

Bioremediering ved hjælp af planter og gensplejsede bakterier

Ulrich Karlson
Danmarks Miljøundersøgelser

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	9
1 TEKNOLOGIEN	13
1.1 PROJEKTETS IDÉGRUNDLAG	13
1.2 FREMTIDIGE FORSKNINGSBEHOV INDENFOR TEKNIKKEN	13
2 PROJEKTETS OPBYGNING	15
3 OVERSIGT OVER RESULTATERNE	17
4 DEN FREMTIDIGE TEKNIK?	25
4.1 FORDELE VED TEKNIKKEN	25
4.2 ULEMPER OG BEGRÆNSNINGER VED TEKNIKKEN	25
4.3 IKKE AFKLAREDE SPØRGSMÅL VED TEKNIKKEN	25
5 VIDEREGÅENDE LITTERATUR	27
5.1 PUBLIKATIONER FRA PROJEKTET.	27
5.2 PHD-, MASTER- OG SPECIALE AFHANDLINGER FRA PROJEKTET.	28
5.3 KONFERENCEBIDRAG FRA PROJEKTET.	28

Forord

Siden 1997 har Miljøstyrelsen under ”Teknologiprogrammet for jord- og grundvandsforurening” støttet projekter, der har til formål at udvikle og afprøve *in situ* jordrensemetoder baseret på anvendelse af planter. Fyto-oprensning er en eksperimental teknologi og er blevet defineret som: „Anvendelsen af grønne planter og disses mikroflora, jordtilsætninger og agronomiske teknikker til at fjerne, tilbageholde eller uskadeliggøre uønskede kemiske stoffer i miljøet .“ Teknologien er anvendelig for fjernelse af både organiske forureninger (fytoremediering) og tungmetal forureninger (fytoekstraktion).

Fra den 1. september 1997 – 31. december 2000 har MST, i fællesskab med Europakommissionens bioteknologiprogram, støttet forsknings- og udviklingsprojektet “Bioremediering ved hjælp af planter og gensplejsede bakterier (Integrated Plant/GEM Systems for *in situ* Soil Bioremediation)”. Projektets formål var at udvikle og afprøve bakteriel teknologi til anvendelse i fytoremediering af PCB-forurenet jord. PCB-forurenede gamle industrigrunde er et stort problem især i USA og de tidligere østeuropæiske lande.

Sammenfatning og konklusioner

Sammenfatning

Et langsigtet forsknings- og udviklingsprojekt blev gennemført under Miljøstyrelsens "Teknologiprogrammet for jord- og grundvandsforurening" i forbindelse med EU's bioteknologiprogram. Formålet med projektet var at udvikle fytoremedieringsteknologi for PCB-forurenede grunde ved at genmodificere bakterier så de nedbryder PCB samtidig med at de bliver vedligeholdt og fordelt i jorden ved hjælp af planterødder. Projektet opnåede at udvikle denne type bakterier. En af bakterierne blev sikkerheds-testet i laboratoriet og er klar til en sikkerhedsmæssig afprøvning i felten. Undersøgelser af bakteriernes evne til at lave fytoremediering mere effektiv er ikke blevet afsluttet. Arbejdet fortsætter under et nyt EU-projekt.

Hovedkonklusioner

Det blev påvist, at man ved gensplejsning kan lave rodkoloniserende bakterier, der kan nedbryde lavt-klorerede PCB'er i jord. Det er dog endnu ikke lykkedes konkret at påvise oprensningseffekten i forurenede jord.

De gensplejsede bakterier kan anvendes ved at pøde dem på frø eller stiklinger.

En gensplejset bakterie blev påvist at være sikker i laboratorie-eksperimenter og er klar til den sikkerhedsmæssige afprøvning i felten.

De vigtigste delkonklusioner

- I jordforsøg med lucerne (*Medicago sativa*) koloniserede bakteriestamme *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb planterødder med en høj densitet. Der blev målt bakteriedensiteter mellem 10^5 cfu/g og 10^6 cfu/g fugtig rod, og den totale aerobe bakteriepopulation bestod af op til 10% af den gensplejsede stamme.
- Den mest effektive måde for podning af lucerne rødder med stammen *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb i ikke-steriliseret jord er ved at anvende alginat kapsler der indeholder bakteriestammen.
- Genafsnit på begge sider af *bph* genkompleksen i den genmodificerede stamme *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb blev sekventeret og dernæst blev der udviklet en PCR (polymerase kædereaktion)-baseret metode for påvisning og kvantificering af bakteriestammen i jord.
- Tilsvarende blev der udviklet en metode for stammen *Pseudomonas fluorescens* F113lacZY, som er baseret på en unik sekvens i overgangen mellem det indførte genkompleks og kromosomet af vildtypen.
- Genmodificerede derivater af stammen *Pseudomonas fluorescens* F113 er blevet konstrueret med om-regulerede *bph* genkomplekser. Konstruktioner med p_{NODD4} og p_{EX} promotorer, som induceres af rodeksudater, er blevet testet. Nogle af disse stammer er også blevet evalueret med hensyn til kolonisering af lucernerødder i ikke sterile jordmikrokosmer.
- Et delmål af projektet var udviklingen af bakteriestammer med begrænset overlevelse (biologisk indeslutning). Der er blevet fremstillet en *Pseudomonas fluorescens* F113 stamme med et *gacA* gen, der reguleres af

p_{EX} promoteren. *gacA* genet sikrer bakteriens naturlige overlevelse i jord. Den nye konstruktion medfører, at bakterierne kun udviser god overlevelse i en rodzone. Forsøget viser, at biologisk indeslutning på basis af rodeksudater er principielt muligt.

