

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Remediace těžkých kovů z kontaminovaných půd
pomocí bakterií**

Jana Voříšková

Školitel: RNDr. Irena Lichá, CSc.

2006 / 2007

Abstrakt

V důsledku lidské činnosti se koncentrace kovů v prostředí neustále zvyšuje. Nejzávažnější hrozbu nejen pro životní prostředí, ale především pro lidské zdraví představují kovy s toxickými vlastnostmi. V několika posledních letech jsou pro remediaci životního prostředí stále více používány biologické metody využívající některých vlastností především mikroorganismů, hub a rostlin. Tyto metody přinášejí v porovnání s fyzikálními a chemickými metodami určité výhody. Mikroorganismy disponují řadou vlastností, které jim udělují jistý stupeň tolerance k toxickým kovům. Některé z těchto mechanismů lze využít pro remediaci prostředí. Mezi tyto mechanismy patří biosorpce (a s tím související imobilizace) kovů nebo jejich iontů pomocí specifických proteinů (obvykle metallothionenů), reduktivní precipitace kovů a také biotransformace toxických iontů do méně toxické formy. Rozvoj molekulární biologie přináší řadu možností pro zlepšení žádoucích vlastností mikroorganismů a jejich enzymatických aktivit vhodných pro bioremediační přístupy. Zejména v několika posledních letech byla provedena řada pokusů využívajících genetickou modifikaci mikroorganismů, které potvrdily prospěšnost vývoje tímto směrem.

Abstract

The concentration of metals in the environment still increase as a consequence of human activities. The metals with toxic features represent a large threat not only for our environment, but above all for a human health. A biological methods exploiting some features of microorganisms, fungi and plants for remediation of environment have been widely used in several last years. These methods bring the specific advantages in comparison with physical and chemical methods. Microorganisms dispose of a range of features, which confer upon them a certain degree of tolerance to the toxic metals. It is possible to exploit some of these mechanisms for the remediation of environment. These mechanisms include biosorption (and thus immobilisation) of the metals or a matching ions by means of specific proteins (frequently a metallothionein), the reductive precipitation of the metals and also the biotransformation of toxic ions into a less noxious form. A development of the molecular biology brings a range of possibilities for an improvement desirable features of microorganisms and their enzymatic activities suitable for bioremediation approaches. Primarily in several last years a range of experiments, which exploit the genetic engineering of microorganisms, have been performed. These experiments have confirmed usefulness of development in this trend.

Klíčová slova:

Remediace, bakterie, těžké kovy, rezistence ke kovům, biosorpce, precipitace, enzymatická transformace, genetické modifikace

Obsah:

1. ÚVOD	5
2. REMEDIACE	6
3. TĚŽKÉ KOVY	7
4. MECHANISMY RESISTENCE BAKTERIÍ K TĚŽKÝM KOVŮM.....	7
5. BIOSORPCE KOVŮ BAKTERIEMI	11
5.1. GENETICKÉ MODIFIKACE BAKTERIÍ ZLEPŠUJÍCÍ BIOSORPCI KOVŮ	11
6. PRECIPITACE KOVŮ POMOCÍ BAKTERIÍ.....	14
6.1. PRECIPITACE VE FORMĚ SULFIDŮ	15
6.2. PRECIPITACE VE FORMĚ FOSFOREČNANŮ	17
7. ENZYMATICKÁ TRANSFORMACE KOVŮ NA MÉNĚ TOXICKOU FORMU	18
7.1. GENETICKÉ MODIFIKACE BAKTERIÍ ZLEPŠUJÍCÍ JEJICH SCHOPNOST ENZYMATICKÉ TRANSFORMACE KOVŮ	21
8. ZÁVĚR	23
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	24

1. Úvod

V okolním prostředí (voda, půda) se přirozeně nacházejí téměř všechny kovy. Mnohé z nich jsou pro život ve stopových množstvích nepostradatelné, ale ve vyšších koncentracích mohou negativně působit na organismy. V důsledku lidské činnosti se koncentrace kovů v prostředí neustále zvyšuje. Jedná se zejména o průmyslovou činnost, dopravu, těžbu a úpravu nerostných surovin, energetiku a zemědělství, kde významný problém představuje používání velkého množství průmyslových hnojiv. Nejzávažnější problém představují kovy s toxickými vlastnostmi, které patří mezi nejvýznamnější anorganické kontaminanty půd a vod. Mezi typické příklady toxických kovů patří kadmium, měď, chrom, zinek, uran, olovo, rtuť, nikl a polokov arsen. Zejména zvýšená koncentrace rtuti, kadmia a chromu představuje v současnosti jedno z neaktuálnějších rizik. Toxické kovy mají negativní dopad nejen na životní prostředí, ale především na lidské zdraví. Dekontaminace oblastí znečištěných toxickými kovy představuje jeden z důležitých předmětů výzkumu současné vědy. Čištění takto znečištěných oblastí fyzikálně-chemickými metodami je finančně značně nákladné a často neekologické, proto se zejména v posledních letech přistupuje k vývoji technologií využívajících biologické systémy. Aplikace biologických postupů při odstraňování těžkých kovů z prostředí představuje nový způsob řešení této problematiky. Živými organismy nejvíce využívanými k odstraňování kovů z prostředí jsou bakterie, houby a rostliny. Jednotlivé technologie jsou založené buď na použití přirozeně se vyskytujících nebo geneticky modifikovaných organismech.

2. Remediacce

Termín remediacce obecně znamená poskytnutí nápravy. Remediacce životního prostředí se zabývá odstraňováním znečišťujících látek (kontaminantů, polutantů) převážně z půd, sedimentů, podzemní a povrchové vody. K odstraňování kontaminant z prostředí se používají fyzikální, chemické a biologické metody. Zejména v posledních letech se pro remediaci životního prostředí stále více využívají biologické metody (bioremediace) založené na biodegradačních schopnostech mikroorganismů, hub a rostlin. Pomocí bioremediačních technologií je zvyšována přirozená biodegradační schopnost organismů.

Obecně můžeme remediační techniky rozdělit na přímé (in situ) a nepřímé (ex situ). In situ remediacce probíhají přímo na kontaminovaném místě, podléhají tedy řadě faktorů, které mohou být v laboratoři eliminovány. Při ex situ remediacích dochází k odčerpání kontaminovaného materiálu z původního místa (to zvyšuje náklady), ale průběh biodegradace je možno lépe kontrolovat. Bioremediace přináší oproti fyzikálním a chemickým metodám několik výhod. Například jednoduchost aplikace, vyšší specifita, vhodnost pro in situ metody a také nižší cena.

Biologické přístupy je možné použít pro biodegradaci organických polutantů (např. ropa a ropné deriváty, uhlovodíky, pesticidy, halogenované sloučeniny, polychlorované bifenyly) a anorganických polutantů (těžké kovy).

Použití termínu bioremediace nebo biodegradace pro dekontaminaci míst znečištěných těžkými kovy pomocí biologických postupů se může zdát být nesprávné, protože pomocí žádného procesu není možné degradovat a tedy z prostředí zcela odstranit kovy stejně tak jako ostatní prvky. Kovy nejsou biodegradovatelné a mohou být pouze transformovány z jednoho chemického stavu do jiného (Ledin, 2000). Nicméně pomocí mikroorganismů lze kovy imobilizovat nebo snížit jejich toxicitu převedením do méně toxické formy a tím zbavit prostředí jejich negativního účinku. Myslím si, že použití termínu bioremediace je v tomto případě správné, protože při 'poskytování nápravy' v kontaminovaném prostředí, jsou použity biologické postupy.

Současný rychlý rozvoj molekulární biologie, mikrobiologie a genetiky dává řadu možností pro zlepšení vlastností mikroorganismů a jejich enzymatických aktivit vhodných pro bioremediační přístupy. Zejména v několika posledních letech byla provedena řada pokusů využívajících genetickou modifikaci mikroorganismů, které potvrdily prospěšnost vývoje tímto směrem.

3. Těžké kovy

Těžké kovy jsou definovány jako kovy s hustotou vyšší než 5g/cm^3 . Konkrétně jsou to prvky nacházející se v periodické soustavě prvků mezi titanem (Ti) a selenem (Se), mezi yttriem (Y) a tellurem (Te) a mezi baryem (Ba) a astatem (At). Lanthanoidy a aktinoidy mohou být také počítány mezi těžké kovy.

