

Marzena Matejczyk*

Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,
Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii, ul. Wiejska 45 E, 15-351 Białystok

Wpłynęło w lipcu 2010 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna definicja biosensora. 3. Klasyfikacja i właściwości całokomórkowych biosensorów mikrobiologicznych. 4. Mechanizmy odpowiedzi komórkowej na stres i ich zastosowanie w biosensorach bakteryjnych. 5. Charakterystyka funkcjonalności biosensora z promotorem *recA*. 6. Nowatorskie trendy w technologii biosensorowej. 7. Podsumowanie

The potential of application of microbial biosensors

Abstract: The increasing levels of environmental pollution and its hazardous mutagenic and carcinogenic effects on living organisms, including human health requires specific, sensitive, rapid and effective tests for monitoring the presence of cytotoxic and genotoxic agents in surface, subsurface water, soil, sediments, sewage, air and in food products.

Recently, microbial (or bacterial) biosensors use reporter *lux*, *luc* or *gfp* genes with genetic fusion of selected promoters have been developed to detect a variety of chemicals, genotoxic agents and factors, which are responsible for DNA damage, oxidative damage or cell growth inhibition. Nowadays, the most popular microbial biosensors are based on analysis of the intensity of reporter gene expression, typically by creating transcriptional fusion between SOS promoter region and reporter gene in genetically engineered microorganisms (GEMs), usually in *Escherichia coli* strains. Living bacterial-based biosensors can perform functional sensing and provide measurement, such as bioavailability, cytotoxicity and genotoxicity or general toxicity. Microbial biosensors are being characterized of high level of specificity, fast response time, low cost, portability, ease of use and giving a continuous *in situ* and *real time* signal, so are famous for dynamic development and represent of the advantages compared with traditional methods, for example chromatography. For living cells biosensors, bacteria are suitable due to their easy and rapid growth rate, very often on standard medias and low cost of their culturability.

Current trends in biosensors technology have been directing to creation more sensitive and flexible genetic constructs for simultaneous biomonitoring cytotoxic and genotoxic action of analyzed samples.

The presented review focuses on characterization of general definition and classification of biosensors. Nowadays trends for creation of more robust genetic constructs for bacterial biosensors are also discussed.

1. Introduction. 2. The general definition of biosensor. 3. The classification and properties of whole-cells microbial biosensors. 4. The stress response mechanisms and its application in bacterial biosensors. 5. The characterization of biosensor's activity with *recA* promoter. 6. The nowadays trends in biosensors technology. 7. Summary

Słowa kluczowe: genotoksyczność, biosensory mikrobiologiczne, SOS regulon

Key words: genotoxicity, microbial biosensors, SOS regulon

1. Wstęp

Udokumentowane licznymi doniesieniami naukowymi zanieczyszczenie środowiska związkami chemicznymi o właściwościach cytotoksycznych i genotoksycznych ze względu na zagrożenie zdrowia i życia ludzi oraz właściwe funkcjonowanie ekosystemów budzi potrzebę opracowania tanich, szybkich i efektywnych testów do monitorowania poziomu niebezpiecznych substancji w wodzie pitnej, wodach powierzchniowych, glebie, powietrzu, ściekach i żywności. Stąd, w ciągu ostatnich 15 lat obserwuje się dynamiczny wzrost zainteresowania jak również finansowania badań, szczególnie na terenie USA, Japonii i w Europie dotyczących technologii biosen-

sorowych stanowiących według dyrektyw Unii Europejskiej (Water Framework Directive – WFD, Marine Strategy Framework Directive) podstawowe, szybkie i ekonomiczne narzędzie biomonitoringu środowiskowego [13].

Dokonując przeglądu literatury można zauważyć pewną ewolucję aplikacyjną mikrobiologicznych biosensorów, począwszy od konstruktów genowych składających się z pojedynczych, specyficznie reagujących na określone grupy związków (np. metale ciężkie, benzen i jego pochodne) [25, 39], z reguły będących w transkrypcyjnej fuzji z określonym genem reporterowym *lux*, *luc*, *gfp* lub *lacZ* [2, 6, 7], aż po kreowane obecnie układy genetyczne, które pozwalają na jednoczesną detekcję efektu cytotoksycznego

* Autor korespondencyjny: M. Matejczyk, Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska, Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii, ul. Wiejska 45 E, 15-351 Białystok; tel: (+48) 85 7469562; fax: (+48) 85 7469559; e-mail: m.matejczyk@pb.edu.pl

i genotoksycznego badanej próby. Współczesne technologie biosensorowe podążają w kierunku opracowania narzędzi, które w tani, szybki, precyzyjny i wiarygodny sposób pozwolą na *in situ* środowiskowy pre-screening wody, gleby, powietrza, żywności. To ukierunkowanie biosensorów mikrobiologicznych na urządzenia służące do kompleksowej analizy cytotoksycznego i genotoksycznego oddziaływania prób względem żywej komórki pociąga za sobą możliwość badania globalnego wpływu badanych prób na fizjologię, biochemię oraz kondycję DNA w żywej komórce [1, 3, 4]. Warto wspomnieć o fakcie niebezpieczeństwa występowania i tworzenia w środowisku, jak również i w organizmach żywych, kompleksów związków chemicznych i ich metabolitów, których genotoksyczności nie znamy, a które mogą mieć wpływ na kondycję materiału genetycznego. W konsekwencji nasuwają się pytania dotyczące opracowania technik umożliwiających badanie genotoksyczności nie tylko prób laboratoryjnych stanowiących swego rodzaju wzorce reaktywności biosensora względem danych związków chemicznych, lecz przede wszystkim prób wody, wyciągów glebowych lub roztworów produktów spożywczych potencjalnie mogących zawierać mieszaninę niebezpiecznych substancji dających w konsekwencji oddziaływania na poziomie DNA efekt genotoksyczny. Kontynuując należy podkreślić, iż z zastosowaniem bakteryjnych biosensorów jesteśmy w stanie określić kompleksowy efekt genotoksyczny badanej próby względem żywej komórki, co automatycznie uwzględni fakt możliwości tworzenia nieznanymi nam kompleksów związków chemicznych na terenie komórki jako skutek wnikięcia określonego związku chemicznego, bądź wielu związków chemicznych. Obecnie jesteśmy świadkami „wybuchu” dynamicznego wzrostu zainteresowania konstrukcją coraz to bardziej złożonych pod względem technik inżynierii genetycznej biosensorów bakteryjnych a szczególnie zawierających w swojej budowie promotory komórkowych systemów naprawczych, np. SOS, którego aktywacja w wyniku uszkodzeń DNA umożliwia określenie kompleksowego genotoksycznego efektu analizowanych prób [3, 10, 15, 20].