- Et specielt bæremateriale blev udviklet og påvist effektivt i anvendelse med stammen *Pseudomonas fluorescens* F113 på pilestiklinger og plantefrø.
- En nem protokol for overflade-sterilisering af pil samt et system for steril hydroponisk dyrkning af pil, blev udviklet. Systemet kan anvendes til mere præcise studier af metabolismen af forurenings-stoffer i pileplanter.
- Bakteriestammen *Pseudomonas fluorescens* F113 var i stand til at etablere sig i rhizosfæren af pil samt i jord uden pil. Bakterietallet var signifikant højere i rhizosfæren end i bulk jorden. Efter planterne var blevet dræbt ved brug af et herbicid, var bakteriestammen i stand til at overleve i rodzonen og derefter at etablere sig igen i rhizosfæren af nye pileplanter, efter disse var blevet plantet i den samme jord.
- Den genmodificerede stamme *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb, som indeholder *bph*-genkomplekset, var i stand til at nedbryde bifenyl og flere PCB-kongenere til CO_2 . Men uden tilføjelse af ekstra kulstof (udover PCB'erne) var nedbrydningsraterne særdeles langsomme, sandsynligvis fordi nedbrydningen er cometabolisk og kræver en ekstra energikilde.
- Det var ikke muligt, at vise forbedret nedbrydning af 4-PCB i jord som effekt af inokulering af pileplanter med den genmodificerede stamme *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb med *bph*-gener. Dette skyldes sandsynligvis, at bakteriernes nedbrydnings-aktivitet var lavere end optagelses-hastigheden i planterne.
- Reporter konstruktioner af stammen *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb viste, i forbindelse med confocal laser scanning mikroskopi, at stammen koloniserede hele rhizosfæren, inklusive rod-spidserne af lucerne og pil. Koloniseringsgraden var uafhængig af tilstedeværelsen af 4-PCB. Alt tydede på, at aktiviteten af bakterierne i rhizosfæren var lav, og kun omkring 1 procent af bakteriecellerne viste en målbar omsætning af 4-PCB til 4-klorbenzoat.
- Nyere konstruktioner af stammen *Pseudomonas fluorescens* F113, med kraftigere gen-regulatorer, er endnu ikke blevet testet i disse detaljer.

Summary and conclusions

- Colonisation studies of alfalfa (*Medicago sativa*) by the bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb indicate that the strain can colonise this plant at a level of 10^5 cfu/g to 10^6 cfu/g root (fresh weight), and will constitute up to 10% of the total aerobic bacterial rhizosphere population.
- Colonisation of alfalfa roots using beads (alginate encapsulated *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb) was found to be the most efficient way of introducing the inoculant into non-sterile soil microcosms. Different encapsulation formulations have been shown to optimise the release of the genetically modified microorganisms to soil over time.
- Left and right distal regions of the *bph* cassette were sequenced, and DNA sequence information allowed the design of PCR primer pairs that can be used to amplify a unique amplicon, indicative of this DNA module, which can be used to track the recombinant insert in *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb. A method was developed using real time PCR methods for the detection and quantification of strain F113rifpcb and its recombinant genes.
- A similar quantitative assay was developed for strain lacZY, based on a unique sequence in the junction between the inserted cassette and the wildtype chromosome.
- A major objective of the project was to place the *bph* degradation genes under the control of exudate/environment inducible promoters. A model plasmid to assess an iron regulated promoter from *Pseudomonas* sp. strain M114 was constructed and evaluated.
- *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives have been constructed with re-regulated *bph* pathways. Constructs with p_{NODD4} and p_{EX} promoters located in the 5' region of the *bph* cassette have been evaluated for growth on biphenyl and gene expression in vitro. These strains have also been evaluated for colonisation of alfalfa roots in non-sterile soil microcosms.
- A goal of the project was to develop inoculants with limited persistence (contained strains). A regulatory gene of secondary metabolites was targeted as a key gene required for the long term survival of *Pseudomonas* in soil.
- Pex fusions to this regulatory gene have been constructed and tested, showing the feasibility of a biological containment system based on root exudate-induced expression of *gacA*.
- A specific carrier is found suitable for application of strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on cuttings as well as on seeds.
- A protocol for easy surface sterilisation of willow was developed, as is the hydroponic sterile culture system of this tree species. This gives basis for more precise measurements and comparison studies of different bacteria used for rhizoremediation in combination with this promising plant species.
- *Pseudomonas fluorescens* F113 is able to colonise and establish in the rhizosphere and bulk soil of willow. Over several months, the abundance of *Pseudomonas fluorescens* F113 remained higher in the willow rhizosphere than in the bulk soil. Killing the plants with a herbicide showed that the strain was able to survive on the decaying roots and re-establish on new willow roots emerging in the same soil.

- A genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* F113 harbouring the *bph*-genes had a potential to degrade biphenyl and some PCB congeners to CO₂. Probably, the low degradation rate was due to the fact that no extra C-source was added to the medium, allowing the degradation to be cometabolic.
- We were unable to detect improved degradation of 4-PCB in the soil as an effect of the inoculated *Pseudomonas fluorescens* F113 bacteria with *bph*-genes. One reason for this could be a low activity of the inoculated strain in the rhizosphere. As the *bph*-genes are expressed constitutively, the expression is decreased when strain F113 was not growing actively. The soil analyses clearly showed that 4-PCB disappearance was due to uptake by the willow roots. This was verified by extraction of the willow plants, as 4-PCB was recovered mainly from the shoots.
- Reporter constructs of *Pseudomonas fluorescens* F113 with the stable variant of *gfp* were used as an indicator of the localisation of strain F113 at the root of alfalfa. CLSM studies showed the inoculated strain to be present along the entire roots of alfalfa. The strain colonised the rhizoplane, often in the intercellular caves between plant cells, the mucigel, root tip and root hairs. No effect of adding 4-PCB to the soil was found on the colonisation patterns. No toxic or selective effect was found of not having or having the degradation genes. This is consistent with the low activity of the bacteria located at the rhizoplane.
- Reporter constructs with the unstable variants of *gfps* (*gfp*AGA and *gfp*AAV) driven by the ribosomal promoter were shown to be reporters of the gene expression of introduced cells in the rhizosphere, in that the expression was strongly dependent upon the growth rate. The CLSM studies showed that only bacteria located at the root tip or at sites for lateral root emergence expressed fluorescence from the two unstable variants of *gfps*. This indicate that only cells at the root tip or at lateral root emergence sites are able to maintain a certain activity based upon the leakage of exudates, and that cells located here have a higher activity than cells located elsewhere at the root. However, the missing expression from unstable *gfps* does not necessarily imply starvation or no activity, as the promoter can be active at levels below *gfp* detection.
- The *pm* promoter was shown to be inducible by chlorobenzoates, which are degradation products from the degradation of PCB in *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb. Pure culture experiments showed that the induction and expression of *gfp* start within a few minutes, and that the concentration needed for *gfp* expression and fluorescence at single cell level is low. This together makes F113Pm::*gfp* constructs suitable reporters for the degradation of 3-PCB in the rhizosphere of alfalfa. CLSM studies showed that *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb was able to degrade 3-PCB in the rhizosphere of alfalfa. However, these studies showed that even though the introduced strain colonised the entire root, only a minor fraction of the cells was degrading at a rate sufficient to be visualised in CLSM. In these present experiments, the rhizodegradation was shown to occur when using the 3-CBA inducible *pm* promoter and stable *gfp* as a marker. However, when using the *pm* promoter combined with unstable *gfp*, no induced fluorescence was seen, indicating a low degradation rate of the xenobiotic. This is supported by the fact that we showed that the addition of PCB did not lead to a higher number of culturable cells in the rhizosphere of the PCB-degrading strain.
- Probably, the explanation for the missing measurable degradation of 4-PCB in the soil microcosms experiments is that only a small fraction of the introduced cells remained active and that the degradation rate was too

slow to be measurable within the time of the experiment. Also, uptake by the willow was found to be an effective competitor for the available PCB to *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb. The conditions for a successful rhizodegradation were found to be present, as *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb colonises the rhizosphere and is able to degrade PCBs in pure culture.

