

Povećanje učinkovitosti bioremedijacije na razini gena

M. Česnik, Z. Findrik Blažević i M. Vuković Domanovac

Ovo djelo je dano na korištenje pod
Creative Commons Attribution 4.0
International License



Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb

Sažetak

Bioremedijacija se koristi potencijalom mikroorganizama pri uklanjanju onečišćenja iz okoliša. Metabolički putovi kojima se onečišćujuća tvar razgrađuje u manje toksične tvari vrlo su kompleksni. Naprednim tehnikama molekularne biologije mehanizmi bioremedijacije izučavaju se na razini gena. Gen zaslužan za proizvodnju proteina koji razgrađuje onečišćujuću tvar može se izolirati i unijeti u drugi organizam, čime nastaje organizam s poboljšanim bioremedijacijskim svojstvima. Brojna se svjetska istraživanja temelje na genetičkom inženjerstvu na mikroorganizmima, no najveću prepreku upotrebe takvih organizama u bioremedijaciji čine zakonski okviri te nedovoljno poznavanje posljedica njihova oslobađanja u okoliš.

Ključne riječi

Bioremedijacija, uklanjanje onečišćenja, mikroorganizmi, proteini, genetičko inženjerstvo

1. Uvod

Onečišćenje okoliša jedno je od najvećih prijetnji za čovječanstvo. Za uklanjanje onečišćujućih tvari iz okoliša moguće je primjenjivati biološke procese. Mikrobnom razgradnjom organske tvari nastaju produkti koji biljkama služe kao hranjive tvari, što dokazuje važnu ulogu mikroorganizama u recikliranju hranjivih tvari u ekosustavu.¹ Uz to što priroda ima moć uklanjanja tvari nastalih prirodnim putem, neki od tih procesa jednako su uspješni i kada se radi o onečišćujućim tvarima antropogenog porijekla.² Poznate su mnoge vrste biljaka, mikroorganizama i nižih eukariota koje upotrebljavaju onečišćujuće tvari iz okoliša kao hranjive tvari.³ Ako se pravilno upotrebljavaju, prirodni izvori imaju dovoljan potencijal za uklanjanje većine elemenata koji uzrokuju onečišćenje okoliša. Razgradnja, uklanjanje ili deaktivacija onečišćujućih tvari biološkim putem poznata je kao bioremedijacija.⁴

2. Bioremedijacija

Bioremedijacija je tehnologija u kojoj se primjenjuje potencijal metabolizma mikroorganizama kako bi se uklonile onečišćujuće tvari iz okoliša.^{5,6} U procesu bioremedijacije onečišćujuće tvari pretvaraju se u manje toksične ili netoksične tvari uz manji utrošak kemikalija i energije u odnosu na druge postupke uklanjanja onečišćujućih tvari iz okoliša.^{7–9} Ako se nalaze u uvjetima pogodnim za razmnožavanje, mikroorganizmi jednostavno dolaze u doticaj s većinom molekula onečišćujuće tvari zbog svoje veličine i brojnosti. Različiti ksenobiotici, kao što su policiklički aromatski ugljikovodici i klorirani te aromatski dušični spojevi, vrlo su toksični za žive organizme te imaju mutageno i karcinogeno djelovanje. Unatoč tomu, mnogi mikroorganizmi

imaju sposobnost vraćanja takvih tvari u prirodan biogeokemijski ciklus.^{10,11} Potencijal mikroorganizama u uklanjanju onečišćujućih tvari proizlazi iz njihove raznolikosti, brojnosti i prilagodljivosti.¹²

Primjena bioremedijacije pogodna je na onečišćenim mjestima čija obnova nije hitna te tamo gdje se ne mogu primijeniti drugi postupci uklanjanja onečišćenja.¹³ Tehnologija bioremedijacije zasniva se na poboljšanju procesa biorazgradnje, biotransformacije ili biosorpcije onečišćujućih tvari održavanjem određenih kultura bakterija, gljiva, mikroalgi ili mješovite mikrobne zajednice koje upotrebljavaju te tvari kao izvor ugljika ili energije i pretvaraju ih u netoksične ili manje toksične spojeve.

Biostimulacija podrazumijeva bioremedijaciju postignutu stimuliranjem rasta i metabolizma autohtonih mikrobnih zajednica dodavanjem tvari koje potpomažu rast povećanjem dostupnosti kisika, kontroliranjem fizikalnih parametara ili kombiniranjem navedenih postupaka.^{14,15}

U slučaju kada autohtoni mikroorganizmi ne mogu ukloniti određenu tvar iz okoliša ili kada je populacija mikroorganizama koji mogu razgraditi onečišćujuću tvar nedovoljno velika, upotrebljavaju se neautohtoni mikroorganizmi. Proces bioremedijacije koji se ostvaruje dodavanjem jedne ili više neautohtone mikrobne vrste naziva se bioaugmentacija.^{16,17} Pritom se mogu upotrebljavati mikroorganizmi koji su prisutni u okolišu ili mikroorganizmi koji nisu pronađeni u okolišu a poznata su im biotransformacijska svojstva.^{2,18,19} Osim navedenog, mogu se upotrebljavati mikroorganizmi dobiveni genetičkim inženjerstvom.