Většina těžkých kovů jsou přechodné prvky s neúplně zaplněnými d-orbitaly. Takovéto d-orbitaly umožňují kationtům těžkých kovů vytvářet komplexní sloučeniny, které mohou být redoxně aktivní. Některé těžké kovy (například měď, železo) jsou při nižších koncentracích pro organismy nezbytné, protože jsou nutné pro správnou funkci některých enzymů a pro správný průběh určitých biochemických reakcí probíhajících v organismech. Při zvýšené koncentraci těžkých kovů dochází v buňkách k tvorbě nespecifických komplexních sloučenin, které mají na buňku toxický efekt. Dojde ke spuštění pro buňku nepříznivých reakcí; v těchto reakcích může dojít například k tvorbě toxických hydroxilových radikálů. Vzniklé hydroxilové radikály jsou vysoce reaktivní molekuly a hrají roli v řadě, pro organismus negativních, reakcích. V organismu reagují s některými molekulami, což má za následek změnu struktury a funkce těchto molekul. Například jejich reakce s lipidy má za následek rozrušení membrány. Mohou také oxidovat proteiny a tím je inaktivovat.

Kationty některých těžkých kovů, například Hg^{2+} , Cd^{2+} a Ag^{2+} vytváří silně toxické komplexní sloučeniny, které mají negativní vliv na řadu fyziologických funkcí. Ionty kovů jako jsou například Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} nebo Cu^{2+} jsou pro organismy toxické ve vyšších koncentracích.

Intracelulární koncentrace jakýchkoliv kovových iontů musí být buňkou striktně regulována. Tato regulace je zprostředkována řadou regulačních mechanismů, které jsou nezbytné pro každou živou buňku.

4. Mechanismy resistance bakterií k těžkým kovům

Různé organismy disponují rozdílnými resistenčními mechanismy, které jim udělují jistý stupeň tolerance ke kovům. Eukaryota jsou obecně daleko více senzitivní k toxickému efektu kovů než bakterie a jejich typickým mechanismem pro regulaci intracelulární koncentrace kovových iontů je exprese metallothioneinů (MTs). MTs jsou skupina proteinů s nízkou molekulární hmotností, bohatých na cystein, které jsou schopny vázat ionty kovů. Tyto proteiny

jsou široce rozšířeny mezi žijícími organismy a jsou to vysoce konzervované struktury u savců, rostlin a hub. Předpokládá se, že MTs vytváří hlavní mechanismus, který chrání eukaryota před kovy. U prokaryot byly nalezeny struktury podobné eukaryotickým MTs. Například u bakterie *Synechococcus* byl nalezen SmtA protein. Tento protein vykazoval určitou podobnost k eukaryotickým MTs a uděloval bakterii rezistenci k iontům Zn^{2+} a Cd^{2+} (Blindauer et al., 2001). Nicméně takovéto mechanismy nepatří u bakterií k hlavním mechanismům tolerance ke kovům a představují u prokaryot spíše výjimku.

Největší skupinu mechanismů rezistence ke kovům představují systémy, které za spotřeby energie aktivně čerpají ionty kovů ven z buňky. Systémy čerpající kovové ionty ven z buňky lze rozdělit na systémy vyžadující pro svojí funkci energii získanou hydrolyzou ATP (ATPasy) a systémy založené na chemiosmotické výměně iontů kovů za protony.

Dalším způsobem kterým bakterie odolávají zvýšené koncentraci kovů je biosorbce. Termínem biosorbce je označována vazba těžkých kovů buněčnými komponentami. Tímto způsobem dojde k imobilizaci kovu a tím snížení jeho toxicity. Precipitace kovů bakteriemi je další možností, kterou mohou některé bakterie imobilizovat kovy. Při precipitaci dochází k redukci kovu do nižšího redoxního stavu pomocí jistě enzymatické aktivity. Tím je kov imobilizován a v této podobě nahromaděn na buněčném povrchu. K reduktivní precipitaci kovů může docházet u některých bakterií při určitých metabolických procesech.

Biosorbce a precipitace jsou jevy, které se značně překrývají a není vždy možné jednoznačně určit, jak velký příspěvek má daný jev k imobilizaci kovu.

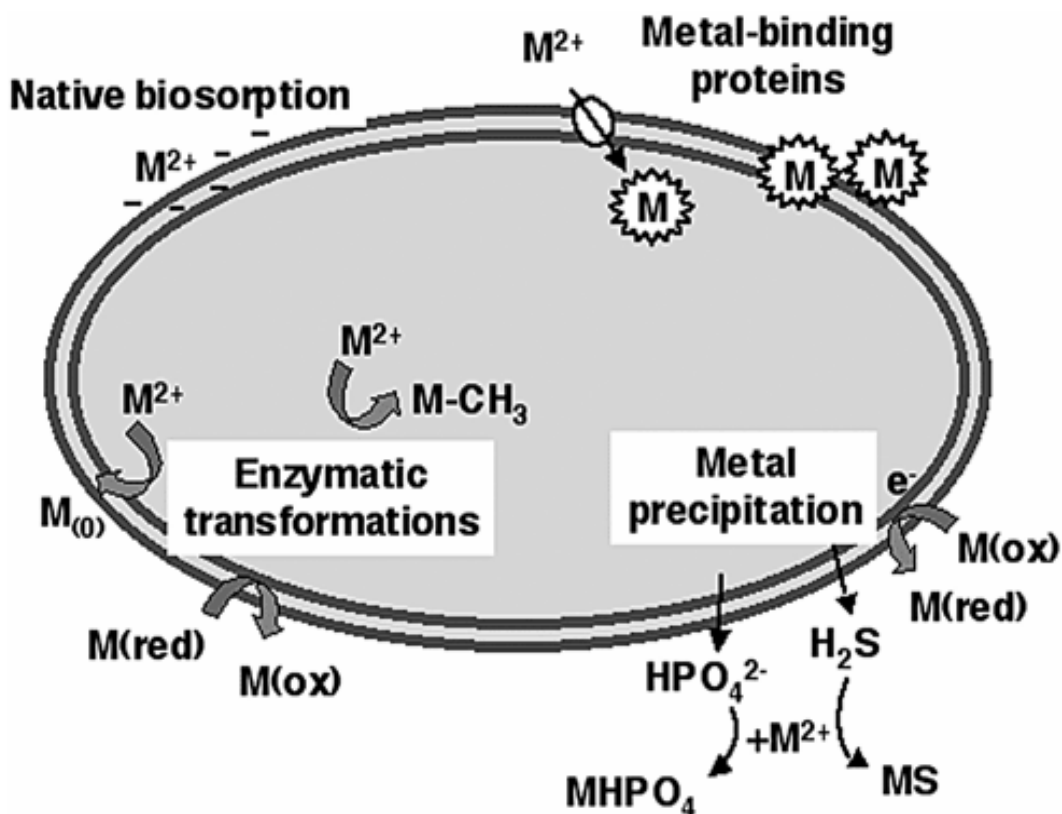
Bakterie jsou schopné exprimovat řadu enzymů. Různé druhy bakterií se projevují různou enzymatickou aktivitou. Některé z enzymů, kterými bakterie disponují jsou vhodné pro enzymatickou transformaci (přeměnu) některých kovů. Nejvýznamnější enzymatické aktivity, kterými jsou bakterie schopné transformovat kovy jsou oxidace, redukce, methylace, alkylace. Některé enzymatické reakce vedou k již výše zmiňované precipitaci popřípadě biosorbci kovů bakteriemi. Enzymatická transformace rtuti je široce studovaným mechanismem bakteriální rezistence k tomuto kovu. Při této enzymatické přeměně je rtuť redukována na méně toxickou formu, tímto procesem dojde k její mobilizaci a uvolnění z prostředí, ve kterém se bakterie vyskytuje. Většina těchto mechanismů se stává funkčními až při určité koncentraci kovových iontů. Geny pro tyto mechanismy, které udělují bakteriím rezistenci ke kovům, jsou velmi často kódovány plazmidy, což usnadňuje jejich šíření mezi bakteriemi.