1 Teknologien

1.1 Projektets idégrundlag

Projektets formål var at udvikle og afprøve bakteriel teknologi til anvendelse i fyto Remediering af PCB-forurenede jord.

Den nye bakterielle teknologi går ud på, ved podning af frø eller stiklinger, at etablere vegetation, hvis rodnet er besat med genmodificerede bakterier, som nedbryder de forurenende stoffer i jorden. Rodnettets funktion er at etablere og vedligeholde bakterierne i jorden. Bakteriel nedbrydning af de forurenende stoffer vil altså foregå co-metabolisk, idet bakteriernes metabolisme og vækst primært vil være baseret på rodesudater. Ved almindelig tilsætning af bakterier i jord vil den tilgængelige substratmængde være utilstrækkelig til at (1) vedligeholde et stort antal af aktive bakterier og (2) inducere dannelse af nedbrydningsenzymmer i bakterierne. Dette skyldes mest den lave tilgængelighed af jordbundet PCB som bakteriel væksts substrat. Genmodificerede bakterier, der både vokser på planter rodesudater og konstitutivt udtrykker nedbrydningsgenerne (dvs. danner nedbrydningsenzymmerne uafhængig af substratmængden) anses for en teknologisk løsning af problemet. Systemet kunne yderligere forbedres ved at splejse nedbrydning generne under kontrol af rodesudat-følsomme genregulatorer, dvs. generne vil aktiveres særligt i planternes rodzone (forbedret ydelse af teknologien), og kun i rodzonen (udvidet genetisk sikkerhed).

Hvis konceptet viser sig at være succesfuldt med PCB'er, forventes det hurtigt at kunne udvides til nedbrydning af andre organiske forureninger, såsom PAH'er, bromerede flammehæmmere, TCE. Den nye teknologi kunne i fremtiden være fordelagtig i bekæmpelse af diffuse forureninger, idet en del af dem ikke nedbrydes på naturlig vis.

1.2 Fremtidige forskningsbehov indenfor teknikken

Projektet nåede ikke alle oprindelige målsætninger. Bl.a. blev teknologien ikke tilstrækkeligt afprøvet for at vise, om jordrensningen faktisk kan forbedres ved hjælp af de gensplejsede bakterier.

Europakommissionen har godkendt en ansøgning fra dette projekts partnere om et nyt projekt, der fortsætter med den påbegyndte forskning. Projektet med acronymet "GM-Rhizoremediation" gennemføres i perioden fra januar 2002 til december 2004.

2 Projektets opbygning

Projektets hovedformål var at udvikle og afprøve bakteriel teknologi til anvendelse i fytoremediering af PCB-forurenet jord.

Som nødvendige deltrin med hensyn til projektets hovedformål, har projektpartnerne i projektforløbet arbejdet på at opnå følgende del-mål:

- A. At forøge ekspressionen af nedbryder-generne kraftigt ved hjælp af alternativ genregulering med højere aktivitet, og desuden at få generne styret af miljø-signaler, f.eks. rodeksudater.
- B. At udvikle en bakterie, hvis overlevelse efter podning er begrænset, f.eks. ved at splejse gener, der styrer bakteriestammens konkurrencedygtighed, under kontrol af rodeksudater.
- C. At udvikle metoder for effektiv podning af planterødder til anvendelse i fytoremediering.
- D. At afgrænse, hvor mange forskellige forureningsstoffer den gensplejsede stamme kan nedbryde.
- E. At udvikle værktøj til specifikt at overvåge de gensplejsede bakterier i forbindelse med udsættelsesforsøg.
- F. At forberede og søge om udsættelse af mindst en gensplejset bakteriel nedbryder samt gennemføre udsættelses-forsøget.

I centrum af projektet var bakteriestammen *Pseudomonas fluorescens* F113, der oprindeligt blev isoleret fra landbrugsjord og kan anvendes til biologisk bekæmpelse af svampeangreb på afgrøder. Stammen koloniserer rodzonen af adskillige plantearter. Til mulig bekæmpelse af jordforureningen er der splejset nedbrydningsgener i stammens kromosom. De gensplejsede stammer hedder *Pseudomonas fluorescens* F113pcb og *Pseudomonas fluorescens* F113 L::1180. Begge indeholder *bph* genkomplekset, der bevirker, at stammerne kan vokse på biphenyl og nedbryde PCB'er. Stammen F113 L::1180 har desuden fået en særlig genregulering, der bevirker en højere aktivitet. I nedbrydningsforsøg måles stammernes aktivitet sammenlignet med en ikke-nedbryder stamme, *Pseudomonas fluorescens* F113lacZY, som er blevet splejset med et gen der laver en blå farve således, at man nemt kan genfinde bakteriestammen i jord.

Resultaterne af hele EU-projektet er beskrevet i en fortrolig rapport på engelsk (BIO4-CT97-2227, RHIZODEGRADATION Project, Final Report, European Commission, 2001). Rapporten er den 27. september 2001 godkendt af Europakommissionen, som slutrapport for projektet. Grunden til at rapporten er fortrolig er dels at projektet indeholder processer, som søges patent på, og dels at dele af projektet er aftalt afleveret i udvalgte fagtidsskrifter. Hovedresultater og særligt DMU's resultater er opsummeret i de følgende afsnit.

3 Oversigt over resultaterne

A. Aktivitet og genekspression i rodzonen:

Måling af den metaboliske aktivitet af *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb ved hjælp af markerede modelbakterier viste, at bakteriestammen kun vokser i den umiddelbare nærhed af rodspidserne. Det betyder, at den metaboliske aktivitet af de celler af *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb, som ikke sidder på en rodspids, er lav. Dette er en overraskelse, idet man havde forventet, at alle bakterier i rodzonen har høj aktivitet. Men det i sig selv vil ikke betyde, at bakteriernes nedbrydningsaktivitet også er lav. (Se i den forbindelse resultaterne under punkt D).