Bioremedijacija se može provoditi *in situ* umjetno povećavajući mikrobnu aktivnost na onečišćenom području ili *ex situ*, pri čemu se onečišćeni materijal prenosi i obrađuje u bioreaktoru. Prednost bioremedijacije *in situ* u usporedbi s *ex situ* je u tome što je potrebno manje opreme te se radi o ekonomski isplativijem procesu. Ukoliko se primjenjuje bioremedijacija *ex situ*, najveća prednost je bolja kontrola

* Autor za dopisivanje: Morana Česnik, mag. ing. oecoining.
e-pošta: mcesnik@fkit.hr

procesa optimiranjem uvjeta. Iako primjena bioremedijacije izvan onečišćenog područja nije praktična za onečišćenja velikog razmjera, prednost takvog pristupa je naglašena ukoliko se žele uporabiti vrijedne tvari iz onečišćenog medija.^{2,20,21,22}

Tablica 1 – Mikroorganizmi s bioremedijacijskim potencijalom uklanjanja onečišćujućih tvari²³

Table 1 – Microorganisms having biodegradation potential for contamination removal²³

Mikroorganizam Microorganism	Onečišćujuća tvar Contamination
<i>Pseudomonas</i> sp.	benzen benzene
<i>Bacillus</i> sp.	fenol phenol
<i>Flavobacterium</i> sp.	aromatski spojevi aromatic compounds
<i>Cunninghamella elegans</i>	polciklički aromatski ugljikovodici polycyclic aromatic hydrocarbons
<i>Actinomycetes</i>	sirova guma raw polymer
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	insekticid DDT insecticide DDT
<i>Rhodococcus</i> sp.	naftalen naphthalene
<i>Bacillus</i> sp.	bakar, cink copper, zinc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	nikal nickel
<i>Aspergillus niger</i>	kadmij cadmium
<i>Rhizopus arrhizus</i>	živa mercury

Kako bi se uspješno uklonilo onečišćenje bioremedijacijom, potrebno je dobro razumijevanje fizikalno-kemijskih svojstava onečišćenog područja i mikrobnih zajednica (tablica 1) koje su uključene u proces.^{10,23–25} Upotreba mikroorganizama u procesu bioremedijacije ima velik potencijal

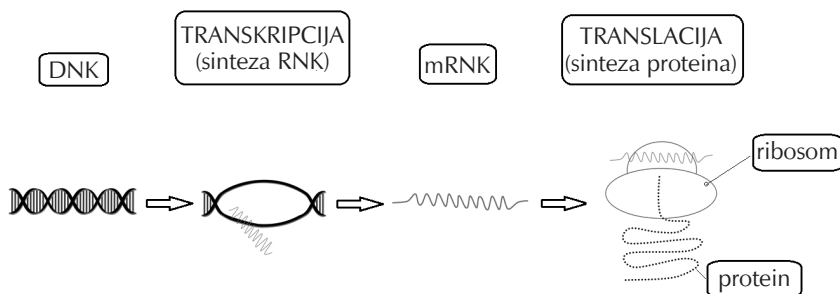
uspješnog uklanjanja onečišćenja iz okoliša, ali nedostatak informacija o čimbenicima koji utječu na rast i metabolizam različitih mikrobioloških vrsta ograničava njihovu uporabu. Jedan od razloga zašto naše znanje o mikrobiološkim putovima razgradnje nije sveobuhvatno je visoka složenost mikrobiološke fiziologije koja daje odgovor i omogućava prilagodbu mikroorganizma na različite vanjske i unutarnje podražaje.¹² Zbog toga se u novije vrijeme provode istraživanja na razini gena, kako bi se što bolje razumio metabolizam mikroorganizama prilikom procesa bioremedijacije te u svrhu pronalaska novih postupaka kojima bi se uspješno uklanjale onečišćujuće tvari iz okoliša.

Jednostavan jednostupnjeviti proces često nije dovoljan kako bi se uklonile onečišćujuće tvari iz okoliša. Najčešće su potrebne uzastopne biološke transformacije kako bi se uklonila određena tvar.²⁰ Takvi se uzastopni procesi mogu ostvariti djelovanjem već spomenutih mikrobnih zajednica. Sintetska biologija nova je znanstvena disciplina koja može stvarati nove biološke organizme ili stanice. U područje sintetske biologije ubrajamo genetičko modificiranje mikroorganizama i razvoj umjetnih, odnosno "sintetskih" mikrobnih zajednica.^{10,20} Ubrzani razvoj sintetske biologije omogućava stvaranje i optimiranje sintetskih mikrobnih zajednica s posebnim svojstvima.^{26,27}

Dakle, usporedno s razvojem metoda kojima se procesi bioremedijacije izučavaju na razini gena razvijaju se umjetne mikrobne zajednice i genetički modificirani organizmi s velikim bioremedijacijskim potencijalom.

3. Proteomika kao alat za razumijevanje procesa bioremedijacije

Proteini mogu imati brojne biološke funkcije i mnoga djelovanja kao što su biološki katalizator (enzimi), antitijelo, transport materijala u tijelu te regulacija funkcija stanice. Proces sinteze proteina obuhvaća translaciju, odnosno prevođenje genske informacije od slijeda nukleotida u slijed aminokiselina u primarnoj strukturi proteina. Pritom se slijed nukleotida molekule DNK prepisuje u komplementarni niz ribonukleotida, što tvori mRNK molekulu, odnosno glasnički (engl. messenger) RNK (slika 1). Svaki mRNK sadrži niz koji nosi informaciju o redosljedu aminokiselina u proteinu koji se proizvodi u postupku prevođenja. Ta



Slika 1 – Prikaz sinteze proteina u stanici

Fig. 1 – Representation of protein synthesis in cell

genska informacija zapravo je niz kodona u mRNK, a proces dekodiranja provodi se pomoću tRNK molekule, odnosno *transportna* ili prijenosna RNK molekule. Prevođenje se odvija na ribosomima koji se sastoje od rRNK (ribosomske RNK) i proteina. Sinteza proteina uključuje istodobno djelovanje mnogih ribosoma na jednoj mRNK molekuli, pri čemu svaki ribosom sintetizira jednu kopiju molekule proteina zapisanu u mRNK, što znači da se mnoštvo proteina proizvodi istodobno.^{28,29,30,31,32} Izraz ekspresija gena opisuje proces kojim se informacija iz gena prepisuje i prevodi u funkcionalni genski produkt (uobičajeno je to protein). Ekspresija proteina odnosi se na spomenutu gensku ekspresiju ili na proizvodnju proteina u većem mjerilu u biotehnologiji (prekomjerna ekspresija proteina).

