

# Przydatność genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów do bioremediacji zanieczyszczonych środowisk

Daniel WASILKOWSKI, Żaneta SWĘDZIOŁ, Agnieszka MROZIK – Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2012, 66, 8, 817-826

## Wstęp

Działalność przemysłowa i rolnicza, zintensyfikowana w ciągu ostatnich 50 lat, systematycznie powoduje wzrost poziomu toksycznych zanieczyszczeń w środowisku. Wśród substancji pochodzenia antropogenicznego najbardziej niebezpieczne są: chlorofenole, nitrofenole, BTEX (mieszanka benzenu, etylobenzenu, toluenu i ksylenu), wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WVA), polichlorowane bifenyle (PCBs) i rozpuszczalniki organiczne. Związki te występują w glebie, ściekach i warstwach wodonośnych. Głównymi źródłami tych zanieczyszczeń są procesy gazowania i koksowania węgla, przemysł rafineryjny, zakłady petrochemiczne oraz inne gałęzie przemysłu, takie jak produkcja syntetycznych związków chemicznych, herbicydów czy pestycydów. Większość z tych substancji wykazuje właściwości kancerogenne i mutagenne, może pozostawać w środowisku przez długi czas, ponieważ trudno ulega rozkładowi. Z tego względu niezbędne jest usuwanie ich z zanieczyszczonych terenów [1, 11, 19, 26].

Metody biologiczne są obecnie rekomendowanymi sposobami pozbywania się toksycznych zanieczyszczeń. Bioremediacja jest jedną z obiecujących, tanich i bezpiecznych technologii rozwiązujących problem skażenia środowiska. Termin ten odnosi się do wszystkich procesów wykorzystujących mikroorganizmy i ich enzymy do wspomaganego degradacji i usuwania zanieczyszczeń ze środowiska. Techniki bioremediacji są stosowane zarówno *in situ* (bioaugmentacja, biostymulacja, biowentylacja), jak i *ex situ* (*landfarming*, kompostowanie i bioreaktory) [9, 26, 27].

W bioremediacji wykorzystuje się naturalną zdolność mikroorganizmów do usuwania zanieczyszczeń. Zdolność ta wynika ze specyfiki metabolizmu, który umożliwia włączanie związków toksycznych w procesy biochemiczne związane z aktywnością i wzrostem komórki. Niektóre mikroorganizmy są zdolne do transformacji niebezpiecznych substancji do mniej toksycznych metabolitów pośrednich lub ich degradacji do nietoksycznych produktów końcowych. W procesie zwanym kometabolizmem, przekształcanie zanieczyszczeń zwykle nie przynosi komórce korzyści, dlatego określane jest z ang. *nonbeneficial biotransformation* [5, 9, 25].

Na początku lat 80. XX w. nastąpił rozwój technik inżynierii genetycznej oraz podjęto intensywne badania nad metabolicznym potencjałem mikroorganizmów. Dzięki temu stało się możliwe zaprojektowanie genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów (GMMs) o pożądanych właściwościach biochemicznych. Obecnie są one wykorzystywane w medycynie, rolnictwie, różnych gałęziach przemysłu oraz bioremediacji zanieczyszczonych środowisk [5]. Wiedza na temat mechanizmów degradacji związków toksycznych, szlaków metabolicznych, enzymów katabolicznych oraz odpowiednich genów ułatwiła konstrukcję GMMs na potrzeby bioremediacji. Zaprojektowane do tego celu GMMs mogą stanowić alternatywę dla dzikich szczepów bakterii, które nie zawsze są w stanie degradować zanieczyszczenia. Takie innowacyjne rozwiązania stwarzają możliwość zmniejszenia

poziomu toksycznych związków organicznych w środowisku oraz poprawy jakości i stanu ekologicznego gleb [5, 27]. W 1981 r. w Stanach Zjednoczonych opatentowano po raz pierwszy dwa modyfikowane genetycznie szczepy: *Pseudomonas aeruginosa* (NRRL B-5472) i *Pseudomonas putida* (NRRL B-5473). Szczepy te skonstruował Chakrabarty na początku lat 70. XX w. Zawierały one geny odpowiedzialne za degradację naftalenu, salicylanu i kamfory [43]. Z kolei modyfikowany genetycznie i zdolny do rozkładu naftalenu szczep *Pseudomonas fluorescens* HK44 był pierwszym szczepem dopuszczonym w USA do badań w warunkach polowych [33].

Celem pracy jest zaprezentowanie możliwości wykorzystania GMMs w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych związkami organicznymi. Przedstawiono wybrane narzędzia i strategie projektowania nowych mikroorganizmów na potrzeby bioremediacji oraz ich bezpiecznego stosowania w środowisku. Zaprezentowano wybrane przykłady praktycznego wykorzystania GMMs do rozkładu zanieczyszczeń w warunkach laboratoryjnych i polowych. Przedstawiono także prawne aspekty dotyczące organizmów modyfikowanych genetycznie (GMO).