Det viste sig, som forventet, at stammen F113rifpcb kun har en lav ekspression af *bph* genkompleks, d.v.s. dennes nedbrydningsaktivitet er på lavt niveau. Det skyldes, at stammen var verdens første forsøg på at gensplejse denne type bakteriestammer, og der derfor ikke blev brugt de allernyeste metoder for at forøge genekspressionen. Man var altså dengang tilfreds med gensplejsningen, hvis stammen overhovedet viste aktivitet, hvilket den gjorde. Forøget ekspression af *bph* genkompleks blev opnået med konstruktion af den nye stamme *Pseudomonas fluorescens* F113L:1180, hvori en genregulator fra *Sinorhizobium meliloti* anvendes. Men som en stor overraskelse er regulatoren i *Pseudomonas fluorescens* F113 altid aktiv. Det var forventet, at den sætter genekspression under kontrol af rodeksudater (fra lucerne), dvs. den nye *Pseudomonas fluorescens* F113L:1180 forventedes kun at være aktiv i rodzonen af lucerne. Faktisk er den dog aktiv i alle nicher, og den er betydelig mere aktiv end stammen F113rifpcb.

Stammen *Pseudomonas fluorescens* F113 L:1180, der er splejset med den alternative genregulator for at styrke *bph* genekspression, gennemførte i renkultur omdannelsen af 4-PCB til 4-chlorbenzoesyre betydeligt hurtigere end stammen *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb. Den sidstnævntes *bph* genekspression er styret af den naturlige genregulator af *bph* genkomplekset.

Måling af nedbrydnings-aktivitet af *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb ved hjælp af markerede modelbakterier viste, at bakteriestammen omdanner 3-PCB til 3-chlorbenzoesyre i rodzonen af lucerne. Cirka 1% af bakteriecellerne var målbare aktive. Resultatet var overraskende lavt, men det må tages i betragtning, at målemetoden underestimerer antallet af aktive bakterier. Det blev desuden påvist, at nedbrydningen ikke kun skete i særlige rodafsnit (f.eks. rodspidserne), men lige kraftigt i alle afsnit af rodoverfladen. Dette resultat viser, i forbindelse med de andre resultater beskrevet i dette kapitel, at nedbrydningsaktiviteten i den gensplejsede bakteriestamme *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb ikke er afhængig af niveauet af bakteriecellernes almindelige celle-metabolisme. Med andre ord, bakterien kan nedbryde 3-PCB selvom den ikke er i gang med at vokse.

B. Begrænset overlevelse af de podede bakterier:

Selvom der blev udviklet stammer af *Pseudomonas fluorescens* F113 med begrænset overlevelse, afsluttede projektet ikke konstruktionen af en bakteriestamme med overlevelse under kontrol af rodeksudater.

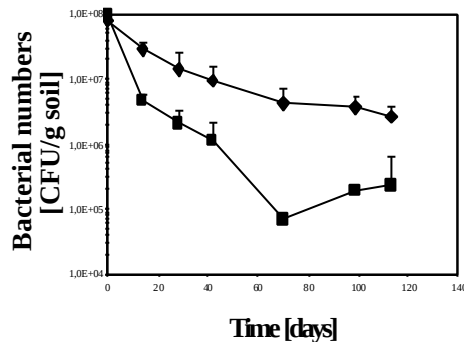
C. Podningsmetoder:

Metoder for effektiv podning af planterødder til anvendelse i fytoremediering blev udviklet og er klar til brug. Metoderne bygger på, at bakterierne dyrkes i renkulturer og blandes med et fugtigt bæremateriale. Derefter bruges bærematerialet som pilleringsmasse til plantefrø. Enkelte frø coates med pilleringsmassen og tørres straks derefter. Pillernes fugtighed justeres så de er fugtige nok til at bakterierne overlever, men tørre nok til at frø ikke spirer. Detaljerne af proceduren, især sammensætningen er bærematerialet, er hemmeligholdte opskrifter af en af projektets partnere.

Pseudomonas fluorescens F113 podet på lucerne-frø eller pilestiklinger koloniserede hele overfladen af roden, som enkelte celler eller mikrokolonier. Dette blev påvist med lucerne ved hjælp af mikroskopi, som vist i figur 2. Bakterierne, som på billederne er lysegrønne, blev oftest set i linier svarende til overgangene mellem rod epidermis celler (2a) og ved bunden af rod hår (2c) og siderødder (2b). Der blev også fundet bakteriekolonier fordelt på overfladen af siderødderne og rod hår (2b, 2c, 2d, 2e). Det vigtigste var, at bakteriecellerne også fandtes i mucigel på rodspidserne (2f). Tilsvarende mikroskopiske observationer blev lavet med pilerødder (billederne er ikke vist).

