

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Manca KOVAČ

**VPLIV ŽIVEGA SREBRA NA POJAVLJANJE GENA *merA* PRI
BAKTERIJSKIH ZDRUŽBAH V REKI IDRJCI**

DIPLOMSKO DELO

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ

**MERCURY INFLUENCE ON PRESENCE OF GENE *merA* ON
BACTERIAL COMMUNITIES IN IDRJCA RIVER**

GRADUATION THESIS

UNIVERSITY STUDIES

Ljubljana, 2008

POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biologijo mikroorganizmov Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter na Inštitutu za fizikalno biologijo v Grosuplju.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija biologija je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde Cimerman, za somentorja dr. Aleša Lapanje in za recenzentko prof. dr. Ano Plemenitaš.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman

Somentor: dr. Aleš Lapanje

Recenzentka: prof. dr. Ana Plemenitaš

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nina GUNDE CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Aleš LAPANJE
Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o.
Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research,
an Institute of the ETH Board

Članica: prof. dr. ANA PLEMENITAŠ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora: 27.8.2008

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Manca KOVAČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 579.25:579.68:546.49(497.4Idrijca)(043.2)=163.6
KG Idrijca / živo srebro / bakterijske združbe / qPCR
AV KOVAČ, Manca
SA GUNDE CIMERMAN, Nina (mentorica) / LAPANJE, Aleš (somentor) / PLEMENITAŠ, Ana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2008
IN VPLIV ŽIVEGA SREBRA NA POJAVLJANJE GENA *merA* PRI BAKTERIJSKIH ZDRUŽBAH V REKI IDRJICI
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XI, 47 str., 2 preg., 22 sl., 0 pril., 54 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Živo srebro (Hg) je kovina, ki je že v zelo nizkih koncentracijah toksična za žive organizme. Organizmi so razvili različne načine tolerance in odpornosti na živo srebro. Odpornost na živo srebro je pri bakterijah kodirana z *mer* operonom. Znotraj *mer* operona leži gen *merA*, ki kodira encim živo srebrovo reduktazo, ki reducira Hg²⁺ v hlapno obliko Hg⁰. Bakterije s transformacijami živega srebra pomembno pripomorejo h kroženju Hg v naravi in njegovi biološki dostopnosti višjim organizmom. V raziskavi smo z metodo polimerazne verižne reakcije v realnem času (qPCR) ugotavljali prisotnost gena *merA* pri bakterijskih združbah vzdolž reke Idrijce. Iz količine gena *merA* lahko sklepamo, kakšna je onesnaženost območja z živim srebrom. Rezultati so pokazali, da se količina gena *merA* vzdolž reke sezonsko in lokacijsko spreminja. Najnižje količine so bile izmerjene na referenčnem mestu nekoliko pod izviro reke, najvišje pa v Spodnji Idriji, v bližini katere se nahaja nekoč delujoča talilnica cinobaritne rude. Nekoliko višje količine iskanega gena se pojavljajo še v Idriji in Želinu. Količina gena se od Spodnje Idrije po toku navzdol zmanjšuje. Visoka ločljivost qPCR metode za določanje gena *merA* v primerjavi z do sedaj znanimi kemijskimi metodami pomeni večjo relevantnost te metode pri ekosistemskih raziskavah in omogoča meritve gradientnih nihanj v koncentraciji specifičnega gena. Tako smo v okolici vira onesnaženja na pol kilometra natančno določili stopnjo pojavnosti gena *merA*. Primerjava z meritvami celokupnega Hg na istih vzorčnih mestih pa je potrdila korelacijo med onesnaženostjo z živim srebrom in količino gena *merA*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 579.25:579.68:546.49(497.4Idrijca)(043.2)=163.6
CX Idrijca / mercury / bacterial communities / qPCR
AU KOVAČ, Manca
AA GUNDE CIMERMAN, Nina (supervisor) / LAPANJE, Aleš (co-advisor) / PLEMENITAŠ, Ana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2008
TI MERCURY INFLUENCE ON PRESENCE OF GENE *merA* ON BACTERIAL COMMUNITIES IN IDRIJCA RIVER
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 47 p., 2 tab., 22 fig., 0 ann., 54 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Mercury (Hg) is a metal, toxic for living organisms already in very low concentrations. Organisms have evolved different mechanism of tolerance and resistance to mercury. Bacterial resistance to mercury is coded by the *mer* operon. *MerA* gene inside the *mer* operon codes for mercuric reductase, which reduces Hg^{2+} into the volatile Hg^0 form. Bacteria contribute importantly to the global mercury cycle and biological accessibility of Hg to higher organisms. In this research we have measured *merA* gene with polymerase chain reaction in real time (qPCR) method in bacterial community along Idrijca river. From gene *merA* quantity we can conclude on degree of pollution in the region. Results indicate that quantity of *merA* gene along river is changing seasonally and positionally. The lowest quantities were measured on reference position close to the spring, while the highest were measured in Spodnja Idrija, near to cinober ore smelter was once located. High quantities were also found in Idrija and Želin. Quantity of *merA* gene is being reduced downstream from Spodnja Idrija. In comparison with usual chemical methods, high resolution of qPCR method for gene *merA* detection, gives higher relevance of this method for ecosystem research and enables gradient oscillations measurements in specific gene concentration. Upon every half of a kilometer in the surroundings of the source of the pollution, we have determined degree of presence of gene *merA*. Comparison with total Hg measurements taken on the same locations has confirmed correlation between Hg pollution and gene *merA* quantity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA V NARAVI.....	3
2.1.1 Antropogeni in naravni viri živega srebra v okolju.....	3
2.1.2 Metilacija ionskega živega srebra (Hg^{2+}).....	5
2.1.3 Demetilacija CH_3Hg^+	6
2.1.4 Redukcija Hg^{2+}	7
2.1.5 Oksidacija elementarnega živega srebra (Hg^0).....	8
2.2 FUNKCIONALNE KOMPONENTE OPERONA REZISTENTNEGA NA Hg (MER OPERON)	9
2.3 BIOFILMI	10
2.3.1 Biofilmi in živo srebro	13
2.4 MIKROBIOLOGIJA REČNIH SISTEMOV	15
2.4.1 Kemijski dejavniki	15
2.4.2 Fizikalni dejavniki	17
2.4.3 Biotski dejavniki	17
2.5 MOLEKULARNE METODE	18
2.5.1 PCR v realnem času (qPCR)	18
3 MATERIAL IN METODE DELA.....	19
3.1 MATERIAL	19
3.2 VZORČENJE	19
3.3 IZOLACIJA DNK IN ČIŠČENJE IZOLIRANE DNK.....	22
3.4 MERITVE CELOKUPNIH KONCENTRACIJ DNK V POSAMEZNEM VZORCU.....	24
3.5 PCR V REALNEM ČASU (QPCR).....	24
3.5.1 Kvantifikacija gena <i>merA</i> glede na celokupno koncentracijo DNK v vzorcu .	25
3.5.2 Kvantifikacija gena <i>merA</i> glede na koncentracijo 16S v vzorcu.....	25
3.6 MERITVE CELOKUPNEGA ŽIVEGA SREBRA (Hg_T)	25
4 REZULTATI.....	26

4.1	SEZONSKA DINAMIKA KOLIČINE GENA MERA.....	26
4.1.1	<i>Količina gena merA v vzorcih biofilmov</i>	27
4.1.2	<i>Količina gena merA v vodnih vzorcih</i>	30
4.2	GRADIENTNE MERITVE GENA MERA VZDOLŽ REKE V VZORCIH BIOFILMA.....	33
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	37
5.1	RAZPRAVA.....	37
5.2	SKLEPI.....	41
6	POVZETEK.....	42
7	LITERATURA	43
	ZAHVALE	

KAZALO SLIK

Slika 2.1: Biogeokemijsko kroženje živega srebra. Glavne zaloge živega srebra so v vodi in sedimentih, kjer se lahko koncentrirajo v živalskih tkivih ali precipitirajo kot HgS (prirejeno po Madigan in sod., 2003).	5
Slika 2.2: Biofilmi vsebujejo posebne kanalčke skozi katere poteka izmenjava hranilnih snovi, presnovkov in plinov (Center for Biofilm Engineering, Montana State University).	11
Slika 2.3: Proces rasti biofilma (Utah Municipal Water Systems).	11
Slika 2.4: Spreminjanje kemijskih in biotskih parametrov po reki navzdol od mesta onesnaženja. Na mestu vnosa odplak pride do takojšnjega upada koncentracije kisika in do porasta števila heterotrofnih bakterij. Z oddaljenostjo od vira onesnaženja se prične koncentracija kisika postopno povečevati (Madigan in sod., 2003).	16
Slika 3.1: Zemljevid z označenimi vzorčnimi mesti.	21
Slika 3.2: Posnetek iz zraka z označenimi vzorčnimi mesti.	21
Slika 4.1: Slika prikazuje graf odvisnosti R_n od števila ciklov, pri čemer R_n predstavlja razmerje med intenziteto fluorescence našega vzorca in intenziteto fluorescence referenčnega barvila. Osnovno črto (baseline) predstavljajo začetni cikli PCR, pri katerih je zelo majhna razlika v intenziteti fluorescence vzorca in referenčnega barvila. Prag (treshold) je linija, ki se nahaja nad osnovno linijo in v področju eksponentne rasti pomnožitvene krivulje. Ct je cikel, pri katerem pomnožitvena krivulja seka prag. $\Delta R_n = R_n - \text{baseline}$ (navodila za Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System).	26
Slika 4.2: Količina gena <i>merA</i> pri vzorčenju 18.7.2006.	27
Slika 4.3: Količina gena <i>merA</i> pri vzorčenju 15.9.2006.	28
Slika 4.4: Količina gena <i>merA</i> pri vzorčenju 20.2.2007.	28
Slika 4.5: Količina gena <i>merA</i> pri vzorčenju 8.9.2007. Na vzorčnem mestu N1 je količina gena pod mejo detekcije.	29
Slika 4.6: Količina gena <i>merA</i> pri vzorčenju 8.9.2007.	29
Slika 4.7: Celokupne koncentracije DNK v posameznih vzorcih biofilmov ob različnih datumih vzorčenja.	30
Slika 4.8: Količina gena <i>merA</i> v vzorcih vode pri vzorčenju 18.7.2006. Na vzorčnem mestu V1 je količina gena pod mejo detekcije.	31

Slika 4.9: Količina gena <i>merA</i> v vzorcih vode pri vzorčenju 15.9.2006. Na vzorčnem mestu V1 je količina gena pod mejo detekcije.....	31
Slika 4.10: Količina gena <i>merA</i> v vzorcih vode pri vzorčenju 20.2.2007. Na vzorčnem mestu V1 je količina gena pod mejo detekcije.....	32
Slika 4.11: Količina gena <i>merA</i> v vzorcih vode pri vzorčenju 8.9.2007. Na vzorčnem mestu V1 je količina gena pod mejo detekcije.....	32
Slika 4.12: Celokupne koncentracije DNK v posameznih vzorcih vode ob različnih datumih vzorčenja.....	33
Slika 4.13: Količina gena <i>merA</i> na vzorčnih mestih gradienta. Vzorci na grafu si sledijo v smeri toka reke. Vrednosti so podane relativno glede na razmerje celokupne koncentracije DNK v posameznem vzorcu. Na vzorčnem mestu N1 (paralelke 1, 2, 3) je količina gena pod mejo detekcije.	34
Slika 4.14: Količina gena <i>merA</i> na vzorčnih mestih gradienta. Vzorci na grafu si sledijo v smeri toka reke. Vrednosti so podane relativno glede na razmerje 16S rRNA v posameznem vzorcu. Na vzorčnem mestu N1 (paralelke 1, 2, 3) je količina gena pod mejo detekcije.....	34
Slika 4.15: Celokupne koncentracije DNK v posameznih vzorcih gradienta.	35
Slika 4.16: Koncentracija celokupnega Hg v posameznih vzorcih gradienta.	35

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 3.1: Koordinate vzorčnih mest. Mesto N2B 12 se nahaja v bližini mesta Idrija, N2B 1 pa pri Želinu.	22
Tabela 3.2: Seznam vzorčnih mest z oznakami vzorcev.	22

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CLSM	vrstična laserska konfokalna mikroskopija
Ct	(threshold cycle) cikel pri katerem pomnožitvena krivulja seka prag
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dsDNK	dvoverižna deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraacetilna kislina
EPS	eksopolisaharid
FAD	flavin adenin dinukleotid
Hg	živo srebro
Hg ⁰	elementarno živo srebro
Hg-T	celokupno živo srebro
HgS	cinabarid
HSTE pufer	(high saline Tris EDTA) visoko slani pufer sestavljen iz Tris-a in EDTA
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
qPCR	polimerazna verižna reakcija v realnem času
rpm	obrati na minuto
SRB	sulfat reducirajoče bakterije

SLOVARČEK

- Operon** funkcionalno področje DNK pri bakterijah, ki vključuje več strukturnih genov, ki so hkrati regulirani. Strukturni geni določenega operona zapisujejo informacije za sintezo proteinov, ki so vključeni v isto metabolno pot. Poleg strukturnih genov vsebuje operon še vezavno mesto za represor (to področje se imenuje operator), vezavno mesto za aktivator ter promotorsko regijo, na kateri se nahaja iniciacijsko mesto za vezavo RNK-polimeraze in ustreznih regulatornih molekul.
- Primer** oligonukleotidni začetnik

1 UVOD

Živo srebro je prisotno na Zemlji že od njenega nastanka. Kljub temu je živo srebro že v nizkih količinah toksično za žive organizme (Boening, 2000), ki so morali zato razviti različne mehanizme tolerance in odpornosti.

Na oblikovanje mikrobne združbe v vodnem ekosistemu lahko vplivajo različni kemijski, fizikalni in biotski dejavniki. Mikroorganizmi pogosto rastejo na vodnih površinah v obliki biofilmov, ki so sestavljeni iz mikrokolonij bakterijskih celic prilepljenih na površino kamnov in obdanih z adhezivnimi polisaharidnimi izločki (Madigan in sod., 2003). Bakterijske celice so v obliki biofilmov boljše zaščitene pred vplivi okolja. Znotraj biofilmov poteka komunikacija med bakterijskimi celicami in izmenjava genskega materiala, s čimer si bakterije lahko pridobijo odpornost na živo srebro. Genotipsko izraženo odpornost na živo srebro določa skupina *mer* genov. *MerA* gen določa encim živo srebrovo reduktazo, ki reducira Hg^{2+} v hlapno obliko Hg^0 . Z biološkimi transformacijami mikroorganizmi pomembno vplivajo na kroženje Hg v okolju in s tem na njegovo dostopnost višjim organizmom (Barkay in sod. 2003; Barkay, 1989).

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bilo ugotoviti, kakšen je selekcijski pritisk živega srebra na bakterijske združbe s pomočjo primerjave pojavnosti gena *merA* izmerjene v ekstraktu celokupnih nukleinskih kislin vzorcev pridobljenih iz petih različnih lokacij ob reki Idrijci in ob različni letnih časih. S primerjavo količine pojavljanja gena *merA* v okoljskih vzorcih smo želeli posredno ugotoviti stopnjo izpostavljenosti bakterij živemu srebru na tem področju Slovenije. Z uporabo molekularnih metod smo želeli določiti gradient onesnaženja z živim srebrom ob samem viru onesnaženja (topilnica cinabaritne rude).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Na podlagi dosedanjih raziskav povezanih s pojavljanjem živega srebra v reki Idrijci smo postavili sledeče delovne hipoteze:

- na mestih s povečano koncentracijo Hg v večjem številu živijo bakterije, ki so odporne na Hg²⁺, ker vsebujejo gen *merA*
- pojavljanje gena *merA* pri bakterijah v zgornjem toku reke Idrijce je manjše, kot pri bakterijah v spodnjem toku Idrijce, ob samem viru onesnaženja
- ločljivost uporabljene metode, polimerazne verižne reakcije v realnem času, bo dovoljevala meritev gradienta onesnaženja z živim srebrom preko merjenja stopnje pojavnosti gena *merA*

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA V NARAVI

2.1.1 Antropogeni in naravni viri živega srebra v okolju

Živo srebro je v naravi prisotno v zelo nizkih količinah, v povprečju približno 1 ng/l (Madigan in sod., 2003). V Zemljini skorji se količina gible v območju med 21 – 56 ppb v obliki Hg^0 in v različnih oblikah HgS binarnih mineralov, kot so cinabarid, metacinabarid in hipercinabarid (Barkay in sod., 2003). V prsti se nahaja v vrednostih med 0,01 $\mu\text{g/g}$ do 0,1 $\mu\text{g/g}$ mase prsti (van Loon in Duffy, 2000).

