UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Manca KOVAČ VIRŠEK

# SELEKCIJSKI PRITISK BIOLOŠKO NEDOSTOPNEGA ŽIVEGA SREBRA NA OHRANJANJE OPERONA *mer* V MIKROBNIH ZDRUŽBAH

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Manca KOVAČ VIRŠEK

# SELEKCIJSKI PRITISK BIOLOŠKO NEDOSTOPNEGA ŽIVEGA SREBRA NA OHRANJANJE OPERONA *mer* V MIKROBNIH ZDRUŽBAH

#### DOKTORSKA DISERTACIJA

# SELECTION PRESSURE OF NON-BIOAVAILABLE MERCURY ON MAINTENANCE OF *mer* OPERON IN MICROBIAL COMMUNITIES

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

#### POPRAVKI

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 12. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 4. 11. 2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, področje genetika. Za mentorja je bil imenovan znan. svet. dr. Aleš Lapanje.

Delo je bilo v celoti opravljeno v laboratorijih Inštituta za mikrobiološke znanosti in tehnologije d.o.o., Domžale.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Peter Dovč Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član:	znan. svet. dr. Aleš Lapanje Inštitut za mikrobiološke znanosti in tehnologije, d.o.o.
Član:	znan. svet. dr. Zdravko Podlesek Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 4. 3. 2014

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

Manca KOVAČ VIRŠEK

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- **DK** UDK 577:574:546.49(497.4Idrijca)(043.3)=163.6
- KG živo srebro / Hg / Idrijca / mer operon / merA / qPCR / mikrobne združbe / biofilmi / biosenzorji / sediment / luminiscenca / biološka dostopnost / cinabarit / HgS / elementarno živo srebro / Hg<sup>0</sup> / cianid / siderofori / onesnaženost / bakterije
- **AV** KOVAČ VIRŠEK, Manca, univ. dipl. biol.
- SA LAPANJE, Aleš (mentor)
- KZ SI 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- **ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicine, področje Genetika
- **LI** 2014
- **IN** SELEKCIJSKI PRITISK BIOLOŠKO NEDOSTOPNEGA ŽIVEGA SREBRA NA OHRANJANJE OPERONA *mer* V MIKROBNIH ZDRUŽBAH
- TD Doktorska disertacija
- **OP** XV, 123 str., 7 pregl., 50 sl., 209 vir.
- IJ sl
- JI sl / en

AI Živo srebro, ki se nahaja v reki Idrijci, je v veliki meri biološko težko dostopno. Prevladujoča oblika živega srebra je cinabarit, ki mu sledi elementarno živo srebro. V raziskavi nas je zanimalo: 1) ali prisotnost biološko težko dostopnih oblik živega srebra vpliva na pojavljanje in ohranjanje rezistence na živo srebro, 2) kako različni bakterijski sevi vplivajo na povečanje biološko dostopne frakcije živega srebra in 3) kakšno vlogo imajo siderofori in cianid pri kroženju živega srebra v okolju, bogatim z biološko težko dostopnimi oblikami živega srebra. V prvem delu raziskave smo z analizo mikrobnih združb ugotovili, da onesnaženje z živim srebrom ne vpliva na bakterijsko raznolikost v združbi, vpliva pa na pojavljanje in ohranjanje rezistence na živo srebro. Rezultati so namreč pokazali visoko korelacijo ( $R^2 = 0.94$ ) med številom merA genov, določenih s qPCR in THg v bakterijskih združbah v biofilmih. Sledilo je vprašanje, ali je korelacija med *merA* in THg posledica vpliva bakterij na povečevanje biološko dostopne frakcije živega srebra. Z meritvami luminiscence biosenzorskih celic je bila izvedena študija vpliva izvenceličnih produktov in direktnega kontakta celic različnih bakterijskih sevov na povečevanje biološko dostopne frakcije živega srebra. Rezultat je pokazal, da bakterije B. subtilis, B. atrophaeus, P. aeruginosa, P. fluorescens, P. stutzeri, J. lividum, R. pisi, L. acidofilus in E. coli v sedimentih reke Idrijce povečujejo biološko dostopno frakcijo živega srebra z izvenceličnimi produkti, medtem ko B. atrophaues, P. fluorescens in P. stutzeri vplivajo na povečevanje biološko dostopne frakcije Hg tudi z direktnim kontaktom celic s sedimentom. Predpostavili smo, da imajo lahko izmed izvenceličnih produkov kratko verižne maščobne kisline, siderofori in cianid vlogo pri raztapljanju Hg<sup>0</sup> in HgS. Analiza prisotnosti cianidnih producentov in producentov sideroforov je pokazala večji delež cianidnih producentov v sedimentih, bolj onesnaženih s Hg. Vpliva sideroforov na povečevanje biološke dostopnosti Hg<sup>0</sup> in HgS nismo dokazali, medtem ko je bil vpliv cianida na topnost HgS in Hg<sup>0</sup> zelo jasen. Ob kontaktu Hg rezistentnih cianid producirajočih bakterij s Hg<sup>0</sup> in HgS se je koncentracija biološko dostopnega živega srebra povečala glede na kontrolo. Bakterije so ob stiku s HgS povečale sintezo cianida. Poleg tega se je ob stiku s Hg<sup>0</sup> povečala tudi ekspresija merA gena. Ugotovili smo, da so cianid producirjoči mikroorganizmi v okolju onesnaženem s Hg v kompetenčni prednosti pred necianidnimi producenti.

#### **KEY WORDS DOCUMENTATION**

ŠD Dd

- **DK** UDC 577:574:546.49(497.4Idrijca)(043.3)=163.6
- **KG** mercury / Hg / Idrijca / *mer* operon / *merA* / qPCR / microbial communities / biofilms / biosensors / sediment / luminiscence / bioavailability / cinnabar / HgS / elementary mercury / Hg<sup>0</sup> / cyanide / siderophores / pollution / bacteria
- **AV** KOVAČ VIRŠEK, Manca, univ. dipl. biol.
- **SA** LAPANJE, Aleš (mentor)
- **KZ** SI 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- **ZA** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, Field: Genetics
- **LI** 2014
- **IN** SELECTION PRESSURE OF NON-BIOAVAILABLE MERCURY ON MAINTENANCE OF *mer* OPERON IN MICROBIAL COMMUNITIES
- TD Doctoral dissertation
- **OP** XV, 123 p., 7 tab., 50 fig., 209 ref.
- IJ sl
- JI sl / en

AI Mercury, located in the Idrijca River, is in the most percentage non-bioavailable. The predominant form of the mercury is cinnabar, which is followed by the elemental mercury. In this study we were interested in: 1) does the presence of non-bioavailable forms of mercury affect the occurrence and preservation of the mercury resistance; 2) how do different bacterial strains affect the increase in bioavailable fraction of mercury and 3) what is the role of siderophores and cyanide in the mercury cycle in the environment, rich in non-bioavailable forms of mercury. In the first part of the study, by analysing the microbial communities, we have found out that the mercury pollution does not affect the bacterial diversity in communities, but has an impact on the occurrence and preservation of the mercury resistance. The results have shown namely a high correlation ( $R^2 = 0.94$ ) between the number of genes determined by qPCR and THg in bacterial communities in biofilms. A question followed, whether the correlation between merA and THg is due to the impact of bacteria on the increase of bioavailable fraction of mercury. By measuring luminescence of biosensor cells, a study was carried out on an impact of the extra-cellular products and a direct contact with cells of different bacterial strains on an increase of bioavailable fraction of mercury. The results showed that bacteria B. subtilis, B. atrophaeus, P. aeruginosa, P. fluorescens, P. stutzeri, R. pisi, J. lividum, L. acidofilus and E. coli, from the Idrijca river sediments increase the fraction of bioavailable mercury through the extracellular products, while bacteria B. atrophaues, P. fluorescens in P. stutzeri also through a direct contact between the cells and the sediment. We have assumed that among the extracellular products, shortchain fatty acids, siderophores and cyanide can play a role in the dissolution of Hg<sup>0</sup> and HgS. Analysis of the presence of cyanide and siderophore producers showed a higher share of cyanide producers in the sediments, which were more contaminated with mercury. Impact of siderophores on the increase of the bioavailability of Hg<sup>0</sup> and HgS could not be proved, while the effect of cyanide on the solubility of HgS and Hg<sup>0</sup> was very clear. In the contact of Hg resistant cyanide producing bacteria with Hg<sup>0</sup> and HgS, the concentration of bioavailable mercury was increased relative to the control. Bacteria, exposed to HgS, increased the synthesis of cyanide. Additionally, in the contact with Hg<sup>0</sup>, also the rate of gen merA expression was increased. We conclude that cyanide producers are in competence advantage in the Hg polluted environment in comparison with non-cyanide producers.

