bacterium*, 2 – *S. entomophila*, 3 – *Flavobacterium* sp., 4 – *L. rhizovicina*, 5 – *Pseudomonas* sp., 6 – *P. fluorescens*, 7 – *Variovorax* sp., 8 – *Bacillus* sp.; left side of the plate – untransformed bacteria, right side of the plate – strains transformed with *BnMT2* sequence)

Obecność ampicyliny w pożywce powodowała zahamowanie wzrostu bakterii (tab. 1). Wysoką oporność na ampicynę wykazywał nietransformowany szczep *L. rhizovicina* oraz transformowane szczepy *B. bacterium* i *S. entomophila*. Zarówno transformowane jak i nietransformowane bakterie *Bacillus* sp. od czwartego dnia wzrostu wykazywały wysoką oporność na zastosowany w doświadczeniu antybiotyk. Nieco mniejszą oporność wykazywał transformowany szczep *L. rhizovicina* oraz niezmodyfikowany szczep *Pseudomonas* sp. Najslabszym wzrostem cechowały się nietransformowane szczepy *S. entomophila* oraz *Flavobacterium* sp., u których średni poziom wzrostu obserwowano dopiero w czwartej dobie. Nietransformowane bakterie *B. bacterium* również nie wykazywały oporności na ampicynę i jedynie szczepienie pożywki nierozcieńczoną zawiesiną bakteryjną umożliwiało ich wzrost w obecności antybiotyku. Pozostałe szczepy bakteryjne charakteryzowały się znacznie wolniejszym wzrostem, co obrazują dane zawarte w tabeli 1, a także można zaobserwować na płytkach pokazanych na rysunku 1.

Tabela 1. Wzrost bakterii na pożywce stałej niezawierającej metali śladowych (K), zawierającej ampicylinę (AMP) oraz jony metali śladowych (Cd, Pb)
 Table 1. Bacterial growth on solid medium without trace metals (K), with ampicillin (AMP) and with trace metals (Cd, Pb)

Hodowla		<i>B. b.</i>	<i>B. b.</i> MT2	<i>S. e.</i>	<i>S. e.</i> MT2	<i>F. sp.</i>	<i>F. sp.</i> MT2	<i>L. r.</i>	<i>L. r.</i> MT2	<i>P. sp.</i>	<i>P. sp.</i> MT2	<i>P. f.</i>	<i>P. f.</i> MT2	<i>V. sp.</i>	<i>V. sp.</i> MT2	<i>B. sp.</i>	<i>B. sp.</i> MT2	
K	1d	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		1000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4d	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		1000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
AMP	1d	1	+++	+++	-	+++	+	+	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+
		10	-	+++	-	+++	-	+	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+
		100	-	+++	-	+++	-	-	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
		1000	-	+++	-	+++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
	4d	1	+++	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++
		10	++	+++	++	+++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
		100	+	+++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
		1000	-	+++	-	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
Pb	1d	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		1000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4d	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		1000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
AMP-Pb	1d	1	++	+++	+	+++	+	+	++	++	++	+	+	+	+	++	++	+
		10	-	+++	+	+++	+	+	++	++	++	+	+	+	+	++	++	+
		100	-	+++	-	+++	++	+	++	++	++	+	+	+	+	++	++	+
		1000	-	+++	-	+++	-	+	++	++	++	+	+	+	+	++	++	+
	4d	1	+++	+++	++	+++	++	+	++	++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++
		10	++	+++	+	+++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++
		100	-	+++	-	+++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++
		1000	-	+++	-	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
Cd	1d	1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	++	
		10	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	
		100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4d	1	++	-	++	++	++	++	+	++	++	++	++	-	+	++	++	++
		10	++	+	++	++	+	++	-	++	++	++	++	-	+	++	++	++
		100	++	+	++	++	-	++	-	++	++	++	++	-	-	++	++	++
		1000	+	+	++	++	-	++	-	++	++	++	++	-	-	++	++	++
AMP-Cd	1d	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4d	1	++	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+

1d, 4d – pierwsza i czwarta doba wzrostu bakterii

1 – wyjściowa hodowla bakterii, 10, 100, 1000 – krotność rozcieńczenia hodowli bakterii