Biorąc pod uwagę ciągle wzrastającą atrakcyjność biosensorów w różnych dziedzinach życia człowieka, począwszy od ich zastosowań do monitoringu środowiskowego [41, 42], żywności, poprzez aplikacje medyczne, a w końcu jako alternatywne narzędzie do „pre-screeningu” nowych związków chemicznych i leków, w tym leków przeciwnowotworowych zdecydowano się w przedłożonej pracy na dokonanie przeglądu głównych rodzajów biosensorów mikrobiologicznych, ich aplikacji oraz nowoczesnych trendów badawczych mających na celu opracowanie coraz bardziej efektywnych, wydajnych i tanich technik biosensorowych.

2. Ogólna definicja biosensora

Biosensor to urządzenie wykrywające, przekazujące i zapisujące informacje związane ze zmianami fizjologicznymi i biochemicznymi mikroorganizmów w układzie. Jest to rodzaj sondy, która składa się z części biologicznej – bioczuJNIKA oraz przetwarzcza konwertującego zmiany biologiczne w sygnał [5]. Biosensor to analityczne urządzenie umożliwiające szybką, dokładną, niskopoziomową detekcję wielu substancji [4]. Łączy w sobie czujnik biologiczny i przetwornik wysyłanego przez niego sygnału, który jest proporcjonalny do stężenia analitu [23]. Działanie biosensorów bazuje na specyficznych interakcjach pomiędzy enzymami i ich substratami, na wzajemnym rozpoznawaniu przeciwciał i antygenów, na dostępności specyficznych molekuł dla ich receptorów lub na wysokim powinowactwie kwasów nukleinowych do ich sekwencji komplementarnych [4]. Funkcjonalność biosensora zależy od specyficzności biochemicznej składnika biologicznego, którego dobór uzależniony jest od jego operacyjnej i środowiskowej stabilności oraz od rodzaju analitu podlegającego detekcji [10]. Komponentem biologicznym biosensora może być:

- enzym (enzyme-based biosensors),
- przeciwciało (antibody-based biosensors),
- DNA (DNA biosensors),
- receptor (receptor-based biosensors),
- cały mikroorganizm (cell-based biosensors), np. całokomórkowe biosensory bakteryjne (whole-cell bacterial biosensors),
- kolonia bakteryjna [11, 35].

Sygnał wysyłany przez czujnik biologiczny może wynikać z procesów (zmiana koncentracji protonów, uwolnienie lub pobór gazów, emisja światła, absorpcja) wywołanych przez metabolizm związków rozpoznawanych przez element biologiczny. Przetwornik przekształca biologiczną reakcję w możliwy do zmierzenia sygnał (prąd, potencjał lub absorpcja światła w sensie elektrochemicznym lub optycznym), który może być później wzmocniony, przetworzony i zapamiętany w celu dalszych analiz [23]. Kluczowym problemem budowy biosensorów jest unieruchomienie komponentu biologicznego na powierzchni przetwornika sygnału, które zapewnia stabilizację biomateriału i wymaganą bliskość czujnika i odbiornika. Osiągane jest to za pomocą adsorpcji fizycznej, usieciowienia molekuł, wiązania kowalencyjnego oraz zamknięcia wewnątrz błony, polimeru lub mikrokapsuły [34]. Takie połączenie i współdziałanie elementów umożliwia bardzo szybkie, czułe i precyzyjne wykrywanie nawet bardzo małych stężeń określonych związków mających toksyczny, mutagenny lub kancerogenny wpływ na organizmy żywe [24, 26].

Tabela I

Przykłady biosensorów mikrobiologicznych i ich granice detekcji [wg 23]

Biosensory bioluminescencyjne i fluorescencyjne		
Badany analit	Mikroorganizm	Najniższe wykrywane stężenie
Nikiel Ni ²⁺	<i>Ralstonia eutropha</i> AE2515	0,1 μM
Kobalt Co ²⁺	<i>Ralstonia eutropha</i> AE2515	9 μM
Rtęć Hg ²⁺	<i>E. coli</i> HMS174	0,2 ng/g
Rtęć biologicznie dostępna	<i>E. coli</i> HMS174	10 pM
Miedź biologicznie dostępna	<i>P. fluorescent</i> DF57 z transpozonomem <i>Tn5::luxAB</i>	0,3 ppm
Fosfor biologicznie dostępny	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	0,3 μM
Żelazo biologicznie dostępne	Zrekombinowany szczep <i>Pseudomonas syringae</i> z genem <i>gfp</i>	Około 10 ⁻⁷ M
genotoksyny	<i>E. coli</i> DPD1718 z fuzją <i>recA'::lux</i>	100 ppb mitomycyny
UV	Zrekombinowany szczep <i>E. coli</i> z fuzją <i>recA'::lux</i>	1,2 J/cm ² dawki UV

Wyróżniamy wiele rodzajów biosensorów. Są one najczęściej klasyfikowane ze względu na metody transdukcji sygnału biologicznego (np. elektrochemiczne, optyczne, piezoelektryczne, termiczne) oraz zastosowane czujniki biologiczne (np. enzymatyczne, receptorowe, komórkowe) [34]. Mogą być także dzielone na specyficzne (diagnostyczne testy do kontroli określonego zanieczyszczenia) lub szerokok zakresowe (zdolne określać ogólne zmiany chemiczne w środowisku, głównie wywołujące zaburzenia w systemach biologicznych) [11, 24].