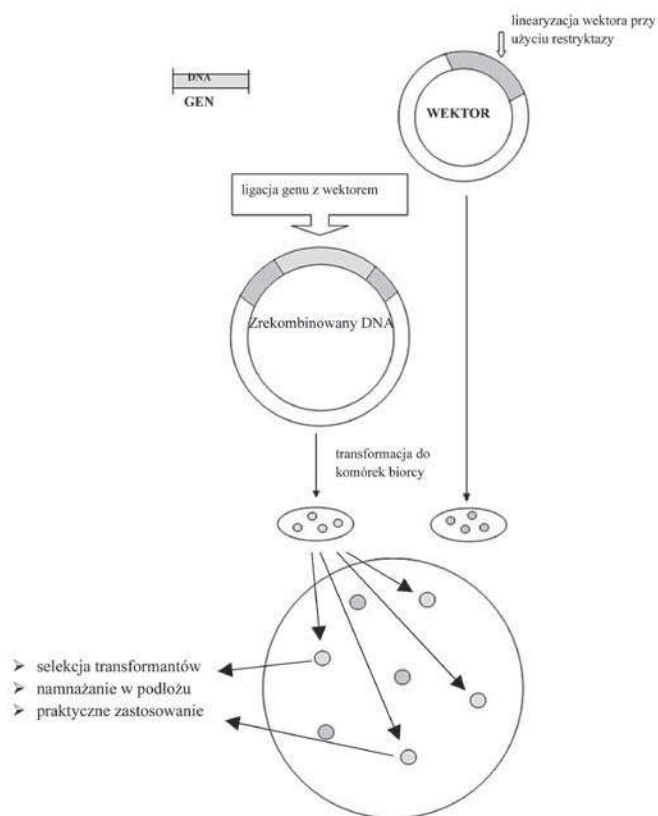
## Konstrukcja GMMs

Inżynieria genetyczna, będąca nowoczesną technologią, pozwala na projektowanie mikroorganizmów zdolnych do rozkładu określonego typu zanieczyszczeń. Dzięki niej stało się możliwe tworzenie takich kombinacji genów, które nie występują naturalnie w przyrodzie. Odbywa się to poprzez wprowadzanie pojedynczych genów lub operonów do nowych gospodarzy oraz konstruowanie nowych, lub uzupełnianie znanych, szlaków metabolicznych [5, 8, 18].

Pierwszym etapem w konstrukcji GMMs jest selekcja odpowiedniego genu bądź grupy genów. Następnie klonowany fragment DNA jest wprowadzany do wektora i umieszczany w komórkach gospodarza. Modyfikowane w ten sposób komórki określa się mianem rekombinantów. Kolejnym krokiem jest powielanie wprowadzonej sekwencji w komórce oraz selekcja otrzymanych transformantów. Ostatni etap obejmuje poszukiwanie klonów z insertem DNA o pożądanych cechach biologicznych [7, 8, 18, 28, 39]. Główne etapy opisanego klonowania molekularnego zilustrowano na Rysunku 1.

Bakterie, szczególnie z rodzaju *Pseudomonas*, stanowią główny obiekt modyfikacji genetycznych. Wynika to z faktu, że powszechnie występują w środowisku i zdolne są do rozkładu wielu toksycznych związków. Ze względu na to, że ich chromosomy i plazmidy zawierają geny odpowiedzialne za degradację zanieczyszczeń są one powszechnym źródłem pozyskiwania genów katabolicznych na potrzeby inżynierii genetycznej [5, 9]. Pierwszym poznany plazmidem degradacyjnym był plazmid TOL (117 pz) pochodzący ze szczepu *Pseudomonas putida* mt-2 [40]. Plazmid ten zawiera dwa operony *xyI-UWCMABN* i *xyIXYZLTEGFJQKIHSR* kodujące enzymy zaangażowane w metabolizm toluenu, *m*- i *p*-ksylenu oraz *m*-etylotoluenu. Innym przykładem katabolicznego plazmidu jest NAH7 (83 kpz) ze szczepu

*P. putida* G7, który zawiera dwa operony *nah* i *sal* kodujące enzymy szlaku rozkładu naftalenu i salicylanów [25]. Szczep *P. putida* F1 może służyć jako dawca operonu *tod*, którego geny *todABC1C2DEF* odpowiedzialne są za rozkład toluenu [42]. Innym szczepem, z którego pozyskuje się geny *bphOAEIFGBC* odpowiadające za rozkład bifenyli jest *Burkholderia* sp. LB400 [23]. Wiele genów katabolicznych pochodzenia plazmidowego, odpowiedzialnych za degradację toksycznych substancji, bardzo często zlokalizowanych jest w transpozonach, na przykład: w Tn4653 szczepu *P. putida* mt-2, Tn4655 szczepu *P. putida* G7 i Tn4656 szczepu *P. putida* MT53 [36].



Rys. 1. Główne etapy klonowania molekularnego [7, 18, zmodyfikowany]

Inżynieria genetyczna wykorzystuje plazmidy jako wektory do powielania i ekspresji określonych genów. Wektorem jest cząsteczka DNA, która umożliwia wprowadzenie nowej informacji genetycznej do komórek i replikuje się niezależnie od chromosomalnego DNA. Często plazmidy zawierają również inne geny, np. oporności na antybiotyki. Kolejnymi elementami genetycznymi, które także mogą być stosowane jako wydajne wektory, są mobilne elementy zwane transpozonami [8, 9, 28]. Współcześnie w konstruowaniu GMMs najczęściej wykorzystuje się sztuczne wektory plazmidowe. Zawierają one istotne elementy pochodzące z naturalnych plazmidów, takie jak: *oriC* (początek replikacji), MCS (polilinker) i geny markerowe. Szerokie zastosowanie w konstrukcji GMMs znalazły także plazmidy ekspresyjne, ze względu na możliwość wydajnej produkcji zaprojektowanych białek. Poza wektorami, ważnymi narzędziami w inżynierii genetycznej są również enzymy. Należą do nich enzymy restrykcyjne odpowiedzialne za cięcie DNA w specyficznych rejonach i ligazy DNA łączące wolne końce DNA. Najczęściej stosowanymi w biologii molekularnej są enzymy restrykcyjne *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* i ligaza T4 DNA [7, 8, 18, 38].

