

PIOTR RZYMSKI, BARBARA PONIEDZIAŁEK

## **Czy życie może być oparte na arsenie? Błędy w badaniach nad bakteriami GFAJ-1**

### **Wprowadzenie**

Rozwój szeroko rozumianej działalności informacyjnej umożliwił powstanie zupełnie nowego wymiaru komunikacji naukowej. Publikacje ukazujące się na łamach niezliczonych czasopism naukowych coraz częściej są indeksowane w specjalistycznych bazach pozwalających na ich wyszukiwanie przy użyciu słów kluczowych, zapoznanie się ze streszczeniami, a nawet pełnymi wersjami tekstowymi. Stymuluje to kolejne badania w danym zakresie, jednocześnie pozwalając na szybką konfirmację wyników uzyskanych przez innych autorów. Dzięki temu rozwój nauki jest procesem niezwykle dynamicznym, a zastosowana metodyka i uzyskane wyniki są szybko sprawdzane, co prowadzi do dyskredytacji prac opisujących zafałszowane, błędnie przeprowadzone lub źle zinterpretowane badania.

Nauka zna wiele sytuacji, w których sensacyjne rezultaty badań okazały się wynikiem błędów metodologicznych. Przypadki te nie powinny być jednak zapominane, mogą bowiem być źródłem niezwykle cennej wiedzy. Ich analiza powinna uczyć zdrowego krytycyzmu wobec własnych rezultatów badań oraz dbałości o rzetelność i dokładność stosowanej metodyki, a także ostrożności w formułowaniu zbyt daleko idących wniosków.

Spektakularnego przykładu popełnionych błędów metodologicznych dostarcza praca opublikowana w 2011 roku na łamach amerykańskiego *Science*, czasopisma należącego do grona najbardziej prestiżowych w świecie nauki. Jej autorzy dowodzili istnienia nieznanego do tej pory szczepu bakterii, wyizolowanego z osadów dennych jeziora Mono (USA, Kalifornia), który nie tylko był w stanie wzrastać na pożywce bogatej w związki arsenu, ale również inkorporował ów pierwiastek w skład cząsteczek biologicznie czynnych, w tym kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA).

### Jeziro Mono jako obiekt badawczy

Jeziro Mono znajduje się we wschodnio-centralnej części Kalifornii, na wschód od pasma górskiego Sierra Nevada, pomiędzy Parkiem Narodowym Yosemite a granicą stanu Nevada. Uważane jest za najprawdopodobniej najstarszy naturalny zbiornik w Ameryce Północnej, powstały przynajmniej 760 tys. lat temu. Od lat przyciąga rzesze naukowców ze względu na specyficzne i trudne dla rozwoju życia biologicznego warunki fizyko-chemiczne, które panują w jego wodach. Charakteryzują się one alkalicznym pH, wysokim zasoleniem, a także wysokim stężeniem związków siarki i arsenu. W konsekwencji bioróżnorodność gatunkowa jeziora Mono jest bardzo ograniczona, a łańcuchy pokarmowe tu występujące są uproszczone – opierają się jedynie na planktonie roślinnym, endemicznym gatunku solowca (*Artemia monica*) i larwy muchówki (*Ephydra hians*). Brak ryb powoduje masowy rozwój tych dwóch ostatnich gatunków, jednocześnie stwarzając optymalne warunki pokarmowe dla rozwoju i bytowania ptactwa, dla którego jezioro Mono stanowi istotną w skali świata ostoję [Rzymski i in., 2012].

Naturalnie występująca wysoka zawartość arsenu w wodach i osadach dennych jeziora Mono była główną inspiracją dla kierowanych przez dr Felisę Wolfe-Simon (NASA Astrobiology Institute, USA) badań naukowych nad adaptacją mikroorganizmów do tak wymagających i niekorzystnych do rozwoju warunków środowiskowych oraz mechanizmami ich tolerancji. Arsen jest pierwiastkiem należącym do półmetali i choć

występuje naturalnie w skorupie ziemskiej, nie pełni w organizmach żywych (dotychczas poznanych) żadnych funkcji metabolicznych, jednocześnie będąc silnie dla nich toksyczny w stosunkowo niskich stężeniach [Manahan, 2006].

### **Hipoteza Wolfe-Simon. Czy inkorporacja arsenu w cząsteczkach DNA jest możliwa?**

Wolfe-Simon swoje zainteresowania naukowe skoncentrowała na mikrobiologii i poszukiwaniu nowych szlaków metabolicznych. W 2009 roku na łamach *International Journal of Astrobiology* w przeglądowej publikacji zatytułowanej „Did Nature Also Choose Arsenic?” postulowała, że przynajmniej teoretycznie możliwe jest, aby arsenian ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) był w stanie zastąpić fosforan ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) w biocząsteczkach<sup>1</sup> [Wolfe-Simon i in., 2009].

W 2010 roku internetowy serwis popularnonaukowy edytowany przez NASA ([www.astrobio.net](http://www.astrobio.net)) zamieścił artykuł donoszący o rozpoczęciu projektu badawczego kierowanego przez zespół Wolfe-Simon i opierającego się na analizie mikrobiologicznej osadu dennego pobranego z jeziora Mono. Wspomina on już dość odważnie, że badania te mogą okazać się przełomowe w dziejach nauki i doprowadzą do przynajmniej częściowego potwierdzenia hipotezy o istnieniu tzw. „biosfery cieni” (*shadow biosphere*). Wedle tej hipotezy, postawionej w 2005 roku przez astrobiologów Carol Cleland i Shelley Copley, niewykluczone jest istnienie alternatywnego mikrobiologicznego środowiska życia (biosfery), wykształconego na drodze równoległych ścieżek ewolucji, w którym procesy i molekuly biochemiczne radykalnie różnią się od obecnie znanych [Cleland, Copley, 2005; Cleland, 2009]. Wolfe-Simon należała do grupy zwolenników hipotezy „biosfery cieni” i dała temu wyraz w swoich wcześniejszych publikacjach naukowych [Davies i in., 2009; Oremland i in., 2009].