MT – bakterie transformowane zawierające plazmid pET21-BnMT2

wzrost bakterii na podłożach: +++ intensywny, ++ średni, + słaby, - brak wzrostu

Wzrost bakterii na podłożach z jonami metali śladowych

W kolejnym etapie badań sprawdzono wzrost bakterii w obecności antybiotyku oraz jonów ołowiu i kadmu. Wszystkie analizowane szczepy bakteryjne PGPR od pierwszego dnia hodowli odznaczały się intensywnym wzrostem w pożywce zawierającej jony ołowiu w stężeniu $250 \mu\text{M}$ (tab. 1, rys. 1). Nie stwierdzono znacznych różnic we wzroście bakterii na pożywce bez jonów metali oraz w obecności Pb^{2+} (rys. 1).

Dodanie ampicyliny do pożywki zawierającej jony ołowiu spowodowało zahamowanie wzrostu wielu badanych szczepów bakteryjnych (tab. 1). Najsilniejszym wzrostem w pożywce z jonami Pb^{2+} i antybiotykiem, po czwartym dniu inkubacji charakteryzowały się transformowane szczepy *B. bacterium* i *S. entomophila*, natomiast wzrost dzikich wariantów tych szczepów był na średnim poziomie, nawet w próbach zaszczerpionych zawiesinami bakteryjnymi o wysokim OD. Średnią tolerancję na jony ołowiu w obecności ampicyliny wykazywały od pierwszego dnia hodowli bakterie *L. rhizovicina* oraz od drugiego dnia hodowli *Flavobacterium* sp. Zaobserwowano także silniejszy wzrost szczepów kontrolnych *Pseudomonas* sp. oraz *Bacillus* sp. (bez genu metalotioneiny) w porównaniu do wariantów zawierających gen *BnMT2*. Nie zaobserwowano wpływu obecności transgenu *BnMT2* na wzrost szczepu *P. fluorescens*, który początkowo rósł słabo, jednak po czterech dniach jego wzrost był średni. W przypadku *Variovorax* sp. transformowany szczep rósł początkowo szybciej, jednak po kolejnych dniach bakterie niemodyfikowane i zmodyfikowane osiągnęły średni wzrost (tab. 1).

Obecność w podłożu jonów kadmu znacznie osłabiała wzrost bakterii w porównaniu z bakteriami rosnącymi na pożywce kontrolnej (bez jonów metali śladowych), czy w obecności jonów ołowiu (rys. 1). Po pierwszej dobie hodowli modyfikowane szczepy *Flavobacterium* sp., *L. rhizovicina*, *Pseudomonas* sp., *Variovorax* sp. i *Bacillus* sp. charakteryzowały się szybszym wzrostem w porównaniu do szczepów typu dzikiego (tab. 1). Ta różnica we wzroście była widoczna w kolejnych dniach hodowli u *Flavobacterium* sp., *L. rhizovicina* oraz *Variovorax* sp. Dla pozostałych szczepów wielkość kolonii wyrównywała się w kolejnych dniach inkubacji. Wzrost *S. entomophila* był na tym samym poziomie niezależnie od tego czy w komórkach bakteryjnych konstrukt zawierający *BnMT2* był obecny (tab. 1, rys. 1). Natomiast w przypadku *B. bacterium* oraz *P. fluorescens* stwierdzono obecność większych kolonii bakteryjnych u nietransformowanych bakterii (rys. 1). Nie stwierdzono wzrostu bakterii na pożywce zawierającej jednocześnie ampicylinę i jony kadmu (tab. 1).

