

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Andraž LOVŠIN

**OPTIMIZACIJA KONTINUIRNE MERITVE
BIOLOŠKO DOSTOPNE FRAKCIJE Hg V VZORCU
VODE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Andraž LOVŠIN

**OPTIMIZACIJA KONTINUIRNE MERITVE BIOLOŠKO
DOSTOPNE FRAKCIJE Hg V VZORCU VODE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**OPTIMIZATION OF CONTINUOUS MEASURMENT OF
BIOLOGICALLY AVAILABLE FRACTION OF MERCURY IN
WATER SAMPLE**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Lovšin A. Optimizacija kontinuirne meritve biološko dostopne frakcije Hg v vzorcu vode.
Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Opravljeno je bilo v Domžalah, v podjetju Inštitut za mikrobiološke znanosti in tehnologije.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar, za somentorja prof. dr. Aleša Lapanjeta in za recenzentko prof. dr. Damjano Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Aleš LAPANJE
Inštitut za mikrobiološke znanosti in tehnologije

Članica: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Andraž Lovšin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 602.3:579.841.1:602.1:53.082.9(043.2)
KG *Pseudomonas putida*/živo srebro/luminiscanca/biosenzor/bioluminiscentni biosenzor
AV LOVŠIN, Andraž
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/ LAPANJE, Aleš (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2016
IN OPTIMIZACIJA KONTINUIRNE MERITVE BIOLOŠKO DOSTOPNE FRAKCIJE Hg V VZORCU VODE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP XI, 50, [9] str., 25 sl., 36 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Meritve biološko dostopnega živega srebra smo opravljali z genetsko spremenjenimi bakterijami *Pseudomonas putida*. Bakterije ob izpostavitvi živega srebra oddajajo luminiscenco, ki se z višanjem koncentracije živega srebra zvišuje. Naloga je sestavljena iz dveh delov. Najprej smo optimizirali gojenje celic na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek), nato smo optimizirali še gojenje celic na avtomatiziranem celičnem biosenzorju (ACB). V prvem delu raziskave smo raziskovali, po kolikšnem času dosežejo celice *Pseudomonas putida* pHg4 in pDNLux najvišjo luminiscenco in primerjali, kako različni načini priprave celic vplivajo na luminiscenco. Sledila je raziskava fenotipskega šuma, kjer se je raziskovalo, kakšna je ponovljivost merjenja absorbance in luminiscence 10 poljubno izbranih kolonij. Nadaljevali smo s primerjavo odzivnosti celic pri različnih starostih celic in po načinu shranjevana celičnih kultur pri nizki temperaturi. Izkazalo se je, da starost celic in pogoji, v katerih jih hranimo, pomembno vplivajo za jakost luminiscence. Zanimalo nas je, če močan pozitiven signal, ki je v bližini mesta meritve, vpliva na meritev. Celice smo v prvem delu raziskave gojili na stresalniku, kjer je moralo biti stresanje dovolj močno za optimalno rast mikroorganizmov. Prvi del raziskave smo zaključili z umeritveno krivuljo za različne koncentracije Hg. Drugi del raziskave, pa je temeljal na optimizaciji gojenja celic na ACB. Celice smo gojili ob prepihovanju s kisikom po intervalih, v izogib težavam penjenja. ACB in gojenje celic smo optimizirali za merjenje različnih koncentracij biološko dostopnega Hg v vzorcu vode.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 602.3:579.841.1:602.1:53.082.9(043.2)
CX *Pseudomonas putida*/mercury/luminescence/biosensor/bioluminescent biosensors
AU LOVŠIN, Andraž
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/ LAPANJE, Aleš (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2016
TI OPTIMIZATION OF CONTINUOUS MEASURMENT OF BIOLOGICAL AVAILABLE FRACTION OF Hg IN WATER SAMPLE
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XI, 50, [9] p., 25 fig., 36 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Measurements of biologically available mercury were made by genetic modified bacteria *Pseudomonas putida*. When bacteria are exposed to biologically available mercury, they emit luminescence, which increases, if the concentration of biologically available mercury increases. Master thesis is divided on two parts. We started with optimizing the culturing of the cells, on a device Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Then we optimized the culturing of the cells on automatic cell biosensor (ACB). In the first part of the study, we investigated how long do the cells *Pseudomonas putida* pHg4 and pDNLux need to reach the highest luminescence point and we analyzed how the difference of cell preparation affects the luminescence. Further on, we measured phenotypic noise for absorbance and luminescence from 10 random selected bacteria colony of cell. The viability of the cells with different age, temperature and method of storage was made. It was discovered that the conditions of the bacteria are crucial for cell luminescence. Next we studied, how the positive response reacts with other measurements. First studies on Synergy machine have been made on shakers. The rate of shaking had to be very high, because of the oxygen, bacteria need. The first part of the master thesis we completed with calibration curve, made by different concentrations of Hg. The second part of the analysis was made for optimization of ACB. The cells were cultivated with blowing air in intervals, to avoid the problems with bubbles. With these techniques we optimized culturing the cells and ACB for measuring biologically available Hg in sample of water.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA V KOPENSKIH IN VODNIH EKOSISTEMIH	3
2.2 TRANSFORMACIJE ŽIVEGA SREBRA V BIOGEOKEMIJSKEM CIKLU	5
2.2.1 Metilacija Hg^{2+}	5
2.2.2 Demetilacija CH_3Hg^+	6
2.2.3 Redukcija Hg^{2+}	6
2.2.4 Oksidacija Hg^0	6
2.3 BAKTERIJA <i>Pseudomonas putida</i>	7
2.3.1 Taksonomija	7
2.4 BIOSENZOR	7
2.4.1 Vrste biosenzorjev	9
2.4.1.1 Biosenzorji na osnovi resonance	9
2.4.1.2 Optični biosenzorji	9
2.4.1.3 Toplotno zaznavni biosenzorji	9
2.4.1.4 Ionsko občutljivi biosenzorji	10
2.4.1.5 Elektrokemični biosenzorji	10
2.4.2 Mehanizmi delovanja biosenzorjev	11
2.5 BIOLUMINISCENČNI BIOSENZORJI	12
2.6 ODPORNOST BAKTERIJ PROTI ŽIVEMU SREBRU	13
3 MATERIALI	14

3.1	MIKROORGANIZMI	14
3.2	GOJIŠČA	14
3.2.1	Gojišče LB (Sigma)	14
3.2.2	Gojišče HMM (Sigma)	14
3.3	APARATURE	15
3.4	MATERIAL ZA ENKRATNO UPORABO	15
4	METODE DELA	17
4.1	KONSTRUKCIJA PLAZMIDOV ZA <i>Pseudomonas. putida</i> pHg4 in <i>Pseudomonas. putida</i> pDNlux	18
4.1.1	Opis priprave <i>Pseudomonas putida</i> pHg4	18
4.1.2	Opis priprave <i>Pseudomonas putida</i> pDNlux	19
4.2	OPTIMIZACIJA GOJENJA CELIC NA NAPRAVI SYNERGY H4 HYBRID READER	19
4.2.1	Priprava inokuluma	19
4.2.2	Šaržna gojitev senzorskih celic <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 in <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> pDNlux za ugotavljanje pogojev detekcije absorbance in luminiscence	20
4.2.3	Primerjava rezultatov luminiscence bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 glede na način priprave inokuluma	21
4.2.4	Gojitev bakterijskih kolonij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 za določitev fenotipskega šuma	21
4.2.5	Umeritvena krivulja z merjenjem luminiscence na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek)	22
4.2.6	Shranjevanje celic <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 v zamrzovalniku pri temperaturi -80° C	22
4.2.7	Primerjava odzivnosti celic <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 pri različnih koncentracijah Hg glede na starost in shranjevanje celic pri nizki temperaturi	23
4.2.8	Vpliv pozitivnega luminiscenčnega signala z zelo visoko luminiscenco na sosednje vzorce v mikrotitrski plošči	23
4.3	OPTIMIZACIJA AVTOMATIZIRANEGA CELIČNEGA BIOSENZORJA	24
4.3.1	Opis ukazov za vzpostavitev računalnika z avtomatiziranim celičnim biosenzorjem	24

4.3.1.1	Ukazi za vzpostavitev računalnika z avtomatiziranim celičnim biosenzorjem.....	24
4.3.2	Krmiljenje senzorjev in postopek meritve	25
4.3.2.1	Strojna iniciacija robota.....	25
4.3.2.2	Aktivacija programa Matlab z napravo ACB.....	25
4.3.2.3	Krmiljenje senzorja.....	25
4.3.2.4	Zanka	27
4.3.3	Umeritvena krivulja za določanje koncentracij Hg z merjenjem luminiscence na napravi ACB	28
5	REZULTATI.....	30
5.1	DOLOČITEV NAJVIŠJIH MEJ DETEKCIJE LUMINISCENCE IN ABSORBANCE PRI <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 BREZ PRISOTNOSTI Hg	30
5.2	VPLIV NAČINA PRIPRAVE INOKULUMA NA AKTIVNOST BAKTERIJ <i>Pseudomonas putida</i> pHg4.....	32
5.3	FENOTIPSKI ŠUM	33
5.4	UMERITVENA KRIVULJA ZA MERJENJE KONCENTRACIJ Hg NA NAPRAVI SYNERGY H4 HYBRID READER.....	36
5.5	PRIMERJAVA ODZIVNOSTI CELIC <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH Hg GLEDE NA STAROST IN SHRANJEVANJE CELIC PRI NIZKI TEMPERATURI	37
5.5.1	Primerjava odzivnosti celic v odvisnosti od starosti celic	37
5.6	VPLIV POZITIVNEGA LUMINISCENČNEGA SIGNALA Z ZELO VISOKO LUMINISCENCO NA SOSEDNJE VZORCE NA MIKROTITRSKI PLOŠČI	38
5.7	UMERITVENA KRIVULJA ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJ Hg Z MERJENJEM LUMINISCENCE NA NAPRAVI ACB	39
6	RAZPRAVA.....	41
6.1	OPTIMIZACIJA GOJENJA CELIC NA NAPRAVI SYNERGY H4 HYBRID READER (BIOTEK).....	41
6.2	OPTIMIZACIJA GOJENJA CELIC IN AVTOMATIZIRANEGA CELIČNEGA BIOSENZORJA (ACB)	44
7	SKLEPI	46
8	POVZETEK	47
9	VIRI	48
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Slika 1: Povzročitelji zračnih emisij prek antropogenih dejavnikov v letu 2010 (UNEP, 2013).....	4
Slika 2: Kroženje živega srebra prek naravnih in antropogenih emisij v hlapni obliki Hg^0 . S prisotnostjo ozona se Hg^0 oksidira v vodotopni ion Hg^{2+} . Hg^{2+} lahko s precipitacijo prehaja v zemljo in se lahko kopiči v zemlji in vodi. Bakterije metilirajo živo srebro, metilirano Hg pa se bioakumulira v prehranski verigi (Ji, 2011).....	5
Slika 3: Shema, ki prikazuje glavne komponente biosenzorja. Sestavljen je iz biokatalizatorja, ki vrši reakcijo in pretvarja substrat v produkt (a). Prevajalnik signala (transducer) (b) pretvori reakcijo v električni signal. Iz prevajalnika signala potuje signal naprej do pomnoževalke (c), kasneje se signal sprocesira (d) in izpiše (e) (Atta in sod., 2011).....	8
Slika 4: Klasifikacija biosenzorjev glede na vrsto prevajalnika signala (Atta in sod., 2011).	9
Slika 5: Najpomembnejše funkcionalne značilnosti biosenzorja (Atta in sod., 2011)	11
Slika 6: Shematski prikaz načrtovanja magistrske naloge, v kateri smo sprva optimizirali gojenje celic <i>Pseudomonas putida</i> na napravi Synergy H4 Hybrid reader in nato še optimizirali gojenje celic na ACB.....	17
Slika 7: Konstrukcija plazmida za <i>Pseudomonas putida</i> pHg4.....	18
Slika 8: Konstrukcija plazmida za <i>Pseudomonas Putida</i> pDNLux.	19
Slika 9: Bakterije <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 na trdnem gojišču LB z dodanim antibiotikom kanamicin pod UV-svetlobo.....	20
Slika 10: Prikaz avtomatiziranega celičnega biosenzorja.	24
Slika 11: Bioprocесна shema avtomatiziranega celičnega biosenzorja.	27
Slika 12: Shematski prikaz merjenja luminiscence z napravo ACB.....	29
Slika 13: Rast bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 in pDNLux, ki smo jo spremljali z merjenjem absorbance. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardnim odklonom (n=3).....	30
Slika 14: Luminiscenca bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 v odvisnosti od časa. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardnim odklonom (n=3).....	31
Slika 15: Luminiscenca bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pDNLux v odvisnosti od časa. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardnim odklonom (n=3).....	31

Slika 16: Absorbanca bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 v odvisnosti od časa. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardnim odklonom (n=3)	32
Slika 17: Luminiscenca bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 v odvisnosti od časa. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardnim odklonom (n=3).....	33
Slika 18: Absorbanca na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek) bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4, izmerjene pri različnih časih kultivacije. Srednja črta okvirja predstavlja mediano. Polovica vseh izmerjenih vrednosti je nad to vrednostjo, polovica pa jih je pod njo (n=30).....	34
Slika 19: Luminiscenca na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek) bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 v odvisnosti od časa. Srednja črta okvirja predstavlja mediano. Polovica vseh izmerjenih vrednosti je nad to vrednostjo, polovica pa jih je pod njo (n=30).....	34
Slika 20: Napaka individualne meritve pri merjenju absorbance bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek) (n=3).....	35
Slika 21: Napaka individualne meritve pri merjenju luminiscence bakterij <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek) (n=3).....	35
Slika 22: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracij Hg na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Legenda označuje čas, kakšne umeritvene krivulje smo dobili ob časih merjenja 1, 2, 3 in 4 ur. Srednja črta okvirja predstavlja mediano. Polovica vseh izmerjenih vrednosti je nad to vrednostjo, polovica pa jih je pod njo (n=4).....	36
Slika 23: Primerjava luminiscence celic <i>Pseudomonas putida</i> pHg4 pri različnih koncentracijah Hg glede na starost in shranjevanje celic ter pri temperaturi -80° C, v zamrzovalniku. Srednja črta okvirja predstavlja mediano. Polovica vseh izmerjenih vrednosti je nad to vrednostjo, polovica pa jih je pod njo. Meritev smo opravili po času gojenja 2 ur (n=4)	37
Slika 24: Test sisanja luminiscence zunaj območja meritve, izveden na mikrotitrski plošči, namenjeni za merjenje luminiscence. Luknjice, ki so označene z močno rdečo barvo oziroma in imajo na barvni skali enoto 200, predstavljajo luknjice, v katerih je bil vzorec, ki je oddajal luminiscenco. Legenda prikazuje intenziteto luminiscence od rdeče barve, kjer je luminiscenca največja proti beli.	39
Slika 25: Umeritvena krivulja z merjenjem luminiscence na napravi ACB za merjenje koncentracije Hg (n=16).....	40

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Protokol v programu matlab za opravljanje gojitve bakterij in meritev

PRILOGA B: Protokol za sterilizacijo kivet

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACB – Avtomatizirani celični biosenzor/Automatic cell biosensor

BDHg – biološko dostopno živo srebro

BW - Bulk Wave

DNA – deoksiribonukleinska kislina

FET - Field Effect Transistor

FT-IR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

HMM - Hepatocyte Maintenance Medium

HPLC – high performance liquid chromatography

ICP/MS – Inductively coupled plasma mass spectrometry

LB – Luria-Bertani broth

MeHg – metilirano živo srebro

MOPS - 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid

QCM - Quartz Crystal Microbalance

RLU - Relative Light Unit

SAW - Surface Acoustic Wave

Shuttle vektor – prenosljivi vektor

SPR - Surface Plasmon Resonance

SRB – sulfat reducirajoče bakterije

UV - ultravioletno

1 UVOD

Živo srebro je kemijski element in kovina s simbolom Hg, vrstnim številom 80 in molsko maso 200,59 g/mol. Opišemo ga kot srebrno belo, težko in prehodno kovino. Za prehodne kovine velja, da so dobri prevodniki električne ter toplove. Tališče živega srebra je pri $-39,8^{\circ}\text{C}$, vrelišče pri $357,3^{\circ}\text{C}$ in se lahko nahaja v treh oksidacijskih stanjih: 0, +1 in +2. Živo srebro je edina kovina, ki je pri sobni temperaturi in tlaku 100 kPa v tekočem agregatnem stanju. Prisoten je v več različnih organskih in anorganskih spojinah. Dokler ostane v anorganski obliki, ni nevaren, problem pa se pojavi, če element spremeni kemijsko obliko in začne vstopati kot metil živo srebro v organizme oz. v biogeni cikel. Do biološko dostopne oblike pride z bakterijsko pretvorbo v vodnem ekosistemu. Biološka pretvorba se začne v bakterijah, nadaljuje v planktonu, ribah in prehaja s prehrano v višje vrste. Morski psi, mečarice, tune in tudi na slovenski obali prisotni ugorji so ribe, ki vsebujejo največ metil živega srebra.

Za živo srebro je že več desetletij znano, da je velik okoljevarstveni problem. Kot pri večini okoljskih onesnaževal gre tudi pri živem srebru za problem bioakumulacije. Bioakumulacija je proces, pri katerem organizem zaužije v kratkem času toliko snovi, da ga ne zmore pravočasno presnoviti ali izločiti, zato se začne v telesu nalagati. Od vsakega organizma posebej pa je odvisno, v kolikšnem času se lahko akumuliranega živega srebra znebi. Človek ga lahko izloči iz svojega telesa v 70 dneh pri predpostavki, da v tem času nima nikakršnega dodatnega stika z živim srebrom.

Najbolj kontaminirana območja na Slovenskem so Tržaški zaliv, porečje Soče in Idrijce. Soča in Idrijca prineseta na leto v Tržaški zaliv 1,5 tone živega srebra, kljub temu, da rudnik že vrsto let ni aktivен.

Poznamo številne klasične pristope analitskih metod za merjenje koncentracije živega srebra, med katerimi prevladujejo kemijskoanalitske, kot so: ionska kromatografija, masna spektrometrija, HPLC, polarografija, ICP/MS. Z naštetimi metodami lahko izmerimo koncentracijo živega srebra, prisotnega v vzorcu, ki ga je predhodno potrebno še ustrezno obdelati, da je primeren za merjenje. Koncentracije živega srebra, izmerjene s kemijskimi analitskimi metodami, pa ne odražajo vedno prave biološke dostopnosti živega srebra odvzetega vzorca. V ta namen so v uporabi biosenzorji, s katerimi lahko izmerimo biološko dostopno frakcijo živega srebra (Hakkila in sod., 2004). Biološke metode temeljijo na spremeljanju specifičnih odzivov organizmov na genetskem ali fiziološkem nivoju s prednostjo relativno hitre ocene količine biodostopnega, oziroma organizmom nevarnega živega srebra. Biosenzor sestavlja senzoričen del, detektor in prevajalni element. Prednosti biosenzorjev pred ostalimi metodami so prenosljivost, analiziranje veliko vzorcev na veliko različnih mestih in hiter odziv. Glavna slabost pa je nespecifičnost signala. Meritve lahko opravimo na kraju vzorčenja brez transporta s terena v laboratorij.

1.1 NAMEN DELA

Meritve koncentracije živega srebra v okolju so težavne, saj so metodološko zahtevne in se večinoma izvajajo v laboratoriju. Običajno je potrebno sprva vzorec vzeti iz okolja, ga transportirati v laboratorij, ustrezno obdelati in izmeriti z analitskimi aparaturami. Postopek je kompleksen in zamuden, v primerjavi z biosenzorskim sistemom, ki je enostavno prenosljiv, hitro odziven in pri katerem ni potrebe po predhodni obdelavi vzorca, hkrati pa rezultate lahko dobimo že na mestu vzorčenja. Pri konvencionalnih analitskih metodah se zaradi transporta vzorca v laboratorij lahko kemijski pogoji spremenijo in s tem tudi koncentracije Hg. Posledično lahko takšne meritve pokažejo napačne, od realnih odstopajoče, koncentracije Hg v okolju. Pri tem je frakcija Hg, ki je biološko dostopna (BDHg), najbolj izpostavljena tovrstnim spremembam. Med transportom z mesta vzorčenja do laboratorija začnejo bakterije pretvarjati BDHg in posledično lahko dobimo nerealne rezultate. Zato je potrebno razviti ustrezne metode, ki omogočajo meritve BDHg *in situ*. Za tovrstne namene meritve BDHg v okolju je bil v okviru evropskega projekta Hydronet (Dario, 2008) razvit biosenzor. Biosenzor je bil preizkušen v simuliranih pogojih, vendar ga je bilo za pravilno delovanje v okolju potrebno optimizirati. Optimizacija obsega številne parametre, od katerih je odvisen končni izmerjeni rezultat. Najbolj pomembni so pogoji kultivacije biosenzorskih celic pri optimalni temperaturi, izbira sveže kulture, določitev meje detekcije in določitev pogojev meritev za najbolj optimalno kontinuirno meritev. Namen magistrskega dela je bil optimizirati postopek gojenja biosenzorskih celic in prek različnih intenzitet luminiscence določiti koncentracijo biološko dostopnega živega srebra v vzorcu vode na avtomatiziranem celičnem biosenzorju.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pričakujemo, da bodo imele različne koncentracije biološko dostopnega živega srebra vpliv na fiziološko aktivnost različnih klonov.
- Predvidevamo, da bodo različni pogoji kultivacije (shranjevanje pri različnih temperaturah, starost celic, spodnja meja detekcije, zgornja meja detekcije, dinamično območje) imeli vpliv na jakost luminiscence.
- Dejavnika, kot sta način gojenja celic in merjenje spodnje meje detekcije biološko dostopnega živega srebra, bosta z uporabo ACB (avtomatiziranega celičnega biosenzorja) po avtomatizaciji spremenjena.
- Merjenje luminiscence z ACB bo hitrejše, v primerjavi z merjenjem po običajnem laboratorijskem postopku, saj lahko rezultate dobimo na mestu vzorčenja.