<sup>1</sup> Terminem tym określa się cząsteczki takie jak białka, kwasy nukleinowe, lipidy, węglowodany produkowane przez komórki żywych organizmów.

Artykuł Wolfe-Simon i in. pod odważnym tytułem „A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus” ukazał się na łamach *Science* pod koniec grudnia 2010 roku w wersji elektronicznej, drukiem natomiast dopiero w czerwcu 2011 roku. Autorzy informowali w nim, że udało im się wyizolować nieznaną dotychczas szczep bakterii na podstawie sekwencji 16S rRNA<sup>2</sup>, zaliczony do rodziny *Halomonadaceae*, skróto nazwany GFAJ-1<sup>3</sup>. Według nich szczep ten zdolny był do wzrostu na pożywce pozbawionej fosforu, a o wysokim stężeniu arsenu (40 mM). Komórki bakterii miały wbudowywać arsen w cząsteczki biologiczne takie jak węglowodany, lipidy, białka i, co najbardziej zaskakujące, również w DNA. Pośrednio świadczyć o tym miało wysokie stężenie arsenu w komórkach, bezpośrednio zaś wyniki analizy składu chemicznego wyizolowanego DNA techniką nanospektrometrii mas jonów wtórnych (NanoSIMS). Na tej podstawie autorzy pracy stwierdzili, że arsen musiał inkorporować do cząsteczek DNA w miejsce fosforu, stając się jednocześnie pierwiastkiem konstytuującym procesy życiowe bakterii GFAJ-1. Odkrycie to, choć dotyczyło szczepu bakteryjnego, mogło mieć daleko idące konsekwencje dla naukowych podwalin całej biochemii, wedle której życie organizmów opiera się na sześciu budulcowych i obligatoryjnie niezbędnych pierwiastków: wodoru, tlenu, węgla, siarki, azotu i fosforu.

Arsen, który w układzie okresowym znajduje się bezpośrednio pod fosforem, wykazuje do niego duże podobieństwo. Ma podobny promień atomowy, niemal identyczną elektroujemność i tworzy wiązania z tlenem o podobnej sile [Fraústo da Silva, Williams, 1997]. Wyjaśnia to, dlaczego w trakcie niektórych procesów biochemicznych arsen może zajmować

---

<sup>2</sup> W przeszłości badania filogenetyczne opierały się na analizie cech morfologicznych, biochemicznych i fizjologicznych. Nowym podejściem stało się zastosowanie w tym celu sekwencji nukleotydowej małej jednostki rybosomalnego RNA – 16S rRNA. Analiza tych sekwencji powszechnie wykorzystywana jest obecnie w badaniach taksonomicznych wszystkich organizmów żywych.

<sup>3</sup> Skrót ten nie pochodzi od nazwy gatunkowej, a jest rozwinięciem „Give Felisa a Job” („Dać pracę Felisie”). Nawiązuje on do sytuacji zawodowej Felisy Wolfe-Simon, która w momencie ukazania się publikacji w *Science* była czasowo zatrudniona w U.S. Geological Survey (USGS) i otrzymała grant Astrobiology Institute NASA na przeprowadzenie badań dotyczących biologicznego wykorzystania arsenu. Jej dalsze zatrudnienie uzależnione było od rezultatów pracy naukowej. W maju 2011 roku została zwolniona z USGS.

miejsce fosforu, doprowadzając tym samym do szkodliwych dla organizmów żywych efektów metabolicznych. To właśnie ta właściwość decyduje m.in. o jego toksyczności [Manahan, 2006]. Zastępując fosfor w cząsteczce DNA, arsen musiałby jednak występować w formie diestrowej, a ta z kolei charakteryzuje się wielokrotnie mniejszą stabilnością niż jej fosforanowy odpowiednik. Jak sugerują nieliczne prace oparte na zasadach kinetyki chemicznej, ekspozycja takich molekuł DNA na działanie wody spowodowałaby rozczepienie wiązań z udziałem arsenu w niespełna 0,1 sekundy [Fekry i in., 2011]. Cząsteczki takie byłyby więc skrajnie niestabilne, co wyklucza pełnienie przez nie prawidłowych funkcji biologicznych. Praca Wolfe-Simon nie podawała jednak potencjalnych mechanizmów, które mogłyby ustabilizować tak zbudowaną cząsteczkę DNA. Pojawiły się one dopiero w odpowiedzi autorów na krytyczne uwagi do pracy [Wolfe-Simon i in., 2011].

Istnienie organizmu, którego wzrost i funkcje życiowe nie są uzależnione od fosforu, a biologiczna rola substytuowana jest przez arsen, mogłoby również świadczyć o alternatywnej ścieżce ewolucyjnej biegnącej równoległe na kuli ziemskiej. Jednocześnie wykluczałoby hipotezę, według której życie biologiczne na innych planetach jest możliwe tylko wtedy, gdy warunki chemiczne na nich panujące są zbliżone do ziemskich.