Do zastosowań praktycznych zaprojektowano wiele zrekombinowanych wektorów. Przykładem może być plazmid pBBR1MCS-2, który zawiera fragment DNA o długości 3,9 kbp z promotorem *tac* pochodzącym z plazmidu pKST11 i geny *todC1C2BA*, odpowiedzialne za degradację toluenu [29]. Fragment ten został wprowadzony w miejsce restrykcyjne *BamHI* tego plazmidu w celu uzyskania eks-

presji genów *tod* w komórkach *Pseudomonas putida* KT2442, *P. stutzeri* 1317 i *Aeromonas hydrophila* 4AK4. W innych badaniach Chen i in. [6] otrzymali sztuczny plazmid dzięki wprowadzeniu genu *ohb* (kodującego 1,2-dioksygenazę *orto*-chlorobenzoesanu) w miejsce restrykcyjne *Haell* w obrębie genu *lacZ* wektora pSP329. Z kolei Saylor i Ripp [33] wykorzystali transpozon Tn4311 jako wektor dla genów *lux*. Haro i de Lorenzo [14] skonstruowali fragment DNA zawierający sekwencje dla dioksygenazy toluenu z plazmidu TOD *P. putida* F1 (*todC1C2BA*) oraz sekwencje głównego szlaku rozkładu toluenu (TOL) z plazmidu pVW0 szczepu *P. putida* mt-2. Uzyskane fragmenty kataboliczne umieszczono pojedynczo w bakteryjnym mini-transpozonie Tn5 i wprowadzono do chromosomu szczepów *P. aeruginosa* PA142 i *P. aeruginosa* JB2, degradujących 2-chlorobenzoesan.

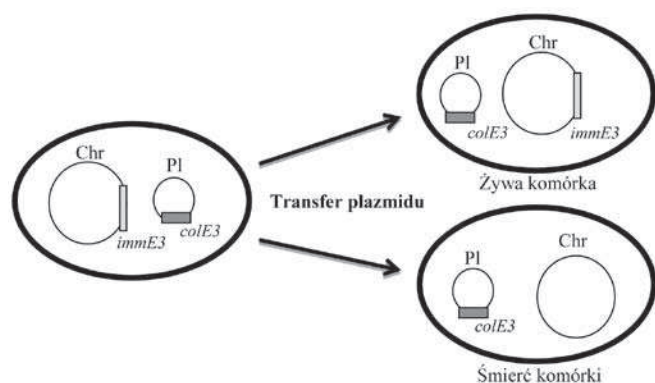
Proces przenoszenia informacji genetycznej z jednego organizmu do drugiego nosi nazwę transferu genetycznego. Rekombinanty bakteryjne zdolne do metabolizowania toksycznych związków organicznych uzyskuje się w warunkach laboratoryjnych najczęściej drogą transformacji. Transformacja genetyczna polega na pobieraniu przez kompetentne komórki biorcy wolnego DNA ze środowiska. Innym sposobem poziomego transferu DNA jest koniugacja, polegająca na fizycznym kontakcie dwóch komórek bakteryjnych. Przenoszenie DNA w czasie koniugacji odbywa się zawsze w jednym kierunku, od dawcy do biorcy [8, 28]. Ouyang i in. [29] zastosowali koniugację w celu przeniesienia plazmidu pKST11 z komórek donora *Escherichia coli* S17-1 do komórek trzech biorców: *P. putida* KT2442, *P. stutzeri* 1317 i *A. hydrophila* 4AK4. W innych badaniach Chen i in. [6] wykorzystali elektrottransformację (z użyciem prądu stałego o niewielkim napięciu) do wprowadzenia plazmidu pE43 do komórek *Sinorhizobium meliloti*. Z kolei Matsui i in. [24] metodą elektroporacji (krótkotrwały impuls wysokiego napięcia) transformowali komórki *Mycobacterium* sp. i *E. coli* JM109 zrekombinowanym plazmidem pNC950.

Do nowoczesnych technik molekularnych, pozwalających na selekcję i identyfikację GMMs, należą obecnie: FISH (hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ*), *in situ* PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy), DGGE (elektroforeza w żelu z gradientem czynnika denaturującego), TGGE (elektroforeza w żelu z gradientem temperatury), T-RFLP (polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych) i ARDRA (analiza restrykcyjna amplifikowanego rDNA). Metody te opierają się na wykrywaniu specyficznych sekwencji DNA lub RNA, szczególnie konserwatywnych fragmentów bakteryjnego 16S rRNA [27, 37]. Dejonghe i in. [10] zastosowali technikę DGGE w monitorowaniu horyzontalnego transferu plazmidów pEMT1 i pJP4 z komórek rekombinanta *P. putida* UW3 do mikroorganizmów autochtonicznych podczas degradacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego w glebie.