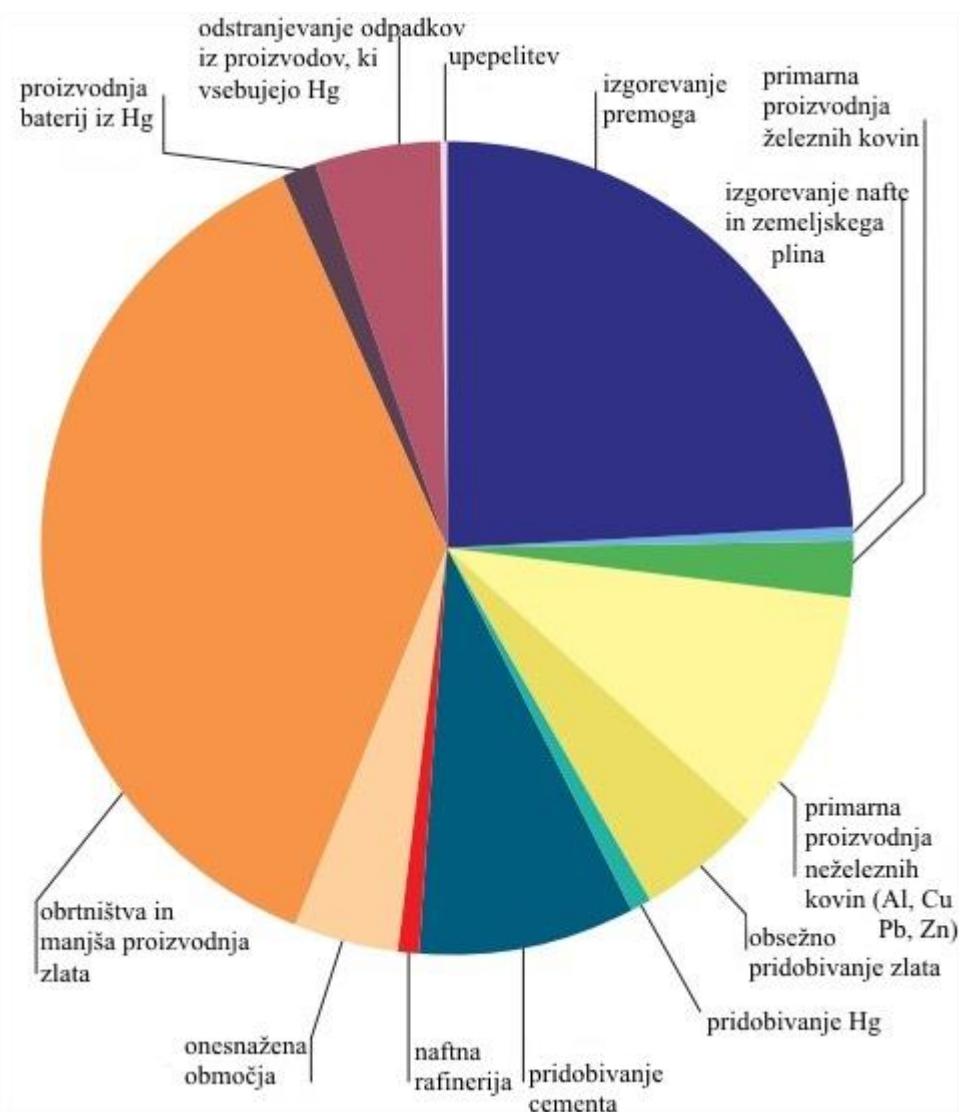
2 PREGLED OBJAV

2.1 KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA V KOPENSKIH IN VODNIH EKOSISTEMIH

Živo srebro je v naravi naravno prisotno, a je človek tisti, ki povečuje koncentracije in je vzrok za vedno večje onesnaževanje okolja. Naravne emisije, s katerimi se povečuje koncentracija Hg v okolju in za katere se ocenjuje, da prispevajo tretjino emisij po vsem svetu, so (UNEP, 2013):

- vulkanska aktivnost
- naravno razplinjevanje zemeljske skorje
- gozdni požari
- izparevanje naravnih vodnih virov

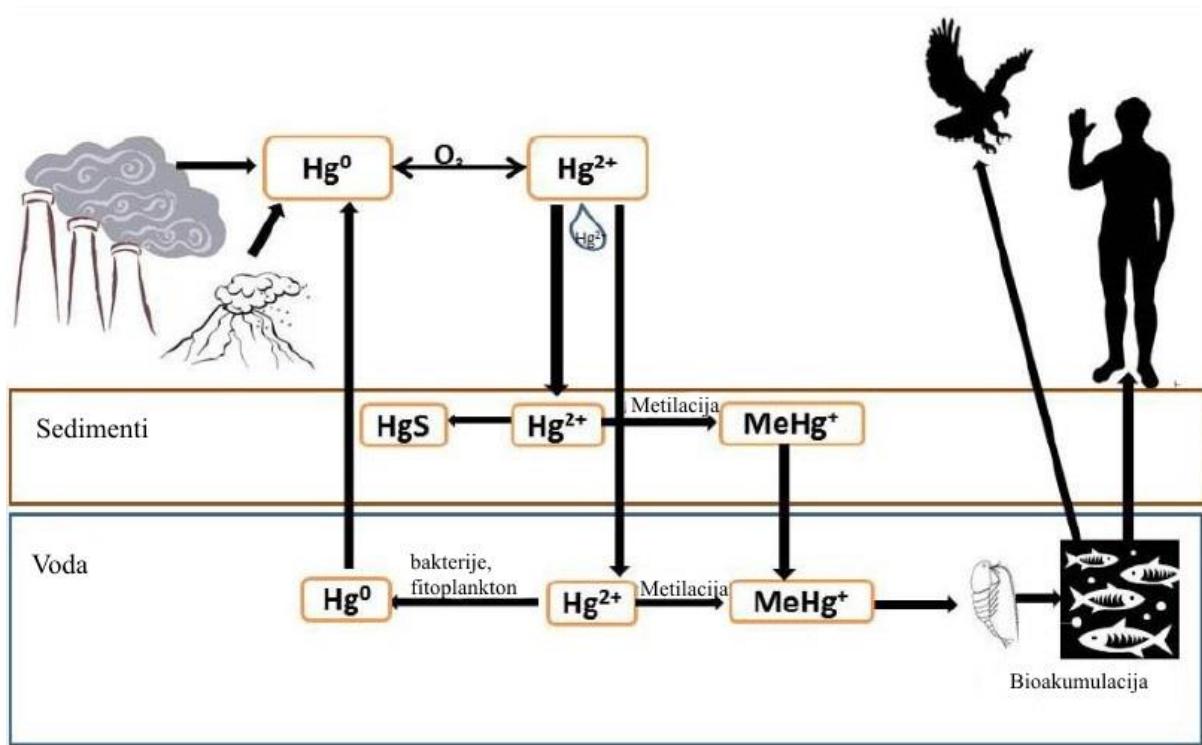
Človeški viri onesnaženja okolja so po nekaterih ocenah odgovorni za dve tretjini emisij po vsem svetu. Po podatkih do leta 2010 je bilo v atmosfero izpuščenega okoli 1960 ton živega srebra. Največje onesnaževanje predstavlja izgorevanje premoga, a se z leti ta odstotek manjša, saj se kurjenje premoga zmanjšuje (UNEP, 2013).



Slika 1: Povzročitelji zračnih emisij prek antropogenih dejavnikov v letu 2010 (UNEP, 2013).

Živo srebro lahko kroži po zraku, v vodi in v sedimentih ter menja svojo kemijsko obliko. Kroženje živega srebra (Slika 1) prikazuje prehod živega srebra v atmosfero prek antropogenih oziroma prek naravnih emisij v elementarni obliki Hg^0 . Elementarno živo srebro fotooksidira v anorganski divalentni Hg^{2+} , ki se lahko poveže z vodno paro in prek dežja prestopi ter se začne nalagati v zemljo ali vodo. Iz zemlje lahko Hg^{2+} prehaja zopet v atmosfero prek gozdnih požarov ali pa se poveže s sulfidi in tvori cinabarit (HgS) (Barkay in sod., 2003).

V vodi prihaja do pretvorbe anorganskega živega srebra s pomočjo anaerobnih mikroorganizmov do metiliranega Hg^+ ($MeHg$). Metilirano živo srebro lahko potuje prek vode v druge organizme, kot so zooplankton in manjše ribe, s katerimi se hranijo večji organizmi, ki s tem zaužijejo koncentrirano metilirano živo srebro. Človek zaužije največ škodljivega živega srebra z ribami (Barkay in sod., 2003).



Slika 2: Kroženje živega srebra prek naravnih in antropogenih emisij v hlapni obliki Hg^0 . S prisotnostjo ozona se Hg^0 oksidira v vodotopni ion Hg^{2+} . Hg^{2+} lahko s precipitacijo prehaja v zemljo in se lahko kopiji v zemlji in vodi. Bakterije metilirajo živo srebro, metilirano Hg pa se bioakumulira v prehranski verigi (Ji, 2011).

2.2 TRANSFORMACIJE ŽIVEGA SREBRA V BIOGEOKEMIJSKEM CIKLU

V naravi so prisotni biotski in abiotični dejavniki, ki olajšujejo kroženje živemu srebru, da prehaja iz zemlje in vode v atmosfero in obratno. V nadaljevanju bo opisano, v katerih oblikah je Hg lahko prisoten in kako biotski ter abiotični dejavniki vplivajo na kroženje Hg.

2.2.1 Metilacija Hg^{2+}

V preteklosti je nekajkrat prišlo do zelo obsežnih množičnih zastrupitev z $MeHg$, zato so svetovne javne inštitucije, ki so odgovorne za javno zdravje, dale velik poudarek na zmanjšanje emisij te škodljive nevrotoksične težke kovine (Clarkson, 1997). Čeprav je večino okoljskega Hg v anorganski obliki, so sposobni naravni biotski in abiotični procesi sintetizirati $MeHg$, ki se v večini primerov bioakumulira, razen v primeru razgradnje z ostalimi biotskimi ali abiotičnimi procesi (Barkay in sod., 1992). Terenski in laboratorijski poskusi z anaerobnimi sedimenti, pri katerih so uporabljali specifične metabolične inhibitorje in substrate, so pokazali, da so za metilacijo anaerobnih sedimentov najbolj odgovorne sulfat reducirajoče bakterije (SRB) (Compeau in Bartha, 1985). SRB za substrat metilacije uporabljajo HgS (Benoit in sod., 2001). Biotski proces torej temelji na sulfat reducirajočih bakterijah, kjer metiltransferaza poskrbi, da se metilna skupina iz

metilkobalamina prenosti na Acetyl CoA. Abiotski proces pa se pojavlja pri metilaciji fulvične, huminske, karboksilne kisline ali kositrovih spojin (Barkay in sod., 2003).

2.2.2 Demetilacija CH_3Hg^+

Podobno kot pri metilaciji tudi pri oksidativni demetilaciji sodelujejo anaerobne bakterije. Povsem natančen mehanizem ni znan, vendar se domneva, da gre za podoben princip kot pri razgradnji monometilamina z metanogenimi arhejami ali oksidacijo acetata s sulfat reducirajočimi bakterijami. Pomembno je, kako se MeHg razgradi, torej, ali se to zgodi z oksidacijo ali z redukcijo v anaerobnih sedimentih. Če poteče redukcija, nastane elementarno živo srebro, ki lahko izhlapi v ozračje. V primeru oksidativne demetilacije pa pride do Hg^{2+} , ki lahko služi kot sedimentni substrat za remetilacijo (Barkay in sod., 2003). Na abiotsko degradacijo lahko vpliva sončna svetloba, specifični UV-žarki (UVA in UVB), valovna dolžina (Suda in sod., 1993).

2.2.3 Redukcija Hg^{2+}

Redukcijo Hg^{2+} v Hg^0 lahko spremljamo v vodi ali zemlji. Hg^0 ima zelo slabo topnost, zato hitro izhlapi. Živo srebro v dežju in snegu, ki sta glavna dejavnika za vračanje Hg v zemljo, je v veliki meri v ionski obliki in je na voljo za redukcijo. Biotska transformacija lahko poteče z bakterijsko reduktazo, obstajajo pa tudi alge, ki so sposobne s svetlobo in tudi brez nje transformirati Hg^{2+} (Barkay in sod., 2003). Abiotska transformacija lahko poteče fotokemijsko z organskimi prostimi radikali, ki izvirajo iz fotolize raztopljenega organskega ogljika, kisika, organskih ogljikovih kompleksov in železovih spojin (Zhang in Lindberg, 2001). Lahko pa poteka tudi z reakcijami, ki se vršijo v temi, kjer se Hg^{2+} reducira s fulvičnimi (Skogerboe in Wilson, 1981) in huminskimi kislinskimi prostimi radikali (Allard in Arsenie, 1991).

2.2.4 Oksidacija Hg^0

Biološka oksidacija Hg^0 je najmanj raziskan segment v biogeokemijskem ciklu Hg. Za aerobne zemeljske bakterije rodov *Bacillus* in *Streptomyces* se predvideva, da imajo največjo sposobnost mikrobne oksidacije (Smith in sod., 1998). Pri tem moramo upoštevati, da je v vseh primerih v občutljivih bakterijah brez plazmidov vsaj 10-krat nižja oksidacija kot pri bakterijah, ki vsebujejo *mer* operon (Hamlett in sod., 1992). Biotski proces transformacije lahko poteka z oksidacijo s hidroperoksidazo v mikrobih, rastlinah in živalih (Smith in sod., 1998). Abiotski proces transformacije pa vključuje fotooksidacijo z različnimi oksidanti in prostimi radikali. V morjih, kjer so slani pogoji, poteka prav tako oksidacija s kisikom (Amyot in sod., 1997).

2.3 BAKTERIJA *Pseudomonas putida*

Bakterije rodu *Pseudomonas* so po Gramu negativne paličaste aerobne bakterije, ki imajo bičke. Služijo kot zelo dober modelni organizem na področju raziskovanja živega srebra, saj so odporne na živo srebro. Najdemo jih v zemlji in v vodnem okolju, kjer je prisoten kisik. Njihova optimalna rastna temperatura je od 25 do 30° C in jih lahko zlahka izoliramo (Espinosa-Urgel in sod., 2000).

2.3.1 Taksonomija

Taksonomska opredelitev (Peix, 2009):

domena: BACTERIA

debelo: Proteobacteria

razred: Gamma proteobacteria

red: Pseudomonadales

družina: Pseudomonadaceae

rod: *Pseudomonas*

vrsta: *Pseudomonas putida*

2.4 BIOSENZOR

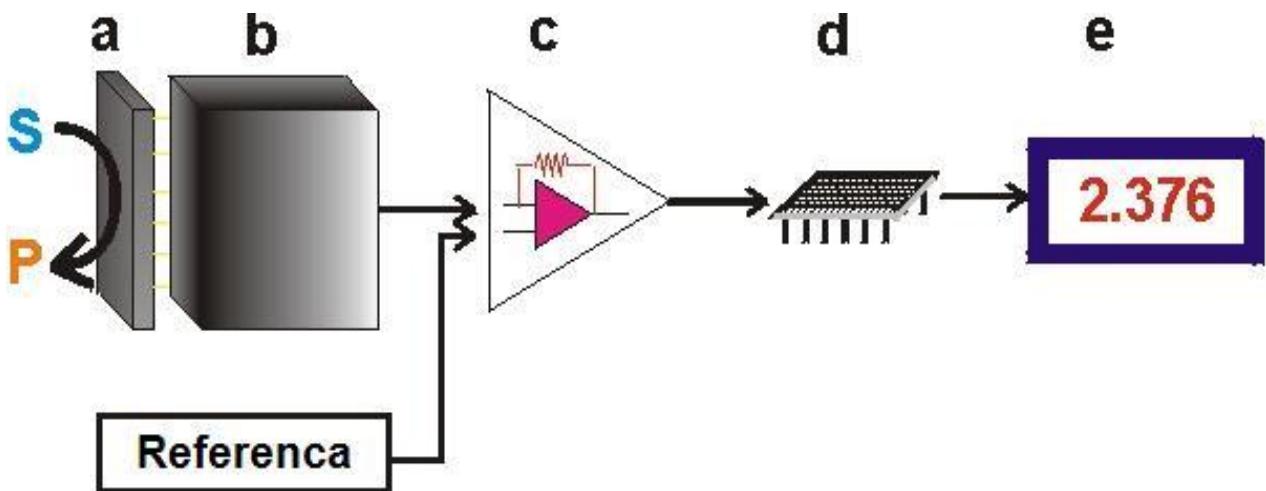
Biosenzor je analitska naprava, ki pretvarja biološki odziv v merljiv električni signal. Je visoko občutljiv in selektiven. Deluje po postopku, pri katerem uporablja biokemijsko reakcijo, prek katere zazna specifične spojine v povezavi s kemijsko ali fizikalno detekcijo. Biološki elementi biosenzorjev so lahko (Chaplin, 2009):

- lipidni sloj
- protitelo
- celica
- immobiliziran encim
- drugi subcelularni partkli

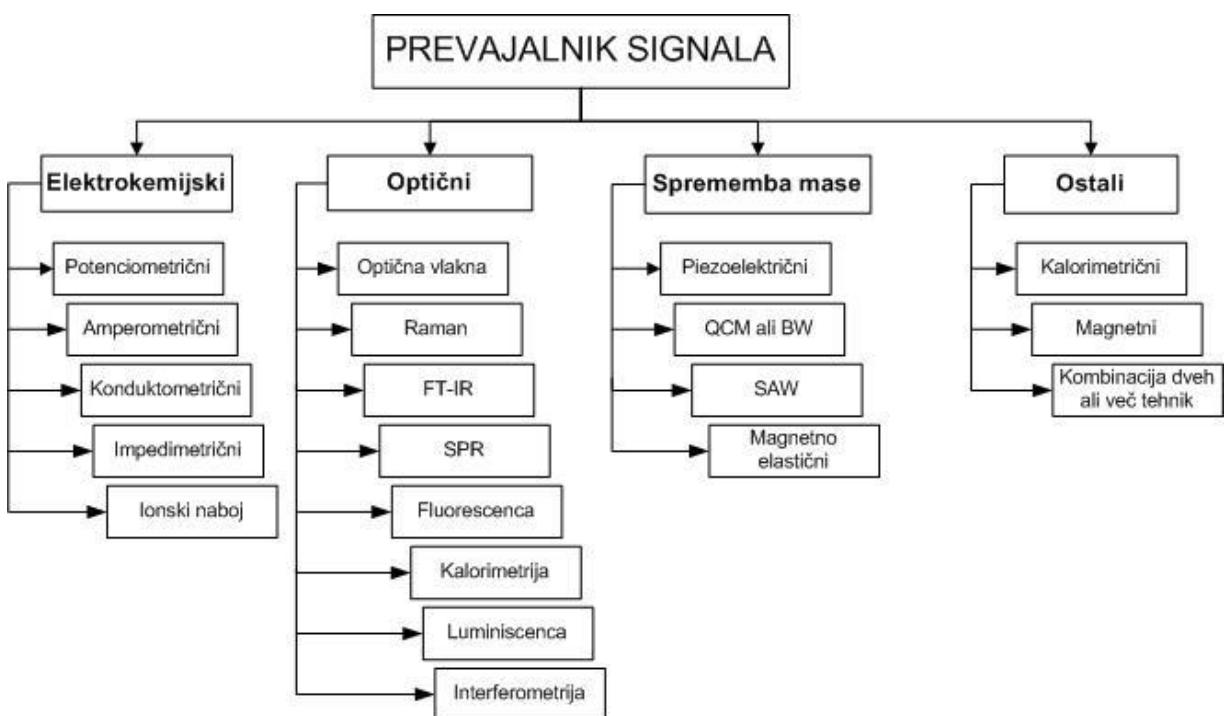
Biološki element biosenzorja je na eni strani v kontaktu z vodnim okoljem, na drugi strani pa z elektrodo ali merilno celico. Biosenzorska znanost je interdisciplinarna, saj združuje za rešitev kompleksnih analitičnih problemov področje kemije, fizike, biologije, elektrotehnike in inženirstva. Glavne prednosti pred ostalimi analitskimi metodami so enostavna prenosljivost, hiter odziv, hkrati pa ni potrebe po predhodni obdelavi vzorca, saj

zadoščajo že majhne količine vzorca, merjenje je možno na mestu vzorčenja. Glavna slabost pa je nespecifičnost signala (Chaplin, 2009).

Čeprav se veliko biosenzorskih sistemov še vedno ne more primerjati s konvencionalnimi analitskimi metodami v smislu točnosti in ponovljivosti, se takšni sistemi še vedno lahko uporabljajo pri raznih regulatornih organih in v industriji, saj podajo dovolj informacij za rutinsko testiranje in pregled vzorcev. Običajno je za analizo vode potrebno sprva zbrati vzorce, jih transportirati v laboratorij, ustreznno obdelati in šele nato izmeriti z analitskimi aparaturami. Pri tem dolgotrajnem postopku lahko izgubimo ključne informacije, ki se spremenijo zaradi prostorske in časovne razlike med vzorčenjem vode in samo analizo. Biosenzorje bi lahko torej uporabili za neprekinjeno vzorčevanje onesnaženih območij. Za razliko od ostalih analitskih metod je prednost tudi v tem, da z biosenzorji lahko izmerimo biološke vplive, kot so toksičnost, citotoksičnost, genotoksičnost, endokrine (hormonske) motnje. Zaznamo lahko zelo pomembne biološke informacije (biološka dostopnost), ki so lahko v mnogih primerih bolj relevantne od kemijskih dejavnikov (Rodriguez-Mozaz S. in sod., 2006).



Slika 3: Shema, ki prikazuje glavne komponente biosenzorja. Sestavljen je iz biokatalizatorja, ki vrši reakcijo in pretvarja substrat v produkt (a). Prevajalnik signala (transducer) (b) pretvori reakcijo v električni signal. Iz prevajalnika signala potuje signal naprej do pomnoževalke (c), kasneje se signal sprocesira (d) in izpiše (e) (Atta in sod., 2011).



Slika 4: Klasifikacija biosenzorjev glede na vrsto prevajalnika signala (Atta in sod., 2011).

2.4.1 Vrste biosenzorjev

2.4.1.1 Biosenzorji na osnovi resonance

Pri tej vrsti biosenzorja je prevajalnik signala površinski akustični val (SAW-Surface Acoustic Wave) povezan z antigenom. Ko se analitska molekula (antigen) veže na membrano, se masa membrane spremeni. Sprememba posledično vpliva na resonanco sekvence prevajalnika signala, razliko v frekvenci pa se izmeri (Atta in sod., 2011).

2.4.1.2 Optični biosenzorji

Signal, ki se meri pri optičnih biosenzorjih, je svetloba. Biosenzor je lahko narejen tako, da temelji na optični difrakciji ali elektrokemiluminiscenci. Za tvorjenje luminiscencije se lahko uporablajo gensko spremenjeni mikroorganizmi, kjer luminiscenco iducira prisotnost analita (v našem primeru živega srebra). Na ta način se aktivira promotor, ki povzroči tvorbo luciferaze (Meighen, 1991).

2.4.1.3 Toplotno zaznavni biosenzorji

Način toplotno zaznavnih biosenzorjev izkorišča eno od najbolj osnovnih lastnosti bioloških reakcij: nastajanje toplote. Izdelani so z združitvijo imobiliziranih encimskih molekul s temperturnimi senzorji. Ko pride do reakcije analita z encimom, se sprosti

toplota, ki jo senzor izmeri. Vsa proizvedena oziroma absorbirana toplota je sorazmerna molarni entalpiji in skupnemu številu molekul v reakciji. Takšne naprave za merjenje toplotne se imenujejo encimski termistorji. Njihova visoka občutljivost za temperaturne spremembe je namreč zelo primerna za takšne meritve. Za razliko od ostalih prevajalnikov signala termalni biosenzorji ne potrebujejo pogoste kalibracije in niso občutljivi za optične in elektrokemične lastnosti vzorca. Pogosto se na ta način meri prisotnost pesticidov ali patogenih bakterij (Atta in sod., 2011).

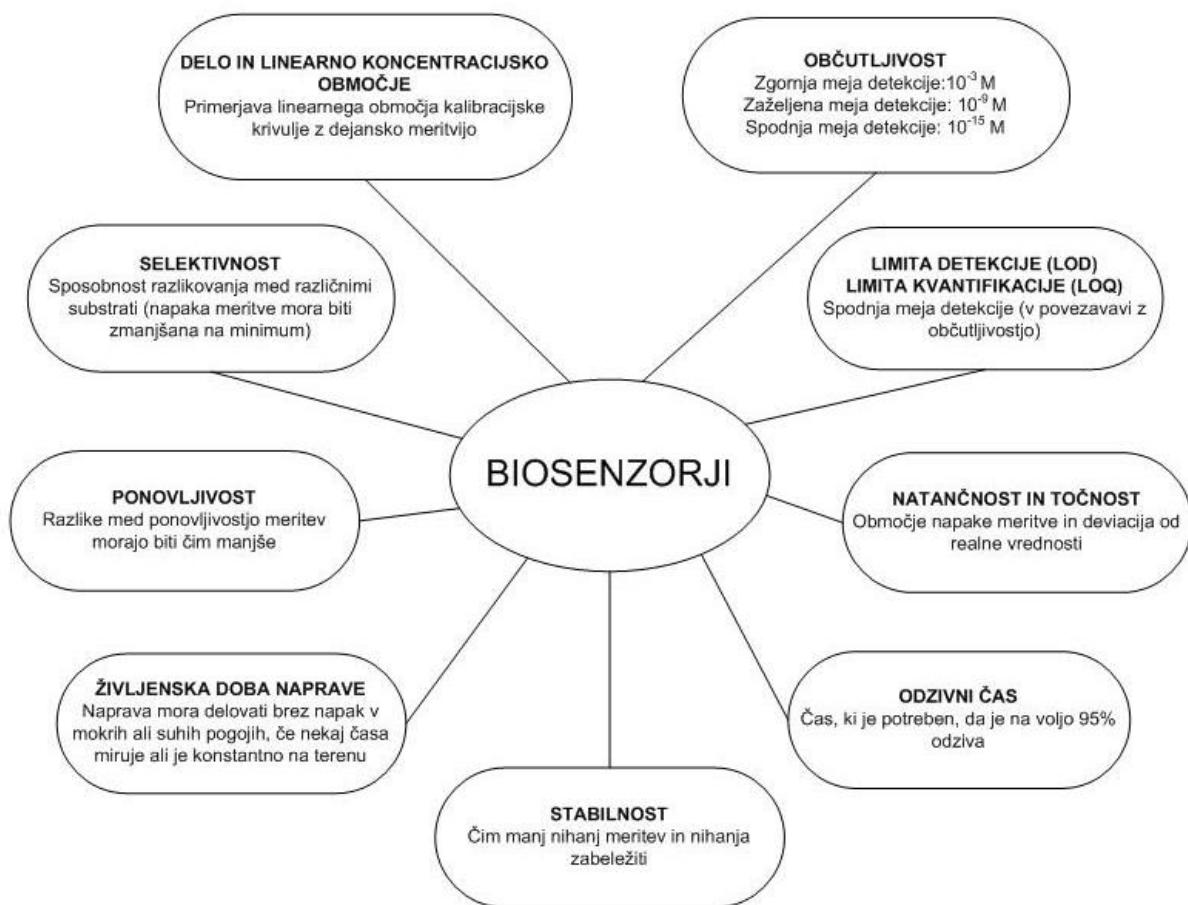
2.4.1.4 Ionsko občutljivi biosenzorji

Gre za polprevodne tranzistorje (Field Effect Transistor-FET), ki imajo ionsko občutljivo površino. Električni potencial površine se spremeni, ko nastane interakcija med ioni in polprevodnikom. Pri tem se lahko izmeri sprememba v potencialu (Atta in sod., 2011).