Można by więc przypuszczać, że autorzy pracy o potencjalnie tak dużym wpływie na obecny stan wiedzy poddadzą krytycznej analizie wyniki swojej pracy przed ich upublicznieniem. Postąpili jednak inaczej i, w porozumieniu z Narodową Agencją Aeronautyki i Przestrzeni Kosmicznej Stanów Zjednoczonych (NASA), ogłosili je na konferencji transmitowanej przez mass media (i zaanonsowanej cztery dni wcześniej jako „przełomowej w dziejach nauki”), zanim jeszcze zostały opublikowane w jakiegokolwiek formie na łamach *Science* (aczkolwiek już po decyzji o zaakceptowaniu manuskryptu). Należy wyraźnie podkreślić, że środowisko naukowe niemal zawsze wykorzystuje recenzowane czasopisma naukowe jako medium „pierwszego kontaktu” w przekazywaniu informacji o wynikach przeprowadzonych badań. Zrozumiałe więc, że wydarzenie odbywające się w entuzjastycznej atmosferze i w blasku fleszy, podczas którego nie poddano otrzymanych wyników badań jakiegokolwiek krytyce, a wręcz

spekulowano, że są one pośrednim dowodem na istnienie życia pozaziemskiego, choć przyniosło zamierzony skutek – międzynarodowy rozgłos – wzbudziło negatywny odzew w środowisku naukowym.

### **Błędy w metodyce i interpretacji wyników**

Ze względu na niezwykłość odkryć opisanych przez Wolfe-Simon i współpracowników redaktorzy *Science* celowo zdecydowali się opóźnić druk manuskryptu o pół roku od momentu jego publikacji w wersji elektronicznej. Umożliwiło to innym grupom badawczym, głównie mikrobiologom i biochemikom, zapoznanie się z jego treścią i sformułowanie krytycznych komentarzy, których łącznie opublikowano osiem. W szczególności podważały one hipotezę o możliwości stabilizacji arsenu w cząsteczce DNA. Hipoteza ta była niezgodna z podstawowymi prawami chemii. Krytykując ją, sugerowano możliwość zanieczyszczenia izolatu DNA i medium hodowlanego związkami fosforu. Podawano również inne możliwe wyjaśnienia wzrostu w warunkach wysokiego stężenia arsenu, których autorzy publikacji nie uwzględnili w dyskusji wyników [Cotner, Hall, 2011; Benner, 2011; Schoepp-Cothenet, 2011; Foster, 2011; Borhani, 2011].

Badania empiryczne nauk ścisłych powinny opierać się na odpowiedniej i powtarzalnej metodyce, w związku z czym wymogiem publikacji naukowej w recenzowanym czasopiśmie winno być jak najdokładniejsze opisanie zastosowanych technik i procedur. Niestety, praca Wolfe-Simon i in., pomimo publikacji w jednym z najbardziej prestiżowych czasopism naukowych na świecie, tego wymogu nie spełniała. W opisie metodyki brak tak podstawowej informacji, jak nazwa producenta arsenianu dodanego do medium hodowlanego oraz stopnia jego czystości. Jest to o tyle zdumiewające, że nawet w przypadku mniej prestiżowych czasopism autorzy proszeni są o obowiązkowe podanie przynajmniej producenta, a często również miejsca produkcji wszystkich odczynników chemicznych zastosowanych na każdym etapie badań. Umożliwia to innym badaczom odtworzenie procedur doświadczalnych, a jednocześnie jest ważną informacją o czystości danego odczynnika chemicznego. Komercyjnie dostęp-

nie odczynniki chemiczne, również cz.d.a. (czyste do analiz), wykazują się konkretnym stopniem czystości, który maksymalnie sięga 99%. Pozostały 1% stanowią natomiast zanieczyszczenia, których skład wymieniany jest najczęściej na etykiecie. Dr David Sanders i jego koledzy z Uniwersytetu Purdue (Indiana, USA) przeprowadzili dokładną analizę dostępnych na amerykańskim rynku arsenianów (metodą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprężonej indukcyjnie, ICP-MS) i stwierdzili w każdym z nich zanieczyszczenie fosforanami [Davies, 2012]. Wolfe-Simon i in. wskazali, co prawda, iż średni udział fosforu w pożywce z dodatkiem arsenu i bez dodatku fosforu (As+/P-) oraz pożywce kontrolnej bez dodatku obu tych pierwiastków (As-/P-) wynosił 3,1  $\mu\text{M}$  i wynikał z obecności fosforu w innych składnikach pożywki (np. agarze, glukozie itd.), jednak dopiero po zapoznaniu się z dołączonym do publikacji materiałem dodatkowym (*supplementary data*) okazuje się, że autorzy wykonali jedynie dwukrotny pomiar zawartości fosforu w obu wymienionych powyżej typach pożywek, która w As+/P- wynosiła odpowiednio 3,7  $\mu\text{M}$  i  $< 0,3 \mu\text{M}^4$ , a w As-/P- (kontrolnej) odpowiednio 2,9  $\mu\text{M}$  i 2,7  $\mu\text{M}$ . Nasuwa się więc pytanie: skąd taki rozrzut pomiędzy zawartością fosforu w pożywce As+/P- (rezultat niedokładnego przygotowania?) i czy w związku z tym wykonanie tylko dwóch powtórzeń takiej analizy jest wystarczające dla publikacji opisującej tak sensacyjne wyniki badań? Ponadto dowodzi to, że pożywka określona przez autorów jako „pozbawiona fosforu” w istocie mogła zawierać pewną jego ilość, skoro podczas jednego pomiaru określono ją na 3,7  $\mu\text{M}$ .