Dyskusja wyników

Biologiczne metody oczyszczania gleb za pomocą mikroorganizmów (bioremediacja) oraz roślin (fitoremediacja) budzą coraz większe zainteresowanie i stanowią alternatywę dla metod fizycznych i chemicznych, które są kosztowne i wiążą się z zaburzeniem równowagi biologicznej w ekosystemach. Fitoremediacja to proces technologiczny wykorzystujący rośliny zielone do stabilizacji lub usunięcia zanieczyszczeń z gleby w drodze np. absorpcji, akumulacji i/lub detoksyfikacji, który prowadzi do rekultywacji skażonego środowiska lub do obniżenia zawartości związków toksycznych [19]. Proces ten oferuje znacznie

więcej korzyści niż konwencjonalne technologie remediacji gleb. Ponadto jest to metoda bezpieczna zarówno dla ludzi, jak i środowiska [15]. Mikroorganizmy wykorzystywane są do usuwania, redukcji, bądź przekształcania głównie zanieczyszczeń organicznych (np. rozpuszczalników, węglowodorów poliaromatycznych). W ostatnich latach podjęto próby zastosowania mikroorganizmów do usuwania zanieczyszczeń metalicznych, w tym także radioaktywnych [20].

W celu uzyskania bakterii zmodyfikowanych o zwiększonej tolerancji na pierwiastki śladowe transformowano wybrane szczepy bakteryjne plazmidem ekspresyjnym niosącym sekwencje *BnMT2* rzepaku. Ponieważ, jak wykazano wcześniej, analizowane szczepy należą do bakterii PGPR [17], naszym dalekosiężnym celem jest zastosowanie zmodyfikowanych bakterii w procesie fitoremediacji. Zakładamy, że bakterie te będą stymulowały wzrost roślin w obecności metali śladowych i umożliwią wydajne akumulowanie pierwiastków śladowych w roślinach.

Wraz z rozwojem biologii molekularnej coraz szersze zainteresowanie budzą bakterie ryzosferowe modyfikowane dzięki inżynierii genetycznej. Możliwość wykorzystania zmodyfikowanych szczepów w procesie bioremediacji do inokulacji roślin (głównie w strefie ryzosfery), wiąże się ze spełnieniem przez bakterie kilku warunków, tj. bakterie muszą zachowywać stabilność po klonowaniu, a docelowy gen powinien ulegać ekspresji na wysokim poziomie, mikroorganizmy powinny być tolerancyjne lub niewrażliwe na zanieczyszczenia i mieć możliwość przetrwania w ryzosferze roślin [12, 21]. Z badań własnych wynika, że transformowane szczepy bakterii rosnące w podłożu zawierającym jony ołowiu utrzymywały transgen *BnMT2* podczas kilku przeprowadzonych pasażów.

Oporność bakterii na metale śladowe istotnie wiąże się z ich opornością na antybiotyki. Obecność pierwiastków śladowych w środowisku, podobnie jak i antybiotyków, gwałtownie wzrasta i jest związana z postępującym rozwojem cywilizacyjnym. Związki te prowadzą do znacznych zmian w środowisku naturalnym i w efekcie mają istotny, niekorzystny wpływ na zdrowie człowieka. Oporność bakterii na pierwiastki śladowe może być kodowana w chromosomach bakteryjnych, jednakże większość genów odpowiedzialnych za wrażliwość bakterii na związki metalu śladowych) kodowana jest przez ruchome elementy genetyczne bakterii (plazmidy), które są głównym elementem decydującym o antybiotykooporności bakterii. Stąd też zrozumienie oporności mikroorganizmów na pierwiastki śladowe w naturalnych ekosystemach może pomóc w zrozumieniu oporności na antybiotyki w środowisku [22, 23]. W zaprezentowanych badaniach sprawdzono czy analizowane szczepy bakteryjne mają oporność na ampicylinę. Uzyskane wyniki wykazały, że większość badanych bakterii wykazywała oporność na zastosowany antybiotyk (tab. 1, rys. 1).

Wiele szczepów bakteryjnych zwłaszcza tych wyizolowanych z terenów zanieczyszczonych metalami śladowymi toleruje wyższe stężenia metali, w porównaniu do bakterii wyizolowanych z obszarów nieskażonych. Co więcej, po dodaniu metali, metalotolerancja w koloniach bakteryjnych zwiększa się poprzez śmierć wrażliwych gatunków i mniejsze współzawodnictwo oraz adaptację bakterii, które przetrwały. U mikroorganizmów odkryto szereg mechanizmów zwiększających tolerancję na metale śladowe, obejmują one takie procesy, jak np. aktywne usuwanie metali, biosorpcję lub bioakumulację [19].