2.4.1.5 Elektrokemični biosenzorji

Večinoma jih uporabljam za zaznavanje hibridizirane deoksiribonukleinske kisline (DNA), zaznavanje drog, koncentracije glukoze itd. Mehanizem delovanja tovrstnih biosenzorjev je, da kemijska reakcija proizvede ali porablja ione ali elektrone in povzroči s tem spremembo v električnih lastnostih, ki so merljive. Elektrokemijske biosenzorje lahko razvrstimo po merjenju električnih parametrov na: konduktimetrične, amperometrične in potenciometrične. Pri konduktimetričnih biosenzorjih je merljiv parameter električna prevodnost. Ko proizvede elektrokemična reakcija ione in elektrone, se spremeni prevodnost. Občutljivost pri merjenju prevodnosti je zelo nizka. Amperometrični biosenzorji so zelo občutljivi in temeljijo na premikanju elektronov, nastalih pri redoks reakcijah.

Potenciometrični biosenzorji merijo oksidacijski ali reduksijski potencial elektrokemijske reakcije. Sprememba v porazdelitvi naboja povzroči spremembo naboja (Atta, 2011).



Slika 5: Najpomembnejše funkcionalne značilnosti biosenzorja (Atta in sod., 2011)

2.4.2 Mehanizmi delovanja biosenzorjev

Biosenzorje glede na kemijske interakcije lahko delimo na (Atta in sod., 2011):

- biokatalitične biosenzorje (encimske/metabolne)
- biosenzorje, ki so odvisni od bioafinitete ali biokomplementarnosti (glede na prepoznavni mehanizem s protitelesi, nukleinskimi kislinami, lektini itd.)
- biosenzorje, ki temeljijo na mikroorganizmih
- in drugi.

V primeru biokatalizatorjev je reakcija katalizirana z makromolekulami, ki so lahko prisotne v naravnem biološkem okolju ali pa so bile predhodno izolirane. Substrat reagira z imobiliziranim biokatalizatorjem in skupaj tvorita kompleks. Po končani reakciji je produkt sproščen v okolico, katalizator pa se regenerira. Poraba substrata ali sproščeni produkt sta dva pomembna biološka odziva, ki se pretvorita v merljiv električni signal, ki

ga meri detektor biosenzorja. Biokatalizatorji so običajno encimi, celice (bakterij, gliv), organeli (mitohondriji, celična stena) ali tkiva (rastlinska ali živalska). Najbolj pogosto se uporablajo encimi, ki bi jih lahko uvrstili v šest skupin: oksidoreduktaze (dehidrogenaze, oksidaze, peroksidaze, oksigenaze), transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze in ligaze. Mehanizem biokatalize temelji na katalitski pretvorbi analita iz nezaznavne oblike v zaznavno ali detekcijo analita, ki inhibira ali posreduje pri encimski aktivnosti (Atta in sod., 2011).

Način bioafinitetnih biosenzorjev temelji na selektivnih interakcijah med analitom, ki nas zanima, in biomolekulo, prisotno v naravi oziroma predhodno izolirano. Zmožnost protiteles za prepoznavanje različnih molekulskih struktur kaže na visoko selektivnost biosenzorjev, ki temeljijo na bioafiniteti (Atta, 2011).

Biosenzorji, ki temeljijo na mikroorganizmih, uporabljajo pogostokrat gensko modificirane mikroorganizme, s katerimi nato merimo prisotnost specifičnega analita (Atta, 2011).

2.5 BIOLUMINISCENČNI BIOSENZORJI

V naravi je veliko število bioluminiscentnih organizmov, ki lahko oddajajo luminiscenco. Proizvajajo jo lahko bakterije, glive, ribe, insekti, raki in lignji. Encim, ki katalizira bioluminiscenčne reakcije v teh organizmih, je luciferaza. Od naštetih skupin mikroorganizmov, ki izražajo luciferazo, so v okolju najbolj številčne bakterije, ki jih najdemo prosto plavajoče v oceanih, prisotne so kot saprofiti na poginulih ribah ali mesu, črevesni simbionti v prebavnem traktu morskih rib in paraziti v insektih ter rakih. Bakterije so po Gramu negativne, z gibljivimi bički in so fakultativni anaerobi, ki preferenčno rastejo anaerobno. Za merjenje onesnaženja v okolju, težkih kovin in pesticidov je potrebno gensko modificiranim mikroorganizmom vstaviti plazmid, ki bo imel genetski zapis za luciferazo. Ti geni so regulirani s promoterjem. Promoter lahko prepozna analit, ki ga želimo izmeriti. V praksi se to kaže tako, da mikroorganizem metabolizira preiskovanou snov, ki nas zanima. V našem primeru gre za živo srebro. Aktivira se promoter in začne se tvorba luciferaze, z oddajanjem svetlobe, ki jo izmerimo z luminometrom (Meighen, 1991).

Primeren reporterski sistem za produkcijo bioluminiscence sestavlja 5 strukturnih genov, z zaporedjem *luxCDABE* iz bakterije *Vibrio fischeri*. Reporter je hitro odziven, ima nizko mejo detekcije in je enostavno uporaben. Prvi bioluminiscenčni biosenzorji so se pojavili leta 1991. Takrat so jih uporabljali za detekcijo naftne in živega srebra (Geiselhart in sod., 1991) Kasneje se je začelo pojavljati vedno več člankov, v katerih so opisovali različne načine detekcije. Večinoma so opravljali raziskave na težkih kovinah, vendar so svoje raziskovanje razširili tudi na ogljikovodike organske snovi, kot so benzen in njegovi derivati ter nafta, in nekatere sintetične spojine, kot npr. poliklorirani bifenil (Daunert in sod., 2000). Biosenzorje za luminiscenco se uporablja tudi za težke kovine, kot so: Cd, Pb, Cr, Ni, Co, Zn, Cu, As. Pri večini biosenzorjev za težke kovine je bila za gostiteljski

organizem izbrana po Gramu negativna bakterija *Vibrio fischeri*, uporabljali pa so tudi *Escherichia coli* in *Pseudomonas* (Ivask in sod., 2009).

2.6 ODPORNOST BAKTERIJ PROTI ŽIVEMU SREBRU

O odpornosti bakterij na organsko in anorgansko živo srebro so prvič poročali leta 1960, pri izolatu *Staphylococcus aureus*, ki je istočasno odporen tudi na penicilin. V tistem času je to predstavljalo skrb, saj so bile živosrebrove spojine na široko uporabljane kot dezinfekcijsko sredstvo in antiseptik v bolnišnicah in drugih ustanovah (Moore, 1960). Nekaj let kasneje so ugotovili, da so za odpornost bakterij odgovorni plazmidi. Podobne raziskave so bile opravljene tudi na sevih *Escherichia coli* (Smith, 1967). Tisti čas so na Švedskem in tudi po nekaj ostalih državah začeli uporabljati fungicide, ki so vsebovali živo srebro. Fungicide so škropili po poljščinah, kar je bilo z zdravstvenega vidika skrb vzbujajoče. Raziskovalci so v raziskavah ugotovili, da obstajajo bakterije, ki lahko spremenijo živosrebrove organske spojine v hlapen Hg^0 (Tonomura in Kanzaki, 1969). Raziskave so pripeljale do spoznanja, da sta za rezistenco proti Hg^{2+} odgovorna gen *merA* (živosrebrova reduktaza) in gen *merB*. MerB ima funkcijo lize vezi med ogljikom in živim srebrom. V primeru lize metil živega srebra bi dobili metan (CH_4) in divalentno živo srebro (Hg^{2+}). Hg^{2+} pa se z reduktazo živega srebra (MerA) spremeni v hlapljiv Hg^0 . (Barkay in sod., 2003).

3 MATERIALI

3.1 MIKROORGANIZMI

Analize smo opravljali z gensko spremenjenima mikroorganizmoma:

- Sev *Pseudomonas putida*, ki vsebuje plazmid pHg4
- Sev *Pseudomonas putida*, ki vsebuje plazmid pDNlux

3.2 GOJIŠČA

3.2.1 Gojišče LB (Sigma)

Gojišče Luria-Bertani broth (LB) (Sigma) vsebuje naslednje sestavine v navedenih koncentracijah:

Tripton	10 g/L
Kvasni ekstrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
Kanamicin, raztopljen v vodi (Sigma)	50 µg/ml
Tetraciklin, raztopljen v vodi (Sigma)	25 µg/ml

Gojišče smo raztopili v destilirani vodi in avtoklavirali 15 minut pri 121° C. Antibiotika sta bila dodana po avtoklaviranju in sta bila filtrirana.

Pri pripravi plošč smo osnovnemu LB gojišču po avtoklaviranju, za gojenje bakterije *Pseudomonas putida* pHg4 dodali 50µg/ml kanamicina (Sigma), za gojenje bakterije *Pseudomonas putida* pDNlux, pa smo dodali 25µg/ml tetraciklina (Sigma).

3.2.2 Gojišče HMM (Sigma)

Gojišče Hepatocyte Maintenance Medium (Sigma) vsebuje naslednje sestavine v navedenih koncentracijah:

3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) (Sigma)	400 Mm
KCl (Sigma)	500 mM
NH4Cl (Sigma)	100 mM
MgSO ₄ (Sigma)	5 mM
Glukoza (Kemika)	40 %
Glicerol-2-fosfat (Sigma)	100 mM
FeCl ₃ (Sigma)	10 mM
Pepton iz kazeina (Sigma)	10 %
NaCl (Merck)	0,5 %

Kanamicin (Sigma)	50 µg/ml
Tetraciklin (Sigma)	25 µg/ml
Glicerol (Sigma)	10 %

Gojišče smo raztopili v destilirani vodi in avtoklavirali 15 minut pri 121° C. Vsako od sestavin MOPS, KCl, NH₄Cl, MgSO₄ smo raztopljal z destilirano vodo v ločenih čašah in jih nato raztopljlene zlili v eno. Naknadno smo v gojišče dodali glukozo, glicerol-2-fosfat ter FeCl₃, ki smo jih sterilizirali s filtracijo.

Pri pripravi tekočega gojišča smo gojišču HMM po avtoklaviranju za gojenje bakterije *Pseudomonas putida* pH4 dodali 50 µg/ml kanamicina (Sigma), za gojenje bakterije *Pseudomonas putida* pDNlux pa smo dodali 25 µg/ml tetraciklina (Sigma). Pozorni smo bili tudi na to, da smo glukozo, glicerol-2-fosfat in FeCl₃ dodajali po avtoklaviranju v ohlajeno gojišče, s čimer smo se izognili razpadu omenjenih komponent.

Za poskus v zamrzovalniku smo gojišču HMM pred avtoklaviranjem dodali 10 % glicerol.

3.3 APARATURE

- centrifuga: 2-16 K (Sigma)
- tehtnica: (Kern, ALS 120-4 N)
- pH-meter: (WTW-Inolab, pH/cond 730)
- magnetno mešalo: (Rotamix SHP-10)
- inkubator: (Memert)
- avtomatske pipete: (Eppendorf)
- avtoklav: A-21CA (Kambič)
- vrtinčnik: (IKA vortex genius 3)
- termoblok: (Bioshake iQ (Q instruments))
- inkubatorski stresalnik: (Biosan, Environmental Shaker - Incubator ES-20)
- spektrofotometer: (Ocean Optics inc., USB2000)
- naprava za merjenje luminiscence, fluorescence in adsorpcije: (Synergy H4 Hybrid reader (BioTek))

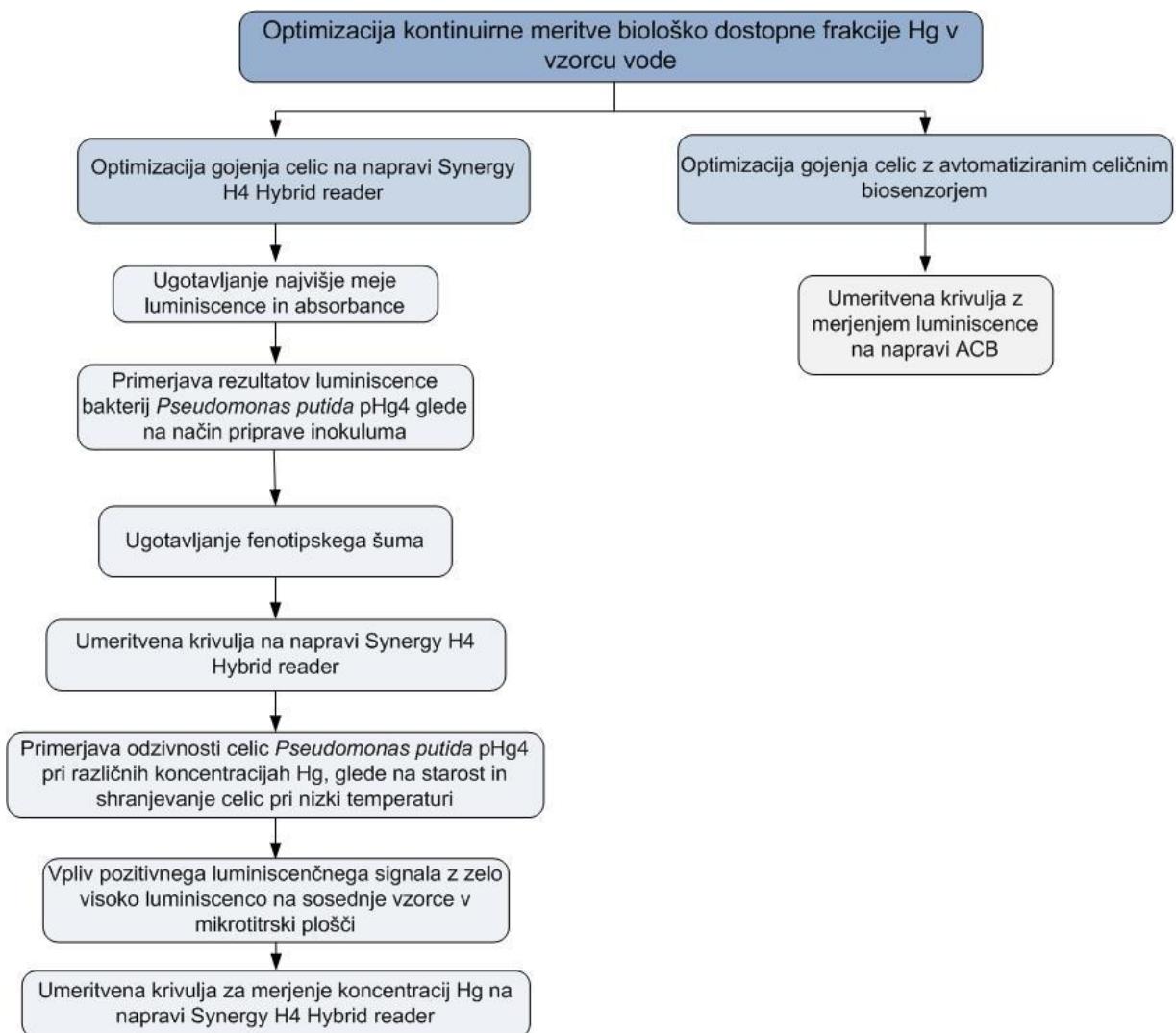
3.4 MATERIAL ZA ENKRATNO UPORABO

- sterilne centrifugirke: Sarstedt, (Cat. No. 60.9922.243)
- mikrotitrskie plošče za merjenje luminiscence: (Costar, 96 Well Half Area, No Lid, Flat Bottom, Non-Treated, Non-Sterile, White Polystyrene, (Cat. No. 3693))
- mikrotitrskie plošče za merjenje absorbance: (Greiner, 96 Well Polystyrene Cell Culture Microplates, (Cat. No. 655098))
- sterilne rokavice: (Kimtech)

- kivete: (Ratiolab, (Cat. No. 2712120))
- viale: (Supelco, 4mL Clear Vial, Screw Top Solid Cap with PTFE Liner (Cat. No. 27138))
- mikrotitrskie plošče za merjenje absorbance: (BRANDplates, (Cat. No. 781960))
- sterilne mikrocentrifugirke: (Sarstedt (Cat. No. 72.693))
- folija za gojenje na mikrotitrskih ploščah: (Kisker, Adhesive Aluminiumfolie)
- folija za gojenje na mikrotitrskih ploščah: (Diversified Biotech, Breathe Easy, (Cat. No. T093.1))

4 METODE DELA

Eksperimentalni del magistrske naloge je bil razdeljen v dva sklopa. Prvi sklop poskusov je potekal na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek), kjer smo merili absorbanco, pri valovni dolžini 600 nm, in luminiscenco bakterij *Pseudomonas putida* pDNlux ter *Pseudomonas putida* pHg4 v odvisnosti od časa inkubacije na mikrotitrskih ploščah. Z analizo absorbance smo spremljali rast bakterij oziroma koncentracijo celic, z luminiscenco pa svetilnost glede na različne koncentracije Hg v vzorcu vode. Drugi del poskusov je bil izveden na avtomatiziranem celičnem biosenzorju (ACB). Na napravi ACB se je gojenje celic razlikovalo od gojenja celic na napravi Synergy. Stresanje je nadomestilo prepihovanje, ki ga je bilo potrebno optimizirati za optimalen prenos kisika v gojitveni prostor.



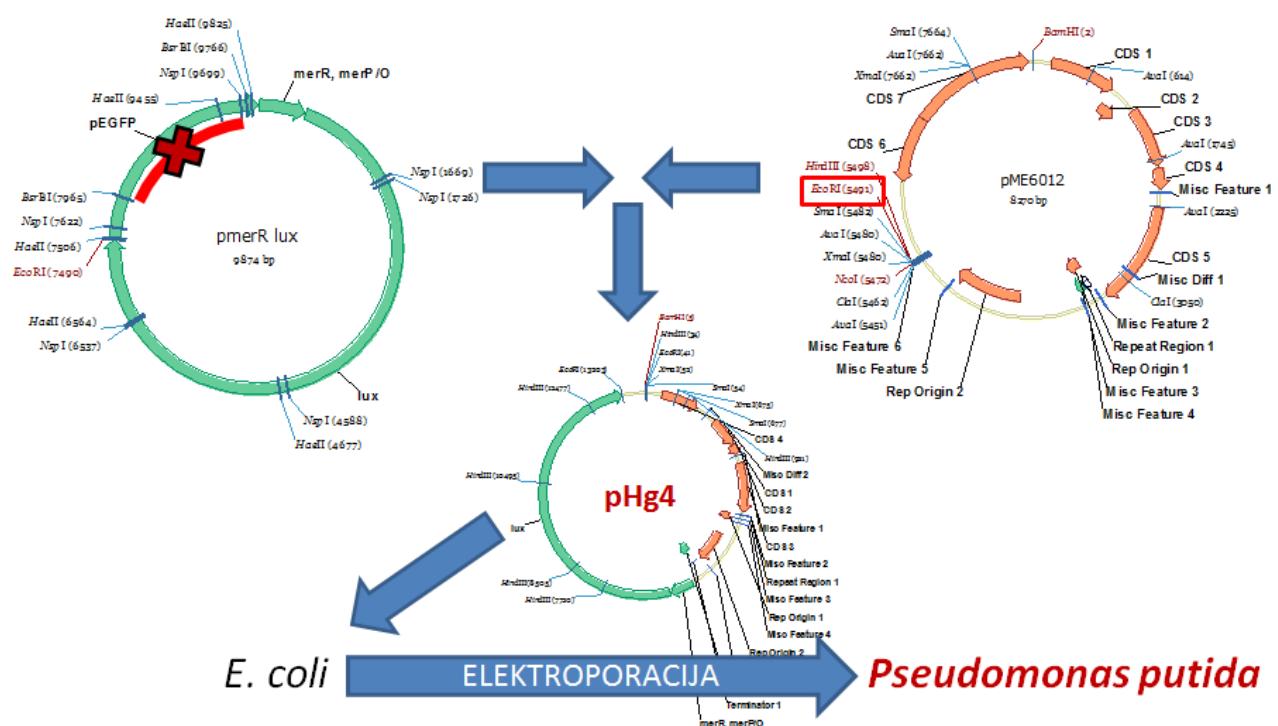
Slika 6: Shematski prikaz načrtovanja magistrske naloge, v kateri smo sprva optimizirali gojenje celic *Pseudomonas putida* na napravi Synergy H4 Hybrid reader in nato še optimizirali gojenje celic na ACB.

4.1 KONSTRUKCIJA PLAZMIDOV ZA *Pseudomonas. putida* pHg4 in *Pseudomonas. putida* pDNlux

Konstrukta *Pseudomonas putida* pHg4 in *Pseudomonas putida* pDNlux sta bila narejena prek projekta Hydronet (Dario, 2008). V tem delu smo uporabljali le vnaprej pripravljene konstrukte.

4.1.1 Opis priprave *Pseudomonas putida* pHg4

Organizma, ki sta bila potrebna za konstrukcijo gensko spremenjenih bakterij, sta bila *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli*. V plazmid je bilo potrebno vnesti gen, ki je v organizmu stabilen. V primeru bakterije *Pseudomonas putida* je bil to plazmid pME6012. pME6012 je prenosljivi vektor, ki se lahko pomnožuje tudi v *E.coli*, zato se je manipulacija s plazmidom lahko izvedla v *E.coli*. V vektor pME6012 so bili vstavljeni geni lux operona z ustreznimi promotorji, ki poženejo izražanje genov le ob prisotnosti živega srebra. Iz plazmida pMerR lux so bili izrezani geni lux operona in vstavljeni v EcoRI restrikcijsko mesto plazmida pME6012. Na ta način smo dobili plazmid pHg4. Glavne prednosti konstrukta so, da se lahko pomnožuje v *Pseudomonas putida*, tovrstne gensko spremenjene bakterije pa so s senzorskimi geni odporne tudi proti kanamicinu. Plazmid pHg4 se je nato vneslo v končni organizem *Pseudomonas putida*. Za metodo vnosa je bila uporabljena elektroporacija.

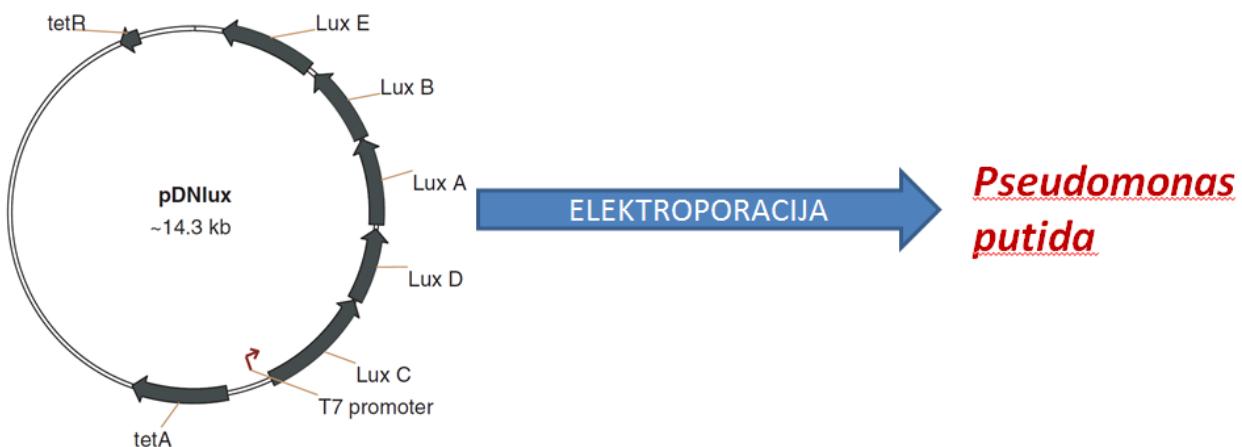


Slika 7: Konstrukcija plazmida za *Pseudomonas putida* pHg4.

4.1.2 Opis priprave *Pseudomonas putida* pDNLux

Plazmid pDNLux je bil z metodo elektroporacije vstavljen v *Pseudomonas putida*. Gre za plazmid, na katerem je lux operon pod nadzorom promotorja T7 (konstitutivna ekspresija), zato te celice stalno svetijo in smo jih v poskusih uporabili za kontrolo. Na plazmidu je zapis za odpornost proti tetraciklinu.