Technologie biosensorowe są wykorzystywane do wykrywania fenoli, metali ciężkich i wielu pestycydów oraz do określania biologicznego zapotrzebowania na tlen. Mają także swoje zastosowanie w analizach nowo pojawiających się zanieczyszczeń takich jak środki powierzchniowo czynne, hormony i antybiotyki. Biosensory oferują możliwość nie tylko oznaczenia związków chemicznych, ale także biologicznych efektów ich obecności w środowisku, takich jak toksyczność i zaburzenia wydzielania wewnętrznego, co daje znacznie szerszą informację na temat badanego analitu [34, 43]. Zestawienie biosensorów mikrobiologicznych oraz ich poziomów detekcji umieszczono w tabeli I.

3. Klasyfikacja i właściwości całokomórkowych biosensorów mikrobiologicznych

Takie cechy mikroorganizmów jak:

- zdolność do detekcji szerokiego zakresu substancji chemicznych,
- możliwość modyfikacji genetycznych,
- szeroki zakres pH i temperatury, w których możliwe jest prowadzenie badań,

czynią je idealnymi biologicznymi materiałami detekcyjnymi, które mogą być zintegrowane z różnorodnymi przetwornikami (np. amperometrycznymi, potencjometrycznymi, kalorymetrycznymi, konduktometrycznymi,

kolorymetrycznymi, luminescencyjnymi lub fluorycencyjnymi) [23].

Biosensory całokomórkowe mogą być wykorzystywane do badania toksyczności wielu komponentów środowiska, włączając glebę, osady i wodę, na zasadzie sprzężenia bakterii z przetwornikami odpowiedzi komórkowej w mierzalny sygnał. Są one konstruowane w wyniku połączenia genu reporterowego (generującego sygnał), z komponentem wykrywającym daną substancję zanieczyszczającą. Ekspozycja na specyficzny analit wywołuje zmiany chemiczne lub fizyczne w komórce, włączając w to nawet uszkodzenia DNA czy błony lipidowej [22]. Biosensory mierzą te zmiany w fizjologii lub zachowaniu organizmów, będące skutkiem stresu wywołanego obecnością związków toksycznych [14, 19]. W momencie gdy biosensor jest wystawiany na działanie danego skażenia, komponent detekcyjny wymusza konkretne reakcje metaboliczne w komórce i włączenie lub wyłączenie genu reporterowego [22, 36]. Produkt ekspresji genu powinien być łatwy do zmierzenia. Geny reporterowe mogą być naturalnym składnikiem materiału genetycznego danych szczepów bakteryjnych lub być wprowadzane na drodze manipulacji genetycznych [38].

Efektywność biosensora zależy od wyboru odpowiedniego promotora oraz genu reporterowego. Generalną zasadą, jaką należy się kierować podczas wyboru promotora, jest jego czułość oraz specyficzność. Niektóre promotory bakteryjne mogą wykryć stężenie związku chemicznego rzędu ppb lub nawet jego opary. Natomiast jeśli chodzi o specyficzność, promotory najczęściej reagują na grupy związków (np. metale ciężkie), rzadziej na konkretny składnik zanieczyszczenia [32].

Gen reporterowy zwykle koduje enzym katalizujący reakcję, która może być łatwo monitorowana [36]. Biosensory całokomórkowe są najczęściej zmodyfikowanymi genetycznie bakteriami, które reagują na obecność lub absencję stresora poprzez syntezę białka reporterowego – lucyferazy, β-galaktozydazy lub

białka GFP [41]. Wywołana reakcja (np. emisja światła widzialnego) wskazuje na stopień zmian fizykochemicznych w komórce [40].

Biosensory reagują na obecność lub brak danego związku chemicznego poprzez wytwarzanie mierzalnego produktu ekspresji genu reporterowego [16]. W zależności od mechanizmu reakcji oraz regulacji promotor – gen reporterowy wyróżnia się trzy grupy biosensorów:

