

# Utveckling av nya jordbakterier för att förhindra kadmiumupptag i vete

## 1. Bakgrund till projektet

Kadmium (Cd) finns numera i relativt höga halter i stora delar av vår bästa åkermark (Eriksson et al, 1997, 2000). Alarmerande nog kan vetekärnor som skördats från sådana jordar innehålla kadmiumhalter över det hygieniska gränsvärdet (Johnsson, 1991; Söderström och Eriksson, 1996). Det är inte ovanligt att man hittar både vete och havre med halter 2-3 gånger över gränsvärdet.

Vårt intag av kadmium ligger nu nära de halter som anses kunna ge störd njurfunktion och benskörhet. Mest utsatta bedöms kvinnor med låga järndepåer vara. Ur hälsosynpunkt innebär detta ett problem! Eftersom ca 50% av denna Cd-belastning kommer från cerealierna i kosten, så behöver åtgärder sättas in och långsiktigt hållbara lösningar utvecklas redan i odlingsledet (Petersson Grawé 1999).

Att utnyttja biologiska system för att sanera kontaminerad mark kan vara ett sätt att sänka Cd nivåerna (Chaney et al, 1997). Mikroorganismer såsom bakterier och olika svamparter används redan idag med framgång för att nedbryta organiska föreningar i mark och en biologisk rening av tungmetallförorenad mark (Kratochvil and Volesky, 1998). För att detta skall fungera behöver organismen då antingen fixera metallen i jorden så att den inte kommer in i det biologiska systemet, eller alternativt, mobilisera metalljoner från marken upp ur systemet. Många organismer uttrycker speciella proteiner med tungmetallbindande aktiviteter såsom t.ex. metallotioniner (MT) hos djur och mikroorganismer och fytokelatiner (PC) hos växter (Zenk, 1996; Cobbet, 2000). Växter har dessutom rötter som både har en fantastisk penetrationsförmåga och som täcker en enorm yta. Växter har därför en stor potentiell kapacitet att påverka sin omedelbara markomgivning. Det finns flera exempel på växter i naturen som är mycket goda tungmetallackumuleringare men det finns tyvärr ännu inte någon gröda som både är en effektiv tungmetallupptagare och samtidigt ger en hög avkastning (Cunningham et al, 1995). På senare år har det därför internationellt pågått intensiv forskning där målsättningen är att på genteknisk väg utveckla nya växtsorter som effektivt kan fytoremediera tungmetallförorenad mark (Meagher, 2000). Genom att tillföra gener som ger växterna förmågan att ta upp metallen ur jorden, transportera den till celler ovan jord, t.ex. ledningsvävnadsceller i stammen och där sätta in den i vakuolen, kan växter utvecklas till att bli mycket effektiva marksanerare.

Ett kortsiktigare och kanske mindre kontroversiellt alternativ till att utveckla transgena växter som fytoremedierare är att genetiskt modifiera de bakterier som lever i nära anslutning till växtrötterna. Genom att introducera gener som kodar för metallbindande proteiner i någon av dessa bakterier skulle de då hindra växten från att ta upp tungmetallen. Sådana bakterier skulle kunna tas fram och testas i fält på mycket kortare tid än motsvarande växter. Detta projekt gick ut på att utveckla just ett sådant system.