Z vnosom senzorskih genov za odpornost proti kanamicinu oziroma tetraciklinu smo dosegli, da smo imeli v gojišču le kulturo, ki je odporna na določen antibiotik. S tem smo se izognili kontaminacijam z drugimi neželenimi organizmi.



Slika 8: Konstrukcija plazmida za *Pseudomonas Putida* pDNLux.

4.2 OPTIMIZACIJA GOJENJA CELIC NA NAPRAVI SYNERGY H4 HYBRID READER

4.2.1 Priprava inokuluma

Za pripravo inokuluma smo potrebovali trdno gojišče LB (Sigma) in tekoče gojišče HMM. Trdno gojišče smo uporabili za nacepitev kultur *Pseudomonas putida* pHg4 in *Pseudomonas putida* pDNLux na gojitvene petrijevke. Na trdnem gojišču so čez noč pri 30° C zrasle kolonije, ki smo jih lahko naslednji dan prenesli v tekoče gojišče HMM. HMM gojišče omogoča dobro biološko dostopnost kovin, saj je revno gojišče z malo hranili, kar povroči, da začnejo celice raje metabolizirati Hg. V primeru, če bi bilo v gojišču dovolj hranil, celice ne bi metabolizirale Hg. Pri pripravi trdnega gojišča LB (Sigma) in tekočega gojišča HMM smo antibiotik kanamicin (za pripravo *Pseudomonas putida* pHg4) in tetraciklin (za pripravo *Pseudomonas putida* pDNLux) dodajali v ohlajeno gojišče. V ta namen smo si pripravili vodno kopel s približno 55° C, kamor smo po avtoklaviranju postavili erlenmajerice za 5 minut. Trdno gojišče je bilo tako pripravljeno za razlitje na plošče, kamor smo nacepili bakterije *Pseudomonas putida* pHg4 in *Pseudomonas putida* pDNLux ter jih čez noč inkubirali pri 30° C. Naslednji dan je sledilo precepljanje kolonije v

erlenmajerice s 25 mililitrov tekočega gojišča HMM in 48-urna inkubacija na stresalniku pri 250 obr./min in 26° C. Erlenmajerice so bile zaprte s staničevinastim, predhodno steriliziranim pokrovčkom, saj bakterije za svojo rast potrebujejo več kisika. Pri pripravi tekočega gojišča HMM je pomembno, da glukozo, glicerol-2-fosfat in FeCl₃ dodamo v ohlajeno gojišče.



Slika 9: Bakterije *Pseudomonas putida* pHg4 na trdnem gojišču LB z dodanim antibiotikom kanamicin pod UV-svetlogo.

4.2.2 Šaržna gojitev senzorskih celic *Pseudomonas putida* pHg4 in *Pseudomonas putida* pDNLux za ugotavljanje pogojev detekcije absorbance in luminiscence

Po 48 urah stresanja pri 250 obr./min in 26° C je sledila inokulacija v dve 150 mL erlenmajeric, v katerih je bilo 50 mL gojišča HMM z različnima vrstama antibiotikov. V prvo smo inokulirali 500 µL bakterij vrste *Pseudomonas putida* pDNLux, kjer je gojišče vsebovalo tetraciklin, v drugo pa 500 µL bakterij vrste *Pseudomonas putida* pHg4, kjer je bil v gojišču antibiotik kanamicin. Erlenmajerice smo stresali pri 250 obr./min, 26° C, 13 ur in merili po 2 urah na vsako uro absorbanco pri valovni dolžini 600 nm (mikrotitrská plošča Greiner, 96 Well Polystyrene Cell Culture Microplates) in luminiscenco (mikrotitrská plošča Costar, 96 Well Half Area, No Lid, Flat Bottom, Non-Treated, Non-Sterile, White Polystyrene) na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Z absorbanco smo spremljali rast celic, z luminiscenco pa svetilnost celic.

4.2.3 Primerjava rezultatov luminiscence bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 glede na način priprave inokuluma

V poskusu smo želeli ugotoviti, kakšna bo absorbanca in luminiscenca pri bakterijah *Pseudomonas putida* pHg4, če bi čez noč inkubirali vcepek iz tekoče kulture ali pa vcepek kolonije iz trdnega gojišča. Meritve so bile opravljene zaradi težnje po čim bolj enostavni pripravi vcepka in čim boljše detekcije, da je lahko senzorska naprava v najkrajšem možnem času pripravljena za optimalno uporabo. Ugotavliali smo, pri katerem načinu priprave vcepka bo absorbanca, pri kateri merimo rast bakterij in luminiscenca, pri kateri merimo svetilnost, večja. Poskusa sta potekala vzporedno z isto pripravo in različnim načinom priprave vcepka.

V vsako od dveh 10 mL centrifugirk smo dali po 5 mL gojišča HMM in 25 µL antibiotika kanamicina. V prvo centrifugirko smo vnesli 100 µL suspendiranega inokuluma. V drugo centrifugirko pa smo iz trdnega gojišča pri sterilnih pogojih z ezo prenesli eno kolonijo. Obe centrifugirki smo inkubirali na stresalniku pri 250 obr./min, 26° C, 24 ur.

Po 24-urnem stresanju je sledila ločena inokulacija, sprva bakterij *Pseudomonas putida* pHg4, ki so bile inokulirane iz tekočega gojišča, in nato še bakterij, ki so bile nacepljene iz trdnega gojišča. V obeh primerih smo zaradi primerljivosti inokulirali 500 µL inokuluma, v 150 mL erlenmajerice po 50 mL gojišča HMM in 250 µL antibiotika kanamicina. Po opravljeni inokulaciji je sledilo 10-urno inkubiranje s stresanjem pri 250 obr./min in 26° C. Po vsaki uri je bilo stresanje prekinjeno za opravljanje meritve na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek).

4.2.4 Gojitev bakterijskih kolonij *Pseudomonas putida* pHg4 za določitev fenotipskega šuma

Gojili smo 10 paralelki bakterijskih kolonij za raziskavo fenotipskega šuma. Raziskavo fenotipskega šuma smo opravljali, ker nas je zanimalo, kakšna je ponovljivost rezultatov meritve luminiscence iz iste agar plošče. Poskus smo zasnovali tako, da smo v 10 centrifugirk dali 10 ml tekočega gojišča HMM in 50 µL antibiotika kanamicina ter z ezo v vsako prenesli po eno kolonijo bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 in inkubirali čez noč na stresalniku pri enakih pogojih kot doslej, 250 obr./min, 26° C.

Naslednji dan smo prenesli 5 mL vcepka v 50 mL HMM gojišče in dodali 250 µL antibiotika kanamicina. Centrifugirke smo stresali pri enakih pogojih, kot je potekala prekonočna inkubacija. Stresanje smo na vsako uro prekinili in izmerili absorbenco in luminiscenco na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek).

4.2.5 Umeritvena krivulja z merjenjem luminiscence na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek)

Cilj je bil izmeriti odzive celic, ko pridejo v stik z živim srebrom v času 4 ur. V ta namen smo pripravili redčitveno vrsto biološko dostopnega živega srebra Hg^{2+} in spremljali odziv. Zaradi kratke stabilnosti Hg smo založne raztopine pripravljali sveže in jih shranjevali pokrite s folijo v hladilniku. Koncentracije živega srebra, pri katerih smo merili luminiscenco, so bile naslednje: 4 $\mu\text{g/L}$, 6 $\mu\text{g/L}$, 7 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$, 9 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 12 $\mu\text{g/L}$, 14 $\mu\text{g/L}$, 16 $\mu\text{g/L}$, 18 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$, 25 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$, 35 $\mu\text{g/L}$, 40 $\mu\text{g/L}$.

Poskus smo izvedli v 4 paralelkah. Izbrali smo 4 poljubne kolonije bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 in jih prekonočno gojili v 10 mL centrifugirkah s 5 mL gojišča HMM, pri 250 obr./min, 26° C.

Po prekonočni kultivaciji je sledilo merjenje absorbance v kiveti z 1 mL vzorca na napravi Ocean Optics inc., USB2000. Za zagotavljanje ponovljivosti rezultatov smo se odločili, da bo izhodiščna absorbanca v gojišču (pri valovni dolžini 600 nm) okoli 0,200 AU. V ta namen smo vsakokrat preračunali, koliko vcepka moramo vnesti v gojišče, da bo absorbanca $\sim 0,200$ AU. Mikrotitrskie plošče, v katerih smo gojili celice z dodanimi redčitvami Hg, smo prekrili s folijo za gojenje na mikrotitrskih ploščah, da se vsebina v luknjicah ni prelivala v sosednje luknjice. Stresanje je potekalo na napravi Bioshake iQ. Stresanje je potekalo 4 ure pri predzadnji stopnji moči stresanja, saj je svetilnost odvisna od lux operona, ta pa je odvisen od ATP sintaze in kisika. Kisik zagotovimo z močnim stresanjem. V luknjice smo odpipetirali 75 μL kulture *Pseudomonas putida* pHg4 in 75 μL želene redčitve živega srebra. Meritev luminiscence smo opravljali na vsako uro, 4 ure in ob času 0 na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Za kontrolo smo uporabili 75 μL kulture in 75 μL vode. Umeritveno krivuljo smo pripravili iz podatkov 4 ur gojenja celic pri različnih koncentracijah živega srebra ter spremljali odziv celic z luminiscenco.

4.2.6 Shranjevanje celic *Pseudomonas putida* pHg4 v zamrzovalniku pri temperaturi –80° C

Zanimalo nas je, kako se celice odzivajo na ekstremne pogoje shranjevanja v zamrzovalniku pri temperaturi – 80° C in kakšni bosta rast ter luminiscanca celic po odmrznitvi. Večja odpornost celic nam bi skrajšala čas priprave bakterij, saj bi si vnaprej lahko pripravili zalogu kultur. Na ta način bi lahko skrajšali čas priprave kultur in meritev bi lahko opravili hitreje.

Poskusa za pripravo celic smo se lotili z izbiro štirih poljubnih kolonij bakterij *Pseudomonas putida* pHg4, ki smo jih prekonočno gojili v 5 mL gojišča HMM, pri 250 obr./min, 26° C. Naslednji dan smo v 1 mL vzorca izmerili absorbanco na napravi Ocean Optics inc., USB2000 in centrifugirali 1 mL vzorca pri 10.000 obr./min 5 minut. Supernatant smo odlili, pelet pa prenesli v 10 mL centrifugirko, v kateri je bilo ravno

toliko gojišča HMM z dodanim 10 % glicerolom v vlogi krioprotектanta, da je bila končna absorbanca vzorca ~ 0,200 AU. Celice smo zamrznili pri -80° C za 24 ur.

Naslednji dan smo jih odmrznili in prenesli po tri paralelke vsake od štirih izbranih kolonij na mikrotitrsko ploščo. V luknjice smo dali 75 µL celic in 75 µL želene redčitve živega srebra, jih prekrili s folijo za gojenje na mikrotiterskih ploščah, stresali na napravi Bioshake iQ in opravljali meritev luminiscence na vsako uro, 4 ure in ob času 0 na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Za kontrolo smo uporabili 75 µL kulture in 75 µL vode. Končne koncentracije živega srebra so bile naslednje: 0,4 ug/L; 1,2 ug/L; 4 ug/L; 8 ug/L; 12 ug/L; 16 ug/L.

4.2.7 Primerjava odzivnosti celic *Pseudomonas putida* pHg4 pri različnih koncentracijah Hg glede na starost in shranjevanje celic pri nizki temperaturi

Primerjali smo odzivnost celic *Pseudomonas putida* pHg4 pri različnih koncentracijah Hg ter luminiscenco celic v odvisnosti od temperature in časa shranjevanja. Prva analizirana kultura je bila shranjena 24 ur pri -80° C, druga 7 dni pri 4° C, tretja pa 39 dni pri 4° C. V vseh treh primerih smo uporabili 4 kolonije celic *Pseudomonas putida* pHg4.

Odzivnost celic 7 in 14 dni stare kulture smo se lotili z meritvijo absorbance na napravi Ocean Optics inc., USB2000. Sledilo je redčenje vzorca kulture s svežim gojiščem HMM na končno absorbanco ~ 0,200AU. V luknjice smo dali 75 µL celic in 75 µL želene redčitve živega srebra, jih prekrili s folijo za gojenje na mikrotitrske plošče, stresali na napravi Bioshake iQ in opravljali meritev luminiscence na vsako uro, 4 ure in ob času 0 na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Za kontrolo smo uporabili 75 µL kulture in 75 µL vode. Redčitve živega srebra so bile naslednje: 0,4 ug/L; 1,2 ug/L; 4 ug/L; 8 ug/L; 12 ug/L; 16 ug/L.

4.2.8 Vpliv pozitivnega luminiscenčnega signala z zelo visoko luminiscenco na sosednje vzorce v mikrotitrski plošči

Namen raziskave sipanja luminiscence iz okolice na izbrano meritev, v našem primeru točno določeno luknjico na mikrotitrski plošči, je bil ugotoviti, ali pozitiven signal, ki je v bližini mesta opravljanja meritve, vpliva na končni rezultat merjenja luminiscence. Rezultat bi lahko bil v takem primeru lažno višji. Test smo izvedli na mikrotitrske plošče za merjenje luminiscence (Costar, 96 Well Half Area, No Lid, Flat Bottom, Non-Treated, Non-Sterile, White Polystyrene), na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek).

V poskusu smo uporabili bakterijo *Pseudomonas putida* pDNlux, ker za svetilnost ne potrebuje dodatka živega srebra, saj oddajajo zelo močno luminiscenco in so bolj primerne za opravljanje poskusa.

Poskusa smo se lotili tako, da smo precepili kolonijo *Pseudomonas putida* pDNlux iz trdnega gojišča v 5 mL tekoče gojšče HMM, dodali 12,5 mL antibiotika tetraciklina in

stresali 24 ur pri pogojih 250 obr./min, 26° C. Po 24 urah je sledilo merjenje luminiscence na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Merjenje je potekalo tako, da smo sprva injicirali 150 µL v luknjico na sredini mikrotitrsko plošči in izmerili rezultat samo z eno napolnjeno luknjico na mikrotitrski plošči. Ostale luknjice so ostale prazne, saj nas je zanimalo, kakšne bodo izmerjene vrednosti luminiscence v ostalih praznih luknjicah. S tem se prepričamo, ali na meritev, ki jo opravimo v točno določeni luknjici, vpliva tudi svetilnost sosednjih. Luknjice smo postopoma dopolnjevali z vzorcem in vsakokrat opravili meritev.

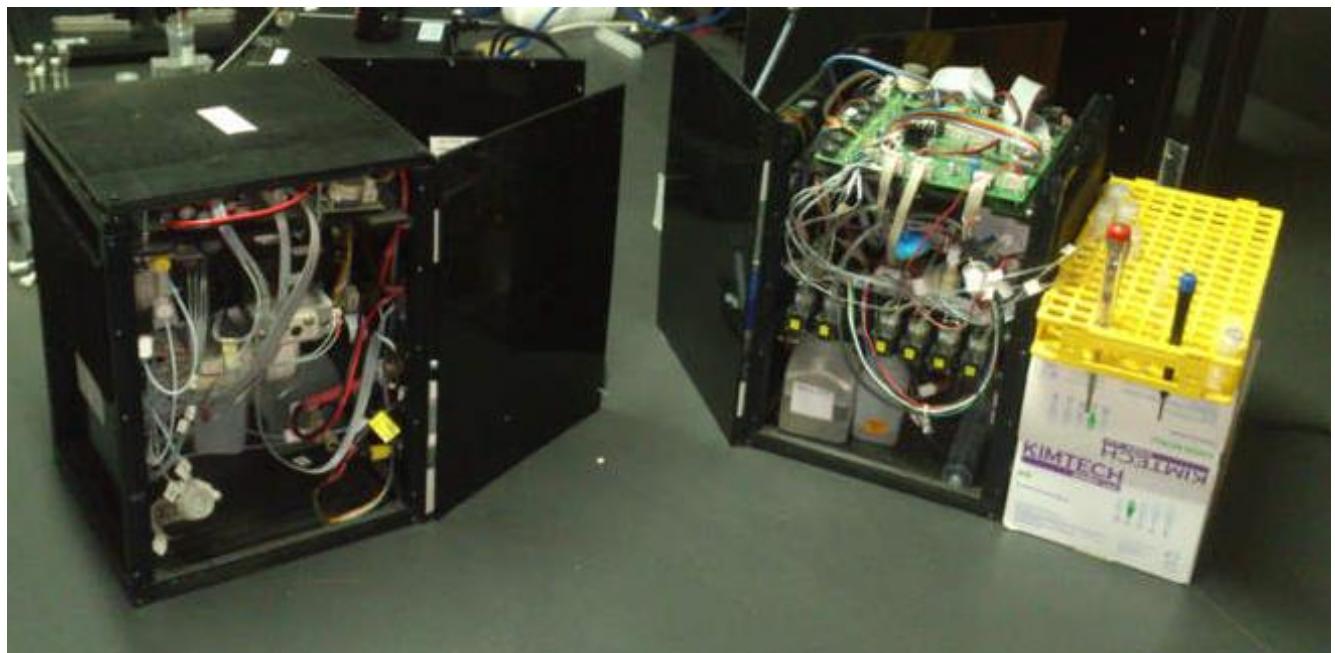
4.3 OPTIMIZACIJA AVTOMATIZIRANEGA CELIČNEGA BIOSENZORJA

4.3.1 Opis ukazov za vzpostavitev računalnika z avtomatiziranim celičnim biosenzorjem

4.3.1.1 Ukazi za vzpostavitev računalnika z avtomatiziranim celičnim biosenzorjem

Če želimo senzor krmiliti prek protokola UART, morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

- Stikalo »CAN/UART« mora biti na poziciji »UART«.
- Stikalo »INIT/OPERATE« mora biti na poziciji »OPERATE«.
- Kabel UART mora biti priključen na ustreznom mestu na vezju.



Slika 10: Prikaz avtomatiziranega celičnega biosenzorja.

4.3.2 Krmiljenje senzorjev in postopek meritve

4.3.2.1 Strojna iniciacija robota

Vklop ACB se izvede s prestavitevijo stikala na oznako ON, s tem aktiviramo strojno iniciacijo ACB, ki izvede naslednje naloge:

- Premik fotopomnoževalke do največje oddaljenosti od začetnega stanja, kar v našem primeru pomeni do zadnjega analiziranega vzorca in nazaj.
- Kratek, dvostopenjski premik ventila.
- Premik brizgalke do maksimalnega volumna in nazaj.

4.3.2.2 Aktivacija programa Matlab z napravo ACB

Z aktivacijo smo naložili vse gonilnike v program Matlab za brezhibno delovanje vseh podnaprav v ACB.

- V programu Matlab odpremo okno, imenovano »Command Window«, in vanj vtipkamo ukaz »deviceConnect«. S tem ukazom vzpostavi program povezavo med ACB in krmilnim računalnikom.
- Vzpostavitev povezave poteče uspešno, če se po izvedbi ukaza pojavi napis »Found device«.
- Če je bilo povezovanje uspešno, vtipkamo ukaz »devInit«, da poteče programska iniciacija robota.
- V polju »Command Window« se pokaže znak », kar pomeni, da lahko začnemo vnašati nadaljnje ukaze.

4.3.2.3 Krmiljenje senzorja

Ukazi (x pomeni številčno spremenljivko, _ pomeni presledek, zelo pomembne so tudi velike in male začetnice)

- **Clear all; close all;clc;** ukaz za izbris vse zgodovine v polju, kamor smo vpisovali ukaze. Ukaz se običajno uporablja kot prvi ukaz, ki mu sledita ukaza »deviceConnect« in »devInit«
- **deviceConnect** ukaz za povezovanje robota s krmilnim računalnikom

- **devInit** ukaz za programsko iniciacijo
- **VntlPos(s,_x);** ukaz za postavitev ventila na določeno pozicijo od 1 do 14.
- **WpmpCnt(s,_x);** ukaz za premik brizgalke. Številka v oklepaju predstavlja število obratov motorja brizgalke in ima območje od najnižje vrednosti 0 pa do maksimalne vrednosti 215000. Primer WpmpCnt(s,215000) torej pomeni premik bata brizgalke na skrajno pozicijo (zajem največjega možnega volumna). Za izpraznitve tekočine iz brizgalke po zajetju (za vračanje bata v začetni položaj) v naslednjem ukazu pa v oklepaj vnesemo številko 0. Možno je tudi postopno praznjenje brizgalke, pri čemer bi uporabili več zaporednih ukazov, kjer število obratov manjšamo na 0.

Primer postopnega praznjenja brizgalke:

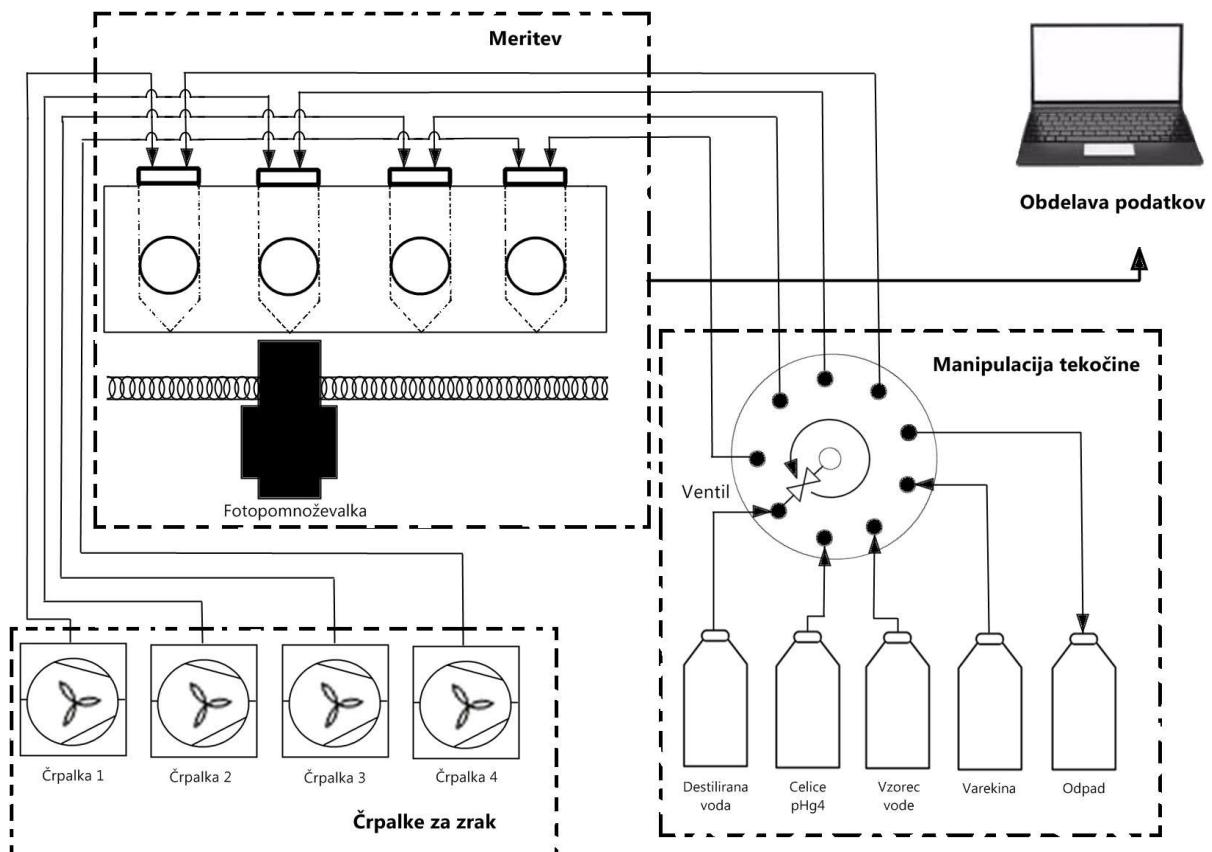
VntlPos(s, 1);	postavitev ventila na pozicijo 1
WpmpCnt(s, 215000);	zajem maksimalnega volumna tekočine z brizgalko
VntlPos(s, 13);	premik ventila na pozicijo 13
WpmpCnt(s, 107500);	praznjenje brizgalke do polovice volumna brizgalke
VntlPos(s, 14);	premik ventila na pozicijo 14
WpmpCnt(s, 0);	praznjenje preostanka tekočine iz brizgalke

- **AirPumps(s, bin2dec('xxxxxx'));** ukaz za določitev statusa zračnih črpalk, številka 0 pomeni, da je črpalka ugasnjena, številka 1 pomeni, da je črpalka prižgana. Prvi dve črpalki prepihujeta reaktorje, preostale štiri pa merilne kivete. Primer AirPumps(s, bin2dec('001111')); pomeni, da sta prvi dve črpalki za prepihanje s kisikom ugasnjeni, preostale 4 pa prižgane.
- **pause(x);** je ukaz, ki v izvajanju nekega zaporedja ukazov vnese pavzo v trajanju x sekund.
- **disp('napis, ki ga želiš, da bo prikazan po izvedbi predhodnega ukaza');** je ukaz, ki ga lahko dodamo takoj za izbranim ukazom, in nas s tekstrom, ki je znotraj oklepaja pod narekovaji, obvesti, da je bil ukaz izведен.
- **Xlswrite('meri.xls', ftpmnRez);** ukaz, ki pomeni zapis matrike izmerjenih vrednosti v Exel datoteko z imenom meri.xls.
- **%;** znak se lahko uporablja, ko želimo napisati komentar in ga lahko dodamo pred ukazno vrstico, za katero želimo, da se v nem zaporedju ne izvede in se jo preskoči a je zaradi tega ni potrebno izbrisati. Lahko pa jo uporabimo tudi po ukazni vrstici, pred začetkom besedila, v katerem lahko navedemo dodatne opisne informacije o tem ukazu.