- niespecyficzne – odpowiedź komórkowa polega na spadku intensywności bioluminescencji emitowanej przez komórki morskich bakterii z rodzaju *Vibrio* z genem *lux* wskutek ich śmierci lub zaburzeń metabolizmu komórkowego [16, 25, 37]. Inhibicja bioluminescencji, która jest skutkiem toksycznego oddziaływania różnorodnych zanieczyszczeń na żywą komórkę, jest wprost proporcjonalna do stężenia tych zanieczyszczeń. Niewątpliwą wadą tego rodzaju biosensorów jest możliwość otrzymania fałszywego wyniku pozytywnego w testach toksyczności, gdyż każdy naturalny spadek aktywności metabolicznej w komórce bakteryjnej może wywołać inhibicję bioluminescencji. Do tej klasy biosensorów zaliczamy popularny test Microtox™ [38].
- specyficzne – bazują na ekspresji genu reporterowego wywoływanej tylko przez określone związki chemiczne. Promotor jest regulowany przez białko represorowe lub aktywatorowe, które jest czułe tylko na specyficzny analit [16]. W przypadku regulacji pozytywnej, połączenie analitu z białkiem regulatorowym powoduje odblokowanie promotora i rozpoczęcie transkrypcji genu reporterowego. W przypadku braku w badanej próbce specyficznej substancji toksycznej, następuje całkowita inhibicja promotora przez białko regulatorowe i transkrypcja genu markerowego nie zachodzi. Uwolnienie białek represorowych z obszaru promotora i rozpoczęcie transkrypcji genu następuje tylko w momencie związania represora ze specyficznym analitem [37].
- semispecyficzne – fuzja promotorów reagujących na bardzo zróżnicowane grupy stresorów (np. środki bakteriobójcze, promieniowanie UV, promieniowanie gamma, genotoksyny, stres oksydacyjny) z genem reporterowym (*gfp*, *lux*, *luc*, *lacZ*) [16]. Wykorzystano w ich konstrukcji fakt, iż bakterie reagują na związki chemiczne lub warunki środowiskowe, które powodują aktywację procesów chroniących komórkę przed tymi czynnikami wywołującymi stres. Biosensory te mogą indukować odpowiedź na szok cieplny (wywołowany przez czynniki środowiskowe powodujące uszkodzenia białek), reakcję SOS (aktywowaną w następstwie uszkodzeń DNA) oraz odpowiedź na stres oksydacyjny lub uszkodzenia błony komórkowej [38]. Pojawienie się stresora uruchamia kaskadę reakcji prowadzących do eks-

presji genu reporterowego i emisji pozytywnego, komórkowego sygnału [27, 37]. Do tego rodzaju biosensorów należą biosensory genotoksyczności z promotorami układu SOS, np. *recA*.

W ostatnich latach bakteryjne biosensory całokomórkowe okazały się być bardzo wartościowymi narzędziami służącymi do wykrywania i szacowania toksyczności zanieczyszczeń występujących w naturalnym środowisku. Mają one kilka znaczących zalet [21, 26, 34]:

- indukują specyficzną i łatwo wykrywalną odpowiedź na poddane detekcji związki chemiczne;
- pozwalają na szybkie określenie toksyczności oraz genotoksyczności zanieczyszczeń względem żywych komórek bakterii w krótkim czasie inkubacji;
- oszacowują biodostępną frakcję określonego związku, co ma znaczenie w procesie bioremediacji, ponieważ to substancje biodostępne są potencjalnie biodegradowalne;
- są bardzo czułymi urządzeniami, niekiedy nawet pojedyncze molekuly analitu powodują reakcję komórkową;
- są niezastąpionym narzędziem w badaniach nad ekspresją genów, aktywnością promotorów oraz regulacją odpowiedzi komórki bakteryjnej w warunkach stresu;
- mogą być stosowane nawet w bardzo zanieczyszczonym środowisku;
- w porównaniu z metodami konwencjonalnymi są one tańsze i mniej skomplikowane technicznie.

Główną wadą biosensorów jest fakt, iż ich działanie opiera się na systemach biologicznych – mają więc mniejszą powtarzalność niż metody chemiczne, a uzyskiwane dzięki nim wyniki pomiarów są zwykle względne i nie absolutne. Biosensory bakteryjne nie są także zawsze dobrym narzędziem do wykrywania toksyczności związków chemicznych w stosunku do ludzi. Po pierwsze, bakterie są bardziej odporne na wiele związków toksycznych ze względu na posiadanie w budowie zewnętrznej dodatkowej osłony w postaci ściany komórkowej, która chroni przed szokiem osmotycznym i uszkodzeniami błony komórkowej. Ponadto niektóre szkodliwe związki stają się toksyczne dopiero pod wpływem enzymów wątrobowych, których bakterie są pozbawione. Te rodzaje związków toksycznych mogą być więc pominięte w procesie monitoringu za pomocą biosensorów całokomórkowych [36].

Podobny problem pojawia się w przypadku zastosowania bakteryjnych biosensorów jako narzędzi do pre-screeningu aktywności potencjalnych leków antynowotworowych. Część z tego rodzaju leków to proleki, które dopiero w organizmie człowieka pod wpływem obróbki enzymatycznej, głównie z udziałem enzymów wątrobowych stają się lekiem docelowym wykazującym właściwości antykancerogenne. W takiej

sytuacji trudne jest określenie właściwego potencjału genotoksycznego pro-leku z zastosowaniem technologii biosensorów bakteryjnych.

Współczesne techniki inżynierii genetycznej ciągle poszerzają możliwości aplikacyjne całokomórkowych biosensorów mikrobiologicznych w wykrywaniu niebezpiecznych substancji skażających środowisko naturalne. Ciągłe udoskonalanie biologicznych elementów detekcyjnych i praca nad zwiększeniem powtarzalności pomiarów w przyszłości mogą uczynić z tych biosensorów znakomite źródło informacji o otaczającym nas środowisku.

