

Identifikácia vplyvu znečisteného prostredia na prítomnosť a diverzitu mikrobiálnych katalázových génov a determinantov rezistencie voči ťažkým kovom

B. Polek, P. Ferianc: Identification of the Effect of Environmental Pollution on the Presence and Diversity of Bacterial Catalase Genes and Heavy Metal Resistance Determinants. Život. Prostr., Vol. 44, No. 6, p. 292 – 294, 2010.

Living micro-organisms are constantly exposed to environmental stresses, most prominently pollution. These stresses exert a selective pressure on species and only those which have a genotype which allows them to remain viable endure. Heavy metals and some other pollutants present in the environment can induce stress responses in bacteria which result in the presence and diversity of several genes involved in metabolic degradation and detoxication pathway, including *cat*, *catG*, *czcA* and *nccA*. The diversity of these genes was examined with the goal of identifying the expression of alternate genes, analyzing the DNA sequence of the gene domains, and determining the microbial diversity of cultivatable species.

K stresovým faktorom prostredia patrí i stále sa zvyšujúce množstvo znečisťujúcich látok. Na Slovensku k nim patria ropné látky, ťažké kovy (okolie metalurgických závodov a baní), ako i ďalšie organické látky (pesticídy, atď.). Mnoho polutantov v prostredí podlieha rozkladným procesom, ktoré vedú k tvorbe reaktívnych intermediátov, najmä radikálov, reagujúcich so vzdušným kyslíkom za vzniku dobre známych reaktívnych toxických foriem kyslíka (*reactive oxygen species* – ROS). Vo všeobecnosti sa mikroorganizmy voči účinku ROS chránia zvýšenou produkciou enzýmov oxidačného stresu, vrátane kataláz, ktoré uvedený účinok detoxikujú, avšak za určitých podmienok sa môžu podieľať aj na degradácii daného polutanta. Gény podieľajúce sa na degradácii kontaminantov, resp. na rezistencii voči ťažkým kovom, sú často lokalizované na plazmidoch alebo transpozónoch. Tie zohrávajú kľúčovú úlohu najmä pri horizontálnych prenosoch génov pri tvorbe vysoko adaptovaných bakteriálnych kmeňov so špecifickými vlastnosťami vedúcimi k vnútrodruhovej diverzite s výraznou variabilitou určitých genetických determinantov.

Hodnotenie mikrobiálnej diverzity

Zo všetkých prírodných ekosystémov predstavuje pôda najväčší rezervoár diverzity mikrobiál-

nych druhov. Jeden gram pôdy obsahuje odhadom 10^7 – 10^{10} prokaryotických buniek, ktorému odpovedá až 10^6 rôznych genómov (Torsvik et al., 1996). Väčšina mikroorganizmov sa však nedá kultivovať a identifikovať tradičnými mikrobiologickými, biochemickými a morfológickými technikami. Až aplikácia metód molekulárnej biológie, predovšetkým extrakcie DNA priamo z prírodného prostredia, ako i PCR metód, umožnila určenie celkovej diverzity v danom prostredí. Nový prístup stanovenia diverzity je od kultivácie nezávislý, založený na konštrukcii komplexu knižnic odvodených od environmentálnej (napr. pôdnej) DNA, v heterológnom hostiteľovi, hlavne *Escherichia coli*.

Štúdium vplyvu znečistenia prostredia na diverzitu génov na úrovni druhov, ako i štruktúru zastúpenia kultivovateľných mikrobiálnych druhov, sme vyhodnocovali za využitia metód molekulárnej biológie.

Identifikácia ekologického vplyvu znečistenia na úrovni mikrobiálnych génov

Odpoveďou mikroorganizmov na oxidačný stres znečisteného prostredia je presná regulácia katalázových aktivít vrátane alternatívnych zmien v expresii jednotlivých