Některé bakterie jsou přirozeně vysoce rezistentní ke zvýšené koncentraci těžkých kovů. Klasický příklad takovéto bakterie je *Ralstonia metallidurans* CH34 (dříve *Alcaligenes eutropus* CH34). Tyto bakterie jsou velmi často nalézány ve znečištěných lokalitách, kde se vyskytuje odpad z hutnického průmyslu. Při genetické analýze bakterie *R. metallidurans* CH34 bylo nalezeno několik operonů udělujících této bakterii rezistenci k devíti různým těžkým kovům. Tyto operony byly lokalizovány na dvou plazmidech pMOL28 a pMOL30. Menší plazmid pMOL28 nese operony s geny pro rezistenci k niklu, chromu, rtuti, thalliu a k nižším koncentracím kobaltu. Větší plazmid pMOL30 nese genetické determinanty, které udělují bakterii rezistenci k kadmii, zinku, rtuti, mědi, olovu, thalliu a k vyšším koncentracím kobaltu (Mergeay et al., 1985; Taghavi et al., 1997). Geny vykazující vysokou homologii k některým genům *Ralstonia metallidurans* CH34 jež jsou u této bakterie zodpovědné za rezistenci k těžkým kovům byly nalezeny u řady dalších bakterií, které byly izolovány z půdy ze zvýšeným obsahem kovů. Tyto bakterie vykazovali rezistenci k řadě kovových iontů (například k iontům olova, rtuti, chromu, kadmia....). Nejpravděpodobnější mechanismus, kterým lze vysvětlit vysokou homologii genů, které udělovali rezistenci ke kovům výše zmiňovaným izolovaným bakteriím, ke genům bakterie *Ralstonia metallidurans* CH34, je horizontální přenos genů mezi bakteriálními společenstvy (Abou-Shanab et al., 2007).

Další skupina bakterií, která je obecně známá pro svoji metabolickou všestrannost a schopnost přežít v přítomnosti některých organických a anorganických polutantů, je rod *Pseudomonas*. Konkrétně druh *Pseudomonas fluorescens* má účinný systém pro detoxifikaci průmyslového odpadu a byl izolován z vody a půdy kontaminované kovy. Zvýšená koncentrace kovů (olovo, měď, kobalt) neměla přímý efekt na růst buněk, ale došlo ke změně v expresi proteinů nezbytných pro přežití a odpověď na stres (Sharma et al., 2006).

Také sulfát redukující bakterie vykazují jistý stupeň tolerance ke kovům jako vedlejší důsledek jejich metabolismu. Sulfát redukující bakterie jsou anaerobní heterotrofové využívající řadu organických látek a SO_4^{2-} (síranový, sulfátový anion) jako terminální akceptory elektronů. Redukcí síranů pomocí těchto bakterií dochází ke vzniku sulfidů. Produkce sulfidů kovů vede k precipitaci kovu a tím k jeho imobilizaci. Nerozpustné sulfidy kovů mohou být odstraněny sedimentací nebo filtrací. Vyprodukované sulfidy pomocí sulfát redukujících bakterií hrají významnou roli při imobilizaci kovů v sedimentech, ale také může být tato schopnost bakterií využita při odstraňování kovů ze znečištěné vody. Většina z těchto bakterií může také oxidovat

elementární síru nebo některé sloučeniny síry, například siřičitany a thiosíranu. U sulfát redukujících bakterií je také poměrně běžná enzymatická redukce kovů (De Luca et al., 2001). Dále byly u těchto bakterií nalezeny nukleotidové sekvence s vysokou homologií k sekvencím kódující metallothioneiny a také ATPasy sloužící k čerpání kovů ven z buněk (Chang et al., 2004; Naz et al., 2005). Tyto mechanismy přispívají k adaptaci těchto bakterií na prostředí s toxickými kovy. Dalším příkladem bakterií, které jsou schopné odolávat vysokým koncentracím kovů jsou bakterie oxidující železo a síru (například rod *Thiobacillus*).



Obr.1: Toto schéma shrnuje, jakými způsoby jsou bakterie schopné vyrovnat se s toxickými koncentracemi kovů (M). Tyto mechanismy zahrnují intra- a extra- celulórní vazbu (a s tím související imobilizaci) kovů nebo jejich iontů pomocí specifických proteinů (obvykle metallothioneinů), biotransformaci toxických iontů do méně toxické formy a také precipitaci kovů. Převzato z Valls and Lorenzo (2002).

Bakterie tedy disponují širokým spektrem mechanismů, které jim udělují resistenci ke kovům (Obr.1). Různé skupiny bakterií si v průběhu evoluce vyvinuly mechanismy, které jim umožňují vyrovnat se s určitou koncentrací toxických kovů v různých prostředích. Některé z těchto bakteriálních činností se zdají být slibnými prostředky pro bioremediaci míst kontaminovaných těžkými kovy.

5. Biosorpce kovů bakteriemi

Při biosorpci kovů bakteriemi dochází k vazbě kovů buněčnými komponentami. Jedná se o pasivní proces, proto může být pro biosorpci použita živá i neživá mikrobiální biomasa. Například v pokusu Green-Ruize (2006) byla pozorována adsorpce Hg^{2+} iontů nacházejících se v roztoku, pomocí neživé biomasy *Bacillus* sp. V současnosti je biosorpce jeden z nepraktičtějších a široce používaných přístupů pro bioremediaci kovů. Sorpce kovů do neporušených buněk nebo mikrobiální biomasy je řízena rozmanitými mechanismy, které jsou navzájem propojeny a nejsou zatím vždy zcela objasněny. Sorpce kovů buňkami je zřejmě velmi důležitá ve všech interakcích mezi mikroorganismy a kovy.

Pro sorpci kovů lze také použít syntetické kaučuky se schopností výměny iontů. Nicméně metody biosorpci za pomoci bakterií se zdají být efektivnější a to zvláště při nižších koncentracích kovů (Byrnes-Brower et al., 1997). Biosorbenty jsou také specifitější než syntetické materiály, tudíž se vyhneme problému se zahlcováním vazebných míst kovy alkalických zemin, které jsou ve znečištěném prostředí přítomné. Další výhodou biologických systémů je možnost jejich genetických modifikací, kterými může být zvýšena efektivnost systému a také specifita k určitému iontu kovu.

5.1. GENETICKÉ MODIFIKACE BAKTERIÍ ZLEPŠUJÍCÍ BIOSORPCI KOVŮ

Slibná technologie pro rozvoj biosorpci pomocí mikroorganismů je exprese eukaryotických metallothioneinů (MTs) v bakteriích. Například lidské jaterní MTs byly exprimovány v bakterii *Escherichia coli*. Cytoplazmatickou produkcí těchto MTs došlo k trojnásobnému až pětinasobnému vzrůstu bioakumulace kadmia a mědi bakterií (Romeyer et al., 1988). Cytoplazmatická exprese MTs přináší určité problémy. Absorpce kovů do buňky je značně limitována a také intracelulární akumulace kovu je spojena s toxicitou pro buňku. Tomuto

problému se lze vyhnout expresí MTs v periplazmatickém prostoru nebo na povrchu buňky. Exprese MTs na buněčných površích umožňuje používání neživých buněk a při regeneraci systému dochází k účinnější desorpci navázaných kovů. Sousa a kolegové (1998) popisují ve své práci expresi kvasinkového a savčího MT na povrchu *Escherichia coli*. MTs byli exprimovány ve spojení s proteinem lokalizovaným na vnější straně membrány – LamB (LamB je struktura, kterou prochází maltosa skrz vnější membránu a zároveň je to receptor pro lambda fága). Exprese tohoto hybridního proteinu měla za následek 15-20ti násobně zvýšenou vazbu Cd^{2+} ve srovnání s wild-type protějškem. Exprese MTs na buněčném povrchu organismů jako jsou například *Pseudomonas* by se v budoucnosti mohla stát slibnou bioremediační strategií.

Alternativní možností k expresi proteinů vázajících kovy na buněčném povrchu je konstrukce rekombinantních bakterií, u kterých budou MTs exprimovány v cytoplazmě a zároveň dojde k expresi transportních systémů pro daný kov v buněčné membráně. Tímto postupem se obejde problém, kdy buněčná membrána značně limituje absorpci kovů do buňky. Nicméně tento postup je možné použít jen pro kovy, pro které existují importní systémy. Chen a Wilson (1997) ve svých studiích používají geneticky modifikovanou bakterii *Escherichia coli*, která zároveň exprimuje MTs v cytoplazmě a MerT a MerP, což jsou transportní proteiny, které transportují Hg^{2+} přes buněčnou membránu (podrobnější popis funkce MerT a MerP je dále v textu). Pro pokus byly použity MTs ze *Saccharomyces cerevisiae* a hrachu, které byly exprimovány v *Escherichia coli*. U *E. coli* bez MTs a bez transportního systému pro Hg^{2+} nebyla zaznamenána žádná výrazná akumulace Hg^{2+} . V přítomnosti pouze Hg^{2+} transportního systému intracelulární akumulace Hg^{2+} významně stoupla. Bakterie, které exprimovaly transportní proteiny a zároveň MTs, akumulovaly asi 5ti násobně více Hg^{2+} než bakterie s transportními proteiny ale bez MTs. Bioakumulace rtuti je tedy srovnatelná s akumulací, kdy je vazebný protein exprimován na povrchu buňky.