Moderne tehnike koje se primjenjuju kao alati za proučavanje molekularnih mehanizama uključenih u metabolizam mikroorganizama obuhvaćaju:

- genomiku (engl. *genomics*) – analiza DNK,
- transkriptomiku (engl. *transcriptomics*) – izučavanje prevođenja RNK,
- proteomiku (engl. *proteomics*) – izučavanje proteina,
- interaktomiku (engl. *interactomics*) – izučavanje proteinskih nakupina, odnosno interakcije između proteina.

Mikroorganizmi proizvode različite enzime kojima razgrađuju jednostavne i složene tvari. Stanična ekspresija gena u organizmu ovisi o okolišnim uvjetima. Do promjena u fiziološkom odgovoru dolazi zbog prilagodljivosti organizma različitim vanjskim podražajima, kao što je prisutnost toksičnih tvari u okolišu. Prilikom takvog procesa pomoću proteomike proučavaju se promjene u sastavu ili povećanje broja proteina te se identificiraju ključni proteini uključeni u odgovor mikroorganizma na novo stanje.^{33,34}

Istraživanjem ekspresije širokog raspona proteina i proučavanjem genoma dobiva se dublji uvid u proces bioremedijacije, jer je regulacija genske ekspresije jedan od ključnih procesa prilagodbe promjeni okolišnih uvjeta, a time i preživljavanja. Objedinjavanjem pristupa transkriptomike i proteomike otkrivaju se novi putevi aerobne i anaerobne razgradnje toksičnog otpada. Taj je pristup u bioremedijaciji posebno naglašen prilikom izučavanja biorazgradnje policikličkih aromatskih ugljikovodika.¹²

Genomika i proteomika izvršni su alati za otkrivanje gena i metaboličkih puteva koji sudjeluju u bioremedijaciji. Pomoću tih alata dobiva se uvid u dinamički aspekt ekspresije gena i funkcije proteina na razini prepisivanja, prevođenja i međudjelovanja protein – DNK i protein – protein. Na taj način dobiva se cjelovita slika o tome kako biološke funkcije proizlaze iz informacija zapisanih u genomu organizma. Najveće prednosti primjene genomike proizlaze iz činjenice da ona proširuje doseg istraživanja ekspresije pojedinačnih gena na istraživanje ekspresije svih gena biološkog sustava. Kvantificiranje ukupne ekspresije gena u stanici mikroorganizma je korisno pri razumijevanju regulacije gena prilikom odgovora na toksičnu tvar. Time se dobiva informacija o mehanizmu prilikom obrane, prilagodbi na onečišćeno okruženje i mehanizmu razgradnje onečišćujuće tvari.^{35,36}

4. Potraga za biološkim izvorima koji se mogu upotrijebiti u bioremedijaciji

Za potencijalnu primjenu u bioremedijaciji primjenjuju se nemolekularni i molekularni pristupi te se u novije doba razvijaju novi mikroorganizmi pomoću genetičkog inženjstva.^{20,37}

Istraživanje bioloških izvora koje nije na molekularnoj razini zasniva se na potrazi novih mikroorganizama koji bi se mogli upotrebljavati u bioremedijaciji. Tako se u potrazi za organizmima koji imaju sposobnost uklanjanja određene onečišćujuće tvari istražuju njome već onečišćena područja.^{38,39} S druge strane, molekularno istraživanje bioloških izvora obuhvaća tehnike kao što su već spomenuta genomika (analiza genskih sekvencija), metagenomika (analiza ukupnog genskog materijala iz okoliša) i proteomika (analiza proteina), koje služe pri istraživanju prirodnih izvora, te transkriptomika (analiza prevođenja RNK) i 16S rRNK gensko sekvencioniranje.^{40,41} Navedene se tehnike primjenjuju u svrhu stjecanja naprednih znanja o prirodnim izvorima s potencijalnom primjenom u bioremedijaciji.

Tehnike molekularnog istraživanja prate razvoj molekularne biologije, bioinformatike i tehnike probira visokog protoka (engl. *high-throughput screening techniques*),⁴² a služe kako bi se razumio sastav cijele mikrobne zajednice iz okoliša, uključujući i mikroorganizme koji se ne mogu uzgajati u laboratoriju. Kako je ranije spomenuto, genomika i proteomika pomažu nam kako bismo saznali koji su geni ili metabolički putevi mikroorganizma uključeni u određenoj aktivnosti kao što je bioremedijacija.

Sekvencioniranje 16S ribosomske RNK (rRNK) uobičajena je metoda koja se primjenjuje pri identifikaciji i usporedbi bakterija prisutnih u uzorku. Pomoću genske sekvencije dobivene primjenom te metode može se identificirati nova vrsta mikroorganizma koja aktivno sudjeluje u bioremedijaciji okoliša, a koju bi bilo nemoguće identificirati pomoću nemolekularnih tehnika.^{43,44} Gen 16S rRNK upotrebljava se za filogenetska istraživanja jer je upravo taj gen evolucijski dobro očuvan te se razlikuje između raznih vrsta bakterija i arheja.^{45,46} Ta je metoda značajno unaprijedila istraživanje mikrobne bioremedijacije jer se pomoću nje mogu pratiti promjene mikrobnog sastava praćenjem prisutnih vrsta tijekom različitih stadija procesa bioremedijacije. Osim toga, saznanja dobivena pomoću te metode služe prilikom dizajniranja umjetnih mikrobnih zajednica za bioremedijaciju određenih onečišćujućih tvari.