## **KAZALO VSEBINE**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA III		
KEY WORDS DOCUMENTATION IV		
KAZALO VSEBINE	V	
KAZALO PREGLEDNIC	. IX	
KAZALO SLIK	X	
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	хШ	
SLOVARČEK	XV	
1 IIVOD	1	
1 1 NAMEN DELA	1	
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2	
2 PREGLED OBJAV	3	
2.1 KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA V NARAVI	3	
2.1.1 Viri živega srebra v naravi	3	
2.1.2 Biogeokemijski cikel živega srebra	3	
2.1.2.1 Redukcija $Hg^{2+}$	6	
2.1.2.2 Oksidacija Hg <sup>0</sup>	6	
2.1.2.3 Pretvorbe HgS	7	
2.1.2.3.1 Ekstrahiranje živega srebra iz sedimentov	7	
2.1.2.3.2 Oksidacija HgS	9	
2.1.2.4 Živo srebro vezano na raztopljeni organski material	10	
2.1.2.5 Živo srebro v Idrijci	12	
2.2 BIOSENZORJI	13	
2.2.1 Biosenzorji, ki temeljijo na bioluminiscenci	14	
2.2.1.1 mer-lux biosenzor	15	
2.2.1.1.1 <i>Mer</i> operon	15	
2.3 CIANID PRODUCIRAJOCE BAKTERIJE	17	
2.3.1 Sinteza cianida	18	
2.4 SINTEZA IN VLOGA SIDEROFOROV PRI BAKTERIJAH	22	
2.4.1 Kaj so siderofori?	22	
2.4.2 Zelezo v naravi in njegov pomen za mikroorganizme	22	
2.4.3 Fizikaino-kemijske lastnosti siderolorov	23	
2.4.4 BIOSINIEZA SIGEFOIOFOV	24	
2.4.5 Sekrecija sideroforo v colico	43	
2.4.0 Prenos re iz siderolora v cenco	43	
2.4.7 Wienanizini spioscanja zeleza iz sluči olor ov	47	
2.4.0 Vioga succorrow pri preperevanju mineralov		
2 1 VIDI IV DIOLOŠKO NEDOSTODNILI ODLIK ŽIVECA SDEDDA NA	20	
5.1 VILIV DIOLOSKO NEDOSTOPNIH ODLIK ZIVEGA SKEDKA NA DOLAVI LANIE U $_{\alpha}$ DEZISTENTNIH DAVTEDIL V DEVLIDULCI	20	
1 UJA V LJANJE HIS KEZIO LEN IMIT DAK LEKIJ V KEKI IDKIJUL	20 مور	
3.1.1 V ZUI UCHIje VUUE III UIUIIIIIUV V FEKI IUFIjei	20 20	
3.1.2 Izolacija in luchulikacija izoli alili rig i čelstelitili sevov	31	
3.1.2.1 Verizina reakcija s pomierazo za 105 mitra gen	22	
5.1.2.2 Servenenunge in mögeneiska ananza izomanni rezistenenni sevov		

3.1.3	Izolacija in čiščenje DNA iz okoljskih vzorcev	32
3.1.4	Analiza mikrobnih združb v vzorcih biofilmov iz reke Idrijce	32
3.1.5	Kvantifikacija merA gena	33
3.1.6	Meritve celokupnega živega srebra	33
3.2 V	PLIV BAKTERIJ NA POVEČANJE BIOLOŠKO DOSTOPNE FRAKCIJ	E
Ž	IVEGA SREBRA V SEDIMENTIH	34
3.2.1	Vpliv bakterijskih izvenceličnih produktov na povečevanje biološko	
	dostopne frakcije Hg v sedimentih	34
3.2.	1.1 Vzorčenje sedimenta na treh lokacijah v reki Idrijci	34
3.2.	1.2 Izpostavitev bakterijskih izvenceličnih produktov sedimentom	34
3.2.	1.3 Meritve biološko dostopnega živega srebra	34
3.	.2.1.3.1 Izvor in sestava senzorskih in konstitutivnih celic	34
3.	.2.1.3.2 Priprava Hg standardov	36
3.2.	1.4 Meritve luminiscence	36
3.	.2.1.4.1 Obdelava rezultatov meritev biološko dostopnega Hg	37
3.2.	1.5 Kemijske meritve celokupnega živega srebra	37
3.2.2	Vpliv metabolno različnih mikroorganizmov na povečanje biološko	
	dostopne frakcije Hg v sedimentih	37
3.2.	2.1 Vzorčenje sedimenta iz reke Idrijce v Idriji	37
3.2.1	2.2 Izbor bakterij in njihovih rastnih pogojev	38
3.2.2	2.3 Izpostavitev celičnih kultur, izvenceličnih produktov in čistega gojišč	a
	sedimentu	41
3.2.3	Vpliv izvenceličnih produktov in direktnega kontakta celic na povečaj	ije
<b>a a</b>	biološko dostopne frakcije Hg v sedimentu	42
3.2.	3.1 Izbor sedimenta in bakterijskih sevov	42
3.2.	3.2 Vpliv izvenceličnih produktov na sediment	42
3.2.	3.3 Vpliv direktnega kontakta celic na sediment	43
3.	.2.3.3.1 Meritve izvenceličnega BDHg	43
3.	.2.3.3.2 Meritve znotrajceličnega BDHg	43
3	2.4. Meritve koncentracije proteinov	44
3.2.	3.4 Meritve THg v vzorcin supernatantov in v usedlini celic	44
3.2.	3.5 Kastne krivulje	45
3.3 V	PLIV CIANID IN SIDERUFUR PRODUCIRAJUCIH BAKTERIJ NA	
В Ž	IULUSKE I KANSFUKMACIJE UINABAKI I A IN ELEMEN I AKNEGA	. 15
2 2 1		45
3.3.1	Izolacija siderolor in clanid producirajocih dakterij iz sedimentov rek	.e 15
22	Iurijce 1.1. Vzorčanja sadimanta na čtirih lakagijah na raki Idrijaj	45
<i>J.J.</i> 2	2.1.1.1. Priprava gojitvonih pločě	45
2	3.1.1.2 Testiranie seven na produkcije sideroforov	40
2	3113 Testiranje sevov za produkcijo slučiolov	+0 //7
22	1.2 Izbor sevov	+/ /8
3.3. 2	3121 Izolacija DNA iz čistih kultur	+0 //0
3	3122 PCR izolirane DNA	رہـ 20
3	3123 Preverianie usnešnosti PCR	رہـ <u>1</u> 9
3	3124 Analiza rezultatov sekvencirania	
5		