Jinou možností zlepšení biosorpce kovů bakteriemi je *de novo* syntéza proteinů vázajících kovy. Tyto proteiny se vyznačují vyšší stabilitou, lepší afinitou a selektivitou vůči těžkým kovům. Peptidy s vysokým obsahem cysteinu nebo histidinu jsou známé svojí schopností vázat kovové ionty. Gen kódující *de novo* syntetizovanou peptidovou sekvenci obsahující motiv schopný vázat kovy, byl chemicky syntetizován a exprimován v periplazmatickém prostoru bakterie *Escherichia coli*. Motiv schopný vázat kovy byl opakující se motiv (Cys-Gly-Cys-Cys-Gly)₃. Buňky, které exprimovaly tento peptid vykazovaly desetinásobně zvýšenou vazbu Hg^{2+} a

Cd^{2+} v porovnání s kontrolními buňkami, které tento peptid neexprimovaly (vazba Cu^{2+} a Pb^{2+} byla také zvýšená v porovnání s kontrolními buňkami, ale rozdíl nebyl tak veliký jako v případě Hg^{2+} a Cd^{2+}). Dále bylo pozorováno, že buňky exprimující protein schopný vázat kovy, efektivně a selektivně odstraňovaly Cd^{2+} a Hg^{2+} z roztoku, kde byla již počáteční koncentrace těchto kovů velice nízká (part per billion) (Pazirandeh et al., 1998). Další pokus zabývající se syntézou nových proteinů vázajících kovy je pokus, při kterém byl vytvořen syntetický multidoménový polypeptid, který byl exprimován v periplazmatickém prostoru *Escherichia coli*. Tento polypeptid obsahoval tandemové repetice z genu pro MT z eukaryotního organismu *Neurospora crassa*. Bylo zkoumáno, jaký vliv má exprese tohoto peptidu na akumulaci kovu ($^{109}\text{Cd}^{2+}$) buňkami. Buňky, které obsahovaly jednu MT kov vázající doménu, vykazovaly asi desetkrát vyšší schopnost vazby Cd^{2+} než kontrolní buňky, které tuto doménu neexprimovaly. Nejvíce vázaly kov buňky, které obsahovaly nonamer výše zmiňovaného polypeptidu. Tyto buňky byly schopné vázat až 6,5x více Cd^{2+} než ekvivalentní množství buněk exprimující protein pouze s jednou doménou schopnou vázat kovy a měly tedy asi 65ti násobně zvýšenou schopnost vazby kovů vzhledem k buňkám *Escherichia coli*, které neexprimovaly žádný rekombinantní MT (Mauro a Pazirandeh, 2000).

Další možností jak získat nové peptidy, které jsou schopné vázat kovy, je selekce různých peptidů z proteinových knihoven pomocí phage-display techniky. Phage-display je technika, při které může být prozkoumáno miliony krátkých peptidů na základě jejich vazby k protilátkám, receptorům nebo jiným vazebným proteinům. Knihovna je směs velkého počtu klonů bakteriofágů, kde jednotliví fágové exprimují určitý gen ve spojení s plášťovým proteinem, takže každý fág vystavuje na svém povrchu jednu peptidovou sekvenci. Bakteriofág, který se pevně naváže k určitému vazebnému proteinu (protilátce nebo receptoru), je následně pomnožen například v *Escherichia coli*. Aminokyselinové sekvence peptidů, které jsou vystavovány na površích bakteriofágů, jsou zjištěny osekvenováním odpovídajících úseků virové DNA (Scot and Smith, 1990). Mejare se svými spolupracovníky (1998) ve svém pokusu využili phage-display techniku pro nalezení a izolaci nových hexapeptidů, které jsou schopny vázat kadmium. Při separaci byl použit gel, na kterém byly imobilizovány ionty kovu. Z knihovny byly vyselektováni fágové, kteří měli afinitu ke kadmiu; peptidy, které nesli na svých površích, nevykazovaly žádnou homologii s metalothioneiny a nejhojnější, aminokyseliny v těchto peptidech schopných vázat kadmium, byly leucin a serin. Peptid, který vykazoval nejsilnější

afinitu ke kovovým iontům byl klonován do bakterie *Escherichia coli* a exprimován na jejím povrchu. Buňky *E. coli* exprimující tento peptid měly zvýšenou schopnost přežití v mediu s toxickou koncentrací CdCl_2 v porovnání s buňkami, které tento peptid neexprimovaly.

V jiné studii byla peptidová sekvence schopná vázat kovy vystavena na fimbriích (typ 1) *E. coli*. Fimbrie typu 1 jsou povrchové orgány, které jsou zodpovědné za vazbu k různým povrchům. Adheze je zprostředkována proteinem FimH. V sekvenci tohoto proteinu bylo identifikováno permisivní místo, kam mohou být vloženy různé peptidové sekvence, které jsou poté vystaveny na povrchu (vlození peptidové sekvence nemá vliv na funkci a strukturu FimH). Takto byla vytvořena peptidová knihovna (asi 40 milionů klonů), ze které byly řadou selekcí vyselektovány takové klony, které byly schopné vázat Zn^{2+} . Sekvence vyselektovaných peptidů nevykazovaly žádnou homologii k již známým proteinům schopným vazby Zn^{2+} . Pokud byl místo FimH použit jiný nosný protein pro peptid, schopnost absorpce byla zachována. Z toho vyplývá, že vazba Zn^{2+} je závislá na inzertovaném peptidu a nikoliv na nosném proteinu (Kjaergaard et al., 2001).

6. Precipitace kovů pomocí bakterií

Jedna z široce studovaných forem bioremediace kovů je mikrobiální redukce Cr^{6+} na Cr^{3+} . Například McLean a Beveridge (2001) ve své práci popisují redukci rozpustného toxického Cr^{6+} na nerozpustný Cr^{3+} pomocí bakteriálního rodu *Pseudomonas* za aerobních a anaerobních podmínek. Dále bylo zjištěno, že tato bakterie je tolerantní k Cr^{6+} a schopná jeho redukce i v přítomnosti dalších toxických kovů (měď, arsen). Enzym, který je zodpovědný za redukci chromu (reduktáza), je syntetizován v cytoplazmě, kde se také nachází v relativně velkém množství a vytváří tam zásobárnu. V případě průniku Cr^{6+} do buňky slouží k jeho detoxifikaci. Z cytoplazmy se může malé množství enzymu dostávat do periplazmatického prostoru nebo může být enzym sekretován vně buňky. Redukovaný Cr^{3+} se poté může navázat na záporně nabitě funkční skupiny na buněčném povrchu.

Řada studií ukazuje, že k redukci Cr^{6+} lze také využít organické polutanty, jako jsou například aromatické sloučeniny. Tyto organické sloučeniny jsou vhodnými donory elektronů pro redukci Shen et al. (1996). Z takovýchto studií vyplývá, že pomocí vlastností některých mikroorganismů může zároveň docházet k remediaci organických polutantů a Cr^{6+} . Šestimocný chrom se vyskytuje v podobě chromanů (CrO_4^{2-}) a dichromanů ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Chromanové anionty vykazují

značnou analogii k síranovým aniontům (SO_4^{2-}). Naskytuje se tedy možnost využití enzymaticky zprostředkované reduktivní precipitace pomocí bakterií redukujících sulfát. Až asi 90% chromu bylo během 48 hodin odstraněno z roztoku pomocí smíšené kultury bakterií redukujících sulfát, která tvořila biofilm (Smith and Gadd, 2000). Biofilmy těchto bakterií mohou být také využity pro znovuzískávání chromu. Reduktivní precipitací pomocí sulfát redukujících bakterií může být redukován nejen chrom, ale i další toxické kovy (například U^{6+} a Tc^{7+}).

