



VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Klasifikace:	Draft	<input type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Oponovaný draft	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Finální dokument	<input type="checkbox"/>	<i>Pro oficiální použití</i>
	Deklasifikovaný dokument	<input type="checkbox"/>	<i>Pro veřejné použití</i>

Název dokumentu:

GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY V EKOSYSTÉMU

Poznámka:

Vypracovaly: Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc., Doc. Dr. Ing. Martina Macková
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 PRAHA 6 - Ruzyně

Tel.: +420 233 022 324 , fax.: +420 233 311 591, URL: <http://www.phytopsanitary.org>

1. Úvod	3
2. Geneticky modifikované organismy a jejich možné využití	3
3. Transgenní mikroorganismy v ekologických procesech	6
3.1 Transgenní mikroorganismy pro biodegradaci organických polutantů.....	7
3.1.1 Obecné strategie pro optimalizaci bioremediačních technologií.....	7
3.1.2 Konstrukce rekombinantních mikroorganismů.....	8
3.1.3 Cytochrom P450 a jeho využití pro bioremediace organických polutantů.	9
3.1.4 Degradace chlorovaných látek	9
3.1.5 Degradace polychlorovaných bifenylyů	11
3.1.6 Degradace uhlovodíků.....	12
3.2 GMM-transformace anorganických polutantů	14
3.2.1 Metallothioneiny	14
3.3 GM houby – biodegradace	15
4. Transgenní rostliny v ekologických procesech.....	16
4.1 Transgenní rostliny využívané pro fytořemediace	17
4.1.1 Fytořemediace organických polutantů a úloha cytochromu P450.....	18
4.1.2 Fytořemediace těžkých kovů	19
4.1.2.1 Zvýšení akumulace těžkých kovů pomocí metallothioneinů	19
5. Použitá literatura	21

1. Úvod

Geneticky modifikované organismy (GMO) zasahují aktivně do našeho života již více než 15 let a postupně se jejich využívání šíří do různých oborů lidské činnosti. Vedle zemědělství, potravinářství, farmacie a dalších, se v poslední době zvyšuje zájem o jejich možné využití jejich potenciálu v ekologii. Konkrétní oblastí našeho zájmu je využití geneticky modifikovaných organismů (GMO) při odstraňování organických a anorganických polutantů ze životního prostředí. V této souvislosti se jedná hlavně o mikroorganismy (bakterie, event. plísně) a rostliny. I když v současné době je přímé využití degračních technologií založených na GMO minimální, lze očekávat jejich rozšíření.

2. Geneticky modifikované organismy a jejich možné využití

Základ vzniku GMO je v genovém inženýrství, které se zabývá přípravou umělých (v přírodě se nevyskytujících) kombinací genů nebo vytvářením pozměněných či zcela nových genů a jejich zaváděním do organismů s cílem upravit anebo doplnit jejich genetickou výbavu, a tím pozměnit jejich vlastnosti. Genového inženýrství vzniklo na základě velmi rychlého rozvoje molekulární biologie, která se začala prosazovat jako samostatný obor koncem druhé světové války a velmi rychle se vyvíjela. Po poznání struktury a funkce DNA byly v šedesátých letech minulého století objasněny na molekulární úrovni způsoby uchování a přenosu genetické informace v buňkách. Tím se otevřely možnosti pro vytváření cílených změn a zásahů do genetické výbavy organismů. V roce 1973 byl připraven v podmínkách *in vitro* (mimo buňku) první rekombinantní gen a začala éra tzv. genových manipulací, které se později staly základem nového odvětví genetiky označovaného jako genového inženýrství.

Cílené úpravy genů umožnila jejich identifikace a charakterizace v daném organismu, stanovení jejich funkce a následná izolace ve formě DNA. Izolované geny lze téměř libovolným způsobem ve zkumavce pozměnit a opět je vrátit do původního nebo jiného organismu a zajistit, aby došlo k jejich vyjádření, které má za následek vznik nové vlastnosti. Na rozdíl od tradičního genetického šlechtění, které umožňuje křížit jen blízké příbuzné druhy, dovolují techniky genového inženýrství přenášet geny do taxonomicky vzdálených (tj. nepříbuzných) organismů a překonávat tak přirozené mezidruhové reprodukční bariéry. Gen upravený metodami genového inženýrství a přenášený do nového hostitelského organismu se označuje jako transgen. Organismus, jehož genom obsahuje stabilně začleněný transgen, se označuje jako transgenní organismus nebo též geneticky modifikovaný organismus (GMO). Proces vytváření transgenního organismu se označuje jako **transgenoze**. Pro transgenní organismy je charakteristické, že se vyznačují vlastnostmi, které by se u daného druhu v průběhu evoluce ve volné přírodě patrně nikdy nevytvořily. Využívání nových vlastností transgenních organismů a jejich produktů v průmyslu, zemědělství a zdravotnictví je základem moderních biotechnologií.

Jaká jsou možná využití GMO:

- Zvýšit výnosy a nutriční hodnotu zemědělských plodin, produkci hospodářských zvířat, drůbeže a ryb a omezit chemizaci v zemědělské výrobě

- Snížit ztráty při pěstování zemědělských plodin a chovu hospodářských zvířat
- Zlepšit chuť, kvalitu a trvanlivost potravin, modifikací rostlin získat nové suroviny pro chemickou výrobu
- Připravit enzymy s novými vlastnostmi a nové typy léčiv a biopreparátů, vyznačující se vyšší účinností bez nežádoucích účinků

Využit biologické systémy pro ekologické čištění vody a půdy

- Připravit transgenní rostliny a zvířata produkující farmakologicky aktivní látky
- Zdokonalit diagnostiku dědičných nemocí a vyhledávání nosičů genetických poškození
- Zavést nové způsoby léčby genetických onemocnění (genová terapie dědičných a nádorových onemocnění)

Podle zákona **č. 78/2004 Sb.**, o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty (účinnost od 25. 2. 2004 nahrazuje zákon č. 153/2000 Sb.2004) se hodnotí riziko vyplývající z konstrukce a práce s GMO do tří skupin podle toho jakým způsobem se s GMO nakládá:

- Uzavřené nakládání se celou dobu odehrává v prostorách k tomu striktně vymezených, tj.v laboratořích. V tomto případě je riziko plynoucí s nakládání s GMO minimální.
- Druhý stupeň představuje uvolnění do prostředí a pokrývá převážně pěstování GM rostlin na pokusných políčkách, kde se současně monitorují všechna možná rizika, která by mohla nastat při nekontrolovatelném šíření GMO.
- Třetí stupeň je uvádění do oběhu, což pro zemědělce a potravináře znamená přímý prodej potravinářských GMO surovin a z nich vyrobených potravin na trhu. V tomto případě je kladen co největší důraz právě na prověření jejich bezpečnosti.

V dnešní době jsou k dispozici podklady studií související s více než desetiletým uvolňováním a užíváním zemědělských plodin jako jsou soja, kukuřice, řepka, bavlna a pod., které ukazují, že počáteční obavy a odpor veřejnosti pomalu ustupují a konsumenti se začínají ztotožňovat s tím, že GMO nejsou tak nebezpečné pro jejich zdraví jak se ze začátku zdálo, a že opravdu mohou částečně přispět k řešení neodvratně se blížících problémů souvisejících s nedostatkem potravy na Zemi.

Z výčtu možných použití GMO uvedených výše v textu je patrné, že další oblastí, kde se tyto organizmy již s úspěchem využívají je oblast farmacie a není vsutku náhodou, že první produkty připravené metodami genového inženýrství v geneticky pozměněných bakteriích byly **lidský inzulin a růstový hormon**, které se díky jejich jednoduché struktuře syntetizují v bakteriích v aktivní formě.

Díky své schopnosti metabolizovat nejrůznější substráty jsou bakterie a kvasinky tradičně využívány k přípravě pokrmů a nápojů (sladařství, pekařství, výroba sýrů apod.). Metody genového inženýrství umožňují nejen upravovat jejich metabolické dráhy a vylepšovat tak

vlastnosti konečných produktů, ale otevřely i cestu k jejich využívání pro přípravu cizorodých produktů, které jsou vytvářeny rostlinami nebo živočichy včetně člověka.

V potravinářském průmyslu se při výrobě sýrů se používá **chymosin** (proteasa podílející se na koagulaci kaseinu a na hydrolýze κ -kaseinu), na jehož produkci geneticky modifikovanými mikroorganismy se pracovalo již od počátku roku 1980. V současné době je tento enzym, jako produkt různých transgenních mikroorganismů, dostupný běžně na trhu.

Další možná perspektivní oblast pro využití GMO technologií je oblast bioremediace polutantů (xenobiotik, těžkých kovů) z životního prostředí. Vhodnými a cílenými genovými modifikacemi se připravují organismy, které jsou schopné degradovat organické polutanty či hromadit a transformovat těžké kovy. I přesto, že byla popsána řada mikroorganismů se schopností degradovat polutanty v životním prostředí, přípravou geneticky modifikovaných organismů je možné zvýšit jejich biodegradační kapacitu a s tím i efektivnost celého procesu, a lze tak urychlit odstraňování obzvláště xenobiotik, látek, které nemají v přírodě obdobu, a byly do ní uvedeny činností člověka.

Byly zkonstruovány tři hlavní typy modifikovaných GMO, které jsou v současné době testovány v laboratorních a polních pokusech s perspektivou komerčního využití. Jsou to **GM mikroorganismy konstruované pro degradaci organických polutantů, GM rostliny se schopností hyperakumulovat nebo odpařování těžkých kovů a GM mikroorganismy používané jako biosensory pro detekci přítomnosti a toxicity určitých polutantů v přírodě.** Do dnešní doby nebylo zatím v Evropě povoleno uvolnění GMO do prostředí za účelem odstraňování organických či anorganických polutantů. GM mikroorganismy modifikované vnesením *lux* genu byly využity při uvolnění do prostředí ke komerčnímu sledování distribuce polutantů na kontaminovaných místech.