Naravni način vnosa živega srebra v okolje predstavljajo vulkanski izbruhi, izhlapevanje živega srebra iz zemlje bogate s Hg in mikrobn mobilizacija Hg, ki se pojavlja v sedimentih rek in oceanov (Muščet, 2006). Poleg naravnega vnosa ima velik pomen tudi antropogeni vnos Hg, saj naj bi ta predstavljal kar 75% globalnega vnosa Hg v okolje. Spremembe v koncentraciji atmosferskega Hg skozi čas in povečane stopnje akumulacije Hg ugotavljajo s preučevanjem sedimentov in ledenih plošč, ki jasno pokažejo povečan vnos Hg v okolje v zadnjih dveh stoletjih (Barkay in sod., 2003). 50% anorganskega Hg prisotnega na severni zemljepisni širini naj bi prišlo v zemljo iz atmosfere (Landers et., 1998). Z izkopavanjem živo srebrove rude in sežiganjem fosilnih goriv naj bi namreč na leto sprostil v okolje 40.000 ton živega srebra (Madigan in sod., 2003). Poraba Hg v industriji je zelo široka; npr. v proizvodnji baterij, električnih vodov, zobozdravstvu itd. (von Canstein, 1999). Poleg uporabe živega srebra v industriji, je le-ta pogosto komponenta mnogih pesticidov in fungicidov (Madigan in sod., 2003; Boening 2000; Barkay in sod., 2003). Živo srebro se nalaga v tkivih živih organizmov, kjer ima toksične učinke (Madigan in sod., 2003).

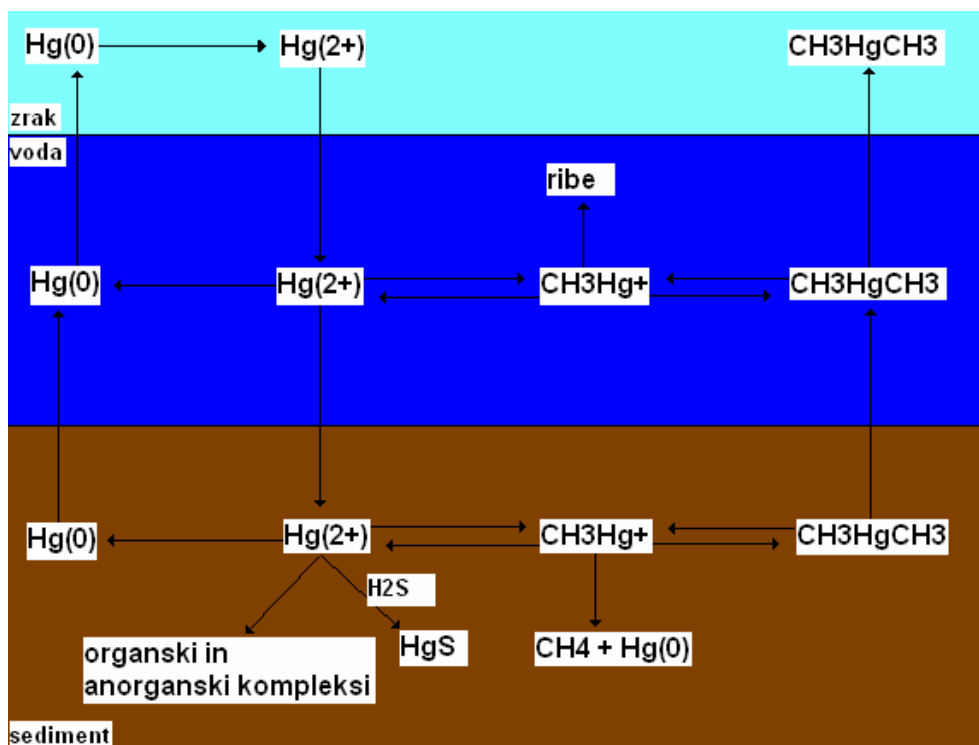
Živo srebro (Hg) je kovina svetleče se srebrne barve z vrstnim številom 80 v periodnem sistemu in molsko maso 200,59 g/mol. To je edina kovina, ki je v čisti obliki pri normalnih razmerah tekoča; ima Henrijev koeficient 0,3 (Muščet, 2006).

Glavna oblika živega srebra v atmosferi je elementarno živo srebro (Hg^0), ki je hlapljivo in fotokemično oksidira v Hg^{2+} ; tako je večina živega srebra, ki vstopi v vodni sistem v obliki Hg^{2+} (Madigan in sod., 2003; Barkay in sod., 2003; Barkay, 1989) (slika 2.1). Hg^{2+} se hitro veže na določeno snov (npr. sedimente), kjer ga nato metabolizirajo mikroorganizmi. Le-ti metilirajo Hg^{2+} v metil-Hg ($\text{CH}_3\text{-Hg}$) (slika 2.1), ki pridobi metilno skupino od metil-B12. Mikroorganizmi so prvi člen v vodni prehranjevalni verigi, kjer se metil-Hg akumulira. Ko mikrobi sprostijo metil-Hg, le-ta vstopa v višje stopnje prehranjevalne verige. Zaradi lipofilne narave, hitre difuzije in vezave na proteine ima visoko sposobnost bioakumulacije. Preko planktona, herbivorov in najvišjih plenilcev rib, akumulirana količina Hg po prehranjevalni verigi narašča. Podobno velja tudi za kopenska področja. Metil-Hg je še toliko bolj toksičen zato, ker se lahko absorbira skozi kožo in je znan kot nevrotoksin (Madigan in sod., 2003; Barkay in sod., 2003; Boening, 2000; Clarkson, 2002; Nazaret, 1994). Metil-Hg je približno 100x bolj toksičen od Hg^0 ali Hg^{2+} (Madigan in sod., 2003).

Mikroorganizmi lahko metil-Hg ponovno metilirajo v hlapljivo obliko dimetil-Hg ($\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_3$) (Barkay in sod., 2003) (slika 2.1). Prav tako kot metil-Hg, ima tudi dimetil-Hg sposobnost akumulacije v živalskih tkivih, še posebno v mišicah. Obe molekuli, metil- in dimetil-Hg sta nepolarni, zato lahko pasivno difundirata hitreje, kot pa Hg^0 ali Hg^{2+} (Barkay in sod., 2003).

Na globalni ravni se pojavljajo še številne druge oblike živega srebra. V okolju je živo srebro najbolj pogosto prisotno v obliki slabo vodotopnega minerala cinabarita (HgS ; topnost 10^{-6} g/100 ml vode) (Weast, 1989; Barkay in sod., 2003). Znano je, da sulfat reducirajoče bakterije tvorijo H_2S , ki spontano reagira s Hg, pri čemer nastane HgS ($\text{H}_2\text{S} + \text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{HgS}$) (Madigan in sod., 2003) (slika 2.1). Ker je topnost HgS zelo nizka (Madigan in sod., 2003; Barkay, 2003) se v anoksičnih sulfat reducirajočih sedimentih večina Hg nahaja ravno v obliki HgS . Ob prisotnosti kisika lahko pride do oksidacije HgS , ki jo primarno povzročajo bakterije rodu *Thiobacillus*. Pri oksidaciji HgS se tvori Hg^{2+} in tudi metil-Hg (Madigan in sod., 2003). HgS je zaradi slabe topnosti v večji meri odstranjen iz kroženja živega srebra in tako slabše biološko dostopen. Vse ostale oblike živega srebra

(Hg^0 , Hg^{2+} , metil-Hg, dimetil-Hg) so topne in tako dostopne za biološke transformacije (Madigan in sod., 2003).



Slika 2.1: Biogeokemijsko kroženje živega srebra. Glavne zaloge živega srebra so v vodi in sedimentih, kjer se lahko koncentrirajo v živalskih tkivih ali precipitirajo kot HgS (prirejeno po Madigan in sod., 2003).

2.1.2 Metilacija ionskega živega srebra (Hg^{2+})

Čprav je večina živega srebra v okolju v anorganski obliki, se lahko z naravnimi abiotskimi in biotskimi procesi sintetizira metil-Hg. Agensi, ki so odgovorni za potek abiotske metilacije Hg, so humična in fulvična kislina, karboksilne kisline in alkilirane kositrne spojine, ki jih uporabljajo v kmetijstvu kot fungicide in kot premaze za ladjeveje (Barkay in sod., 2003).

Glavni donorji metilne skupine pri biotskem načinu metilacije Hg so metilkorinoidi, analogi vitamina B12 (Barkay in sod., 2003). Bakterijska metilacija poteka najbolj intenzivno v anaerobnih sedimentih, kjer 95% metilacije opravijo sulfat reducirajoče bakterije. V optimalnih pogojih se metilira približno 3% dostopnega Hg (Barkay in sod.,

2003; Pak in Bartha 1998A; Pak in Bartha 1998B). Ritchard Bartha je pri študiju metilacije na bakterijah vrste *Desulfovibrio desulfuricans* ugotovil, da metilna skupina izvira iz serina C3 ali pa se tvori preko acetil-CoA in CH₃-tetrahidrofolata v metilkobalamin, čemur nato sledi encimska metilacija Hg. Kasneje je ugotovil, da prenos metilne skupine iz metilkobalamina na Hg ni spontan proces, ampak pri tem sodelujejo bakterije (Barkay in sod., 2003).

Produkcija dimetil-Hg iz metil-Hg je povezana z okolji bogatimi s H₂S, kjer naj bi sulfat reducirajoče bakterije (SRB) tvorile dimetil-Hg med sulfidogenično rastjo (Barkay in sod., 2003). Z združitvijo dveh metil-Hg s sulfidom, ki nastaja pri sulfatni respiraciji, nastane netopen precipitat dimetil-HgS ((CH₃Hg)₂S), ki se nalaga izven sulfat reducirajočih celic. Z znižanjem pH se ta molekula razgradi na dimetil-Hg in HgS. Dimetil-Hg je zelo hlapen in izhaja iz neposredne okolice SRB celic. Poleg tega se lahko dimetil-HgS spremeni v metil-Hg in HgS, ki se tudi precipitira v okolici celice. Pri tej reakciji nastajajo tudi manjše količine metana (Baldi in sod. 1993 po Muščet). Baldi in sod. (1993) so pokazali, da je metil-Hg 10x manj toksičen za SRB *Desulfovibrio desulfuricans* kot pa za aerobni odporni sev *Pseudomonas putida* z *mer* operonom. Znano je, da lahko *P. putida* s Hg reduktazno aktivnostjo, kodirano na *mer* operonu, popolnoma razgradi 1 µg metil-Hg do Hg⁰ in metana v le 2 urah (Muščet, 2006).

Metilacija Hg sicer poveča toksičnost za večcelične organizme, za bakterije pa je to lahko eden od potencialnih mehanizmov detoksifikacije Hg (Compeau in Bartha, 1985; Baldi in sod., 1993).

2.1.3 Demetilacija CH₃Hg⁺

Demetilacija lahko poteka po dveh različnih poteh: biotski in anabiotski poti. Pri biotski poti ločimo reduktivno in oksidativno demetilacijo. Reduktivna pot poteka v aerobnih pogojih (Barkay in sod., 2003). Povzročajo jo bakterije, ki vsebujejo *mer* operon z zapisom za encim liazo. Liaza cepi vez med ogljikom iz metilne skupine in Hg, tako da nastane

metan in Hg^{2+} . Encim Hg–reduktaza reducira nastali Hg^{2+} v inertno in hlapno Hg^0 (Robinson in Tuovinen, 1984).

V anaerobnih pogojih pa s pomočjo metanogenih in sulfat reducirajočih bakterij poteka oksidativna demetilacija, pri kateri se tvorijo CO_2 , metan in Hg^0 (Barkay in sod., 2003; Oremland in sod., 1991).

Mnogo okoljskih študij predpostavlja, da reduktivna demetilacija prevladuje pri visokih količinah Hg v pretežno aerobnih pogojih, medtem ko oksidativna demetilacija prevladuje pri nizkih količinah Hg v pretežno anaerobnih pogojih (Barkay in sod., 2003).

Nivo metil–Hg v okolju je predvsem odvisen od ravnotežja med bakterijsko metilacijo in demetilacijo, na katerega pa vplivajo redoks potencial, pH, tip prsti, organski material in prisotnost mikrobnih inhibitorjev (Boening, 2000).

Anabiotska razgradnja metil–Hg poteka s pomočjo sončne svetlobe, predvsem v UV–A in UV–B delu spektra (280 – 400 nm). Inkubacija jezerske vode v temi je imela 350x višjo koncentracijo metil–Hg, kot inkubacija na svetlobi. Sude in sod. so ugotovili, da se med fotodegradacijo tvori Hg^0 . Tako naj bi bila fotodegradacija v okoljih z nizko skupno koncentracijo Hg in dovolj svetlobe glavni način razgradnje metil–Hg. Nasprotno pa v sedimentih in nizkih vodah glavni vir razgradnje metil–Hg predstavljata reduktivna in oksidativna demetilacijska pot (Barkay in sod., 2003).

2.1.4 Redukcija Hg^{2+}

Redukcija odloženega Hg^{2+} v Hg^0 omogoča transport Hg nazaj v atmosfero in tako ščiti pred oboritvijo Hg in njegovim nalaganjem v sedimente, kjer bi se lahko metiliral (Barkay in sod., 2003). Biološko redukcijo vršijo bakterije, ki vsebujejo rezistenčno determinanto *mer* operon. Te reducirajo Hg^{2+} v Hg^0 . Poleg bakterij pa so redukcije Hg^{2+} sposobne tudi nekatere alge s posebnim mehanizmom, ki je bodisi odvisen bodisi neodvisen od svetlobe (Barkay in sod., 2003). Nastali Hg^0 je slabo topen in dobro hlapen, zato redukcija pomembno prispeva k zmanjšanju toksičnosti Hg za organizme.

Redukcija Hg^{2+} lahko poteka tudi na abiotski način, s fotokemično transformacijo (fotoredukcija) ali pa s temotnimi reakcijami. Fotoredukcijo povzročijo organski prosti radikali, ki se tvorijo pri fotolizi. V temi pa redukcijo Hg^{2+} povzročajo prosti radikali povezani s fulvično in humisko kislino (Barkay in sod., 2003).

2.1.5 Oksidacija elementarnega živega srebra (Hg^0)

Biološko inducirana oksidacija Hg^0 je najmanj raziskan proces v živo srebrovem biogeokemijskem ciklu. Smith in sod. (1998) so pokazali, da bakterijski encimi hidroperoksidaze (KatG, KatE) lahko oksidirajo hlapni Hg^0 v topen in biološko dostopen Hg^{2+} . Visoko stopnjo Hg^0 oksidirajoče aktivnosti v zemlji imajo aerobne bakterije rodu *Bacillus* in *Streptomyces*, zato predpostavljajo, da naj bi le te imele veliko vlogo pri kroženju Hg v okolju (Barkay in sod., 2003). Oksidacija slabo topnega HgS poteka v aerobnih razmerah zlasti s pomočjo bakterij iz rodu *Thiobacillus*, kar vodi v nastanek Hg^{2+} in s tem vračanje Hg v kroženje (Madigan in sod., 2003; Lizama in Sankey, 1993). Oksidacijo lahko vršijo tudi rastlinske in živalske katalaze (Muščet, 2006).

Oksidacija Hg^0 v Hg^{2+} lahko poteka tudi na abiotski način v zraku, zemlji ali vodi. Raziskovanja so bila usmerjena predvsem v transformacije Hg, ki potekajo v zraku, zato so transformacije Hg v vodi in zemlji manj znane. Predpostavljajo, da naj bi oksidacija posredno vplivala na poviševanje koncentracije metil-Hg (Barkay in sod., 2003).

Fotooksidacijo Hg^0 lahko povzročajo O_2 v prisotnosti klorida, vodikov peroksid, ozon, žveplo-hidrilne spojine, prosti radikali BrO^* , Br^* in Cl^* in UV-B v prisotnosti Cl_2 in fotoreaktivne spojine kot je benzokinon. Oksidacija v temi pa poteka ob prisotnosti klorida (Barkay in sod., 2003).

2.2 FUNKCIONALNE KOMPONENTE OPERONA REZISTENTNEGA NA Hg (*mer* operon)

Mer operon je bil najbolj intenzivno proučevan pri Gram negativnih (G^-) bakterijah rezistentnih na živo srebro. *Mer* operon se pri Gram negativnih bakterijah razlikuje od operona *mer* pri Gram pozitivnih bakterijah (G^+) v prisotnosti posameznih genov ter v njihovi orientaciji (Barkay in sod., 2003; Osborn in sod., 1997; Bogdanova in sod., 2001; Barkay in sod., 1985; Lapanje, 2005). Mehanizem odpornosti evbakterij na živo srebro z *mer* operonom vsebuje redukcijo visoko reaktivne kationske oblike živega srebra (Hg^{2+}) v hlapno, relativno inertno obliko monoatomnega Hg. Za ta proces redukcije je odgovoren protein MerA ali živo srebrova reduktaza, ki porablja NADPH kot reduktant (Barkay in sod., 2003; Barkay, 1992).