Innym rozwiązaniem śledzenia i wizualizacji bakterii w środowisku jest zastosowanie markerów selekcyjnych. Idealny marker pozwala na wykrycie określonych mikroorganizmów oraz umożliwia monitorowanie procesów związanych z ekspresją genów i transdukcją sygnałów. Do powszechnie stosowanych genów markerowych należą: *lacZ* ( $\beta$ -galaktozydazy), *lux* (lucyferazy bakteryjnej), *tfd* (monooksygenazy), *xyIE* (2,3-dioksygenazy katecholowej) i *gfp* (białka zielonej fluorescencji) [8, 9, 15, 37]. Saylor i Ripp [33] wykorzystali operon *lux* wprowadzony do plazmidu pUTK21 w celu detekcji rekombinanta *P. fluorescens* HK44 w glebie skażonej naftalenem. W innych badaniach Villaceros i in. [38] użyli genu *gfp* w monitorowaniu przeżywalności szczepu *P. fluorescens* F113L::I180 podczas rozkładu polichlorowanych bifenyli (PCBs) w strefie ryzosferowej. Z kolei Quan i in. [31] wykorzystali dwa geny markerowe *dsRed* (białka czerwonej fluorescencji) w plazmidzie pJP4 i *gfp* w chromosomie do detekcji szczepu *P. putida* SM1443 w glebie zanieczyszczonej kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym (2,4-D).

W celu zminimalizowania ryzyka wynikającego z uwolnienia GMMs do środowiska stosuje się pewne bariery genetyczne. Zabiegi te ograniczają przeżywalność komórek rekombinanta i transfer genów. Przepływ genów z GMMs do innych komórek bakterii może być

ograniczony poprzez zastosowanie transpozonów pozbawionych genu transpozazy bądź usunięcie genów koniugacyjnych *tra* ze zrekombinowanych plazmidów. Przypadkowy horyzontalny transfer genów może być również ograniczony przez umieszczenie w wektorze genu *colE3* kodującego kolicynę, tnącą wszystkie prokariotyczne 16S rRNA oraz genu *immE3*, kodującego represor syntezy kolicyny [9, 20]. Regulację genu zabójczego zilustrowano na Rysunku 2.



**Rys. 2. Regulacja genu zabójczego. Horyzontalny transfer plazmidu zawierającego gen *colE3* do innej komórki pozbawionej w chromosomie bakteryjnym genu *immE3* prowadzi do jej śmierci [20, zmodyfikowany].** Objaśnienia: Chr – chromosom bakteryjny, PI – plazmid. Wyjaśnienia w tekście

### GMMs w bioremediacji

Połączenie tradycyjnych metod mikrobiologicznych, biochemicznych i ekologicznych z metodami inżynierii genetycznej stanowi obiecujące rozwiązanie w bioremediacji *in situ*. Z wielu prac wynika, że GMMs mają większe możliwości w rozkładzie toksycznych zanieczyszczeń organicznych w porównaniu z dzikimi szczepami [5]. Przykłady wybranych GMMs rozkładających różne zanieczyszczenia zaprezentowano w Tablicy 1.

Tablica 1

Genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy rozkładające toksyczne związki organiczne

GMMs	Wprowadzony gen/ny	Związek organiczny	Źródło
<i>Escherichia coli</i> AtzA	gen chlorohydrolazy atrazyny	atrazyna	[34]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> HK44	<i>luxCDABE</i>	naftalen	[33]
<i>Burkholderia cepacia</i> L.S.2.4	plazmid pTOD	toluen	[2]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113rifpcbrnBP1::gfpmut3	operon <i>bph</i> , <i>gfp</i>	chlorowane bifenylo	[4]
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442(pNF142::TnMod-OTc)	plazmid pNF142, <i>gfp</i>	naftalen	[12]
<i>Burkholderia cepacia</i> VM1468	plazmid pTOM-Bu61	toluen	[35]
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1 (pRHD34::fcb)	operon <i>fcbABC</i>	2(4)-chlorobenzoesan, 2(4)-chlorobifenyl	[32]
<i>Pseudomonas putida</i> PaW85	plazmid pWW0	ropa naftowa	[17]
<i>Comamonas testosteroni</i> SB3	plazmid pNB2::d-sRed	3-chloroanilina	[3]
<i>Escherichia coli</i> JM109 (pGEX-AZR)	gen azoreduktazy	barwnik azowy decolorize azo dyes, C.I. Direct Blue 71	[16]
<i>Pseudomonas putida</i> PaW340(pDH5)	plazmid pDH5	kwas 4-chlorobenzoesowy	[22]

Nadawanie nowych cech mikroorganizmom obejmuje następujące zabiegi: modyfikację specyficzności enzymu i jego powinowactwa do substratu, konstrukcję nowego szlaku metabolicznego i jego regulację, wprowadzanie genów umożliwiających detekcję mikroorganizmów w zanieczyszczonym środowisku oraz tworzenie biosensorów wykorzystywanych do detekcji określonych substancji chemicznych [9, 20, 33].