Bakterie asociované na rostliny - jedná se o druhy *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter* a další, o kterých je známo, že v jejich přítomnosti rostliny dávají větší výnos, jsou podrobovány genetickým modifikacím.

Hlavním úkolem při aplikaci GMM je zjištění jejich interakcí s původní (indigenní) mikroflorou. Z těchto důvodů jsou při uvedených modifikacích používány kromě cílových genů také reporterové geny, které pomáhají mapovat šíření GMM a eventuální genové interakce. Situaci poněkud ztěžuje fakt, že většina volně žijících mikroorganismů obsahuje celou řadu plasmidů a jejich funkce není mnohdy známá. Největšího uplatnění bylo docíleno v případě rhizobií a agrobakterií, kde proběhla celá řada polních aplikací.

Rozdíl mezi uzavřeným nakládáním s GMM a jejich uvolňováním do životního prostředí spočívají v tom, že zatímco zásady uzavřeného nakládání jsou vypracovány do přesných pravidel a bezpečnost provozu je zabezpečena standardními technologickými postupy, je v oblasti uplatnění GMM v životním prostředí celá řada nejistot, které pramení z dosud omezených znalostí o účasti mikroorganismů při vytváření životního prostředí. Není pochyb, že intenzita bádání o mechanismech působení mikroorganismů v půdě, v sedimentech a ve vodách se neustále zvyšuje, a tak se vytváří podmínky pro uplatnění mikroorganismů s cíleně

pozměněnými vlastnostmi. Zásoba dosud neprozkoumaných mikroorganismů volně žijících v životním prostředí, spolu se současným rozvojem genomiky, proteomiky a metod genetického inženýrství, dává do budoucnosti velmi dobré předpoklady pro daleko širší uplatnění GMM pro tvorbu udržitelného životního prostředí.

3. Transgenní mikroorganismy v ekologických procesech

Půdní mikroflora složená z bakterií, hub a řas má zásadní úlohu při zpracování všech složek tvořících organismy, které po skončení života se dostávají do půdy. Tato mikroflora, která je má hmotnost 5 až 10 t živých organismů na jeden hektar, je vysoce diversifikovaná a její složení se mění v prostoru a čase. Vysoká funkční a právě tak genetická diversita je výsledkem násobných mutací, genetických výměn a selekcí, ke kterým docházelo během evoluce a které dovolují mikroorganismům schopnost adaptace do nových ekologických nik, které vznikají působením aktivity člověka na životní prostředí. Řada takto žijících bakterií má vysoký potenciál nejen pro zvyšování zemědělské produkce, ale i pro i pro odstraňování polutantů životního prostředí.

Všechny aplikace GMO pro bioremediace využívají bakterie nebo rostliny. Houby (plísňe) mají sice poměrně rozsáhlou schopnost degradovat celou řadu velmi špatně odbouratelných látek, ale pro genetické modifikace nejsou vhodné svou složitostí genomu a tím, že řada hub jsou rostlinné patogeny, tudíž nevhodné pro použití jako GMO pro odstraňování polutantů z přírody.

Jak již bylo řečeno GMM se přednostně využívají pro odstraňování organických polutantů, hlavně chlorovaných sloučenin a uhlovodíků a GM rostliny byly převážně konstruovány pro odstraňování kovů ze životního prostředí. Vedle toho byly konstruovány mikroorganismy pro odstraňování kovů a rostliny pro odstraňování organických polutantů jako jsou nitroaromáty a polychlorované bifenyly, ale zatím se v současné době dává přednost jejich výše zmíněnému využití.

Přímá využití GMO při bioremediacích jsou založena na vývoji a aplikaci GMO přímo na kontaminovaném místě, kde působí na polutant *in situ*. Tento postup ovšem vyžaduje, aby GMO byl schopný přežít v reálném životním prostředí, a aby odstraňovaná látka bylo volně přístupná jeho působení. V praxi existuje mnoho dlouhodobě kontaminovaných oblastí, kde není přítomen pouze jeden kontaminant, ale směs různých organických a anorganických látek s rozdílnou přístupností. V tomto případě nelze předpokládat, že by jedna mikrobiální kultura či komunita byla schopna degradovat všechny typy přítomných chemických sloučenin. Velmi záleží nejen na charakteru jednotlivých organických event. anorganických látek, ale také na jejich vzájemném zastoupení, které může u nejméně koncentrované látky vyústit k inhibici růstu aplikovaných mikroorganismů event. konsorcií mikroorganismů v důsledku její toxicity. Např. na místě, které je kontaminované chlorovanými rozpouštědly a radionuklidy musí používané GMO vykazovat degradační aktivitu proti chlorovaným rozpouštědlům a při tom být resistentní vůči radionuklidům. Takovým mikroorganismem je bakterie *Deinococcus radiodurans*, jejíž geneticky

modifikovaná forma je schopná degradovat 125 n mol/ml chlorbenzenu v prostředí o radioaktivitě do 60 Gy/h.

V případech vícečetných kontaminací, kterých je v reálném prostředí většina, může být řešením kombinovaná strategie – použití rhizosferní mikroflory rostlin(bakterie a houby - plísně). Organické polutanty se často vyznačují nízkou rozpustností a vyšší hydrofobicitou, což obojí způsobuje nízkou dostupnost pro mikroorganismy a z toho vyplývající slabou či téměř žádnou degradabilitu. Degradace těchto těžko dostupných látek vyžaduje přítomnost organismů, které mohou jejich dostupnost zvýšit produkcí biosurfaktantů či jejich přímým přidávkem.

3.1 Transgenní mikroorganismy pro biodegradaci organických polutantů

Mezi mikroorganismy jsou hlavně bakterie využívány pro expresi cizích bílkovin nejdéle. Při přípravě transgenních mikroorganismů se využívá jejich hlavní přednosti, kterou je jejich snadná kultivace a krátká doba nutná na dělení buněk, což umožňuje získat obrovskou biomasu mikroorganismů a žádaný produkt pak izolovat ve velkém množství.

Schopnost bakterií a hub využít širokou škálu různých látek je ideální pro jejich využití pro biodegradaci. Několik stovek mikrobiálních genetických systémů koduje schopnost používat různé organické látky jako zdroje uhlíku, dusíku a energie a dá se s výhodou využít i pro biodegradaci nežádoucích látek v prostředí. Co se však týká xenobiotik, byly mikroorganismy v přírodě vystaveny jejich účinku a vlivu historicky krátkou dobu, za kterou nebyly schopny vyvinout nové degradační dráhy specializované pro jejich metabolizaci. Využívají tedy již dosud dráhy v mikroorganismu již vyvinuté, které si přizpůsobuje. Např. enzymy používané bakteriemi *Pseudomonas putida* LB400 a *Alcaligenes eutrophus* H850 pro degradaci bifenyly a níže chlorovaných polychlorovaných bifenyly patří mezi enzymy, které jsou využívány těmito bakteriemi pro degradaci terpenů produkovaných v přírodě rostlinami v rhizosféře. Tento „přizpůsobený“ metabolismus však neprobíhá optimální rychlostí, což je i jeden z důvodů persistence xenobiotik v přírodě.

Optimalizace biodegradační dráhy xenobiotik je jeden z hlavních předpokladů efektivnosti a účinnosti bioremediačních procesů. GM technologie nabízejí určité řešení tohoto problému, stejně tak mohou být využity i jako nástroj pro detekci přítomnosti polutantů v prostředí a míry jejich toxicity. Několik málo mikroorganismů vyskytujících se v přírodě mají dráhu, která může mineralizovat xenobiotika jako jsou pentachlorfenol a polychlorované bifenyly. GM technologie dává možnost zlepšit existující katabolickou dráhu nebo rozšířit takovou dráhu tak, aby byly využity i látky předtím nemetabizovatelné.

3.1.1 Obecné strategie pro optimalizaci bioremediačních technologií

Optimalizace bioremediačních technologií je založená na:

- Zlepšení transkripce genových sekvencí
- Zlepšení translace
- Zvýšení stability a aktivity biodegradačních enzymů

- Rozšíření existujících specifity katabolických drah
- Konstrukce rekombinantních organismů

Geny podílející se na degradaci polutantů jsou obvykle umístěny na širokospektrých, konjugativních nebo mobilních plasmidech. Uspořádání genů na operonu zajišťuje správný přepis sekvencí a tvorbu příslušného enzymu. Jednotlivé operony jsou kontrolovány pozitivně regulujícími proteiny, které jsou aktivovány substráty nebo metabolity (efektory) přítomnými v katabolické dráze. Kontrola transkripce tímto způsobem zajišťuje, že mikroorganismy budou metabolisovat pouze příslušné přítomné substráty v katabolické dráze.

Aktivace katabolického operonu se projeví když je příslušný efektor přítomný v dostatečné koncentraci. Např. katabolické promotory TOL plasmidu jsou aktivovány při koncentraci efektoru 5-50 μM . *Pm* promoter TOL plasmidu pWVO v *Pseudomonas putida* je aktivován při koncentraci 1 ppm benzoátu. *Pm*, *Pu* a *PsaI* promotory, které jsou aktivovány alkyl and halobenzoáty, alkyl- a halotolueny a salicylátem mají široké spektrum působení a mohou působit v mnoha rodech bakterií. Ale jestliže je úkolem určité bioremediační technologie degradovat polutant v koncentraci nižší než je nutná koncentrace efektoru, pak se pro získání uhlíku a energie musí využívat metabolická dráha pro jiný substrát. A vlastní degradační katabolická dráha je oddělena. Jedna z možností jak se vyhnout přidavku dalšího zdroje uhlíku do kontaminovaného prostředí je vnesení příslušné degradační katabolické dráhy do mikroorganismů, které přirozeně kolonizují rhizosféru. Byla popsána genetická modifikace buněk bakterie *Pseudomonas*, kolonizující kořeny bph genovým klastrem využívaným pro degradaci níže chlorovaných PCB. Využití technik genetické modifikace pro vnesení alternativního promotoru do buňky současně zvýší i počet efektorů, které mohou aktivovat biodegradační dráhy. Jestliže nejsou k dispozici vhodné promotory mohou být modifikované geny vneseny do mikroorganismu minitransposomem.