W przeprowadzonych wcześniej badaniach [16] zaobserwowano, że bakterie *Bacillus* sp. *P. fluorescens*, *Variovorax* sp., *Flavobacterium* sp., *B. bacterium*, *S. entomophila* rosnące w podłożu płynnym są wrażliwe nawet na mniejsze niż zastosowane w tej pracy ilości jonów Cd^{2+} . W pracy [24] również stwierdzono mniejszą wrażliwość bakterii glebowych *Paenibacillus* sp. i *Bacillus thuringiensis* na miedź niż kadm. Gdy do pożywki stałej dodano ampicylinę, wzrost bakterii został niemal całkowicie zahamowany. Po jednej dobie hodowli, niewielkie kolonie tworzył jedynie niemodyfikowany szczep *B. bacterium* i tylko przy inokulacji największą ilością suspensji bakterii. Po kolejnej dobie zaobserwowano niewielki wzrost nietransformowanych szczepów *S. entomophila* i *Flavobacterium* sp. oraz modyfikowanego szczepu *P. fluorescens*. W czwartej dobie zanotowano intensywny wzrost *P. fluorescens*, który został zainokulowany największym, 1000-krotnym rozcieńczeniem wyjściowej suspensji bakterii. Ponadto szczep ten wytwarzał barwnik o żółtozielonym zabarwieniu. Po czterech dobach hodowli zaobserwowano wzrost bakterii nietransformowanych *Variovorax* sp. oraz zmodyfikowanych *Bacillus* sp. (tab. 1, rys. 1).

Podobnie jak w badaniach własnych, również autorzy pracy [25] wykazali, że obecność *MT2 Brassica juncea* umożliwił *E. coli* kilkakrotnie lepszy wzrost w pożywce zawierającej 5 mM $Cu(NO_3)_2$ i 1,5 mM $Cd(NO_3)_2$ w porównaniu ze szczepem kontrolnym. Wprowadzenie do komórek bakterii *Pseudomonas putida* genu fitochelatyny umożliwiło bakterii nabycie tolerancji na wysokie stężenia kadmu [26].

Wykorzystane w badaniach szczepy nie były wcześniej badane pod kątem obecności w ich genomach sekwencji homologicznych do metalotionein. Wprowadzenie egzogennej MT rzepaku do bakterii *Escherichia coli* pozwalało na wzrost przeżywalności bakterii w pożywce płynnej zawierającej 250 μM Cd^{2+} . Niektóre bakterie, podobnie jak i inne grupy organizmów, mają sekwencje kodujące MT. W 37 z 940 bakteryjnych genomów odnaleziono sekwencje należące do rodziny metalotionein – *bmtA* (bacterial metallothioneins with similarity to SmtA). Istnieje jednak możliwość, że u pozostałych bakterii występują białka o podobnej funkcji jednak innej sekwencji aminokwasowej [27]. Obecnie autorzy prowadzą badania, które pozwolą ustalić, czy wykorzystane do powyższych eksperymentów szczepy bakteryjne zawierają sekwencje kodujące metalotioneiny.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że jony ołowiu w stężeniu 250 μM nie hamowały wzrostu bakterii, a jony kadmu odznaczały się silnymi właściwościami toksycznymi w stosunku do badanych bakterii. Większość badanych szczepów wykazywała oporność na ampicylinę. Przeanalizowane szczepy bakteryjne okazały się najbardziej wrażliwe, gdy w pożywce zawarte były zarówno ampicylina, jak i jony kadmu. Bakterie stransformowane plazmidem pET21-*BnMT2* wykazywały wyższą tolerancję na kadm niż bakterie kontrolne.