Warto również zwrócić uwagę, że podana przez autorów średnia zawartość fosforu w pożywkach As+/P- i As-/P-, która miała rzekomo wynosić 3,1  $\mu\text{M}$ , została błędnie obliczona. Z analizy załączonego do pracy materiału dodatkowego wynika bowiem, że uzyskano ją z trzech pomiarów, nie uwzględniając tego, w którym stężenie fosforu wynosiło  $< 0,3 \mu\text{M}$ . W rzeczywistości więc średnia arytmetyczna zawartości pierwiastka w tych pożywkach była o wiele niższa, jednak nie sposób jej podać za pomocą tego typu miary statystycznej. Ten błąd nie ma, być może, kluczowego znaczenia dla interpretacji treści pracy, może jednak

<sup>4</sup> Poniżej progu pomiarowego urządzenia analitycznego.

stanowić punkt wyjścia dla podważenia staranności i poprawności opracowania reszty wyników i ich odpowiedniej interpretacji.

Powyższe rozważania wyraźnie wskazują więc, że medium hodowlane zastosowane w badaniach Wolfe-Simon i in. nie było absolutnie wolne od fosforanów. To z kolei wspiera hipotezę, że badany szczep GFAJ-1 jest w stanie wykorzystywać do wzrostu śladowe ilości fosforu, jednocześnie posiadając niezwykle efektywne mechanizmy tolerancji arsenianu. Autorzy pracy zauważają, że w obrazie transmisyjnego mikroskopu elektronowego komórki bakterii hodowane na pożywce arsenowej, w przeciwieństwie do komórek z pożywki fosforanowej, charakteryzowały się większą objętością spowodowaną rozrostem wakuoli. Pozostawiają jednak tę obserwację bez jakiegokolwiek dalszej dyskusji. To kolejny zdumiewający aspekt tej publikacji, zważywszy na funkcję, jaką pełnią wakuole w komórkach bakteryjnych (jeżeli w ogóle występują). Jest nią bowiem magazynowanie substancji o toksycznym działaniu na struktury cytoplazmy [Schulz-Vogt, 2006]. Możliwe więc, że jednym z mechanizmów tolerancji tak wysokiego stężenia arsenu w otaczającym środowisku przez komórki GFAJ-1 jest kumulacja arsenu właśnie w wakuolach. Badania przeprowadzone przez Takeuchi i in. [2007] potwierdzają, że szczepy bakterii należące do rodziny *Halomonadaceae* (a więc tej samej co GFAJ-1) zdolne są do wewnątrzkomórkowej akumulacji istotnych ilości arsenu. Ponadto z treści pracy wynika, że materiał DNA izolowano z komórek znajdujących się w spoczynkowej fazie wzrostu<sup>5</sup>, a ta z kolei wymaga zdecydowanie mniejszych nakładów fosforu niż faza wzrostu aktywnego [Madigan, Martinko, Parker, 2000]. Warto również zwrócić uwagę, że Wolfe-Simon i in. nie wykonali analizy drugiego z kwasów nukleinowych – RNA<sup>6</sup> – co uzasadnili prawdopodobnym jego brakiem w komórkach hodowanych na podłożu z arsenem. Nie dociekali jednak przyczyn tego zjawiska, choć mogło być ono spowodowane „oszczędzaniem” fosforu do podtrzymania

<sup>5</sup> U bakterii jest to faza, w której nie zachodzą podziały komórkowe. Okres adaptacji komórki do warunków środowiskowych, trwający w zależności od gatunku od kilku do kilkunastu godzin.

<sup>6</sup> Kwas rybonukleinowy. Od DNA różni się występowaniem cukru rybozy zamiast deoksyrybozy oraz (najczęściej) brakiem zasady tyminowej zastępowanej w nim uracylową. Przeważnie przyjmuje formę jednoniciową.



procesów życiowych i tym samym inhibicją syntezy RNA w komórkach GFAJ-1.

Jak już wcześniej wspomniano, najbardziej odważnym z postawionych w pracy wniosków była hipoteza o inkorporacji arsenu w cząsteczkę DNA w miejsce fosforu. Wnioski te oparto na wynikach analizy zawartości arsenu za pomocą techniki NanoSIMS w wyizolowanym z komórek DNA. Izolacja DNA z komórek wzrastających na podłożu bogatym w arsen powinna być więc wykonana z zachowaniem największej dbałości o czystość pozyskiwanego materiału. Procedura zastosowana przez Wolfe-Simon i in. opierała się na standardowej metodzie wykorzystującej mieszaninę fenolu i chloroformu. Pierwszy umożliwia rozdzielanie DNA od związanych z nimi białek, drugi natomiast ułatwia rozdzielanie fazy wodnej i organicznej, prowadząc tym samym do inaktywacji i usunięcia enzymów [Sambrook i wsp., 1989]. W kolejnym etapie autorzy przeprowadzali zagęszczenie DNA poprzez wytrącanie cząsteczek etanolem i odwirowywali osad. Na tym etapie nie można jednak wykluczyć zanieczyszczenia precypitatu przez drobne cząsteczki pochodzące z cytoplazmy, dlatego też wytrącone cząsteczki należy dwukrotnie przemyć etanolem, następnie pozostawić w temperaturze pokojowej w celu odparowania składników ciekłych z próbki. Ten standardowy etap w metodyce izolacji i puryfikacji DNA został jednak przez autorów pominięty bez podania jakiegokolwiek przyczyny. Pozyskane w wyżej opisany sposób cząsteczki DNA przekładano natomiast na skrawki żelu agarozowego i po wysuszeniu poddawano analizie. Ponownie pominięto standardowy etap w procedurze polegający na usunięciu skrawków żelu bezpośrednio przed pomiarem. Przy tak rażącym braku odpowiedniej puryfikacji materiału nie sposób wykluczyć zanieczyszczenia izolatu DNA arsenianami obecnymi w innych strukturach komórkowych lub też w skrawkach żelu. Jednocześnie zastosowana technika pomiarowa NanoSIMS, choć jest precyzyjną metodą analityczną, może dostarczać jedynie informacji o poziomie danego pierwiastka w badanej próbce, a nie o jego miejscu w strukturach chemicznych. Opierając się tylko i wyłącznie na pomiarach tą techniką, nie można więc wprost stwierdzić inkorporacji arsenu w cząsteczce DNA. Sformułowanie takiego wniosku w przypadku Wolfe-Simon i in. było zatem poważną nadinterpretacją. Można tylko domniemywać, dlaczego autorzy

pracy nie skorzystali z metod umożliwiających stwierdzenie konkretnych pierwiastków w biocząsteczkach, takich jak celowana spektrometria mas [Katsnelson, 2010]. Wolfe-Simon i in. nie podają również, ile powtórzeń izolacji i analizy NanoSIMS wykonali, choć taka informacja należy najczęściej do podstawowych wymogów w recenzowanych czasopismach nauk ścisłych.