V případě genů vyšších organismů řada proteinů, jakými jsou např. lidské faktory pro srážení krve nebo protilátky, vyžadují tyto geny pro svou aktivaci nejrůznější modifikace, které mohou zajistit pouze buňky eukaryotických organismů, např. kvasinek, hmyzu nebo savců.

3.1.2 Konstrukce rekombinantních mikroorganismů

Jak již bylo řečeno, díky genetickým modifikacím mikroorganismů můžeme získat bakterie se znásobenou degradační dráhou nebo bakterie, které díky vneseným genům budou moci odbourávat látku do té doby neodbouratelnou. Zdá se, že perspektivní vývoj a konstrukce kmenů s takovými schopnostmi by mohly být v praxi výhodnější než využití konsorcií nemodifikovaných organismů, kde jsou jednotlivé kroky odbourávání zajišťovány různými mikroorganismy. Tedy omezení využití konsorcií pro biodegradace je způsobena tím, že intermediáty metabolické dráhy musí být přenášeny mezi buňkami, což vede ke snížení aktivity a metabolity mohou být přeměněny v toxické látky tzv. *dead end* metabolity. Použití geneticky modifikovaných mikroorganismů, kde celý katabolický proces probíhá v jedné buňce může odstranit výše zmíněné problémy. Ovšem samozřejmě se zde vyskytují jiné problémy úzce

související se schopností těchto nekombinovaných kmenů přežít a růst v reálném kontaminovaném prostředí.

Případ biodegradace chloro- nebo methylkatecholu (vznikajících během degradace chloro- a metylaromatických sloučenin) ukazuje na potenciální problém spojený s „chybnou“ metabolickou dráhou intermediátů. Ačkoliv mnoho půdních mikroorganismů vykazuje schopnost degradovat chlorkatechol *ortho* dráhu a metylkatechol *meta* dráhu, obě metabolické dráhy se projeví jen v individuální přítomnosti příslušného substrátu. Jen velmi málo kmenů je schopno efektivně růst na směsi metylovaných a chlorovaných aromatických látek.

Aby zabránil vzniku inhibičních metabolitů degradační dráhy zkonstruoval Erb a kol. (1997) geneticky modifikovanou pseudomonadu (*Pseudomonas* sp. B13 SN45RE) se schopností degradovat jak chlorované tak i metylované aromatické sloučeniny *ortho* metabolickou dráhou. Jiná pseudomonada (*Pseudomonas* sp. B13 FR1 (pFRC20P)) využívající stejné sloučeniny ve vnesené *ortho* dráze byla schopná degradovat 3- chlorbenzoát a 4- methylbenzoát (koncentrace obou látek 25 μ M), ve vrstvě sedimentu převrstveného vodou během 4 týdnů. Analýza degradace ve vodě i sedimentu v mikrokosmu ukázala, že GM bakterie měly pro svou degradaci optimální podmínky, což by se jistě dalo využít pro reálné kontaminace v obdobném uspořádání.

Genetické modifikace mohou být také využity pro přípravu mikroorganismů, které jsou tolerantní vůči stresům v kontaminovaném prostředí. Indigenní mikroorganismy jsou pro růst v takovém prostředí adaptovány rostoucí v těchto prostředích, ale tyto adaptace mají své omezení (např. vysoká koncentrace toxického polutantu, vysoké pH a pod.).

3.1.3 Cytochrom P450 a jeho využití pro bioremediace organických polutantů.

Cytochrom P450 je přítomen u mikroorganismů, rostlin a zvířat a zajišťuje celou řadu chemických reakcí včetně degradace organických sloučenin, jako je štěpení eterové vazby a vazby uhlíku s chlorem. Mikrobiální P450 se dají částečně aplikovat pro biodegradace xenobiotik, protože jsou všude přítomné a mají silný reduktivní a oxidativní potenciál. Cytochrom P450 z *P.putida* je schopen dehalogenovat substráty methanu a ethanu jako jsou hexachlorethan a pentachloethan.

Řada prací ukazuje, že cílené změny v aktivním vazebném místě může pozměnit substrátovou specifitu, rozsah a katalytickou efektivitu tohoto enzymu.

Substrátová specifita monooxygenasy cytochromu P450 *Pseudomonas putida* substituací se změnila záměnou jedné aminokyseliny vazebného místa substrátu tak, že vedle chlorfenolu byl takto modifikovaný mikroorganismus schopný degradovat i polychlorované benzeny.

3.1.4 Degradace chlorovaných látek

Řada chlorovaných látek využívaných v průmyslu nebo vznikajících při degradaci polychlorovaných látek se současně často objevuje v přírodě jako kontaminanty. Chlorbenzoáty, dichlorbenzoáty, tetrachloethyleny a trichlorethylen, chlorbenzény, chlorované herbicidy jako jsou 2-methyl, 4-chlorfenoxyacetát a atrazine. Metabolické dráhy odbourávání těchto látek mají

stejně intermediáty a jednotlivé enzymy jsou schopné odbourávat rozdílné sloučeniny. Např. chlorované katecholy jsou klíčovým intermediátem odbourávání chlorovaných aromatických sloučenin a enzym toluen-4- monooxygenasa vykazuje aktivitu k TCE, toluenu, ethylbenzenu acetanilidu, 2-fenylethanolu a fenolu. Tyto podobnosti katabolických metabolických drah u chlorovaných látek se dají využít při konstrukci GM mikroorganismů se zvýšenými biodegradačními schopnostmi.

Pro degradaci TCE se mohou s výhodou využívat GM mikroorganismy, protože vlastní indigenní mikroflora vyžaduje přídavky speciálních substrátů jako je methan, kresol nebo toluen, které jsou však samy o sobě polutanty životního prostředí. Bakterie *E. coli* a *P. putida*, modifikované geny pro toluen monooxygenasu z *Pseudomonas mendocina* KR1, jsou schopné degradovat TCE bez přídavku substrátů uvedených výše. Winter a kol (1989) konstruovali geneticky modifikovaný kmen *E.coli*, který degraduje TCE v přítomnosti glukosy. Naklonovaná toluen monooxygenasa je exprimována pouze při teplotě 42°C a výše, což umožňuje odstraňování TCE v bioreaktorech a náhodné neplánované uvolnění do prostředí je pod kontrolou promotoru sensitivního na teplotu. *E.coli* a *P. putida* byly rovněž modifikovány pro degradaci TCE insercí řady fenolových katabolických genů (*pheA*, *pheB*, *pheC*, *PheD* a *pheR*) na plasmidu pS10-45, izolovaných z *P. putida* BH. Tyto mikroorganismy jsou schopné degradovat TCE v přítomnosti fenolu, ale nejsou schopné degradovat samotný fenol. Ovšem indikovat degradaci TCE přidáním fenolu do kontaminované půdy či vody, není v žádném případě přípustné, sám fenol je toxický a inhibuje přítomné organismy. Krumme a kol., (1993) používal GM kmen *P. cepacia* G4 5223 PR1, který byl schopen produkovat enzym toluen monooxygenasu konstitutivně a srovnával jeho aktivitu s původním nemodifikovaným kmenem *P. cepacia*, který vyžadoval k degradaci TCE přítomnost fenolu. Geneticky modifikovaný kmen prokázal stejnou schopnost přežít v životním prostředí jako kmen původní. Byly testovány i možnosti využití GM cyanobakterií pro biodegradační účely. Geneticky modifikovány byly dva jejich kmény těchto bakterií, *Anabaena* sp. *Nostoc ellipsorum*. První z nich insercí genu *linA* z *P. paucimobilis* a druhý vnesením genů *fcABC* z *Arthrobacter globiformis*. Gen *linA* kontroluje první krok degradace lindanu (γ - hexachloryklohexan) a *fcABC* umožňuje degradaci halobenzoátů (4-chloubenzoát).

I když řada laboratorních a poloprovozních pokusů ukazuje, že genetické mikroorganismy jsou schopné urychlit odbourávání nežádoucích látek v životním prostředí, přesto dosud nebylo v širokém měřítku povoleno uvolnění těchto geneticky modifikovaných bakterií do prostředí. To úzce souvisí s obavou nad jejich nekontrolovatelným šířením v životním prostředí. Byla snaha obejít tuto skutečnost, tj. množení GM mikroorganismů v životním prostředí, tím, že půda půdu kontaminovanou s-triazinový herbicidem atrazinem byla remediována usmrcenými buňkami GM *E.coli*, které byly modifikovány na nadprodukcii atzA genu z *Pseudomonas* ADP. Tento gen koduje produkci enzymu atrazin chlorohydrolasy, která dechloruje atrazin na hydroxyatrazin, který není toxický pro rostliny.

Kompletní degradace polychlorovaných látek jako ke pentachlorfenol a PCB vyžaduje po sobě následující anaerobní a aerobní reakce. V první fázi dochází za anaerobních podmínek reduktivní dehalogenaci, při které se z více chlorovaných aromatických jader odstraňuje chlor a výsledná sloučenina je pak substrátem pro pro bakteriální oxidasy za aerobních podmínek.. Tyto rozdílné metabolické dráhy vyžadují přítomnost různých mikroorganismů rostoucích za různých podmínek. Wackett a kol., (1994) použil cytochrom P450 a toluen dioxygenasu pro zajištění obou vyžadovaných reakcí (anaerobní a aerobní) pro degradaci pentachlorethanu. V přítomnosti kamforu GM *P. putida* G768 přeměnila pentachlorfenol na TCE. Stejný systém byl aplikovaný na biodegradaci polybromovaných sloučenin a sloučenin obsahujících chlor a fluor.