- **ftpmlnRez = zeros(1,4);** ukaz za izpis matrike v eni vrstici s štirimi meritvami, ki jih nadomestijo vrednosti meritev.
- **FtpmPos(s,1);** premik fotopomnoževalke, ki razbere vrednost meritve na poziciji 1.
- **[status ftpmlnRez(i,_1)] = FtpmMeasure(s, 100);** izvedba meritve, ki traja 100 milisekund
- Izvajanje ukaza lahko med potekom prekinemo s kombinacijo tipk Ctrl+C.

4.3.2.4 Zanka

Zanka je zaporedje ukaznih vrstic, ki ga na koncih oklepata besedi **for** in **end**. V zanko nanizamo ukaze takrat, ko želimo, da se isto zaporedje ukazov ponovi večkrat. Z zapisom v obliki zanke se izognemo nezaželenemu ponavljanju ukaznih vrstic v skripti za boljšo preglednost. Poleg besede **for** in zaključkom zanke z besedo **end** navedemo še, kolikokrat želimo, da se zanka ponovi. Ukaz **for i=1:1:2** pomeni, da se vsaka ukazna vrstica izvede po enkrat, cela zanka pa se ponovi dvakrat.

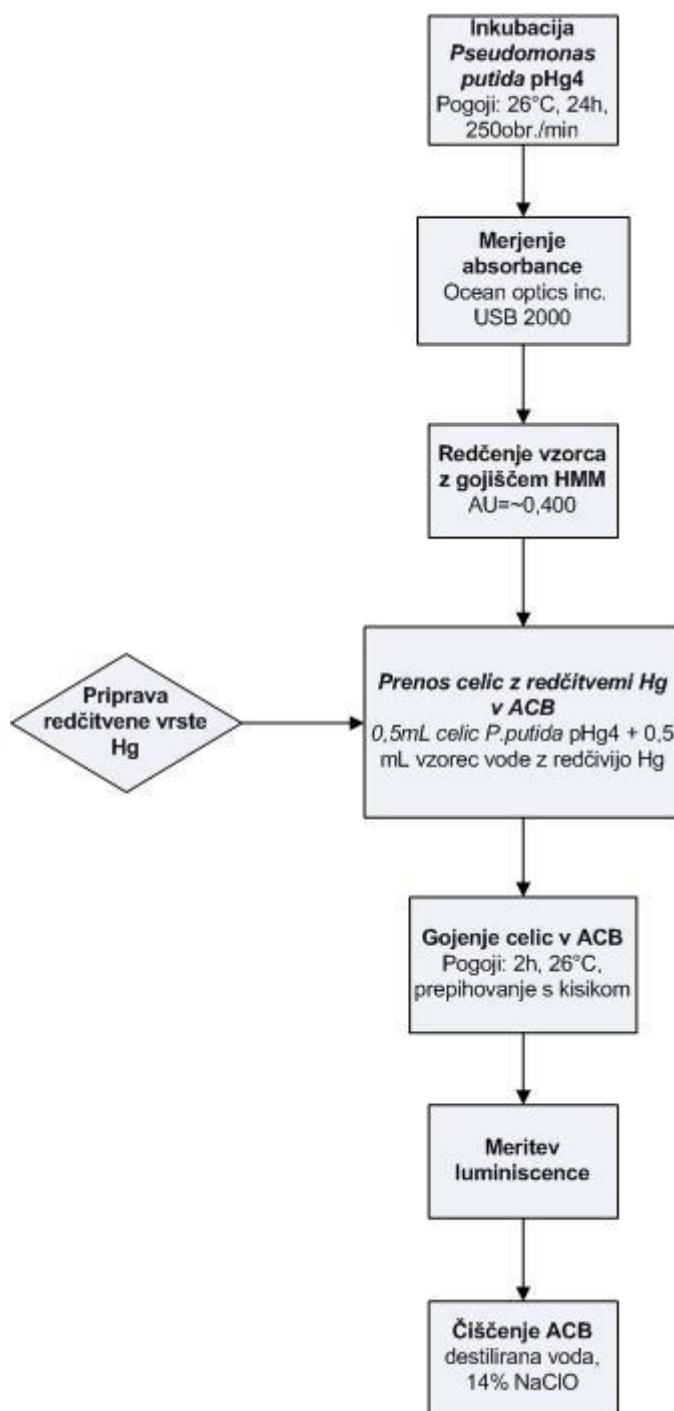


Slika 11: Biopresnska shema avtomatiziranega celičnega biosenzorja.

4.3.3 Umeritvena krivulja za določanje koncentracij Hg z merjenjem luminiscence na napravi ACB

Dela smo se lotili tako, da smo sprva precepili bakterije *Pseudomonas putida* pHg4 iz trdnega gojišča v tekoče gojišče HMM in jih inkubirali čez noč pri 26° C, 24 ur in 250 obr./min. Naslednji dan smo izmerili prekonočni kulturi absorbanco v kivetih z napravo Ocean Optics inc. USB 2000 in vzorec redčili s svežim gojiščem HMM tako, da smo dobili končno absorbanco AU=~0,400. Sledil je prenos redčene kulture v ACB z računalniškimi ukazi v štiri prirejene plastične centrifugirke z vstavljenimi cevkami za prepohovanje z zrakom. V prvih treh centrifugirkah je bilo 0,5 mL kulture *Pseudomonas putida* pHg4 in 0,5 mL znane koncentracije Hg, redčene v destilirani vodi. Četrto centrifugirko smo uporabili za kontrolo in je vsebovala 0,5 mL kulture ter 0,5 mL destilirane vode. Znane koncentracije za potrebe umeritvene krivulje so bile: 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,8 µg/mL; 1,2 µg/mL; 2,4 µg/mL.

Tako smo pripravili vse potrebno za šaržno gojenje celic v napravi ACB z intervalnim prepohavanjem zraka. Po dvournem prepohovanju je sledila meritev luminiscence s fotopomnoževalko. Fotopomnoževalka je zelo občutljiva na svetlobo, zato smo bili primorani najti ustrezno rešitev. ACB smo postavili v temen prostor z improviziranim črnim ohišjem z vratci za lažji dostop do notranjosti naprave. Na ta način smo poskrbeli, da naprava ni bila izpostavljena svetlobi, ki bi lahko vplivala na meritve. Po opravljenem merjenju je sledilo zaporedje ukazov, s katerimi smo očistili ACB. Sprva smo vse komponente, kjer se je nahajal vzorec, sprali z 14 % NaClO in nato še z destilirano vodo.

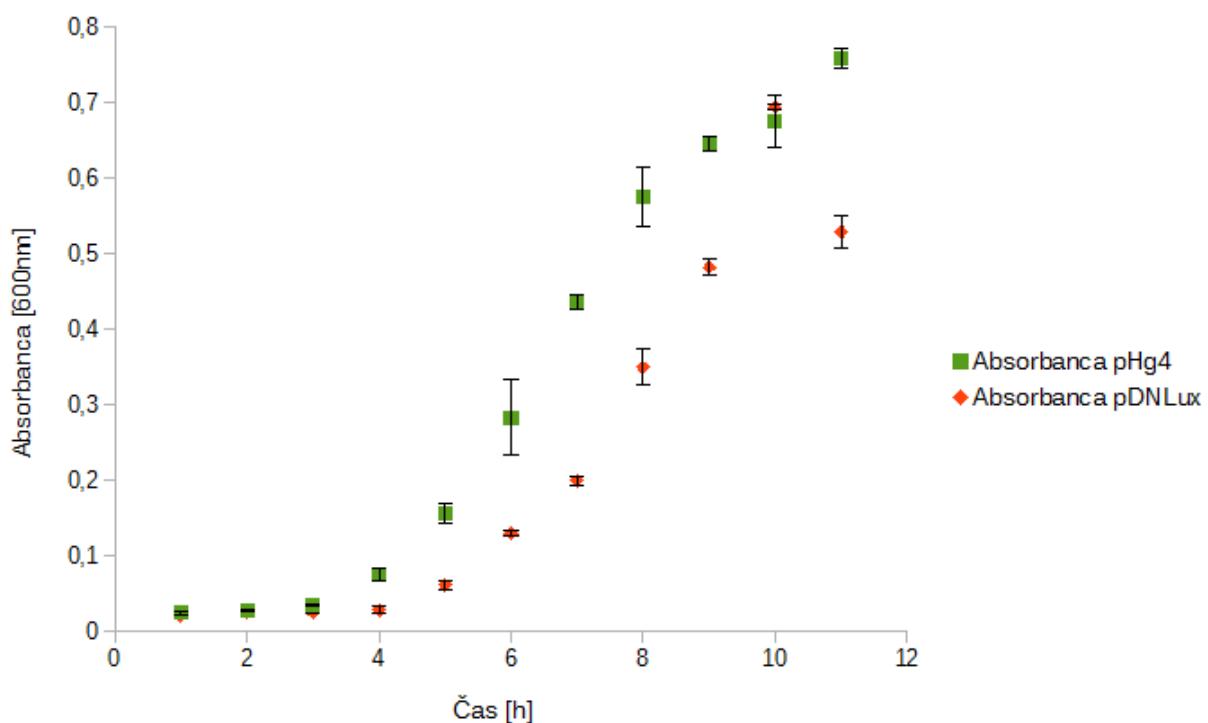


Slika 12: Shematski prikaz merjenja luminiscence z napravo ACB.

5 REZULTATI

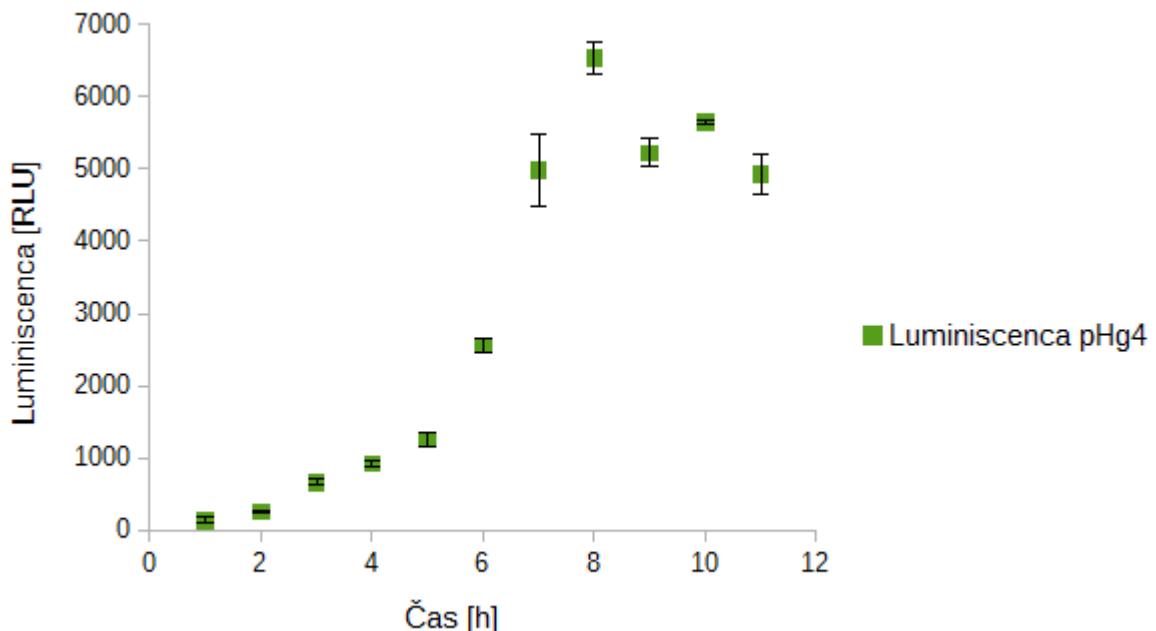
5.1 DOLOČITEV NAJVIŠJIH MEJ DETEKCIJE LUMINISCENCE IN ABSORBANCE PRI *Pseudomonas putida* pHg4 BREZ PRISOTNOSTI Hg

Namen šaržne gojitve senzorskih celic *Pseudomonas putida* pHg4 in *Pseudomonas putida* pDNLux je bil ugotoviti, v kolikšnem času in pri kakšni absorbanci celice dosežejo največjo svetilnost. 11 ur smo merili absorbanco in luminiscenco. Z absorbanco smo spremljali rast oziroma koncentracijo celic. Z luminiscenco pa smo spremljali svetilnost.

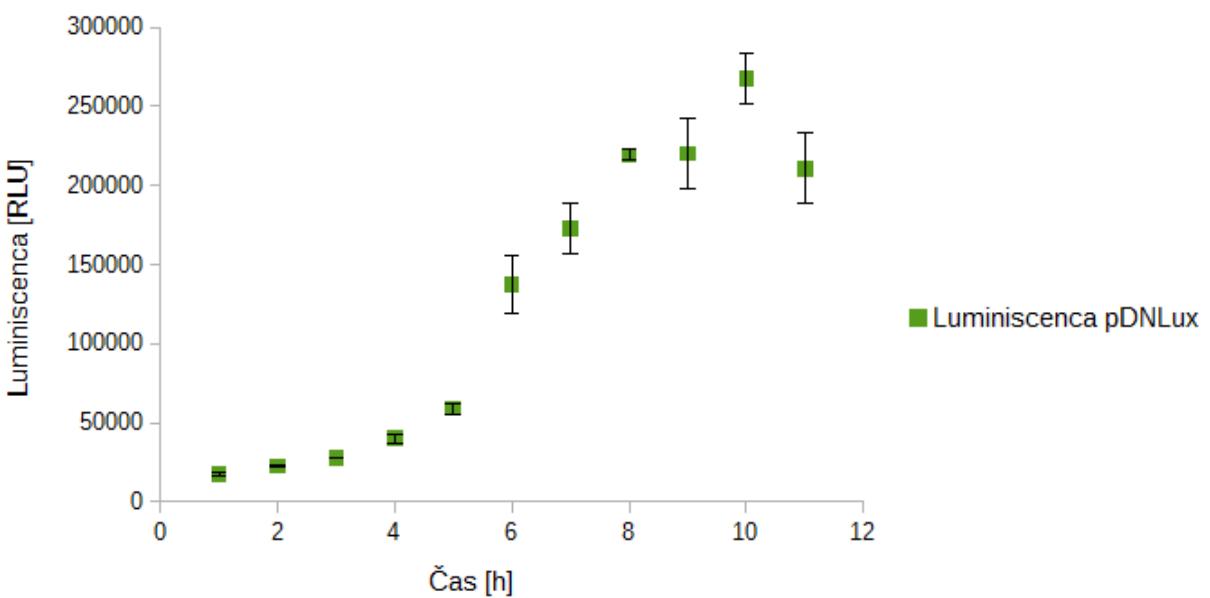


Slika 13: Rast bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 in pDNLux, ki smo jo spremljali z merjenjem absorbance. Rezultati so prikazani kot povpreče s standardnim odklonom ($n=3$).

Iz grafikona, nastalega na podlagi 11-urnega merjenja (Slika 13), je razvidno, da se seva razlikujeta po dolžini lag faze, torej v fazì prilagajanja na sveže obogateno gojišče. Sev pDNLux ima daljšo lag fazo, kot sev pHg4. Po treh urah gojitve pri enakih pogojih imata seva približno enake vrednosti absorbanc (Slika 13), ki pa se začnejo razlikovati po 4 urah rasti. Po 4 urah začnejo celice prehajati v eksponentno fazo, kjer se že opazijo večje razlike v vrednostih absorbanc. Največjo razliko v absorbancah smo izmerili po 7 urah (Slika 13), kasneje se zmanjuje vse do meritve pri 10 urah, kjer sta absorbanci skoraj enaki. Eksponentna faza rasti se po 10 urah pri sevu pDNLux ustavi, za razliko od seva pHg4 (Slika 13).



Slika 14: Luminiscenca bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 v odvisnosti od časa. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardnim odklonom ($n=3$).



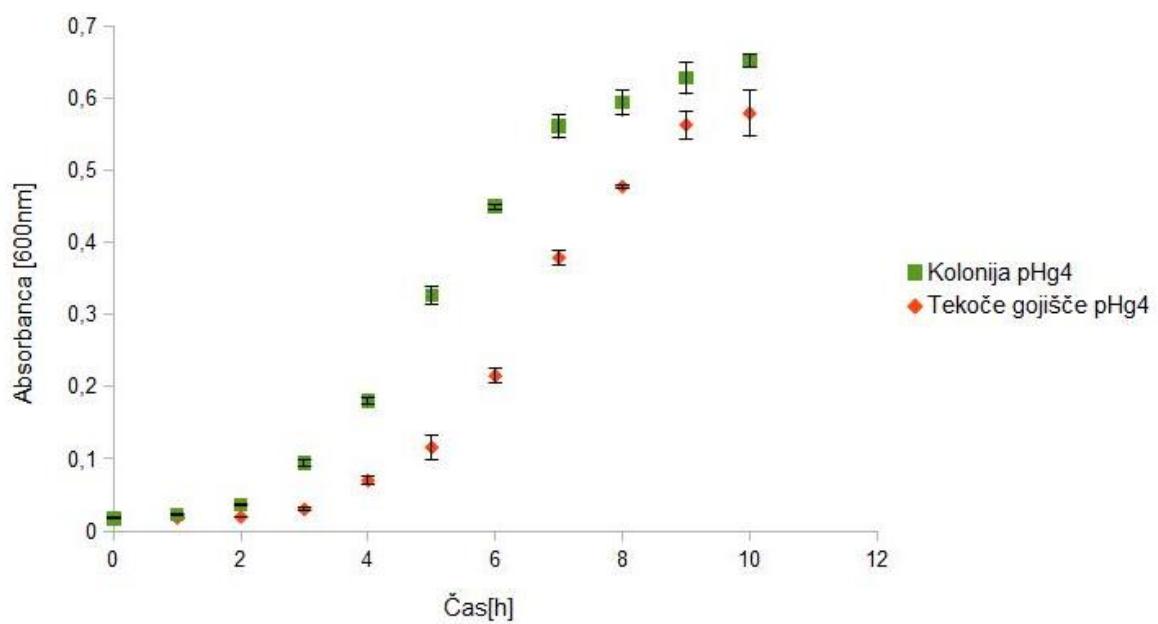
Slika 15: Luminiscenca bakterij *Pseudomonas putida* pDNLux v odvisnosti od časa. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardnim odklonom ($n=3$).

Razlika v sevih pHg4 in pDNLux je v tem, da je luminiscenca pri sevu pDNLux (Slika 15) veliko višja kot pri sevu pHg4 (Slika 14), kar je ustrezno, saj sev pDNLux služi kot kontrolni organizem in luminiscira brez dodatka živega srebra. Sev pHg4 brez prisotnosti živega srebra ne luminiscira v takšni meri kot kontrolni organizem. Luminiscenca (Slika

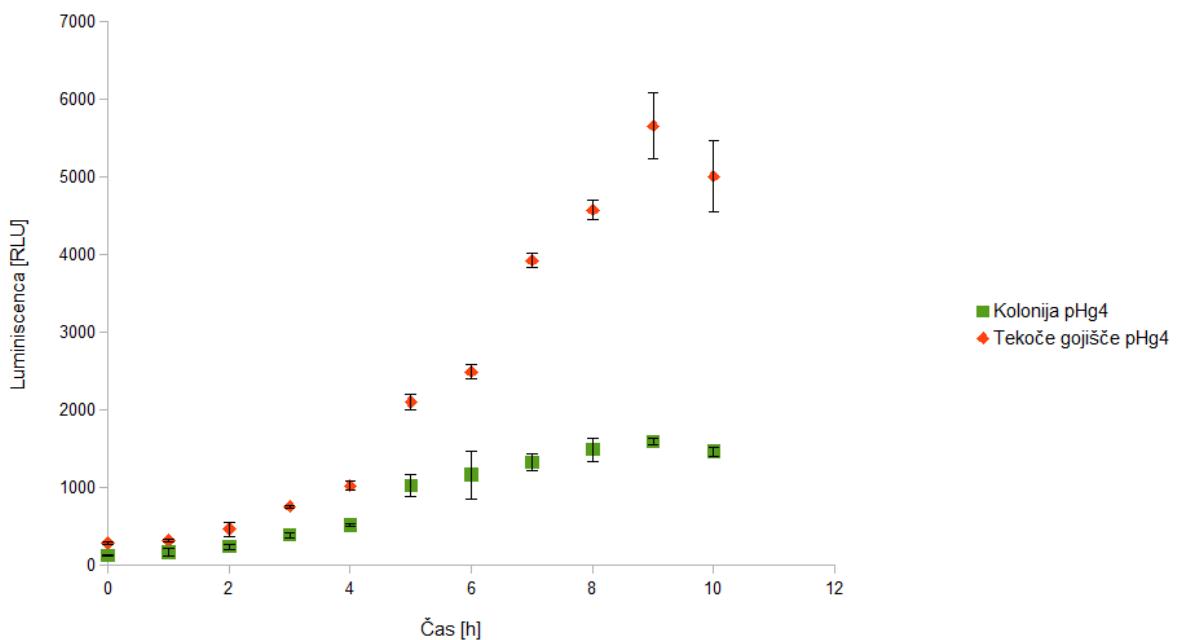
15) z vsako uro gojenja narašča in doseže svojo najvišjo vrednost pri 8 urah, nato začne upadati. Pri sevu pDNlux (Slika 15), doseže luminiscenca svoj maksimum pri 10 urah, šele nato začne svetilnost upadati.

5.2 VPLIV NAČINA PRIPRAVE INOKULUMA NA AKTIVNOST BAKTERIJ *Pseudomonas putida* pHg4

Spremljali smo dva različna načina, kako lahko pripravimo celice za gojenje v kontroliranih pogojih. Namen poskusa je bil ugotoviti, kateri način inokulacije celic za prekonočno gojenje je bolj primeren za naše meritve. Če primerjamo vcepek iz kolonije in tekočega gojišča (Slika 16), ugotovimo, da so vrednosti absorbance pri inokulaciji kolonije večje kot vrednosti absorbance pri inokulaciji iz tekočega gojišča. Iz tega lahko sklepamo, da namnožimo večje število celic iz vcepka kolonije kot iz vcepka tekočega gojišča. Poleg absorbance smo spremljali tudi luminiscenco (Slika 17), kjer smo izmerili večje vrednosti luminiscence pri vcepku iz tekočega gojišča kot pri vcepku iz kolonije (Slika 17). Luminiscenca se konstantno povečuje do 9. ure gojenja celic (Slika 17), nato začne intenziteta upadati. Na podlagi rezultatov smo za nadaljnje delo odločili, da bomo pripravljali svežo kulturo, ki jo bomo precepili iz trdnega na tekoče gojišče in naslednji dan s celicami opravljalci meritve, saj so celice seva pHg4 s takim načinom priprave bolje luminiscirale.



Slika 16: Absorbanca bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 v odvisnosti od časa. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardnim odklonom (n=3).



Slika 17: Luminiscenca bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 v odvisnosti od časa. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardnim odklonom ($n=3$).