Primjer primjene analize 16S rRNK je proučavanje triju vrsta bakterija izoliranih iz vode i tla: *Mycobacterium chlorophenicum*, *Mycobacterium chubuense* i *Mycobacterium obuense* koje su povezane s razgradnjom aromatskih spojeva.⁴⁷ Na temelju analize klasificirane su kao brzorastuće bakterije koje se nalaze u istoj grani filogenetskog stabla. Sojevi povezani s tim vrstama imaju svojstvo razgradnje različitih tipova kloriranih onečišćivala i aromatskih ugljikovodika, zbog čega su zanimljive za uporabu u bioremedijaciji onečišćenog tla. Izvršena komparativna analiza genoma tih bakterija služi za bolje razumijevanje njegovih karakteristika (veličina genoma, uobičajeni i posebni geni, dolazi li do izmjene gena) i međusobnih evolucijskih veza. Iako ih sve spomenute proučavane vrste posjeduju, poka-

zalo se da *Mycobacterium chlorophenolicum* sadrži najviše gena koji su zaduženi za proizvodnju proteina povezanih s razgradnjom aromatskih spojeva.

Uz prethodno opisane genomiku i proteomiku, metagenomika je korisna tehnika za proučavanje ukupne mikrobne zajednice onečišćenog područja ili područja zahvaćenog tehnologijom bioremedijacije. To je tehnika za proučavanje metagenoma, ukupnog genskog materijala izoliranog izravno iz uzorka iz okoliša, bez prethodnog uzgoja mikroorganizama.^{48,49} Tom se tehnikom dolazi izravno do genoma ukupne mikrobne zajednice, za razliku od tradicionalne genomike zasnovane na uzgoju, pri čemu se mogu analizirati samo mikroorganizmi koji se mogu uzgojiti u laboratorijskim uvjetima, pri čemu se propušta važna frakcija nekulturable mikrobne populacije. Metagenomika je vrlo važna za bioremedijaciju jer je velika većina mikrobne populacije onečišćenog područja prilagođena ekstremnim okolišima i ne može se uzgojiti ni u kojim laboratorijskim uvjetima. Bolje razumijevanje o tome kako se mikrobne zajednice nose s toksičnim onečišćujućim tvarima u međusobnoj suradnji pomaže u poboljšanju strategija bioaugmentacije i biostimulacije. Uobičajeni protokol dobivanja podataka primjenom metagenomike ima nekoliko stupnjeva:

1. ekstrakcija DNK iz okoliša i cijepanje fragmenata DNK odgovarajuće duljine,
2. vezanje odnosno ubacivanje fragmenata u vektore za kloniranje,
3. transformacija u odgovarajuću stanicu domaćina,
4. sekvencioniranje genoma nastalih klonova.

Kao rezultat navedenih postupaka dobiva se metagenomička knjižnica koja sadrži velik broj fragmenata DNK.^{2,50} Pomoću njih je moguće izvršiti pretragu specifične sekvencije, odnosno redoslijeda gena koji su odgovorni za određenu funkciju, a mogu se upotrebljavati i u svrhu istraživanja funkcionalne i genske raznolikosti mikroorganizama.

5. Genetičko inženjerstvo u funkciji bioremedijacije

Napretkom znanosti svakim se danom sintetiziraju nove kemikalije i složeni polimeri koji se ne mogu razgraditi pomoću prirodno prisutnih mikroorganizama. Genetičko inženjerstvo je biotehnološki proces kojim se modificira genom živog organizma, a uobičajeno se postiže dodavanjem ili izmjenom jednog ili više gena genoma organizma. Genetičko inženjerstvo obuhvaća "ubacivanje" stranih gena u željeni organizam (transgenični organizmi) i "izbacivanje" gena iz funkcije (*knock-out* gena). Također se provodi i uređivanje genoma što obuhvaća izmjene, prekrajanje i prepravlanje genoma (eng. *genome editing*).^{51,52}

Upotrebom tehnika genetičkog inženjerstva moguće je povećati učinkovitost razgradnje onečišćujućih tvari biljkama i mikroorganizmima čija je aktivnost u bioremedijaciji već poznata. Primjer za to su biljke koje uklanjaju onečišćenje teškim metalima u čijim se stanicama genetičkim modificiranjem povećava broj prijenosnika metala.⁵³ Drugi primjer

je upotreba određenog mikroorganizma u bioremedijaciji koji je zbog svih kriterija optimalan izbor, ali ne sadrži potrebnu aktivnost prema onečišćujućoj tvari. U tom se slučaju gen za aktivnost iz drugog organizma koji nije prikladan za upotrebu u bioremedijaciji iz praktičnih razloga "ubacuje" u prvi organizam.^{2,10}

Genetički modificirani organizmi imaju velik potencijal, ali postoji velika zabrinutost vezana uz njihovu primjenu zbog negativnog učinka koji mogu imati na okoliš i zdravlje ljudi ukoliko se puste u prirodu. Od samih začetaka genetičkog inženjerstva postoji otpor kako bi se spriječio utjecaj ljudski stvorenih genskih materijala na živi svijet. Već je davne 1975. godine održana konferencija u Asilomaru, gdje su zabrinuti znanstvenici pozvali na strogu regulaciju u primjeni genetičkog inženjerstva.⁵⁴

Reguliranje genetički modificiranih organizama (GMO), odnosno živih modificiranih organizama (eng. *living modified organisms*, LMO) ili, kako se negdje nazivaju, produkata moderne biotehnologije uspostavljeno je zahvaljujući brojnim dokumentima, organizacijama i događajima koji su se bavili i aktivno se bave tom temom. Neki od značajnijih su:

- Program Ujedinjenih naroda za okoliš (eng. *United Nations Environmental Programme*),
- Konvencija o biološkoj raznolikosti (eng. *Convention on Biological Diversity*),
- Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD),
- Protokol iz Cartagene o biosigurnosti.