3.1.5 Degradace polychlorovaných bifenyly

Aplikace geneticky modifikovaných mikroorganismů na degradaci PCB byly prováděny pouze pro aerobní část degradační dráhy tj. pro níže chlorované kongenery PCB. Dehalogenace výše chlorovaných bifenyly, které vyžadují anaerobní podmínky jsou hůře přístupné genetickým manipulacím. Aerobní degradace PCB je obdobná jako degradace bifenyly a je realizován dvěma metabolickými drahami „horní“ a „dolní“. Horní dráha přeměňuje příslušný kongener PCB na odpovídající chlorbenzoát a v dolní dráze tento chlorbenzoát podléhá kompetní mineralizaci. Avšak řada mikroorganismů degradujících PCB mají pouze horní metabolickou dráhu a končí chlorbenzoáty. V tomto případě je pro kompletní degradaci PCB vyžadována přítomnost dvou kmenů, kdy druhý má v genomu zakodovanou dráhu dolní.

Geny kodující enzymy horní metabolické dráhy jsou umístěny v *bphA* operonu: *bphA1*, *bphA2*, *bphA3*, *bphA4*, *bphB*, *bphC*, *bphD*. Geny : *bphA1*, *bphA2*, *bphA3*, *bphA4* kodují multikomponentní dioxygenázový enzymový systém, který katalyzuje první krok degradace – z bifenyly na bifeny-dihydrodiol. Ten je degradován *bphB* produktem na 2,3- dihydroxybifenyly. Další dioxygenasa kodovaná *bphC* otevírá kruh *meta* štěpením na látku, která je přeměněna na benzovou kyselinu a pentadienovou kyselinu pomocí produktu *bphD* genu.

Zvýšená exprese genů *bph* dráhy v *Pseudomonas* sp. LB400 vedlo k získání GM mikroorganismu, který byl schopen degradovat vyšší množství níže chlorovaných kongenerů PCB ve srovnání s původním, nemodifikovaným kmenem. Tento kmen byl též schopen degradovat 2,4,2',4',5'- chlorované deriváty. Genetická modifikace bakterie *Pseudomonas putida* F1, schopného degradovat toluen vnesením klastru genů *bph*, se projevila tím, že výsledná GM bakterie byla schopna růstu na bifenyly. Dowling a kol., (1993) publikoval sestavení přenosného genetického elementu (transposomu) TnPCB navrženého tak, aby byl schopen přenést *bph* operon (původ *Pseudomonas* sp. LB440) do chromosomu řady Gram-negativních bakterií, zahrnující i rhizosféry pseudomonády. Vnesení TnPCB do recipientního mikroorganismu bylo provedeno plasmidem pDDPCB. Takto vnesený fragment je stabilní, zůstává stále v chromozomu bez detekovatelného přenosu do dalších mikroorganismů. Insercí TnPCB do rhizosféry pseudomonády *P. fluorescens* F113pcb byl získán GM kmen, který byl schopen využívat bifenyly jako zdroj energie a uhlíku. *Bph* operon se přepisoval konstitutivně a

jeho přítomnost v genomu bakterie neovlivnila její rhizosférní vlastnosti (např. schopnost kolonizovat kořeny rostlin). Genetická modifikace byla stabilní v průběhu měření 25 dnů.

Vnesení *bph* klastru genů do *P. putida* KT2442 a *Pseudomonas* sp. B13FR1 rozšířila biodegradativní schopnosti obou kmenů tak, že byly schopné degradovat bifenyl i 4-chlorbifenyl.

Během biodegradace PCB některými bakteriemi se akumulují chlorbenzové kyseliny a metabolity chlorbenzoátů (chlorkatechol a chlormukonát semialdehyd), které inhibují enzym 2,3-dihydroxybifenyl-1,2-dioxygenasu. Tato inhibice má negativní vliv na degradaci PCB. Několik pracovišť publikovalo výsledky získané s GM bakteriemi, které byly navrženy tak, aby odbourávaly Cl,Cl'-PCB bez tvorby inhibujících metabolitů. Ačkoliv nebyla provedena aplikace tohoto GM mikroorganismu v životním prostředí, tento případ zcela jasně ukazuje význam komplexního studia metabolických drah, kdy, při návrhu degradační strategie, vnesenou modifikací je možné se vyhnout tvorbě inhibičních intermediátů.

Hrywna a kol. (1999) geneticky modifikoval PCB metabolizující kmen *Comamonas testosteroni* VP44, který byl po té schopen růstu, dechlorace a kompletní mineralizace *ortho*- a *para*- substituovaných monochlorbifenylů. Kmen byl modifikován vnesením genů z *Pseudomonas aeruginosa* 142, kodující *ortho*-dechlorinaci, a genů z *Athrobacter globiformis* KZT1, které kodují *para* dechlorinaci.

Zlepšení biodegradace PCB v půdě je také možné dosáhnout přidáním surfaktantů, které na jedné straně činí hydrofóbní PCB lépe dostupným pro bakterie, a za druhé mohou sloužit i jako zdroj uhlíku a energie pro bakterii odbourávající polutant. Vzhledem ke své nižší toxicitě vůči mikroorganismům jsou neionogenní surfaktanty jsou pro tyto účely vhodnější než anionické nebo kationické. Lajoie a kol.(1997) geneticky modifikoval bakterie *P. putida* a *Ralstonia eutropha* transposonem TnPCB nesoucím bifenyl/PCB degradativní *bph* operon. Oba mikroorganismy byly schopné využít surfaktan jako zdroj uhlíku a energie a degradovat některé jednotlivé níže chlorované kongenery PCB. Při srovnání růstu GM mikroorganismů v nesterilní kontaminované půdě se prokázalo, že kompetice s původní, indigenní mikroflorou byla minimální.

3.1.6 Degradace uhlovodíků

Životní prostředí je kontaminováno vedle xenobiotickými uhlovodíky, které se odstraňují s prostředím obtížně, řadou dalších typů uhlovodíků od nízkomolekulárních, které jsou velmi snadno odbouratelné přirozenými mikroorganismy po vyšší větvené uhlovodíky a aromatické látky, které již patří mezi rekalitranty. Bioremediace uhlovodíků se soustřeďuje na dvě skupiny rekalitrantních sloučenin: polyaromatické uhlovodíky (PAU) a benzen, toluen, ethylbenzen a m-xylen (BTEX).

Jediná aplikace GM bioremediační technologie v polním měřítku byla provedena s polyaromatickým uhlovodíkem naftalenem. Mikroorganismus použitý Saylerem a kol. (2000) byl kmen *Pseudomonas fluorescens* HK44, který byl geneticky modifikován naftalenovým katabolickým plasmidem pUTK21, do kterého byl transposonem vnesen *lux* gen. Původní

kmen byl izolován z půdy kontaminované PAU. GM kmen byl konstruován tak, aby degradační geny naftalenu a lux geny byly pod stejným promotorem indukovaným přítomností naftalenu. Přítomnost naftalenu nebo intermediátu jeho metabolické dráhy salicylátu nebo 4-methyl salicylátu způsobila zvýšenou expresi genů pro odbourání naftalenu a u bakterie se projevila bioluminiscence, která byla monitorována on-line měřením fotonů za použití optických vláken. Míra bioluminiscence ukazuje na rychlost a úroveň biodegradace aniž by se musely používat chemické analýzy. Modifikované bakterie byly uvolněny do povrchových vrstev 4 m hluboko v lysimetru navrženém Rippem a kol. (2000). A instalovaném na poli. Použití lysimetru umožnilo kontrolu možného proniknutí bakterií do životního prostředí. Půda byla kontaminována naftalenem, fenanthrenem a antracem, které jsou nejvíce zastoupenými PAU v přírodě. Nesterilní půda umožnila kontakt GM mikroorganismů s ostatní indigenní mikrooflorou. Ještě po 444 dnech GM bakterie stále vykazovaly aktivitu vůči PAU, i když pouze v přítomnosti anorganických živin. Dostupnost PAU kyslíku byly vyhodnoceny jako významné faktory ovlivňující *in situ* metabolickou aktivitu, růst a aerobní degradační aktivitu použitých GM mikroorganismů.

Aplikace GMM při biodegradaci uhlovodíků, jako jsou PAU se soustředilo na genetické modifikace mikroorganismů, kterým vyhovuje sledované životní prostředí.

Některé jiné uhlovodíky mohou být odbourány mikroorganismy a je i poměrně dobře známo genetické pozadí těchto biodegradací.

Toluene může být nemodifikovanými bakteriemi odbouráván 5 různými degradačními drahami. Genetické modifikace umožňují přenos katabolické dráhy do mikroorganismu, který by lépe přežíval v kontaminovaném životním prostředí.

Ačkoliv biodegradace BTEX byla velmi dobře charakterizována a je zajišťována *tot* a *tol* metabolickými drahami, mnoho prací se zaměřuje pouze na odbourávání jedné látky z komplexu BTEX. BTEX se obvykle vyskytují v přítomnosti benzínu.

Lee a kol. (1995) ukázali, že v prostředí nedochází ke kompletní mineralizaci benzenu, toluenu a *p*-xylynu (BTX), dokonce ani v přítomnosti konsorcií mikroorganismů. Biochemické studie ukázaly, že nekompletní degradace těchto tří látek je způsobena vznikem intermediátu metabolismu *p*-xylynu, 3,6- dimethylcatecholu, který působí jako „dead end“ metabolit v *tot* metabolické dráze a tudíž enzym xylenoxygenasa v *tol* metabolické dráze nemůže degradovat benzen. BTX látky jsou degradovány toluenoxxygenasou na odpovídající dyhydrodioly. Přítomnost *cis-p*-toluatdihydrodioldehydrogenasy umožní kompletní mineralizaci BTX. Bakterie *Pseudomonas putida*, geneticky modifikovaná vnesením genů *totC1C2BA*, kodujících toluendioxygenasu, umožňuje kompletní mineralizaci BTX bez akumulace intermediátů metabolismu.