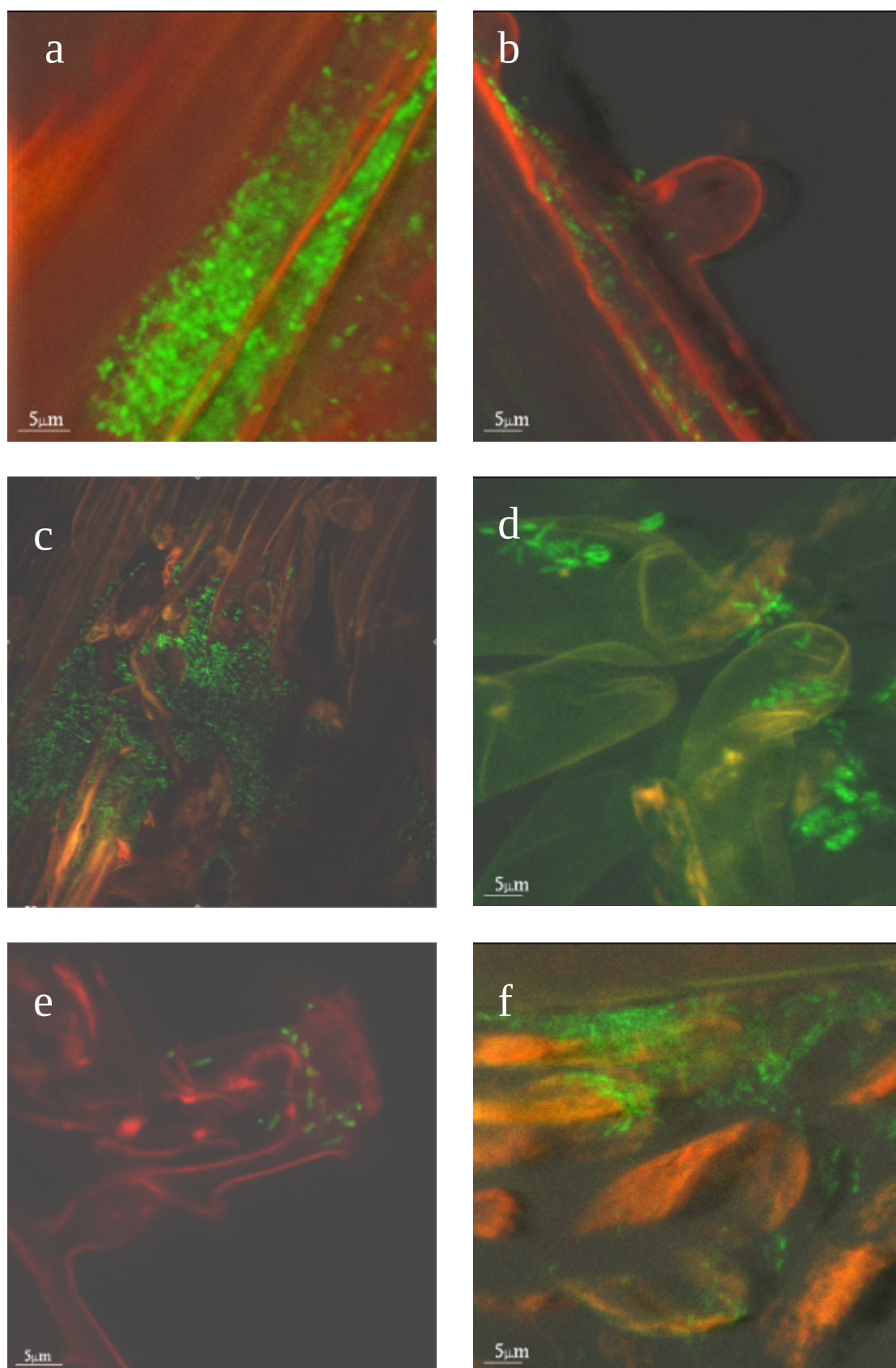
Antallet af cellerne af stamme F113 blev kvantificeret i forsøg med PCB-forurenet jord (figur 1). I såvel jord med pil, som i plantefri jord, var der et betydeligt fald i bakterietallet i tiden efter inokulering, men med pil var aftagelsen omkring en faktor 10 langsommere end uden pil.

Det konkluderes, at *Pseudomonas fluorescens* F113 kan podes på lucerne og pil for at etablere bakteriestammen i PCB-forurenet jord.



Figur 1: Overlevelse af en stamme af F113 i rhizosfæren af pil og i jord uden pil. Romber: Bakterietal i rhizosfære-jord. Kvadrater: Jord uden planter. Vertikale linier viser standardafvigelser af 3 replikater.

Figur 2: Stamme *Pseudomonas fluorescens* F113 i rhizosfæren af lucerne.

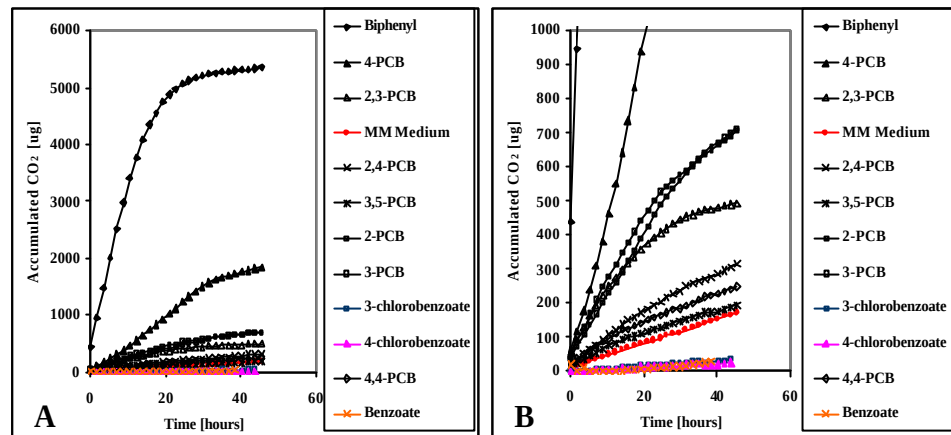


Undersøgt ved hjælp af et confocal laser scanning mikroskop. De selvlysende grønne områder er enkelte bakterieceller, der ligger meget tæt ved siden af hinanden.

D. Anvendelse til forskellige forureningsstoffer.

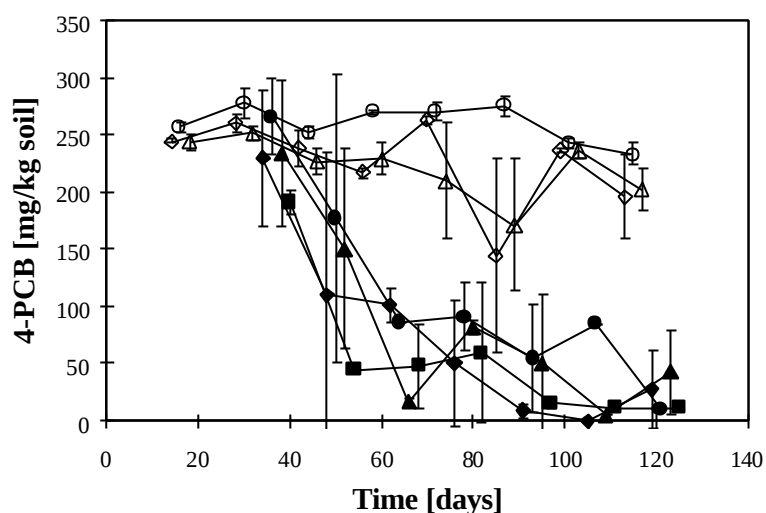
Udvidelse af konceptet fra nedbrydning af PCB'er til nedbrydning af andre forureningsstoffer er ikke afsluttet.

Det blev påvist at den gensplejsede stamme *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb kan omdanne mono- og di-klorerede PCB'er til CO₂. Omdannelsen sker hurtigst med 4-PCB, og derefter med 2-PCB og 3-PCB (figur 3).