Problem može nastati u slučaju kada modificirani organizmi prevladaju nad autohtonima jer tada dolazi do ugrožavanja ekološke ravnoteže. Također, protok gena između genetički modificiranog i prirodnog organizma možda je i najveći rizik prilikom upotrebe modificiranih organizama u bioremedijaciji *in situ* jer se na taj način može prenijeti otpornost na antibiotike u patogene mikroorganizme. Jedno od rješenja je upotreba takozvanih "gena samoubojica" koji uzrokuju smrt bakterije nakon što završi razgradnju toksičnih kemikalija.^{10,55}

Izrečen je stav¹⁹ da se u okoliš ne dodaje novi gen ukoliko se u jednu vrstu mikroorganizma iz tla doda gen iz drugoga, također mikroorganizma iz tla. Velika je vjerojatnost da genetički modificirani organizam neće dugo živjeti nakon što je potrošio specifičan supstrat kojim se hrani. Ukoliko se tome pridoda da gen koji prenosi informaciju o specifičnoj aktivnosti metabolizma u pravilu nije povezan sa svojstvom patogenosti, rizik od modificiranog soja za upotrebu u bioremedijaciji vrlo je nizak. Međutim prevladava zabrinutost od utjecaja genetički modificiranih organizama u okolišu, te se stoga mnoga istraživanja bave pronalaskom načina kako da se obustavi njihov potencijalni negativni utjecaj.

Nove ideje zaštite u području sintetske biologije ne zasnivaju se na granicama između prirodnih i sintetskih organizama kao spomenuti "geni samoubojice", već na pronalaženju alternativnih umjetnih molekularnih jezika koji ne mogu komunicirati s postojećim živim svijetom. Na taj

način bi se u potpunosti spriječila razmjena gena. Takvi su sustavi u razvoju i obuhvaćaju upotrebu ksenonukleinskih kiselina umjesto deoksiribonukleinske kiseline, pri čemu bi takav genski zapis bio potpuno nepoznat i nečitljiv prirodnim DNK polimerazama. Druga takva ideja temelji se na promjeni veličine DNK čijim se proširenjem molekule DNK procesom benzo-homologacije u dvije dimenzije dobivaju parovi baza koji su, ako uđu u prirodnog domaćina, preveliki da se smjeste u dvostruku zavojnicu DNK. Prednosti tih proširenih molekula DNK je što zasebno čine vrlo stabilne i funkcionalne uzvojnice, a pri sparivanju s prirodnom molekulom DNK dolazi do destabilizacije, čime je onemogućena ugradnja rekombinantne DNK u srodne bakterije. Također se istražuje zamjena ili povećavanje genske abecede DNK s parovima baza koji nisu pronađeni u prirodi, čime se onemogućava prirodnim polimerazama prepoznavanje takvih zapisa, a istodobno se pokušavaju stvoriti novi tipovi enzima polimeraze koji bi mogli prepoznati umjetno stvorene zapise da bi takav organizam mogao funkcionirati.⁵⁶

Još jedno od rješenja problema puštanja genetički modificiranih organizama u okoliš može biti u upotrebi proteina za bioremedijaciju ekspresijom proteina koji su zaslužni za razgradnju onečišćujuće tvari, ali bez stanica. Osim sigurnosti, primjena takvih sustava ima i prednost što se proces odvija u prisutnosti toksičnih tvari bez pojave inhibicije, odnosno smrti živih stanica. To znači da se enzimi mogu proizvesti u većim koncentracijama nego u živim stanicama, što bi povećalo efikasnost bioremedijacije.⁵⁷ Također, svi se energetski izvori na taj način upotrebljavaju za željenu svrhu razgradnje bez njihova trošenja za razmnožavanje stanica. Primjenom sustava bez cijelih stanica izbjegava se evolucijsko ponašanje organizama koje često smanjuje ili čak poništava funkcije koje su naglašene genetičkim inženjersvom. Ekspresija proteina izvan stanica podrazumijeva upotrebu ekstrakta stanice koji sadrži sve potrebno za prepisivanje i prevođenje gena uz potrebne pufere, nukleotide, aminokiseline i izvore energije. Takvi se sustavi već dulje vrijeme primjenjuju u biološkim istraživanjima pri čemu se proizvode proteini koje je teško dobiti ekspresijom u živim stanicama. S obzirom na to da su izazovi vezani uz slabija iskorištenja i visoku cijenu tih postupaka u novije doba prevladani, nema prepreke niti za njihovu primjenu u bioremedijaciji. Trenutačni nedostaci takvih sustava su njihovo ograničeno vrijeme djelovanja te razlikovanje brzine procesa razgradnje s brzinom razgradnje u stanici. Unaprjeđenje upotrebe takvih sustava temelji se na sušenju i konzerviranju komponenata za ekspresiju proteina izvan stanice kako bi se izbjegla potreba za njihovim skladištenjem uobičajeno pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, što nije održivo ukoliko se ti sustavi žele primjenjivati u bioremedijaciji *in situ*. Također, kako bi se poboljšala zaštita i integracija reagenasa potrebnih za izvanstanično prepisivanje i prevođenje gena te u svrhu povećanja stabilnosti sustava, istražuje se njihovo kapsuliranje u liposomima i polimerima.

Napomena: Što se tiče hrvatskog nazivlja u području genetike, naputak Instituta za hrvatski jezik i jezikoslovlje je da se pridjev "genski" upotrebljava kada se pojam odnosi na gene. Pridjev "genetički" znači "koji se odnosi na genetiku". U skladu s navedenim, u ovome se radu rabe pojmovi kao što su genski kod, genetičko inženjerstvo te genetički modificirani organizmi.

6. Zaključak

Tehnologija bioremedijacije upotrebljava metabolizam organizama za uklanjanje onečišćujućih tvari iz okoliša. U procesu bioremedijacije se ne upotrebljavaju kiseline, lužine ili druge toksične kemikalije, a proces se odvija pri okolnim temperaturama i tlaku, što troši manje energije od uobičajenih kemijskih procesa. Bioremedijacija se više ne smatra funkcijom jedne vrste mikroorganizma, već se nove tehnologije zasnivaju na upotrebi mikrobnih zajednica.