GM mikroorganismy byly testovány na osdtranění např fenolů z odpadních vod. V tomto případě se lépe uplatní mikroorganismy se schopností flokulace, které jsou v této formě delší dobu ve styku s cílovým polutantem. Soda a kol. (1999) připravili geneticky modifikovaný flokulující kmen *Sphingomonas paucimobilis* s rekombinantním plasmidem pS10-45 nesoucím

geny katabolické fenolové dráhy z *P. putida* BH, který přežil v odpadní vodě déle než neflokulující kmen *E.coli* se stejnou genetickou modifikací.

Pro odstraňování nitrosoaromatických sloučenin jako je 2,4,6-trinitrotoluen nebyly zatím zkonstruovány účinné GM kmeny. V této oblasti se intenzivně pracuje.

3.2 GMM-transformace anorganických polutantů

Anorganické polutanty jako je např. rtuť nelze přeměnit na kysličních uhlíčitý a vodu, a tím je odstranit z kontaminovaného prostředí.

Strategie na odstranění anorganických polutantů z přírodního prostředí jsou následující:

- transformace polutantů na netoxické formy (biotransformace)
- vysrážení kovových iontů na povrchu buněk (bioprecipitace)
- izolace kovových iontů a bioakumulace polutantu v mikrobiální buňce (biosorpce).

Volba strategie závisí na charakteru polutanta, na hladině jeho koncentrace a na lokalizaci kontaminace. Biotransformace bývá často součástí strategie mikroorganismů přežít v životním prostředí nepříznivé podmínky- přítomnost těžkých kovů. Biosorpce a bioprecipitace jsou většinou aplikovány v *ex situ* procesech, kdy proces s mikroorganismy probíhá v bioreaktorech.

3.2.1 Metallothioneiny

Metallothioneiny jsou bílkoviny bohaté na cystein, které jsou schopné izolovat a následně akumulovat těžké kovy. Tyto proteiny jsou přítomny v plísních, bezobratlých, hmyzu, savcích a rostlinách. V rostlinách je tvorba metallothioneinů indukována různými stresovými faktory, jako jsou těžké kovy, tepelný šok, rostlinné hormony, poranění, senescence a virová infekce.

Expres těchto bílkovin v bakteriích je používána pro zvýšení zádržnosti kovů mikroorganismy a aplikuje se při odstraňování těžkých kovů z odpadních a spodních vod. Pro tyto aplikace se mikroorganismy imobilizují do formy permeabilních matic.

Použití metallothioneinů v bioremediacích využívá stejnou základní strategii jak bylo popsáno výše. Výzkumy na tomto poli se však v poslední době zaměřují hlavně na:

- syntézu nových metallothioneinů, které nejsou produkovány přirozenou cestou a jsou schopné akumulovat různé těžké kovy
- na alteraci systému exprese metallothioneinů v bakteriích a tím i alterace místa exprese v buňce
- využití metallothioneinů s násobným vazebným místem pro kovy, což zvyšuje kapacitu mikroorganismu pro odstraňování kovů z roztoku.

Kotrba a kol. (1999) geneticky modifikovali *E.coli* tak, že exprimovala krátké peptidy vázající kovy, které fuzovaly s LamB proteinem. Dvě sekvence měly různou afinitu ke kadmiu, mědi a zinku. Z výsledků vyplývá, že krátké peptidy by mohly být využity pro odstraňování různých kovů. Mejare a kol. (1998) popsali, že genetická modifikace *E.coli*, projevující se expresí

fúze His-Ser-Gln-Lys-Val-Phe peptidu a proteinu vnější membrány OmpA, vyústila v resistenci k 1,2 mM chloridu kadmia. Tento GM mikroorganismus se dá využít pro odstranění kadmia z kontaminované vody.

Další strategie pro odstraňování těžkých kovů z odpadních vod využívají mikrobiální procesy nepřímo, k biosorpci nebo bioprecipitaci. Sulfát redukující bakterie jsou schopné vysrážet rozpustné kovy z roztoku jako nerozpustné sirníky kovů.

V případě sulfát-redukujících bakterií je sirník kovu vedlejším produktem při přeměně anorganického thiosíranu na na sirník.

Při přípravě geneticky modifikovaného kmene *E. coli* s nadprodukcí sirovodíku z thiosíranu, byl gen *phsABC*, kodující thiosíranreduktázu, původně izolovaný z bakterie *Salmonella typhimurium*, přenesen inzercí plasmidu pSB74. Tento kmen rostl v přítomnosti chloridů zinku, olova a kadmia (jednotlivě i dohromady) za vzniku precipitátů kovů ve formě sirníků. Kovy byly z roztoku odstraněny z 98-99 %.

Pro jednotlivé těžké kovy byly popsány geneticky modifikované mikroorganismy schopné odstraňovat tyto kovy z životního prostředí. Nejvíce pozornosti bylo věnováno nejtoxičtějšímu kovu rtuti. V průběhu posledních deseti let zkonstruovány různé geneticky modifikované mikroorganismy převážně využívající exprese různých částí systému resistance primárně redukující Hg(II) na více inertní, těkající elementární formu rtuti (Hg⁰).

3.3 GM houby – biodegradace

I když bakterie jsou snáze kultivovatelné a dostupnější ke genetickým modifikacím, houby mají řadu výhod, které je činí atraktivní pro využití pro bioremediacích. Např. Jsou tolerantnější k nízkému pH, jsou schopné degradovat a využít širokou škálu různých přírodních substrátů jako jsou celulóza, hemicelulóza, lignin a pektin. Schopnost degradaovat tyto látky souvisí s produkcí extracelulárních enzymů relativně nízkou substrátovou specifitou, jsou houby schopné degradovat i řadu xenobiotik jako jsou fenoly, PCB, DDT, dioxiny, PAU, alkyl halidy a nitrotolueny. Houby jsou také vhodné pro bioremediaci těžkých kovů. Vykazují poměrně velkou resistenci vůči těžkým kovům, mají schopnost kovy biakumulovat aktivním i pasivním procesem. Produkci takových látek jako jsou oxaláty a citráty zvyšují rozpustnost kovů a jejich větší mobilitu v prostředí.

Dosud však nebyly žádné GM houby přímo využity pro bioremediace. Limitované možnosti jejich genetické modifikace spočívají v mimo jiné v jejich myceliární formě struktury, nehomogennímu růstu v tekutých kulturách, řada hub jsou patří mezi rostlinné patogeny, požadují primární zdroj uhlíku a energie, aby mohly kometabolizovat aromatické látky, genetické vybavení pro biodegradaci polutantů jsou více komponentní, komplexní.

Využití geneticky modifikovaných hub pro bioremediace je v současné době otázkou budoucnosti. Některé nemodifikované druhy jako jsou houby bílé hniloby *Phanerochaete chrysosporium*, *Irpex lacteus* a *Coriolus versicolor* se ukazují velmi perspektivní při odstraňování takových polutantů jako jsou diazinová barviva, PAU a pod. Stejně tak i

mykrohrzní houby mají v této oblasti svou budoucnost ve spojení s rostlinami při fytoremediacích.

4. Transgenní rostliny v ekologických procesech

Obecně jsou rostliny jako takové pro člověka neodmyslitelnou a nenahraditelnou složkou přírody. Jsou zdrojem potravy, energie, ale i stavební surovinou, produkují celou řadu látek, bez nichž si lidstvo dokáže život už jen velice těžko představit. Nejsou to však jen primární metabolity rostlinného organismu, nýbrž i metabolity sekundární, o jejichž značné části se doposud podrobně neví, za jakým účelem jsou v rostlinných buňkách syntetizovány. Mnohé z těchto metabolitů jsou pro člověka velice užitečné a neustále se nachází praktické uplatnění pro další a další z těchto látek v nejrůznějších oblastech lidské činnosti, medicínou počínaje a průmyslem konče.

Celá řada transgenů používaných v zemědělské produkci již nyní znamená významný přínos ke snižování zátěže životního prostředí a ochrany necílových organismů. Začleněním transgenů pro odolnost k virovým, houbovým a jiným patogenům jakož i hmyzím škůdcům do rostlinného genomu je výrazně omezena potřeba aplikace pesticidů. Posuzováno objektivně, patří sem i transgeny kódující toleranci plodin k herbicidům. Jedná se totiž o herbicidy nové generace, které minimálním způsobem zatěžují přírodu. Příslušné aktivní substance mají krátkou životnost a produkty jejich rozpadu jsou přírodní látky. Tím, že příslušná plodina lépe snáší ošetření herbicidem, je možné používat jejich vyšších koncentrací a snižovat celkový počet ošetření, což opět absolutně snižuje množství používané aktivní látky.

Je známo, že některé druhy rostlin dokáží ve značné míře akumulovat z půdy a vody ionty těžkých kovů, radioaktivní izotopy a některé polutanty. Pro praktické účely je jejich účinek často příliš pomalý, hyperakumulující rostliny mají většinou nízký přírůstek biomasy. V případě transgenních rostlin by byla jejich sorbční a akumulační schopnost dále zvýšena a rozšířena i na jiné typy látek. Jinou alternativou je přeměna toxických forem látek na méně toxické. Takové rostliny by byly použitelné při bioremediacích (fyto-remediacích) kontaminovaných těžebních, zpracovatelských a průmyslových ploch, skládek, letišť a vojenských prostorů. Pro odstraňování toxických těžkých kovů se například nabízí možnost využít transgenů pro metalothioneiny, které mají schopnost je pevně vázat. V úvodních pokusech byl zaveden gen *CUP1* pro metalothionein izolovaný z genomu kvasinek do rostlin tabáku. Bylo prokázáno, že transgenní rostliny vykazovaly vyšší toleranci vůči toxickým kovům a současně zvýšenou schopnost jejich akumulace. Jiným zajímavým příkladem bylo začlenění pozměněného genu *merA* pro reduktasu iontů rtuti do huseníčku. Takto byly získány rostliny tolerující zvýšené množství rtuti v půdě, které uvolňovaly rtuť do atmosféry, což ovšem není optimální řešení, pouze přenesení problému dál. Uspokojivé řešení nabízí až využití genu *merB* pro bakteriální lyázu.