3.3.2 P	osreden kontakt cianid in siderofor producirajočih bakterij s HgS in	n 50
П 2 2 <b>2</b> 1	Jahar aquay in aquižă	
3.3.2.1	IZUOI SEVUV III GUJISC	
2222	Lanostavitavi inhanih haltariislih aavav Ua <sup>0</sup> in UaS	
3.3.2.2	2.1 Maritua DDLa	
3.3.	2.2.1 Mentve BDHg	
	2.2.2 Mientve koncentracije sideroforov	
3.3.	2.2.5 IZOIACIJA KINA	
3.3.	2.2.4 Mieniev koncentracije KINA	
3.3.	2.2.5 Odstranitev DNA iz vzorcev izolirane RNA	
3.3.	2.2.6 Reverzna transkripcija	
3.3.	2.2.7 Meritev koncentracije kopirane DNA	
3.3.	2.2.8 qPCK meritev ekspresije <i>merA</i> gena	
3.3.	2.2.9 Priprava qPCR standarda	
3.3.	2.2.10 Obdelava rezultatov qPCR	
3.3.3 N	eposreden kontakt clanid producirajočih bakterij s HgS in Hg <sup>*</sup>	
3.3.3.1	Izbor bakterijskih sevov in gojišć:	
3.3.3.2	Izpostavitev izbranih bakterijskih sevov Hg° in HgS	
3.3.	3.2.1 Nacepljanje vzorcev na plošće	
3.3.3.3	Vpliv koncentracije živega srebra na sintezo cianida pri Hg	
	nerezistentnem bakterijskem sevu	
4 REZULT	`ATI	
4.1 VPI	IV BIOLOŠKO NEDOSTOPNIH OBLIK ŽIVEGA SREBRA NA	
POJ	AVLJANJE BAKTERIJ ODPORNIH NA ZIVO SREBRO V REKI	
IDR	IJCI	
4.1.1 V	pliv onesnaženja z živim srebrom na sestavo bakterijskih združb v	
b	iofilmih	
$4.1.2 S_{\rm c}$	premljanje števila in vrstne sestave na živo srebro odpornih bakteri	j .60
4.1.3 M	leritve <i>merA</i> gena v vzorcih vode in biofilma v različnih letnih časih	64
4.1.4 M	leritve <i>merA</i> gena in THg v vzorcih gradienta	
4.2 VPI	IV BAKTERIJ NA POVECANJE BIOLOSKO DOSTOPNE FRAKCI.	JE
ZIV	EGA SREBRA V SEDIMENTIH	68
4.2.1 V	pliv bakterijskih izvenceličnih produktov na povečanje biološko	
d	ostopne frakcije živega srebra v sedimentih	68
4.2.2 V	pliv metabolno različnih mikroorganizmov na povečanje biološko	
d	ostopne frakcije živega srebra v sedimentih	69
4.2.3 V	pliv izvenceličnih produktov in direktnega kontakta celic na poveča	inje
b	iološko dostopne frakcije živega srebra v sedimentih	71
4.2.3.1	Vpliv izvenceličnih produktov na povečanje koncentracije BDHg v	
	sedimentih	72
4.2.3.2	Razvoj metode za preverjanje vpliva direktnega kontakta bakterijski	h
	celic na povečanje koncentracij BDHg v sedimentih	76
4.2.3.3	Vpliv direktnega kontakta celic na povečanje koncentracij BDHg v	
	sedimentih	76
4.3 VPL	IV CIANID IN SIDEROFOR PRODUCIRAJOČIH BAKTERIJ NA	
BIO	LOŠKE TRANSFORMACIJE CINABARITA IN ELEMENTARNEGA	4
ŽIV	EGA SREBRA	80

4.3.1	Poj	avljanje cianid in siderofor producirajočih mikroorganizmov v reki	
	Idr	ijci	80
4.3.2	Vp	liv Hg rezistentnega cianidnega in siderofornega producenta na	
	bio	loško pretvorbo $\mathbf{Hg}^{\mathtt{v}}$ – posredni kontakt	82
4.3	.2.1	Rezultati meritev BDHg	83
4.3	.2.2	Rezultati meritev koncentracij HCN	85
4.3	.2.3	Rezultati ekspresije merA gena	86
4.3.3	Vp	liv Hg rezistentnega in Hg nerezistentnega cianidnega producenta na	ì
	bio	loško pretvorbo Hg <sup>0</sup> – neposredni kontakt	88
4.3	.3.1	Rezultati meritev BDHg	88
4.3	.3.2	Vpliv koncentracije živega srebra na sintezo in meritev cianida pri Hg	
		nerezistentnem bakterijskem sevu	93
5 RAZE	PRAV	/A	94
5.1 Y	VPLI	V BIOLOŠKO NEDOSTOPNIH OBLIK ŽIVEGA SREBRA NA	
I	POJA	VLJANJE BAKTERIJ ODPORNIH NA ŽIVO SREBRO V REKI	
I	DRIJ	CI	94
5.2	VPLI	V BAKTERIJ NA POVEČANO KOLIČINO BIOLOŠKO	
]	DOST	OPNEGA ŽIVEGA SREBRA V SEDIMENTIH	97
5.3	VPLI	V CIANID IN SIDEROFOR PRODUCIRAJOČIH BAKTERIJ NA	
I	BIOL	OŠKE TRANSFORMACIJE CINABARITA IN ELEMENTARNEGA	
	ŽIVE	GA SREBRA10	00
6 SKLE	IPI		04
7 POVZ	ZETE	CK (SUMMARY)1	06
7.1 I	POVZ	ZETEK	06
7.2	SUMI	MARY	08
8 VIRI			10
ZAHV	ALA	L .	

# KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Koordinate vzorčnih mest in fizikalno kemijski parametri, izmerjeni ob	
gradientnem vzorčenju pozno poleti	30
Pregl. 2: Seznam uporabljenih koncentracij HgCl <sub>2</sub> in njihova priprava	36
Pregl. 3: Seznam uporabljenih sevov in gojišč	38
Pregl. 4: Časovni intervali razbijanja celic za posamezne bakterijske seve	44
Pregl. 5: Izbor sevov in njihovih gojišč za testiranje vpliva siderofor in cianid	
producirajočih bakterij na povečanje biološke dostopnosti Hg s posrednim	
kontaktom	50
Pregl. 6: Izbor sevov in njihovih gojišč za testiranje vpliva cianid producirajočih	
bakterij na povečanje biološke dostopnosti Hg z neposrednim kontaktom	56
Pregl. 7: Rezultati sekvenciranja	83