Napredak znanosti omogućava bolje razumijevanje metabolizma mikroorganizama i nudi nova rješenja za uklanjanje onečišćenja iz okoliša. Moderne tehnike koje se bave izučavanjima na razini gena dovode do novih saznanja o procesima razgradnje onečišćujućih tvari. Iako su molekularne tehnike unijele revoluciju u proučavanju mikroorganizama, njihova primjena u bioremedijaciji još je u začetcima. Primjena genetičkog inženjerstva na mikroorganizmima može uvelike poboljšati proces uklanjanja onečišćenja u okolišu. Važno je detaljno ispitati ponašanje takvih organizama u okolišu prije upotrebe, a zakonski okviri vezani za njihovu uporabu uzrokuju prepreke i dodatne troškove.

S obzirom na sve poznate prednosti procesa bioremedijacije, potencijalno uspješniji sustavi od dosadašnjih koji su otkriveni proučavanjem organizama na razini gena mogli bi biti od velikog značaja u budućnosti te je poželjno da se takva istraživanja nastave s obzirom na prednosti koje bioremedijacija nudi nad drugim tehnologijama uklanjanja onečišćenja iz okoliša.

Popis pojmova i kratica List of terms and abbreviations

DDT	– 1,1'-(2,2,2-trikloroetan-1,1-diil)bis(4-klorobenzen) – 1,1'-(2,2,2-trichloroethane-1,1-diyl)bis(4-chlorobenzene)
Nukleotidi / Nucleotides	– monomerske jedinice nukleinskih kiselina i posrednici u reakcijama prijenosa energije u stanicama – monomeric nucleic acid units and mediators in cell energy transfer reactions
DNK / DNA	– (deoksiribonukleinska kiselina) – nukleinska kiselina u obliku dvostruke spiralne zavojnice koja sadrži genske upute za specifični biološki razvoj staničnih oblika života i većine virusa – (deoxyribonucleic acid) – a thread-like chain of nucleotides carrying the genetic instructions for the specific biological development of all known living organisms and many viruses
DNK polimeraza / DNA polymerase	– enzim koji ima ključnu ulogu u udvostručavanju DNK jer kontrolira pravilno ugrađivanje nukleotida DNK na matricu originalnog lanca DNK – enzyme that plays a key role in doubling DNA because it controls the proper DNA insertion of nucleotides on the original DNA chain matrix

Rekombinantna DNK / Recombinant DNA	– DNK nastala umjetnim putem – artificially produced DNA
RNK (ribonukleinska kiselina) / RNA (ribonucleic acid)	– biološki važan tip molekula koji se sastoji od dugih kovalentno vezanih jedinica nukleotida – biologically important type of molecule consisting of long covalently bound nucleotide units
Genom / Genome	– genom nekog organizma su svi njegovi nasljedni podatci kodirani u DNK – genome of an organism is all hereditary data encoded in DNA
Metagenom / Metagenome	– sav genski materijal prisutan u uzorku iz okoliša koji se sastoji od genoma brojnih pojedinačnih organizama – all gene material present in the sample of the environment consisting of the genomes of many individual organisms

