

Marta POGORZELEC, Katarzyna PIEKARSKA\*

## **WYKORZYSTANIE BAKTERII BIOLUMINESCENCYJNYCH DO WYKRYWANIA SUBSTANCJI TOKSYCZNYCH I MUTAGENNYCH W ŚRODOWISKU**

Jednym z największych współczesnych problemów ekologicznych staje się zanieczyszczenie środowiska związkami toksycznymi i mutagennymi. Bardzo ważne jest ich wczesne wykrycie, dlatego dąży się do tego, by zastąpić czasochłonne i drogie techniki analityczne nowymi metodami detekcji. Coraz częściej wykorzystuje się w tym celu testy biologiczne, których działanie opiera się na luminescencji bakterii takich jak *Vibrio fischeri* oraz *V. harveyi*.

### 1. WSTĘP

Szybko rozwijający się przemysł i rolnictwo, a także wzrost liczebności populacji ludzkiej w znacznym stopniu przyczyniają się do degradacji środowiska naturalnego. Znaczną część zanieczyszczeń antropogennych stanowią związki o działaniu toksycznym oraz mutagennym. Spowodowane nimi zanieczyszczenia stały się jednym z najpoważniejszych problemów ekologicznych, dlatego ich wczesne wykrywanie ma coraz większe znaczenie [1]. Obecność substancji mutagennych i toksycznych w środowisku może powodować wiele chorób, w tym nowotwory, a także bezpłodność. Ogromnym problemem jest fakt, że pomimo, iż nawet niewielka ilość tych substancji wywołuje poważne skutki, to wykrycie ich przy niskich stężeniach jest skomplikowane [2]. Ze względu na wysoki koszt i czasochłonność klasycznych metod wykrywania substancji szkodliwych dla zdrowia i środowiska, poszukuje się nowych technik detekcji, opartych na ocenie wpływu związków zanieczyszczających na organizmy żywe (testy biologiczne) oraz metod szybkiego oznaczania obecności w środowisku substancji o istotnym znaczeniu dla aktywności biologicznej organizmów (czujniki bio-

---

\* Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże S. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, pogorzelec.marta@gmail.com

logiczne) [3]. Ciekawą alternatywą stają się między innymi techniki wykorzystujące bioluminescencję bakterii.

### 1.1. LUMINESCENCJA BAKTERII

Podstawą bioluminescencji, czyli emisji światła przez żywe organizmy, jest reakcja utleniania związku zwanego lucyferyną przez enzym- lucyferazę. Reakcja przebiega następująco:



Lucyferaza łącząc się z kofaktorem- zredukowanym mononukleotydem flawinowym (FMNH<sub>2</sub>), przy pomocy tlenu, przekształca aldehyd w kwas tłuszczowy, a sama ulega wzbudzeniu przechodząc na poziom wyższy energetycznie. W wyniku utleniania powstaje cząsteczka w stanie wzbudzonym- oksylucyferyna, której przejście do stanu podstawowego wiąże się z emisją światła (światło o długości fali 490 nm, zielono-niebieskie). Kofaktor zostaje utleniony do mononukleotydu flawinowego (FMN). Istnieje hipoteza, że enzymatyczny proces prowadzący do produkcji kwantów światła mógł ewoluować jako mechanizm detoksyfikacji reaktywnych form tlenu.

Bakterie wykazujące bioluminescencję posiadają zestaw genów nazwany operonem *lux* [4]. Komórki bakterii emitują światło w wyniku syntezy białek kompleksu lucyferazy, kodowanych przez pięć genów strukturalnych *luxCDABE*, które są częścią operonu *luxICDABE*. Gen kodujący białko regulatorowe LuxR jest transkrybowany w odwrotnym kierunku niż przylegające do niego geny operonu *luxICDABE*. Ekspresja genu kodującego białkowy kompleks lucyferazy jest kontrolowana przez dwa białka regulatorowe LuxI i LuxR. Pierwsze z nich jest syntazą odpowiedzialną za syntezę autoinduktora acyl-HSL, drugie zaś rozpoznaje cząsteczkę sygnałową w wyniku czego następuje połączenie LuxR z HSL. Powstały kompleks LuxR/HSL ma również zdolność łączenia się z genem *luxR*. Powoduje to powstanie systemu kontroli negatywnej, który w warunkach silnej indukcji może hamować nadmierną biosyntezę białek z operonu *luxICDABE* [5].