Figur 3 (A): Dannelse af CO₂ ved kulturer af den gensplejsede stamme *Pseudomonas fluorescens* F113pcblacZ i minimal medie med forskellige modelstoffer som kulstofkilde. (B) er en forstørrelse af (A).

I laboratorie-eksperimenter med 4-PCB forurennet jord, pil og bakterier blev forureningen hurtigt fjernet (figur 4). Der kunne ikke ses en effekt af den podede stamme *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb. Dette skyldes formentlig en hurtig optagelse i planten. Dette kan forklares ved hjælp af en ny matematisk model, som forudsiger, at organiske stoffer med en $\log K_{ow}$ under 5 optages i planter. Højere klorerede PCB'er har en betydelig højere $\log K_{ow}$ og vil sandsynligvis ikke optages i planter, men effekten af *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb ved disse forbindelser er ikke undersøgt endnu.

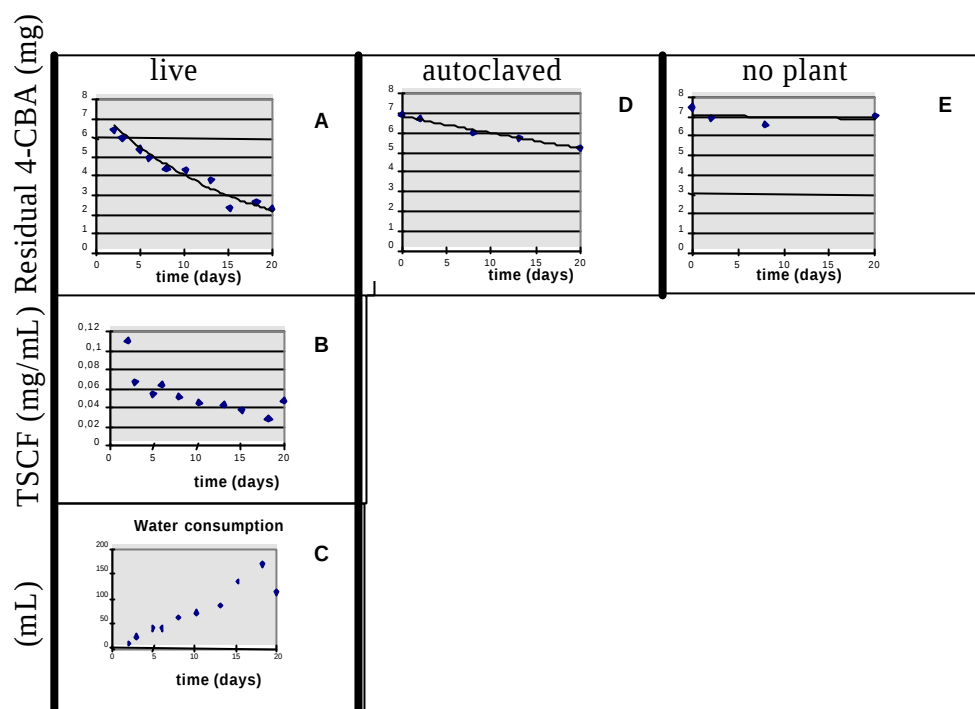


Figur 4: Den resterende 4-PCB i jord-plant systemer. ○autoklaveret jord, △*Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb og ingen planter, ○jord alene, △autoklaveret jord + pil, ●*Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb +pil, ◆*Pseudomonas fluorescens* F113riflacZ +pil. Vertikale linier viser standardafvigelse af 3 replikater.

I bakterier, der indeholder *bph* genkomplekset, omdannes PCB'er via chlorbenzoater. Det er endvidere bekendt fra litteraturen, at chlorbenzoaterne frigives af bakteriecellerne. Det blev i projektet bekræftet, at stammen F113rifpcb danner og frigiver chlorbenzoater som forventet.

Det blev desuden påvist, at mono-, di- og trichlorbenzoater optages hurtigt i pileplanter (figur 5). Idet TSCF er næsten konstant med tiden, er optagelsen primært afhængig af vandforbruget, som tolkes som bevis for hurtig (passiv) optagelse af chlorbenzoat. Det betyder, at chlorbenzoater, der dannes under nedbrydning af PCB'er ved gensplejsede stammer af *Pseudomonas fluorescens* F113 i rodzonen af planter, vil fjernes fra jordvæsken. De producerede chlorbenzoater bliver dermed ikke til et miljøproblem.

Desuden antyder de seneste resultater, at *Pseudomonas fluorescens* F113 selv nedbryder chlorbenzoater. Dette forløbige resultat er en overraskelse og bliver undersøgt videre.



Figur 5: Skæbne af 4-chlorbenzoat (4-CBA) i hydroponiske systemer med pil. TSCF (transpiration stream concentration factor) er beregnet på basis af de målte værdier for optagelse af chlorbenzoat (A) og den sideløbende vandforbrug (transpiration) af planterne (C). Chlorbenzoat optages ikke i døde planter (D), idet disse ikke forbruger vand. Som kontrol anvendes en opstilling uden planter (E).

E. Detektionsmetoder.

Udvikling af detektionsmetoder for specifikt at overvåge de gensplejsede bakterier i forbindelse med udsættelses-forsøg er kommet til et punkt, hvor metoderne er klar til brug. Genafsnit på begge sider af *bph* genkompleksen i den genmodificerede stamme *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb blev sekventeret og dernæst blev der udviklet en PCR (polymerase kædereaktion)-baseret metode for påvisning og kvantificering af bakteriestammen i jord. Tilsvarende blev der udviklet en metode for stammen *Pseudomonas fluorescens* F113lacZY, som er baseret på en unik sekvens i overgangen mellem det indførte genkompleks og kromosomet af vildtypen.

F. Sikkerhedsstudie og udsætningsansøgning:

Genmodificeret *Pseudomonas fluorescens* F113 var i stand til at overleve på døde rødder og at re-etablere sig på rødderne af nye planter, der efter tre ugers ventetid blev plantet i den samme jord. Det betyder at fjernelse af vegetation ikke fuldstændigt vil fjerne bakteriestammen i tilfælde, at man ønsker at fjerne den fra jorden. Det betyder dog også, at bakteriestammen kan anvendes effektivt, idet den efter podning overlever godt i jord. Før i tiden har der været vanskeligheder med andre laboratoriestammer, som ikke overlevede tilstrækkeligt efter podning i forurennet jord.