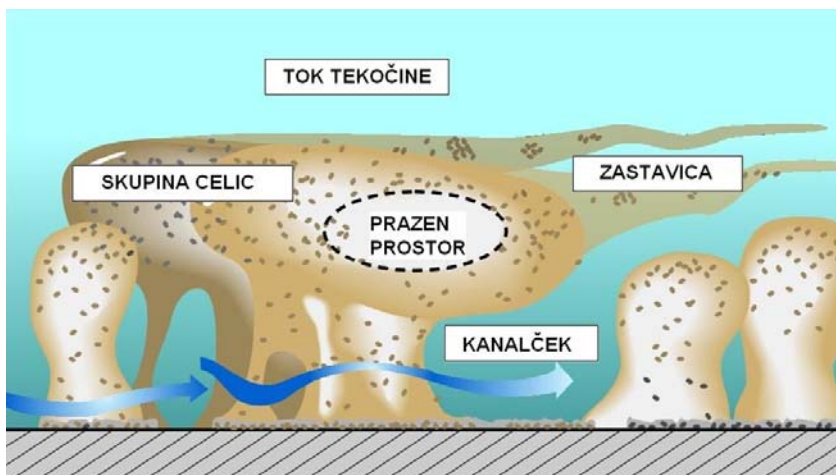
Mer operon je sestavljen iz genov: *merR*, *merA*, *merB*, *merD*, *merP*, *merT*, *merC* ter *merF* (Lapanje, 2005; Barkay in sod., 2003). Produkt gena *merR* je regulatorni protein, ki pozitivno regulira ekspresijo drugih genov ob prisotnosti Hg^{2+} . Protein MerA je FADH oksidoreduktaza, ki reducira Hg^{2+} v Hg^0 . Protein MerB cepi vezi Hg-C v organskih živosrebrih molekulah, pri čemer se sprošča Hg^{2+} , ki nato vstopa v metabolno pot redukcije Hg^{2+} v Hg^0 z encimom MerA. Protein MerP je periplazmatski protein, ki ima vlogo pri ločevanju nukleofilov (npr. Cl^- ion) od Hg^{2+} iona, zaradi česar se lahko Hg^{2+} prenese na protein MerT. Protein MerT je transmembranski transportni protein in prenaša Hg^{2+} ion v celico. V celici Hg^{2+} ion prevzamejo cisteinske in glutationske molekule in ga prenesejo v tiolno vezani obliki k proteinu MerA, ki reducira Hg^{2+} v Hg^0 . Hg^0 je relativno inertna in lipidotopena, zaradi česar lahko difundira izven celice (Silver, 1996; Silver, 1998; Barkay in sod., 2003). MerC in MerF naj bi sodelovala pri transportu Hg^{2+} v celico, pri čemer ne sodelujeta s proteinom MerP v periplazmatskem prostoru (Wilson in sod., 2000). Protein MerD je negativni regulator ekspresije genov. Protein MerG, ki ni prisoten v vseh *mer* operonih, pa naj bi povečeval odpornost na organske Hg spojine pri bakterijah brez proteina MerB (Barkay in sod., 2003). Poleg proteinov MerR in MerD vplivata na ekspresijo tudi atenuacija in polarnost (Barkay in sod., 2003).

Protein MerB je večinoma prisoten le pri Gram pozitivnih bakterijah in le redko tudi pri Gram negativnih bakterijah. Organizacija *mer* operona je pri G^+ in G^- bakterijah z visokim deležem GC takšna, da se RNA na genu *merR* prepisuje v nasprotni smeri kot ostali *mer* geni. Pri G^+ bakterijah z nizkim deležem GC se RNA iz gena *merR* prepisuje v isti smeri kot ostali *mer* geni (Osborn, 1997; Barkay, 2003; Lapanje, 2005).

Glede na prisotnost genov *merA* in *merB*, ločimo široki in ozki spekter rezistence na živo srebro. Pri širokem spektru rezistence vsebujejo bakterije oba gena (*merA* in *merB*), pri ozkem pa le *merA* (Barkay in sod., 2003). Pri širokem spektru rezistence ni nujno, da se gen *merB* nahaja na *mer* operonu, ampak se lahko nahaja na povsem ločenem mestu na mobilnem elementu novega *mer* operona brez gena *merA*. Takšna razporeditev je znana pri plazmidu R831b (Ogawa in sod., 1984). *Mer* operon se pogosto nahaja na mobilnih elementih, kot so transpozoni in plazmidi. Najpogosteje se *mer* operon nahaja na traspozonih II skupine tako po Gramu pozitivnih kot negativnih bakterijah (Barkay in sod., 2003).

2.3 BIOFILMI

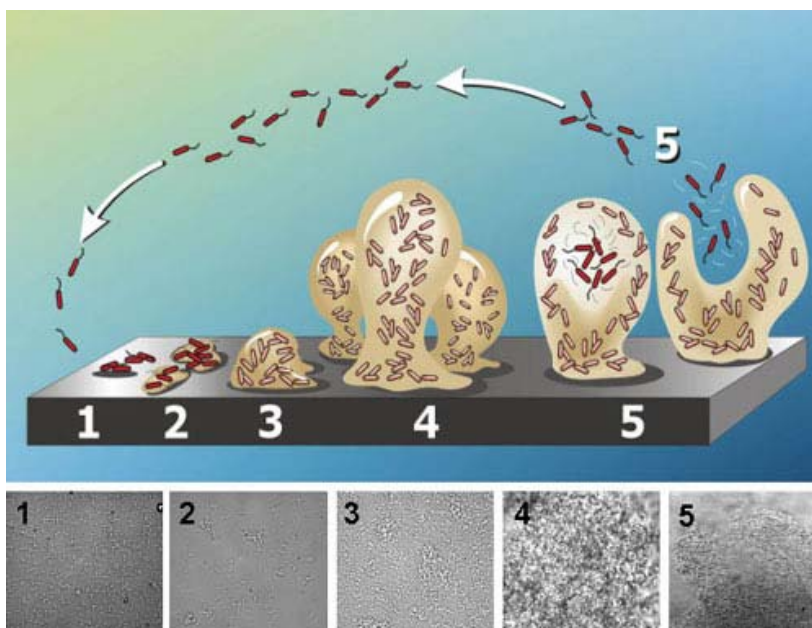
Mikroorganizmi v naravi rastejo na dva načina, v planktonski obliki in v obliki biofilmov. Biofilmi so mikrokolonije bakterijskih celic prilepljenih na površino in obdanih s eksopolisaharidnimi (EPS) izločki celic (Madigan in sod., 2003). EPS varuje bakterijske celice pred mehanskim, kemijskim in antibiotičnim delovanjem ter imajo pomembno vlogo pri zadrževanju hranilnih snovi, ki služijo za vzdrževanje in nadaljnji razvoj biofilma. Čeprav EPS plast varuje mikroorganizme pred zunanjimi vplivi, je prepustna za transport hranilnih snovi in kisika iz okolice, v nasprotni smeri pa vrača odpadne produkte in ogljikov dioksid v okolico. Ugotovili so obstoj t.i. vodnih kanalčkov, skozi katere prihaja do izmenjave hranilnih snovi, presnovkov in plinov z okoljem (Allison, 2000) (slika 2.2).



Slika 2.2: Biofilmi vsebujejo posebne kanalčke skozi katere poteka izmenjava hranilnih snovi, presnovkov in plinov (Center for Biofilm Engineering, Montana State University).

Razvoj biofilma poteka v petih stopnjah (slika 2.3):

1. reverzibilna pritrnitev mikrobnih celic
2. ireverzibilna pritrnitev mikrobnih celic
3. bujna rast mikrobnih celic in razvoj mikrokolonije
4. razvoj zrelega biofilma
5. delni razkroj biofilma in sprostitev mikrobnih celic, ki poiščejo nove površine za naselitev in razvoj biofilma



Slika 2.3: Proces rasti biofilma (Utah Municipal Water Systems).

Razvoj biofilma se prične s povezavo posameznih mikroorganizmov s podlago. Prvi kolonisti se pritrjujejo na podlago s šibko, reverzibilno van der Waalsovo silo. V primeru, da prvi kolonisti niso takoj odstranjeni s površine, se lahko trajno pritrjujejo s pomočjo adherentnih struktur, kot so pili. Prvi kolonisti olajšajo prihod naslednjim celicam s tvorbo novih primernejših adhezijskih mest in s tvorbo matriksa, ki poveže biofilm v celoto. Med kolonizacijo se med celicami vzpostavi komunikacija in tako pride do celičnih delitev in okrepitev biofilma (Allison, 2000; Lappin-Scott, 2003).

Najpomembnejši del razvoja biofilmov je pritrjevanje na podlago. S pritrjevanjem na podlago imajo mikroorganizmi večje možnosti interakcij in povečano stopnjo sedimentacije. Šele pritrjene celice lahko oblikujejo združbo. To prispeva k ohranjanju bakterij v določenih nišah, zagotovljeno je njihovo preživetje in razmnoževanje (Marshall, 1992).

Delni razkroj biofilma poteka s pomočjo bakterijskih encimov. K odstranjevanju biofilma pogosto pripomorejo tudi intenzivnost pretoka in vrtinčenje vode, prisotnost kemijskih sredstev in spremembe na površini materiala, na katerem biofilm raste (Zorko, 2003).

Struktura biofilma je odvisna od mnogih zunanjih dejavnikov (vrsta podlage, dostopnost hranil, pretok vode), zato pravimo, da je biofilm dinamična struktura, ki se prilagaja spremembam v okolju (Lappin-Scott, 2003).

Razvoj biofilma zahteva visoko stopnjo usklajenosti, komunikacije (quorum sensing) in interakcije med mikrobnimi vrstami in med osebki ene vrste, znotraj biofilma. Biofilmi torej predstavljajo biološki sistem z visoko stopnjo organizacije, kjer bakterijske populacije tvorijo urejene in funkcionalne združbe (Lappin-Scott, 2003; Allison, 2000).

Prva raziskovanja biofilmov so potekala z elektronskim mikroskopom. Toda izkazala so se kot ne preveč praktična, saj pride med opazovanjem biofilma pod mikroskopom do sušenja biofilma in s tem do njegovega sesedanja in posledično do spremembe oblike. Razvoj novejših tehnik, med drugim vrstične laserske konfokalne mikroskopije (CLSM), ki omogoča neinvazivno preiskovanje struktur in s tem razumevanje biofilmov, ter gojitvenih metod, ki omogočajo kontinuirano gojenje biofilmov, simulacijo naravnega okolja in s tem

proučevanje kompleksnejših procesov, je pripomogel k boljšemu razumevanju razvoja biofilmov (Zorko, 2003).

2.3.1 Biofilmi in živo srebro

Učinek težkih kovin na bakterijske združbe je bil že mnogokrat pomemben predmet raziskav. Raziskava hitrega odgovora pri izpostavitvi mikrobne združbe stresorju v umetnem, z živim srebrom onesnaženim vodnem mikrokozmosu, je pokazala, da se ob izpostavitvi bakterijske združbe živemu srebru hitro poveča frekvenca odpornosti na živo srebro in močno zmanjša bakterijska raznolikost (Barkay, 1987). Raziskave razvoja bakterijskih združb ob dolgo časovni izpostavitvi težkim kovinam so pokazale, da bakterijske združbe povečajo frekvenco pojavljanja odpornosti na stresor (Barkay in sod., 1996). Toda to ne velja vedno, saj so že leta 1985 Barkay in sod. objavili, da se utegne bakterijska raznolikost ob dolgotrajni adaptaciji na izpostavitvev težkim kovinam tudi povečati.

Na Danskem so delali raziskavo, kjer so ugotavljali ali ima močno onesnaženje z živim srebrom kakšne naknadne dolgo časovne učinke na bakterijsko združbo v morskih sedimentih. Bakterijske združbe iz dveh različnih mest (z živim srebrom onesnaženo пристanišče v Kopenhagenu in neonesnaženo kontrolno mesto Køge Buge) so gojili na ploščah z dodanim Hg, Cu, ali pa kakšnim antibiotikom. Ugotovili so, da je bila najvišja količina bakterijskih kolonij na ploščah iz vzorca vzetega iz mesta onesnaženega z živim srebrom. To kaže na korelacijo, da so bakterije, ki so se sposobne prilagoditi na živo srebro, sposobne sočasno prilagoditi tudi na različne vrste antibiotikov (Lasse in sod., 1997).

Bakterijske združbe imajo zelo pomembno funkcijo pri kroženju elementov v naravi. Ker onesnaženje okolja predstavlja nevarnost za osnovne mikrobiološke funkcije, je bilo veliko raziskav narejenih na adaptivnem odgovoru naravnih bakterijskih združb na onesnaževalce (Barkay, 1986). Prilagoditev se lahko pojavi na fenotipski ali genotipski ravni (Barkay, 1986). Fenotipska raven temelji na aktivnosti in funkcijah združb ali izoliranih rodov.

Molekularni mehanizmi, ki pospešijo dedovanje novih fenotipov v naravnih bakterijskih združbah, nam omogočajo bolj osnovno razumevanje prilagoditev. Mehanizmi kot so prenos genov, rekombinacija, transpozicija in spremembe DNK, lahko pospešijo prilagoditve v naravnih okoljih (Reaney in sod., 1983). Spoznanje, da mnogo genov, ki kodirajo degradacijo ali detoksifikacijo onesnaževalcev, leži na plazmidih, vodi v hipotezo, da k prilagoditvi pripomore širjenje plazmidov znotraj naravnih bakterijskih združb. Tako je Barkey v izoliranih bakterijskih združbah iz sedimentov vzetih v okolju onesnaženim s Hg dokazala povečanje števila genov, ki so odgovorni za rezistenco živega srebra. Odkrivali so vpliv onesnaženosti živega srebra jezerskih sedimentov na fenotipsko in genotipsko rezistenco na živo srebro tamkajšnjih heterotrofnih aerobnih bakterijskih združb. Pokazala se je močna pozitivna korelacija med koncentracijo Hg v sedimentih in frekvenco gena (*merA*), ki je odgovoren za pretvorbe živega srebra v hlapno obliko. Toda pri enem izmed vzorcev sedimentov onesnaženih z živim srebrom, kjer je bila vidna nizka fenotipska ekspresija ni bilo mogoče zaznati *mer* gena, kar razlagajo z možno prisotnostjo drugačnega mehanizma odpornosti pri določenih na živo srebro odpornih organizmih ali pa kemijsko omejeno dostopnost živega srebra mikroorganizmom (Barkay, 1986).

Na strukturo in funkcijo bakterijske združbe lahko vpliva gradient težke kovine. Gradientno spreminjanje koncentracije težkih kovin je najlažje spremljati v rekah. V reki onesnaženi s specifično težko kovino so opazili različne odgovore bakterijskih združb glede na njihovo lego (planktonske, epilitične in sedimentne) (Dean-Ross in Mills, 1989). Planktonska bakterijska združba je od vseh treh najslabše prilagojena na težke kovine. Vzrok so majhne koncentracije težkih kovin izmerjene v vodi in le bežen kontakt med bakterijo in težko kovino. Podobno se je pokazalo tudi pri epilitičnih bakterijskih združbah. Čeprav se v sedimentnih bakterijskih združbah običajno kaže pozitivna korelacija med koncentracijo določene težke kovine in procentom bakterij odpornih nanjo (Houba in Remacle, 1980; Hornor in Hilt, 1985), se je v raziskavi, ki sta jo opravila Dean-Ross in Mills izkazalo drugače. Kljub 10x višjim koncentracijam težkih kovin v sedimentih v primerjavi z vodo, se ni pokazalo povečanje v rezistenci težkih kovin znotraj sedimentne bakterijske združbe. Vzrok za pomanjkanje rezistence na težke kovine je visok pH v reki (Dean-Ross in Mills, 1989). Omenjena raziskava kaže močan vpliv drugih kemijskih

dejavnikov na dostopnost težkih kovin za bakterijske združbe, na kar opozarja tudi že Barkay leta 1986.

Bakterijske združbe imajo velik vpliv na razmerje med metil-Hg in celokupnim Hg (Hg_T). O akumulaciji Hg v bakterijskih združbah litoralnega pasu, predvsem biofilmov v perifitonu je malo znanega. V perifitonu se lahko akumulirajo velike količine Hg in ta akumulacija je močno povezana z značilnostmi samega vodnega okolja in biomase perifitona (Desrosiers in sod, 2005). Biomasa perifitona v jezerih je v pozitivni korelaciji z zemljepisno širino in v negativni korelaciji z nagibom jezerske brežine in globino jezera. Od biomase perifitona pa sta odvisni tudi koncentraciji Hg_T in metil-Hg. Koncentracija metil-Hg se zmanjša z zemljepisno širino, kar je povezano s povečanjem biomase perifitona in zmanjšanjem količine ogljika v perifitonu. Z drugimi besedami, biofilm bogat z organizmi ali organskim detritom lahko tvori bolj primerno okolje za proliferacijo sulfat reducirajočih bakterij ali za bolj fiziološko aktiven perifiton, ki lahko učinkovito metilira anorganski Hg (Desrosiers in sod, 2005).