Bioluminescencja bakterii jest ściśle związana z gęstością ich populacji oraz stanem metabolicznym. Bakterie luminescencyjne emitują światło, gdy znajdują się w optymalnym dla siebie środowisku. W warunkach normalnych komórki bakterii wykorzystują 10% energii pochodzącej z metabolizmu na świecenie, a w obecności związków wysoce szkodliwych dla mikroorganizmów, z uwagi na zaburzenia procesów fizjologicznych ich luminescencja zanika [4]. Im wyższy jest stopień toksyczności, tym mniejsza jest ilość światła emitowanego przez bakterie. Najczęściej stosowane gatunki to *Vibrio* i *Photorhabdus* głównie *Vibrio fischer* i *Vibrio harveyi* [1].

## 2.CZUJNIKI I TESTY BIOLOGICZNE

### 2.1. BIOSENSORY

Czujnik biologiczny jest urządzeniem analitycznym, które zawiera biologicznie aktywny materiał będący w bezpośrednim kontakcie z właściwie dobranym elementem przetwornikowym w celu detekcji (odwracalnie i selektywnie) stężenia lub aktywności chemicznej substancji w dowolnej próbce. W czujnikach optycznych wykorzystuje się właściwości optyczne elementu detekcyjnego, które ulegają zmianie pod wpływem oddziaływania z substancją oznaczaną. Zmiany mogą dotyczyć absorpcji (sensory spektrofotometryczne), fluorescencji, fosforescencji (sensory luminescencyjne), rozpraszania światła, załamania światła oraz skręcania płaszczyzny polaryzacji. W testach mikrobiologicznych wykorzystywane jest zjawisko naturalnej luminescencji bakteryjnej [6].

Zaletami biosensorów są wysoka czułość i selektywność, znikoma podatność na zakłócenia oraz miniaturowe rozmiary. Pomiar za pomocą bioczujnika zwykle nie wymaga pracochłonnego przygotowania próbki, a koszt analizy jest niewielki, ponieważ czujnik biologiczny może być stosowany przez długi okres czasu. [2].

### 2.2. MICROTOX

Potencjalne możliwości przyspieszenia badań nad toksycznością daje test Microtox. System ten polega na wykorzystaniu bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischeri* i *Benecka harveyi*. Efektem jest luminescencja świetlna tychże bakterii mierzona fotometrycznie. Obecnie Microtox jest najczęściej stosowanym, a jednocześnie najlepiej poznanym dostępnym na rynku biotestem wykorzystującym bakterie bioluminescencyjne jako element aktywny. Stanowi on użyteczne narzędzie wykorzystywane do oceny toksyczności substancji chemicznych, stopnia zanieczyszczenia wód, osadów dennych i gleb [7]. Może być także użyteczny przy skryningu ścieków i odcieków zawierających znaczne ilości związków organicznych i nieorganicznych [3]. Ze względu na szybkość działania i dużą czułość, test jest często stosowany w przypadku analiz złożonych próbek środowiskowych [2]. Między innymi został wykorzystany do oceny toksyczności gleby zawierającej wiele różnych pestycydów i ich głównych metabolitów [8]. System Microtox znalazł również zastosowanie przy analizie zmian toksyczności podczas oczyszczania ścieków na różnych jego etapach [9] oraz przy badaniach nad toksycznością zakwitów sinic [10]. Oprócz standardowych zastosowań na próbkach środowiskowych test można także wykorzystać w celu wykrycia substancji toksycznych w płynach biologicznych, co może okazać się bardzo przydatne we wczesnym wykrywaniu wielu chorób. Test Microtox doskonale sprawdził się podczas analizy moczu pracowników przemysłu koksowniczego. W badaniach porównywano

mocz pracowników bezpośrednio narażonych na emisję koksu z moczem osób pracujących z dala od pieca koksowniczego, [11], co wskazuje na to, iż test może być użyteczny także w analizie obecności biomarkerów, a tym samym w badaniach wpływu środowiska pracy na obecność substancji toksycznych w organizmie.