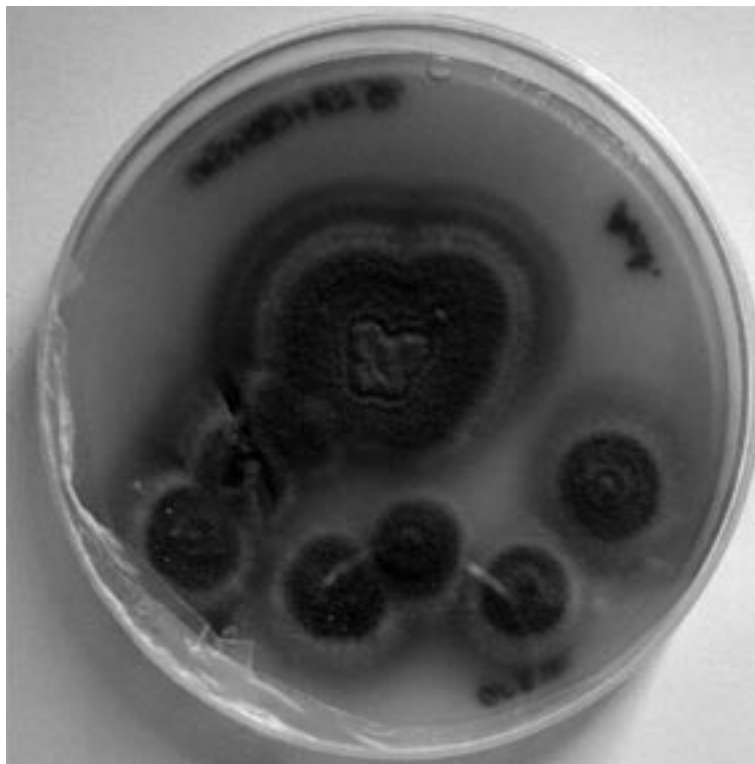
vých izoenzýmov. Je súčasťou adaptačných procesov, ktoré zabezpečujú ich prežívanie v danom prostredí. Pôdne baktérie rodiny *Comamonadaceae* sú známe svojou širokou katabolickou diverzitou a z toho dôvodu sa vo zvýšenej miere nachádzajú v kontaminovaných prostrediach. Izolát *Comamonas terrigena* N3H z pôdy kontaminovanej ropnými látkami vykazoval oveľa vyššie katalázové aktivity než ten istý druh z kontrolného čistého prostredia. Navyše u tohto izolátu bola pozorovaná indukcia novej katalázy. Elektroforetické rozlíšenie bunkového homogenátu odhalilo dva pásy izoenzýmov, katalázy-1 a katalázy-2, zatiaľ čo pri kontrole bola detekovaná len kataláza-1 (Godočíková et al., 2005). Zistili sme, že izoláty *Comamonas* spp. a *Aspergillus niger*, selektované zo znečisteného prostredia, charakterizované vysokou hladinou kataláz, boli výrazne odolnejšie voči toxickému účinku oxidačného stresu než kontrolné kmene (Bučková et al., 2005). Stojnev et al. (2007) dávali do súvisu odolnosť baktérií *Escherichia coli* voči toxickému účinku kadmia s aktivitou génu *yodA* produkujúceho bielkovinu schopnú viazať, a tak detoxikovať uvedený kov.

Dlhodobý účinok znečistenia ovplyvňoval i sekvencie génov kataláz. Boháčová et al. (2006) zistili, že PCR produkt kódujúci katalázu-1 u *Comamonas terrigena* N3H bol odpovedajúcou sekvenciou identický so sekvenciou katalázy-1 génu z *Comamonas terrigena* N1C kmeňa, ktorý bol tiež izolovaný zo znečisteného prostredia. U ďalších izolátov, ktoré neboli exponované oxidačným stresom, špecifický sekvencný motív nebol identifikovaný.

Kataláza-peroxidáza, bifunkčný enzým, je zahrnutý do metabolických dráh rozkladu polutantov. Porovnali sme sekvencie génov *katG* produkujúcich tento enzým u dvoch zbierkových kmeňov, *Comamonas terrigena* CCM 2409 a *Comamonas testosteroni* CCM 1931 a izolátu *Comamonas testosteroni* K1 z odpadových vôd. Evolučná a štrukturálna diverzita týchto enzýmov, skúmaná na základe viacnásobného sekvenčného porovnania a obsiahlej fylogenetickej analýzy, poukázali na ovplyvnenie sekvencií génov *katG* účinkom znečisteného prostredia (Godočíková et al., 2010). Uvedené výsledky len potvrdzujú vplyv prostredia na mikrobiálnu diverzitu druhov na úrovni génov.