2.4 MIKROBIOLOGIJA REČNIH SISTEMOV

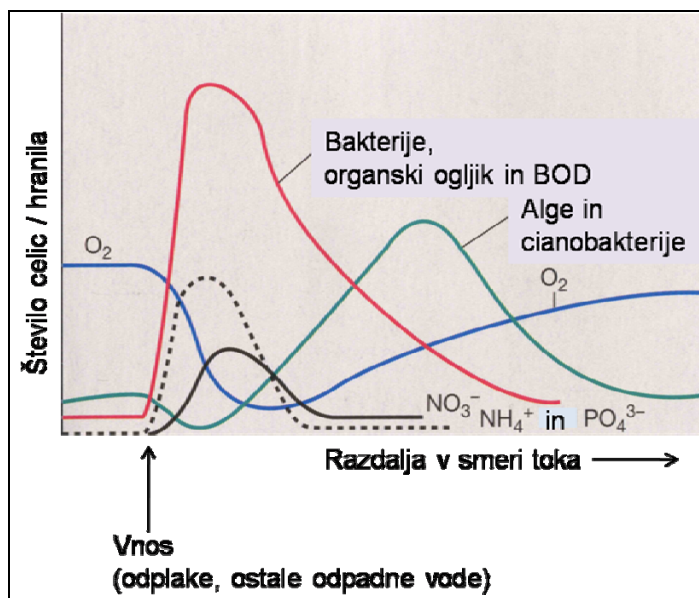
Reka kot sladkovodni sistem vzdolž rečne struge spreminja svoje fizikalne in kemijske lastnosti. Na razvoj mikrobnih združb imajo vpliv različni fizikalni, kemijski in biotski dejavniki.

2.4.1 Kemijski dejavniki

2.4.1.1 Kisik v rekah

Količina kisika v rekah je zelo pomemben podatek, še posebno na področjih večjega onesnaženja rek z odpadnimi vodami in industrijskimi odplakami. Čeprav naj bi bile reke dobro premešane zaradi hitrega toka vode in turbulence, lahko velike količine dodanega organskega materiala kljub vsemu vodijo v izrazito pomanjkanje kisika ob bakterijski respiraciji. Od vira onesnaženja reke, se organski material postopoma izgublja in vsebnost kisika se vrne na normalno vrednost (slika 2.4). Pomanjkanje kisika je najbolj neugodno za

rečne živali, saj pod takimi pogoji lahko poginejo. Poleg tega anaerobne bakterije tvorijo spojine z neprijetnim vonjem (npr. amini, H_2S , merkaptani, maščobne kisline), ki so toksične za višje organizme (Madigan in sod., 2003).



Slika 2.4: Spreminjanje kemijskih in biotskih parametrov po reki navzdol od mesta onesnaženja. Na mestu vnosa odplak pride do takojšnjega upada koncentracije kisika in do porasta števila heterotrofnih bakterij. Z oddaljenostjo od vira onesnaženja se prične koncentracija kisika postopno povečevati (Madigan in sod., 2003).

2.4.1.2 pH

Znano je, da zakisanje vodnih sistemov vodi v zmanjšanje raznolikosti vrst rastlin in živali, nekoliko manj pa je znanega o vplivu zakisanosti okolja na mikrobne združbe. Raziskovalna skupina F. Percent (2008) je objavila raziskavo, v kateri so ugotovili da sta raznolikost in bogastvo bakterioplanktonskih združb v pozitivni korelaciji s pH, celotna zgradba združb pa ne. V raziskavi so se pokazale izrazite korelacije med zgradbo bakterijsko planktonskih združb in globino vode, raztopljenim anorganskim ogljikom in nelabilnimi monomernimi koncentracijami aluminija. Raziskava je pokazala, da je za razliko od bolj jasnih korelacij med kislostjo in bogastvom vrst pri višjih trofičnih nivojih, pregled zgradbe bakterijsko planktonskih združb veliko bolj kompleksen, saj so vanj vpleteni mnogi direktni in indirektni procesi, zato ne moremo sklepati, da se z zakisanjem bakterijska raznolikost zmanjša (F. Percent in sod., 2008).

2.4.2 Fizikalni dejavniki

2.4.2.1 Strižne sile

Na oblikovanje raznolikosti mikrobnih združb pri sladkovodnih biofilmih vplivajo strižne sile. Razvoj biofilmov, ki vsebujejo različne vrste bakterij, poteka v počasi in hitro tekočih vodah. Bakterijska raznolikost in velikost strižnih sil sta si v obratnem sorazmerju, kar pomeni, da se bakterijska raznolikost znotraj biofilmov z naraščanjem strižnih sil zmanjšuje (Cloete, 2003; Liu, 2002; Rickard, 2003; Soini, 2002). Raznolikost vrst znotraj biofilmov pa je odvisna tudi od sposobnosti bakterijskih celic za avtoagregacijo ali/in koagregacijo (Rickard in sod., 2004). Proces koagregacije med bakterijami se pojavi ko dva ali več genetsko različnih rodov interagira s specifičnim celica-celica prepoznavanjem. Proces koagregacije in avtoagregacije vodita v nastanek biofilmov (Rickard in sod., 2002). Medtem ko se s povečevanjem strižnih sil v vodi raznolikost biofilmov zmanjšuje, se delež bakterij, ki so sposobne avtoagregacije in koagregacije, močno spreminja. Tako je delež bakterij, ki avtoagregirajo znotraj biofilmov, v obratnem sorazmerju s strižnimi silami. Delež bakterij, ki koagregirajo, pa je največji ob srednje močnem vodnem toku. Sila vodnega toka in z njim povezane strižne sile vplivajo na raznolikost biofilmov. Sposobnost agregacije je eden izmed pomembnih dejavnikov pri tvorbi biofilmov ob visokih strižnih silah (Rickard in sod., 2004).

2.4.3 Biotski dejavniki

Na rast in razvoj bakterijskih združb v vodnih ekosistemih vplivajo ne le fizikalni in kemijski dejavniki, ampak mnogokrat tudi biotski. Ob cvetenju alg diatomej se bakterijska raznolikost spreminja; nekatere vrste izginejo in pojavijo se nove (Riemann, Winding, 2001). Na bakterijsko združbo v reki, lahko vplivajo tudi virusi (van Hannen in sod., 1998) in protozoji (Hahn in Höfle, 2001). Prehranjevalne navade protozojev v vodnih ekosistemih lahko vplivajo na morfološko zgradbo bakterijske združbe, pri čemer se spremeni taksonomska sestava združb in bakterijska aktivnost. Vpliv protozojev na bakterijske združbe je selektiven, zaradi razlik v občutljivosti bakterijskih vrst na hranjenje protozojev, razlik v odgovoru posamezne bakterijske populacije na hranjenje (velikost in

fiziologija), zaradi direktnega vpliva hranjenja (hranjenje protozojev z bakterijami) in indirektnega vpliva hranjenja (hranjenje protozojev z enakim substratom, kot ga potrebujejo bakterije za svojo rast in s tem spreminjanje njihovih pogojev v danem okolju) ter zaradi tekmovanja med bakterijami (eliminacija kompetitorjev) (Hahn in Höfle, 2001).

2.5 MOLEKULARNE METODE

Razvoj molekularnih tehnik je močno razširil izbor metod za preučevanje genov in njihovih funkcij. Omenjene tehnike vključujejo metode za izolacijo DNK in identifikacijo posameznih področij DNK, ki kodirajo specifične funkcije (Synder, Champness, 2003). Za uporabo metode PCR v realnem času (qPCR) smo se odločili, ker z visoko stopnjo ločljivosti omogoča hitro detekcijo specifičnega gena in njegovo kvantifikacijo.

2.5.1 PCR v realnem času (qPCR)

qPCR je metoda, ki se v molekularni biologiji uporablja za pomnoževanje in sočasno kvantifikacijo tarčne DNK molekule. Ta tehnika bazira na osnovni polimerazni verižni reakciji in omogoča detekcijo in kvantifikacijo specifične sekvence v DNK vzorcu. Za detekcijo pomnožene sekvence DNK se uporabljajo barvila, ki se vežejo na dvoverižno DNK (dsDNK) in ob vezavi na dsDNK fluorescirajo. Tako povečanje količine DNK produkta med PCR reakcijo, vodi v povečanje intenzitete fluorescence. Intenziteta fluorescence se meri na koncu vsakega posameznega cikla in tako omogoča kvantifikacijo koncentracije DNK. Dvoverižna DNK barvila kot je SYBR Green se lahko vežejo na vse dsDNK produkte, tudi na nespecifične PCR produkte (npr. primerski dimeri), kar lahko potencialno onemogoča dejansko kvantifikacijo zelene tarčne sekvence. Vendar pa kakovost pomnožka in s tem prisotnost morebitnih dimerov lahko preverimo z disociacijsko krivuljo. qPCR se lahko uporablja tako v diagnostične kot tudi v raziskovalne namene.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

Za izvedbo posamičnih faz meritev smo uporabili spodaj naštet material:

Izolacija DNK:

SmartHelix™ Nucleic Acid Extraction Kit

Čiščenje DNK:

HSTE pufer:

10 mM TRIS-HCl

1 mM EDTA

100 mM NaCl

pH 8

Sephadex G-100, for molecular biology, DNK grade (Sigma-Aldrich)

1 ml injekcijske brizge

ddH₂O

10 M amonijev acetat

96% etanol

80% etanol

Meritve celokupnih koncentracij DNK v vzorcih:

Quant-iT™ dsDNK HS Assay Kit

PCR v realnem času:

oligonukleotidni začetnik A1S-nF

oligonukleotidni začetnik A5-nR

2 x Master Mix Power Sybr Green (Applied Biosystems)

3.2 VZORČENJE

Nabiranje vzorcev je potekalo vzdolž reke Idrijce. Za preverjanje sezonske dinamike količine gena *merA* smo določili 5 lokacij: Bela, Idrija, Sp. Idrija, Želin in Most na Soči

(slika 3.1). Na vsakem vzorčnem mestu smo s treh kamnov podobnih velikosti z zobno ščetko postrgali biofilm in ga shranili v sterilne plastenke ter zajeli 0,5 l vode v novo sterilno plastenko. Dne 8.9.2007 smo vzorčili po 3 paralelke biofilmov (3x3 kamni) na vzorčno mesto, pri ostalih vzorčenjih (18.7.2006, 15.9.2006, 20.2.2007) pa posamezne biofilme (1x3 kamni).

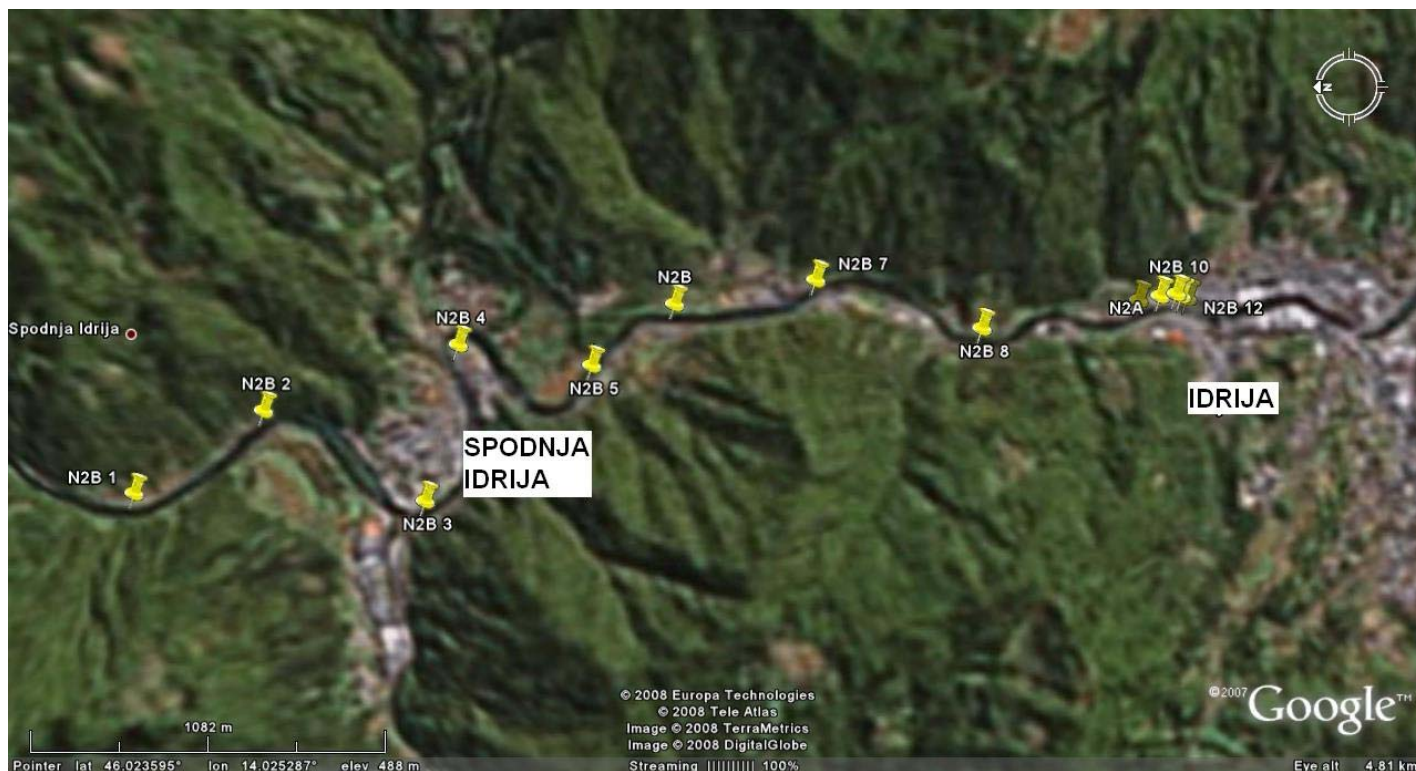
Za preverjanje sezonske dinamike količine gena *merA* smo poleg biofilmov zraslih na kamnih predvideli tudi meritve količine gena v vzorcih biofilmov zraslih na umetnem substratu steklu. Tako smo pred prvim vzorčenjem namestili na vseh petih zgoraj omenjenih lokacijah stekelca velikosti 20x20 cm. Stekelca nameščena na mestu 4 niso bila nikoli vzorčena, saj jih je odnesla voda, postopoma med enim in drugim datumom vzorčenja pa so se stekelca izgubila tudi na ostalih vzorčnih mestih, zato primerjave med stekelci ni bilo mogoče narediti.

Pri gradientnem določevanju količine iskanega gena smo vzorce nabrali na 12 lokacijah med Želinom in Idrijo, medsebojno oddaljenih 0,5 km. Koordinate vzorčnih mest so prikazane v tabeli (tabela 3.1; slika 3.2). Pri gradientnem vzorčenju smo nabirali le obrasti treh kamnov na posamezni lokaciji, ne pa tudi vodnih vzorcev.

V laboratoriju smo po 0,5 l posameznega vodnega vzorca prefiltrirali skozi sterilni filter s porami velikosti 0,22 μm . Filtre smo shranili v sterilne petrijevke in jih zamrznili na -20°C . Vzorce sedimenta pa smo prelili v 50 ml centrifugirke in jih centrifugirali na 4°C , 10000 obratov/min, 10 min. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant in vzorce zamrznili na -20°C .



Slika 3.1: Zemljevid z označenimi vzorčnimi mesti.



Slika 3.2: Posnetek iz zraka z označenimi vzorčnimi mesti.

Tabela 3.1: Koordinate vzorčnih mest. Mesto N2B 12 se nahaja v bližini mesta Idrija, N2B 1 pa pri Želinu.

oznaka vzorčnega mesta	zemljepisna dolžina (Lon)	zemljepisna širina (Lat)
N2B 1	14,01982	46,04297
N2B 2	14,02374	46,03864
N2B 3	14,01943	46,03337
N2B 4	14,02684	46,03228
N2B 5	14,02583	46,02789
N2B	14,02870	46,02516
N2B 7	14,02979	46,02053
N2B 8	14,02754	46,01508
N2B 13	14,02877	46,00994
N2A	14,02898	46,00923
N2B 10	14,02912	46,00870
N2B 11	14,02889	46,00835
N2B 12	14,02904	46,00854

Tabela 3.2: Seznam vzorčnih mest z oznakami vzorcev.