Literatura References

1. L. Yang, X. Li, X. Li, Z. Su, C. Zhang, H. Zhang, Catabolic profiles dynamics during the bioremediation process of chlorimuron-ethyl contaminated soil by *Methanolivora* CHL1^T, *Ecotox. Environ. Safe.* **155** (2018) 43–49, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.004>.
2. B. Sana, Bioresources for control of environmental pollution, u J. Mukherjee (ur.), *Biotechnological Applications of Biodiversity*, Adv. Biochem. Eng. Biot., Vol. **147**, Springer, Berlin, Heidelberg, 2015., str. 137–183, doi: https://doi.org/10.1007/10_2014_276.
3. M. Rizwan, S. Ali, M. Z. ur Rehman, J. Rinklebe, D. C. W. Tsang, A. Bashir, A. Maqbool, F. M. G. Tack, Y. S. Ok, Cadmium phytoremediation potential of *Brassica* crop species: A review, *Sci. Total. Environ.* **631-632** (2018) 1175–1191, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.104>.
4. S. K. Sarkar, Phytoremediation of trace metals by mangrove plants of Sundarban wetland, u S. K. Sarkar, *Trace metals in a tropical mangrove wetland*. Springer, Singapore, 2018., str. 209–247, doi: https://doi.org/10.1007/978-981-10-2793-2_9.
5. M. Megharaj, B. Ramakrishnan, K. Venkateswarlu, N. Sethunathan, R. Naidu, Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective, *Environ. Int.* **37** (8) (2011) 1362–1375, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>.
6. M. Šabić, M. Vuković Domanovac, Z. Findrik Blažević, E. Meštrović, Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrijske otpadne vode, *Kem. Ind.* **64** (5-6) (2015) 229–236, doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2014.014>.
7. M. Kästner, A. Miltner, Application of compost for effective bioremediation of organic contaminants and pollutants in soil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100** (8) (2016) 3433–3449, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7378-y>.
8. M. Chen, P. Xu, G. Zeng, C. Yang, D. Huang, J. Zhang, Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs, *Biotechnol. Adv.* **33** (6/1) (2015) 745–755, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>.
9. A. K. Haritash, C. P. Kaushik, Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review, *J. Hazard. Mater.* **169** (1-3) (2009) 1–15, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>.
10. I. Hussain, G. Aleti, R. Naidu, M. Puschenreiter, Q. Mahmood, M. M. Rahman, F. Wang, S. Shaheen, J. H. Syed, T. G. Reichenauer, Microbe and plant assisted-remediation of organic xenobiotics and its enhancement by genetically modified organisms and recombinant technology: A review, *Sci. Total. Environ.* **628-629** (2018) 1582–1599, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.037>.
11. M. Kumar, L. Philip, Remediation of endosulfan contaminated system by microbes, u S. N. Singh, *Microbe-Induced Degradation of Pesticides*. Vol. 1, Springer International Publishing, Switzerland, 2017, str. 59–81.
12. O. V. Singh, N. S. Nagaraj, Transcriptomics, proteomics and interactomics: Unique approaches to track the insights of bioremediation, *Brief. Funct. Genomics* **4** (4) (2006) 355–362, doi: <https://doi.org/10.1093/bfpg/eli006>.
13. R. M. Atlas, T. C. Hazen, Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the two worst spills in U.S. history, *Environ. Sci. Technol.* **45** (16) (2011) 6709–6715, doi: <https://doi.org/10.1021/es2013227>.
14. A. Roy, A. Dutta, S. Pal, A. Gupta, J. Sarkar, A. Chatterjee, A. Saha, P. Sarkar, P. Sar, S. K. Kazy, Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge, *Biores. Technol.* **253** (2018) 22–32, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.004>.
15. A. Alabresma, Y. P. Chen, A. W. Decho, J. Lead, A novel method for the synergistic remediation of oil-water mixtures using nanoparticles and oil-degrading bacteria, *Sci. Total. Environ.* **630** (2018) 1292–1297, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.277>.
16. M. Cycoń, A. Mrozik, Z. Piotrowska-Seget, Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review, *Chemosphere* **172** (2017) 52–71, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129>.
17. W. P. Louisa, Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments, *J. Hazard. Mater.* **177** (1-3) (2010) 81–89, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.090>.
18. A. Dzionek, D. Wojcieszynska, U. Guzik, Natural carriers in bioremediation: A review, *Electron. J. Biotechnol.* **23** (2016) 28–36, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>.
19. J. Drobnik, Genetically modified organisms (GMO) in bioremediation and legislation, *Int. Biodeter. Biodegr.* **44** (1) (1999) 3–6, doi: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(99\)00040-2](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(99)00040-2).
20. T. Gong, X. Xu, Y. Dang, A. Kong, Y. Wu, P. Liang, S. Wang, H. Yu, P. Xu, C. Yang, An engineered *Pseudomonas putida* can simultaneously degrade organophosphates, pyrethroids and carbamate, *Sci. Total. Environ.* **628-629** (2018) 1258–1265, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.143>.
21. S. S. Suthersan, J. McDonough, *Remediation engineering: Design concepts*. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996., str. 123–158, doi: <https://doi.org/10.1201/9781420050585>.
22. I. M. M. Gillespie, J. C. Philp, Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy, *Trends. Biotechnol.* **31** (6) (2013) 329–332, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.015>.
23. P. A. Latha, S. S. Reddy, Review on bioremediation – potential tool for removing environmental pollution, *Int. J. Basic Appl. Chem. Sci.* **3** (3) (2013) 21–33.
24. A. Singh, R. C. Kuhad, O. P. Ward, Biological remediation of soil: An overview of global market and available technologies, u A. Singh, R. C. Kuhad, O. P. Ward (ur.), *Advances in*