4. Mechanizmy odpowiedzi komórkowej na stres i ich zastosowanie w biosensorach bakteryjnych

Mikroorganizmy wykształciły kilka behawioralnych odpowiedzi na stres wywołany zmieniającymi się warunkami środowiskowymi. Są dwa generalne poziomy możliwe reakcji: doraźna regulacja i odpowiedź fizjologiczna oraz późniejsze zmiany w metabolizmie oraz strukturach komórkowych [17]. Gdy komórka prokariotyczna zostanie wystawiona na działanie stresorów fizycznych lub chemicznych dochodzi do zmian w ekspresji specyficznych genów (w tym genów szoku termicznego) oraz zmian w stabilności wielu białek komórkowych. Oprócz wspomnianego szoku termicznego istnieje wiele czynników indukujących syntezę białek szoku cieplnego będących pod kontrolą specyficznych sekwencji promotorowych [26]. Powszechnie badane są bakteryjne odpowiedzi komórkowe będące reakcją na głód, brak dostępu tlenu, stres oksydacyjny, zmiany osmotyczne czy odpowiedź SOS na uszkodzenia DNA [17]. Stres komórkowy może być również skutkiem pojawienia się w środowisku związku chemicznego oraz w niektórych przypadkach zmiany pH, którego zakres optymalny zależy od indywidualnych cech szczepu. Reakcja promotorów białek szoku cieplnego na związki toksyczne została wykorzystana w konstrukcji biosensorów, będących fuzją elementów promotorowych z określonym genem reporterowym otrzymywaną metodami inżynierii genetycznej [26].

Komórki bakteryjne (np. *E. coli*) narażone na działanie stresorów bronią się przed uszkodzeniami i śmiercią wykorzystując różnorodne mechanizmy fizjologicznej, biochemicznej czy behawioralnej odpowiedzi komórkowej [17]. Jedną z możliwości obrony i naprawy uszkodzeń jest bakteryjny regulon SOS, który stanowi przykład adaptacyjnej odpowiedzi bakterii na stres. Jego wyrażanie jest indukowane uszkodzeniami DNA w komórce (głównie obecnością jednoniciowych fragmentów DNA), będącymi skutkiem ekspozycji komórki na związki chemiczne, czy promieniowanie wywołujące efekt genotoksyczny. Białka kodowane przez

geny tego regulonu mają wpływ na liczne funkcje komórki, w tym: metabolizm energetyczny, zatrzymanie podziałów komórkowych, restrykcję czy naprawę DNA. Naprawa SOS obejmuje kilka mechanizmów, w tym naprawę błędną (mutageneza SOS), czyli naprawę nie dopuszczającą do zatrzymania replikacji nawet kosztem zwiększenia liczby mutacji w DNA. Ponieważ niektóre mutacje mogą zwiększyć zdolność bakterii do przeżycia w warunkach stresowych, zwiększenie liczby mutacji w wyniku błędnej naprawy DNA traktowane jest często jako czynnik adaptacyjny [15, 44].

Uszkodzenia materiału genetycznego indukujące odpowiedź SOS są zazwyczaj następstwem działania związków mutagennych. Zmiany te mogą mieć dwójaki charakter: bezpośredni lub pośredni. Uszkodzenia bezpośrednie obejmują łączenie się związku toksycznego z DNA wiązaniem kowalencyjnym lub pęknięciem nici DNA wywołane przykładowo ekspozycją organizmu na promieniowanie α . Pośrednie uszkodzenia materiału genetycznego są następstwem pojawienia się reaktywnych produktów, które zmieniają strukturę nukleotydów [15].

W normalnych warunkach transkrypcja genów SOS jest hamowana za pomocą represora – białka LexA. W wyniku pojawienia się uszkodzeń materiału genetycznego następuje transkrypcja genu *recA* i aktywacja białka RecA, które zaczyna funkcjonować w sposób nieenzymatyczny jako koproteaza niezbędna do przecięcia LexA i zniesienia represji regulonu SOS. W wyniku tego zachodzi transkrypcja genów SOS a jej produkty naprawiają DNA. Jednym z transkrybowanych genów jest *lexA*, którego wyrażanie się w miarę upływu czasu prowadzi do zwiększenia liczby białka represorowego LexA i ponownego zablokowania regulonu SOS [15, 44].

Modyfikowane genetycznie bakterie bioluminescencyjne i fluorescencyjne są ostatnio szeroko stosowane w detekcji wielu zanieczyszczeń środowiska. Charakteryzują się one połączeniem komponentu receptorowego (promotora będącego przedmiotem regulacji środowiskowej) z komponentem reporterowym (genem odpowiadającym za bioluminescencję, *luc* lub *lux* lub fluorescencję, np. z genem *gfp*) [12, 18]. Biosensory stosowane do wykrywania genotoksyn bazują na wzmocnionej w stosunku do szczepów dzikich odpowiedzi komórkowej będącej reakcją na wywoływane przez te związki uszkodzenia DNA (modyfikacje zasad, alkilacja, przerwanie nici DNA, wewnętrznicowe usieciwienie) [8, 9, 28].

Testy oparte na bakteryjnym systemie SOS bazują na tym, iż odpowiedź na związki chemiczne uszkadzające DNA wywołuje kaskadę reakcji, włączając w to syntezę wielu białek związanych z mutagenezą, takich jak RecA i UmuCD. Wyniki tego typu biomonitoringu są wykorzystywane do wykrywania zanieczyszczeń

Tabela II
Przykłady biosensorów mikrobiologicznych opartych na bakteryjnym systemie reakcji komórkowej SOS [wg 20, 30]

Biosensor	Analizowany związek	Limit detekcji*
<i>recA</i> :: <i>gfpmut3</i>	mitomycyna C	0,012 μM
	MNNG	0,763 μM
	nadtlenek wodoru	286 μM
	Formaldehyd	305 μM
SOS <i>lux</i> test	mitomycyna C	0,0043 μM
	MNNG	0,71 μM
	nadtlenek wodoru	83 μM
	Formaldehyd	6500 μM

* Minimum detekcji jest określane jako stężenie, dla którego współczynnik wzbudzenia wynosi 2.

będących potencjalnym źródłem kancerogenezy u zwierząt i człowieka, gdyż badania dowodzą, że 60–70% genotoksyn indukujących odpowiedź SOS jest czynnikiem kancerogennym także dla ssaków [20, 29, 30]. Zestawienie przykładowych biosensorów opartych na indukcji bakteryjnej odpowiedzi SOS oraz ich poziomów detekcji umieszczono w tabeli II.