Reduktivní precipitace, ale i další procesy, při kterých dochází k redukcí kovů, jsou katalyzovány cytochromem c. Cytochrom c je základní komponenta elektron transportního řetězce a u širokého spektra organismů je to vysoce konzervovaná struktura. Může být oxidován a redukován, ale neváže kyslík. Jeho hlavní úloha spočívá v transportu elektronů mezi komplexem III a komplexem IV. Cytochrom c je u bakterií vázaný na periplazmatickou stranu cytoplazmatické membrány. Z bakterie schopné redukovat sulfát *Desulfuromonas acetooxidans* byl do jiné sulfát redukující bakterie *Desulfovibrio desulfuricans* klonován a exprimován gen kódující cytochrom c_7 . Cytochrom c_7 je u sulfát redukujících bakterií pravděpodobně terminální oxidáza v řetězci transportu elektronů vedoucího ke vzniku elementární síry. Toto klonování mělo za následek, že u *Desulfovibrio desulfuricans* došlo ke zvýšení reduktásové aktivity (Aubert et al. 1998). Nadprodukce cytochromu c_7 u modifikovaných bakterií a s tím související zvýšená schopnost redukce kovů může být dobře využita pro remediaci.

6.1. PRECIPITACE VE FORMĚ SULFIDŮ

Další studie týkající se sulfát redukující bakterie *Desulfovibrio desulfuricas* se zabývaly její schopností spojovat oxidaci řady donorů elektronů s redukcí Tc^{7+} . Touto reakcí bylo technecium precipitováno na nerozpustný oxid o nízkém oxidačním čísle. Substrát, kterým byla bakterie schopna nejefektivněji redukovat technecium, byl vodík. Ze studie vyplývá, že za redukcí technecia je zodpovědná hydrogenáza. Hydrogenáza je obecně enzym, který reverzibilně katalyzuje oxidaci vodíku a tato reakce je spojena s redukcí akceptoru elektronu, což může být například kyslík, dusičnan, síran,...a ve výše zmíněném případě i technecium. U sulfát redukujících bakterií je periplazmatický prostor místem s vysokou hydrogenázovou aktivitou. S tím souvisí pozorování precipitace Tc na okraji buněk, která zřejmě přímo souvisí s enzymatickou aktivitou periplazmatické hydrogenázy. K podpoření této hypotézy přispěl pokus, kdy byly bakterie *Desulfovibrio desulfuricas* inkubovány s Cu^{2+} ionty. Měďnaté ionty selektivně

inaktivují hydrogenázu lokalizovanou v periplazmě, nikoliv však cytoplazmatickou hydrogenázu. Takto inkubované buňky ztratily svoji schopnost redukovat Tc^{7+} (Lloyd et al., 1999).

Labrens se svými spolupracovníky (2000) pozorovali tvorbu nánosu, který byl tvořen ZnS (sfalerit), pomocí biofilmu aerotolerantních bakterií patřících do skupiny *Desulfobacteriaceae*. V biofilmu, který tvořily tyto bakterie, docházelo ke koncentraci zinku a tím k jeho odstraňování z podzemní vody. Precipitované sulfidy kovů tvořící nános na povrchu biofilmu, mohou být následně vychytávány pomocí extracelulárně produkovaných polymerů. Tyto polymery jsou tvořeny směsicí polysacharidů, mukopolysacharidů a proteinů, jejichž složení je variabilní v závislosti na bakteriálních druzích vyskytujících se v kultuře a na kultivačních podmínkách. Produkce a akumulace výše zmiňovaných exopolymérů bakteriálním biofilmem je indukována přítomností sulfidů kovů (White and Gadd, 2000).

Využití sulfát redukujících bakterií pro remediaci těžkých kovů se potýká s několika problémy. Přítomnost některých kovových iontů snižuje reduktivní schopnosti těchto bakterií. Například přítomnost Cd^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} iontů snižuje schopnost redukce sulfátu o více než 50% (Fang et al., 2002). Další překážka, která brání rozsáhlejšímu využití sulfát redukujících bakterií při odstraňování toxických kovů z prostředí je inhibice dráhy, která je zodpovědná za redukci síranu, kyslíkem. Redukce síranů je tudíž efektivní jen za anaerobních podmínek. Nicméně nejen sulfát redukující bakterie jsou schopné odstraňovat kovy pomocí precipitace sulfidů kovů. Jeden z prvních pokusů týkající se této problematiky uskutečnil Bang se svými spolupracovníky (2000). Z několika známých bakteriálních systémů, které generují sirovodík byl pro tento pokus vybrán gen *phsABC* kódující thiosíranreduktázu, který pocházel z bakterie *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Tento gen byl exprimován v bakterii *Escherichia coli*, která je lépe schopna odolávat stresu vyvolaným přítomností toxických kovů. Thiosíranreduktáza je enzym, který se poměrně běžně vyskytuje u bakterií a katalyzuje redukci thiosíranů na sirovodík a siřičitany. Thiosíranreduktáza v rekombinantní buňkách *Escherichia coli* exprimujících gen *phsABC* vykazovala vyšší aktivitu za aerobních i anaerobních podmínek a bakterie tudíž produkovala více sirovodíku, pomocí něhož docházelo k precipitaci kovu. Byla zde také pozorována korelace mezi množstvím produkovaného sirovodíku a množstvím kadmia, které bylo odstraněno z media. Buňky, které produkovaly více sirovodíku, mohly účinněji precipitovat kadmium v podobě sulfidu kadmia a tím kadmium odstraňovat z media. Sulfidy ze síranů jsou také vytvářeny při asimilační redukci síranů pro syntézu cysteinu a methioninu. Redukce síranu

touto cestou může probíhat za různých kultivačních podmínek, není tudíž limitována aerobními podmínkami. Wang se svými spolupracovníky (2000) geneticky upravili bakterii *Escherichia coli* tak, aby byla schopná produkce sulfidů za aerobních podmínek. Do bakterie byly vloženy geny kódující serinacetyltransferázu a cysteindesulfhydrasu z *Treponema denticola*. Acetyltransferáza je enzym, který katalyzuje acetylaci serinu, acetylserin je poslední prekurzor cysteinu. Cysteindesulfhydrasa je aminotransferáza, která katalyzuje přeměnu cysteinu na pyruvát, amoniak a sirovodík. Takto modifikovaná bakterie produkovala zvýšené množství cysteinu a tento nadbytek byl následně přeměněn pomocí cysteindesulfhydrasy na sulfidy. To mělo za následek precipitaci kadmia v podobě sulfidů kadmia, které vytvořili usazeninu na povrchu buněk.

Precipitace kovů v podobě sulfidů je jeden ze způsobů imobilizace a snížení toxicity kovů. Nicméně za určitých podmínek může být imobilizace kovů v podobě sulfidů zcela nevhodná. Například v případě rtuti, kdy Hg^{2+} je forma rtuti vhodná pro metylaci pomocí sulfát redukujících bakterií. Rtuť vstupuje do těchto bakterií difuzí v podobě sulfidu rtuťnatého (HgS) (Benoit et al., 2001). Produkovaná methylovaná rtuť je nejtoxičtější forma rtuti pro organismy a také se nejnáze akumuluje v jejich tělech.

6.2. PRECIPITACE VE FORMĚ FOSFOREČNANŮ

Další způsob, kterým mikroorganismy precipitují kovy je precipitace pomocí anorganického fosfátu (P_i). Kovy jsou v tomto procesu precipitovány ve formě fosforečnanů. Tento způsob je efektivní pro odstraňování řady kovů. Basnakova se svými spolupracovníky (1998) pracovali s bakterií *Citrobacter* sp., která byla izolovaná z půdy kontaminované kovy. Tato bakterie svojí činností vytvářela nános fosforečnanů kovů pomocí činnosti enzymu PhoN fosfatázy, která se vyskytuje v periplazmatickém prostoru. Primární funkcí této fosfatázy je zvyšovat pH v okolí organismu, pokud se bakterie nachází v prostředí o nízkém pH. *Citrobacter* sp. je schopna odstraňovat z roztoku uranylové ionty (UO_2^{2+}) a vytvářet z nich nános v podobě $H_2UO_2PO_4$. Tvorba tohoto nánosy je podmínkou pro odstranění Ni^{2+} iontů z roztoku. Ni^{2+} ionty jsou následně interkalovány do vrstvy $H_2UO_2PO_4$. *Citrobacter* N14 byl zatím jediný nalezený organismus se schopností přirozeně exprimovat PhoN fosfatázu. Jiné druhy bakterií (včetně *Escherichia coli*) exprimují jiné typy fosfatázy, které ale nevykazují aktivity vhodné pro účinnou akumulaci kovů. Bakterie *Citrobacter* N14 ale není příliš vhodná pro vylepšování svých vlastností týkajících se