### 2.3. MUTATOX

W ostatnich latach rozwinęła się nowa dyscyplina genetyki toksykologicznej zakładająca, że wiele mutagenów jest rakotwórczych. Prowadzi się badania dotyczące genotoksyczności i tworzenia, a także ulepszania szybkich testów w ocenie wpływu zanieczyszczeń na środowisko [19]. System Mutatox wykorzystuje zmodyfikowane genetycznie bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri* w celu wykrywania czynników genotoksycznych [13]. Test pozwala na wykrycie substancji działających niekorzystnie na strukturę DNA poprzez pomiar intensywności światła emitowanego przez specjalnie wyselekcjonowane bakterie luminescencyjne. Wykorzystywane szczepy pozbawione są zdolności świecenia [14]. Po odpowiednio długim czasie inkubacji (16-24 h) substancje mutagenne powodują rewersję mutacji i przywrócenie bakteriom zdolności świecenia. Podejrzane o genotoksyczność są te próbki, w których indukowana emisja światła jest co najmniej dwukrotnie większa niż w próbce kontrolnej [3].

System Mutatox może być używany w badaniu próbek środowiskowych, które są podejrzewane o posiadanie potencjału genotoksycznego. Główne zastosowania to określanie genotoksyczności związków chemicznych, wody, ścieków, ekstraktów z osadów ściekowych, ścieków z procesów ługowania i materiałów niebezpiecznych, monitoringu wód w celu ochrony źródeł wody przeznaczonej do spożycia i bytowania organizmów [15]. Może też być wykorzystywany do badań istniejących i nowych substancji oraz ich mieszanin, a także oceny ryzyka biologicznego skażeń, które mają wpływ na środowisko wodne oraz oceny osadów ściekowych w celu wyboru metody i zakresu unieszkodliwiania [2, 13].

### 2.4. TEST *VIBRIO HARVEYI*

Szczególnym przypadkiem są zanieczyszczenia mutagenne w środowisku morskim, ponieważ występują one tam w bardzo niskich stężeniach. Do oceny ich działania został opracowany szybki i tani test biologiczny, wykorzystujący zmutowane bakterie morskie *Vibrio harveyi* A16, niezdolne do emisji światła [16], w skutek mutacji w genie *luxE*. Pod wpływem działania mutagenu jest w stanie odzyskać zdolność emisji światła. Organizm ten jest halotolerancyjny, a także łatwy i bezpieczny w hodowli w warunkach laboratoryjnych, ponieważ nie jest patogenny dla człowieka [17]. Badania prowadzone z udziałem *V. harveyi* po ich kilkugodzinnej inkubacji z różnymi mutagenami w próbce osadu morskiego wykazywały znaczny wzrost luminescencji.

Najlepsze rezultaty osiągnięto już po 4 godzinach, co wskazuje na możliwość szybkiego stwierdzenia obecności mutagenu w badanej próbce. Otrzymane przez badaczy wyniki wykazują powiązanie wzrostu poziomu luminescencji ze wzrostem stężenia mutagenu. Podobne rezultaty osiągnięto wykorzystując test do wykazania obecności mutagenów skumulowanych w tkankach roślin morskich [16]. Co więcej, test *Vibrio harveyi* z mutacją w genie *lux E* udało się także wykorzystać do badania akumulacji substancji mutagennych w ekstrakcie tkankowym małża [18], co wskazuje, iż test może być użyteczny również w przypadku analiz akumulacji mutagenów w tkankach zwierzęcych, a w przyszłości może zostać wykorzystany jako narzędzie do badania biomarkerów.

## 2. PODSUMOWANIE

Od kiedy zdano sobie sprawę z zagrożeń jakie może spowodować obecność substancji toksycznych i mutagennych w środowisku, powstaje coraz więcej testów biologicznych pozwalających na ich wykrywanie. Wykorzystanie zjawiska bioluminescencji bakterii stało się ciekawą alternatywą dla skomplikowanych analiz chemicznych i doprowadziło do opracowania tanich i szybkich testów. Biotesty mogą być także uzupełnieniem standardowych analiz, ponieważ stosując równolegle kilka różnych testów do badania prób środowiskowych pochodzących z jednego źródła, każdy z testów wykazuje różną czułość wobec poszczególnych związków, dlatego zaleca się stosowanie baterii testów w celu otrzymania bardziej miarodajnych wyników [12].

Pomimo wielu zalet, testy wykorzystujące bioluminescencję nie dają jednak szczegółowych informacji na temat chemicznej natury wykrywanych mutagenów. Nie mniej jednak ich zastosowanie stanowi pierwszy krok do oceny mutagenności, a także pozwala zdecydować o konieczności zastosowania bardziej szczegółowych analiz chemicznych pozwalających w lepszym stopniu poznać specyfikę danego mutagenu.