Autorzy pracy, a przede wszystkim Felisa Wolfe-Simon, główna autorka artykułu, zmuszeni byli odnieść się do krytycznych uwag. W swojej odpowiedzi na łamach *Science* Wolfe-Simon zastrzegła jednak, że odnosić będzie się tylko i wyłącznie do krytyki wyrażonej na łamach recenzowanych czasopism naukowych jako jedyne medium pozwalającego na moderację dyskusji na odpowiednim naukowym poziomie. Takie orzeczenie zostało przez wielu obserwatorów uznane za niedorzeczne, zważywszy na fakt, że to właśnie Wolfe-Simon zdecydowała się w pierwszej kolejności zaanonsować swoje wyniki badań na telewizyjnej konferencji [Katsnelson, 2010]. Autorka postanowiła jednak udostępnić wszystkim zainteresowanym jednostkom naukowym kultury GFAJ-1 celem prowadzenia dalszych badań bądź weryfikacji wyników uzyskanych przez jej zespół. Szczepy zostały pozyskane m.in. przez naukowców z Politechniki Federalnej w Zurychu oraz z Uniwersytetu Princeton (USA).

### Hipotezy konkurencyjne

Wyniki badań obu wspomnianych wyżej jednostek badawczych zostały opublikowane w czerwcu 2012 roku również na łamach *Science*. Praca zespołu Erb i wsp. [2012] skupiła się między innymi na zachowaniu jak największego stopnia czystości medium hodowlanego; osiągnięto ostatecznie w każdej próbie poziom fosforu  $< 0,3 \mu\text{M}$ . W warunkach tych przy obecności 40 mM arsenianu nie obserwowano jakiegokolwiek wzrostu komórek do momentu dostarczenia do medium niewielkich ilości fosforu. Jak określono w badaniach Erb i in. [2012], bakterie GFAJ-1 zdolne były do wzrostu przy dostępności  $1,7 \mu\text{M}$  fosforu w pożywce, a więc nawet mniejszej niż jego średnia zawartość w pożywce As+/P- zastosowanej

w pracy Wolfe-Simon i in. Na tej podstawie autorzy wyciągnęli oczywisty wniosek, że pomimo wysokiej odporności na arsen wzrost bakterii GFAJ-1 jest obligatoryjnie zależny od fosforu. Z kolei druga praca, Reaves i in. [2012] wykazała, że komórki GFAJ-1 wykazują wzrost na pożywce pozbawionej arsenu, natomiast zawierającej zaledwie 0,5  $\mu\text{M}$  fosforu. Wykluczało to więc hipotezę, że arsen jest potrzebny do wzrostu komórkom tego szczepu i było kolejnym potwierdzeniem o niewielkim zapotrzebowaniu GFAJ-1 na fosfor względnie o istnieniu mechanizmów radzenia sobie z jego niedoborem.

Wolfe-Simon w swojej odpowiedzi na krytyczne komentarze postulowała, że funkcje ochronne przed hydrolizą tak niestabilnych cząsteczek, jakimi byłyby cząsteczki DNA, w których arsen substytuuje fosfor, mogą pełnić specyficzne białka. Swoją teorię podparła jedynie domniemaniem, nie potwierdzonym żadnymi danymi empirycznymi. Tym niemniej, jeżeli takie białka miałyby istnieć i pełnić wskazaną funkcję, to prawidłowa izolacja i puryfikacja DNA powinna je całkowicie usuwać z materiału badawczego. W związku z tym Reaves i in. eksponowali wyizolowane przez siebie cząsteczki DNA (pozyskane z komórek hodowanych na podłożach As+/P- i As-/P+) na działanie wody bezpośrednio po ich puryfikacji i dwa miesiące po (przechowując je w 4°C), w żadnym przypadku nie zaobserwowali jednak zjawiska hydrolizy DNA. Stosując metodę chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC/MS), Reaves i in. wykazali natomiast, że izolat DNA otrzymany w identyczny sposób jak w badaniach Wolfe-Simon i in. zawierał anion wolnego arsenianu ( $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ) w stężeniu porównywalnym z poziomem arsenu w DNA podanym w publikacji będącej tematem dyskusji. Oczyszczenie poprzez trzykrotne przemycie wodą destylowaną powodowało jednak spadek zawartości arsenu poniżej wykrywalnego poziomu. Warto również wspomnieć, że analiza LC/MS, w przeciwieństwie do NanoSIMS, nie wymagała umieszczenia izolowanego DNA na skrawkach żelu agarozowego. Dzięki temu wykluczono możliwość zanieczyszczenia prób przez związek w nim obecny. Wyniki przeprowadzonych przez Reaves i in. analiz sugerują, że materiał DNA poddany analizie przez Wolfe-Simon nie został starannie oczyszczony i był zanieczyszczony arsenem oddziaływującym niekowalencyjnie z DNA i pochodzącym najprawdopodobniej z medium hodow-

lanego (dlatego można było go łatwo usunąć poprzez przemycie izolatu wodą). Brak arsenu w cząsteczkach DNA potwierdzili również Erb i in. metodą ICP-MS, wykazując zbliżoną zawartość fosforu w cząsteczkach, niezależnie czy GFAJ-1 hodowany był na medium zawierającym, czy nie zawierającym arsenu.