Nesporně velký význam z hlediska ochrany životního prostředí by měla produkce speciálních surovin vhodných pro výrobu biodegradovatelných plastů rostlinami. V tomto ohledu se výzkum orientoval zejména polyestery poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) a poly (3-

hydroxyalkanoáty) (PHA), vytvářené některými bakteriemi rodů *Pseudomonas* a *Alcaligenes*. Upravené geny pro tři stěžejní enzymy syntézy PHB již byly přeneseny do modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. PHB se hromadil v listech a to v buněčných inkluzích v cytoplazmě a v jádrech. Jeho obsah však představoval je malý zlomek sušiny rostlin. Dalšími úpravami genů bylo dosaženo toho, že PHB byl dopravován do chloroplastů. Tím jeho podíl v rostlině vzrostl až na 14 % sušiny. S ohledem na průmyslový charakter akumulované látky jsou zvažovány vhodné rostlinné druhy, které by sloužily jako producenti. Stejně tak je třeba patřičným způsobem posoudit, ve kterých částech rostliny by se měla surovina hromadit, vzhledem k tomu, že tyto části nebudou vhodné k požívání ani jako krmivo a to i pro příležitostné konzumenty.

Jinou oblastí je příprava transgenních rostlin určených pro tzv. fytořemediaci. Zejména při akumulaci těžkých kovů, ale i odstraňování organických sloučenin je hlavním limitujícím faktorem použití rostlin dlouhá doba potřebná k dekontaminaci. Z tohoto důvodu je v současnosti uplatňována snaha, šlechtěním či genovými manipulacemi získat rostliny upravené na míru požadavkům fytořemediace. V nedávné době se již objevily v odborné literatuře výsledky zvýšení exprese existujících genů, nebo vnesení bakteriálních či savčích genů do rostlin s cílem zvýšit např. účinnost dekontaminace rtuti, výbušnin na bázi dusíkatých sloučenin, polychlorovaných bifenyly apod.

4.1 Transgenní rostliny využívané pro fytořemediaci

Rostliny hrají důležitou roli v udržování čistého životního prostředí. Mohou pomáhat při odstraňování organických i anorganických xenobiotik z půd, vody a vzduchu. Fytořemediace je definována jako užití zelených rostlin k zachycení, akumulaci nebo odstraňování kontaminantů životního prostředí. Kontaminanty lze z životního prostředí odstranit i fyzikálně-chemickými procesy, které jsou ale většinou drahé. Ačkoliv je fytořemediace pomalejší proces, na velkých plochách je lépe využitelná.

Podle různých způsobů uplatnění se fytořemediace obecně dělí do několika oblastí uvedených v Tab I (Pletsch a kol. 1999):

Tab. I

Fytořemediace	
Typ	Osud kontaminantů
Fytoextrakce	Absorpce kontaminantů z půd do kořenů (či jiných rostlinných pletiv) v nepozměněné formě. Rostliny jsou poté sklizeny a připraveny pro další užití, např. pro znovuzískání kovů.
Fytotransformace	Absorpce a biokonverze (katabolismus nebo anabolismus) v kořenech (či jiných rostlinných pletivech).
Fytovolatilizace	Příjem a konverze kontaminantů do plynné fáze.
Fytostimulace	Stimulace mikrobiální degradace působením rostlinných exudátů.
Rhizofiltrace	Absorpce kontaminantů z vodního prostředí.
Fytostabilizace	Lignifikace a humifikace v půdě.

Protože jsou rostliny živé organismy a vyžadují v půdě dané koncentrace živin, přítomnost kontaminantů zpomaluje fytořediční proces. Vybrat vhodnou rostlinu pro tyto účely není proto snadný úkol. Např. rostliny hyperakumulující, tolerantní k těžkým kovům, se nachází v oblastech bohatých na přítomnost kovů, avšak tyto přirozené rostliny jsou malé a produkují málo biomasy. Nejsou tudíž vhodné pro další využití, a proto je třeba do výběru ideální rostliny pro fytoředičaci zahrnout více hledisek. V posledních několika letech se objevují snahy zvýšit účinnost akumulace těžkých kovů u rostlin vytvářejících značné množství biomasy. Protože polutanty jsou většinou v životním prostředí přítomny ve směsi, byly by zvláště zajímavé rostliny schopné fytoředičaci více než jednoho polutantu.

4.1.1 Fytoředičaci organických polutantů a úloha cytochromu P450

Cílem fytoředičaci organických polutantů je jejich mineralizace na relativně netoxické látky, kterými jsou oxid uhličitý, nitrát, chlor a amoniak. K nejvýznamnějším organickým polutantům, k jejichž odstraňování z životního prostředí lze využít fytoředičaci, patří polychlorované bifenyly, polycyklické aromatické uhlovodíky (např. benzopyreny), nitroaromáty (např. trinitrotoluen) a lineární halogenované uhlovodíky (např. trichloroethylen).

Některé vodní rostliny jsou také schopny rozkládat nitroaromatické sloučeniny, jako jsou trinitrotoluen, glycerol-trinitrát či nitroglycerin. Tyto sloučeniny jsou obsaženy v municích a oblasti kolem místa produkce i skladování jsou jimi velmi kontaminované. Trichlorethylen (TCE) je zřejmě nejvíce rozšířený polutant v podzemních vodách a půdě. Rostliny rostoucí v kontaminovaných oblastech jsou schopny degradovat TCE, zvláště křížené topoly je degradují na trichlorethanol, chloracetáty a oxid uhličitý. Ke zvýšení schopnosti metabolizovat TCE a jiné sloučeniny byl do tabáku zaveden gen pro cytochrom P450 cyp 2E1 současně s genem pro oxidoreduktasu a cytochrom B5 (pro zajištění aktivity a stability cytochromu P450 cyp 2E1). Trichlorethylen, tetrachlormethan, dibromethylen a některé další chlorované sloučeniny slouží jako substráty pro cytochrom P450 cyp 2E1, který je oxiduje. Celkový metabolismus meziproductů vede ke vzniku trichloroctové kyseliny, popř. oxidu uhličitého, chloridového iontu a vody. Cytochrom P450 se podílí při oxidačních reakcích širokého spektra sloučenin, mezi které patří i některá xenobiotika. Cytochrom P450 se vyskytuje i v rostlinách a zvířatech, ale mikrobiální P450 je zvláště užitečný pro biodegradaci pro jeho vysoký redukční a oxidační potenciál. Mezi další rozšířené polutanty životního prostředí patří polychlorované bifenyly (PCB). Vzhledem k tomu, že rostliny absorbují PCB, jsou tak polychlorované bifenyly zahrnovány do potravního řetězce, kde jsou u jeho konce akumulovány v tukové tkáni. Metabolické dráhy PCB rostlin ještě nejsou dostatečně charakterizovány, ačkoliv schopnost rostlin degradovat PCB byla prokázána a je nadále studována. Jistý potenciál je spatřován ve velmi známých bakteriálních drahách pro degradaci PCB a využití bakteriálních genů k inženýrským postupům vedoucím k tvorbě transgenních rostlin.

4.1.2 Fytoremediace těžkých kovů

Kontaminace těžkými kovy již dosáhla toxické hladiny ve vzduchu, půdě a vodě, a tím se objevil další problém při odstraňování kontaminantů z životního prostředí. Mezi největší polutanty patří olovo, rtuť, kadmium, měď a arsen. Řešení daného problému skýtá možnost fytoremediace. Transgenní rostliny by tak mohly akumulovat těžké kovy a/nebo by byly tolerantní k těžkým kovům.

4.1.2.1 Zvýšení akumulace těžkých kovů pomocí metallothioneinů

Metallothioneiny jsou proteiny bohaté na cystein, které jsou schopné vázat těžké kovy. Tyto proteiny jsou přítomny v plísňích, bezobratlých, hmyzu, savcích a rostlinách. V rostlinách je tvorba metallothioneinů indukována různými stresovými faktory, jako jsou těžké kovy, tepelný šok, rostlinné hormony, poranění, senescence a virová infekce. Již byly popsány pokusy o vnášení genů savčích, kvasničných, hmyzích i humánních metallothioneinů do rostlin, které by pak byly schopné vázat kovy. U některých rostlin tato snaha vedla ke zvýšení akumulace těžkých kovů, u jiných pouze ke zvýšení rezistence vůči některým těžkým kovům. Např. akumulace kadmia byla prokázána v *Nicotiana tabacum* obsahující gen pro kvasničný metallothionein CUP s histidinovou kotvou. Přítomnost histidinové kotvy zde byla zodpovědná za několikanásobně zvýšenou akumulaci Cd.

Další možnosti zvýšení akumulace a/nebo zvýšení rostlinné tolerance k těžkým kovům.