Mikroorganizmem skonstruowanym z użyciem metod inżynierii genetycznej, który po raz pierwszy wykorzystano w badaniach polowych był szczep *Pseudomonas fluorescens* HK44. Celem podjętego projektu była ocena możliwości użycia tego szczepu w długoterminowej bioremediacji gleb skażonych naftalenem oraz kontrola tego procesu z wykorzystaniem zjawiska bioluminescencji. Szczep *P. fluorescens* HK44 posiadał zrekombinowany plazmid pUTK21, powstały w wyniku włączenia transpozonu Tn4431 z *Vibrio fischeri* zawierającego kasetę genów *luxCDABE* do odpowiedzialnego za degradację naftalenu plazmidu NAH7, pochodzącego ze szczepu *P. fluorescens* 5R. Modyfikowany genetycznie szczep HK44 zawierał geny degradacji naftalenu i gen *lux* pod wspólnym promotorem, co powodowało, że ekspozycja mutanta na działanie naftalenu wywoływała jednoczesną degradację zanieczyszczenia oraz powstawanie zjawiska bioluminescencji [33]. Kolejnym szczepem skonstruowanym przez Filonova i in. [12] na potrzeby eliminacji naftalenu z gleby był *P. putida* KT2442 (pNF142::TnMod-OTc). Do jego konstrukcji posłużył szczep *Escherichia coli* S17 I z plazmidem pTnMod-OTc (zawierającym gen oporności na tetracyklinę), naturalny szczep *Pseudomonas* sp. 142NF (pNF142) zdolny do rozkładu naftalenu i *P. putida* KT2442 z obecnym w chromosomie genem *gfp*. Przeprowadzone badania z użyciem tego szczepu potwierdziły jego zdolność do degradacji naftalenu oraz umożliwiły ustalenie częstotliwości transferu plazmidu pNF142::TnMod-OTc do szczepów autochtonicznych.

Możliwość transferu katabolicznego plazmidu pWW0, nadającego komórkom *Pseudomonas putida* PaW85 zdolność degradacji węglowodorów ropy naftowej, do bakterii ryzosferowych badali Jussila i in. [17]. Stwierdzili oni, że w ryzosferowej glebie zanieczyszczonej ropą naftową zachodził transfer tego plazmidu z komórek *P. putida* PaW85 do komórek *Pseudomonas oryzaehabitans* 29. Skutkiem tego transferu było uzyskanie bakterii ryzosferowych o nowych właściwościach degradacyjnych. W innych badaniach nad degradacją kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego w glebie, Liphay i in. [21] wykorzystali bakterie *Ralstonia eutropha* oraz *Escherichia coli* HB101, będące gospodarzami plazmidu pRO103. Plazmid ten zawierał gen dioksygenazy kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego/2-oksoglutarowego. Uzyskane transkoniuganty *R. eutropha* (pRO103) znacząco przyspieszyły rozkład ksenobiotyku w glebie.

Enzymatyczny rozkład PCBs przez dzikie szczepy bakterii prowadzi do powstania kwasu chlorobenzoesowego (CBA), który jest dla większości z nich toksyczny i może prowadzić do zahamowania procesu degradacji w glebie. Rodrigues i in. [32] zbadali zdolność szczepu *Rhodococcus* sp. RHA1 (pRHD34::fcb) i *Burkholderia xenovorans* LB400 (pRO41) do rozkładu mieszaniny PCBs w glebie zanieczyszczonej preparatem Aroclor 1242. Dzikie szczep *Rhodococcus* sp. RHA1 został wyposażony w operon *fcbABC*, pochodzący z komórek *Arthrobacter globiformis* sp. KZT1. Kasetę genów *fcbABC* wprowadzono do naturalnego plazmidu pRT1 pochodzącego ze szczepu *Pyrococcus* sp. JT1, otrzymując plazmid pRHD34::fcb. Szczep LB400 (*ohb*) posiadał z kolei operon *ohbABCR* kodujący enzymy orto-dehalogenacji mono-, di- i trichlorobenzoesanów. Dawcą tego operonu był szczep *Pseudomonas aeruginosa* 142. Kasetę genów *ohbABCR* umiejscowiono w plazmidzie pRT1 otrzymując zrekombinowany plazmid pRO41, który drogą transformacji wprowadzono do komórek szczepu LB400. Wprowadzone geny ulegały ekspresji, dlatego po inokulacji gleby szczepem LB400 (*ohb*) nie dochodziło w niej do akumulacji 2-CBA i 2,4-CBA. Jednocześnie z badań tych wynika, że rozkład Arocloru 1242 w glebie zachodził efektywnie niezależnie od liczby inokulowanych komórek rekombinantów RHA1 (pRHD34::fcb) i LB400 (pRO41).