# KAZALO SLIK

S1.	1:	Porazdelitev živega srebra na zemlji brez vpliva človeka (naravna porazdelitev
<b>C</b> 1	2	Hg) (B) in ob delovanju cloveka (A) (Mercury, 2013)
SI.	2:	Biogeokemijski cikel zivega srebra (Steinlin in Huang, 2008: 3)
<b>S</b> I.	3:	Znane moznosti vezave raztopljene oblike Hg (ionski Hg) v naravi z
		anorganskimi in organskimi snovmi ter njegove pretvorbe (Fitzgerald in Clarkson,
01	4	1991: 162)
51.	4:	Prepostavljeni model oksidacije gličina v HCN preko nestabilnega vmesnega
01	_	produkta imino acetine kisine (Blumer in Haas, 2000: $1/1$ )
51.	5	Regulacija clanogeneze pri <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO (Blumer in Haas,
<b>C</b> 1	6.	2000: 1/4)
51.	0.	Dhip ter niihovo novozovo z DNA polimerazo (Doosi in Hoos, 2000; 6047)
C1	7.	Model Coos (CooA gignal no transdukcija pri <i>Basudamanga fluanasang</i> CHAO
51.	1.	(Hoos in Defere 2005: 0) 22
<b>Q1</b>	ç.	Drimori razližnih tipov sidoroforov (Miothko in Marshial 2007: 415)
SI.	0. Q.	Pazporeditev glavnih vzorčnih mest sezonskega vzorčenja na razdalji 40 km 20
S1.	). 10	Razporeditev yzorčnih mest na razdalij 4 km pri gradjentnem vzorčenju 29
SI.	11	: Shematski prikaz pmerR lux plazmida vstavljenega v <i>F. coli</i> MC1061 celice pri
51.	11	čemer so nastale <i>E. coli</i> IND celice.
S1.	12	: Shematski prikaz pDNlux plazmida vstavljenega v <i>E. coli</i> MC1061 celice, pri
~11		čemer so nastale <i>E. coli</i> CON celice
S1.	13	: Prikaz izdelane gojitvene plošče za preverjanje bakterijskih sevov za sintezo
		sideroforov
S1.	14	: Dendrogrami izračunani iz TTGE profilov 16S rRNA genov vzorčenih v
		zimskem (A), zgodnje poletnem (B) in pozno poletnem (C) letnem času 59
S1.	15	: Delež HgR bakterij med sezonami pri vzorcih vode (A) in biofilmov (B) 60
S1.	16	: Filogenetsko drevo narisano na podlagi zaporedij 16S rRNA genov izoliranih iz
		HgR bakterij v vzorcih biofilma
S1.	17	: Filogenetsko drevo izračunano na podlagi zaporedij 16S rRNA genov izoliranih
		iz HgR bakterij v vzorcih vode
S1.	18	: Stevilo kopij <i>merA</i> gena normaliziranih na celokupno koncentracijo DNA v
~1		vzorcu pri sezonskem vzorčenju vode (A) in biofilmov (B)
SI.	19	: Korelacija med THg in številom kopij gena <i>merA</i> , normaliziranim na celokupno
		koncentracijo DNA ob upoštevanju vseh vzorčnih mest (A) in po izključitvi
01	20	vzorčnih mest z diskrepanco (B)
51.	20	: Korelacija med THg in stevilom kopij gena <i>merA</i> , normaliziranim na stevilo
		kopij gena 165 fRINA ob upostevanju vsen vzorenin mest (A) in po izključitvi
<b>C</b> 1	01	VZOICHIN MESL Z diskrepanco (B)
51.	21	stagionarnih galižnih kultur razližnih haktorijskih vrst sadimentom iz Pala. Idrije
		in Sp. Idrije
<b>S</b> 1	$\gamma\gamma$	III Sp. Turije
01.	<i></i> _	kultur (S) 2) suspenzije bakterijskih celic izbranih bakterijskih sevov (C) in 3)
		gojišč v katerih so bili posamezni sevi gojeni (G) iznostavljenih sedimentu iz
		reke Idrijce v štirih časovnih intervalih (1 h 3 h 6 h in 24 h) 70

Sl. 23: Deleži BDHg za vzorce supernatantov izbranih stacionarnih kultur (S) in
suspenzije bakterijskih celic (C) izračunanih iz koncentracij BDHg, glede na
koncentracije BDHg v gojišču (G)
Sl. 24: Primeriava koncentracij BDHg v vzorcih izvenceličnih produktov in nijhovih
kontrol (LB NB ultra čista voda) iznostavljenih sedimentu v dveh časovnih
intervalih (1 h in 3 h) 73
Sl 25: Deleži BDHg vzorcev izračunani glede na koncentracije BDHg kontrole 73
SI. 26: Drimariava koncentraciji THa v vizorajh izvanacličnih produktov in njihovih
SI. 20. FIIIIerjava Koncentraciji Frig v vzorcini izvencencini produktov in njihovini Izventral (LD, ND, siltra žista sia da) 1 h. jen setasljanjih sa djuganta. 74
kontrol (LB, NB, ultra cista voda) 1 n izpostavljenih sedimentu
SI. 27: Deleži 1Hg izračunani glede na koncentracije 1Hg kontrole
Sl. 28: Deleži BDHg glede na THg pri vzorcih supernatantov stacionarnih bakterijskih
kultur
Sl. 29: Primerjava koncentracij THg znotraj <i>E. coli</i> celic pri testiranju štirih metodologij
inkubacije celic s sedimentom76
Sl. 30: Primerjava koncentracij BDHg zunaj celic med različnimi bakterijskimi vzorci77
Sl. 31: Primerjava koncentracij BDHg znotraj celic med različnimi bakterijskimi vzorci
Sl 32 <sup>•</sup> Primeriava koncentracii THg znotraj celic med različnimi bakterijskimi vzorci 78
SI 32: Koncentracija THg in koncentracija BDHg normalizirani na število celic v
vzoren
SI 24: Delež DDUg glada na koncentracija TUg 70
SI. 34. Delez BDrig glede na koncentracije i rig
SI. 35: Delezi siderotornin producentov, cianidnin producentov, sevov, ki sintetizirajo
siderofore in cianid ter sevoy, ki ne sintetizirajo niti cianida niti sideroforov,
izoliranih na gojitvenih ploščah brez dodanega Hg, iz rečnih sedimentov reke
Idrijce na štirih vzorčnih mestih
Sl. 36: Deleži siderofornih producentov, cianidnih producentov, sevov, ki sintetizirajo
siderofore in cianid ter sevov, ki ne sintetizirajo niti cianida niti sideroforov,
izoliranih na gojitvenih ploščah z dodanim Hg, iz rečnih sedimentov reke Idrijce
na štirih vzorčnih mestih
Sl. 37: Koncentracije BDHg in rast bakterijskega seva, ki sintetizira cianid,
izpostavlienega Hg <sup>0</sup> in HgS s posrednim kontaktom
Sl 38: Koncentracije BDHg in rast bakterijskega seva, ki sintetizira siderofore
izpostavljenega $Ha^0$ in $HaS$ s posrednim kontaktom
SI 20: Koncentracije DDHg in rest belterijskogo savo ki na cintetizira niti cionida niti
SI. 59. Koncentracije DD11g in last bakterijskega seva, ki ne sintetizira inti clanida inti sidovofovov izpostovljenoso Us <sup>0</sup> in USS s posrodnim kontolstom
sideroiorov, izpostavijenega Hg in HgS s posrednim kontaktom
SI. 40: Koncentracije cianida pri cianidnem producentu izpostavljenemu Hg <sup>o</sup> , HgS ali
brez Hg (K) v štirih časovnih intervalih
Sl. 41: Stevilo kopij <i>merA</i> gena pri cianidnem producentu izpostavljenemu HgS, Hg <sup>o</sup> ali
brez Hg (K)
Sl. 42: Število kopij <i>merA</i> gena pri producentu sideroforov izpostavljenemu HgS, Hg <sup>0</sup>
ali brez Hg
Sl. 43: Število kopij <i>merA</i> gena pri sevu, ki ni tvoril niti cianida niti sideroforov.
izpostavljenemu H $gS$ , H $g^0$ ali brez H $g$ (K) 87
Sl 44: Koncentracije BDHg in število kolonij (CFU/ml) HgR+ in HgR- cianidnih
producentov penosredno izpostavljenih $Ha^0 v$ štirih časovnih intervalih
si $45$ : Koncentracije cianida in čtavilo kolonij (CEU/ml) pri UaD $\pm$ in UaD $\pm$ acvih
SI. 45. Koncentracije clainda in stevilo kolonij (CFU/ini) pli rigk $+$ in rigk- sevin,
12postavijenin Hg <sup>-</sup>

Sl. 46:	Koncentracije BDHg in število kolonij (CFU/ml) HgR+ in HgR- sevov brez produkcije cianida neposredno izpostavljenih $Hg^0$ v štirih časovnih intervalih.	90
Sl. 47:	Koncentracije BDHg in število kolonij (CFU/ml) HgR+ in HgR- cianid	
	producirajočih sevov, neposredno izpostavljenih HgS v štirih časovnih interval	lih
		91
Sl. 48:	Koncentracije cianida in število kolonij (CFU/ml) pri HgR+ in HgR- sevih	
	izpostavljenih HgS	92
Sl. 49:	Koncentracije BDHg in število kolonij (CFU/ml) HgR+ in HgR- cianid	
	neproducirajočih sevov, neposredno izpostavljenih HgS v štirih časovnih	
	intervalih	92
S1. 50:	Koncentracije cianida in število celic (CFU/ml) v odvisnosti od koncentracije	
	HgCl <sub>2</sub>	93

# OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMP	adenozin monofosfat
ANR	anaerobni regulator
ATP	adenozin trifosfat
ATR-IR	stanjšana celokupna reflekcijska infra rdeča spektroskopija
BDHg	biološko dostopno živo srebro, ang. BAHg - biologically availabile
	mercury
CAS	kromazurol S
cDNA	kopirana deoksiribonukleinska kislina
CPS	število na sekundo
СМ	citoplazemska membrana
CVAAS	atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DOM	raztopljen organski material
DOC	raztopljen organski ogljik
DEPC	dietilpirokarbonat
dsDNA	dvoverižna deoksiribonukleinska kislina
G+	Gram pozitivne bakterije
G-	Gram negativne bakterije
FAD	flavin adenin dinukelotid
HA	hranilni agar
HAHg	hranilni agar z dodanim živim srebrom
HCN	cianid
HDTMA	heksadeciltrimetilamonij
$Hg^0$	elementarno živo srebro
Hg	živo srebro
HgR	rezistenca na živo srebro
K	ravnotežna konstanta
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NB	hranilno gojišče
NRPS	neribosomalna peptidna sintetaza
NTP	nukleotid trifosfat
HgS	cinabarit
OdDHL	N-(3-oksodo-dekanoil)-homoserin lakton
OMR	zunanje membranski receptor
OM	zunanja membrana
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
PBS	slani fosfatni pufer
PICT	z onesnaženjem povzročena toleranca združbe (pollution induced
	community tolerance)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
POM	partikulatni organski material
ppb	delcev na milijon
rpm	obrati na minuto
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina
RT	reverzna transkripcija

TBETris-borat-EDTATHgcelokupno živo srebroTTGEtemporalen temperaturni gradientni elektroforezni gel

# SLOVARČEK

Biosenzor	Naprava, ki za detekcijo analita uporablja biološko komponento, v kateri pride do fizikalnokemijske spremembe, ki jo izmeri elektronski del naprave.
Bioluminiscenca	Oddajanje svetlobe pri živih bitjih, ki nastane ob pretvorbi kemične energije v svetlobo.
Transpozon	DNA sekvenca, ki lahko spreminja svojo lego po genomu.
Cianogeneza	Sinteza cianida pri živih organizmih.
Quorum sensing	Zaznavanje celične gostote. Sistem dražljajev in odgovorov, ki korelira z gostoto populacije. Bakterije ga uporabljajo za regulacijo ekspresije določenih genov v odvisnosti od gostote celic.
Siderofor	Siderofor je helator specifičnih železovih ionov z nizko molekularno težo, ki ga sproščajo bakterije in glive, ki rastejo na področju s pomanjkanjem železa.

## 1 UVOD

Živo srebro (Hg), ki se pojavlja v naravi, je v veliki meri biološko težko dostopno. Takšne oblike živega srebra so živosrebrovi sulfitni minerali (cinabarit, metacinabarit, hipercinabarit), elementarno živo srebro (Hg<sup>0</sup>) in živo srebro vezano s partikulatnim materialom (Hg-POM) in raztopljenim organskim materialom (Hg-DOM) (Ravichandran in sod., 1998). Kljub prevladujočim biološko slabo dostopnim oblikam živega srebra so mikroorganizmi razvili odpornost proti Hg, ki je zapisana z *mer* operonom (Osborn in sod., 1997). Biološko težko dostopne oblike živega srebra se lahko namreč v procesu geokemijskega cikla z abiotskimi in biotskimi dejavniki pretvarjajo v biološko dostopne oblike Hg, kot so Hg<sup>2+</sup>, Hg<sup>+</sup>, metil-Hg, dimetil-Hg. Le te pa lahko bakterije z *mer* operonom reducirajo (Hg<sup>2+</sup> v Hg<sup>0</sup>) ali metilirajo (Hg<sup>2+</sup> v metil-Hg) (Barkay in sod., 2003).

Biološke pretvorbe biološko težko dostopnih oblik živega srebra v biološko dostopne oblike Hg so zelo slabo poznane. Analize možne oksidacije Hg<sup>0</sup> so bile narejene edino leta 1974 (Holm in Cox, 1974). Mikroorganizmi, za katere je znano, da lahko oksidirajo elementarno živo srebro so: *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli, Citrobacter* sp., *Bacillus subtilis* in *Bacillus megaterium* (Holm in Cox, 1974), pri čemer oksidacija ne poteka s pomočjo encimov, ampak je običajno rezultat interakcije Hg<sup>0</sup> z metabolnimi produkti mikroorganizmov (Steinlin in Huang, 2008). O bioloških transformacijah HgS je še manj znanega. Znano je le, da bakterija *Thiobacillus ferooxidans* raztaplja HgS ob prisotnosti FeSO<sub>4</sub> (Silver in Torma, 1974). Mikroorganizmi lahko sicer z izločanjem kratko verižnih maščobnih kislin in sideroforov vplivajo na topnost mineralov (Uroz in sod., 2009), toda topnosti HgS z mikroorganizmi ni preučeval še nihče. Kemijsko lahko HgS raztaplja tudi cianid (Shaw in sod., 2006), ki se v naravi lahko pojavlja kot sekundarni produkt mikroorganizmov (Castric K. F. in Castric P. A., 1983).

#### 1.1 NAMEN DELA

Namen doktorskega dela je bilo poiskati odgovore na sledeča znanstvena vprašanja:

• Ali prisotnost biološko težko dostopnih oblik živega srebra vpliva na pojavljanje in ohranjanje rezistence na živo srebro v mikrobnih združbah v reki Idrijci?

- Kako različni bakterijski sevi vplivajo na povečano biološko dostopnost živega srebra v sedimentih s prevladujočimi biološko nedostopnimi oblikami živega srebra?
- Kakšno vlogo imajo siderofori in cianid pri kroženju živega srebra v okolju bogatem z biološko težko dostopnimi oblikami živega srebra?

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V okviru doktorskega dela smo postavili tri delovne hipoteze:

Hipoteza 1:

Na biološko dostopnost živega srebra lahko vplivajo različni dejavniki, od oksidacije elementarnega živega srebra do različnih metabolnih produktov mikroorganizmov. Predvidevamo, da je kljub prevladujočim, biološko slabo dostopnim, ali celo nedostopnim oblikam živega srebra (Hg<sup>0</sup>, HgS, Hg-POM, Hg-DOM), selekcijski pritisk dovolj velik, da je celokupno živo srebro v korelaciji s količino bakterij odpornih na živo srebro.

Hipoteza 2:

Bakterijski sevi imajo različno sposobnost mobilizacije živega srebra. Ločimo dva mehanizma: 1. kontakt celice s substratom, ki vsebuje nedostopno živo srebro in 2. izločanje metabolnih produktov. Menimo, da določeni mikroorganizmi lahko izločajo metabolite, s katerimi vplivajo na povečevanje biološko dostopne frakcije živega srebra.

Hipoteza 3:

V predhodnih raziskavah je bilo dokazano, da v okoljih onesnaženih s Hg živijo fluorescentne pseudomonade. To je splošno razširjena skupina bakterij v naravi, ki tvorijo siderofore. Določene izmed njih lahko tvorijo tudi cianid. Bakterije lahko z izločanjem sideroforov in cianida pripomorejo k večji »ekstrakciji« imobiliziranega Hg, kar povzroči povečano toksičnost, aktivnost *mer* operona in selekcijo rezistenčnih determinant.