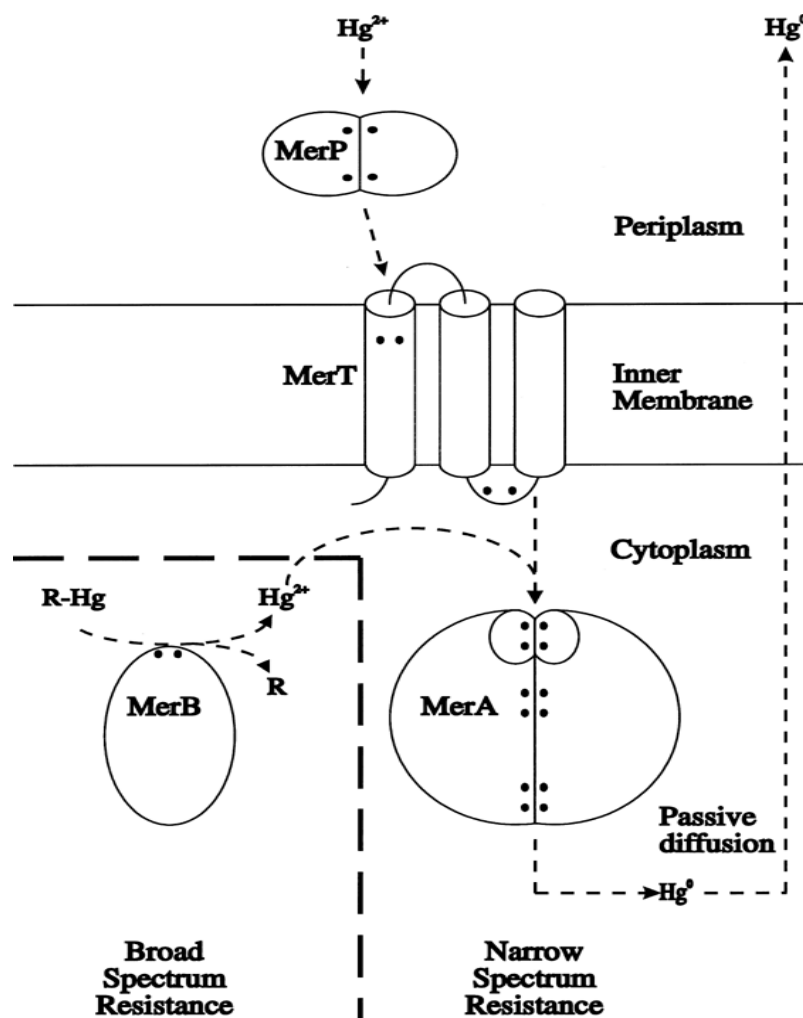
precipitace kovů, a to zejména kvůli její limitované schopnosti přeměny a méně známému genetickému pozadí v porovnání s *Escherichia coli*. Do *Escherichia coli* byl klonován gen *phoN* a byla porovnávána schopnost této rekombinantní bakterie a *Citrobacter* sp. odstraňování výše zmíněných iontů kovů. Bylo zjištěno, že *E. coli* s vloženým genem *phoN* kódujícím fosfatázu byla schopná akumulovat větší množství uranylových a nikelnatých iontů v porovnání s *Citrobacter* N14.

7. Enzymatická transformace kovů na méně toxickou formu

Jednou z nejlépe prostudovaných enzymatických transformací, při které dochází ke vzniku méně toxické formy kovu, je přeměna rtuti. Rtuť je jedna z nejtoxičtějších látek na světě, ale přirozeně se v prostředí vyskytuje pouze v malém množství. Nicméně v poslední době, díky lidské činnosti, její množství v prostředí stoupá. Cyklus rtuti v prostředí je ovlivněn geologickými a biologickými procesy. V atmosféře se rtuť nachází v podobě výparů (Hg^0), které jsou nestálé a jsou oxidovány na rtuťnaté ionty (Hg^{2+}) jako důsledek jejich reakce s ozónem v přítomnosti vody (DeMagalhaes a Tubino, 1995). Anorganická rtuť přítomná ve vodě a sedimentech je některými mikroorganismy přeměňována na methylrtuťnaté sloučeniny, které jsou akumulovány ve vodním potravním řetězci. Predátorské organismy, které jsou na vrcholu potravního řetězce mají tedy v těle obecně vyšší koncentrace rtuti. Lidský organismus bývá nejčastěji vystaven rtuti v podobě výparů (Hg^0) a v podobě methylrtuťnatých sloučenin, které jsou vysoce toxické pro všechny žijící organismy. Toxicita organických a anorganických sloučenin rtuti je dána jejich silnou afinitou k organickým sloučeninám obsahujícím síru (jako jsou enzymy a další proteiny). Nicméně některé bakterie, houby a rostliny si v průběhu evoluce vyvinuly speciální mechanismus, který jim uděluje schopnost rezistence k toxickým formám rtuti, které se vyskytují v jejich okolí. Tato rezistence některých bakterií je vlastně považována za příklad detoxifikace kovů na méně škodlivé formy pomocí enzymatické transformace. Rozsáhle studovaný systém pro rezistenci, založený na expresi genů v *mer* operonu, umožňuje bakteriím pomocí enzymatické redukce detoxifikovat Hg^{2+} na méně toxickou a těkavou formu rtuti Hg^0 (Osborne et al. 1997).

Geny udělující bakteriím rezistenci ke rtuti byly nalezeny u řady Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií izolovaných z různých prostředí. Tyto geny mohou být lokalizovány na plazmidové (Summers and Silver, 1972) i chromozomální (Wang et al., 1987) DNA a často bývají součástí transpozonů (Hamlett et al., 1992) nebo integronů.

Mer operony lze rozdělit na 2 hlavní typy: úzkospektré, které udělují rezistenci k anorganické rtuti a širokospektré udělující rezistenci jak k anorganické rtuti, tak k organickým sloučeninám rtuti, jako jsou například methylrtuťnaté nebo fenylrtuťnaté sloučeniny (Obr.2) (Bogdanova et al., 1998).



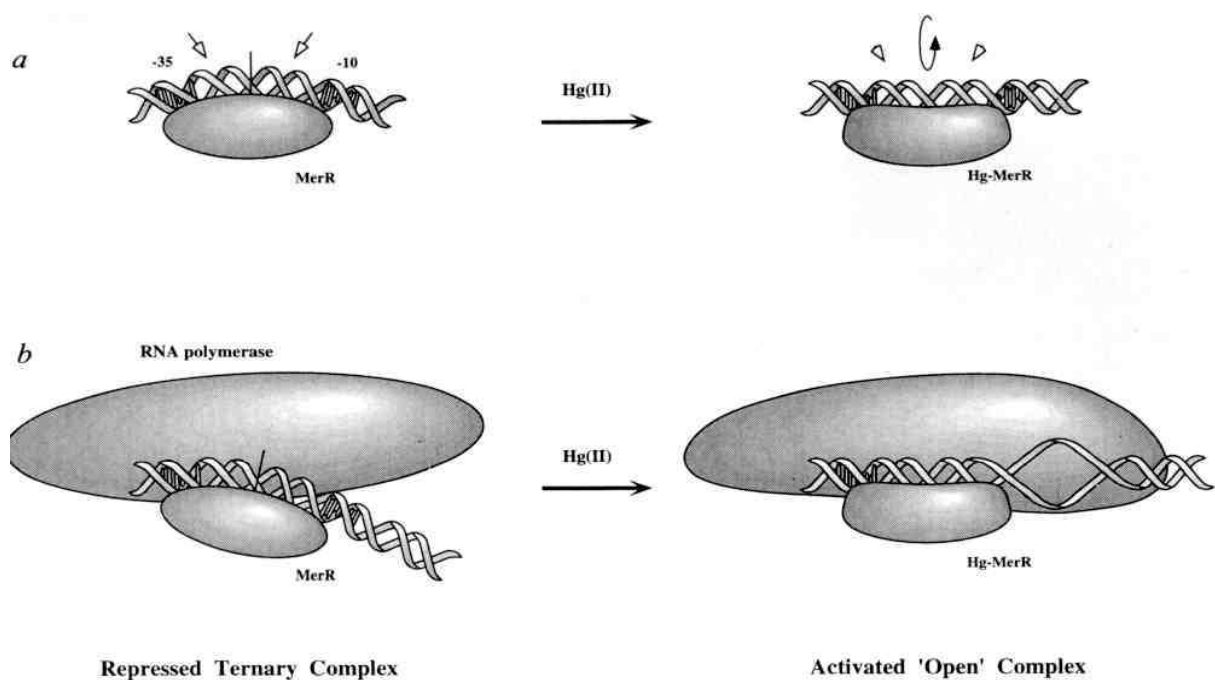
Obr.2: Mechanismus širokospektré a úzkospektré bakteriální rezistence ke rtuti. Podrobnější popis v textu. Převzato z Osborne et al. (1997).