Kwas 4-chlorobenzoesowy (4-CBA) stanowi produkt pośredni rozkładu chloroaromatycznych zanieczyszczeń, szczególnie PCBs i *p,p'*-dichlorodifenylotrichloroetanu (DDT). Na potrzeby degradacji 4-CBA w glebie, Massa i in. [22] skonstruowali szczep *Pseudomonas putida* PaW340 (pDH5). Szczep ten uzyskali w wyniku wklonowania genów *fc*b, kodujących dehalogenezę, do sztucznego wektora plazmidowego pDH5, który następnie umieścili w komórkach nierosnącego w obecności 4-CBA szczepu *P. putida* PaW340. Dawcą genów *fc*b był szczep *Arthrobacter* sp. FGI, który metabolizował 4-CBA do kwasu 4-hydroksybenzoesowego (4-HBA) w wyniku hydrolitycznej dehalogenuacji. Otrzymany szczep z dużą skutecznością rozkładał 4-CBA, zarówno po wprowadzeniu do gleby sterylnej jak i w obecności mikroflory autochtonicznej. Podobnie szczep *Arthrobacter* sp. FGI degradował 4-CBA po introdukcji do gleby, zarówno sterylnej jak i niesterylnej. Z badań tych wynika, że szczepy FGI i modyfikowany genetycznie PaW340 (pDH5) mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w eliminacji kwasu 4-chlorobenzoesowego z gleby.

Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie można użyć nie tylko w celu degradacji toksycznych zanieczyszczeń, ale także wykorzystać jako szczepionkę promującą wzrost i rozwój roślin. Bakterie promujące wzrost roślin (PGPB ang. plant growth-promoting bacteria) najczęściej nie są w stanie przeżyć w zanieczyszczonym środowisku w obecności różnych ksenobiotyków [5, 9, 30]. Z tego względu Yang i in. [41] podjęli próbę skonstruowania modyfikowanego genetycznie szczepu, który nie tylko promowałby wzrost roślin, ale jednocześnie degradowałby ten związek. Do konstrukcji nowego rekombinanta użyto szczepu *Pseudomonas aeruginosa* SZH16, który nie stymulował wzrostu kukurydzy oraz szczepu *Pseudomonas fluorescens* P13 z grupy PGBP, który nie miał zdolności rozkładu fenolu. Otrzymany w wyniku horyzontalnego transferu genów transkoniugant P13 nie tylko promował wzrost kukurydzy, ale również zwiększał efektywność usuwania fenolu. W innych badaniach Barac i in. [2] wprowadzili plazmid pTOD ze szczepu *Burkholderia cepacia* G4 zdolnego do degradacji toluenu do komórek *B. cepacia* L.S.2.4, naturalnego endofita łubinu żółtego. Inokulacja łubinu tak zmodyfikowanym szczepem spowodowała, że transpiracja toluenu przez powierzchnię liści zmniejszyła się o 50-70% w porównaniu z roślinami nieinokulowanymi. W podobnych badaniach Taghavi i in. [35] do inokulacji łubinu wykorzystali zmodyfikowany szczep *B. cepacia* VM1468. Powstał on w wyniku transferu plazmidu pTOM-Bu61 z *B. cepacia* BU61 do komórek *B. cepacia* BU0072. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzili, że u roślin inokulowanych szczepem VM1468 transpiracja toluenu przez części nadziemne była 5-krotnie niższa niż u roślin kontrolnych, a masa korzeni i liści wzrosła o ok. 30%. Może to wskazywać na możliwość transferu plazmidu pTOM-Bu61 do innych bakterii endofitycznych i zwiększenia wydajności degradacji toluenu. Podobne wyniki uzyskali Germaine i in. [13], którzy uzyskali modyfikowany genetycznie szczep bakterii endofitycznych *Pseudomonas putida* VM1441 (pNAH7), rozkładający naftalen. Użyty do inokulacji grochu szczep skutecznie chronił rośliny przed toksycznym działaniem naftalenu. Ponadto kooperacja roślin z bakteriami endofitycznymi spowodowała, że o ok. 40% naftalenu więcej ulegało detoksykacji w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

### Regulacje prawne

W polskim systemie prawnym organizmy modyfikowane genetycznie zostały zdefiniowane w Art. 3 Ustawy z dnia 22 czerwca 2001 r. (Dz. U. 2001.76.811 z dnia 25 lipca 2001 r.). Rozporządzenie Ministra Sprawiedliwości z dnia 8 lipca 2002 r. zawiera regulacje z zakresu użycia i zamierzonego uwolnienia GMO. Polska jako członek Unii Europejskiej podlega również regulacjom prawnym Wspólnoty. Przepisy odnoszące się do GMO zawarte zostały w dyrektywach: 2001/204/WE z dnia 8 marca 2001 r., 2001/18/WE z dnia 12 marca 2001 r. i 2009/41/WE z dnia 6 maja 2009 r.

### Podsumowanie

Biodegradacja toksycznych związków organicznych w glebie jest procesem skomplikowanym, wieloetapowym i sprawnie przebiega tylko w sprzyjających warunkach środowiskowych. Wydajność biodegradacji zanieczyszczeń zależy nie tylko od ich budowy chemicznej, struktury i właściwości gleby, ale także od potencjału degradacyjnego mikroorganizmów. Inżynieria genetyczna oferuje szerokie możliwości wykorzystania naturalnych zdolności komórek bakterii w projektowaniu GMMs o pożądanych właściwościach metabolicznych. Niestety wykorzystanie takich zrekombinowanych szczepów jest ciągle ograniczone głównie do badań laboratoryjnych. Nowym podejściem w remediacji środowisk zanieczyszczonych związkami organicznymi może być wykorzystanie zrekombinowanych endofitów, czyli bakterii promujących wzrost roślin i jednocześnie rozkładających zanieczyszczenia. To zagadnienie wymaga jednak dodatkowych badań w skali laboratoryjnej.