5.3 FENOTIPSKI ŠUM

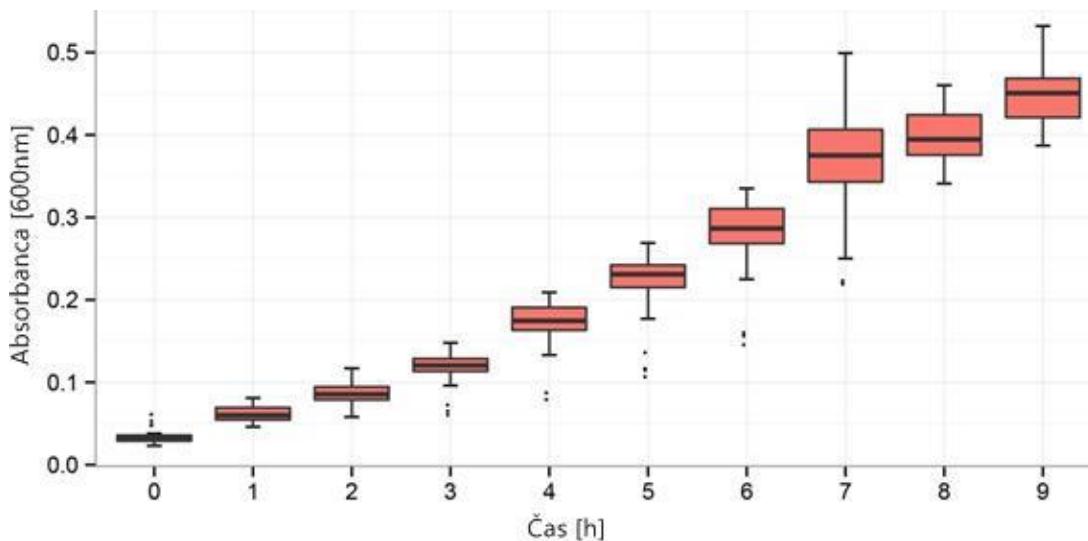
10 različnih kolonij smo prenesli v obogateno tekoče gojišče HMM za spremljanje absorbance in luminiscence na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Namen je bil primerjati 10 kolonij in s tem ugotoviti, kakšen je fenotipski šum oziroma, kakšni so odzivi celic, če uporabimo za meritve luminiscence in absorbance 10 paralelki ločenih kolonij. Kolonije so si med seboj lahko različne, nas pa je zanimalo, kakšna je primerljivost med meritvami luminiscence ter absorbance, če celice gojimo 9 ur, pri enakih pogojih.

Pomembno je omeniti, da celice nismo izpostavljali živemu srebru, saj smo žeeli sprva ugotoviti le ponovljivost rezultatov glede na rast celic, po času 9 ur, torej primerljivost absorbance in luminiscence.

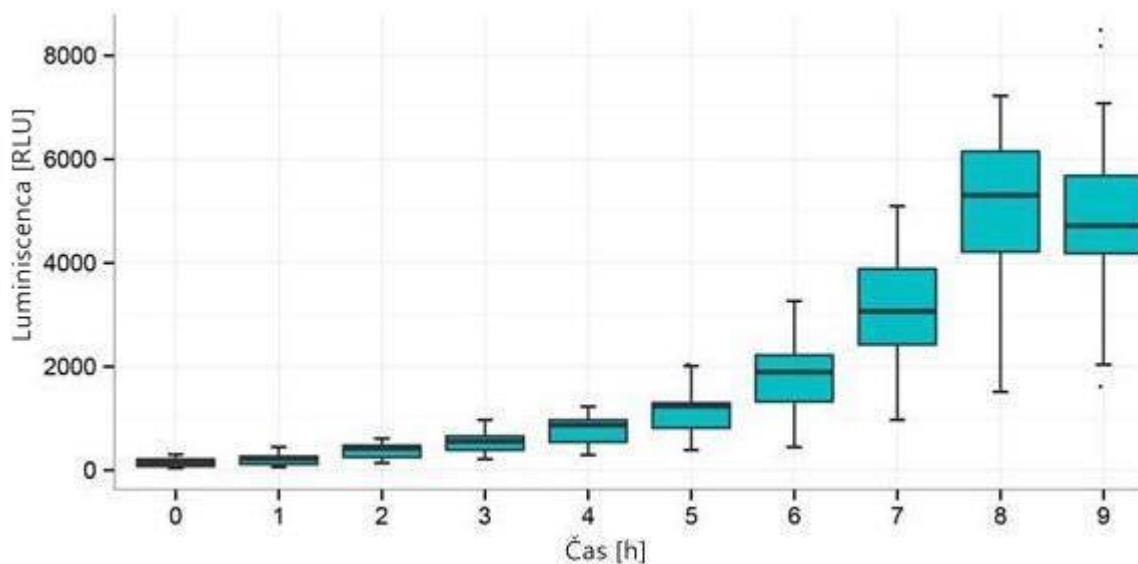
Za način prikaza absorbance (Slika 18) in luminiscence (Slika 19) smo izbrali okvir z ročaji. Mediana v obeh primerih z naraščajočim časom narašča in običajno presega vrednost iz prejšnje meritve, razen pri luminiscenci ob času 9 ur (Slika 18, Slika 19). Razpršenost meritev po vsaki uri merjenja absorbance je do 3. ure še relativno majhna (Slika 18), če ne upoštevamo nekaj osamelcev, ki so prisotni vse tja do 7. ure. Največji variacijski razmik pri meritvah absorbance je prisoten pri 7. uri meritve (Slika 18), pri luminiscenci pa pri 8. uri (Slika 19).

Sorazmerno s povečevanjem celične populacije se povečuje tudi luminiscenca (Slika 19). Iz grafikona (Slika 19) opazimo, da celice oddajajo luminiscenco tudi, če ni indukcije z živim srebrom in se s številom celic ter časom le-ta povečuje. V prvi uri so celice še v lag

fazi prilagajanja na novo okolje in je raven svetilnosti še zelo majhna. Z naraščajočim časom pa je razpršenost vedno bolj prisotna (Slika 19).



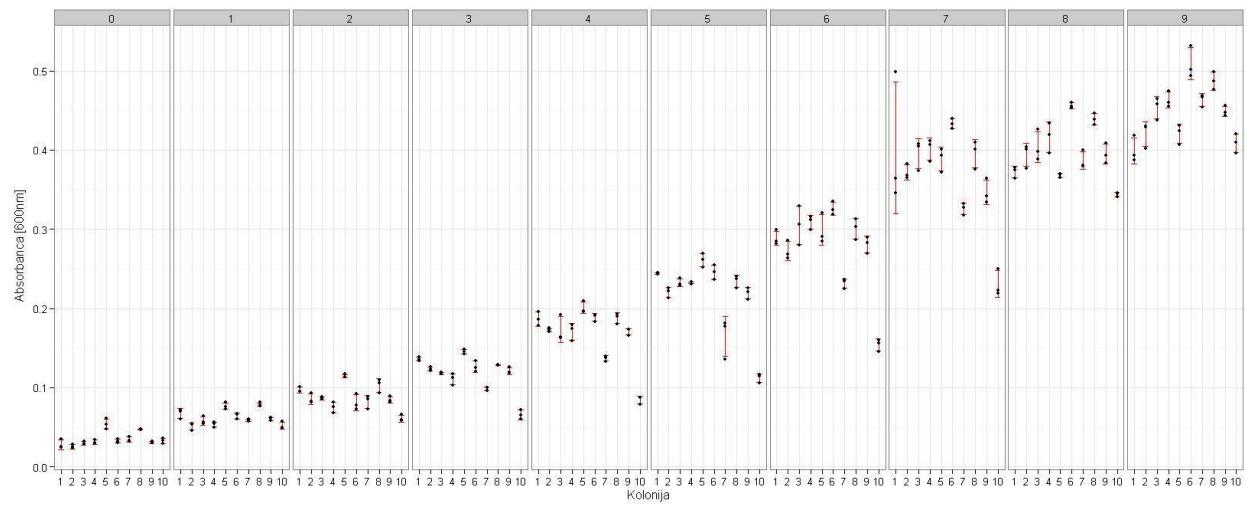
Slika 18: Absorbanca bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 v odvisnosti od časa, na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Srednja črta okvirja predstavlja mediano. Polovica vseh izmerjenih vrednosti je nad to vrednostjo, polovica pa jih je pod njo (n=30).



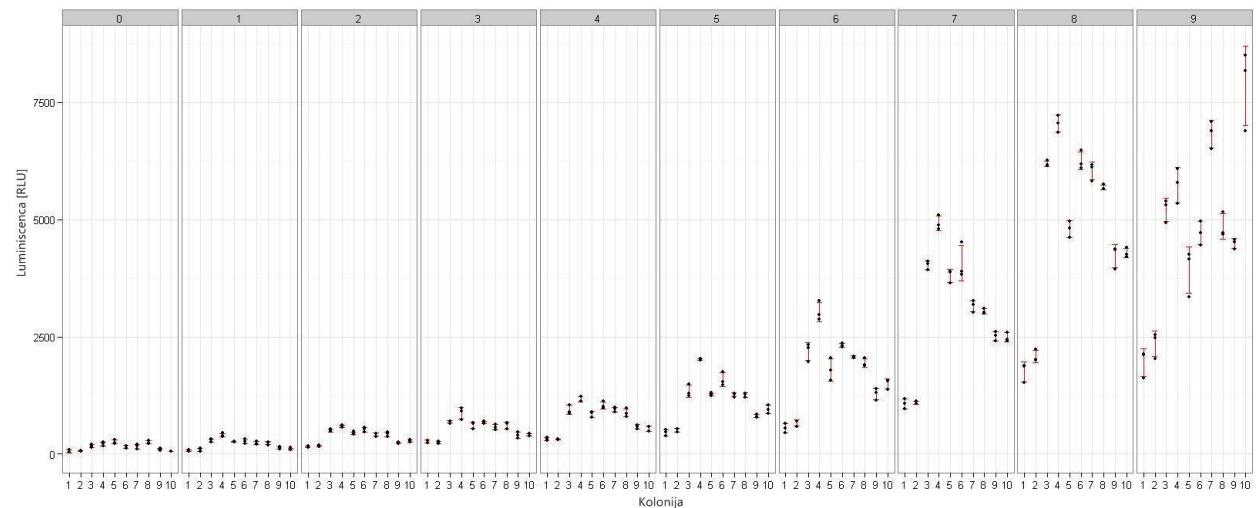
Slika 19: Luminiscenca bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 v odvisnosti od časa na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Srednja črta okvirja predstavlja mediano. Polovica vseh izmerjenih vrednosti je nad to vrednostjo, polovica pa jih je pod njo (n=30).

Poleg fenotipskega šuma je bila narejena tudi analiza napake individualne meritve absorbance in luminiscence. Prikazali smo, kakšne so razlike v individualnih meritvah 10

različnih kolonij v 9 urah merjenja (Slika 20, Slika 21). Ob vsakem času smo izmerili 10 kolonij v treh ponovitvah. Rdeča navpična črta označuje razpon (povprečje \pm standardni odklon). Iz grafikonov (Slika 20, Slika 21) vidimo, da postajajo meritve s časom bolj razpršene. Razlika v individualnih meritvah se s časom veča. Napaka postaja večja pri merjenju absorbance (Slika 20) od 4. ure naprej, pri luminiscenci (Slika 21) pa od 5. ure naprej.



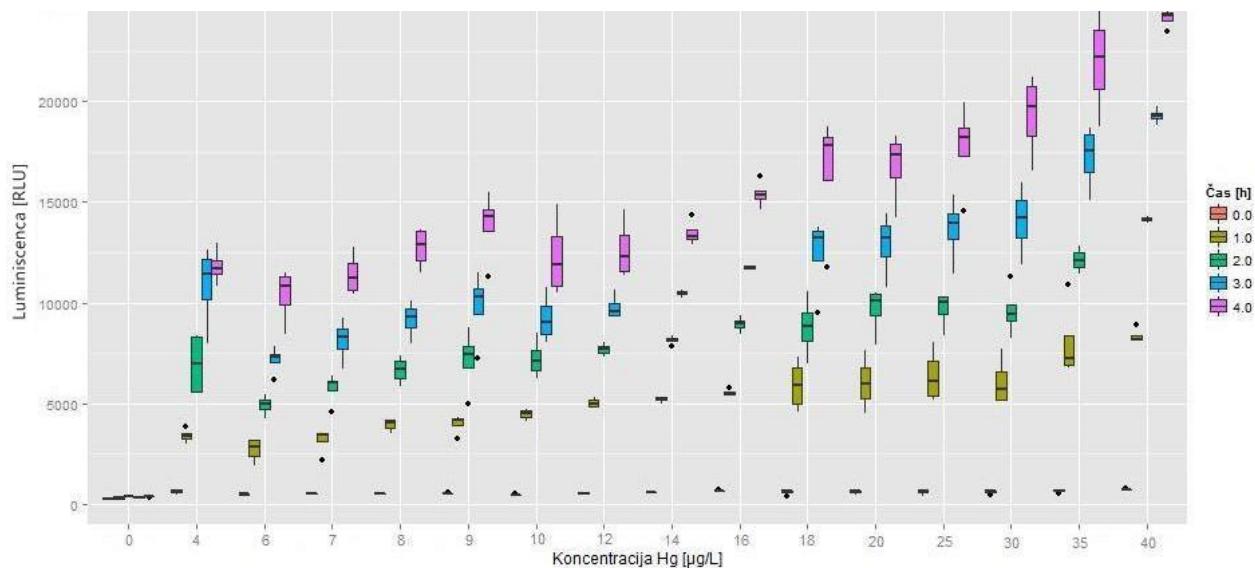
Slika 20: Napaka individualne meritve pri merjenju absorbance bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek) ($n=3$).



Slika 21: Napaka individualne meritve pri merjenju luminiscence bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek) ($n=3$).

5.4 UMERITVENA KRIVULJA ZA MERJENJE KONCENTRACIJ Hg NA NAPRAVI SYNERGY H4 HYBRID READER

Meritve (Slika 22) pokažejo naraščajoče vrednosti luminiscence v odvisnosti od naraščajočih koncentracij Hg. Najvišjo luminiscenco dosežemo celice pri koncentraciji Hg $40 \mu\text{g/L}$. Celice smo gojili 1, 2, 3 in 4 ure. Preverjali smo, koliko časa je celice potrebno gojiti, da dobimo linearno umeritveno krivljo (Slika 22). Umeritveno krivuljo smo pripravili, da lahko na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek) merimo koncentracije biološko dostopnega Hg, če je v vzorcu vode koncentracija Hg med $4 \mu\text{g/L}$ in $40 \mu\text{g/L}$. Iz grafikona (Slika 22) je razvidno, da je bila svetilnost bakterij pri kontroli, za katero smo uporabili destilirano vodo, pri vseh štirih merjenih časih zelo majhna in konstantna. Iz tega lahko sklepamo, da celice oddajajo luminiscenco, a je ta zelo majhna. S časom se sicer povečuje, a so v vseh štirih časovnih obdobjih vrednosti zelo podobne. Interkvartilni razmik je najmanjši pri koncentracijah 14, 16 in $40 \mu\text{g/L}$. Mediana pa najbolj variira pri času merjenja 3 in 4 ur, meritve pri 1 uri in 2 urah variirajo manj (Slika 22). Interkvartilni razmik je največji pri 4 urah, najmanjši pa pri 2 urah. Ekstremnih osamelcev ni prisotnih, je pa nekaj osamelcev, ki so najbolj očitni pri meritvah, opravljenih po 4 urah (Slika 22).



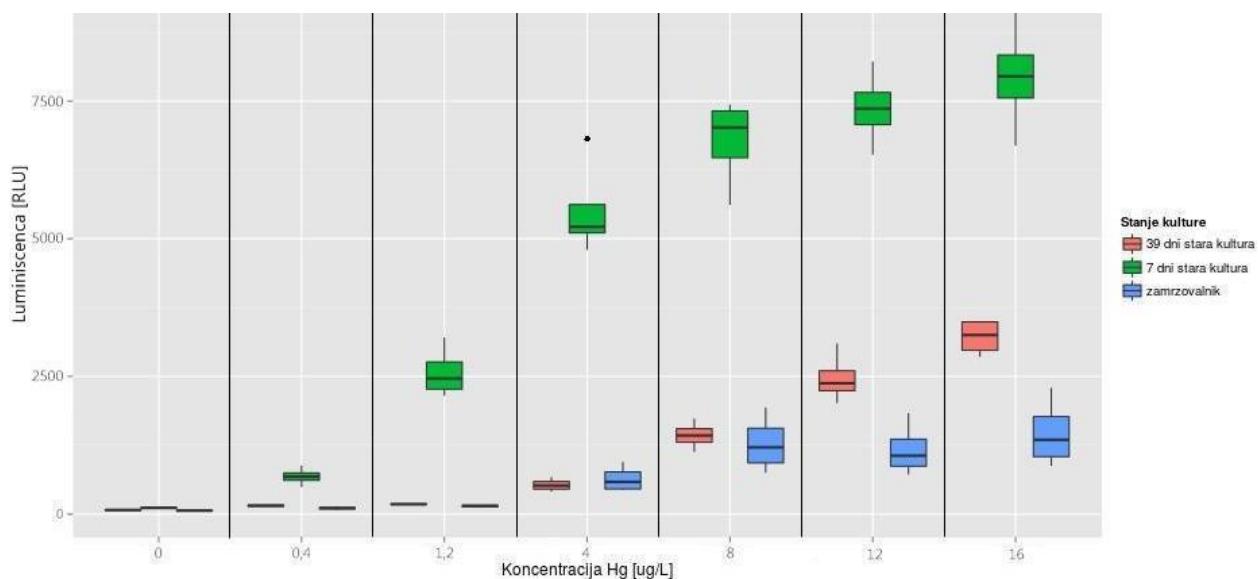
Slika 22: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracij Hg na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Legenda označuje čas, kakšne umeritvene krivulje smo dobili ob časih merjenja 1, 2, 3 in 4 ur. Srednja črta okvirja predstavlja mediano. Polovica vseh izmerjenih vrednosti je nad to vrednostjo, polovica pa jih je pod njo ($n=4$).

5.5 PRIMERJAVA ODZIVNOSTI CELIC *Pseudomonas putida* pHg4 PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH Hg GLEDE NA STAROST IN SHRANJEVANJE CELIC PRI NIZKI TEMPERATURI

5.5.1 Primerjava odzivnosti celic v odvisnosti od starosti celic

Pogoji, pri katerih gojimo celice, so zelo pomemben dejavnik za ponovljivost in standardizacijo poskusa. Pri meritvah lahko prihaja do velikih razlik, če celice ne shranjujemo pri enakih pogojih (Slika 23). Želeli smo ugotoviti, kako različni načini shranjevanja celic vplivajo na luminiscenco, ki jo oddajajo bakterije. Luminiscenca bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 je odvisna od koncentracije Hg v vzorcu vode. Višja kot je koncentracija Hg v vzorcu, bolj bodo celice luminiscirale. V ta namen smo pripravili različne koncentracije Hg.

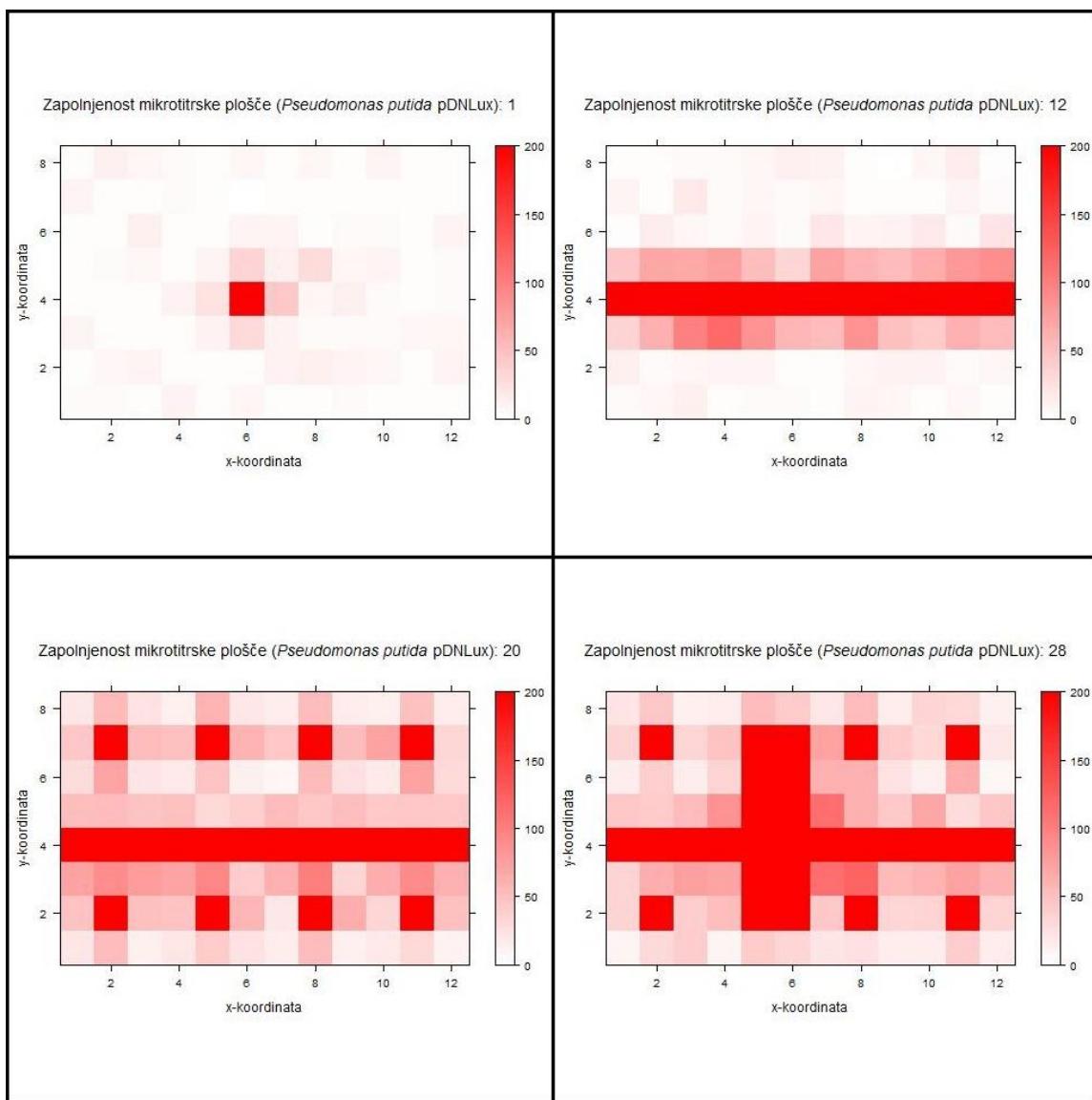
Najslabše so luminiscirale celice, ki so bile hranjene v zamrzovalniku pri temperaturi -80°C (Slika 23). Sledile so celice, ki so bile stare 39 dni in hranjene pri 4°C , najbolje pa so luminiscirale celice, stare 7 dni, hranjene pri temperaturi 4°C (Slika 23). Rezultati kažejo, da so celice, ki so shranjene pri -80°C , povsem neprimerne za opravljanje meritev, prav tako pa to velja tudi za 39 dni stare celice, saj je vrednost luminisce prenizka za ugotavljanje prisotnosti živega srebra v vzorcu vode. Mediana se pri celicah, starih 7 dni, povečuje z naraščajočo koncentracijo Hg in doseže najvišjo vrednost pri koncentraciji 16 $\mu\text{g/L}$ (Slika 23). Podobno lahko trdimo tudi za celice, stare 39 dni, vendar so vrednosti luminisce precej nižje. Prisoten je le en osamelec, pri 7 dni stari kulturi in koncentraciji 4 $\mu\text{g/L}$ (Slika 23).



Slika 23: Primerjava luminisce celic *Pseudomonas putida* pHg4 pri različnih koncentracijah Hg glede na starost in shranjevanje celic ter pri temperaturi -80°C , v zamrzovalniku. Srednja črta okvirja predstavlja mediano. Polovica vseh izmerjenih vrednosti je nad to vrednostjo, polovica pa jih je pod njo. Meritev smo opravili po času gojenja 2 ur ($n=4$).

5.6 VPLIV POZITIVNEGA LUMINISCENČNEGA SIGNALA Z ZELO VISOKO LUMINISCENCO NA SOSEDNJE VZORCE NA MIKROTITRSKI PLOŠČI

Test smo izvedli tako, da smo postopoma polnili prazne luknjice na mikrotitrski plošči z bakterijami *Pseudomonas putida* pDNlux, ki brez indukcije s Hg zelo močno luminiscirajo. Sprva smo napolnili le eno luknjico in izmerili luminiscenco na celotni mikrotitrski plošči, nato smo napolnili še 12, 20 in 28 luknjic ter pred vsakim novim polnjenjem izmerili luminiscenco. Praznim luknjicam na mikrotitrski plošči smo prav tako vzporedno izmerili vrednost luminiscence, da bi s tem ugotovili, ali močna luminiscenca vpliva na sosednjo, v tem primeru prazno luknjico. Iz rezultatov (Slika 24) lahko vidimo, da ima visoka vrednost luminiscence (obarvano močno rdeče, na skali označeno s številko 200) minimalen vpliv na meritve, ki smo jih izmerili v praznih luknjicah. Vpliv pozitivnega luminisenčnega signala se je povečeval, ko smo mikrotitrsko ploščo postopoma polnili s celicami *Pseudomonas putida* pDNlux. Pri interpretaciji rezultatov moramo upoštevati, da merimo pozitiven luminisenčni odziv pri zelo visoki luminiscenci bakterij *Pseudomonas putida* pDNlux. Pri naši analizi bo luminiscanca velika nižja kot pri poskusu vpliva pozitivnega luminisenčnega signala, zato vpliv ne bo takoj visok, da bi lahko dobili lažno previsoke rezultate.