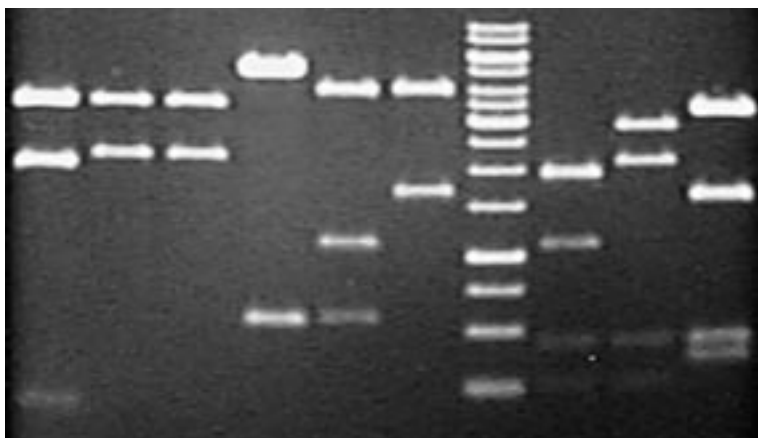
Dopad znečisteného prostredia na štruktúru bakteriálnej diverzity

Diverzitu bakteriálneho spoločenstva sme sledovali aj v lokalite znečistenej ťažkými kovmi. Pôda obsa-



Obr. 1. Aktinobaktérie izolované z pôdy znečistenej ťažkými kovmi. Foto: archív autorov

hovala zvýšené množstvá niklu ($2,1 \text{ mg.kg}^{-1}$), kobaltu (355 mg.kg^{-1}) a zinku (177 mg.kg^{-1}). V danej lokalite fylogenetická analýza bakteriálnych génov pre 16S rRNA odhalila rôznorodosť prítomných izolátov. V bohatom médiu boli kultiváciou zistené dve taxonomické skupiny: *Firmicutes* a *Proteobacteria*, avšak v minimálnom médiu boli identifikované štyri taxonomické skupiny: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* a *Proteobacteria*. Štyridsaťdva izolátov v bohatom médiu predstavovalo 20 bakteriálnych druhov, 58 baktérií rastúcich na minimálnom médiu patrilo k 49 druhom. Rozdiely v štruktúre frakcií bakteriálnych spoločenstiev rastúcich na bohatom a minimálnom médiu ešte viac zvýraznili rozdiely v diverzite. Indexy diverzity naznačili, že kultúra rastúca na minimálnom médiu bola menej vyrovnaná a vyvážená, ale s vyššou rôznosťou druhov v porovnaní s kultúrou rastúcou na bohatom médiu. Dvadsaťtri izolátov obsahovalo determinanty rezistencie voči ťažkým kovom (*czcA* a / alebo *nccA*), pričom na základe nízkej podobnosti (40 – 93 %) produktov týchto génov s ich najpríbuznejšími proteínmi možno považovať tieto proteíny za nové proteíny rezistencie voči ťažkým kovom. Ide buď o efluxné pumpy ťažkých kovov *czcA*, proteíny transmembránového typu alebo transkripčné regulátory z rodiny *LysR*. Všetky izoláty z oboch kultivačných pôd boli schopné rásť alebo prežívať v prostredí so zvýšenou



Obr. 2. Diverzita katG génov vybraných kmeňov rodiny Comamonadaceae preukázaná štiepením DNA s rôznymi endonukleázami. Foto: archív autorov

hladinou kobaltu, niklu a kadmia. Štúdium poskytlo dôkazy o existencii špecifickej bakteriálnej populácii nesúcej gény zahrnuté v aktívnej ochrane baktérií voči ťažkým kovom v prostredí kontaminovanom týmito kovmi.

* * *

Poznatky zo sekvenčnej analýzy a expresie génov prispievajú k štúdiu vzťahov medzi štruktúrou génov a vlastnosťami exprimovaných látok. Výsledky prispievajú i k objasneniu mechanizmov tolerancie a adaptácie mikroorganizmov na stres prostredia, a tým k porozumeniu mechanizmov biologickej rovnováhy.