5. Charakterystyka funkcjonalności biosensora z promotorem *recA*

Aktywacja regulonu SOS będącego reakcją na uszkodzenia DNA znajduje zastosowanie w pomiarze mutagennych i genotoksycznych efektów oddziaływania wielu czynników chemicznych i fizycznych [20]. Mechanizm ten został wykorzystany w biosensorach bakteryjnych zawierających fuzję promotora *recA* wraz z genem *gfp* lub *lux*, gdzie promotor *recA* jest indukowanym uszkodzeniami DNA promotorem genu systemu SOS [20, 21]

Gen *recA* jest często angażowany w układy biosensorowe ze względu na swoją bardzo znaczącą rolę w aktywacji odpowiedzi SOS. Bierze on udział w kilku różnych mechanizmach naprawczych DNA, w tym eliminacji luk w nici potomnej DNA, pęknięć podwójnej helisy, jak również w mechanizmie tolerancji na błędy replikacyjne zwanym mutagenezą SOS. To wszystko sprawia, iż fuzja tego promotora i genu reporterowego *gfp* lub *lux* posiada cechy efektywnego sensora genotoksyczności. To połączenie wykazuje szybszą i czulszą reakcję niż fuzja innych indukowanych uszkodzeniami DNA promotorów takich jak *uvrA* czy *alkA* [20].

Odpowiedź komórkowa indukowanego stresem semispecyficznego biosensora *recA*::*gfp* lub *lux*::*gfp* podlega regulacji aktywatorowej. Kinetyka bioluminescencji związanej z odpowiedzią SOS jest zależna od biodostępności i dawki genotoksycznego związku

chemicznego. W przypadku braku stresora nie dochodzi do transkrypcji genu białka aktywatorowego w wyniku czego następuje zablokowanie transkrypcji genu reporterowego *gfp*. W następstwie pojawienia się czynnika genotoksycznego białko regulatorowe, będące produktem ekspresji genu aktywatorowego, indukuje transkrypcję genu reporterowego, w wyniku czego dochodzi do pojawienia się pozytywnej odpowiedzi komórkowej. Białko GFP przy wzbudzeniu światłem UV emituje zieloną fluorescencję, której intensywność możemy zmierzyć na drodze spektrofлуorymetrii [26]. Ten mierzalny sygnał może być wprost proporcjonalny do stężenia analizowanego związku genotoksycznego.

Technologia reporterów bioluminescencyjnych i fluorescencyjnych pozwala na szybką (w przeciągu kilku sekund) analizę genotoksyczności związków *in vivo* bez zakłóceń funkcji komórki. Sygnał świetlny pochodzi od żywych komórek a szybki pomiar nie wywołuje ich destrukcji, co sprzyja jego powtarzalności. W przypadku wysokich stężeń, większość substancji wykazuje działanie cytotoksyczne ujawniające się poprzez spadek intensywności fluorescencji wraz ze wzrostem dawki związku [30].

6. Nowatorskie trendy w technologii biosensorowej

Zgodnie z nowatorskimi trendami w dziedzinie kreowania biosensorów mikrobiologicznych szczególnie interesujące są prace polskich autorów, którzy przedstawiają możliwości aplikacyjne bakterii *Vibrio harveyi* do wykrywania mutagennego oddziaływania zanieczyszczeń w wodzie, osadach oraz tkankach roślinnych. Na uwagę zasługuje fakt szybkości dokonania oznaczeń, około 4 godzin od momentu otrzymania próby osadu w laboratorium do zakończenia testu [31–33].

W pracy A h n i wsp. [1], za zadanie badawcze obrano poznanie korelacji pomiędzy określonym typem promotorów związanych z danym systemem naprawy DNA a mechanizmem uszkodzenia DNA po zadziałaniu wybraną genotoksyną. W eksperymencie zastosowano siedem szczepów bioluminescencyjnych zawierających genetyczne fuzje promotorów zaangażowanych w odpowiedź SOS (*nrdA*-, *dinI*-, *sbmC*-, *recA*-, *recN*-, *sulA*-, *alkA*-) i genu *lux* jako genu reporterowego w *E. coli*. Każdy ze szczepów bakteryjnych poddano działaniu genotoksyn, takich jak: mitomycyna C, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG), kwas nalidyksowy (Nal) i tlenek 4-nitroquinolinowy (4-NQO). Każda ze stosowanych genotoksyn wywołała zniszczenia DNA jednakże w różnorodny sposób wynikający z ich odmiennej aktywności jako związków chemicznych. Różnicowanie komórkowej odpowiedzi *E. coli* z fuzją siedmiu różnych promotorów z genem *lux* pozwoliła na pogrupowanie biosensorów w zależności od mecha-

nizmu aktywności promotora w systemie naprawczym DNA. Wyniki tego eksperymentu jednoznacznie wskazują na ścisły związek pomiędzy podstawowym mechanizmem genotoksycznej aktywności określonego związku chemicznego a schematem komórkowej odpowiedzi naprawczej DNA. Stąd można wnioskować, że w tym wypadku biosensory bakteryjne stały się nie tylko narzędziem pozwalającym na monitoring genotoksyczności lecz również okazały się wspaniałymi obiektami modelowymi pozwalającymi na poznanie molekularnych mechanizmów komórkowych.