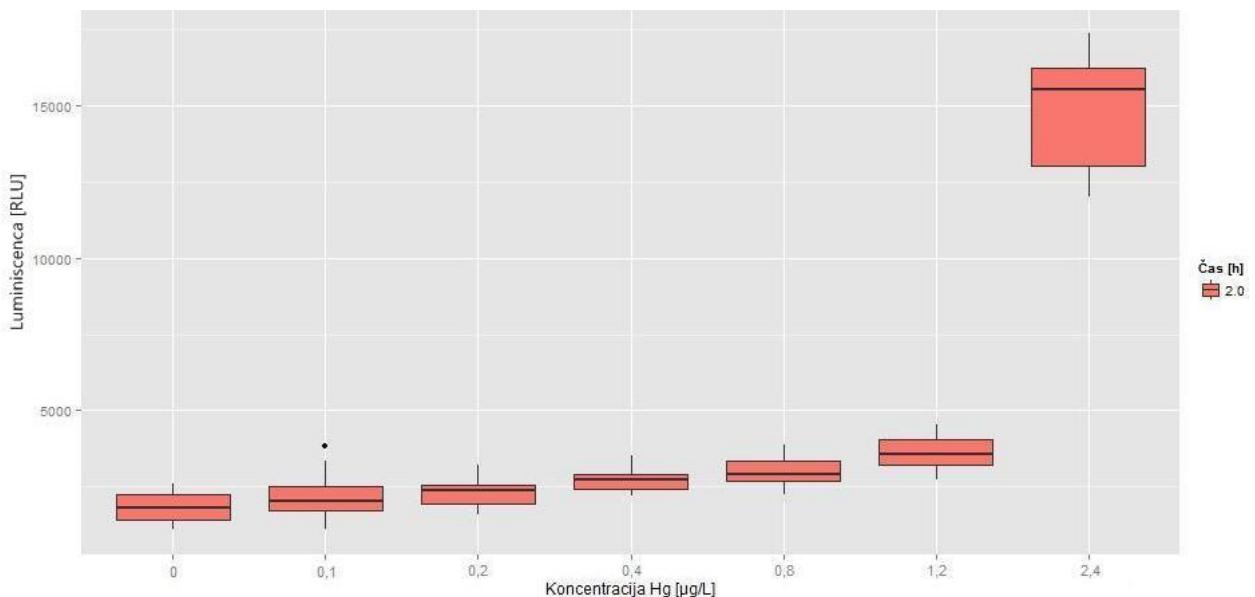


Slika 24: Test sisanja luminiscence zunaj območja meritve, izveden na mikrotitrski plošči, namenjeni za merjenje luminiscence. Luknjice, ki so označene z močno rdečo barvo in imajo na barvni skali enoto 200, predstavljajo luknjice, v katerih je bil vzorec, ki je oddaljal luminiscenco. Legenda prikazuje intenziteto luminiscence od rdeče barve, kjer je luminiscanca največja, proti beli.

5.7 UMERITVENA KRIVULJA ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJ Hg Z MERJENJEM LUMINISCENCE NA NAPRAVI ACB

Naše raziskovalno delo smo zaključili s pripravo umeritvene krivulje na napravi ACB. Standardizirali smo postopek, s katerim lahko na terenu izmerimo vsebnost živega srebra v vzorcu vode, v kateri pričakujemo, da bo koncentracija biološko dostopnega živega srebra v razponu od $0,1 \mu\text{g/L}$ do $2,4 \mu\text{g/L}$. Iz grafikona (Slika 25), ki prikazuje koncentracije živega srebra v odvisnosti od luminiscence pri času 2 ur vidimo, da se luminiscanca povečuje s povečevanjem koncentracije Hg do $1,2 \mu\text{g/L}$. Ob koncentraciji $2,4 \mu\text{g/L}$ pa

doseže svoj maksimum. Mediana vrednost luminiscence se z višanjem koncentracije živega srebra v vzorcu vode povečuje. Največja razlika se pojavi med koncentracijo 1,2 $\mu\text{g/L}$ in 2,4 $\mu\text{g/L}$. Največji interkvartilni in variacijski razmik pa opazimo pri 2,4 $\mu\text{g/L}$ (Slika 25).



Slika 25: Umeritvena krivulja z merjenjem luminiscence na napravi ACB za merjenje koncentracije Hg (n=16).

6 RAZPRAVA

Področje analitike in raziskovanja, ki temelji na biosenzorjih, se je začelo pojavljati sredi leta 1970 in je naredilo do sedaj v znanosti velik korak naprej. Biosenzorji se najpogosteje uporabljajo na področju živilstva, diagnostike, okolja in medicine. Največ prihodka prinese področje biosenzorjev za medicinsko uporabo.

Magistrska naloga je sestavljena iz dveh delov. Sprva smo optimizirali gojenje celic na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Merili smo absorbanco (600 nm) in luminiscenco bakterij *Pseudomonas putida* pDNlux in *Pseudomonas putida* pHg4 v odvisnosti od časa inkubacije na mikrotitrskih ploščah ter različnih koncentracij Hg. V drugem delu naloge pa smo optimizirali gojenje celic z merjenjem luminiscece pri različnih koncentracijah Hg na avtomatiziranem celičnem biosenzorju (ACB).

6.1 OPTIMIZACIJA GOJENJA CELIC NA NAPRAVI SYNERGY H4 HYBRID READER (BIOTEK)

Raziskavo smo opravljali z gensko spremenjeno bakterijo *Pseudomonas putida*, ki je bila gensko modificirana v projektu Hydronet (Dario, 2008). Mikroorganizem predstavlja odličen modelni organizem, saj ni patogen, kot na primer *Pseudomonas aeruginosa*, in je odporen na živo srebro.

Inokulum za namnoževanje *Pseudomonas putida* smo sprva pripravili v trdnem gojišču LB (Sigma), tekoče gojišče HMM pa smo uporabili za gojenje celic, s katerimi smo merili vsebnost živega srebra v pripravljenih poskusnih raztopinah. Gojišče HMM je bilo izbrano zato, ker gre za minimalno gojišče z malo hranili, kar pomeni, da celice začnejo hitreje metabolizirati Hg kot pa v bogatih gojiščih. V primeru, če bi imele celice dovolj hranil, jim živega srebra ne bi bilo potrebno metabolizirati. Biogene pretvorbe Hg pa so glavni dejavnik, zaradi katerega celice začnejo oddajati različno intenzitetu luminiscece, odvisno od koncentracije Hg v vzorcu.

Spremljanje luminiscece seva *Pseudomonas putida* pHg4 (Slika 14) in *Pseudomonas putida* pDNlux (Slika 15) nam je dalo informacijo, koliko časa je potrebno, da celice dosežejo svojo najvišjo raven svetilnosti brez indukcije živega srebra. *Pseudomonas putida* pDNlux je v nalogi služil le kot kontrolni organizem. Vloga kontrolnega organizma je bila, da celice stalno svetijo z zelo visoko intenzitetu luminiscece (Ivask in sod., 2009). Najvišja vrednost luminiscece pri sevu pHg4 (Slika 14) je kar štirikrat nižja brez indukcije s Hg od najvišje vrednosti pri sevu pDNlux (Slika 15). Rezultati meritev absorbance (Slika 13) in luminiscece (Slika 14, Slika 15) so nam pokazali odvisnost med absorbanco, torej, med relativnim številom celic in oddajanjem luminiscece. Ugotovili smo, da se luminiscenca povečuje sorazmerno z absorbanco v odvisnosti od časa, vendar se pojavljajo pričakovane razlike v doseganjih najvišjih vrednosti pri sevu pHg4 (Slika 14).

in pDNlux (Slika 15). Sevu pHg4 začne luminiscanca upadati po 8 urah, kljub temu, da se Absorbanca s časom še vedno povečuje. Sevu pDNlux pa začne luminiscanca padati po 10 urah. Iz tega lahko sklepamo, da sev pHg4 doseže v krajšem času svojo najvišjo intenziteto luminiscence, sev pDNlux pa do najvišje vrednosti luminiscence potrebuje 2 uri več. Zelo pomemben dejavnik pri bakterijah, da oddajajo luminiscenco, je kisik, zato je bilo stresanje suspenzije z bakterijami tudi močno. Krivulje absorbance (Slika 13) in luminiscence (Slika 14, Slika 15) so primerljiva z raziskavo, kjer so preučevali *Vibrio fischeri* in *Vibrio harveyi* (Kricka in Stanley, 2002). Za emisijo luminiscence in vzdrževanje luminiscence skozi daljše časovno obdobje je bila potrebna visoka ekspresija *luxCDABE* genov in sinteza substratov bakterijske luciferaze. Prav tako je bila luminiscanca odvisna od gostote celic in od gojitvenega okolja. V raziskavi so dali velik pomen zaznavanju celične gostote (ang. quorum sensing, QS). Celice komunicirajo med seboj prek signalnih molekul, ki sprožijo v drugi celici odziv na ravni transkripcije. Bolj kot so celice v bližini drugih celic, več signalnih molekul jih bo doseglo. V gosti kulturi lahko celice spremenijo svoj fenotip, zato je informacija o gostoti zelo pomembna. Obstaja več skupin signalnih molekul, v vsaki skupini pa so lahko razlike, na primer v dolžini stranskih verig. Z drugimi besedami lahko signalno molekulo poimenujemo tudi avtoinduktor. Ko celice dosežejo določeno gostoto ($>10^{10}/\text{mL}$), se izražanje luciferaze ustavi (Kricka in Stanley, 2002).

Način priprave bakterij za prekonočno gojenje celic je bil za razvoj biosenzorja pomemben zato, da smo s tem pridobili podatke, pri kakšnih pogojih bodo celice oddajale večjo luminiscenco. Prekonočno gojenje je tako pri načinu priprave inokuluma iz kolonije celic *Pseudomonas putida* pHg4 kot tudi pri načinu priprave inokuluma iz tekočega gojišča celic *Pseudomonas putida* pDNlux potekalo na enak način. Razlika je bila le v tem, da smo vzeli inokulum iz dveh različnih virov shranjevanja. Iz grafikona (Slika 16) lahko vidimo, da razlika v absorbanci ni prevelika, opazimo lahko tudi razliko med luminiscenco (Slika 17) med načinom priprave inokuluma *Pseudomonas putida* pHg4 iz kolonije ali iz tekočega gojišča. Inokulum iz tekočega gojišča je imel najvišjo vrednost luminiscence (Slika 17) za približno 3,5-krat višjo, kljub zelo podobni absorbanci (Slika 16). Iz tega lahko sklepamo, da celice ostanejo v veliko boljšem fiziološkem stanju, če jih kot vcepek vzamemo iz tekoče kulture, kot v primeru, če bi vcepek za prekonočno gojenje vzeli iz trdnega gojišča. V literaturi se po večini primerov poslužujejo priprave iz kolonije v tekoče gojišče, nikjer pa nisem zasledil, da bi nekdo primerjal luminiscenco bakterij na način, kot smo ga v nalogi opisali mi. Večina opisov temelji na skrajšanju lag faze s povečanjem volumna vcepka (Rolfe in sod., 2012).

Veliko pozornosti smo namenili fenotipskemu šumu, saj nas je zanimalo, kakšna je ponovljivost meritev luminiscence, če vcepke pripravimo iz 10 različnih kolonij. Meritve so pokazale, da so vrednosti absorbance (Slika 18) in prav tako luminiscence (Slika 19) v prvih urah meritev precej podobne. Razpršenost rezultatov se začne večati po 2 urah meritve (Slika 19). Poleg ugotavljanja variabilnosti rezultatov, če inokulum pripravimo iz 10 različnih kolonij, smo izvedli tudi primerjavo med individualnimi meritvami (Slika 20,

Slika 21). Individualne meritve prav tako variirajo s časom. Pri grafikonu, ki prikazuje luminiscenco (Slika 21), so do druge ure meritve izredno ponovljive. Razlike se začnejo večati pri podaljšanem času merjenja (Slika 21). Opazili smo, da je rezultat individualne meritve v veliki meri odvisen od jakosti luminiscence. Pri višjih vrednostih luminiscence se individualna napaka veča. Celice seva *Pseudomonas putida* pHg4 smo prav tako izpostavili različnim pogojem, da bi preverili, kako različni dejavniki vplivajo na luminiscenco celic in ali se luminiscanca pomembno spremeni. Za opravljanje meritve bi bilo namreč najbolj ugodno, da bi celice pripravili v večjih količinah in jih nato zamrznili pri takih pogojih, da celic ne bi poškodovali. V raziskavi smo to storili tako, da smo kot krioprotектant uporabili 10 % glicerol. Za krioprotектant bi lahko izbrali tudi DMSO, vendar je toksičen (Simione, 2009). Prednost DMSO je, da prodre globlje v celico, zato lahko zamrznitev in odmrznitev poteka počasneje kot pri glicerolu, celica pa je tudi manj poškodovana (Simione, 2009). Uporablja se pri večjih in kompleksnejših celicah. DMSO in glicerol se po navadi dodajata kot krioprotектanta v koncentraciji 5–10 % (Simione, 2009). Poleg zamrzovanja celic pri temperaturi – 80° C smo izvedli tudi test z različno starimi celicami. Najbolje so se obnesle celice, ki so bile najmlajše, torej 7 dni stare celice (Slika 23). 39 dni stare celice pa so imele podobno nizko luminiscenco kot tiste, hranjene v zamrzovalniku. Iz tega lahko sklepamo, da je najbolje pripraviti čim bolj sveže kulture, saj so odzivi celic veliko boljši kot pri starejših oziroma celicah, hranjenih v zamrzovalniku. V literaturi (Xue-ling, 2008) se lahko zasledi krioprezervacija z metodo tekočega dušika. V raziskavi so metodo krioprezervacije v tekočem dušiku, pri –196° C preizkusili na bakterijah *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* in *Acidianus brierleyi* s 30 % glicerolom. Raziskava je pokazala odlične rezultate, saj je viabilnost celic po krioprezervaciji ostala skoraj nespremenjena. Kot alternativo našemu načinu krioprezervacije bi bilo v prihodnosti smiselno preizkusiti način shranjevanja s tekočim dušikom in raziskati, kako drugačen način shranjevanja celic vpliva na luminiscenco bakterij *Pseudomonas putida*.

Vpliv močnega pozitivnega signala luminiscence na okoliške vzorce na mikrotitrski plošči je lahko dejavnik, zaradi katerega dobimo lažno višje rezultate (interferenca). Na mikrotitrskih ploščah za merjenje luminiscence smo zato opravili test, kjer smo merili vpliv močnega luminiscentnega signala na meritve v okoliških vzorcih: močan luminiscentni signal so oddajale luknjice mikrotitrsko plošče, napolnjene s celicami *Pseudomonas putida* pDNlux. Vpliv tega signala pa smo merili v praznih luknjicah v okolini. Sev pDNlux smo izbrali, ker smo ga uporabili pri naši nalogi za kontrolni organizem, pri katerem vemo, da brez indukcije z živim srebrom oddaja visoko luminiscenco. Svetilnost *Pseudomonas putida* pDNlux je imela majhen vpliv na okolico (Slika 24), vendar moramo upoštevati pomemben dejavnik, da so bile vrednosti luminiscence zelo visoke. Najvišja vrednost luminiscence, ki je bila v neposredni bližini meritve, je bila 0,07 % (Slika 24). Pri naših meritvah so luminiscence seva *Pseudomonas putida* pHg4 nižje, zato pričakujemo, da pozitivni luminiscenčni signal ne bo imel

pomembnejšega vpliva na meritve v sosednjih luknjicah mikrotitrsko plošče. Poleg tega meritve na ACB potekajo v strogi temi. Naprava je prilagojena zahtevam tako, da je dobro izolirana od zunanjosti, torej, da do območja meritve ne pride nikakršna svetloba. Prav tako se mesta, kjer poteka meritev, tesno prilegajo fotopomnoževalki, da fotopomnoževalka resnično opravi meritev le na tistem mestu, ki ga mora, brez vpliva dodatne luminiscence. Problem interference, če bi ta bila zelo visoka, bi se lahko odpravilo tako, da bi odšteli signal šum (Atta in sod., 2011).

Raziskavo na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek) smo zaključili s pripravo umeritvene krivulje za merjenje koncentracij Hg, kjer smo celice *Pseudomonas putida* pHg4 izpostavili različnim koncentracijam biološko dostopnega živega srebra in merili luminiscenco na vsako uro. Merjenje je trajalo 4 ure. Meritve so pokazale, da je razpršenost rezultatov meritev najmanjša po 2 urah, največja pa po 4 urah (Slika 22). Standardna krivulja (Slika 22) lahko služi za merjenje onesnaženja s Hg v vzorcu vode. Raziskava je narejena za merjenje Hg le, če je koncentracija Hg v vzorcu med 4 µg/L in 40 µg/L. Če bi bile koncentracije Hg večje od 40 µg/L, bi bile vrednosti višje od prikazanih na grafikonu (Slika 22) oziroma nižje, če bi bile vrednosti pod 4 µg/L. Raziskave gredo zadnja leta tudi na druga področja detekcije težkih kovin. Metoda, ki se razvija in kaže dobre rezultate, je t.i. »lab on a chip« (Su in sod., 2010). Mikroorganizmi naj bi bili imobilizirani na kemijski način (kovalentna vezava) ali fizikalni način (adsorpcija ali t.i. ujetost mikroorganizmov). Metoda je obetajoča, vendar se pojavlja velik problem z imobilizacijskimi metodami. Kovalentna vezava namreč negativno vpliva na viabilnost in funkcijo celic, problem fizikalne imobilizacije pa je slaba stabilnost (Su in sod., 2010).

6.2 OPTIMIZACIJA GOJENJA CELIC IN AVTOMATIZIRANEGA CELIČNEGA BIOSENZORJA (ACB)

Na podlagi vseh raziskav, ki smo jih naredili s celicami na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek), smo informacije uporabili za pripravo celic za meritve koncentracije Hg na napravi ACB. Sistem gojenja celic je bil drugačen. Na laboratorijskem nivoju smo celice gojili na stresalniku, kjer smo z zelo močnim stresanjem zagotavljalci dovolj kisika. Na ACB pa gojitev poteka s prepihovanjem s kisikom. ACB (Dario, 2008) je naprava, ki mora delovati na terenu, zato je v eni napravi združenih veliko funkcij, ki smo jih na laboratorijskem nivoju imeli v ločenih sklopih. Velik problem je predstavljalo prepihovanje komorice, kjer je potekala gojitev celic. Največja težava je bilo penjenje. Težavo smo odpravili s prepihovanjem v intervalih in se tako izognili nastajanju mehurčkov. Za reševanje težav s penjenjem bi lahko uporabili tudi protipenilce, vendar obstaja vprašanje, kako bi mikroorganizmi reagirali na protipenilec (Routledge, 2012). Lahko bi tudi spremenili obliko kivet, vendar je to stvar, ki lahko ostane na voljo nadaljnji raziskavi. Naslednje veliko vprašanje je bilo čiščenje kivet po opravljeni meritvi. Mikroorganizmi lahko tvorijo biofilme, zato je bilo potrebno poiskati način, kako najbolj učinkovito očistimo komorice, kjer je potekalo gojenje celic, ne da bi čiščenje kivet imelo

vpliv na naslednje meritve. Dezinfekcijo komorice smo očistili s 14 % NaClO, ki potencialno uniči večino mikroorganizmov na površini. Po čiščenju z NaClO je sledilo spiranje kivet z vodo, ki smo ga ponovili dvakrat. Po čiščenju je bila naprava zopet pripravljena na naslednje meritve.

Meritve, opravljene na ACB, ne moremo dobro primerjati z meritvami, opravljenimi na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek), saj so bile koncentracije biološko dostopnega Hg pri meritvah na napravi ACB manjše kot na Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Naprava ACB ima zelo občutljivo fotopomnoževalko, ki lahko zazna že zelo nizke vrednosti luminiscence, v primerjavi z Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Za meritve vode na terenu, ki je onesnažena z živim srebrom, je ACB optimizirana za koncentracije Hg med 0,1 µg/L in 2,4 µg/L. Za merjenje višjih koncentracij Hg bi morali napravo optimizirati pri višjih koncentracijah Hg in v kontroliranih pogojih. Najbolje bi bilo optimizacijo izvesti v digestoriju, da koncentracije Hg ne bi prihajale v stik s človekom. Razvijajo se tudi druge metode merjenja onesnaženosti vode. V raziskavah so se poleg elektrokemičnih, optičnih in kolorimetričnih biosenzorjev osredotočili tudi na senzorje, ki temeljijo na detekciji spremembe tlaka. Razvili so prenosljivo napravo, kjer se meri bakterijsko respirometrijo (Lei in sod., 2006). Respirometrija se meri s padcem pritiska, zaradi porabe kisika, ki ga bakterije potrebujejo, če so v stiku z onesnaženim vzorcem.

Biosenzorji imajo še veliko pomankljivosti, ki jih je potrebno podrobno raziskati in za njih poiskati ustrezne rešitve. Cilj raziskovalcev, ki delujejo na področju biosenzorjev, je, razviti biosenzorje, ki bi bili odporni na ekstremne pogoje, kot so na primer visoke temperature, zelo kislo, bazično ali slano okolje. S trenutno razvitimi biosenzorji v izjemno ekstremnih pogojih ne bi bili sposobni meriti onesnaženosti okolja, saj mikroorganizmi ne bi preživeli težkih razmer (Lei in sod., 2006). Pomanjkljivosti morajo biti za uspešno izvajanje analiz v težkih pogojih nujno odpravljene. S trenutnim napredkom v smeri izboljšav biosenzorjev in moderne biotehnologije je znanja dovolj, da se pomanjkljivosti, ter težave biosenzorskih sistemov odpravijo (Lei in sod., 2006).

7 SKLEPI

- Različni kloni biosenzorskih celic *Pseudomonas putida* pHg4 so proizvajali različno jakost luminiscence. To lahko razlagamo z raznovrstnostjo klonskih fenotipov, hkrati pa smo ugotovili, da na jakost luminiscence vpliva tudi koncentracija Hg.
- Pogoji kultivacije biosenzorskih celic *Pseudomonas putida* pHg4 so vplivali na jakost luminiscence.
- Jakost luminiscence biosenzorskih celic *Pseudomonas putida* pHg4, glede na različne koncentracije Hg so se spremenile pri prenosu iz odročne meritve na avtomatizirano meritev. Pri prenosu odročne meritve (Synergy H4 Hybrid reader (BioTek)) na avtomatizirano meritev (ACB) je bil način gojenja celic spremenjen. Rezultatov iz odročne meritve ne moremo primerjati z rezultati meritve na ACB zaradi visokih koncentracij Hg. Koncentracije Hg niso bile enake na meritvah, ki so potekale na ACB in na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek). Naprava ACB je bila optimizirana pri nižjih koncentracijah Hg, odročna meritev pa je bila optimizirana na višje koncentracije Hg. Zaradi možnosti izpostavitve strupenega Hg smo ACB optimizirali na nižje koncentracije Hg.
- Merjenje z avtomatizirano biosenzorsko napravo poteka hitreje in enostavnejše od običajnega laboratorijskega postopka ter omogoča terenske meritve.