## 2. Uppnådda resultat

### 2. Anrikning, isolering och karakterisering av bakterier associerade med veterötter.

#### 2.1 Anrikning av bakterier

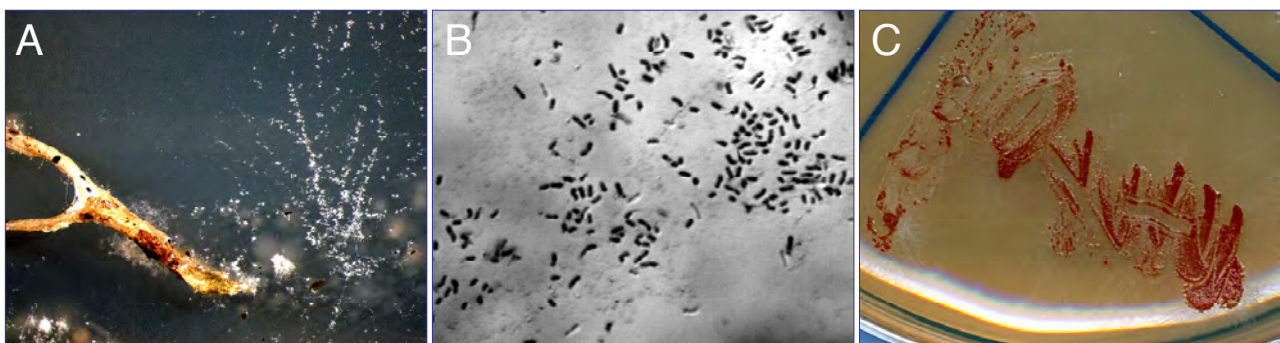
Eftersom ingenting var gjort inom området vid projektstarten började vi från början. Vi utgick från vete odlat i krukor med förhöjda kadmiumhalter som vi fick från försöksgården i Lanna. Vi lyfte fram rötter från dessa plantor, sköljde försiktigt bort överskottsjord och placerade därefter finrötter på olika medium, selektiva för antingen *Pseudomonas* eller Metanotrofer (se material och metoder). Efter 1-2 dygn syntes *Pseudomonas*-kolonier och efter ca en vecka också Metanotrofer. Dessa renströks och gramfärgades och odlades på olika selektiva medier. Vi klassificerade därefter

*Pseudomonas*-bakterierna genom jäsningar, mikroskopi och olika färgningar. Vi kunde då identifiera 10 olika isolaten av *Pseudomonas fluorescens* och *Pseudomonas chlororaphis* (figur 1). Metanotrofmediet var så selektivt att endast metanotrofer kunde växa. Vi gramfärgade några av dessa mest för att bekräfta att de var gramnegativa. Efter ett tag syntes också en karakteristisk rosa pigmentering på kulturen då den växte på agarplattan. Detta innebär att vi hade plockat upp s.k. ”pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria” (PPMF), sammanlagt 6 olika isolat (figur 2).



**Figur 1. Isolering av *Pseudomonas* från vaterötter**

- A. Rot med associerade *Pseudomonas*-bakterier.
- B. Renstryk av *Pseudomonas fluorescens* och *Pseudomonas chlororaphis*
- C. Mikroskopi av renodlade *Pseudomonas fluorescens*



**Figur 2. Isolering av PPMF från vaterötter**

- A. Agaryta med bakterier associerade kring finrötter
- B. Mikroskopisk bild (100x) av gramfärgade, gramnegativa PPMF bakterier
- C. Renstrykta PPMF bakterier på selektivt metanolmedium

## 2.2 Transformation och konjugation av isolerade bakterier

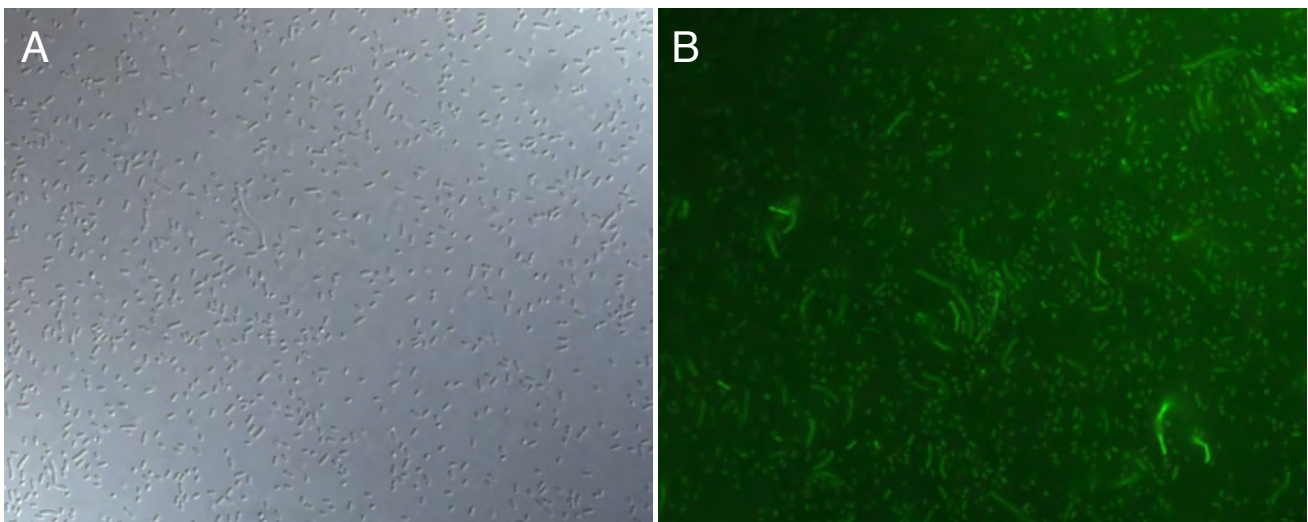
För att kunna bygga upp ett genetiskt system för några av dessa bakterier testade vi alla isolat för naturlig antibiotika resistens med sk MIC tester. Därefter valde vi ut antibiotikakänsliga bakterier och utarbetade elektroporerings- och konjugationsmetoder för dessa. Detta för att vi ville kunna introducera diverse plasmider uttryckande gener vars produkter är lätta att detektera till dessa bakterier. Det visade sig då att flera av isolaten redan var resistenta, dvs. de föll bort redan i denna första test. Återstod 5 *Pseudomonas fluorescens* och 4 PPMF.