I forsøg med tilsætning af genmodificeret *Pseudomonas fluorescens* F113 til henholdsvis forurennet jord eller pilestiklinger (plantet i forurennet jord), blev der med pil vedligeholdt mere end 10 gange så mange celler af bakteriestammen per jordmasse end uden pil (figur 2). Det bekræfter, at

anvendelse af vegetation er en væsentlig del af teknologien for at etablere og vedligeholde et højt antal af disse bakterier i jord. Samtidig betyder det også, at fjernelse af vegetation nedsætter antallet af bakterierne med mere end en faktor 10 indenfor få uger.

I såvel jord med som uden planter, etablerede genmodificeret *Pseudomonas fluorescens* F113 sig med et vis bakterietal per jordmasse. Antallet var efter nogle måneder relativt stabilt og blev kun langsomt mindre. Det er aldrig sket, at genmodificerede *Pseudomonas fluorescens* F113 stammer ville vokse usædvanligt i jord, og på intet tidspunkt overstiger bakterietallet det niveau, der er set for andre jordbakterier.

Rodkolonisering og bakterieantal per jordmasse var de samme med og uden PCB'er, med såvel stamme F113 som stamme F113rifpcb. Det viser, at indspejlsning af *bph*-generne ikke har indflydelse på, hvordan *Pseudomonas fluorescens* F113 overlever i miljøet.

Et økologisk felt-studie med udsættelse af de genmodificerede stammer *Pseudomonas fluorescens* F113lacZY og *Pseudomonas fluorescens* F113rifpcb er planlagt og forberedt. Stammernes økologiske karakterisering er afsluttet og resultaterne er blevet fremlagt i en ansøgning om et udsættelses-forsøg. Ansøgningen er under behandling i Skov- og Naturstyrelsen. Miljøministerens afgørelse afventes.

4 Den fremtidige teknik?

4.1 Fordele ved teknikken

Teknikken anvendes *in situ*, d.v.s. uden at opgrave og flytte jorden, og er ikke meget forskellig fra skov- eller landbrugsmæssig dyrkning af planter. Derfor burde fyto-oprensning være billig, lavteknologisk, og en metode med lille miljøbelastning. Det er dog for tidligt, at udtale sig om omkostningerne, idet teknologi-udviklingen ikke er afsluttet. Udviklings-omkostningerne kan kun inkluderes i den endelige pris af teknologien, efter udviklingen er afsluttet.

Teoretisk kan teknikken anvendes for alle former for organiske forureninger, også forureningsblandinger.

4.2 Ulemper og begrænsninger ved teknikken

Den nye bakterielle teknologi kræver ny gensplejsning, hver gang bakteriestammen skal nedbryde en anden type af forurening.

Den nye bakterielle teknologi kræver en ny risikovurdering, hver gang der er splejset en ny bakteriestamme.

Indtil videre er en del af befolkningen skeptisk overfor gensplejsningen.

Der mangler p.t. viden om hvilke oprensningsniveauer der kan opnås ved denne form for fyto-oprensning.

En af de største ulemper ved denne, såvel som andre former for fyto-oprensning er, at der formentlig er tale om 10 år eller mere.

4.3 Ikke afklarede spørgsmål ved teknikken

Det er indtil videre ikke konkret påvist, at podning med de gensplejsede bakterier medfører en forøget nedbrydning af forureningen.

5 Videregående litteratur

5.1 Publikationer fra projektet.

- Boldt, T.S. Kan bakterier rense jord ?. Specialhistorie i Forskningsforums og Forskningsrådenes årsberetning 2000.
- Boldt, T.S., U. Karlson, J. Sørensen, S. Molin and C. Ramos. In situ degradation and effect of 3- and 4-PCB on *Ps. fluorescens* F113 in the rhizosphere of alfalfa studied by using CLSM. In prep.
- Boldt, Tina S., Kirsten B. Lejbølle, Jan Sørensen and Ulrich Karlson. Evaluation of a genetically modified *Ps. fluorescens* F113 for phytoremediation of 4-PCB polluted soil. In prep.
- Dowling, D. (1999) Directed Evolution of bacteria for the detoxification of pollutants. The Irish Scientists Year Book 1999 p101 (ed. Mollam, C.) Sampton Ltd., Dublin.
- Karlson, U, Dowling, DN, O'Gara, F, Rivilla, R, Bittens, M, Francesconi, S, Pritchard, H and H.C. Pedersen (1998) . Development of self-contained plant/GMM systems for soil bioremediation. Proceedings Second CCRO Workshop. Past, Present and Future Risk Assessment when using GMO's. Gert E. de Vries (editor). ProBio Partners V.O.F., Overschild, The Netherlands, pp. 23-31
- O'Riordan, B., R. Rivilla, M. Sheehan, J. Morrissey, F. O'Gara. Development of plant exudate inducible systems for in situ degradation of PCBs. In Preparation.
- Power, B and Dowling, DN. Long Term Survival, release and activity of Genetically Modified inoculant bacteria encapsulated in alginate beads. In preparation for Industrial Biotechnology.
- Sánchez-Contreras, M., Lloret, J., Martín, M., Villaceros, M., Bonilla, I. and Rivilla, R. (2000) PCR use of highly conserved DNA regions for identification of *Sinorhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. 66:3621-3623.
- Sánchez-Contreras, María , Marta Martín, Marta Villaceros, Fergal O'Gara, Ildefonso Bonilla and Rafael Rivilla. *Pseudomonas fluorescens* F113 phase variants are affected in multiple traits relevant to rhizosphere colonization. Submitted to J. Bact.
- Sherlock, O., Whelan, C., Ryan, D and D.N. Dowling. Genetic and biochemical analysis of a mutant *bphC* allele from a GM pseudomonad. In preparation for FEMS Microbiology.
- Sherlock, O, Whelan, C., Ryan, D, Francesconi, S and Dowling, D. Development of a Real time PCR assay for the detection of a PCB degrading genetically modified organism in soil. Submitted to FEMS Microbiol. Ecol.
- Villaceros, M. et al. Design of expression systems based on rhizobial nod promoters for PCBs rhizodegradation. In Preparation.
- Villaceros, M., B. Power, M. Sánchez-Contreras, J. Lloret, R.I. Oruezabal, M. Martín, F. Fernández-Piñas, I. Bonilla, C. Whelan, David N. Dowling and R. Rivilla. Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. Submitted to Appl. Environ. Microbiol.
- Villaceros, M., Power, B , Sanchez-Contreras, M, Lloret, J, Oruezabal, R.I, Martin, Marta, Fernandez-Pinas, Whelan, C., Bonilla, I, Dowling, DN and Rivilla, R. Colonisation behaviour *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa rhizosphere. Submitted to Applied and Environmental Microbiology (2001).