Številka vzorčnega mesta	Oznaka vzorca bioflma	Oznaka vzorca vode
1	N1	V1
2a	N2A	V2A
2b	N2B	V2B
3	N3	V3
4	N4	V4

3.3 IZOLACIJA DNK IN ČIŠČENJE IZOLIRANE DNK

Izolacija DNK iz vzorcev sedimenta in vodnih vzorcev je bila narejena po protokolu SmartHelix™ Nucleic Acid Extraction Kit (Venturia, Slovenija), ki je namenjen izolacijam DNK iz kompleksnih vzorcev. Izolacija DNK iz sedimentov je bila narejena iz 0,5 ml vzorca, izolacija DNK vodnih vzorcev pa je bila narejena iz filtrov premera 47 mm, skozi katere je bilo prefiltrirano 500 ml (vzorci nabrani 8.9.2007) oz. 300 ml (vzorci nabrani

18.7.2006, 15.9.2006 in 20.2.2007) vode. Izolirano DNK iz sedimenta smo nato očistili po naslednjem protokolu:

1. Priprava kolon:

- Sephadex G-100, for molecular biology, DNK grade (Sigma-Aldrich) smo rehidrirali v HSTE pufru (minimalno 5 h)
- nato smo nabrekle kroglice Sephadexa 3 krat sprali v HSTE pufru
- po zadnjem spiranju smo dodali toliko pufra HSTE, da je prekril kroglice in vse skupaj avtoklavirali
- sterilne kroglice smo napipetirali v 1,2 ml injekcijsko brizgo, katero smo na spodnjem koncu zamašili s sterilno vato oblikovano v kroglico
- vse skupaj smo centrifugirali pri 130 g, 8°C, 10 min – ta postopek smo 3x ponovili tako, da smo na koncu dobili približno 1 ml veliko kolono
- kolono smo nato 2x sprali s 100 µl sterilnega HSTE pufra (med spiranjem smo kolone centrifugirali na 130 g, 10 min)

2. Čiščenje vzorcev:

- 50 µl vzorca smo dodali 150 µl ddH₂O
- kolone smo namestili v steklene centrifugirke, v katere smo predhodno namestili epice brez pokrovčkov in jih avtoklavirali
- 100 µl vzorca smo napipetirali v kolono (za vsak vzorec smo imeli 2 koloni) in centrifugirali pri 130 g, 4°C, 10 min
- vzorec smo nato 3 x sprali s 100 µl sterilnega HSTE pufra (centrifugirali pri 130 g, 4°C, 10 min)
- vzorec, ki se je nabral v epici na dnu centrifugirke, smo prestavili v sterilno epico s pokrovčkom in mu dodali ¼ skupnega volumna vzorca amonijevega acetata in 2x volumen 96% ohlajenega etanola
- vzorce smo precipitirali 1 uro
- po precipitaciji smo centrifugirali vzorce pri 14000 rpm, 25 min, 4°C
- supernatant smo odlili in vzorcu dodali 750 µl ohlajenega 80% etanola
- nato smo centrifugirali pri 14000 rpm, 25 min, 4°C
- vzorcem smo odstranili supernatant in pelete posušili ob ognju
- pelete smo nato raztopili v 50 µl ddH₂O in jih shranili na -20°C

3.4 MERITVE CELOKUPNIH KONCENTRACIJ DNK V POSAMEZNEM VZORCU

Pri vseh vzorcih je bila izmerjena celokupna količina DNK z napravo Qubit™ fluorometer (Invitrogen) s Quant-iT™ dsDNK HS Assay Kit (Invitrogen) po navodilih proizvajalca.

3.5 PCR V REALNEM ČASU (qPCR)

S qPCR smo pomnožili in kvantitativno ocenili koncentracijo gena *merA*. Mešanica za qPCR je vsebovala:

- 600 nM oligonukleotidni začetnik A5-nR,
- 600 nM oligonukleotidni začetnik A1S-nF,
- 2 x Master Mix Power Sybr Green (Applied Biosystems)
- ddH₂O

Celokupni volumen qPCR mešanice za 1 vzorec je bil 29 µl. V vsako jamico smo nanegli 1 µl vzorca.

Program za qPCR je bil:

1. inkubacija: 50°C 2 min
2. denaturacija: 95°C 10 min
3. denaturacija: 94°C 10 s
4. prileganje: 62°C 1 min 50 ciklov
5. disociacija: 95°C 15 s
6. disociacija: 60°C 1 min
7. disociacija: 95°C 15 s

qPCR je bil narejen z napravo 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA). Kvantitativni PCR za vzorce biofilmov nabranih 18.7.2006 pa je naredil Aleš Lapanje na napravi 7900 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA) na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Kot standard je bil uporabljen plazmid pR831b.

3.5.1 Kvantifikacija gena *merA* glede na celokupno koncentracijo DNK v vzorcu

Kvantifikacija gena *merA* je bila relativna. Vzorce smo normirali glede na vzorec z najvišjo celokupno koncentracijo DNK.

3.5.2 Kvantifikacija gena *merA* glede na koncentracijo 16S v vzorcu

S qPCR smo pomnožili vse vzorce z oligonukleotidnimi začetniki za gen *merA* in prav tako vse vzorce z oligonukleotidnimi začetniki za 16S in tako naredili kvantifikacijo gena *merA* glede na bakterijsko DNK v posameznem vzorcu. Oligonukleotidni začetniki za 16S so bili U968normal in L1401 koncentracije 600 nM. Program za qPCR je bil enak kot pri kvantifikaciji gena *merA* glede na celokupno koncentracijo DNK v vzorcu.

3.6 MERITVE CELOKUPNEGA ŽIVEGA SREBRA (Hg_T)

Meritve celokupnega živega srebra so bile narejene na Institutu »Jožef Stefan«, na raziskovalnem odseku Znanosti o okolju O2. Meritve so bile narejene na vzorcih biofilmov iz kamnov nabranih 8.9.2007.

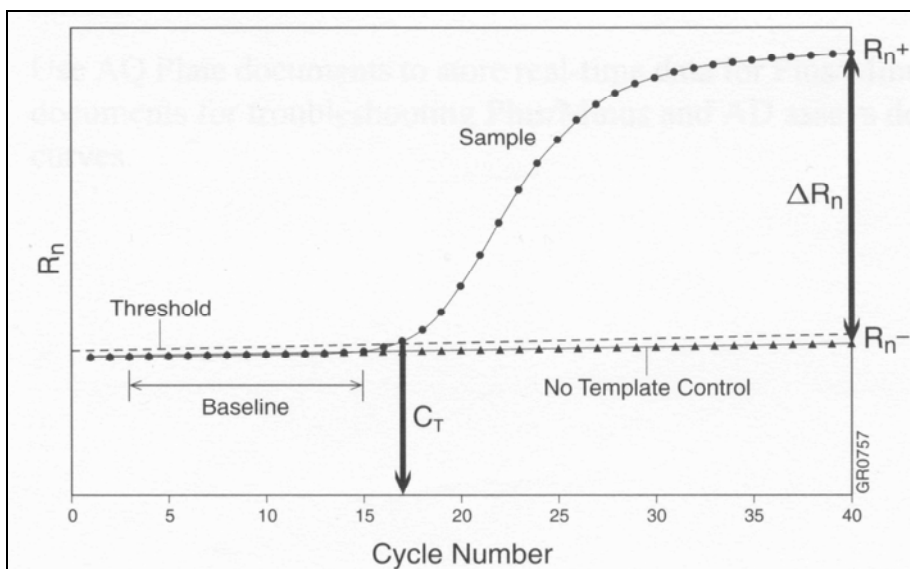
Vzorci so bili liofilizirani pri temperaturi -50°C in tlaku 0.030 bar. 0.1 – 0.2 g vzorca so razkrojili s 4 ml koncentrirane HNO₃ in pustili stati 1 h pri sobni temperaturi. Nato so vzorce segrevali v zaprtih teflonskih posodah čez noč pri 100°C. Po segrevanju so posode napolnili z bidestilirano vodo do oznake (25,8 ml). Hg so določali s tehniko atomske absorpcijske spektrometrije hladnih par (AAS HP). Pri delu je bil uporabljen certificiran referenčni material IAEA-140 (Sea plant homogenate).

4 REZULTATI

4.1 SEZONSKA DINAMIKA KOLIČINE GENA *merA*

Vzorčenja so potekala štirikrat: 17.8.2006, 15.9.2006, 20.2.2007 in 8.9.2007. Pri prvem vzorčenju (17.8.2006) na vzorčnem mestu 4 ni bil vzorčen biofilm na kamnih in stekelcih. Stekelca nameščena na mestu 4 niso bila nikoli vzorčena, saj jih je odnesla voda, postopoma med enim in drugim datumom vzorčenja pa so se stekelca izgubila tudi na ostalih vzorčnih mestih, zato primerjave med stekelci ni bilo mogoče narediti.

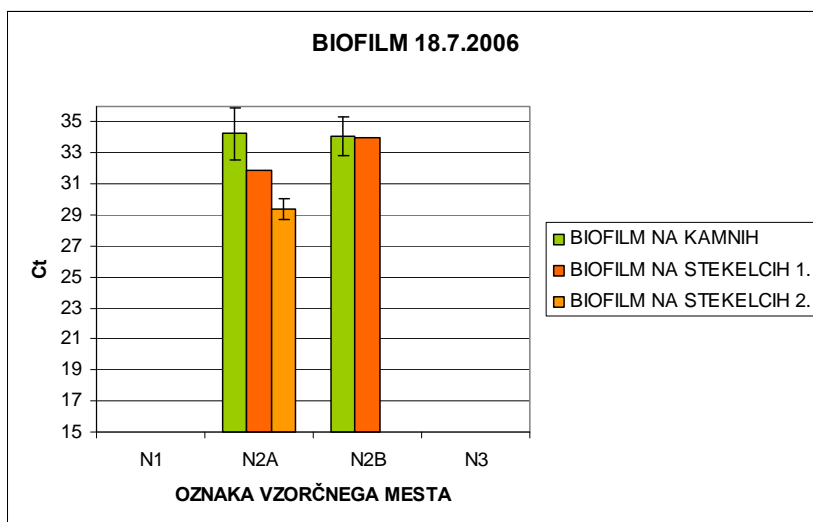
Grafi nam prikazujejo cikle pri katerih pomnožitvena krivulja seka prag (C_T ; threshold cycle) za posamezna vzorčna mesta. C_T je cikel, pri katerem fluorescenca preseže mejno vrednost (slika 4.1). Višji kot je C_T , manj je prisotnega gena *merA*. Rezultati so obdelani relativno.



Slika 4.1: Slika prikazuje graf odvisnosti R_n od števila ciklov, pri čemer R_n predstavlja razmerje med intenziteto fluorescence našega vzorca in intenziteto fluorescence referenčnega barvila. Osnovno črto (baseline) predstavljajo začetni cikli PCR, pri katerih je zelo majhna razlika v intenziteti fluorescence vzorca in referenčnega barvila. Prag (threshold) je linija, ki se nahaja nad osnovno linijo in v področju eksponentne rasti pomnožitvene krivulje. C_T je cikel, pri katerem pomnožitvena krivulja seka prag. $\Delta R_n = R_n - \text{baseline}$ (navodila za Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System).

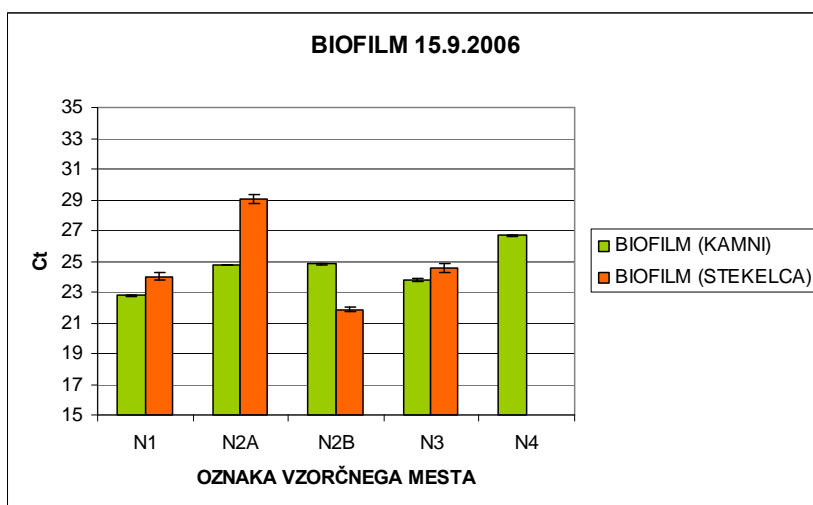
4.1.1 Količina gena *merA* v vzorcih biofilmov

Pri prvem vzorčenju 18.7.2006 je bila količina gena *merA* na vzorčnih mestih 1 in 3 pod mejo detekcije. Med količinama gena na biofilmih kamnov med vzorčnima mestoma 2a in 2b ni značilne razlike. Količina gena *merA* je pri biofilmih iz kamnov višja kot pri biofilmih iz stekelc (slika 4.2).



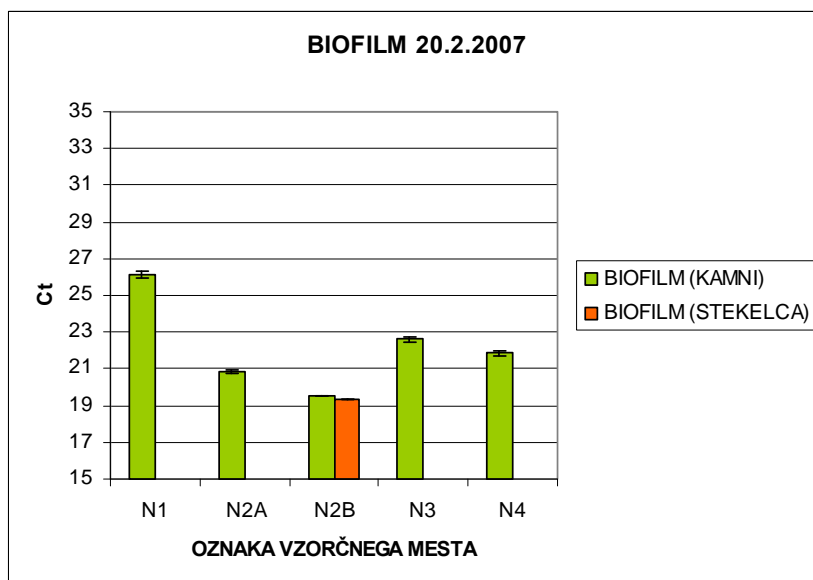
Slika 4.2: Količina gena *merA* pri vzorčenju 18.7.2006. Na vzorčnih mestih N1 in N3 je količina gena pod mejo detekcije.

Ob drugem vzorčenju (15.9.2006) se prav tako kot pri prvem ne kaže značilna razlika v pojavljanju gena med vzorčnima mestoma 2a in 2b. Pri biofilmih iz kamnov je največja količina gena na mestu 3, pri biofilmih iz stekelc pa na mestu 2b. Na mestu 1 se kaže velika količina gena *merA* pri obeh vrstah biofilmov, kar kaže na zelo verjetno kontaminacijo. V skladu s pričakovanji pa je mesto 4, kjer je najnižja količina gena med biofilmi na kamnih (slika 4.3).



Slika 4.3: Količina gena *merA* pri vzorčenju 15.9.2006.

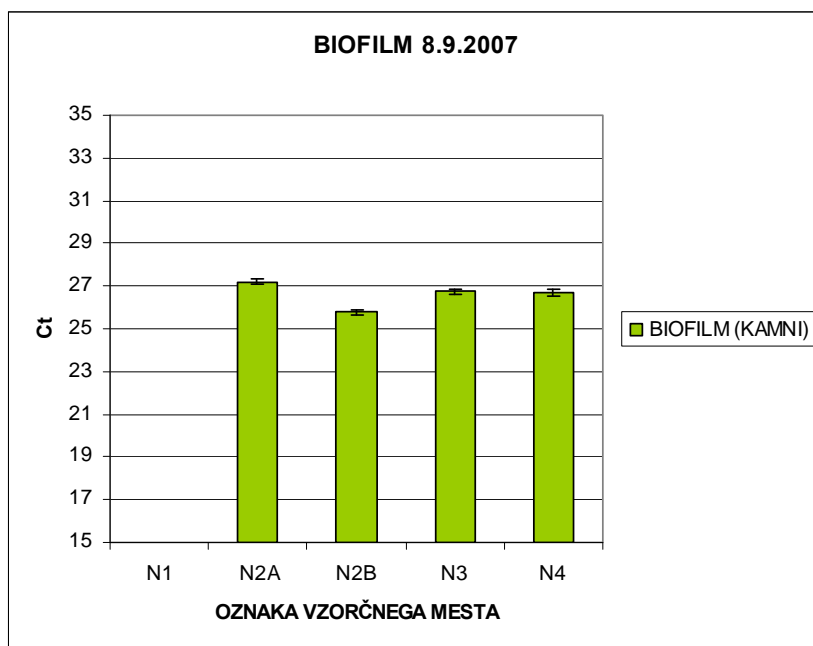
Vzorčenja dne 20.2.2007 se precej razlikujejo od prvih dveh vzorčenj. Po pričakovanjih je količina gena *merA* najnižja na mestu 1, s čimer lahko potrdimo omenjeno kontaminacijo pri vzorčenju 15.9.2006. Količina gena je najvišja na mestu 3, kar nam potrjujejo tudi stekelca. Pojavljanje gena med mestoma 2a in 2b se razlikuje. Nekoliko nižje količine gena so na mestih 3 in 4 (slika 4.4).