#### 2 PREGLED OBJAV

#### 2.1 KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA V NARAVI

#### 2.1.1 Viri živega srebra v naravi

Živo srebro in njegove spojine se sproščajo v zemljo, zrak in vodo z naravnimi geološkimi in antropogenimi ali t.i. industrijskimi procesi. Najpomembnejši naravni vir živega srebra na Zemlji predstavljajo vulkanski izbruhi v preteklosti, na kar kaže prisotnost živega srebra v magmatskih kamninah (Osborn in sod., 1997). Danes s procesom preperevanja kamnin in hidrotermalnimi podvodnimi vrelci (Steinlin in Huang, 2008) živo srebro vstopa v zemljo, zrak in vodo in se tako vključuje v biogeokemijski cikel. Živo srebro se pojavlja v zgornji zemljini skorji kot redek element, z le 50 ppb. V zemlji se njegova količina giblje med 20 in 150 ppb, pojavlja se v zelo različnih oblikah, od katerih jih je večina biološko nedostopnih. Najbolj pogosto se v naravi nahaja v različnih oblikah živosrebrovega sulfitnega minerala (cinabarit, metacinabarit, hipercinabarit) (Barkay in sod., 2003), ki lahko vsebuje celo do 86 % živega srebra (Mercury..., 2013), in v elementarni obliki, Hg<sup>0</sup>. Količina naravno sproščenega Hg v naravo naj bi bila 2500 ton/leto (Slika 1).

Poleg naravnega vnosa ima velik pomen tudi antropogeni vnos živega srebra v okolje, saj naj bi le-ta predstavljal kar 75 % globalnega vnosa Hg v okolje. Ločimo dve skupini virov antropogenega vnosa Hg v naravo: primarne in sekundarne. Primarni so tisti, pri katerih je živo srebro geološkega izvora v naravi mobilizirano in se prične sproščati kot posledica človeške dejavnosti (npr. rudarjenje živo srebrove rude, gorenje fosilnih goriv). Sekundarni viri pa vključujejo namerno uporabo živega srebra v industriji, zobozdravstvu in rudarjenju zlata (Pacyna in sod., 2010).

#### 2.1.2 Biogeokemijski cikel živega srebra

Najbolj pogosta oblika živega srebra na zemlji je biološko nedostopen cinabarit. Topna oblika HgS (HgS(s)) lahko pri procesu preperevanja oksidira v Hg<sup>2+</sup>. Poleg tega se lahko transformira še v HgS<sup>(0)</sup> ali Hg(SH)<sub>2</sub>, ki se naprej prerazporejata po zemlji in zraku. Ionska oblika živega srebra, Hg<sup>2+</sup>, hitro tvori komplekse z organskimi in anorganskimi snovmi (Slika 2, 3) (Fitzgerald in Clarkson, 1991). Tako lahko iz Hg<sup>2+</sup> nastanejo: metil-Hg, dimetil-Hg, HgS(s), HgHS<sub>2</sub><sup>-</sup>, FeS(s), HgS<sup>(0)</sup>, Hg(SH)<sub>2</sub>, Hg-DOM, Hg-POM (Steinlin in Huang, 2008; Barkay in sod., 2003; Ravichandran, 2004). S procesom redukcije se Hg<sup>2+</sup> reducira v Hg<sup>0</sup>. Raztopljeni Hg<sup>0</sup> je hlapen in lahko preide iz vode v zrak, lahko se adsorbira v zemlji, sedimentih, humusnih snoveh ali pa se nazaj

oksidira v  $Hg^{2+}$ . Poleg  $Hg^0$  lahko v zrak difundira tudi dimetil-Hg. Oba se z reakcijo katalize z ozonom pretvorita v  $Hg^{2+}$ , ki vstopi nazaj v vodo in zemljo (Slika 2) (Barkay in sod, 2003; Steinlin, 2008).



Slika 1: Porazdelitev živega srebra na zemlji brez vpliva človeka (naravna porazdelitev Hg) (B) in ob delovanju človeka (A) (Mercury..., 2013)



Slika 2: Biogeokemijski cikel živega srebra (Steinlin in Huang, 2008: 3)



Slika 3: Znane možnosti vezave raztopljene oblike Hg (ionski Hg) v naravi z anorganskimi in organskimi snovmi ter njegove pretvorbe (Fitzgerald in Clarkson, 1991: 162)

# 2.1.2.1 Redukcija Hg<sup>2+</sup>

Redukcija  $Hg^{2+}$  poteka v vodi in prsteh. Ker je  $Hg^0$  slabo topen v vodi in zelo hlapen, je proces redukcije ključen pri prenosu Hg v zrak. Živo srebro, ki se nahaja v dežnih in snežnih padavinah, je zelo dostopno za redukcijo (Vandal in sod., 1991). Redukcija  $Hg^{2+}$  in nadaljni prenos  $Hg^0$  v atmosfero, je ključni dejavnik za preprečevanje procesa metilacije v prsti in s tem nalaganja najbolj toksične oblike živega srebra (metil-Hg) po prehranjevalni verigi (Barkay in sod., 2003). V ekvatorialnih vodah, bogatih s hranili, je bilo ugotovljeno, da koncentracije  $Hg^0$  korelirajo z biološko produktivnostjo (Kim in Fitzgerald, 1986). Okolja, močno kontaminirana s  $Hg^{2+}$ , so bogata z rezistentnimi bakterijami, ki vsebujejo *mer* operon (Nazaret in sod., 1994). Tako imajo najpomembnejšo vlogo pri redukciji Hg bakterije z rezistenčno determinanto *mer* operon. Poleg bakterij so redukcije  $Hg^{2+}$  sposobne tudi nekatere alge s posebnim mehanizmom, ki je bodisi odvisen bodisi neodvisen od svetlobe (Ben-Bassat in Mayer, 1978; Devars in sod., 2000).

Med železo oksidirajočimi acidofilnimi tiobacili se je razvila redukcija  $Hg^{2+} v Hg^{0}$ , ki poteka s pomočjo  $Fe^{2+}$  iona (Iwahori in sod., 2000; Takeuchi in sod., 1999). Ugotovljeno je bilo, da pri redukciji sodeluje Hg rezistentna citokrom c oksidaza, ni pa jasno, če pri tem sodeluje še kateri drug encim, ki je sicer udeležen pri oksidaciji železa (Iwahori s sod., 2000). Stopnja rezistence sevov s tovrstnim mehanizmom rezistence je 10 - 100x manjša od rezistence zapisane na *mer* operonu (Takeuchi in sod., 1999), toda kljub temu so ti sevi še vedno veliko bolj odporni na  $Hg^{2+}$ , kot na Hg občutljivi sevi (sevi brez enega ali drugega mehanizma rezistence) (Sugio in sod., 2001; Takeuchi in sod., 1999). Omenjeni način redukcije stimulirata  $Fe^{2+}$  in rusticianin, inhibira pa ga cianid, kar kaže na to, da se  $Hg^{2+}$  reducira na koncu dihalne verige, kjer se pri normalnem procesu prenesejo elektroni iz  $Fe^{2+}$  na kisik (Sugio in sod., 2003).

## 2.1.2.2 Oksidacija Hg<sup>0</sup>

Oksidacija  $Hg^0 v Hg^{2+}$  poteka v zraku (Lindberg in sod., 2002), vodah (Siciliano in sod., 2002) in zemlji (Thöming in sod., 2000). Oksidacija  $Hg^{2+} v$  zraku poteka s fotooksidacijo, ki jo lahko povzročajo O<sub>2</sub> ob prisotnosti klorida (de Magalhães and Tubino, 1995), vodikov peroksid in ozon (Munthe, 1992; Seigneur in sod., 1994), sulfhidrilne spojine (Yamamoto, 1995), prosti radikali BrO\*, Br\* in Cl\* (Ebinghaus in sod., 2002; Lindberg in sod., 2002) in UV-B ob prisotnosti C1 ter fotoreaktivne spojine, kot je benzokinon (Lalonde in sod., 2001). Oksidacija v temi običajno poteka s kisikom ob prisotnosti klorida (Amyot in sod., 1997; Barkay in sod., 2003).

Manj je znanega o oksidaciji  $Hg^0$  v vodah in zemlji, kjer proces oksidacije, preko naraščajočih koncentracij  $Hg^{2+}$ , pomembno posredno vpliva na produkcijo metil-Hg. V vodah naj bi  $Hg^0$  izginjal predvsem z oksidacijami in manj z izhlapevanjem (Amyot in sod., 1997; Lalonde in sod., 2001).