Ryan,D., Sherlock,O., Whelan,C., Francesconi,S., Rivilla, R. and Dowling,D. Location of the the *bph* cassette and its insertion site in the GM bacterium F113rifpcb. Submitted to FEMS Microbiol. Letters.

5.2 PhD-, Master- og speciale afhandlinger fra projektet.

Boldt, Tina S. (2001). Rhizoremediation of PCBs by GM strains of *P. fluorescens* F113 inoculated to willow and alfalfa. PhD thesis.

Gaillet. David (1999) "Bioremediation Research. Establishment of a Model-System: Quantification of the Roles Played by Some of the Biotic Participants in the Remediation of Chlorinated Benzoic Acids" Danisco Seed. MSc. Thesis.

O'Riordan, Brid. Exploitation of plant exudate inducible gene promoters to develop *Pseudomonas* strains for biotechnological applications. In preparation. Msc Thesis. University College Cork, Ireland

Power,B. (2001). Development of a practical delivery system for the storage, delivery and release of microbial inoculants for bioremediation applications. PhD thesis.

Sánchez-Contreras, M. (2001). Variación de Fase de *Pseudomonas fluorescens* durante la colonización de la rizosfera de alfalfa. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. (In Spanish).

Villaceros M. (2000). Desarrollo de un sistema integrado planta/microorganismos modificados genéticamente para descontaminación. PhD. Thesis. Universidad Autónoma de Madrid (In Spanish).

Whelan,C. (2001). Construction and analysis of GM bacteria with re-regulated expression of *bph* genes. PhD thesis.

5.3 Konferencebidrag fra projektet.

Brazil,G.M., Bermingham,A., Gardiner,S., O'Sullivan,O., O'Gara,F. and Dowling,D.N. (1997) Design of bacterial inoculants for the degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the rhizosphere. Proceedings VI International Congress on *Pseudomonas*: Molecular Biology and Biotechnology p23. CSIC, Madrid.

Brazil,G.M., Bermingham,A., Gardiner,S., Whelan,C., O'Gara,F., Karlson,U. and Dowling,D.N. (1997) Novel bacterial inoculants for the biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the rhizosphere. Society for General Microbiology (SGM) Symposium - Microorganisms: the answer to environmental pollution? P57 UCD, Dublin.

Brazil,G.M., Kenefick,L., Dowling,D.N. and O'Gara,F. (1997) Quantification of lateral transfer of a novel degradative trait,bph, from a genetically modified rhizosphere pseudomonad, F113pcb, in the laboratory and in the sugar beet rhizosphere. Proceedings of the Society for General Microbiology p27, University of Limerick, Galway.

Gilmartin, Niamh, David Ryan, Orla Sherlock, Donal Skelly and David Dowling. *Rhodococcus erythropolis* ITCBP; an isolate with potential for degradation of PCBs. *Proceedings of the Society for General Microbiology*, Institute of Technology Waterford, 2001.

O'Riordan, B., Hogan, I., Sheehan, M.M., Carnicero, P. and O'Gara, F. (2000). Exploitation of Green Fluorescent Protein for the study of the behaviour of the *Pseudomonas fluorescens* strain F113 in the sugarbeet rhizosphere. Proceedings of SGM conference on Microbial Ecology, NUIG,

O'Riordan, B., Sheehan, M. M., Carnicero, P. and O'Gara, F. (1999). Exploitation of plant exudate responsive promoters in the construction of inducible expression systems. Proceedings of SGM conference. Colerain, Northern Ireland.

- Power, B., Conway, S., and Dowling, D.N. (1998) Design of microbial inoculants for environmental applications. Proceedings Science Research Colloquim. Institute of Technology Tallaght, Dublin.
- Sánchez-Contreras, M., Martín, M., Villaceros, M. and Rivilla, R. Phase variation in *Pseudomonas fluorescens*. Implications for Bioremediation. In *Biotechnology for Environmental Applications*. p T13. Roskilde 2000.
- Sánchez-Contreras, M., Villaceros, M., Fernández-Piñas, F., Lloret, J., Martín, M. Bonilla, I y Rivilla, R. Estudio del potencial biorremediador de *Sinorhizobium meliloti*. Res. VIII Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno. p. 189 (1998).
- Sheehan, M. M., O'Riordan, B. and O'Gara, F. (2000) Integrated Plant/GEM Systems for in situ Soil Bioremediation. Proceedings of EU conference: *Biotechnology for Environmental Applications*. Roskilde, Denmark.
- Sherlock, O., O'Shaughnessy, K. Gardiner, S. and D.N. Dowling. (1999) Generation of novel PCB degrading genes using molecular genetic techniques. Proceedings of the 4th Research Science Colloquium, Institute of Technology Letterkenny.
- Sherlock, O. and Dowling, D. (2000) Development of a PCR assay for the detection of a PCB degrading GEM in soil. In Proceedings of SGM Conference on Microbial Ecology, NUIG, Galway.
- Villaceros, M., Sánchez-Contreras, M. Martín, M. and Rivilla, R. Use of rhizobial nod promoters for foreign gene expression in the alfalfa rhizosphere. In *Biotechnology for Environmental Applications*. p P13. Roskilde 2000.
- Villaceros, M., Sánchez-Contreras, M., Martín, M. and Rivilla, R. Expression systems based on rhizobial nod promoters can be used to express foreign genes in the alfalfa rhizosphere. Abs. 4th European Conference on Nitrogen Fixation. p. 216. Sevilla 2000.
- Villaceros, M., Sánchez Contreras, M., Lloret, J., Fernández-Piñas, F., Bonilla, I. y Rivilla, R. Efectos de la coinoculación de alfalfa con *Sinorhizobium meliloti* EFB1 y *Pseudomonas fluorescens* F113. Res. VIII Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno. p. 195-196 (1998).
- Whelan, C., Gardiner, S., O'Gara, F. and Dowling, D.N. (1998) Genetic Manipulation of a Genetically Modified *Pseudomonas* with Potential to Degrade Polychlorinated Biphenyls (PCBs). Proceedings Science Research Colloquim. Institute of Technology Tallaght, Dublin.
- Whelan, C., Power, B., Sherlock, O., Ryan, D. and Dowling, D.N. (2000) Development of rhizosphere bacteria and delivery systems for the degradation of PCBs. Proceedings of EU Conference: *Biotechnology for Environmental Applications*, p15. Roskilde, Denmark.