Ze względu na oryginalność eksperymentu bardzo ciekawa wydaje się praca autorstwa Baumstark-Khan i wsp. [3], w której w obrębie programu badawczego TECHNOTOX (Technical Workshop on Genotoxicity Biosensing) stworzono symultaniczny Lux-Fluoro test w którym jednocześnie możliwe jest dokonanie pomiaru efektu genotoksycznego (fuzja operonu *lux* z promotorem systemu SOS) oraz cytotoksycznego (fuzja genu *gfp* z konstytutywnym promotorem) wybranych związków chemicznych oraz prób środowiskowych. W obrębie tego programu badawczego skomercjalizowano kilka testów, z czego część ma certyfikat ISO: SOS Chromo test, VitoTOX[®], Umu test Kit Umulac[®] oraz RAD54-GFP test kit GreenScreen GC.

Ponadto do najbardziej popularnych komercyjnie dostępnych testów biosensorowych należą: Microtox[™] (wykrywa ogólną toksyczność), ToxAlert[™] (wykrywa ogólną toksyczność), Biomet[™] (specyficzny dla Zn, Cd, Cu, Ni, Pb, Cr, Hg), Cellsense[™] (wykrywa metale ciężkie), Biologically Heavy Metal Assay Kit (wykrywa As) [36].

7. Podsumowanie

Technologie biosensorowe ze względu na swój ogromny potencjał aplikacyjny w różnych dziedzinach życia człowieka stają się coraz bardziej popularne i według dyrektyw Unii Europejskiej znalazły poparcie w zastosowaniu jako podstawowe, szybkie i ekonomiczne narzędzie biomonitoringu środowiskowego.

Różnorodność konstrukcji genowych, głównie rodzaj stosowanego promotora jak również genu reporterowego z reguły jest ściśle skorelowana z kierunkiem zastosowawczym biosensora, czy to służącego do detekcji określonej grupy związków chemicznych, czy oszacowaniu ogólnego cyto- bądź genotoksycznego oddziaływania analizowanej próby. Związane to jest głównie z faktem ciągle wzrastającego dynamicznego rozwoju technik inżynierii genetycznej, dzięki której istnieje możliwość umieszczenia i funkcjonalnego połączenia zróżnicowanych konstrukcji genowych z różnymi wariantami genów reporterowych, głównie *lux* i *gfp*.

Obecnie najbardziej aktualne kierunki badawcze w technologii biosensorów mikrobiologicznych to detekcja: mutagenów, pestycydów, organicznych zanieczyszczeń, metali, biologicznych parametrów (takich jak: biologiczne zapotrzebowanie na tlen, wydajność bioremediacji, itd.), określanie genotoksyczności.

Badania laboratoryjne owocują ciągle poszerzającą się listą skomercjalizowanych, biosensorów mikrobiologicznych, co jest najdoskonalszym potwierdzeniem ich potencjału aplikacyjnego.

Piśmiennictwo

1. Ahn J.-M., Hwang E.T., Youn C.H.-H., Banu D.L., Kim B.C.H., Niazi J.H., Gu M.B.: Prediction and classification of the modes of genotoxic action using bacterial biosensors specific for DNA damages. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 767–772 (2009)
2. Bae J.H., Rubini M., Jung G., Wiegand G., Seifert M.H.J., Azim M.K., Kim J.-S., Zumbusch A., Holak T.A., Moroder L., Huber R., Budisa N.: Expansion of the genetic code enables design of a novel “gold” class of green fluorescent proteins. *J. Mol. Biol.* **328**, 1071–1081 (2003)
3. Baumstark-Khan Ch., Rabbow E., Rettberg P., Horneck G.: The combined bacterial Lux-Fluoro test for the detection and quantification of genotoxic and cytotoxic agents in surface water: Results from the “Technical Workshop on Genotoxicity Biosensing”. *Aqua. Toxicol.* **85**, 209–218 (2007)
4. Belkin S.: Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Cur. Opin. Microbiol.* **6**, 206–212 (2003)
5. Błaszczuk M.K.: Biosensory mikrobiologiczne (w) Mikroorganizmy w Ochronie Środowiska, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2009, s. 175–182
6. Bongaerts R.J.M., Hautefort I., Sidebotham J.M., Hinton J.C.D.: Green fluorescent protein as a marker for conditional gene expression in bacterial cells. *Meth. Enzymol.* **358**, 43–47 (2002)
7. Casavanth C., Thompson D., Beatie G.A., Philips G.J., Halverson L.J.: Use of site-specific recombination-based biosensor for detecting toluene and related compounds on roots. *Environm. Microbiol.* **4**, 238–249 (2003)
8. Cha H.J., Srivastava R., Vakharia V., Rao G., Bentley W.: Green fluorescent protein as a noninvasive stress probe in resting *Escherichia coli* cells. *Appl. Environm. Microbiol.* **65**, 409–414 (1998)
9. Chirico G., Cannone F., Beretta S., Diaspro A., Campanini B., Bettati S., Ruotolo R., Mozzarelli A.: Dynamics of green fluorescent protein mutant2 in solution, on spin-coated glasses, and encapsulated in wet silica gels. *Protein Sci.* **11**, 1152–1161 (2002)
10. D’Souza S.F.: Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 337–353 (2001)
11. Durant J.: Environmental Biotechnology. *Europ. Fed. Biotechnol. Briefing paper* **4** (1999)
12. Errampalli D., Leung K., Cassidy M.B., Kostrzyńska M., Blears M., Lee H., Trevors J.T.: Applications of green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganism. *J. Microbiol. Meth.* **35**, 187–199 (1999)
13. Farre M., Rodriguez-Mozaz S., Lopez de Alda M., Barcelo D., Hansen P. D.: Biosensors for environmental monitoring