### Literatura

- Ahn Y., Sanseverino J., Saylor G.S.: *Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils*. Biodegradation 1999, **10**, 2, 149-157.
- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., van der Lelie D.: *Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants*. Nat. Biotechnol. 2004, **22**, 5, 583-588.
- Bathe S., Schwarzenbeck N., Hausner M.: *Bioaugmentation of activated sludge towards 3-chloroaniline removal with a mixed bacterial population carrying a degradative plasmid*. Bioresour. Technol. 2009, **100**, 12, 2902-2909.
- Boldt T.S., Sørensen J., Karlson U., Molin S., Ramos C.: *Combined use of different Gfp reporters for monitoring single-cell activities of a genetically modified PCB degrader in the rhizosphere of alfalfa*. FEMS Microbiol. Ecol. 2004, **48**, 2, 139-148.
- Cases I., de Lorenzo V.: *Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them*. Int. Microbiol. 2005, **8**, 3, 213-222.
- Chen H., Gao K., Kondorosi E., Kondorosi A., Rolfe B.G.: *Functional genomic analysis of global regulator NalR in Sinorhizobium meliloti*. Am. Phytopathol. Soc. 2005, **18**, 12, 1340-1352.
- Chmiel A.: *Biotechnologia – podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*. PWN 1998, 260-306.
- Dale J.W., Park S.F.: *Molecular genetics of bacteria*. University of Surrey 2007, 137-244.
- Davison J.: *Risk mitigation of genetically modified bacteria and plants designed for bioremediation*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2005, **32**, 11-12, 639-650.
- Dejonghe W., Goris J., El Fantroussi S., Höfte M., De Vos P., Verstraete W., Top E.M.: *Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons*. Appl. Environ. Microbiol. 2000, **66**, 8, 3297-304.
- De Lorenzo V.: *Cleaning up behind us*. EMBO reports 2001, **2**, 5, 357-359.
- Filonov A.E., Akhmetov L.I., Puntus I.F., ESikova T.Z., Gafarov A.B., Izmailkova T.Y., Sokolov S.L., Kosheleva I.A., Boronin A.M.: *The construction and monitoring of genetically tagged, plasmid-containing, naphthalene-degrading strains in soil*. Microbiology 2005, **74**, 4, 526-532.
- Germaine K.J., Keogh E., Ryan D., Dowling D.N.: *Bacterial endophyte-mediated naphthalene phytoremediation and phytoremediation*. FEMS Microbiol. Lett. 2009, **296**, 2, 226-234.
- Haro M.A., de Lorenzo V.: *Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of Pseudomonas strains for biodegradation of 2-chlorotoluene*. J. Biotechnol. 2001, **85**, 2, 103-113.
- Jansson J.K., Björklöf K., Elvang A.M., Jørgensen K.S.: *Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants*. Environ. Pollut. 2000, **107**, 2, 217-223.
- Jin R., Yang H., Zhang A., Wang J., Liu G.: *Bioaugmentation on decolorization of C.I. Direct Blue 71 using genetically engineered strain Escherichia coli JM109 (pGEX-AZR)*. J. Hazard. Mater. 2009, **163**, 2-3, 1123-1128.