Zmeny na úrovni génov poskytnú informácie aj o evolučnom potenciáli mikroorganizmov a umožnia predpovedať, ako sa môže sledovaný typ baktérií adaptovať na budúce stresové výzvy prostredia. Posúdenie expresie a diverzity mikrobiálnych génov vo vzťahu k miere a typu znečisteného prostredia umožní odhadnúť stupeň ohrozenia genofondu mikroorganizmov vplyvom prostredia.

Posúdenie zmien na genetickej úrovni je priradené k ekologickým indikátorom ohodnotenia stavu prírody (Vačkář, 2007) a prispieje k celkovému hodnoteniu kumulatívnych účinkov antropogénnych činností na diverzitu (Kalivodová, Kozová, 2007).

Skúmanie genetickej diverzity mikroorganizmov v ich prirodzenom prostredí nesie v sebe veľký potenciál pre ich využitie v biotechnológiách. Mikrobiálne izoláty odolné voči toxickému účinku kovov, resp. kmene schopné degradovať xenobiotiká, môžu využiť technológie bioremediácie. Najmä v extrémnych prostrediach nachádzame nové, neobvyklé formy enzýmov, bioaktívnych látok s neočakávanými vlastnosťami. Praktické využitie majú molekuly s vhodnými vlastnosťami (pH optimum v alkalicknej oblasti, tepelná stabilita atď.).

Porozumenie zmenám biodiverzity, predpovedanie dôsledkov zmien zapríčinených ľudskou činnosťou z pohľadu adaptačného potenciálu druhu s dopadom na štruktúru bakteriálnej diverzity je súčasťou národnej stratégie ochrany biodiverzity aj na Slovensku.

V r. 1992 Slovenská republika ratifikovala Dohovor o biologickej diverzite, ktorý ju zaväzuje vytvoriť podmienky na ochranu a využívanie zložiek biologickej diverzity. Získané údaje možno použiť v oblasti ochrany a tvorby životného prostredia.

Tento článok bol vytvorený realizáciou projektu ITMS 26240120014 Centrum excelentnosti pre ochranu a využívanie krajiny a biodiverzitu na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Boháčová, V., Zámocký, M., Godočíková, J., Bučková, M., Polek, B.: The Expression and Diversity of Catalases in Isolates of Genus *Comamonas* in Response to the Oxidative Stress of Polluted Environment. *Current Microbiol.*, 53, 2006, p. 430 – 434.
- Bučková, M., Godočíková, J., Šimonovičová, A., Polek, B.: Production of Catalases by *Aspergillus niger* Isolates as a Response to Pollutant Stress by Heavy Metals. *Current Microbiol.*, 50, 2005, p. 175 – 179.
- Godočíková, J., Boháčová, V., Zámocký, M., Polek, B.: Production of Catalases by *Comamonas* spp. and Resistance to Oxidative Stress. *Folia Microbiol.*, 50, 2005, 2, p. 113 – 118.
- Godočíková, J., Zámocký, M., Bučková, M., Obinger, Ch., Polek, B.: Molecular Diversity of *katG* Genes in the Soil Bacteria *Comamonas*. *Arch Microbiol.*, 192, 2010, p. 175 – 184.
- Kalivodová, E., Kozová, M.: Hodnotenie kumulatívnych účinkov antropogénnych činností na diverzitu bioty. *Život. Prostr.*, 41, 2007, 1, s. 44 – 49.
- Torsvik, V., Sorheim, R., Goksoyr, J.: Total Bacterial Diversity in Soil and Sediment Communities – A Review. *J Indust. Microbiol.*, 17, 1996, p. 170 – 178.
- Vačkář, D.: Ekologické indikátory pro měření stavu přírody. *Život. Prostr.*, 41, 2007, 1, s. 19 – 23.
- Stojnev, T., Harichová, J., Ferianc, P., Nyström, T.: Function of a Novel Cadmium-induced yodA Protein in *Escherichia coli*. *Current Microbiol.*, 55, 2007, p. 99 – 104.

Ing. Bystrík Polek, CSc., Bystrik.Polek@savba.sk
RNDr. Peter Ferianc, CSc., Peter.Ferianc@savba.sk
Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravska cesta 21,
845 51 Bratislava