Obecnie do zwiększenia skuteczności procesu fitoremediacji konstruowane są rośliny modyfikowane genetycznie w celu sprawnego akumulowania jonów metali śladowych. Jednocześnie wiele uwagi poświęca się badaniu interakcji pomiędzy roślinami i bakteriami PGPR występującymi w ryzosferze, jako alternatywę dla stosowania roślin

transgenicznych do usuwania z gleb zanieczyszczeń spowodowanych obecnością pierwiastków śladowych. Przeprowadzone badania umożliwiły uzyskanie bakterii PGPR o zwiększonej oporności na jony kadmu. W najbliższym czasie badania autorów skierowane będą na poznanie mechanizmów nabywania zwiększonej tolerancji przez bakterie ryzosferowe na obecność jonów kadmu w środowisku. Potencjalne wykorzystanie zmodyfikowanych szczepów w fitoremediacji daje szansę na podwyższenie aklimatyzacji roślin w niekorzystnych warunkach środowiskowych spowodowanych obecnością pierwiastków śladowych w podłożu, jak również usprawnienia tej techniki.

Praca została częściowo sfinansowana ze środków przyznanych na badania naukowe przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz zrealizowana w ramach projektu PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki (DEC-2121/07/N/N29/01608).

Autorki składają podziękowania dr Agnieszce Mierek-Adamskiej za udostępnienie plazmidu do transformacji bakterii.

LITERATURA

1. C.S. COBBETT, P. GOLDSBROUGH: Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 2002, Vol. 53, pp. 159–182.
2. V.H. HASSINEN, A.I. TERVAHAUTA, H. SCHAT, S.O. KÄRENLAMPI: Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology* 2011, Vol. 13, pp. 225–232.
3. N.J. ROBINSON: A bacterial copper metallothionein. *Nature Chemical Biology* 2008, Vol. 4, pp. 582–583.
4. C.A. BLINDAUER: Bacterial metallothioneins: Past, present, and questions for the future. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2011, Vol. 16, pp. 1011–1024.
5. K. HRYNKIEWICZ, G. DĄBROWSKA, C. BAUM, K. NIEDOJADŁO, P. LEINWEBER: Interactive and single effects of ectomycorrhiza formation and *Bacillus cereus* on metallothionein *MT1* expression and phytoextraction of Cd and Zn by willows. *Water, Air and Soil Pollution* 2012, Vol. 223, No. 3, pp. 957–968.
6. G. DĄBROWSKA, K. HRYNKIEWICZ, A. TREJGELL: Wpływ PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) na ekspresję metalotioneiny *BnMT2 Brassica napus* L. rosnącego w obecności metali ciężkich. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 2011, vol. 567, ss. 83–92.
7. G. DĄBROWSKA, K. HRYNKIEWICZ, A. TREJGELL: Do arbuscular mycorrhizal fungi affect metallothionein *MT2* expression *Brassica napus* L. roots? *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 2012, Vol. 54, No. 1, pp. 7–12.
8. G. DĄBROWSKA, A. MIEREK-ADAMSKA, A. GOC: Characteristics of *Brassica napus* L. metallothionein genes (*BnMTs*) expression in organs and during seed germination. *Australian Journal of Crop Science* 2013, Vol. 9, No. 7, pp. 1324–1332.
9. G. DĄBROWSKA, A. MIEREK-ADAMSKA, A. GOC: Plant metallothioneins: Putative functions arising from *in silico* promoter analysis. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 2012, Vol. 54, No. 2, pp. 109–120.
10. S. JIN, Y. CHENG, Q. GUAN, D. LIU, T. TAKANO, S. LIU: A metallothionein-like protein of rice (*rgMT*) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. *Biotechnology Letters* 2006, Vol. 28, pp. 1749–1753.
11. J. YANG, Y. WANG, G. LIU, C. YANG, C. LI: *Tamarix hispida* metallothionein-like *ThMT3*, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} and NaCl in transgenic yeast. *Molecular Biology Reports* 2011, Vol. 38, pp. 1567–1574.