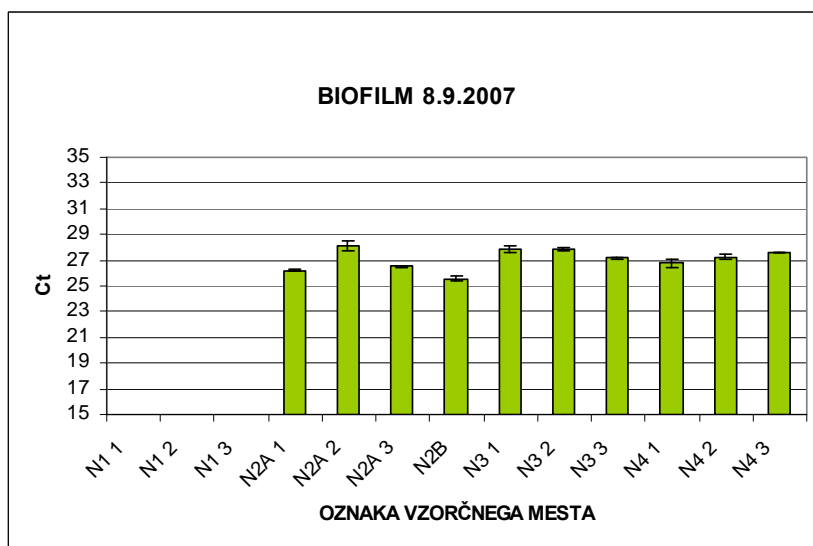
Slika 4.4: Količina gena *merA* pri vzorčenju 20.2.2007.

Zadnje vzorčenje nam prikazuje zelo podobno situacijo kot vzorčenje 20.2.2007. Količina gena je bila prav tako na mestu 1 najnižja, celo pod mejo detekcije. Najvišja količina gena

je bila na mestu 2b. Količini gena med vzorčnima mestoma 3 in 4 sta se minimalno razlikovali. Slika 4.5 nam prikazuje povprečne vrednosti Ct med paralelkami, slika 4.6 pa vse vrednosti posameznih paralelk.

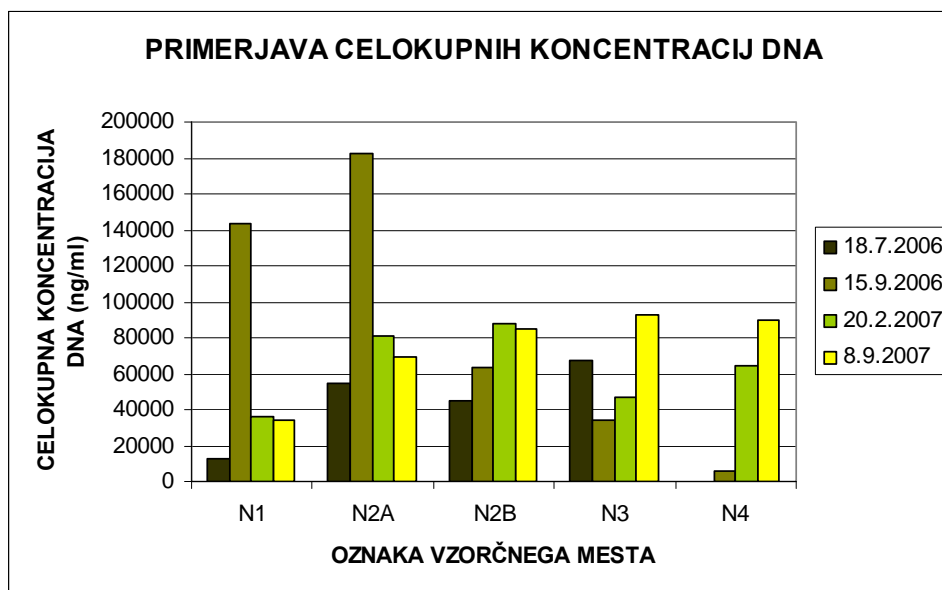


Slika 4.5: Količina gena *merA* pri vzorčenju 8.9.2007. Na vzorčnem mestu N1 je količina gena pod mejo detekcije.



Slika 4.6: Količina gena *merA* pri vzorčenju 8.9.2007. Na vzorčnem mestu N1 (paralelke 1, 2, 3) je količina gena pod mejo detekcije.

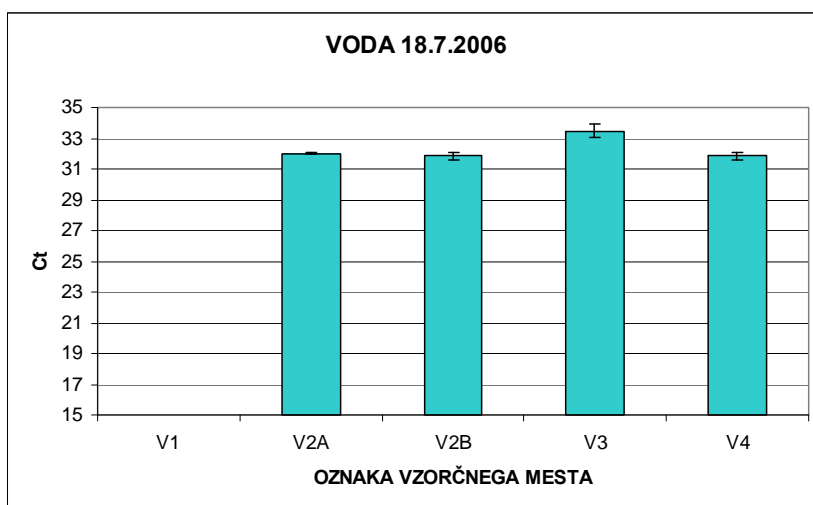
Vse količine gena so bile preračunane glede na celokupne koncentracije DNK v vzorcih. Celokupne koncentracije se sezonsko in lokacijsko spreminjajo. Visoke celokupne koncentracije se kažejo 15.9.2006 kjer močno izstopata mesti 1 in 2a. Po najnižji celokupni koncentraciji pa prav tako izstopa vzorčenje 15.9.2006 na lokaciji 4 (slika 4.7).



Slika 4.7: Celokupne koncentracije DNK v posameznih vzorcih biofilmov ob različnih datumih vzorčenja.

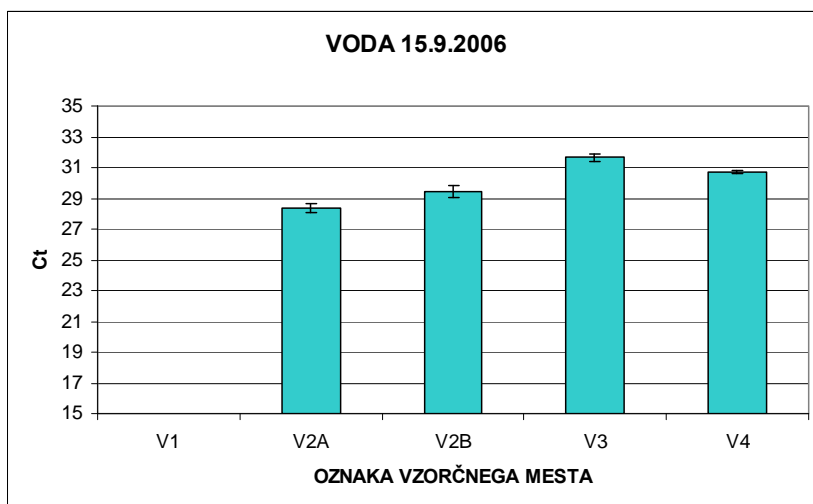
4.1.2 Količina gena *merA* v vodnih vzorcih

Pri vseh štirih datumsko različnih vzorčenjih vode, je bila količina gena *merA* na lokaciji 1 pod mejo detekcije. Rezultati vzorčenja dne 18.7.2006 nam prikazujejo zelo majhne razlike med vzorčnimi mesti. Nekoliko manjša količina gena je le na mestu 3, med preostalimi mesti, razen mesta 1, pa ni značilnih razlik (slika 4.8).



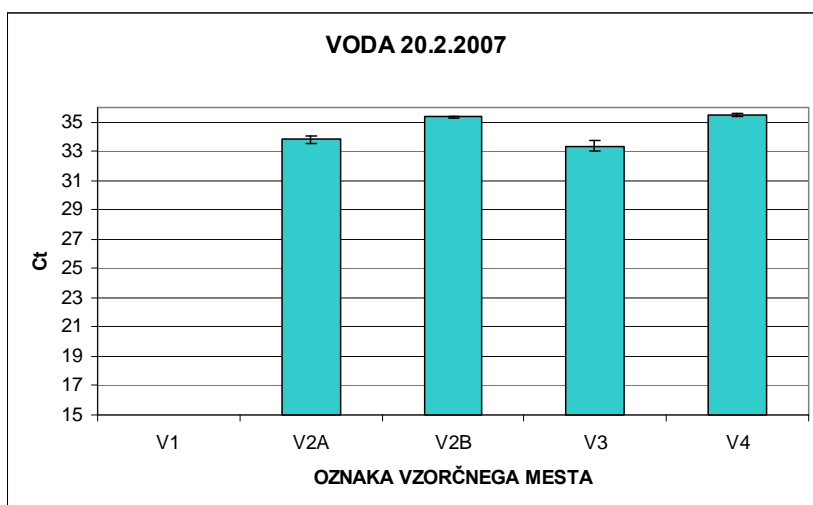
Slika 4.8: Količina gena *merA* v vzorcih vode pri vzorčenju 18.7.2006. Na vzorčnem mestu V1 je količina gena pod mejo detekcije.

Rezultati vodnih vzorcev drugega vzorčenja (15.9.2006) se precej razlikujejo od rezultatov vodnih vzorcev prvega vzorčenja (18.7.2006). Najvišja količina gena je prisotna na mestu 2a, najnižja pa na mestu 3 (slika 4.9).



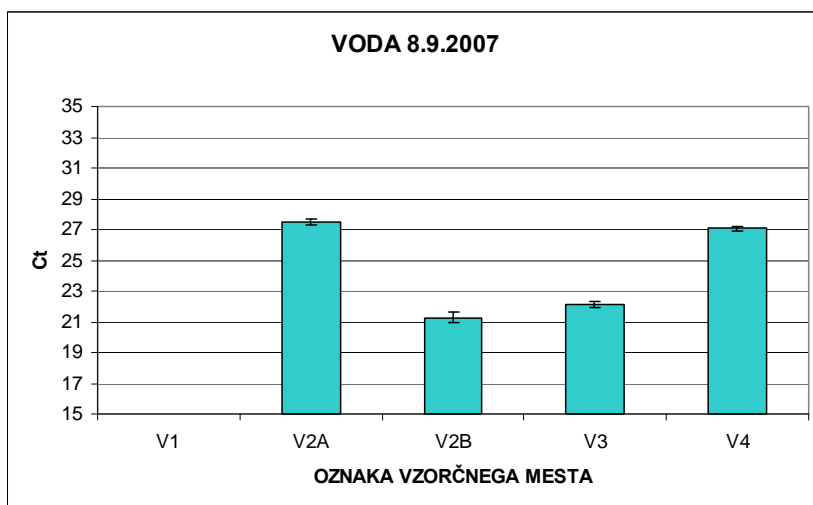
Slika 4.9: Količina gena *merA* v vzorcih vode pri vzorčenju 15.9.2006. Na vzorčnem mestu V1 je količina gena pod mejo detekcije.

Nekoliko drugačen vzorec spreminjanja količin gena *merA* pri vodnih vzorcih med posameznimi vzorčnimi mesti pa nam prikazuje slika 4.10. Najnižja količina gena je prisotna na mestu 3, toda ta je le malenkost nižja od količine na mestu 2a. Prav tako pa je med mestoma 2b in 4 opazna le majhna razlika.



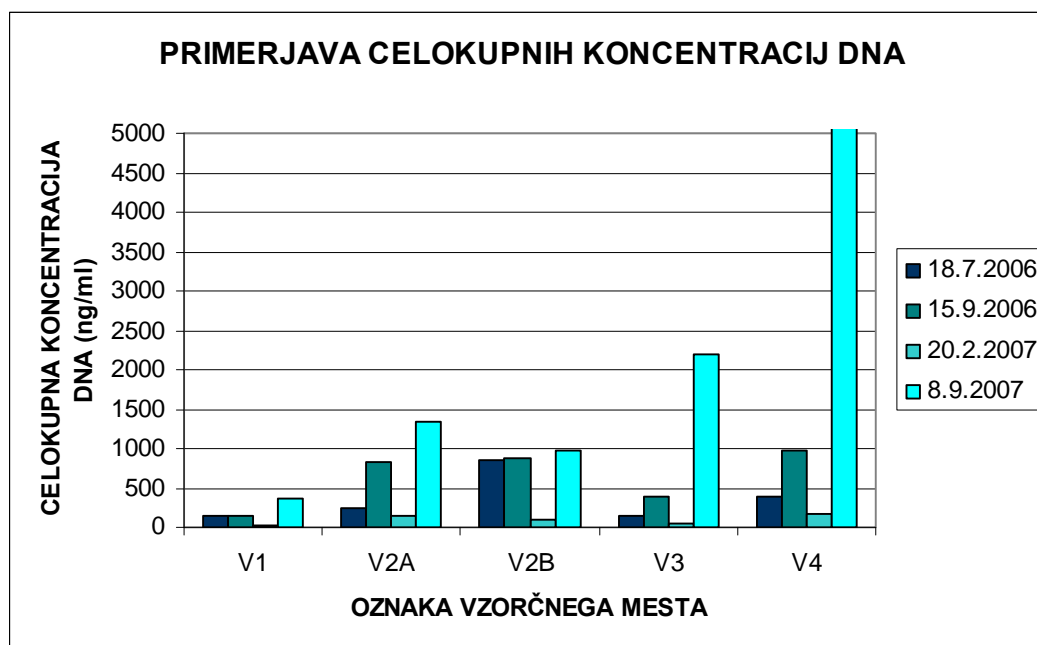
Slika 4.10: Količina gena *merA* v vzorcih vode pri vzorčenju 20.2.2007. Na vzorčnem mestu V1 je količina gena pod mejo detekcije.

Rezultati datuma 8.9.2007 nam jasno prikazujejo najvišje količine gena na vzorčnem mestu 2b, kateremu sledi vzorčno mesto 3. Vzorčno mesto 4 ima nekoliko višje količine gena *merA* kot vzorčno mesto 2a (slika 4.11).



Slika 4.11: Količina gena *merA* v vzorcih vode pri vzorčenju 8.9.2007. Na vzorčnem mestu V1 je količina gena pod mejo detekcije.

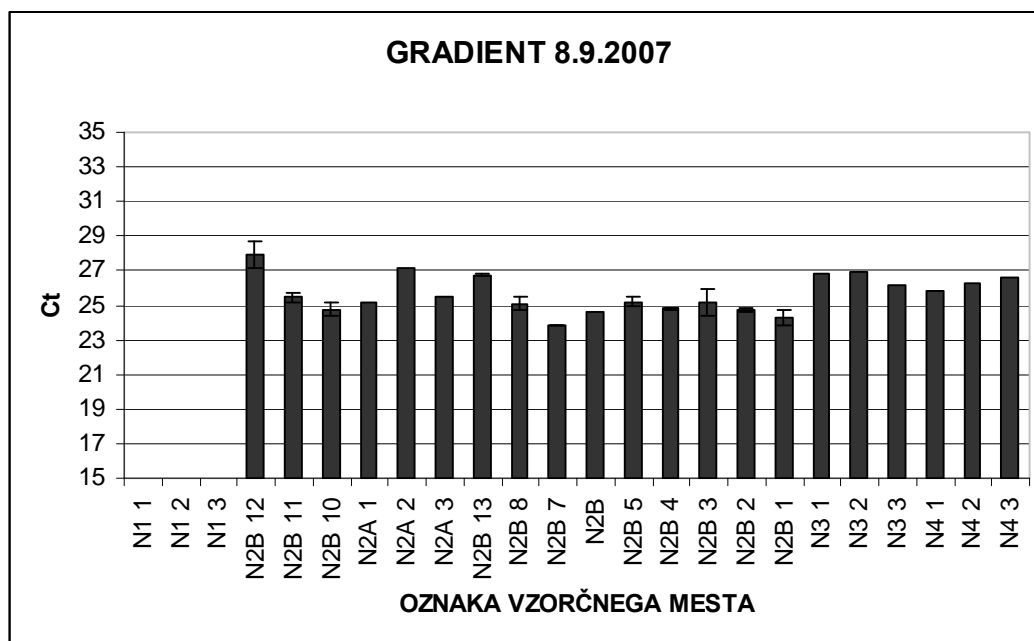
Rezultati celokupnih koncentracij DNK v posameznih vzorcih se sezonsko in lokacijsko spreminjajo. Močno izstopa celokupna koncentracija DNK na mestu 4 pri zadnjem vzorčenju. Pri vseh vzorčnih mestih so najnižje celokupne koncentracije pri vzorcih datuma 20.2.2007, najvišje pa pri vzorcih datuma 8.9.2007 (slika 4.12).