Z kolei inni badacze, na łamach *Journal of Biological Chemistry*, wykorzystując komórki bakterii *Escherichia coli*, wykazali że wysokie stężenie arsenu powoduje masowy rozpad rybosomów w cytoplazmie. W wyniku tego dochodzi do spowolnienia wzrostu kultur bakterii, ale jednocześnie do wewnątrzkomórkowego uwolnienia zapasów fosforu wchodzącego w skład tych struktur, który może być wówczas wykorzystany do utrzymania funkcji życiowych komórki. To zjawisko zostało zasugerowane jako możliwy mechanizm tolerancji GFAJ-1 na wysokie stężenia arsenu przy jednoczesnej niewielkiej dostępności fosforu w pożywce [Basturea i wsp., 2012].

Prace Erb i wsp. [2012] oraz Reaves i wsp. [2012] w prosty, metodyczny i staranny sposób opisują zastosowane metody, podają liczbę powtórzeń, wykorzystują alternatywne techniki analityczne. Obie podkreślają, że GFAJ-1 jest szczepem bakterii odpornym na wysokie stężenia arsenu, którego rozwój uzależniony jest jednak m.in. od fosforu. Obie wydają się być ważnym podsumowaniem błędów popełnionych w pracy Wolfe-Simon i in., które doprowadziły jej autorów do sformułowania nieprawidłowych wniosków.

### **Problem kontroli wyników badań naukowych**

W świetle przedstawionych argumentów nie ulega wątpliwości, że publikacja Wolfe-Simon i in. nie była wolna od błędów niemal na każdym etapie pracy badawczej: opracowania metodyki, jej zastosowania, obliczeń matematycznych i interpretacji otrzymanych wyników. Nietrudno też oprzeć się wrażeniu, że pewne, niewygodne z punktu widzenia oczekiwań naukowych, aspekty umyślnie pominięto, inne z kolei nie zostały sumiennie przedyskutowane. Autorzy pracy nie wykazali się należyty krytycyzmem i pokorą względem rezultatów własnych badań. Przeciwnie, prze-

konani o swojej nieomyślności, postanowili przenieść uzyskane wyniki na płaszczyznę dyskusji popularnonaukowej, zanim zostały opublikowane w recenzowanym czasopiśmie naukowym. W efekcie o ich krytyce wyrażonej w publikacjach autorstwa dwóch niezależnych zespołów badawczych informowały codzienne dzienniki, co nie należy do częstej praktyki w przypadku badań naukowych.

Oczywiste wydaje się, że największą odpowiedzialność za taką sytuację ponosi każdy z dwunastu autorów pracy. Nie powinno również budzić zdumienia, że największa krytyka dotyka pierwszego autora, czyli Felisę Wolfe-Simon. Jednak czy autorzy są jedynymi, których obarczyć można winą za opublikowanie pracy z tak licznymi niedoskonałościami, a wręcz błędami metodologicznymi? Czy winy nie ponoszą również niezależni i anonimowi recenzenci pracy, których w przypadku manuskryptów zgłaszanych do *Science* deleguje się zazwyczaj trzech? Zastanawiający jest też niezwykle krótki okres między wysłaniem manuskryptu do redakcji a jego ostateczną akceptacją do publikacji, który wynosił zaledwie dwa miesiące (1.09–8.11.2010). Dla porównania okres ten dla pracy Reaves i in. [2012] wynosił pięć, a dla pracy Erb i in. [2012] – sześć miesięcy. Wydaje się sprawą oczywistą, że recenzenci pracy Wolfe-Simon i in. [2011] powinni przynajmniej zasugerować uzupełnienie opisu zastosowanej metodyki, zastosowanie dokładniejszych metod izolacji i oczyszczenia DNA oraz alternatywnych technik pomiarowych. Po analizie treści publikacji Wolfe-Simon i in. [2011] nie sposób uwierzyć, że recenzenci byli w stanie tak poważne niedopatrzona pominąć w swojej ocenie. *Science* nie upublicznia jednak treści recenzji nadsyłanych manuskryptów (jak mają w zwyczaju niektóre inne czasopisma), w związku z czym nie jesteśmy w stanie stwierdzić, o jaką decyzję wnioskowali w sprawie rzezczonej publikacji. Znane są bowiem przypadki decyzji redakcji czasopisma o opublikowaniu pracy naukowej pomimo otrzymania negatywnych opinii od recenzentów, i odwrotnie – odrzucenia manuskryptu, choć praca otrzymała pozytywne oceny. Wydaje się więc, że w przypadku pracy, która formułuje tak spektakularne z punktu widzenia dotychczasowej wiedzy naukowej wnioski, powinna zostać zachowana najwyższa ostrożność ze strony redakcji *Science*. Warto w tym miejscu wspomnieć przypadek publikacji francuskiego immunologa Jacques'a Benveniste'a na ła-