17. Jussila M.M., Zhao J., Suominen L., Lindström K.: TOL plasmid transfer during bacterial conjugation *in vitro* and rhizoremediation of oil compounds *in vivo*. *Environ. Pollut.* 2007, **146**, 2, 510-24.
18. Kunicki-Goldfinger W.: *Życie bakterii*. PWN 2007, 267-344.
19. Lehmann V.: *Bioremediation: a solution for polluted soils in the south?* *Biotechnol. Dev. Monit.* 1998, **34**, 12-17.
20. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: *Mikrobiologia techniczna – tom II*. PWN 2008, 297-532.
21. Liphay J.R., Barkay T., Sørensen S.J.: *Enhanced degradation of phenoxycetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfdA* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001, **35**, 1, 75-84.
22. Massa V., Infantin O.A., Radice F., Orlandi V., Tavecchio F., Giudici R., Conti F., Urbini G., Di Guardo A., Barbieri P.: *Efficiency of natural and engineered bacterial strains in the degradation of 4-chlorobenzoic acid in soil slurry*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2009, **63**, 1, 112-115.
23. Master E.R., Mohn W.W.: *Induction of *bphA*, encoding biphenyl dioxygenase, in two polychlorinated biphenyl-degrading bacteria, psychrotolerant *Pseudomonas* strain Cam-1 and mesophilic *Burkholderia* strain LB400*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, **67**, 6, 2669-2676.
24. Matsui T., Saeki H., Shinzato N., Matsuda H.: *Characterization of *Rhodococcus-E. coli* shuttle vector pNC9501 constructed from the cryptic plasmid of a propene-degrading bacterium*. *Curr. Microbiol.* 2006, **52**, 6, 445-448.
25. Menn F.M., Applegate B.M., Saylor G.S.: *NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, **59**, 6, 1938-1942.
26. Mrozik A., Piotrowska-Seget Z.: *Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds*. *Microbiol. Res.* 2010, **165**, 5, 363-375.
27. Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Łabużek S.: *Bacteria in bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments*. *Post. Mikrobiol.* 2005, **44**, 3, 227-238.
28. Nair A.J.: *Introduction to biotechnology and genetic engineering*. Infinity Science Press LLC 2008, 467-776.
29. Ouyang S.-P., Sun S.-Y., Liu Q., Chen J., Chen G.-Q.: *Microbial transformation of benzene to cis-3,5-cyclohexadien-1,2-diols by recombinant bacteria harboring toluene dioxygenase gene *tod**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, **74**, 1, 43-49.
30. Pimentel M.R., Molina G., Dionisio A.P., Maróstica M.R.Jr., Pastore G.M.: *The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process*. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, 2011, 1-11.
31. Quan X.C., Tang H., Xiong W.C., Yang Z.F.: *Bioaugmentation of aerobic sludge granules with a plasmid donor strain for enhanced degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*. *J. Hazard. Mater.* 2010, **179**, 1-3, 1136-1142.
32. Rodrigues J.L.M., Kachel A., Aiello M.R., Quensen J.F., Maltseva O.V., Tsio T.V., Tiedje J.M.: *Degradation of Aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400 (*ohb*) and *Rhodococcus* sp. strain RHA1 (*fcb*)*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, **72**, 4, 2476-2482.
33. Saylor G.S., Ripp S.: *Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000, **11**, 3, 286-289.
34. Strong L.C., McTavish H., Sadowsky M.J., Wackett L.P.: *Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase*. *Environ. Microbiol.* 2000, **2**, 1, 91-98.
35. Taghavi S., Barac T., Greenberg B., Borremans B., Vangronsveld J., van der Lelie D.: *Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, **71**, 12, 8500-8505.
36. Top E.M., Springael D., Boon N.: *Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002, **42**, 2, 199-208.
37. Urung-Demirtas M., Stark B., Pagilla K.: *Use of genetically engineered microorganism (GEMs) for the bioremediation of contaminants*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2006, **26**, 3, 145-164.
38. Villaceros M., Whelan C., Mackova M., Molgaard J., Sánchez-Contreras M., Lloret J., Aguirre de Cárcer D., Oruezabal R.I., Bolaños L., Macek T., Karlson U., Dowling D.N., Martín M., Rivilla R.: *Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives, using a *Sinorhizobium meliloti* nod system to drive *bph* gene expression*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, **71**, 5, 2687-2694.
39. Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R.: *Molecular biology of the gene*. Inc., Pearson Education 2004, 293-342.
40. Williams P.A., Murray K.: *Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid*. *J. Bacteriol.* 1974, **120**, 1, 416-423.
41. Yang L., Wang Y., Song J., Zhao W., He X., Chen J., Xiao M.: *Promotion of plant growth and *in situ* degradation of phenol by an engineered *Pseudomonas fluorescens* strain in different contaminated environments*. *Soil Biol. Biochem.* 2011, **43**, 5, 915-922.
42. Zylstra G.J., McCombie W.R., Gibson D.T., Finette B.A.: *Toluene degradation by *Pseudomonas putida* Fl: genetic organization of the *tod* operon*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, **54**, 6, 1498-1503.
43. <http://www.freebase.com> 05.07.2012.
44. Ustawa z dnia 22 czerwca 2001 r. o organizmach genetycznie zmodyfikowanych (Dz. U. 2001.76.811 z dnia 25 lipca 2001 r.).
45. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 8 lipca 2002 r. (poz. 943 i 944).
46. Dyrektywa 2001/204/WE z dnia 8 marca 2001 r.
47. Dyrektywa 2001/18/WE z dnia 12 marca 2001 r.
48. Dyrektywa 2009/41/WE z dnia 6 maja 2009 r.

Mgr Daniel WASILKOWSKI – doktorant w Katedrze Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego. Stypendysta projektu DoktoRIS – Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska. Zainteresowania naukowe: biotechnologia środowiska, biochemia, biologia molekularna mikroorganizmów, biomonitoring. Współautor 2 rozdziałów w monografiach, 5 referatów i 3 posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych.

[dwasilkowski@us.edu.pl](mailto:dwasilkowski@us.edu.pl), (32) 200 94 62

Mgr Żaneta SWĘDZIOŁ – doktorantka w Katedrze Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Zainteresowania naukowe: mikroorganizmy modyfikowane genetycznie, bioaugmentacja gleb, bakteryjne kwasy tłuszczowe. Współautorka 1 rozdziału w monografii, 3 artykułów eksperymentalnych, 3 referatów i 4 posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych. Była stypendystka Projektu „Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy” w roku akademickim 2010/2011.

[zswedziol@us.edu.pl](mailto:zswedziol@us.edu.pl), (32) 200 94 62

Dr hab. Agnieszka MROZIK – adiunkt w Katedrze Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Specjalizuje się w biochemii drobnoustrojów. Główne zainteresowania naukowe to rozkład związków aromatycznych przez bakterie, bioaugmentacja gleb skażonych związkami fenolowymi, zmiany w składzie bakteryjnych kwasów tłuszczowych w obecności różnych ksenobiotyków, fitoremediacja. Współautorka 42 artykułów przeglądowych i oryginalnych, autorka 1 monografii, współautorka referatów i posterów na 21 konferencjach krajowych i 7 międzynarodowych.

[agnieszka.mrozik@us.edu.pl](mailto:agnieszka.mrozik@us.edu.pl), (32) 200 94 62