8 POVZETEK

Za živo srebro je več desetletij znano, da je velik okoljevarstveni problem. Hg se lahko bioakumulira v živih bitjih. V Sloveniji poznamo nekaj področij, ki so znana po povišanih koncentracijah Hg, to so Tržaški zaliv, porečje Soče in Idrije. Napravo ACB, ki smo jo optimizirali za biosenzorsko merjenje koncentracij Hg, bi prav zato lahko zelo koristno uporabili na terenu, kjer bi lahko že na mestu vzorčenja izmerili vsebnost Hg. Meritve Hg na terenu so metodološko zahtevne, zato se večina meritev opravlja v laboratoriju. Velika prednost ACB je merjenje Hg takoj po odvzetju vzorca, saj se s časom biološko dostopna frakcija manjša in meritve lahko pokažejo napačne koncentracije, ki odstopajo od realnih koncentracij Hg v okolju. Gojenje celic smo sprva optimizirali na napravi Synergy H4 Hybrid reader (BioTek) in nato še na napravi ACB. Na napravi Synergy smo določili pogoje detekcije ter ugotavliali, kateri način priprave biosenzorskih bakterij *Pseudomonas putida* pHg4 je najbolj primeren za opravljanje meritev. Ugotovili smo, da je za namnoževanje celic *Pseudomonas putida* pHg4 primernejša inokulacija iz tekočega gojišča od inokulacije iz trdnega gojišča. Na podlagi fenotipskega šuma smo ugotavliali, kakšna je ponovljivost meritev, če meritev opravljamo po začetni inokulaciji z različnimi kolonijami iz trdnega gojišča. Pričakovali in dokazali smo, da se rezultati meritev v tem primeru razlikujejo. Z različnimi načini priprave celic smo poskusili optimizirati postopek, s katerim bi bile celice lahko v najkrajšem času pripravljene za meritev. S poskusi smo dokazali, da celice, ki so bile shranjene v zamrzovalniku pri -80°C , in 39 dni stare celice ne delujejo dovolj dobro za opravljanje meritve, saj je bila luminiscanca (Slika 23), ki so jo mikroorganizmi proizvajali, prenizka. Vpliv pozitivnega luminiscenčnega signala z visoko luminiscenco z bakterijami *Pseudomonas putida* pDNlux na okolico je pokazal, da ima luminiscanca minimalen vpliv na meritve, ki potekajo v neposredni bližini naše meritve. Zaradi nižjih vrednosti luminiscence, ki jih pričakujemo z merjenji luminiscence z bakterijami *Pseudomonas putida* pHg4 na napravi ACB, smo vpliv pozitivnega signala izločili. Poskuse na napravi Synergy smo zaključili s pripravo umeritvene krivulje, s katero lahko ugotavljamo onesnaženost vode z živim srebrom, če je pričakovana koncentracija Hg znotraj območja od $4 \mu\text{g/L}$ do $40 \mu\text{g/L}$. Po zaključenih poskusih na napravi Synergy smo optimizirali gojenje senzorskih celic na napravi ACB. Velik problem gojenja bakterij v komorah je bilo penjenje. Zato je bila naša naloga optimizirati prepohovanje tako, da se med gojenjem celic povzroča čim manj penjenja. Za optimizacijo ACB je bilo potrebno uporabiti program MatLab, v katerem sem spisal protokol, po katerem je ACB samostojno opravljala gojenje celic in na koncu meritev ter sterilizacijo sistema. Sterilizacija je morala biti temeljita, da smo se s tem izognili problemom z biofilmi prejšnjih analiz, ki bi lahko motili naslednje meritve. ACB smo optimizirali na način, da lahko v okolju zaznamo onesnaženost z živim srebrom, če so koncentracije Hg med $0,1 \mu\text{g/L}$ in $2,4 \mu\text{g/L}$ (Slika 25). Za optimizacijo naprave za višje koncentracije Hg v vzorcu vode bi bilo potrebno ACB optimizirati v digestoriju, kar je lahko priložnost za naslednje magistrske ali doktorske naloge.

9 VIRI

- Allard B., Arsenie I. 1991. Abiotic reduction of mercury by humic substances in aquatic system - an important process for the mercury cycle. *Water Air and Soil Pollution*, 56: 457-464
- Amyot M., Gill G.A., Morel F.M. 1997. Production and loss of dissolved gaseous mercury in coastal seawater. *Environmental Science and Technology*, 31: 3606-3611
- Atta F.N., Galal A., Ali M.S., 2011. Biosensors for health, environment and biosecurity. Croatia, Intech: 540 str.
- Barkay T., Miller S.M., Summers A.O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 279: 1-30
- Barkay T., Turner R., Saouter E., Horn J. 1992. Mercury biotransformations and their potential for remediation of mercury contamination. *Biodegradation*, 3: 147-159
- Benoit J.M., Gilmour C.C., Mason R.P. 2001. The influence of sulfide on solid-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Environmental Science and Technology*, 35: 127-132
- Chaplin M.F. 2009. Molecular Biology and Biotechnology. 5. izd. Royal Society of Chemistry. Cambridge: 604 str.
- Clarkson T.W. 1997. The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 34: 369-403
- Compeau G.C., Bartha R. 1985. Sulfate-reducing bacteria: principle methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 498-502
- Dai C., Choi S. 2013. Technology and applications of microbial biosensor. *Open journal of applied biosensor*, 2: 83-93
- Dario P. 2008. Floating Sensorised Networked Robots for Water Monitoring. Research centre on sea technologies and Marine Robotics. Italy: 83 str.
- Daunert S., Barrett G., Feliciano J.S., Shetty R., Shrestha S., Smith-Spencer W. 2000. Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical review*, 100: 2705-2738
- Espinosa-Ugel M., Salido A., Ramos J.L. 2000. Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds. *Journal of bacteriology*, 182, 9: 2363-2369

- Geiselhart L., Osgood M., Holmes D.S., 1991: Construction and evaluation of a self-luminescent biosensor. Annals of the New York academy of sciences, 646: 53-60
- Hakkila K., Green T., Leskinen P., Ivask A., Marks R., Virta M. 2004. Detection of bioavailable heavy metals in EILATox-Oregon samples using whole-cell luminescent bacterial sensors in suspension or immobilized onto fibre-optic tips. Journal of applied toxicology, 24: 333-342
- Hamlett N.V., Landale E.C., Davis B.H., Summers A.O. 1992. Roles of the Tn21 merT, merP, and merC gene products in mercury resistance and mercury binding. Journal of Bacteriol, 174: 6377-6385
- <http://www.unep.org/PDF/PressReleases/GlobalMercuryAssessment2013.pdf> (12. 3. 2016)
- Ivask A., Rolova T., Kahru A. 2009. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. BMC Biotechnology, 9: 41, doi: 10.1186/1472-6750-9-41: 15 str.
- Ji I. 2011. The bioavailability of mercury in aquatic systems. Northwestern undergraduate research journal, 6: 40-43
- Kricka L.J., Stanley P.E. 2002. Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress & Current Applications. Singapore, World Scientific: 558 str.
- Lei Y., Chen W., Mulchandani A. 2006. Microbial biosensors. Analytica Chimica Acta, 568: 200-210
- Meighen E.A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. Microbiological Reviews, 55, 1: 123-142
- Moore B. 1960. A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. The Lancet, 276: 453-458
- Peix A., Ramirez-Bahena M.H., Velazquez E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infection, Genetics and Evolution 9: 1132-1147
- Rodriguez-Mozas S., Lopez de alda M.J., Barcelo D. 2006. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. Analytical and bioanalytical chemistry, 386: 1025-1041
- Rolfe M.D., Rice C.J., Laucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A.D.S., Alston M., Stringer M.F., Betts R.P., Baranyi J., Peck M.W., Hinton J.C.D. 2012. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. Journal of Bacteriology, 194: 686-701

- Routledge S.J. 2012. Beyond de-foaming: the effects of antifoams on bioprocess productivity. Computational and Structural Biotechnology Journal, 3, 4: 1-7
- Simione F.P. 2009. Thermo scientific nalgene and nunc cryopreservation guide. Thermo fisher scientific: 12 str.
- Skogerboe R.K., Wilson S.A. 1981. Reduction of ionic species by fulvic acid. Analytical Chemistry, 53: 228-232
- Smith D.H., 1967. R factors mediate resistances to mercury, nickel, and cobalt. Science, 156: 1114-1116
- 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
- Su L., Jia W., Hou C., Lei Y. 2010. Microbial biosensors: A review. Biosensors and Bioelectronics, 26: 1788-1799
- Suda I., Suda M., Hirayama K. 1993. Degradation of methyl and ethyl mercury by singlet oxygen generated from sea water exposed to sunlight or ultraviolet light. Archives of Toxicology, 67: 365-368
- Tonomura K., Kanzaki F., 1969. The reductive decomposition of organic mercurials by cell-free extracts of a mercury resistant pseudomonad. Biochim Biophys Acta, 184: 227-229
- UNEP: Global mercury assessment 2013: sources, emissions, releases, and environmental transport. Geneva, UNEP Chemical Branch: 32 str.
- Xue-ling W., Xiao-hong X., Ying J., Ren-xing L., Peng Y., Cheng-xiang F. 2008. Liquid-nitrogen cryopreservation of three kinds of autotrophic bioleaching bacteria. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 18: 1386-1391
- Zhang H., Lindberg S.E. 2001. Sunlight and iron(III)-induced photochemical production of dissolved gaseous mercury in freshwater. Environmental Science & Technology, 35: 928-935

ZAHVALA

Sprva bi se zahvalil dr. Alešu Lapanjetu za sprejem v njegovo raziskovalno skupino ter za njegovo strokovno pomoč pri načrtovanju in izvajanju poskusov na Inštitutu za mikrobiološke znanosti in tehnologije.

Zahvala gre tudi mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za nasvete, čas in strokovni pregled naloge.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Damjani Drobne za strokovni pregled magistrskega dela.

Posebna zahvala pa gre mojim staršem ter dekletu Nini za podporo in vzpodbudne besede med študijem in ob zagovoru.

PRILOGA A

Protokol v programu matlab za opravljanje gojitve bakterij in meritev

```
%MERITEV luminiscence v komoricah (spiranje brizgalke in izpraznитеv tekočine iz cevk)
%Prečrpati sprva celice v komorice, nato spiranje brizgalke z vzorcem, sledi črpanje vzorca v
komorice, nazadnje prazenje cevk
%komorica 1-----
VntlPos(s, 4); %ventil za Gojišče KE (pHg4)
WpmpCnt(s, 120786); %vzameš ven vzorec iz Gojišča KE (pHg4)
VntlPos(s, 8); %ventil za komorico 1
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš pol mL v komorico 1
%komorica 2-----
VntlPos(s, 4); %ventil za Gojišče KE (pHg4)
WpmpCnt(s, 120786); %vzameš ven vzorec iz Gojišča KE (pHg4)
VntlPos(s, 9); %ventil za komorico 2
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš pol mL v komorico 2
%komorica 3-----
VntlPos(s, 4); %ventil za Gojišče KE (pHg4)
WpmpCnt(s, 120786); %vzameš ven vzorec iz Gojišča KE (pHg4)
VntlPos(s, 10); %ventil za komorico 3
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš pol mL v komorico 3
%komorica 4-----
VntlPos(s, 4); %ventil za Gojišče KE (pHg4)
WpmpCnt(s, 120786); %vzameš ven vzorec iz Gojišča KE (pHg4)
VntlPos(s, 11); %ventil za komorico 4
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš pol mL v komorico 4
%spiranje brizgalke z vzorcem vode-----
for i=1:1:5
VntlPos(s, 6);%ventil vzorec/storage
WpmpCnt(s, 215000); %vsebnost potegne notri iz komorice 1
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš vse v WASTE
end
%Prečrpati vzorec vode v komorice
%komorica 1-----
VntlPos(s, 6);%ventil vzorec(STORAGE)
WpmpCnt(s, 120786); %vzorec notri
VntlPos(s, 8); %ventil za komorico 1
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš pol mL v komorico 1 (8) (120786 obratov)
%prazenje tekočine iz cevk z zrakom iz bioreaktorja 1 (je prazen)
VntlPos(s, 5); %ventil za biorektor 1 - celice KE
WpmpCnt(s, 215000); %vzameš ven ZRAK
VntlPos(s, 8); %ventil za komorico 1
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš pol mL v komorico 1
%komorica 2-----
VntlPos(s, 6);%ventil vzorec(STORAGE)
WpmpCnt(s, 120786); %vzorec notri
VntlPos(s, 9); %ventil za komorico 2
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš pol mL v komorico 2(9) (120786 obratov)
%prazenje tekočine iz cevk z zrakom iz bioreaktorja 1 (je prazen)
```

```
VntlPos(s, 5); %ventil za biorektor 1 - celice KE
WpmpCnt(s, 215000); %vzameš ven ZRAK
VntlPos(s, 9); %ventil za komorico 2
WpmpCnt(s, 0); %spustiš pol mL v komorico 2
%komorica 3-----
VntlPos(s, 6);%ventil vzorec(STORAGE)
WpmpCnt(s, 120786); %vzorec notri
VntlPos(s, 10); %ventil za komorico 3
WpmpCnt(s, 0); %spustiš pol mL v komorico 3(10) (120786 obratov)
%praznenje tekočine iz cevk z zrakom iz bioreaktorja 1 (je prazen)
VntlPos(s, 5); %ventil za biorektor 1 - celice KE
WpmpCnt(s, 215000); %vzameš ven ZRAK
VntlPos(s, 10); %ventil za komorico 3
WpmpCnt(s, 0); %spustiš pol mL v komorico 3
%komorica 4-----
VntlPos(s, 14);%ČISTA DESTILIRANA VODA NOTRI!!!! - TO JE KONTROLA
(celice+destilirana voda)
WpmpCnt(s, 120786); %dest. voda notri
VntlPos(s, 11); %ventil za komorico 4
WpmpCnt(s, 0); %spustiš pol mL v komorico 4(11) (120786 obratov)
%praznenje tekočine iz cevk z zrakom iz bioreaktorja 1 (je prazen)
VntlPos(s, 5); %ventil za biorektor 1 - celice KE
WpmpCnt(s, 215000); %vzameš ven ZRAK
VntlPos(s, 11); %ventil za komorico 4
WpmpCnt(s, 0); %spustiš pol mL v komorico 4
disp('NAPOLNITEV KOMORICE Z VZORCEM IN CELICAMI, NA VRSTI JE
PREPIHOVANJE');
%prepihovanje 7200 sekund, to je 1493 enot
for i=1:1:1493 %prepihoval bom s 3 s pavzo, da mehurčki izginejo, to je 2 h prepihovanja
AirPumps(s, bin2dec('001111'));
pause(1);
AirPumps(s, bin2dec('000000'));
pause(1)
pause(1)
end
%konec prepihovanja na vrsti je meritev
disp('KONEC PREPIHOVANJA, NA VRSTI JE MERITEV');
%meritev luminiscence v komorice
meritev 1-----
ftpmlnRez = zeros(1,4);%
for i=1:1:1%zanka se ponovi dvakrat
FtpmPos(s,1);
AirPumps(s, bin2dec('000111'));
[status ftpmlnRez(i, 1)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,2);
AirPumps(s, bin2dec('001011'));
[status ftpmlnRez(i, 2)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,3);
AirPumps(s, bin2dec('001101'));
[status ftpmlnRez(i, 3)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,4);
```

```
AirPumps(s, bin2dec('001110'));
[status ftpmnRez(i, 4)] = FtpmMeasure(s, 100);
end
xlswrite('meritev1.xls', ftpmnRez);
disp('izvedel 1 meritev');
% meritev luminiscence v komorici meritev 2-----
ftpmnRez = zeros(1,4);%
for i=1:1:1%zanka se ponovi dvakrat
FtpmPos(s,1);
AirPumps(s, bin2dec('000111'));
[status ftpmnRez(i, 1)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,2);
AirPumps(s, bin2dec('001011'));
[status ftpmnRez(i, 2)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,3);
AirPumps(s, bin2dec('001101'));
[status ftpmnRez(i, 3)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,4);
AirPumps(s, bin2dec('001110'));
[status ftpmnRez(i, 4)] = FtpmMeasure(s, 100);
end
xlswrite('meritev2.xls', ftpmnRez);
disp('izvedel 2 meritev');
% meritev luminiscence v komorici meritev 3-----
ftpmnRez = zeros(1,4);%
for i=1:1:1%zanka se ponovi dvakrat
FtpmPos(s,1);
AirPumps(s, bin2dec('000111'));
[status ftpmnRez(i, 1)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,2);
AirPumps(s, bin2dec('001011'));
[status ftpmnRez(i, 2)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,3);
AirPumps(s, bin2dec('001101'));
[status ftpmnRez(i, 3)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,4);
AirPumps(s, bin2dec('001110'));
[status ftpmnRez(i, 4)] = FtpmMeasure(s, 100);
end
AirPumps(s, bin2dec('000000'));
xlswrite('meritev3.xls', ftpmnRez);
disp('izvedel 3 meritev');
% meritev luminiscence v komorici meritev 4-----
ftpmnRez = zeros(1,4);%
for i=1:1:1%zanka se ponovi dvakrat
FtpmPos(s,1);
AirPumps(s, bin2dec('000111'));
[status ftpmnRez(i, 1)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,2);
AirPumps(s, bin2dec('001011'));
[status ftpmnRez(i, 2)] = FtpmMeasure(s, 100);
```

```
FtpmPos(s,3);
AirPumps(s, bin2dec('001101'));
[status ftpmnRez(i, 3)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,4);
AirPumps(s, bin2dec('001110'));
[status ftpmnRez(i, 4)] = FtpmMeasure(s, 100);
end
AirPumps(s, bin2dec('000000'));
xlswrite('meritev4.xls', ftpmnRez);
disp('izvedel 4 meritev');
% meritev luminiscece v komorici meritev 5-----
ftpmnRez = zeros(1,4);%
for i=1:1:1% zanka se ponovi dvakrat
FtpmPos(s,1);
AirPumps(s, bin2dec('000111'));
[status ftpmnRez(i, 1)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,2);
AirPumps(s, bin2dec('001011'));
[status ftpmnRez(i, 2)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,3);
AirPumps(s, bin2dec('001101'));
[status ftpmnRez(i, 3)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,4);
AirPumps(s, bin2dec('001110'));
[status ftpmnRez(i, 4)] = FtpmMeasure(s, 100);
end
AirPumps(s, bin2dec('000000'));
xlswrite('meritev5.xls', ftpmnRez);
disp('izvedel 5 meritev');
% meritev luminiscece v komorici meritev 6-----
ftpmnRez = zeros(1,4);%
for i=1:1:1% zanka se ponovi dvakrat
FtpmPos(s,1);
AirPumps(s, bin2dec('000111'));
[status ftpmnRez(i, 1)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,2);
AirPumps(s, bin2dec('001011'));
[status ftpmnRez(i, 2)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,3);
AirPumps(s, bin2dec('001101'));
[status ftpmnRez(i, 3)] = FtpmMeasure(s, 100);
FtpmPos(s,4);
AirPumps(s, bin2dec('001110'));
[status ftpmnRez(i, 4)] = FtpmMeasure(s, 100);
end
AirPumps(s, bin2dec('000000'));
xlswrite('meritev6.xls', ftpmnRez);
disp('izvedel 6 meritev');
%prenos vseh tekočin v waste-----
%komorica 1-----
for i=1:1:2
```

```
VntlPos(s, 8);%ventil komorica 1
WpmpCnt(s, 215000); %vsebnost potegne notri iz komorice 1
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš vse v WASTE
end
%komorica 2-----
for i=1:1:2
VntlPos(s, 9);%ventil komorica 2
WpmpCnt(s, 215000); %vsebnost potegne notri iz komorice 2
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš vse v WASTE
end
%komorica 3-----
for i=1:1:2
VntlPos(s, 10);%ventil komorica 3
WpmpCnt(s, 215000); %vsebnost potegne notri iz komorice 3
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš vse v WASTE
end
%komorica 4-----
for i=1:1:2
VntlPos(s, 11);%ventil komorica 4
WpmpCnt(s, 215000); %vsebnost potegne notri iz komorice 4
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš vse v WASTE
end
%spraznenje cevk pred sterilizacijo-----
VntlPos(s, 5);%prazen bioreaktor
WpmpCnt(s, 215000); %vsebnost potegne notri iz komorice 4
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %ospustiš vse v WASTE
```

PRILOGA B

Protokol za sterilizacijo kivet

```
%spiranje kivet z NaClO
AirPumps(s, bin2dec('001111'));
%komorica 1 (spiranje z NaClO) -----
VntlPos(s, 2);%ventil NACIO
WpmpCnt(s, 215000); %NaClO notri
VntlPos(s, 8); %ventil za komorico 1
WpmpCnt(s, 0); %spustiš NACIO ven-----
VntlPos(s, 2);%ventil NACIO
WpmpCnt(s, 100000); %NaClO notri
VntlPos(s, 8); %ventil za komorico 1
WpmpCnt(s, 0); %s
pustiš
%komorica 2 (spiranje z NaClO)-----
VntlPos(s, 8);%ventil komorica 1, kjer je NaClO
WpmpCnt(s, 215000); %NaClO notri
VntlPos(s, 9); %ventil za komorico 2
WpmpCnt(s, 0); %spustiš NACIO ven-----
VntlPos(s, 8);%ventil komorico 1
WpmpCnt(s, 100000); %NaClO notri
VntlPos(s, 9); %ventil za komorico 2
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
%komorico 3 (spiranje z NaClO)-----
VntlPos(s, 9);%ventil komorico 2, kjer je NaClO
WpmpCnt(s, 215000); %NaClO notri
VntlPos(s, 10); %ventil za komorico 3
WpmpCnt(s, 0); %spustiš NACLO ven-----
VntlPos(s, 9);%ventil komorico 2
WpmpCnt(s, 100000); %NaClO notri
VntlPos(s, 10); %ventil za komorico 3
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
%komorico 4 (spiranje z NaClO)-----
VntlPos(s, 10);%ventil komorico 3, kjer je NaClO
WpmpCnt(s, 215000); %NaClO notri
VntlPos(s, 11); %ventil za komorico 4
WpmpCnt(s, 0); %spustiš NACLO ven-----
VntlPos(s, 10);%ventil komorico 3
WpmpCnt(s, 100000); %NaClO notri
VntlPos(s, 11); %ventil za komorico 4
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
%prenos NaClO iz zadnje komorice - komorice 4, v WASTE-----
VntlPos(s, 11);%ventil komorico 4, kjer je NaClO
WpmpCnt(s, 215000); %NaClO notri
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %spustiš NACLO ven v WASTE-----
VntlPos(s, 11);%ventil komorico 4
WpmpCnt(s, 215000); %NaClO notri
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
```

```
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
disp('KOMORICE SPRANE Z NACIO');
%komorice sem spral z NaClO, sledilo bo še DVAKRATNO spranje z destilirano
%vodo iz slota 14
%spiranje kivet z vodo
%komorico 1 (spiranje z vodo)-----
for i=1:1:2
VntlPos(s, 14);%ventil za VODO
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 8); %ventil za komorico 1
WpmpCnt(s, 0); %spustiš vodo ven-----
VntlPos(s, 14);%ventil voda
WpmpCnt(s, 100000); % voda notri
VntlPos(s, 8); %ventil za komorico 1
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
%iz komorice 1 v WASTE-----
VntlPos(s, 8);%ventil komorico 1
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 13); %ventil WASTE
WpmpCnt(s, 0); %spustiš vodo ven-----
VntlPos(s, 8);%ventil komorico 1
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
%komorico 2 (spiranje z vodo)-----
VntlPos(s, 14);%ventil za VODO
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 9); %ventil za komorico 2
WpmpCnt(s, 0); %spustiš vodo ven-----
VntlPos(s, 14);%ventil voda
WpmpCnt(s, 100000); % voda notri
VntlPos(s, 9); %ventil za komorico 2
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
%iz komorice 2 v WASTE-----
VntlPos(s, 9);%ventil komorico 2
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 13); %ventil WASTE
WpmpCnt(s, 0); %spustiš vodo ven-----
VntlPos(s, 9);%ventil komorico 2
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
%komorico 3 (spiranje z vodo) -----
VntlPos(s, 14);%ventil za VODO
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 10); %ventil za komorico 3
WpmpCnt(s, 0); %spustiš vodo ven-----
VntlPos(s, 14);%ventil voda
WpmpCnt(s, 100000); % voda notri
VntlPos(s, 10); %ventil za komorico 3
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
```

```
%iz komorice 3 v WASTE-----
VntlPos(s, 10);%ventil komorico 3
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 13); %ventil WASTE
WpmpCnt(s, 0); %spustiš vodo ven-----
VntlPos(s, 10);%ventil komorico 3
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
%komorico 4 (spiranje z vodo)-----
VntlPos(s, 14);%ventil za VODO
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 11); %ventil za komorico 4
WpmpCnt(s, 0); %spustiš vodo ven-----
VntlPos(s, 14);%ventil voda
WpmpCnt(s, 100000); % voda notri
VntlPos(s, 11); %ventil za komorico 4
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
%iz komorice 4 v WASTE-----
VntlPos(s, 11);%ventil komorico 4
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 13); %ventil WASTE
WpmpCnt(s, 0); %spustiš vodo ven-----
VntlPos(s, 11);%ventil komorico 4
WpmpCnt(s, 215000); % voda notri
VntlPos(s, 13); %ventil za WASTE
WpmpCnt(s, 0); %spustiš
end
AirPumps(s, bin2dec('000000'));
disp('KOMORICE SPRANE Z VODO DVAKRAT');
```