12. X. ZHUANG, J. CHEN, H. SHIM, Z. BAI: New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* 2007, Vol. 33, pp. 406–413.
13. B. KOLWZAN: Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi (Assessment and choice of inoculants for the bioremediation of soil contaminated with petroleum products). *Ochrona Środowiska* 2008, vol. 30, nr 4, ss. 3–14.
14. B. KOLWZAN: Usuwanie zanieczyszczeń naftowych z gruntu metodą pryzmowania (Removal of petroleum products from soil by the prism method). *Ochrona Środowiska* 2009, vol. 31, nr 2, ss. 3–10.
15. X.F. SHENG, J.J. XIA, C.Y. JIANG, L.Y. HE, M. QIAN: Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution* 2008, Vol. 156, pp. 1164–1170.
16. G. DĄBROWSKA, K. HRYNKIEWICZ, K. KŁOSOWSKA, A. GOC: Selekcja bakterii ryzosferowych usprawniających procesy fitoremediacji gleb zawierających związki metali ciężkich (Selection of rhizobacteria improving phytoremediation of soil contaminated with heavy metal compounds). *Ochrona Środowiska* 2011, vol. 33, nr 2, ss. 53–58.
17. K. HRYNKIEWICZ, C. BAUM, P. LEINWEBER: Density, metabolic activity and identity of cultivable rhizosphere bacteria on *Salix viminalis* in disturbed arable and landfill soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 2010, Vol. 173, pp. 747–756.
18. J. SAMBROOK, E.F. FRITSCH, T. MANIATIS: Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
19. M. RAJKUMAR, N. AE, H. FREITAS: Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere* 2009, Vol. 77, pp. 153–160.
20. P.K. PADMAVATHIAMMA, L.Y. LI: Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air and Soil Pollution* 2007, Vol. 184, pp. 105–126.
21. D.C. YEE, J.A. MAYNARD, T.K. WOOD: Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene orthomonooxygenase constitutively. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, Vol. 64, pp. 112–118.
22. J.L. MARTINEZ: Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* 2009, Vol. 157, pp. 2893–2902.
23. J.L. MARTINEZ: Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 2008, Vol. 321, pp. 365–367.
24. I.V.N. RATHNAYAKE, M. MEGHARAJ, N. BOLAN, N. RAVI NAIDU: Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 2009, Vol. 53, pp. 1185–1189.
25. A. ZHIGANG, L. CUIJIE, Z. YUANGANG, D. YEJIE, A. WACHTER, R. GROMES, T. RAUSCH: Expression of *BjMT2*, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Experimental Botany* 2006, Vol. 57, pp. 3575–3582.
26. R. SRIPRANG, M. HAYASHI, H. ONO, M. TAKAGI, K. HIRATA, Y. MUROOKA: Enhanced accumulation of Cd²⁺ by a *Mesorhizobium* sp. transformed with a gene from *Arabidopsis thaliana* coding for phytochelatin synthase. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, Vol. 69, No. 3, pp. 1791–1796.
27. C.A. BLINDAUER: Bacterial metallothioneins. In: A. SIGEL, H. SIGEL, R.K.O. SIGEL [Eds.]: Metallothioneins and Related Chelators. *Metal Ions in Life Science* 2009, Vol. 5, pp. 51–82.

Dabrowska, G., Hrynkiewicz, K., Janczak, K., Żurańska, M. Modified Soil Bacteria and Their Potential Application to Improving Fitoremediation of Trace Metal-Contaminated Environment. *Ochrona Środowiska* 2014, Vol. 36, No. 1, pp. 21–26.

Abstract: Eight bacterial strains from areas contaminated with trace metals were selected for the experiments: *Bacillus* sp., *Bacteroidetes bacterium*, *Flavobacterium* sp., *Luteibactor rhizovicina*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp., *Serratia entomophila* and *Variovorax* sp. Bacteria were transformed with pET21a expression plasmid encoding *Brassica napus* L. metallothionein 2 (*BnMT2*). Transformant colonies were examined for growth on solid culture medium containing trace metal ions (Cd and Pb). It was found that most of the analyzed bacterial strains were

resistant to ampicillin, though the antibiotic inhibited their growth. It was demonstrated that growth of bacterial strains on a medium containing Pb ions was not inhibited, while Cd ion content limited or inhibited growth of some bacterial strains. No significant differences were noted in growth between transformed and untransformed bacteria of a given strain on the medium containing Pb ions. The *BnMT2* transgene presence abolished adverse effects of Cd ions on *Flavobacterium* sp., *Variovorax* sp. and *L. rhizovicina*. Modified bacterial strains were demonstrated for potential use in treatment of soil contaminated with trace metals, especially Cd ions.

Keywords: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), transformation, *Brassica napus*, metallothionein, trace elements.