Mikroorganizmi, za katere je znano, da lahko oksidirajo Hg so: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *Streptomyces*, *Citrobacter* sp., *B. subtilis* in *B. megaterium.*, pri čemer imata *Bacillus* in *Streptomyces* največjo oksidazno aktivnost. Oksidacija ne poteka z encimi, ampak je običajno rezultat interakcije Hg z metabolnimi produkti. Smith in sod. (1998) so pokazali, da lahko oksidacija pri *E. coli* poteka z bakterijskimi hidroperoksidazami KatG in manj pogosto tudi s KatE. Ugotovljeno je bilo, da je stopnja oksidacije Hg<sup>0</sup> pri bakterijah brez *mer* operona, 10x nižja od stopnje redukcije pri bakterijah z *mer* operonom (Hamlett in sod., 1992).

#### 2.1.2.3 Pretvorbe HgS

V naravi živo srebro prevladuje v obliki HgS (Gavis in Ferguson, 1972), ki je slabo topen in kemijsko ter fizikalno zelo stabilen. Kljub temu se predvideva, da se lahko majhne količine HgS v naravi pretvorijo v biološko dostopne oblike Hg (Fagerström in Jernelöv, 1971).

#### 2.1.2.3.1 Ekstrahiranje živega srebra iz sedimentov

Kovine se lahko estrahira iz sedimentov z dodajanjem enega ali več ekstrahantov zaporedno. Najpogosteje uporabljen ekstrahant za določitev frakcije kovin je redčena HCl, ki raztopi različne oksidirane železove in manganove faze iz sedimenta skupaj s kovinami v sledovih, vezanih na omenjene faze (Huerta-Diaz in Morse, 1990; Huerta-Diaz in Morse, 1992). V anaerobnih razmerah HCl ekstrahira tudi železovo monosulfidno fazo. Ekstrakcija živega srebra s HCl je bila preučevana v različnih študijah na zelo različne načine. HCl z majhno molarnostjo je bil uporabljen pri ekstrakciji Hg, povezanega z Fe in Mn oksidi, kjer so dokazali vpletenost Hg v železo oksidacijsko-redukcijskem ciklu v obalnih sedimentih (Cossa in sod., 1994). Z uporabo 1 M HCl za ekstrakcijo FeS in povezanih kovin v sledovih so določevali stopnjo piritizacije kovin v sledovih, vključno s Hg, v anoksičnih morskih sedimentih (Huerta-Diaz in Morse, 1992). Di Toro in sod. (1992) so predpostavili, da lahko biološko dostopnost in potencialno toksičnost težkih kovin v anaerobnih sedimentih ocenimo iz razmerja med kislo hlapnimi sulfidi in ekstrahiranimi kovinami. Pri sedimentih kjer so koncentracije ekstrahiranih kovin večje od koncentracij kislo hlapnih sulfidov, lahko ob

odsotnosti drugih vezavnih mest, izmerimo okoljsko signifikantne koncentracije določene kovine. Kovine, ki delujejo po tem modelu so Ni, Zn, Cd, Cu in Hg.

Študija vpliva HCl na ekstrahiranje Hg iz sedimentov, ki so vsebovali različne količine kislo hlapnih sulfidov (sulfidi ekstrahirani iz sedimenta s HCl, večinoma je to FeS), je pokazala, da Hg topen v 1 M HCl lahko reagira s H<sub>2</sub>S, ki se sprosti iz kislo topnih sulfidov in precipitira v HgS. Pri višjih koncentracijah HCl (2-6 M) je precipitacija HgS(s) manjša kot pri 1 M HCl, iz česar sledi, da je tvorba HgS(s) v raztopini odvisna od dodane koncentracije HCl. V HCl topna Hg frakcija v sedimentih je pri 1 M HCl zelo majhna (THg 1-5 %) v primerjavi s 6 M HCl (THg 50-60 %) (Mikac in sod., 2000). Nadaljne raziskave so pokazale, da v 1 M HCl ni topen niti cinabarit niti metacinabarit, medtem ko se je v 6 M HCl metacinabarit raztapljal zelo učinkovito (več kot 90 %), sledil mu je kristalni metacinabarit (več kot 70 %) in nazadnje še cinabarit, ki pa se slabo raztaplja v 6 M HCl (le 15 %). Topnost HgS v 6 M HCl je odvisna od njegove koncentracije in eksponentnega razmerja med količino HgS in volumnom 6 M HCl. Pri višjih koncentracijah HgS (10 mg v 20 ml kisline), je bila ugotovljena manjša topnost. Pri ekstrakciji Hg iz naravnih sedimentov je bilo ugotovljeno, da 6 M HCl ne more biti uporabljena za ekstrahiranje reaktivnega Hg in da se z njo ne da napovedati biološke dostopnosti Hg v sedimentih s HgS (Mikac in sod., 2002). Topnost cinabarita v HCl raztopini lahko povečajo dodani nitrati in Mn oksidi (Fernández-Martínez in Rucandio, 2005).

Poleg kloridnih spojin, železa, Mn oksidov, lahko na zmožnost ekstrakcije HgS v zemlji vplivajo še spojine kot so: jodidne spojine (KI), sulfati, nitrati in kovine, ki tekmujejo s Hg za vezavna mesta (npr. Cu<sup>2+</sup>) (Fernández-Martínez in Rucandio, 2005).

Uporaba HCl v kombinaciji z FeCl<sub>3</sub> se je izkazala tudi kot zelo učinkovita v procesu čiščenja s Hg kontaminiranih sedimentov v Minamata zalivu. Več kot 85 % Hg v sedimentu z 0,11–37,4 mg/kg Hg je bilo učinkovito ekstrahiranega s 3 M HCl in 74 mM FeCl<sub>3</sub>. Kemijskemu luženju Hg iz sedimenta je sledila še bakterijska transformacija Hg v hlapno obliko Hg s procesom redukcije, s čimer je bilo iz sedimenta učinkovito odstranjeno tudi metil živo srebro (Nakamura in sod., 1999).

V manj kontaminiranih vzorcih, kjer prisotnosti HgS ne moremo identificirati z direktnimi metodami (npr. absorpcijska spektroskopija z X žarki), se uporabljajo ekstrakcije za indirektno določitev deleža Hg v obliki HgS. Za ekstrakcijo različnih faz sedimenta in Hg, vezanega na te faze, se uporabljajo različne koncentracije HNO<sub>3</sub> (0,01–14 M). Zelo redčena HNO<sub>3</sub> (0,01 M) je bila uporabljena pri ekstrakciji kislo topnega Hg iz rečnih sedimentov (Wallschläger in sod., 1998), 4 M HNO<sub>3</sub> pa je bila

uporabljena pri določanju mobilne frakcije Hg (elementaren Hg, labilen in s karbonatom povezan Hg) v obalnih sedimentih (Fabbri in sod., 2001). Revis in sod. (1989) so uporabili 12 M HNO<sub>3</sub> za odstranitev vseh Hg spojin (Hg oksidov, kloridov, amalgamov in organskih spojin) razen HgS iz zemlje. Koncentrirana HNO<sub>3</sub> je bila uporabljena tudi pri ekstrakciji Hg vezanega na organsko snov v rečnih sedimentih (Martín-Doimeadios in sod., 2000). Bloom in sod. (2003) so uporabili 12 M HNO<sub>3</sub> za odstranitev ostankov ne-cinabaritnih oblik Hg. Pri vseh uporabah HNO<sub>3</sub> se je izkazalo, da le-ta nima vpliva na ekstrakcijo HgS. Pri nobeni od uporabljenih koncentracij HNO<sub>3</sub> (1–14 M HNO<sub>3</sub>) nista bila topna niti cinabarit niti metacinabarit kot čisti spojini (Mikac in sod., 2003).