mach *Nature*, który w 1988 roku opisał kontrowersyjne doświadczenia wpływu ekstremalnie wysokich rozcieńczeń immunoglobuliny IgE w wodzie (do  $10^{-120}$ ) na aktywność komórek krwi – bazofoili. Benveniste i jego zespół wykazał, że aktywność substancji była najwyższa przy rozcieńczeniu  $10^{-3}$ , potem z każdym kolejnym rozcieńczeniem malała aż do rozcieńczenia  $10^{-9}$ , począwszy od którego obserwowano wzrost aktywności immunoglobuliny. Aktywność IgE Benveniste i in. wykazali nawet dla rozcieńczenia  $10^{-120}$ . Zasugerowali więc, że molekuly wody zdolne są do gromadzenia wcześniej dostarczonych im informacji, przechowywania, a następnie ich przenoszenia. Zjawisko to, nazwane później „pamięcią wody”, miało być naukowym dowodem na istnienie homeopatii [Davenas i wsp., 1988]. Publikacja Benveniste’a została opatrzona zastrzeżeniem ze strony redakcji czasopisma zatytułowanym „Kiedy wierzyć w niewiarygodne” („*When to believe the unbelievable*”), w którym przeczytać możemy m.in. „Czytelnicy poniższej publikacji mogą dzielić niedowierzenie wyrażone przez wielu recenzentów. [...] Nie ma fizycznych podstaw takiej aktywności. [...] *Nature* zdecydowała się na zorganizowanie niezależnego zespołu badawczego w celu powtórzenia opisanych eksperymentów” [Maddox, 1988]. Publikacja Wolfe-Simon i in. (2011) aż prosi się o podobne reakcje ze strony redakcji *Science*.

Swój udział w naukowym fiasko Wolfe-Simon ma również instytucja finansująca przeprowadzone i opisane badania – NASA. To za jej pośrednictwem zorganizowano bowiem konferencję z udziałem pierwszego autora, która przy użyciu języka popularnonaukowego (niemal kolokwialnego) tłumaczyła, jak poważne konsekwencje dla nauki i poznania życia biologicznego (w tym również pozaziemskiego) mają przeprowadzone badania nad GFAJ-1. Należy wyraźnie zaznaczyć, że nic nie powinno stać na przeszkodzie upowszechniania wiedzy zdobywanej poprzez badania naukowe, wysoce kontrowersyjne jednak wydaje się ich upublicznianie poprzez mass media, zanim zostaną opublikowane w fachowym, recenzowanym czasopiśmie naukowym i potwierdzone przez innych badaczy. Z pewnością taka sytuacja służy rozgłosowi, trudno jednak się zgodzić, by forma „medialnego szumu” przystawała badaczom. W rezultacie tych działań autorzy pracy, a zwłaszcza Wolfe-Simon, zmuszeni byli udzielać licznych wywiadów i brać udział w audycjach telewizyjnych mających charakter

z pogranicza programu rozrywkowego. Cena, którą przyszło im zapłacić, okazała się bardzo wysoka. Stacje telewizyjne i prasa bowiem z podobnym entuzjazmem informowały o przełomowym odkryciu, co o jego de-tronizacji.

Wydaje się więc, że w tym przypadku zawiedli nie tylko autorzy publikacji, których chęć sławy okazała się silniejsza niż krytycyzm wobec otrzymanych wyników. Zawiodła również instytucja sprawująca pieczę nad badaniami, chcąc naukowcom nadać status „medialnych gwiazd” oraz „system obronny” sprawdzania informacji naukowej w postaci zespołu recenzentów i redaktorów czasopisma *Science*.

### Podsumowanie

Pomimo że praca Wolfe-Simon i in. [2011] jest przykładem wielu zaniedbań metodologicznych i w konsekwencji błędnej interpretacji otrzymanych wyników, nie może zostać usunięta z baz naukowych, a jej treść powinna pozostać dostępna dla zainteresowanych. Po pierwsze, w niespełna dwa lata doczekała się ponad 60 cytowań w innych publikacjach naukowych. Po drugie, Wolfe-Simon utrzymuje, że ma zamiar kontynuować badania nad komórkami GFAJ-1 z uwagi na hipotetyczną możliwość wykorzystywania arsenu jako składnika cząsteczek biologicznych. Niewykluczone więc, że sprawa ta będzie przedmiotem kolejnych dyskusji naukowych. Ponadto nie należy zapominać, że praca Wolfe-Simon i in. [2011] opisuje nowy szczep bakterii o wysokiej tolerancji na obecność arsenu w środowisku, co zostało potwierdzone doświadczalnie i tłumaczy, dlaczego występuje on w osadach jeziora Mono. Publikacja ta jest również dobrym przykładem, jakich błędów powinni wystrzegać się inni badacze, a cała sprawa wyraźnie podkreśla ogromne znaczenie zachowania stosownej ostrożności i krytyki wobec rezultatów swojej pracy naukowej. Jest to szczególnie ważne w przypadku badań, których wyniki podważają obecny stan wiedzy. Staranna kontrola metod i warunków doświadczalnych, liczne powtórzenia eksperymentów, konsultacje z innymi badaczami i ostrożność przy formułowaniu końcowych wniosków, mogą ustrzec badaczy przed wytworzeniem naukowego artefaktu.