Základní mechanismus rezistence bakterií k anorganickým sloučeninám rtuti jako je například HgCl₂ (chlorid rtuťnatý), založený na genech v *mer* operonu, zahrnuje redukci Hg²⁺ na nestálou formu Hg⁰ pomocí enzymu redukující rtuť (Osborne et al.1997). U gram-negativních bakterií se

Hg^{2+} ionty dostávají do bakteriální buňky difúzí skrz vnější membránu a poté se naváží na pár cysteinových zbytků na MerP proteinu, který je lokalizován v periplazmatickém prostoru. Následně jsou Hg^{2+} ionty přemístěny na pár cysteinových zbytků na MerT proteinu, což je protein lokalizovaný v cytoplazmatické membráně a nakonec dojde k přemístění iontů na cysteinový pár v aktivním místě enzymu redukujícím rtuť (MerA protein) (Hamlett et al., 1992). V aktivním centru tohoto enzymu dojde k NADPH-dependentní redukci Hg^{2+} na Hg^0 , která je uvolněna do cytoplasmy a následně vytéká ven z buňky (Obr. 2).

V přírodních izolátech bakterií se často vyskytují širokospektré *mer* operony udělující bakteriím rezistenci k organickým sloučeninám rtuti. Tyto *mer* operony obsahují geny, které kódují kromě Hg reduktázy ještě další enzym, který štěpí Hg-C vazby. Uvolněné Hg^{2+} ionty jsou následně redukovány MerA enzymem (Obr.2) (Schottel,1978; Nakamura ,1990) .

Jednotlivé *mer* operony se mohou lišit ve své struktuře. Skládají se z genů, které kódují proteiny pro regulaci (*merR*), transport (*merT*, *merP* a/nebo *merC*,*merF*) a redukci (*merA*). U *mer* operonů, které udělují rezistenci k organickým sloučeninám rtuti se navíc vyskytuje gen *merB*, jehož produktem je již výše zmiňovaný enzym, který hydrolyzuje Hg-C vazbu. *Mer* operon obsahuje regulační gen *merR*, který je transkribován samostatně od ostatních strukturálních genů na *mer* operonu. Protein MerR reguluje pozitivně i negativně expresi ostatních genů na operonu; je to příklad mechanismu, kdy jediný protein senzitivní ke změnám koncentrace kovových iontů přímo mění genovou expresi. V přítomnosti určité koncentrace Hg^{2+} MerR aktivuje transkripci genů na *mer* operonu, naopak při nepřítomnosti těchto iontů dochází k represí transkripce (Frantz and O'Halloran., 1990). Změna genové exprese zapříčiněná MerR regulátorem je založena na vazbě MerR do promotorové oblasti *mer* operonu. V nepřítomnosti Hg^{2+} vytváří MerR v promotové oblasti ohyb DNA, která se tak stane nevhodným substrátem pro RNA polymerázu a dojde k represí transkripce. Po navázání Hg^{2+} na MerR dojde k uvolnění ohybu na DNA. DNA se tak stává vhodným substrátem pro RNA polymerázu. Vazba RNA polymerázy k promotoru na *mer* operonu je ještě zesílena interakcí mezi MerR a RNA polymerázou. Tyto děje vedou ke vzniku otevřeného komplexu a aktivaci transkripce a tím ke vzniku proteinů nutných pro detoxifikaci Hg^{2+} (Obr.3) (Ansari et al., 1995).



Obr.3: Mechanismus změny genové exprese u bakterií v závislosti na přítomnosti rtuti založený na vazbě MerR regulátoru do promotorové oblasti mer operonu. Převzato z Ansari et al. (1995).

Aktivita enzymu redukujícího rtuť je vhodný prostředek pro mobilizaci rtuti jako alternativa k výše zmiňovaným strategiím vhodným k imobilizaci kovů. Možnosti a schopnosti bakterií týkající se redukce rtuti byly široce zkoumány při různých podmínkách. Například Okino se svými spolupracovníky (2000) zkoumali schopnost bakterie rezistentní ke rtuti *Pseudomonas putida* odstraňovat chlorid rtuťnatý (HgCl_2) z okolí. Schopnost odstraňovat kov z prostředí bez živin byla pozorována při různé koncentraci buněk, teplotách a pH. Bylo zjištěno, že bakterie *Pseudomonas putida* je schopna za optimálních podmínek odstranit až téměř 100% kovu ze 40mg Hg l^{-1} roztoku během 24 hodin.

7.1. GENETICKÉ MODIFIKACE BAKTERIÍ ZLEPŠUJÍCÍ JEJICH SCHOPNOST ENZYMATICKÉ TRANSFORMACE KOVŮ

Zvýšenou schopnost rezistence ke rtuti u bakterií a s tím související její odstraňování z okolí lze dosáhnout geneticky modifikovanými kmeny bakterií. Geneticky upravené kmeny *Escherichia coli* byly získány současnou expresí mer genů pocházejících z *Escherichia coli* a

glutathione S-transferázových genů ze *Schistosoma mansoni*. Glutathion S-transferáza je součástí mikrobiálních detoxifikačních mechanismů. Její pomocí může bakterie ze svého těla odstraňovat toxická xenobiotika, například rtuť. Geneticky modifikované kmeny bakterií *E. coli* exprimující současně *mer* a glutathion S-transferázové geny byly schopné lépe odolávat vysokým koncentracím chloridu rtuťnatého (HgCl_2). Tyto kmeny také vykazovaly vyšší schopnost redukce kovu obsaženém v mediu na Hg^0 v porovnání s bakteriemi nesoucími jen *mer* geny nebo jen glutathion S-transferázové geny nebo nenesoucí ani jeden z výše zmiňovaných genů (Cursino et al., 2000). Brim (2000) se svými kolegy geneticky modifikovali bakterii *Deinococcus radiodurans* vložením *mer* operonu. Tato bakterie je známá pro svoji schopnost odolávat radioaktivnímu záření. V místech znečištěných radioaktivním odpadem se také často vyskytuje rtuť ve formě toxických rtuťnatých iontů (Hg^{2+}). Náklady na remediaci takto kontaminovaných míst jsou značně vysoké, potenciální využití takto modifikované bakterie by tyto náklady mohlo výrazně snížit. Ve výše zmíněném pokusu byly bakterie *Deinococcus radiodurans* exprimující geny z *mer* operonu (pocházející z *Escherichia coli*) schopny růst při daleko vyšší radiaci a také vyšší koncentraci Hg^{2+} iontů než je běžné v místech kontaminovaných smíšeným radioaktivním odpadem. Tyto bakterie byly také schopny přítomnou Hg^{2+} efektivně redukovat na méně toxickou Hg^0 . Qin se svými kolegy (2006) zkoumali vlastnosti modifikovaných bakterií, které expimovaly MBD. MBD (metal-binding domain) je uměle sestrojený polypeptid jež obsahuje strukturně obdobné motivy jako doména MerR proteinu, která váže kov. Narozdíl od buněk obsahující *mer* operon, které rtuť ze svého okolí odstraňují její redukcí na Hg^0 a následným uvolněním z buňky do atmosféry, buňky exprimující MBD jsou schopny vycytávat Hg^{2+} ionty a následně je odstranit precipitací. Buňky *Escherichia coli* exprimující MBD na svém povrchu byly schopné vázat až 6krát více Hg^{2+} než buňky, které tento polypeptid neexpimovaly. Také cytosolická exprese výše zmiňovaného polypeptidu dovolila modifikovaným buňkám *Escherichia coli* a *Deinococcus radiodurans* lépe odolávat přítomnosti Hg^{2+} .

Redukce Hg^{2+} na nestálou a méně toxickou formu Hg^0 pomocí bakterií se zdá být slibnou a levnou remediační technologií. Tento způsob remediace by mohl být využíván při odstraňování lokálních kontaminací rtuť, nicméně používání této technologie ve větším měřítku by mohlo eventuálně přispívat ke globálnímu znečištění atmosféry.