- of aquatic systems (w) Biosensors for Environmental Monitoring at Global Scale and the EU Level, Springer, Berlin/Heidelberg. 2009, vol. **5J**, s. 1–32.
14. Girotti S., Feeri E.N., Fumo M.G., Maiolini E.: Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal. Chim. Act.* **608**, 2–29 (2008)
 15. Gu M.B., Mitchell R.J., Kim B.C.: Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* **87**, 269–305 (2004)
 16. Hansen L.H., Sørensen S.J.: The use of whole-cell biosensors to detect and quantify compounds or conditions affecting biological systems. *Microb. Ecol.* **42**, 483–494 (2001)
 17. Hazen T.C., Stahl D.A.: Using the stress response to monitor process control: pathways to more effective bioremediation. *Cur. Opin. Biotechnol.* **17**, 285–290 (2006)
 18. Jansson J.K.: Marker and reporter genes: illuminating tools for environmental microbiologists. *Cur. Opin. Microbiol.* **6**, 310–316 (2003)
 19. Kim B.C., Gu M.B.: A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification. *Biosens. Bioelectron.* **160**, 445–457 (2003).
 20. Kostrzyńska M., Leung K.T., Lee H., Trevors J.T.: Green fluorescence protein based biosensor for detecting SOS-inducing activity of genotoxic compounds. *J. Microbiol. Meth.* **48**, 43–51 (2002)
 21. Kuang Y., Biran I., Walt D.R.: Living bacterial cell array for genotoxins monitoring. *Anal. Chem.* **76**, 2902–2909 (2004).
 22. Lee J.H., Mitchell R.J., Kim B.C.H., Cullen D.C., Gu M.B.: A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 500–507 (2005)
 23. Lei Y., Chen W., Mulchandani A.: Microbial biosensors. *Anal. Chim. Act.* **568**, 200–210 (2006)
 24. Matejczyk M.: Bakteryjne biosensory. *Post. Mikrobiol.* **43**, 155–165 (2004)
 25. Matejczyk M., Rosochacki S.J.: Application of plasmid-borne green fluorescent protein-based bacterial biosensors for benzene and its selected derivatives detection in water ecosystems. *Pol. J. Environ. Stud.* **15(5D)**, 703–707 (2006)
 26. Matejczyk M., Rosochacki S.J.: Gen *gfp* jako fluorescencyjne narzędzie w analizie ekspresji genów i konstrukcji biosensorów. *Biotechnol.* **1(76)**, 53–62 (2007)
 27. Mitchell R.J., Gu M.B.: Construction and characterisation of novel dual stress-responsive bacterial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **19**, 977–985 (2003)
 28. Neuss S., Speit G.: Further characterization of the genotoxicity of formaldehyde *in vitro* by the sister chromatid exchange test and co-cultivation experiments. *Mutagen.* **23**, 355–357 (2008)
 29. Norman A., Hansen L.H., Sørensen S.J.: A flow cytometry-optimized assay using an SOS-green fluorescent protein (SOS-GFP) whole-cell biosensor for the detection of genotoxins in complex environments. *Mutat. Res.* **603**, 164–172 (2006)
 30. Ptitsyn L.R., Horneck G., Komova O., Kozubek S., Krasavin E.A., Bonev M., Rettberg P.: A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4377–4384 (1997)
 31. Podgórska B., Węgrzyn G.: A modified *Vibrio harveyi* mutagenicity assay based on bioluminescence induction. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**, 578–582 (2006)
 32. Podgórska P., Pazdro K., Węgrzyn G.: The use of the *Vibrio harveyi* luminescence mutagenicity assay as a rapid test for preliminary assessment of mutagenic pollution of marine sediments. *J. Appl. Genet.* **48**, 409–412 (2007)
 33. Podgórska B., Królicka A., Lojkowska E., Węgrzyn G.: Rapid detection of mutagens accumulated in plant tissues using a novel *Vibrio harveyi* mutagenicity assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **70**, 231–235 (2008)
 34. Rodriguez-Mozaz S., López de Alda M.J., Marco M.P., Barceló D.: Biosensors for environmental monitoring. A global perspective. *Talanta*, **65**, 291–297 (2005)
 35. Rogers K.R.: Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. *Anal. Chim. Act.* **568**, 222–231 (2006)
 36. Ron E.Z.: Biosensing environmental pollution. *Cur. Opin. Biotechnol.* **18**, 252–256 (2007)
 37. Rosochacki S.J., Matejczyk M.: Green fluorescent protein as a molecular marker in microbiology. *Acta Microbiol. Polon.* **51**, 205–216 (2002)
 38. Sørensen S.J., Burmølle M., Hansen L.H.: Making bio-sense of toxicity: new developments in whole-cell biosensors. *Cur. Opin. Biotechnol.* **17**, 11–16 (2006)
 39. Stiner L., Halverson L.J.: Development and characterisation of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for bioavailable toluene and related compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1962–1971 (2002)
 40. Strosnider H.: National Network of Environmental Management Studies Fellow.: Whole-cell bacterial biosensors and the detection of bioavailable arsenic. U. S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office, Washington, DC, 1–19 (2003).
 41. Tecon R., Roelof van der Meer J.: Bacterial biosensors for measuring availability of environmental pollutants. *Sensors*, **8**, 4062–4080 (2008)
 42. Vollmer A.C., Van Dyk T.: Stress responsive bacteria: biosensors as environmental monitors. *Adv. Microbiol. Physiol.* **49**, 131–174 (2004)
 43. Willardson B.M., Wilkins J.F., Rand T.A., Schupp J.M., Hill K.K., Keim P., Jackson P.J.: Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1006–1012 (1998)
 44. Wolska K.I.: Regulon SOS (w) Biologia molekularna bakterii, red. J. Baj, Z. Markiewicz., Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2006, s. 301–303
 45. Yagi K.: Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1251–1258 (2007).
- Temat realizowany w ramach projektu statutowego S/WBiŚ/22/2006.