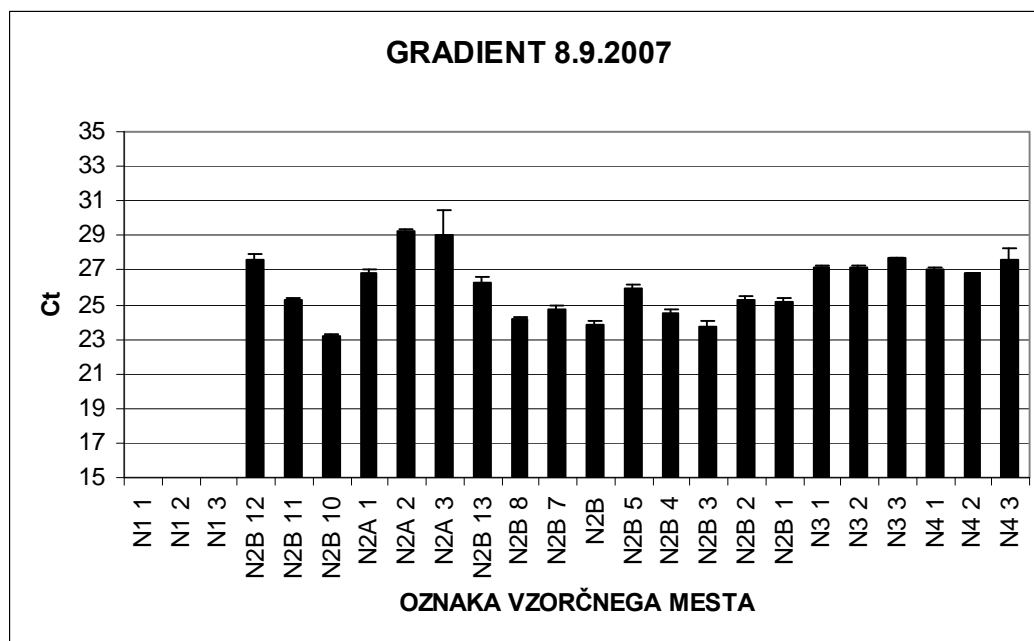
Slika 4.12: Celokupne koncentracije DNK v posameznih vzorcih vode ob različnih datumih vzorčenja.

4.2 GRADIENTNE MERITVE GENA *merA* VZDOLŽ REKE V VZORCIH BIOFILMA

Rezultati gradienta nam prikazujejo spreminjanje količine gena *merA* na razdalji 500 m med vzorčnimi mesti N2B 12 in N2B 1. V to verigo vzorčnih mest sta zajeti tudi vzorčni mesti 2a (= N2A) in 2b (= N2B). Količine gena so bile preračunane na dva različna načina; glede na celokupno koncentracijo DNK v vzorcu in glede na količino pomnožene bakterijske 16S rRNK. Trend spreminjanja količine gena *merA* se med enim in drugim načinom preračunavanja nekoliko razlikuje. Kot lahko vidimo na sliki 4.13, je najnižja količina gena na mestu N2B 12 (nad mestom Idrija) in najvišja na mestu N2B 7. Slika 4.13 nam prikazuje tri prelomna mesta, kjer so količine gena precej visoke v primerjavi z drugimi. Ta mesta so N2B 10, N2B 7 in N2B 1. Slika 4.14 nam prikazuje malenkost drugačno situacijo; najvišje količine se kažejo na mestih N2B 10, N2B IN N2B 3. Nekoliko višje količine so še na mestih N2B 8, N2B 7 in N2B 4. Nižje količine gena se na obeh grafih (slika 4.13 in 4.14) kažejo pri N2B 12, N2B 2, N2B 3, N3 1, 2, 3 in N4 1, 2, 3.

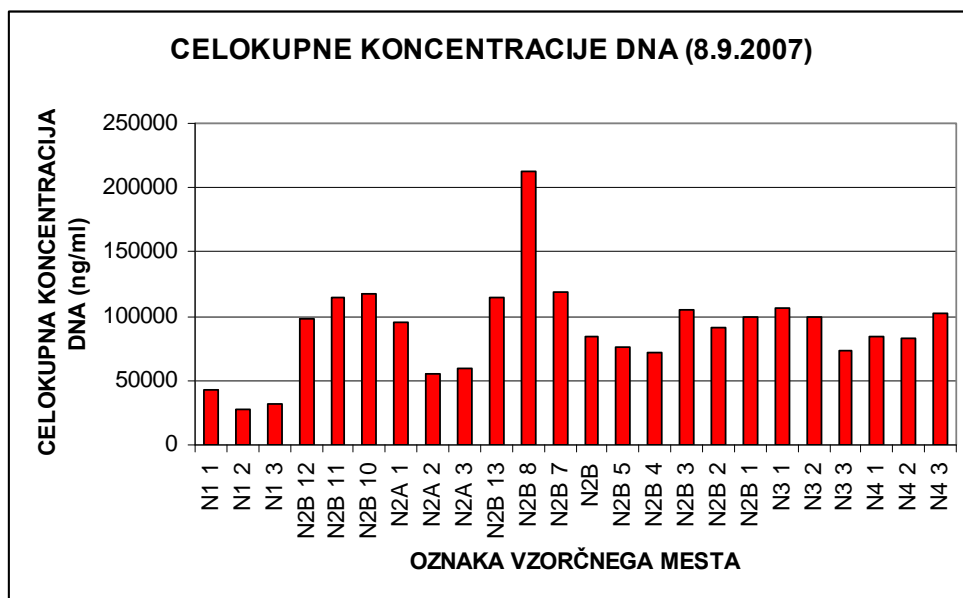


Slika 4.13: Količina gena *merA* na vzorčnih mestih gradienta. Vzorci na grafu si sledijo v smeri toka reke. Vrednosti so podane relativno glede na razmerje celokupne koncentracije DNK v posameznem vzorcu. Na vzorčnem mestu N1 (paralelke 1, 2, 3) je količina gena pod mejo detekcije.



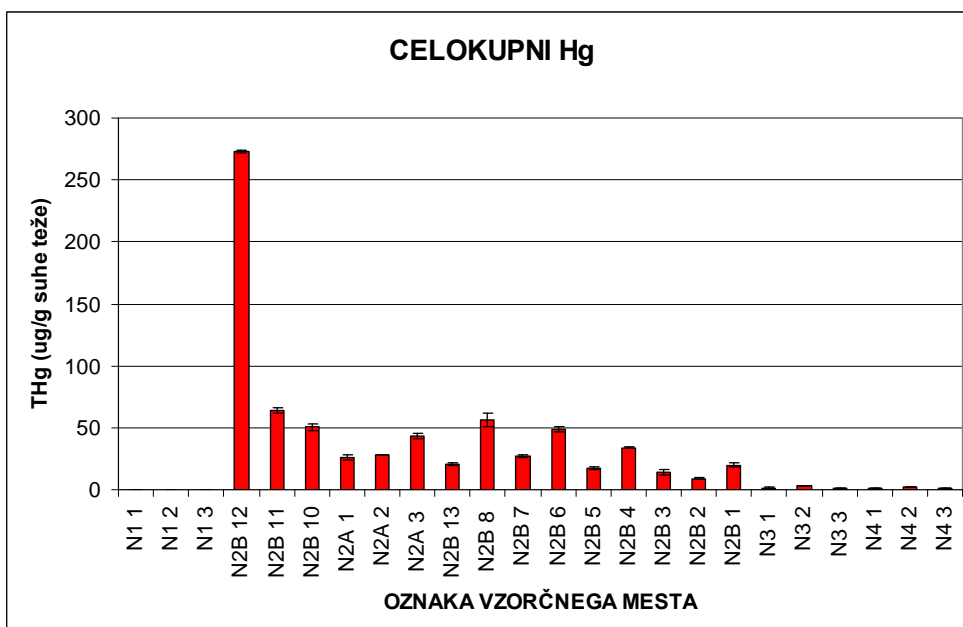
Slika 4.14: Količina gena *merA* na vzorčnih mestih gradienta. Vzorci na grafu si sledijo v smeri toka reke. Vrednosti so podane relativno glede na razmerje 16S rRNA v posameznem vzorcu. Na vzorčnem mestu N1 (paralelke 1, 2, 3) je količina gena pod mejo detekcije.

Celokupne koncentracije DNK se med mesti razlikujejo. Najbolj izstopa mesto N2B 8. Najnižje koncentracije so na mestu N1 (slika 4.15).



Slika 4.15: Celokupne koncentracije DNK v posameznih vzorcih gradienta.

Meritve celokupnega živega srebra kažejo na močno povečano koncentracijo Hg_T na mestu N2B 12. vzdolž reke proti Mostu na Soči sledi trend zmanjševanja koncentracije Hg_T (slika 4.16).



Slika 4.16: Koncentracija celokupnega Hg v posameznih vzorcih gradienta. Vrednosti THg na vzorčnem mestu N1 (paralelke 1, 2, 3) so majhne (pod 0,2 $\mu\text{g/g}$ suhe teže), tako da se na grafu ne razločijo.

Ob vzorčenju vzorcev gradienta dne 8.9.2007 smo spremljali tudi temperaturo vode, pH v vodi, kisik v vodi in vodni pretok. Temperatura vode se je tekom dneva spreminjala. Gibala se je v mejah med 12 in 18,8°C. Na vzorčnem mestu 4 je bila najvišja. Med ostalimi vzorčnimi mesti, pa se ni bistveno spreminjala. pH vode je bil rahlo bazičen. Vrednosti so bile v mejah med 8,2 do 8,8. Koncentracija kisika v vodi se je zelo malo razlikovala med posameznimi vzorčnimi mesti. Vrednosti so bile od 10,3 mg/l – 14,17 mg/l. Prevodnost se je na različnih lokacijah izvajanja meritev gibala okrog vrednosti 500 in 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Naša raziskava je pokazala, da v okoljih s povišano koncentracijo živega srebra v večjem številu živijo bakterije z odpornostjo na živo srebro, saj vsebujejo gen *merA*. Iz rezultatov meritev količine gena *merA* v vodi in biofilmih je razvidno, da je pojavljanje gena v zgornjem toku reke Idrijce (vzorčno mesto 1) najmanjše ali celo pod mejo detekcije. Pojavljanje gena se močno poveča na vzorčnih mestih 2a, 2b in 3, kar lahko povežemo z meritvami koncentracij celokupnega živega srebra (Hg_{-T}) in metil-Hg (Žižek, 2007). Uporaba metode qPCR je pokazala, da je mogoče s to metodo zaznati razmeroma majhne razlike v količini gena *merA* (slika 4.13 in 4.14).

Rezultati vzorčenja 18.7.2006 se precej razlikujejo od rezultatov preostalih vzorčenj. Predvsem izstopa rezultat pri meritvah količine gena *merA* biofilmov na vzorčnem mestu 3, ki je bil pod mejo detekcije (slika 4.2). Vzrok lahko iščemo v takratni uporabi druge qPCR naprave, kot je bila uporabljena v preostalih meritvah. Razlike s preostalimi vzorčnimi mesti se kažejo tudi v precej manjših količinah *merA* gena na vzorčnih mestih 2a in 2b v primerjavi s preostalimi meritvami (slika 4.3, 4.4., 4.5) in tudi v majhnih celokupnih koncentracijah (slika 4.7). Vse te ugotovitve lahko povežemo s takrat še ne dodobra utečenim protokolom za vzorčenje.

Rezultati vzorčenja 15.9.2006 so delno že potrdili našo hipotezo, saj se kažejo visoke količine gena med mesti 2a in 3 ter nižje na mestu 4 (slika 4.3). Na sliki 4.3 je sicer vidna najvišja količina gena *merA* na mestu 1, če gledamo biofilme iz kamnov, toda to lahko verjetno razložimo z možnostjo kontaminacije vzorca med postopkom priprave vzorcev za qPCR. V nadaljevanju so preostala vzorčenja dokazovala našo predpostavko z rezultati vzorčnega mesta 1, ki vsebujejo zelo nizke količine analiziranega gena (slika 4.4), ali pa so pod mejo detekcije (slika 4.5).

Sliki 4.4 in 4.5 v celoti podpirata našo hipotezo, da je pojavljanje gena *merA* v zgornjem toku reke Idrijce manjše, kot v spodnjem toku. Pri obeh vzorčenjih (20.2.2007 in 8.9.2007) je najvišja količina gena na mestu 2b ter enak trend spreminjanja količine gena med vzorčnimi mesti.

Pri rezultatih vodnih vzorcev se kažejo različni trendi spreminjanja količine gena *merA*. Znano je, da so bakterije, ki živijo planktonski način življenja, slabše prilagojene na vplive težkih kovin, saj so z njimi le v bežnem kontaktu (Houba in Remacle, 1980; Hornor in Hilt, 1985). Pri vzorčenju 18.7.2006 je najnižja količina gena na mestu 3, prav tako se takšen trend pokaže tudi pri rezultatih vzorčenja 15.9.2007 (slika 4.8, 4.9). Pri obeh omenjenih vzorčenjih se količina gena *merA* na mestu 4 spet nekoliko poveča v primerjavi z mestom 3. Za nekoliko zmanjšano količino gena *merA* na mestu 3 je lahko vzrok pritok rečice Cerknica pri Želinu. Pri vzorčenjih 20.2.2007 in 8.9.2007 se kaže nekoliko drugačen trend spreminjanja količine gena *merA*. Najvišje količine se kažejo na mestu 3 (slika 4.10) in mestu 2b (slika 4.11). Na sliki 4.11 je opazen velik preskok v pojavljanju iskanega gena med mestoma 2a in 2b. Količina gena na mestu 2b je znatno višja od količine na mestu 2a. Predvidevamo, da je vzrok za ta preskok talilnica cinobaritne rude, ki se nahaja ob reki Idrijci malo pod našim vzorčnim mestom 2a.

Na vse rezultate močno vplivajo različni okoljski dejavniki in vzorčenje. Rezultate bi lahko izboljšali, oz. jih naredili med seboj bolj primerljive, s povečanim številom vzorčenj in s povečanjem števila paralelk, saj so vidne kar precejšnje razlike med paralelkami znotraj enega vzorčnega mesta (slika 4.6). Koristilo bi tudi upoštevanje vremenskih podatkov, kar pomeni, da bi poskušali vzorčiti ob približno enakem vodostaju, saj le-ta lahko vpliva na meritve količine gena *merA*. Koristna bi bila pogostejša vzorčenja na krajše časovne presledke, saj se v rezultatih kaže sezonska dinamika nihanja koncentracij gena med vzorčnimi mesti. Pomembno vplivajo na rast mikrobnih združb v biofilmih in s tem na prisotnost iskanega gena tudi številni fizikalni, kemijski in biološki parametri. Močne strižne sile, ki se lahko pojavljajo v sredini rečne struge in ob močnih deževjih, upočasnijo rast biofilmov (Rickard in sod., 2004). Pomanjkanje kisika v vodi, kar je značilno predvsem ob virih onesnaženja, vodi v razvoj anaerobnih bakterij in zavira razvoj aerobnih (Madigan in sod., 2003). Bakterije, pri katerih so do sedaj odkrili odpornost na živo srebro,

pa so aerobne (Lapanje, 2005). Na rezultate lahko vpliva tudi način vzorčenja, kar se še posebno pozna pri vzorčenju vode. Če vzorčimo vodo bolj na dnu reke in se po vsej verjetnosti dotikamo rečnega dna, zajamemo večje število bakterijskih celic, in s tem gena *merA*, kot če bi vzorčili bližje gladini vode. Vsekakor je dejavnikov, ki vplivajo na spreminjajoče se količine gena med datumi vzorčenja veliko, vendar se pri vseh vzorčenjih kaže trend povečanega pojavljanja gena na vzorčnih mestih 2a, 2b in 3, s tem, da se najvišja količina gena premika znotraj teh treh vzorčevalnih mest.