Först och främst ville vi göra isolaten bioluminescerande eller fluorescerande för att underlätta en senare lokalisering på växten. För detta ändamål använde vi två olika testplasmider, en som innehåller de bakteriella luciferagenerna *luxA* och *luxB* (Olsson et al, 1987), en som innehåller gener för green fluorescent protein (GFP). Den senare plasmiden fick vi från Prof J. Jansson, Stockholm (Unge et al, 1999). Båda plasmiderna innehåller en gen som ger resistens mot

kanamycin, vilket passar bra eftersom de valda isolaten var kanamycinkänsliga, dvs vi kunde då selektera på kanamycin efter konjugeringen. Vi utgick därefter från publicerade protokoll både för en direkt införing av plasmiderna med hjälp av eletroporering (lux plasmiderna) (Chalfie, 1998) och en insättning via konjugation (GFP plasmiden) (Scherborn and Groskreutz, 1999). Inget av dessa protokoll fungerade utan vi fick ägna en rätt stor tid till att modifiera och optimera dessa. Till slut lyckades vi få in GFP plasmiden i 2 olika isolat av PPMF och i en *Pseudomonas*.

### 2.3 In vivo lokalisering av isolerade bakterier på enskilda veteplantor

Efter det att GFP genen (Green Fluorescent Protein) introducerats och de fluorescerande rekombinanta bakterier isolerats och renstrykts bekräftade vi genetiskt att de bar på plasmiden genom plasmidisolering och agarosgelanalys. Bakterier som uttrycker GFP genen ger upphov till synlig fluorescens i levande celler. Den variant av GFP genen som användes här uttrycker ett protein som ger ifrån sig ett kontinuerligt ljus med en emissionstopp vid 510 nm om det kontinuerligt exciteras vid 395 och 473 nm. Detta ljus kan därför detekteras om man förser mikroskopet med en exciteringskälla och lämpliga filter. Det går därefter ganska enkelt att visualisera fluorescerande bakterier både som enskilda celler (figur 3) och som kolonier (figur 4).