## LITERATURA

- [1] GIROTTI S., [i in.], Improved detection of toxic chemicals using bioluminescent bacteria, *Analytica Chimica Acta* 471 (2002) 113–120;
- [2] WĘGRZYN G., CZYŻ A. Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbial assays, *Journal of Applied Microbiology* (2003) 96, 1175–1181;
- [3] TRACZEWSKA T. M., *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2011
- [4] HOMA I.M., *Chromatografia planarna - bioluminescencja, czyli analiza ukierunkowana na efekt*; dostępny w Internecie: <http://www.labportal.pl/article/chromatografia-planarna-bioluminescencja-czyli-analiza-ukierunkowana-na-efekt/czesc/0/3>;

- [5] MATEJCZYK M., SUCHOWIERSKA M., Charakterystyka zjawiska *Quorum sensing* i jego znaczenie w aspekcie funkcjonowania biofilmu w inżynierii środowiska, budownictwie, medycynie oraz gospodarstwie domowym, *Budownictwo i Inżynieria Środowiska* 2(2011), 68-75;
- [6] STEPNOWSKI P. [i in.] Monitoring i analityka zanieczyszczeń w środowisku, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego (2010);
- [7] NAŁĘCZ-JAWECKI G., Microtox – szybki system bioindykacyjny do oceny toksyczności wód i ścieków. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* (1996), nr 2., 47–51;
- [8] GALLI R. [i in.], Evaluation and application of aquatic toxicity test: use of the Microtox for the prediction of toxicity based upon concentrations of contaminants in soil, *Hydrobiology* (1994), 273: 179-189)
- [9] NUNES-HALLDORSON V. de S., DURAN N. L., Bioluminescent bacteria: LUX genes as environmental biosensors, *Brazilian Journal of Microbiology* (2003) 34, 91-96;
- [10] CAMPBELL D. L. [i in.] Comparative assessment of specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic *Cyanobacteria*;
- [11] CHAO M. R., [i in.], Repeated measurement of urinary methylated/oxidative DNA lesions, acute toxicity and mutagenicity in coke oven workers, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* (2008), 12: 3381-9;
- [12] CODINA J. C., [i in.], Detection of heavy metal toxicity and genotoxicity in wastewaters by microbial assay, *Water Science and Technology* (1994), Vol. 30, Nr 10, 145-151;
- [13] <http://www.tigret.eu/tigret/images/stories/produkty/ToksSrodowiskowa/mutatox.pdf>;
- [14] PODGORSKA B., WĘGRZYN G., The use of marine bacteria in mutagenic assays, *Polish Journal of Microbiology* (2007), Vol. 56, Nr 4, 227-231;
- [15] MADILL R. E. A. [i in.] Comparison of the Ames Salmonella assay and Mutatox genotoxicity assay for assessing the mutagenicity of polycyclic aromatic compounds in porewater from Athabasca oil sands mature fine tailings, *Environmental Science & Technology* (1999), 33, 2510-2516;
- [16] PODGÓRSKA B., [i in.] The use of the *Vibrio harveyi* luminescence mutagenicity assay as a rapid test for preliminary assessment of mutagenic pollution of marine sediments *J Appl Genet* 48(4) (2007), 409–412;
- [17] GRAINDORGE V., Link Between Luminescence And Toxicity in *Vibrio harveyi*, *The Advocate*, (2001) 9-10;
- [18] CHEĆ E., [i in.], Comparison of the use of mussels and semipermeable membrane devices for monitoring and assessment of accumulation of mutagenic pollutants in marine environment in combination with a novel microbiological mutagenicity assays, *Environmental Monitoring and Assessment* (2008), 140: 83-90;
- [19] JOHNSON T. B., LONG E. R., Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: a new tandem in vitro testing approach, *Environmental Toxicology and Chemistry* (1998), Vol. 17, Nr 6, 1099-1106.

#### THE USE OF BIOLUMINESCENT BACTERIA FOR DETECTION OF TOXIC AND MUTAGENIC COMPOUNDS IN ENVIRONMENT

Toxic and mutagenic compounds pollution becomes one of the greatest environmental problems. Early detection is very important, so the aim is to replace the time-consuming and expensive analytical techniques by new methods of detection. Biological tests based on the luminescence of bacteria such as *Vibrio fischerii* and *Vibrio harveyi* are more and more often used for this purpose.