Kadmium, které je pro rostliny vysoce toxické, může být absorbováno rostlinnými kořeny a transportováno do vegetativních a reprodukčních orgánů, kde může negativně působit na DNA syntézu, mitosu a buněčné dělení a jiné. K účelu zvýšení akumulace kadmia, popřípadě zvýšené tolerance rostliny ke kadmium, byly provedeny studie s rostlinou *Brassica juncea* obsahující gen pro γ -glutamylcysteinsynthetasu. Výsledky ukázaly, že transgenní semínka vykazují zvýšenou toleranci ke kadmium. Tyto rostliny mají také zvýšenou akumulaci Cd o 40% - 90% více než netransgenní druh. V současné době byly popsány transgenní rostliny se schopností přeměny toxických rtuťnatých iontů na méně toxickou elementární rtuť. Dosahuje se toho transformací genu *merA*, který je součástí *mer* operonu gramnegativních bakterií žijících v půdě kontaminované rtuť. Tento operon zajišťuje bakteriím rezistenci ke rtuť. Gen *merA* slouží pro expresi rozpustné NADPH-dependentní, disulfidové oxidoreduktasy obsahující FAD, katalysující reakci Hg^{2+} na méně toxickou elementární Hg. Pro použití v rostlinách byla sekvence genu *merA* upravena mutagenezí na gen *merApe9*. Zájem se soustřeďoval také na organickou sloučeninu methylrtuť, která je vylučovaná bakteriemi v půdě kontaminované rtuť. Methylrtuť je velmi toxická a způsobuje časté neurologické degenerace u zvířat. Byl popsán případ transgenose modifikovaného bakteriálního genu *merBpe*, kódujícího lyasu MerB. MerB katalysuje protonolysu vazby uhlík-rtuť, odstraňuje tak organický ligand a uvolňuje se Hg^{2+} . Transgenní rostliny s expresí *merBpe* pak mohou sloužit pro degradaci methylrtuti v kontaminovaných oblastech. Z hlediska využití MerA a MerB proteinů byl připraven *Arabidopsis thaliana* obsahující geny pro expresi obou proteinů. Transgenní *A. thaliana* tak

nejprve převede pomocí lyasy MerB organickou sloučeninu rtuti na rtuťnaté ionty, které se následně redukují na elementární rtuť pomocí reductasy MerA



Hliník, který je v rozpustné formě v kyselých půdách, je pro rostliny také velmi toxický. V případě nadprodukce citrátu byla prokázána tolerance vyšších rostlin k hliníku a zvýšená schopnost získávání nerozpustného fosforu ze zásaditých půd. Ačkoliv se objevily i studie, které se tento fakt snažily vyvrátit, původní myšlenka tolerance rostlin k hliníku díky nadprodukci citrátu byla potvrzena. Byly připraveny i transgenní rostliny nesoucí gen pro protein transportující těžký kov přes membránu. Např. protein transportující zinek, kódovaný genem *ZAT1*, zvýšil toleranci k Zn v transgenních rostlinách *Arabidopsis thaliana*.

Tab. II ukazuje stručný přehled proteinů pro zvýšení fytořemediace.

Tab. II (Liu a kol. 2000)

Příklady transgenních rostlin s hypertolerancí a/nebo heperakumulací těžkých kovů			
Kov	Transgenní rostlina	Proteiny pro zvýšení fytořemediace	Původ genu
Al	<i>Nicotiana tabacum</i>	Citrátsynthasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (de la Fuente a kol. 1997)
Hg	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MerA	<i>Escherichia coli</i> (Rugh a kol. 1996)
Hg	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MerB	<i>Escherichia coli</i> (Bizily a kol. 1999, a)
Hg	<i>Liriodendron tulipifera</i>	Modifikovaný MerA	<i>Escherichia coli</i> (Rugh a kol. 1998)
Cd	<i>Nicotiana tabacum</i>	Metalothionein	<i>Mus musculus</i> (Pan a kol. 1994)
Cd	<i>Nicotiana tabacum</i>	Metalothionein	<i>Nicotiana glutinosa</i> (Suh a kol. 1998)
Cd	<i>Brassica juncea</i>	Glutathionsynthetasa	<i>Escherichia coli</i> (Zhu a kol. 1999)

5. Použitá literatura

Bang SW, Clark DS and Keasling JD (2000). Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (*phsABC*) from *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9): 3939-3944.

Bartels I, Knackmuss H-J and Reineke W (1984). Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 500-505.

Brim H, McFarlan SC, Fredrickson JK, Minton KW, Zhai M, Wackett LP and Daly MJ (2000). Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnology*, 18(1): 85-90.

Brazil GM, Kenefick L, Callanan M, Haro A, de Lorenzo V, Dowling DN and Ogara F (1995). Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated-biphenyls and detection of *bph* gene- Expression in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5): 1946-1952.

Bizily S. P., Rugh C. L., Summers A. O., Meagher R. B. (1999): Phytoremediation of methylmercury pollution: *merB* expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6808-6813.

Cunningham SD and Ow DW (1996). Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiology*, 110: 715-719.

Cunningham SD, Anderson TA, Schwab AP and Hsu FC (1996). Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, 56: 55-114.

Cunningham SD, Berti WR and Huang JWW (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*, 13: 393-397.

De la Fuente J. M., Ramirez-Rodriguez V., Cabrera-Ponce J. L., Herrera-Estrella L. (1997): Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276, 1566-1568.

Delhaize E., Hebb D. M., Ryan P. R. (2001): Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* **125**, 2059-2067

de Lorenzo V (1994). Designing microbial systems for gene-expression in the field. *Trends in Biotechnology*, 12(9): 365-371.

de Lorenzo V and Timmis KN (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5-derived and Tn10-derived minitransposons. *Bacterial Pathogenesis, Pt A*, 235: 386-405.

de Lorenzo V, Fernandez S, Herrero M, Jakubzik U and Timmis KN (1993). Engineering of alkyl-responsive and haloaromatic-responsive gene-expression with mini-transposons containing regulated promoters of biodegradative pathways of *Pseudomonas*. *Gene*, 130(1): 41-46.

DeWitt N (2000). Phytoremediation of organic mercury. *Nature Biotechnology*, 18(2): 136.

Donnelly PK, Hegde RS and Fletcher JS (1994). Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. *Chemosphere*, 28(5): 981-988.

Dowling DN, Pipke R and Dwyern DF (1993). A DNA module encoding *bph* genes for the degradation of polychlorinated-biphenyls (PCBs). *FEMS Microbiology Letters*, 113(2): 149-154.

Doyle JD, Short KA, Stotzky G, King RJ, Seidler RJ and RH O (1991). Ecologically significant effects of *Pseudomonas putida* Ppo301(Pro103), genetically engineered to degrade 2,4-dichlorophenoxyacetate, on microbial-populations and processes in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 37(9): 682-691.

Drobník J (1999). Genetically modified organisms (GMO) in bioremediation and legislation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 44: 3-6.

Eggen T and Majcherczyk A (1998). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41(2): 111-117.

Erb RW, Eichner CA, Wagner-Döbler I and Timmis KN (1997). Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad. *Nature Biotechnology*, 15(4): 378-382.

Erickson BD and Mondello FJ (1993). Enhanced biodegradation of polychlorinatedbiphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11): 3858-3862.

Evans CS, Veness RG and Ullah M (1998). Breakdown of plant polymers by fungi and their potential for use in bioremediation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71(4): 357-359.

Filipovic D, Paulsen MD, Loida PJ, Sligar SG and Ornstein RL (1992). Ethylbenzene hydroxylation by cytochrome P450-cam. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189: 488-495.

Fodor F., Cseh E., Varga A., Záray G. (1998): Lead uptake distribution, remobilization in cucumber. *J. Plant Nutr.* **21**, 1363-1373.

Fodor F., Sárvári É., Láng F., Szigeti Z., Cseh E. (1996): Effects of Pb and Cd on cucumber depending on the Fe complex in the culture solution. *J. Plant Physiol.* 148, 434-439

Focht DD (1995). Strategies for the improvement of aerobic metabolism of polychlorinated biphenyls. *Current Opinions Biotechnology*, 6: 341.

Ford CZ, Sayler GS and Burlage RS (1999). Containment of a genetically engineered microorganism during a field bioremediation application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(3): 397-400.

Fox B., Walsh C. T. (1982): Mercuric reductase. Purification and characterization of a transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide. *J. Biol. Chem.* **257**, 2498-2503.

French CE, Rosser SJ, Davies GJ, Nickin S and Bruce NC (1999). Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nature Biotechnology*, 17(5): 491-494.

Fry JD and Day Mj, *Bacterial genetics in natural environments*. 1990, London: Chapman and Hall.

Fujita M, Ike M, Hioki JI, Kataoka K and Takeo M (1995). Trichloroethylene degradation by genetically-engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(2): 100-106.

Furukawa K, Hirose J, Hayashida S and Nakamura K (1994). Efficient degradation of trichloroethylene by a hybrid aromatic ring dioxygenase. *Journal of Bacteriology*, 176(7): 2121-2123.

Francova K, Sura M, Macek T, Szekeres M, Bancos S, Demnerova K, et al. Generation of plants carrying bacterial enzyme for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fresenius Environ Bull* 2003; 12: 309–313.

Gabara B., Mojtylakuchta B., Taczynska M. (1992): The effect of calcium on DNA-synthesis in pea (*Pisus sativus* L.) roots after treatment with heavy-metals. *Folia Histochem. Cytobiol.* **30**, 68-72.

Grotenhuis T, Field J, Wasseveld R and Rulkens W (1998). Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in polluted soil by the white-rot fungus *Bjerkandera*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71(4): 359-360.

Heuer H, Dwyer DF, Timmis KN and Wagnerdobler I (1995). Efficacy in aquatic microcosms of a genetically-engineered pseudomonad applicable for bioremediation. *Microbial Ecology*, 29(2): 203-220.

Holliger C, Gaspard S, Glod G, Heijman C, Schumacher W, Schwarzenbach RP and Vazquez F (1997). Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4): 517-523.

Hong SH, Gohya M, Ono H, Murakami H, Yamashita M, Hirayama N and Murooka Y (2000). Molecular design of novel metal-binding oligomeric human metallothioneins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(1): 84-89.

Horn JM, Brunke M, Deckwer WD and Timmis KN (1994). *Pseudomonas putida* strains which constitutively overexpress mercury resistance for biodetoxification of organomercurial pollutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1): 357-362.

Hrywna Y, Tsoi TV, Malteva OV, Quensen JF and Tiedje JM (1999). Construction and characterisation of two recombinant bacteria that grow on *ortho*- and *para*substituted chlorobiphenyls. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5): 2163-2169.