**Figur 3 Visualisering av enskilda bakterier**

A. Ljusbild med enskilda bakterier

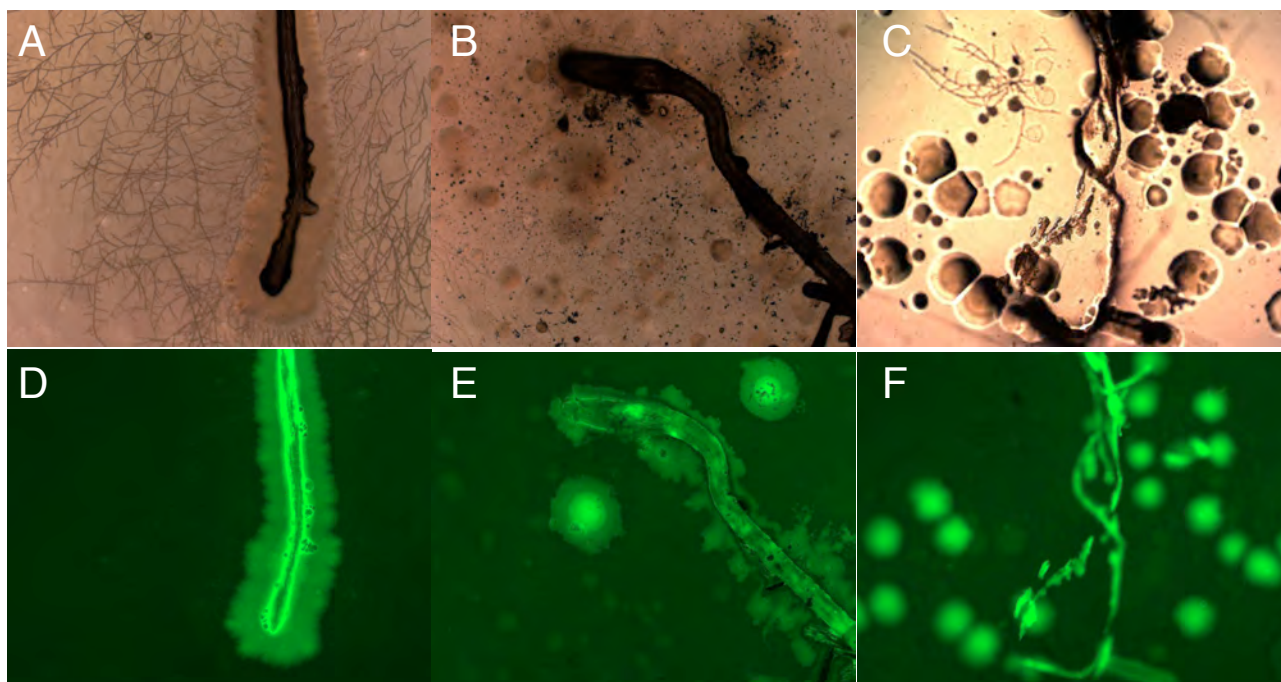
B. Fluorescensbild av enskilda, fluorescerande GFP bakterier

Vi gjorde därefter en serie experiment där vi testade återinfektionen av de isolerade, GFP märkta bakterierna på veteplantorna. Denna gjordes på så vis att vetetfrön antingen doppades i en bakteriesuspension innan sådd eller så vattnades unga plantor regelbundet med en suspension av den fluorescerande bakterien. När plantorna var 4 veckor gamla eller äldre, togs rötter försiktigt upp från jorden under och inkuberades på plattor selektiva för antingen *Pseudomonas* eller PPMF. När bakteriekolonierna blev synliga för ögat undersökte vi om de uttryckte GFP proteinet i fluorescensmikroskop assayen. Som framgår kunde vi visa att i samtliga fall hade bakterierna etablerat sig på växten (figur 4). Detta gällde både de två *Pseudomonas* isolaten och PPMF isolatet och det fungerade både med frödopp och vattning med bakterier.

### 3. Diskussion

I detta projekt har vi demonstrerat att det är fullt möjligt att isolera och identifiera bakterier som lever på och nära växten genetiskt modifiera dessa med hjälp av genteknik och därefter återinfektera plantan med de modifierade bakterierna på ett sätt som gör att dessa bakterier i

konkurrens med andra kan etableras sig på växten. Med andra ord, vi har byggt upp ett system där vi kan introducera valfria egenskaper till bakterier som lever nära växter.



**Figure 5 Visualisering av GFP uttryckande bakteriekolonier**

A-C. Ljusbild av rötter på en agaryta med bakterier växande på och omkring rötterna

D-F. Fluorescensbild av motsvarande bilder där bakteriernas lokalisering på rötterna tydligt framgår

Nästa steg i detta projekt blir att välja ut några av alla de olika gener för methallothionin (MT) och phytochelatin (PC) biosyntes som finns beskrivna i litteraturen, sätta in dessa i de här identifierade och GFP märkta bakterierna och därefter testa deras metallbindande förmåga först som frilevande på laboratoriet och senare efter det att de associerats på växten. Ett flertal olika metallotioniner och fytokelatiner kan då testas. Efter det att de bästa metallbindande proteinerna i denna applikation är identifierade kan också syntetiska varianter göras där både de bindande domänerna optimerats och dessutom flera domäner satts ihop efter varandra i tandem. Detta bör förstärka deras affinitet för sin specifika tungmetall avsevärt. Rent praktiskt skulle cerealiefrön kunna betas med sådana bakterier innan sådd. Bakterierna kommer då att etablera sig på växtens rötter och med sin stora affinitet för den tungmetall som de metallbindande proteiner som den uttrycker har optimerats för kommer den att hindra att denna tungmetall tas upp av växten. Detta skulle således kunna vara ett bra sätt att sänka Cd halterna i t.ex. vetemjöl.