### Bibliografia

- Basturea G.N., Harris T.K., Deutscher M.P., (2012), „Growth of a Bacterium that Apparently Uses Arsenic Instead of Phosphorus is a Consequence of Massive Ribosome Breakdown”, *Journal of Biological Chemistry*, 287, s. 28816–28819.
- Benner S.A., (2011), „Comment on „A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus””, *Science*, 332, s. 1149–c.
- Borhani D.W. (2011), „Comment on *A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus*”, *Science*, 332, s. 1149–e.
- Cleland C.E., (2009), „Epistemological Issues in the Study of Microbial Life: Alternative Biospheres”, *Studies in the History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 38, s. 847–861.
- Cleland C.E., Copley S.D., (2005), „The Possibility of Alternative Microbial Life on Earth”, *International Journal of Astrobiology*, 4, s. 165–173.
- Cotner J.B., Hall E.K., (2011), „Comment on *A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus*”, *Science*, 332, s. 1149–f.
- Davenas E., Beauvais F., Amara J., Oberbaum M., Robinzon B., Miadonna A., Tedeschi A., Pomeranz B., Fortner P., Belon P., Sainte-Laudy J., Poitevin B., Benveniste J., (1988), „Human Basophil Degranulation Triggered by Very Dilute Antiserum Against IgE”, *Nature*, 333, s. 816–818.
- Davies P.C.W., Benner S.A., Cleland C.E., Lineweaver C.H., McKay C.P., Wolfesimon F., (2009), „Signatures of a Shadow Biosphere”, *Astrobiology*, 9, s. 241–249.
- Davies, P. (2012), „Despite Refutation, Science Arsenic Life Paper Deserves Retraction, Scientist Argues”, <http://retractionwatch.wordpress.com/2012/07/09/despite-refutation-science-arsenic-life-paper-deserves-retraction-scientist-argues> [dostęp 20.04.2013].
- Erb T.J., Kiefer P., Hattendorf B., Günther D., Vorholt J.A., (2012), „GFAJ-1 Is an Arsenate-Resistant, Phosphate-Dependent Organism”, *Science*, 337, s. 467–470.
- Fekry M.I., Tipton P.A., Gates K.S. (2011), „Kinetic Consequences of Replacing the Internucleotide Phosphorus Atoms in DNA with Arsenic”, *ACS Chemical Biology*, 6, s. 127–130.
- Foster P.L., (2011), „Comment on *A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus*”, *Science*, 332, s. 1149–i.
- Fraústo da Silva J.J.R., Williams R.J.P., (1997), *The Biological Chemistry of the Elements: the Inorganic Chemistry of Life*, Oxford, Oxford University Press.
- Katsnelson A., (2010), „Microbe Gets Toxic Response”, *Nature*, 468, s. 741.
- Maddox J., (1988), „When to Believe the Unbelievable”, *Nature*, 333, s. 787.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., (2000), „Microbial growth”, [w:] *Brock Biology of Microorganisms*, [ed.] P.F. Corey, New Jersey, Prentice-Hall, s. 135–162.
- Manahan S.E., (2006), *Toksykologia środowiska*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 285.



- Oremland R.S., Saltikov C.W., Wolfe-Simon F., Stolz J.F., (2009), „Arsenic in the Evolution of Earth and Extraterrestrial Ecosystems”, *Geomicrobiology Journal*, 26, s. 522–536.
- Reaves M.L., Sinha S., Rabinowitz J.D., Kruglyak L., Redfield R.J., (2012), „Absence of Detectable Arsenate in DNA from Arsenate-Grown GFAJ-1 Cells”, *Science*, 337, s. 470–473.
- Redfield, R.J., (2011), „Comment on *A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus*”, *Science*, 332, s. 1149–h.
- Rzyski P., Poniedziałek B., Klimaszuk P., (2012), „Jeziro Mono – fenomen wart ocalenia”, *Ekonatura*, 1, s. 23–25.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schoepp-Cothenet B., Nitschke W., Barge L.M., Ponce A., Russell M.J., Tsapin A.I., (2011), „Comment on *A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus*”, *Science*, 332, s. 1149–d.
- Schulz-Vogt H.N., (2006), „Vacuoles”, [w:] *Inclusions in Prokaryotes*, [ed.] J.M. Shively, Berlin, Springer-Verlag, s. 295–298.
- Takeuchi M., Kawahata H., Gupta L/P., Kita N., Morishita Y., Ono Y., Komai T., (2007), „Arsenic Resistance and Removal by Marine and Non-Marine Bacteria”, *Journal of Biotechnology*, 127, s. 434–442
- Wolfe-Simon F., Davies P.C.W., Anbar A.D., (2009), „Did Nature Also Choose Arsenic?”, *International Journal of Astrobiology*, 8, s. 69–74.
- Wolfe-Simon F., Switzer Blum J., Kulp T.R., Gordon G.W., Hoefft S.E., Pett-Ridge J., Stolz J.F., Webb S.M., Weber P.K., Davies P.C.W., Anbar A.D., Oremland R.S., (2011), „A Bacterium that Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus”, *Science*, 332, s. 1163–1166.
- Wolfe-Simon F., Switzer Blum J., Kulp T.R., Gordon G.W., Hoefft S.E., Pett-Ridge J., Stolz J.F., Webb S.M., Weber P.K., Davies P.C.W., Anbar A.D., Oremland R.S., (2011), „Response to Comments on *A Bacterium That Can Grow Using Arsenic Instead of Phosphorus*”, *Science*, 332, s. 1149–j.

### Could Life Be Based on Arsenic?

#### Mistakes in GFAJ-1 Bacteria Investigations

ABSTRACT. Life constitutes of six essentials elements: carbon, hydrogen, carbon, nitrogen, sulphur, phosphorus. However, „shadow biosphere” theory assumes the existence of alternative life pathway that uses radically different biochemical and molecular processes than currently known life. Paper by Wolfe-Simon et al. (2011) published in high-profiled journal *Science* described bacterial species GFAJ-1 with ability not only to maintain life processes in high extracellular concentrations of arsenic but also to substitute phosphorus with arsenic in DNA. This report caused a number controversies

related to applied methodology and interpretation of obtained results. Case of Wolfe-Simon et al. publication demonstrates the important role which is played by criticism against obtained results as well as concern for correction of applied methods.

KEY WORDS: arsenic, DNA, methodological errors, arsenic life

dr Piotr Rzymski, dr Barbara Poniedziałek, Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań, rzymskipiotr@gmail.com