8. Závěr

Mikroorganismy disponují řadou vlastností, které lze využít pro remediaci prostředí. Pomocí molekulární biologie lze tyto žádoucí vlastnosti mikroorganismů vhodně modifikovat. Molekulárně-biologické postupy umožňují vytvoření bakterií se zvýšenou schopností vázat kovy pomocí exprese specifických proteinů nebo peptidů. Tyto postupy taky poskytují možnost zefektivnění procesů, při kterých dochází k precipitaci nebo enzymatické transformaci kovů. Využívání remediačních postupů s použitím biologických systémů při odstraňování těžkých kovů z kontaminovaných půd se jeví jako slibná alternativa k fyzikálně-chemickým postupům. Výhodou tohoto přístupu v porovnání s klasickými fyzikálně-chemickými metodami je především vyšší specifita, nižší náklady, vhodnost pro *in situ* technologie, malé množství sekundárních odpadů a s tím související minimální narušení životního prostředí.

9. Seznam použité literatury

Abou-Shanab R.A.I., van Berkum P. and Angle J.S. (2007) Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68, 360-367.

Ansari A.Z., Bradner J.E., and O'Halloran T.V. (1995) DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature* 374, 371-375.

Aubert C., Lojou E., Bianco P., Rousset M., Durand M.C., Bruschi M. and Dolla A. (1998) The *Desulfuromonas acetoxidans* triheme cytochrome *c7* produced in *Desulfovibrio desulfuricans* retains its metal reductase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1308-1312 .

Bang S.W., Clark D.S. and Kealing J.D. (2000) Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (*phsABC*) from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3939-3944.

Basnakova G., Stephens E.R., Thaller M.C., Rossolini G.M. and Macaskie L.E. (1998) The use of *Escherichia coli* bearing a *phoN* gene for the removal of uranium and nickel from aqueous flows. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 266-272.

Benoit J.M., Gilmour C.C. and Mason R.P. (2001) The influence of sulfide on solid-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Environ. Sci. Technol.* 35, 127-132.

Blindauer C.A., Harrison M.D., Parkinson J.A., Robinson A.K., Cavet J.S., Robinson N.J. and Sadler P.J. (2001) A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9893-9598.

Bogdanova E.S., Bass I.A., Minakhin L.S., Petrova M.A., Mindlin S.Z., Volodin A.A., Kalyaeva E.S., Tiedje J.M., Hobman J.L., Brown N.L. and Nikiforov V.G. (1998) Horizontal spread of *mer* operons among Gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiology* 144, 609-620.

Brim H., McFarlan S.C., Fredrickson J.K., Minton K.W., Zhai M., Wackett L.P. and Daly M.J. (2000) Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat. Biotechnol.* 18, 85-90.

Byrnes-Brower J., Ryan R.L. and Pazirandeh M. (1997) Comparison of ion-exchange resins and biosorbents for the removal of heavy metals from plating factory wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2910-2914.

Chang I.S., Groh J.L., Ramsey M.M., Ballard J.D. and Krumholz L.R. (2004) Differential expression of *Desulfovibrio vulgaris* genes in response to Cu(II) and Hg(II) toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1847- 1851.

Chen S. and Wilson D. (1997) Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg²⁺-contaminated environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2442-2445.

Cursino L., Mattos S.V., Azevedo V., Galarza F., Bucker D.H., Chartone-Souza E. and Nascimento A. (2000) Capacity of mercury volatilization by *mer* (from *Escherichia coli*) and *glutathione S-transferase* (from *Schistosoma mansoni*) genes cloned in *Escherichia coli*. *Sci. Total Environ.* 261, 109-113.

De Luca G., de Philip P., Dermoun Z., Rousset M and Vemeglio A. (2001) Reduction of technetium (VII) by *Desulfovibrio fructosovorans* is mediated by the nickel-iron hydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4583-4587.

DeMagalhaes M.E.A. and Tubino M. (1995) A possible path for mercury in biological systems: the oxidation of metallic mercury by molecular oxygen in aqueous solutions. *Sci. Total Environ.* 170, 229-239.

Fang H.H.P., Xu L. and Chan K. (2002) Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Reserach* 36, 4709-4716.

Frantz B. and O'Halloran T.V. (1990) DNA distortion accompanies transcriptional activation by the metal-responsive gene-regulatory protein MerR. *Biochemistry* 29, 4747-4751.

Green-Ruiz C. (2006) Mercury(II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary. *Bioresource Technology* 97, 1907-1911.

Hamlett N.V., Landale E.C., Davis B.H. and Summer A.O. (1992) Roles of the Tn21 *merT*, *merP*, and *merC* gene products in mercury resistance and mercury binding. *J.Bacteriol.* 174, 6377-6385.

Kjaergaard K., Schembri M.A. and Klemm P. (2001) Novel Zn²⁺-chelating peptides selected from a fimbria-displayed random peptide library. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5467-5473.

Ledin M. (2000) Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews* 51, 1-31.

Lloyd J.R., Ridley J., Khizniak T., Lyalikova N.N. and Macaskie L.E. (1999) Reduction of technetium by *Desulfovibrio desulfuricans*: biocatalyst characterization and use in a flowthrough bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2691-2696.

Mauro J.M. and Pazirandeh M. (2000) Construction and expression of functional multi-domain polypeptides in *Escherichia coli* : expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene. *Lett.Appl. Microbiol.* 30, 161-166.

McLean J. and Bevaridge T.J. (2001) Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1067-1084.

Mejare M., Ljung S. and Bulow L. (1998) Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as OmpA fusion proteins in *Escherichia coli*. Protein Engineering 11, 489-494.

Mergeay M., Nies D., Schlegel G.H., Gerits J., Charles P. and van Gijsegem F. (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. J. Bacteriol. 162, 328-334.

Nakamura K., Sakamoto M., Uchiyama H. and Yagi O. (1990) Organomercurial-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediment of Minamata Bay, Japan. Appl. Environ. Microbiol. 56, 304-305.

Naz N., Young H.K., Ahmed N. and Gadd G.M. (2005) Cadmium accumulation and DNA homology with metal resistance genes in sulfate-reducing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4610-4618.

Okino S., Iwasaki K., Yagi O. and Tanaka H. (2000) Development of a biological mercury removal-recovery system. Biotechnol. Lett. 22, 783-788.

Osborn A.M., Bruce K.D., Strike P. and Ritchie D.A. (1997) Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. FEMS Microbiol. Rev. 19, 239-262.

Pazirandeh M., Wells B.M. and Ryan R.L. (1998) Development of bacterium-based heavy metal biosorbents: enhanced uptake of cadmium and mercury by *Escherichia coli* expressing a metal binding motif. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4068-4072.

Qin J., Song L., Brim H., Daly J.M. and Summers A.O. (2006) Hg(II) sequestration and protection by the MerR metal-binding domain (MBD). Microbiology 152, 709-719.

Romeyer F.M., Jacobs F.A., Masson L., Hanna Z. and Brousseau R. (1988) Bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli* expressing an inducible synthetic human metallothionein gene. J. Biotechnol. 8, 207-220.

Schottel J.L. (1978) The mercuric and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 253, 4341-4349.

Scott J.K. and Smith G.P. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. Science 249, 386-390.

Sharma S., Sundaram C.S., Luthra P.M., Singh Y., Sirdeshmukh R. and Gade W.N. (2006) Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. Journal of Biotechnology 126, 374-382.

Shen H., Pritchard H. and Sewell G.H. (1996) Kinetics of chromate reduction during naphthalene degradation in a mixed culture. Biotechnol. Bioeng. 52, 357-363.

Smith W.L. and Gadd G.M. (2000) Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. J. Appl. Microbiol. 88, 983-991.

Sousa C., Kotrba P., Ruml T., Cebolla A. and de Lorenzo V. (1998) Metaloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J. Bacteriol.* , 180, 2280-2284.

Summers A.O. and Silver S. (1972) Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112, 1228-1236.

Taghavi S., Mergeay M., Nies D.H. and van der Lelie D. (1997) *Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment. *Res. Microbiol.* 148, 536- 551.

Valls M. and de Lorenzo V. (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev.* 26, 327-338.

Wang C.L., Maratukulam P.D.L., Lum A.M., Clark D.S. and Keasling J.D. (2000) Metabolic engineering of an aerobic sulfate reduction pathway and its application to precipitation of cadmium on the cell surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4497-4502.

Wang Y., Mahler I., Levinson H.S. and Halvorson H.O. (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli* of chromosomal mercury resistance genes from a *Bacillus* sp. *J. Bacteriol.* 169, 4848-4851.

White C. and Gadd G.M. (2000) Copper accumulation by sulfate-reducing bacterial biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 313-318.