## 4. Material och metoder

### 4.1 Bakteriella medier

För *E. coli* använde vi LB agar och som selektivt medium för *Pseudomonas* Difco *Pseudomonas* Isolation Agar. För metanotroferna användes TSB medium:

100ml 10x M9 salter (6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5g NaCl, 1g NH<sub>4</sub>Cl), 5ml Metanol 895ml H<sub>2</sub>O och 15g bacto agar. Efter autoklavering adderades 1 ml 1M MgSO<sub>4</sub> och 10 ml 0.01M CaCl<sub>2</sub> från sterilfiltrerade lösningar

## 4.2 Konjugationer

### E. coli till Pseudomonas

Mottagarbakterierna odlades upp över natten. 100µl av kulturerna spreds därefter på plattor innehållande kanamycin. Konjugeringsbakterierna (F-pili positiva) sm10 eller s17 innehållande Lux eller GFP plasmider odlades upp i LB-medium över natt i 10ml LB. De pelleterades och tvättades därefter en gång i dH<sub>2</sub>O och 20µl droppades därefter på plattorna med mottagarbakterierna. Plattorna inkuberades vid 30°C över natten. De kanamycinresistenta kolonier som kom upp renströks och testades därefter på Lux och GFP aktivitet.

### E. coli till metanotrofer

E. coli odlades upp i LB över natten och PPMF i TSB under 2 dygn. Kulturerna centrifugerades och suspenderas i dH<sub>2</sub>O. Därefter blandades de båda kulturerna i proportionerna 1:1. Blandningen spreds ut på ett filter som lades ut på en TSA platta och inkuberades i rumstemperatur över natten. Därefter flyttades membranet till kanamycininnehållande TSA plattor och konjugeringspositiva kolonier identifierades efter ca 5 dygns inkubering i rumstemperatur. Rosa kolonier valdes ut och testades för Lux och GFP.

## 5. Referenser

- Chaney, R.L. et al. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 285-289
- Cobbet, C.S. (2000). Phytokelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825-832
- Cunningham, S.D. (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393-40
- Eriksson, J., Andersson, A. and Andersson, R. 1997. Tillståndet i svensk åkermark. Naturvårdsverket. Rapport 4778. *Naturvårdsverket förlag.* [kundtjanst@environ.se](mailto:kundtjanst@environ.se), © Naturvårdsverket
- Eriksson, J. Stenberg, B Andersson A och Andersson R. 2000, Tillståndet i svensk åkermark och spannmålsgröda – jordartens betydelseförmarkegenskaperna , samband markfaktorer och element i kärnan. Naturvårdsverket. Rapport nr: 5148.
- Jonsson, A 1991. Bedömning av spannmålsgrödans innehåll av kadmium baserad på SGUs geokemiska kartor. Rapport från SLR FoU nr. 115. pp.
- Kratochvil, D. and Volesky, B. (1998). Advances in biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 16, 291-300
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 153-162.
- Olsson, O., Koncz, C., and Szalay, A.A. (1988). The use of the *luxA* gene of the bacterial luciferase operon as a reporter gene. *Mol. Gen. Gen.* 215, 1-9.,
- Pettersson Grawé, K. 1996. Kadmium i våra njurar . var kommer det ifrån? Livsmedelverket, Vår föda nr 6. 1996, uppdaterad 1999 på [www.slv.se/templatesSLV/SLV\\_page\\_2557.asp](http://www.slv.se/templatesSLV/SLV_page_2557.asp).
- Söderström M. and Eriksson J.E. 1996 Cadmium in Soil and winter wheat grain in southern Sweden II. Geographical Distribution and its relation to Substratum. *Acta Agric. Scand., section B: Soil and Plants Sci.*, 46, 249-257.
- Zenk, D.H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 179, 21-30
- Unge, A., Tombolini, R., Mölbak, L. and Jansson, J.K (1999). Simultaneous Monitoring of Cell Number and Metabolic Activity of Specific Bacterial Populations with a Dual *gfp-luxAB* Marker System. *Appl. Environm. Microbiol.* 65: 813–821