Da bi ugotovili, zakaj in kje prihaja do preskokov v količinah iskanega gena, smo izvedli še gradientno vzorčenje in meritve *merA* gena. Znano je namreč, da je gradientno spreminjanje koncentracij težkih kovin najlažje spremljati ravno v rekah (Dean-Ross in Mills, 1989). Rezultati kvantifikacije gena *merA* glede na celokupno koncentracijo DNK v vzorcu in kvantifikacije gena *merA* glede na koncentracijo bakterijske 16S rRNA v vzorcu, kažejo na zelo podoben trend spreminjanja količine iskanega gena med vzorčnimi mesti N2B 1 in N2B 13. Med vzorčnima mestoma 3 in 2a pride do treh viškov v koncentraciji *merA* gena (slika 4.13, 4.14). Prvi prelom se zgodi tik pred vzorčnim mestom 2a (vzorčno mesto N2B 10), nato pa količina iskanega gena sunkovito pade, tako da je na mestu 2a že spet nizka. Naslednji preobrat se zgodi ob mestu 2b in N2B 7 (pri Domu starejših občanov Idrija), zadnji pa pri mestu N2B 1 in N2B 3. Na mestu 3 se količina ponovno zmanjša, čemur bi lahko pripomogel že prej omenjeni pritok rečice Cerknice. Na postopno zmanjševanje onesnaženosti z živim srebrom vzdolž reke Idrijce opozarja tudi slika 4.16, ki prikazuje koncentracije celokupnega živega srebra (Hg_T). Meritve Hg_T so na vzorčnem mestu N1 in med vzorčnimi mesti N2B 8 in N4 po reki navzdol v korelaciji z meritvami pojavljanja *merA* gena. Na mestu N2B 12 so opazne močno povečane koncentracije in pa razmeroma majhne količine gena *merA*. Znatno povečana koncentracija Hg_T je lahko posledica napake v samem postopku. Tako kot na druge meritve, tudi na meritve Hg_T namreč vplivajo številni dejavniki. Zaradi značilnosti Hg, da se združuje v kapljice, zelo težko določimo realno koncentracijo Hg_T v vzorcu, saj ni enakomerno porazdeljen po površini. Sicer pa je na tem mestu visoka koncentracija Hg_T več kot očitna, saj ga je mogoče celo najti na rečnih brežinah v obliki kapljic. Morda pa so tu količine Hg tako visoke, da tudi bakterije ne morejo vzpostaviti rezistence, ali pa je tamkajšnja oblika živega srebra nedostopna mikroorganizmom.

Vpeljava molekularnih metod za zaznavanje onesnaženosti okolja z živim srebrom ima lahko zelo velik pomen v prihodnosti. Živo srebro se nalaga v prehranjevalne verige (Madigan in sod., 2003; Barkay, 2003), kjer so bakterije prvi člen, s katerim se hranijo živali. Že dolgo je znano, da se živo srebro nalaga v ribah (Naglič, 2005). S poznavanjem bakterijske onesnaženosti z živim srebrom lahko določimo rizična območja lovljenja živali za prehrano ljudi. S prehranjevanjem z živalmi, ki so kontaminirane z zelo nevarnim metil-Hg, vnesemo to obliko živega srebra v človeško telo. Metil-Hg prehaja skozi možgansko bariero v možgane, kjer deluje kot nevrotoksin (Barkay, 2003; Madigan in sod., 2003; Boening, 2000; Clarkson, 2002). Ugotavljanje onesnaženosti okolja preko rezistence bakterijskih združb (meritev količine gena *merA*) je lahko zelo koristno, saj se bakterije od vseh organizmov najhitreje prilagajajo spremembam v okolju. Metoda qPCR omogoča natančno detekcijo genov, ki so odgovorni za rezistenco. S qPCR lahko časovno in prostorsko natančno spremljamo spreminjanje koncentracije specifičnega gena in tako spremljamo tudi samo onesnaženost okolja in sklepamo kakšne so možne kontaminacije organizmov višjih taksonomskih skupin. Visoka ločljivost qPCR metode za določanje gena *merA* v primerjavi z do sedaj znanimi kemijskimi metodami pomeni večjo relevantnost te metode pri ekosistemskih raziskavah in omogoča meritve gradientnih nihanj v količini specifičnega gena. Poleg vsega naštetega pa bakterije z mehanizmom biotransformacije živega srebra pomembno pripomorejo h dekontaminaciji okolja (Barkay, 2003).

5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov smo postavili naslednje sklepe:

- Količina gena *merA* vzdolž reke Idrijce se sezonsko in lokacijsko spreminja.
- Najnižje količine so bile izmerjene na referenčnem mestu nekoliko pod izviro reke (vzorčno mesto 1), najvišje pa v Spodnji Idriji. Visoke količine iskanega gena se pojavljajo še na mestih 2a (Idrija) in 3 (Želin). Količina gena se od Spodnje Idrije navzdol zmanjšuje.
- Meritve gradienta so pokazale tri mesta, kjer količine gena *merA* dosežajo najvišje vrednosti v območju Idrije in Spodnje Idrije.
- Meritve pojavnosti gena *merA* so od vzorčnega mesta N2B 8 navzdol in na mestu N1 v korelaciji z meritvami koncentracij celokupnega živega srebra (Hg_{-T})
- Količina gena *merA* je lahko pokazatelj onesnaženosti področja z živim srebrom.
- qPCR metoda ima dovolj veliko ločljivost za meritve gradientnih nihanj v količini specifičnega gena.
- Visoka ločljivost qPCR metode za določanje gena *merA*, v primerjavi z do sedaj znanimi kemijskimi metodami, pomeni večjo relevantnost te metode pri ekosistemskih raziskavah in omogoča meritve gradientnih nihanj v količini specifičnega gena.

6 POVZETEK

Živo srebro (Hg) je kovina, ki je že v zelo nizkih koncentracijah toksična za žive organizme (Boening, 2000). Organizmi so razvili različne načine tolerance in odpornosti na živo srebro.

Bakterije poznajo dva načina rasti v okolju; planktonsko in v obliki biofilmov. Znotraj biofilmov poteka komunikacija med bakterijskimi celicami in izmenjava genskega materiala, s čimer si bakterije lahko delijo odpornost na živo srebro. Genotipsko izraženo odpornost na živo srebro določa skupina *mer* genov. *MerA* gen določa encim živo srebrovo reduktazo, ki reducira Hg^{2+} v hlapno obliko Hg^0 . Z biološkimi transformacijami mikroorganizmi pomembno vplivajo na kroženje Hg v okolju in s tem na njegovo dostopnost višjim organizmom (Barkay in sod. 2003).

V raziskavah smo z metodo qPCR ugotavljali prisotnost gena *merA* pri bakterijskih združbah vzdolž reke Idrijce. Meritve smo izvajali na vzorcih biofilmov in vodnih vzorcih. Predpostavljali smo, da se količina gena *merA* vzdolž reke Idrijce sezonsko in lokacijsko spreminja in da ima metoda qPCR dovolj veliko ločljivost za izvajanje meritev gradientnega nihanja količine iskanega gena vzdolž reke.

Z raziskavo smo potrdili lokacijsko in sezonsko nihanje količine *merA* gena. Najnižje količine so bile tik pod izviro reke Idrijce, najvišje pa v Spodnji Idriji. Visoke količine iskanega gena se pojavljajo še na področju Idrije in Želina. Količina gena se od Spodnje Idrije navzdol zmanjšuje. Rezultati gradientnih meritev gena *merA* med Idrijo in Želinom so pokazali obstoj treh lokacij, kjer je pojavljanje iskanega gena najvišje. Podoben trend je bil opazen tudi pri meritvah koncentracije celokupnega živega srebra.

Metoda qPCR nam omogoča hitro detekcijo gena, ki pri bakterijah določa rezistenco na živo srebro. Z njegovo detekcijo lahko sklepamo na onesnaženost okolja z živim srebrom. Visoka ločljivost qPCR metode za določanje gena *merA* v primerjavi z do sedaj znanimi kemijskimi metodami pomeni večjo relevantnost te metode pri ekosistemskih raziskavah in omogoča meritve gradientnih nihanj v koncentraciji specifičnega gena.

7 LITERATURA

- Allison D. 2000. Community structure and co-operation in biofilms, Cambridge University Press, 37 str.
- Applied Biosystems 2005. Absolute Quantification Getting Started Guide, 4 str.
- Baldi F., Pepi M., Filippelli M. 1993. Methylmercury resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* stains in relation to methylmercury degradation. Applied and Environmental Microbiology, 59: 2479-2485
- Barkay T., Olson B.H. 1986. Phenotypic and genotypic adaptation of aerobic heterotrophic sediment bacterial communities to mercury stress. Applied and Environmental Microbiology, 52, 2: 403-406
- Barkay T., Liebert C., Gillman M. 1989. Environmental significance of the potential for *mer*(Tn21)-mediated reduction of Hg^{2+} to Hg^0 in natural waters. Applied and Environmental Microbiology, 55, 5: 1196-1202
- Barkay T., Liebert C., Gillman M. 1992. Conjugal gene transference to aquatic detected by the generation of a new phenotype. Applied and Environmental Microbiology, 59, 3: 807-814
- Barkay T., Miller S.M., Summers A. O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiology Reviews, 779: 1-30
- Biofilm formation and quantitation. Center for Biofilm Engineering, Montana State University: <http://biology.fullerton.edu/biol302/302labf99/biofilm.html> (2.7.2008)
- Boening D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. Chemosphere, 40: 1335-1351
- Bogdanova E., Minakhin L., Bass I., Volodin A., Hobman J.L., Nikiforov V. 2001. Class II broad-spectrum mercury resistance transposons in Gram-positive bacteria from natural environments. Res. Microbiol. 152: 503-514
- Clarkson T.W. 2002. The three modern faces of mercury. Environmental Health Perspectives, 110, 1: 11-23
- Cloete T.E., Westaard D., van Vuuren S.J. 2003. Dynamic response of biofilm to pipe surface and fluid velocity. Water Sci. Technol., 47: 57-59
- Compeau G., Bartha R. 1985. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of Hg in anoxic estuarine sediments. Applied and Environmental Microbiology, 50: 498-502
- Dean-Ross D, Mills A.I. 1989. Bacterial community structure and function along a heavy metal gradient. Applied and Environmental Microbiology, 55, 8: 2002-2009

Desrosiers M., Planas D., Mucci A. 2005. Total mercury and methylmercury accumulation in periphyton of Boreal Shield Lakes: Influence of watershed physiographic characteristics. *Science of the Total Environment*, 355: 247-258

Hahn M.W., Höfle M.G. 2001. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 2: 113-121

Hornor S.G., Hilt B.A. 1985. Distribution of zink-tolerant bacteria in stream sediments. *Hydrobiologia*, 128: 155-160

Houba C., Remack J. 1980. Composition of the suprophytic bacterial communities in freshwater systems contaminated by heavy metals. *Microb. Ecol.*, 6: 55-69

Landers D.H., Gubala C., Verta M., Lucotte M., Johansson K., Vlasova T., Lockhart W.L. 1998. Using lake sediment mercury flux ratios to evaluate the regional and continental dimensions of mercury deposition in arctic and boreal ecosystems. *Atmospheric Environment*, 32: 919-928

Lapanje A., 2005. Vpliv onesnaženosti z živim srebrom na vrstno raznolikost bakterij v prebavilih enakonožnih rakov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 25-30

Lappin-Scott H. 2003. *Microbial biofilms*. Cambridge University Press

Lasse D. Rasmussen, Søren J. Sørensen 1997. The effect of longterm exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. *Current Microbiology*, 36: 291-297

Liu Y., Tay J.H., 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.*, 36: 1653-1665

Lizama H.M., Sankey B.M. 1993. Conversion of hydrogen sulphide by acidophilic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 438-441

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. New York. Prentice Hall: 636, 642, 672-673 str.

Marshall K.C. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surface. *ASM News*, 58: 202-207

Muščet B. 2006. Odpornost bakterijske združbe v prebavilih raka *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda) proti živemu srebru. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 2-5

Naglič M. 2005. Kopičenje živega srebra v tkivih izbranih ribjih vrst v reki Idrijci. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Nazaret S., Jeffrey W.H., Saouter E., von Haven R., Barkay T. 1994. *merA* gene expression in aquatic environments measured by mRNA production and Hg²⁺ volatilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 11: 4059-4065

Ogawa H.I., Tolle C.L., Summers A.O. 1984. Physical and genetic map of the organomercury resistance (*Omr*) and inorganic mercury resistance (*Hgr*) loci of the IncM Plasmid R831b. *Gene*, 32: 311-320

Oremland R.S., Culbertson C.W., Winfrey M.R. 1991. Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1: 130-137

Osborn A.M., Bruce K.D., Strike P., Ritchie D.A. 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiology Reviews*, 19: 239-262

Pak K.R., Bartha R. 1998A. Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1987-1990

Pak K.R., Bartha R. 1998B. Mercury methylation and demethylation in anoxic lake sediments and by strictly anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1013-1017

Percent S.F., Frischer M.E., Vescio P.A., Duffy E.B., Milano V., McLellan M., Stevens B.M., Boylen C.W., Nierzwicki-Bauer S. 2008. Bacterial community structure of acid-impacted lakes: What controls diversity? *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6: 1856-1868

Reaney D.C., Gowland D.C., Slater J.H. 1983. Genetic interaction among microbial communities. Cambridge University Press

Rickard A.H., Loach S.A., Hall L.S., Buswell C.M., High N.J., Handley P.S. 2002. Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3644-3650

Rickard A.H., McBain A.J., Ledder R.G., Handley P.S., Gilbert P. 2003. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. *FEMS Microbiol. Lett.*, 220: 133-140

Rickard A.H., McBain A.J., Stead A.T., Gilbert P. 2004. Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 12: 7426-7435

Riemann L., Winding A., 2001. Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microbial Ecology*, 42: 274-285

Robinson J.B., Tuovinen O.H. 1984. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: Physiological, biochemical and genetic analysis. *Microbiological Reviews*, 48: 95-124

Silver S. 1996. Bacterial resistance to toxic metal ions – a review. *Gene*, 179: 9-19

Silver S. 1998. Genes for all metals – a bacterial view of the Periodic Table. The 1996 Thom award lecture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1-12

Smith T., Pitts K., McGarvey J.A., Summers A.O. 1998. Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg(0). *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1328-1332

Snyder L., Champness W. 2003. *Molecular Genetics of Bacteria*. 55 str.

Soini S.M., Koskinen K.T., Vilenius M.J., Puhakka J.A. 2002. Effects of fluid-flow velocity and water quality on planktonic and sessile microbial growth in water hydraulic system. *Water Res.*, 36: 3812-3820

van Hannen E.J., Zwart G., van Agterveld M.P., Gons H.J., Ebert J., Laanbroek H.J. 1998. Changes in bacterial and eucaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2: 795-801

van Loon G.W., Duffy S.J. 2000. *Environmental chemistry*. New York, Oxford University Press Inc. 492 str.

von Canstein H., Li Y., Timmis K.N., Deckwer W.-D., Wagner-Döbler I. 1999. Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 12: 5279-5284

Weast R.C. 1989. *Handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data*. Cleveland, CRC Press: 224 str.

What is biofilm?, Utah Municipal Water Systems:

http://images.google.si/imgres?imgurl=http://myutahwater.com/biofilm.jpg&imgrefurl=http://myutahwater.com/umws_biofilm.htm&h=381&w=500&sz=47&tbnid=qKOuyOnI_A0SrM:&tbnh=99&tbnw=130&prev=/images%3Fq%3Dbiofilm%26um%3D1&start=2&ei=fwdsSKDBOJL40AXV54ynDA&sig2=4c-Go-G2EaT_vVdDXMszQw&sa=X&oi=images&ct=image&cd=2 (2.7.2008)

Wilson J.R., Leang C., Morby A.P., Hobman J.L., Brown N.L. 2000. MerF is a mercury transport protein: different structures but common mechanism for mercuric ion transporters? *FEBS Lett.* 472: 78-82

Zorko Š. 2003. Odstranjevanje biofilmov v industrijskem okolju. *Vzdrževalec*, 29: 21-22

Žižek S., Horvat M., Gibičar D., Fajon V., Toman M.J. 2007. Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining. *Science of the Total Environment*, 377: 407-415

ZAHVALE

Velika zahvala somentorju dr. Alešu Lapanje za ves trud, razumevanje, vesele ure vzorčenja, razlage in vodenje pri pisanju diplomske naloge.

Hvala mentorici prof. dr. Nini Gunde Cimerman in recenzentki prof. dr. Ani Plemenitaš za temeljit pregled diplomske naloge.

Hvala dr. Alexisu Zrimcu za nasvete in spodbude pri nastajanju diplomske naloge. Hvala Barbari za veliko pomoč v laboratoriju, praktične nasvete in prijetne klepete. Hvala vsem sodelavcem Inštituta za fizikalno biologijo za bogate izkušnje in pomoč na vseh področjih.

Hvala Maretu za pomoč pri pisanju diplomske naloge, za praktične nasvete in spodbude tekom celega študija.

Hvala staršem, bratu in sestri za podporo in spodbude tekom študija.

Hvala zvestim sošolkam, Katarini, Anji M., Anji B., Tini in Urški za prijetno preživljanje časa na faksu.