- Applied Bioremediation, Vol. 17, Springer, Berlin, Heidelberg, 2009., str. 1–19, doi: https://doi.org/10.1007/978-3-540-89621-0_1.
25. E. Smith, P. Thavamani, K. Ramadass, R. Naidu, P. Srivastava, M. Megharaj, Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: Evaluation of bioslurry and biopiling techniques, *Int. Biodeter. Biodegr.* **101** (2015) 56–65, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.029>.
 26. M. Z. Ding, H. Song, E. X. Wang, Y. Liu, Y. J. Yuan, Design and construction of synthetic microbial consortia in China, *Synth. Syst. Biotechnol.* **1** (4) (2016) 230–235, doi: <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.08.004>.
 27. H. Song, M. Z. Ding, X. Q. Jia, Q. Ma, Y. J. Yuan, Synthetic microbial consortia: From systematic analysis to construction and applications, *Chem. Soc. Rev.* **43** (20) (2014) 6954–6981, doi: <https://doi.org/10.1039/c4cs00114a>.
 28. K. Denniston, J. Topping, R. Caret, *General, Organic, and Biochemistry*, 6th Ed., McGraw-Hill Higher Education, New York, 2008, str. 694–710.
 29. T. M. Hansen, P. V. Baranov, I. P. Ivanov, R. F. Gesteland, J. F. Atkins, Maintenance of the correct open reading frame by the ribosome, *Embo. Rep.* **4** (5) (2003) 499–504, doi: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor825>.
 30. C. B. Anfinsen, The formation and stabilization of protein structure, *Biochem. J.* **128** (4) (1972) 737–749, doi: <https://doi.org/10.1042/bj1280737>.
 31. V. Sirri, S. Urcuqui-Inchima, P. Roussel, D. Hernandez-Verdun, Nucleolus: The fascinating nuclear body, *Histochem. Cell. Biol.* **129** (1) (2008) 13–31, doi: <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0359-6>.
 32. A. Köhler, E. Hurt, Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm, *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **8** (2007) 761–773, doi: <https://doi.org/10.1038/nrm2255>.
 33. J. Sikkema, J. A. de Bont, B. Poolman, Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol. Rev.* **59** (2) (1995) 201–222.
 34. C. Vasseur, J. Labadie, M. Hébraud, Differential protein expression by *Pseudomonas fragi* submitted to various stresses, *Electrophoresis* **20** (11) (1999) 2204–2213, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990801\)20:11<2204::AID-ELPS2204>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990801)20:11<2204::AID-ELPS2204>3.0.CO;2-I).
 35. Z. Basharat, A. Yasmin, T. He, Y. Tong, Genome sequencing and analysis of *Alcaligenes faecalis* subsp. phenolicus MB207, *Sci. Rep-UK.* **8** (2018), <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21919-4>.
 36. K. Wei, H. Yina, H. Peng, G. Lu, Z. Dang, Bioremediation of triphenyl phosphate by *Brevibacillus brevis*: Degradation characteristics and role of cytochrome P450 monooxygenase, *Sci. Total. Environ.* **627** (2018) 1389–1395, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.028>.
 37. T. Zwillich, A tentative comeback for bioremediation, *Science.* **289** (5488) (2000) 2266–2267, doi: <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2266>.
 38. A. J. Beattie, M. Hay, B. Magnusson, R. Nys, J. Smeathers, J. F. V. Vincent, Ecology and bioprospecting, *Austral. Ecol.* **36** (3) (2011) 341–356, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2010.02170.x>.
 39. A. Ratnaparkhe, A. Tiwari, Bioprospecting approaches for biocatalysts from extremophiles, *Int. J. Biomed. Res.* **2** (1) (2011) 1–17, doi: <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.75>.
 40. R. Chakraborty, C. H. Wu, T. C. Hazen, Systems biology approach to bioremediation, *Curr. Opin. Biotech.* **23** (3) (2012) 483–490, doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.01.015>.
 41. T. K. Wood, Molecular approaches in bioremediation, *Curr. Opin. Biotech.* **19** (6) (2008) 572–578, doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.10.003>.
 42. W. F. Donahue, B. M. Turczyk, K. A. Jarrell, Rapid gene cloning using terminator primers and modular vectors, *Nucleic. Acids. Res.* **30** (18) (2002) doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gnf094>.
 43. M. Vogel, I. Nijenhuis, J. Lloyd, C. Boothman, M. Pöritz, K. Mackenzie, Combined chemical and microbiological degradation of tetrachloroethene during the application of Carbo-Iron at a contaminated field site, *Sci. Total. Environ.* **628-629** (2018) 1027–1036, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.310>.
 44. X. Zhu, W. Li, L. Zhan, M. Huang, Q. Zhang, V. Achal, The large-scale process of microbial carbonate precipitation for nickel remediation from an industrial soil, *Environ. Pollut.* **219** (2016) 149–155, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.047>.
 45. W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J. Bacteriol.* **173** (2) (1991) 697–703, doi: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
 46. T. Coenye, P. Vandamme, Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes, *FEMS. Microbiol. Lett.* **228** (1) (2003) 45–49, doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00717-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00717-1).
 47. S. Das, B. M. F. Pettersson, P. R. K. Behra, M. Ramesh, S. Dasgupta, A. Bhattacharya, L. A. Kirsebom, Characterization of three *Mycobacterium* spp. with potential use in bioremediation by genome sequencing and comparative genomics, *Genome. Biol. Evol.* **7** (7) (2015) 1871–1886, doi: <https://doi.org/10.1093/gbe/evv111>.
 48. G. E. Rosso, J. A. Muday, J. F. Curran, Tools for metagenomic analysis at wastewater treatment plants: Application to a foaming episode, *Water. Environ. Res.* **90** (3) (2018) 258–268, doi: <https://doi.org/10.2175/106143017X15054988926352>.
 49. A. Kouzuma, S. Ishii, K. Watanabe, Metagenomic insights into the ecology and physiology of microbes in bioelectrochemical systems, *Biores. Technol.* **255** (2018) 302–307, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.125>.
 50. D. Chen, D. Wang, C. Xu, C. Chen, J. Li, W. Wu, X. Huang, H. Xie, Nematicidal protease genes screened from a soil metagenomic library to control *Radopholus similis* mediated by *Pseudomonas fluorescens* pf36, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102** (7) (2018) 3301–3314, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8869-9>.
 51. F. J. M. Mojica, L. Montoliu, On the origin of CRISPR-Cas technology: From prokaryotes to mammals, *Trend. Microbiol.* **24** (10) (2016) 811–820, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>.
 52. S. Joo, I. J. Cho, H. Seo, H. F. Son, H. Y. Sagong, T. J. Shin, S. Y. Choi, S. Y. Lee, K. J. Kim, Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation, *Nat. Commun.* **9** (2018), doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>.
 53. M. Urgun-Demirtas, B. Stark, K. Pagilla, Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants, *Crit. Rev. Biotechnol.* **26** (3) (2006) 145–164, doi: <https://doi.org/10.1080/07388550600842794>.
 54. A. J. Hogan, From precaution to peril: Public relations across forty years of genetic engineering, *Endeavour* **40** (4) (2016) 218–222, doi: <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2016.09.002>.
 55. C. Garbisu, I. Alkorta, Utilization of genetically engineered

- microorganisms (GEMs) for bioremediation, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74** (7) (1999) 599–606, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199907\)74:7<599::AID-JCTB82>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199907)74:7<599::AID-JCTB82>3.0.CO;2-G).
56. M. Schmidt, V. de Lorenzo, Synthetic constructs in/for the environment: Managing the interplay between natural and engineered Biology, *FEBS. Lett.* **586** (15) (2012) 2199–2206, doi: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.02.022>.
57. D. K. Karig, Cell-free synthetic biology for environmental sensing and remediation, *Curr. Opin. Biotechnol.* **45** (2017) 69–75, doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.01.010>.

SUMMARY

Improvement of Bioremediation Efficiency on the Gene Level

Morana Česnik,* Zvezdana Findrik Blažević, and Marija Vuković Domanovac

Bioremediation uses the potential of microorganisms for the removal of contaminants from the environment. The metabolic pathways that degrade contaminants into less toxic substances are very complex. Bioremediation mechanisms are studied on the gene level using advanced molecular biology techniques. The gene responsible for the production of a protein that degrades the contaminant can be isolated and introduced into another organism, creating an organism with enhanced bioremediation properties. Scientific research worldwide focuses on genetically engineered microorganisms. However, the greatest obstacle in their application for bioremediation is the legal framework and insufficient knowledge of the consequences of their release into the environment.

Keywords

Bioremediation, contamination removal, microorganisms, proteins, genetic engineering

University of Zagreb,
Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Marulićev trg 19, Zagreb, Croatia

Review
Received May 24, 2018
Accepted July 9, 2018