Hur HG, Sadowsky MJ and Wackett LP (1994). Metabolism of chlorofluorocarbons and polybrominated compounds by *Pseudomonas putida* G786(Phg-2) via an engineered metabolic pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11): 4148-4154.

Johri AK, Dua M, Singh A, Sethunathan N and Legge RL (1999). Characterization and regulation of catabolic genes. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(4): 245-273.

Jones JP, O'Hare EJ and Wong LL (2000). The oxidation of polychlorinated benzenes by genetically engineered cytochrome P450(cam): potential applications in bioremediation. *Chemical Communications*, 3: 247-248.

Kärenlampi S., Schat H., Vangronsveld J., Verkleij J. A. C., van der Lelie D., Mergeay M., Tervahauta A. I. (2000): Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environ. Pollut.* **107**, 225-231.

Kellner DG, Maves SA and Sligar SG (1997). Engineering cytochrome P450s for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(3): 274-278.

King JMH, DiGrazia PM, Applegate B, Burlage R, Sanseverino J, Dunbar P, Larimer F and Saylor GS (1990). Bioluminescent reporter plasmid for naphthalene exposure and biodegradation. *Science*, 249: 778-781.

Kotrba P, Doleckova L, de Lorenzo V and Ruml T (1999). Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3): 1092-1098.

Kotrba P, Pospisil P, de Lorenzo V and Ruml T (1999). Enhanced metal sorption of *Escherichia coli* cells due to surface display of beta- and alpha-domains of mammalian metallothionein as a fusion to LamB protein. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 19(1-4): 703-715.

Krämer U., Chardonnens A. N. (2001): The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 661-672.

Krumme ML, Timmis KN and Dwyer DF (1993). Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4-5223 Pr1 in aquifer microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8): 2746-2749.

Laha S and Luthy RG (1991). Inhibition of phenanthrene mineralisation by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environment Science and Technology*, 25: 1920-1930.

Lajoie CA, Layton AC and Saylor GS (1994). Cometabolic oxidation of polychlorinated-biphenyls in soil with a surfactant-based field application vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8): 2826-2833.

Lajoie CA, Layton AC, Easter JP, Menn FM and Sayler CS (1997). Degradation of nonionic surfactants and polychlorinated biphenyls by recombinant field application vectors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19(4): 252-262.

Lange CC, Wackett LP, Minton KW and Daly MJ (1998). Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments. *Biotechnology*, 16: 929-933.

Lee J-Y, Jung K-H, Choi SH and Kim H-S (1995). Combination of the *tod* and the *tol* pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralisation of a benzene, toluene, and *p*-xylene mixture. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6): 2211-2217.

Liu J. R., Suh M. Ch., Choi D. (2000): Phyto remediation of cadmium contamination: Overexpression of metallothionein in transgenic tobacco plants. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **43**, 126-130.

Loida PJ and Sligar SG (1993). Engineering cytochrome P450cam to increase the stereospecificity and coupling of aliphatic hydroxylation. *Protein Engineering*, 6: 207-212.

Lopez-Bucio J., de La Vega O. M., Guevara-Garcia A., Herrera-Estrella L. (2000): Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat. Biotechnol.* **4**, 450-453.

Macek T., Macková M., Pavlíková D., Száková J., Truksa M., Singh Cundy A., Kotrba P., Yancey P., Scouten W.H. (2002): Accumulation of cadmium by transgenic tobacco. *Acta Biotechnol.* **22**, 1-2, 101-106

Macek T., Frančová K., Surá M., Macková M. (2005): Genetically modified plants with improved properties for phyto remediation purposes. V knize: *Phyto remediation of metals*. (Morel J., ed.), NATO Science Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v tisku.

Maloney SE (1998). Degradation of insecticides and herbicides by fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71(4): 360-362.

Martin A (1992). Genetics of bacterial stress response and its applications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 665: 1-15.

Matin A, Little CD, Fraley CD and Keyhan M (1995). Use of starvation promoters to limit growth and select for trichloroethylene and phenol transformation activity in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9):3323-3328.

Mars AE, Kasberg T, Kaschabek SR, vanAgteren MH, Janssen DB and Reineke W (1997). Microbial degradation of chloroaromatics: Use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *Journal of Bacteriology*, 179: 4530-4537.

Mason JR, Briganti F and Wild JR, *Protein engineering for improved biodegradation of recalcitrant pollutants*, in *Perspectives in Bioremediation*, Wild JR et al., Editor. 1997, Kluwer Academic Publishers: Netherlands. p. 107-118.

Mauro JM and Pazirandeh M (2000). Construction and expression of functional multi-domain polypeptides in *Escherichia coli*: expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene. *Letters in Applied Microbiology*, 30(2): 161-166.

McClure NC, Weightman AJ and Fry JC (1989). Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated sludge unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2627-2634.

McCullar MV, Brenner V, Adams RH and Focht DD (1994). Construction of a novel polychlorinated biphenyl-degrading bacterium - Utilization of 3,4'-dichlorobiphenyl by *Pseudomonas acidovorans* M3GY. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10): 3833-3839.

Meagher R. B. (2000): Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 153-162.

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(6): 489-494.

Mermod N, Ramos JL, Lehrbach PR and Timmis KN (1986). Vector for regulated expression of cloned genes in a wide-range of Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 167(2): 447-454.

Mondello FJ (1989). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *Journal of Bacteriology*, 171(3): 1725-1732.

Nakatsu CH and Wyndham RC (1993). Cloning and expression of the transposable chlorobenzoate-3,4-dioxygenase genes of *Alcaligenes* sp. strain BR60. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11): 3625-3633.

Newman LA, Strand SE, Choe N, Duffy J and Ekuan G (1997). Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. *Environmental Science and Technology*, 31: 1062-1067.

Ondřej M., Drobník J.: V knize: *Transgenoze rostlin*. (Ondřej M., Drobník J., ed.)

Pan A., Yang M., Tie F., Li L., Chen Z., Ru B.(1994): Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **24**, 341-351.

Pipke R, Wagner-Döbler I, Timmis KN and Dwyer DF (1992). Survival and function of a genetically engineered pseudomonad in aquatic sediment microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1259-1265.

Pletsch M., de Araujo B. S., Charlwood B. V. (1999): Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnol. Adv.* **17**, 679-687.

Ramos JL, Diaz E, Dowling D, de Lorenzo V, Molin S, Ogara F, Ramos C and Timmis KN (1994). The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Bio-Technology*, 12(13): 1349-1356.

Ripp S, Nivens DE, Ahn Y, Werner C, Jarrell J, Easter JP, Cox CD, Burlage RS and Saylor GS (2000). Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. *Environmental Science & Technology*, 34(5): 846-853.

Robinson GK and Lenn MJ (1994). The bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): Problems and perspectives. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 12: 139-188.

Rosellini D., Barone P., Bouton J., LaFayette P., Sledge M., Veronesi F., Parrott W.: Aluminum tolerance in alfalfa with the citrate synthase gene. Internet: 4. března 2003, www.Naaic.org/Meetings/National/2002meeting/2002Abstracts/Rosellini.pdf.

Rugh CL, Senecoff JF, Meagher RB and Merkle SA (1998). Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnology*, 16: 925-928.

Sayler GS (1991). Contribution of molecular-biology to bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 28(1-2): 13-27.

Sayler GS and Ripp S (2000). Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3): 286-289.

Soda S, Uesugi K, Ike M and Fujita M (1999). Application of a floc-forming genetically engineered microorganism to a sequencing batch reactor for phenolic wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(1): 85-91.

Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF and Adams WJ (1997). The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere*, 35: 667-749.

Stratford J, Wright MA, Reineke W, Mokross H, Havel J, Knowles CJ and Robinson GK (1996). Influence of chlorobenzoates on the utilisation of chlorobiphenyls and chlorobenzoate mixtures by chlorobiphenyl/chlorobenzoate-mineralising hybrid bacterial strains. *Archives of Microbiology*, 165(3): 213-218.

Stroinski A. (1999): Some physiological and biochemical aspects of plant resistance to cadmium effect. I. Antioxidative system. *Acta Physiol. Plant* **21**, 175-188.

Suh M. C., Choi D., Liu J. R. (1998): Cadmium resistance in transgenic tobacco plants expressing the *Nicotiana glutinosa* L. metallothionein-like gene. *Mol. Cells* **8**, 678-684.

Timmis KN and Pieper DH (1999). Bacteria designed for bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 17: 201-204.

Timmis KN, Steffan RJ and Unterman R (1994). Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annual Reviews Microbiology*, 48: 525-557.

Valls M, Gonzalez-Duarte R, Atrian S and de Lorenzo V (1998). Bioaccumulation of heavy metals with protein fusions of metallothionein to bacterial OMPs. *Biochimie*, 80(10): 855-861.

van der Meer JR, Devos WM, Harayama S and AJB Z (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological Reviews*, 56(4): 677-694.

Wackett LP, Sadowsky MJ, Newman LM, Hur HG and Li SY (1994). Metabolism of polyhalogenated compounds by a genetically-engineered bacterium. *Nature*, 368(6472): 627-629.

Ward TE, Bulmer D and Walton MR (1998). Development of genetically engineered bacteria for trichloroethylene degradation. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 33(2): 179-193.

Wilson M and Lindow SE (1993). Rrelease of recombinant microorganisms. *Annual Reviews Microbiology*, 47: 913-944.

Winter RB, Yen KM and Ensley BD (1989). Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*. *Bio-Technology*, 7(3): 282-285.

Yen KM, Karl MR, Blatt LM, Simon MJ, Winter RB, Fausset PR, Lu HS, Harcourt AA and Chen KK (1991). Cloning and characterization of a *Pseudomonas smendocina* KR1 gene-cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *Journal of Bacteriology*, 173(17): 5315-5327.

Zenk MH (1996). Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene*, 179: 21-30.

Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Jouanin L., Terry N. (1999): Overexpression of glutathion synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* **119**, 73-79.