#### 2.1.2.3.2 Oksidacija HgS

HgS se lahko oksidira kemijsko z raztopljenim O<sub>2</sub>. Stopnja oksidativnega raztapljanja HgS z raztopljenim O<sub>2</sub> v reaktorjih narašča s hitrostjo mešanja (Barnett in sod., 2001). Stopnjo oksidacije se lahko meri z meritvijo produkcije  $SO_4^{2^2}$ . Stopnja raztapljanja cinabarita je 2,64 do 6,16 µmol ( $SO_4^{2^2}$ )/m<sup>2</sup> na dan, metacinabarita pa 1,2 do 1,9 µmol ( $SO_4^{2^2}$ )/m<sup>2</sup> na dan. Toda z metodo ATR-IR spektroskopijo so našli na površini HgS še spojino  $S_2O_3^{2^2}$ , kar kaže na to, da samo z meritvami  $SO_4^{2^2}$  ni mogoče realno oceniti stopnje raztapljanja minerala. Stopnja sproščenega Hg med raztapljanjem je bila več kot 2x manjša kot produkcija  $SO_4^{2^2}$ , toda še vedno signifikantna. Med raztapljanjem cinabarita in metacinabarita se Hg mobilizira in tvori kompleks Au-Hg (amalgam), preostali pa se adsorbira nazaj na raztapljajoči se HgS (Holley in sod., 2007). Količina Hg, ki se sprosti v raztopino je 1–3x manjša od količine Hg<sup>2+</sup>, ki se nazaj adsorbira na površino raztapljajočega se HgS (Barnett in sod., 2001).

Cinabarit se v kislih pogojih lahko oksidira tudi z Fe<sup>3+</sup>. Že leta 1975 so Burkstaller in sod. demonstrirali kako Fe<sup>3+</sup> pri koncentracijah, ki se pojavljajo v kisli vodi iz rudniških drenaž, signifikantno oksidira cinabarit. Prisotnost FeCl<sub>3</sub> (Mikac in sod., 2003) in tudi drugih halidnih spojin (Fernández-Martínez in Rucandio, 2005) poveča topnost cinabarita in metacinabarita, še posebno ob uporabi koncentrirane HNO<sub>3</sub>. Ker do podobnega učinka ni prišlo ob prisotnosti FeOOH, sklepajo, da je za topnost HgS odgovoren Cl in ne Fe<sup>3+</sup>. Domnevo so potrdili rezultati, kjer je dodatek nizke koncentracije klorida koncentrirani HNO<sub>3</sub> sprožil delno (Cl > 10<sup>-4</sup> M) ali popolno (Cl >  $10^{-2}$  M) raztapljanje HgS. Učinek klorida na cinabarit je precej manjši kot na metacinabarit. Ekstrakcija HgS s koncentratirano HNO<sub>3</sub> v prisotnosti sedimentov različnih slanosti je pokazala, da se količina raztopljenega HgS povečuje s povečevanjem slanosti (sladka voda, estuarcijska voda, morska voda), kar potrdi, da klorid vpliva na raztapljanje HgS (Mikac in sod., 2003).

## 2.1.2.4 Živo srebro vezano na raztopljeni organski material

Znano je, da raztopljeni organski material (DOM), ki je povsod navzoč v vodnem ekosistemu, močno veže kovine v sledeh in s tem vpliva na njihovo speciacijo, topnost, mobilnost in toksičnost. Tako DOM v vodnem okolju močno ragira tudi z živim srebrom, s čimer vpliva na njegovo speciacijo, biološko dostopnost, transport in transformacije (Loux, 1998). Živo srebro tvori močno ionsko vez z reduciranimi žveplovimi mesti v zemlji in vodnem organskem materialu. Močna kompleksacija omogoča živemu srebru prenos iz sedimentov in zemlje v reke, jezera in podzemne vode (Wallschläger in sod., 1996; Mierle in Ingram, 1991).

Približno 20 % DOM je sestavljenega iz ogljikovih hidratov, karboksilnih kislin, aminokislin, vodikovih ogljikov in drugih spojin. Ostalih 80 % DOM sestavljajo humične kisline, ki so sestavljene iz kompleksne mešanice ostankov razgradnje rastlin in živali (Leenheer in Croué, 2003). 80–90 % humičnih snovi sestavljajo hidrofobne in hidrofilne kisline, ki so najbolj reaktivne frakcije pri vezavi kovin v sledovih. Sestava in struktura DOM se sicer močno razlikuje med zemeljskim, rečnim in morskim okoljem (Malcolm, 1990).

Živo srebro in ostale kovine v sledovih se v organskih snoveh vežejo na kisla mesta. Najpogosteje uporabljene kisle funkcionalne skupine v DOM so: karboksilne skupine, fenoli, amonijevi ioni, alkoholi in tioli. Kar 90 % kislosti organskim snovem zagotavljajo tioli in karboksline kisline. Živo srebro naj bi se najraje vezalo na tiole in druge skupine, ki vsebujejo žveplo, ki so v organskih snoveh prisotne le v sledovih. Kovine v obliki kationov, za katere je značilna hitra kompleksacija, uvrščamo v skupino »mehkih kovin«, z zelo polariziranimi elektroni na svojem zunanjem ovoju. »Mehke kovine« se rade vežejo z ligandi kot so žveplo, elektronegativni halidi in dušik, pred ligandi, ki vsebujejo kisik. Močne interakcije med Hg in organskimi snovmi v zemlji in vodi, so posledica vezave Hg na funkcionalne skupine, ki vsebujejo žveplo (Ravichandran, 2004).

Žvepla je v organskih snoveh malo, le 0,5–2 % skupne teže. Pojavlja se v oksidirani (sulfonati, sulfati) in reducirani obliki (sulfidi, tioli). Živo srebro se veže le na reducirana žveplova mesta, saj je konstanta stabilnosti, v primerjavi z vezavo na oksidirana žveplova mesta, mnogo večja. Na splošno velja, da imajo hidrofobne kislinske frakcije DOM (vsebujejo humične in fulvične kislinske frakcije) signifikantno več reduciranega žvepla kot nizko molekularne hidrofilne frakcije. Vse te ugotovitve tudi podprejo tezo, da se v vodnem okolju živo srebro najraje veže z raztopljenimi humičnimi snovmi (Mierle in Ingram, 1991).

V naravnem vodnem okolju je razmerje med reduciranim žveplom in celokupnim Hg  $1,2 \ge 10^4 - 1,2 \ge 10^5$ . Tudi, če upoštevamo, da je le majhna frakcija reduciranega žvepla dostopna za vezavo Hg, količina močnih vezavnih mest v organskih snoveh, močno preseže količino dostopnega Hg v naravnih vodnih ekosistemih (Ravichandran, 2004). V okolju, kjer Hg izvira iz vode in zemlje in se skupaj z raztopljenim organskim ogljikom (DOC) prenaša po okolju, so koncentracije Hg in DOC v medsebojni korelaciji (Wallschläger in sod., 1996). V okolju, kjer pa Hg izvira iz zraka pa ni nujno, da pride do te korelacije. Na korelacijo vplivajo strukturne in kemijske lastnosti DOM ter prisotnost drugih kompetitivnih ionov v vodi, ki vplivajo na reaktivnost DOM s Hg (Babiarz in sod., 2001).

Organske snovi lahko tudi povečajo topnost cinabaritu z reakcijo:  $HgS + H \leftrightarrow Hg^{2+} + HS^{-}$ . Npr. merkaptoacetilna kislina (HS-CH<sub>2</sub>-COOH), ki vsebuje tiolno skupino, ima veliko sposobnost raztapljanja cinabarita. Ligandi, ki vsebujejo le ligande s kisikom, brez žvepla, raztopijo zelo malo cinabarita ali pa sploh nič. DOM ima v primerjavi z merkaptoacetilno kislino večjo afiniteto za vezavo Hg, zato lahko inhibira precipitacijo metacinabarita z merkaptoacetilno kislino (Ravichandran in sod., 1998).

DOM tudi posredno vpliva na tvorbo toksičnega metil-Hg. Kompleksacija DOM s  $Hg^{2+}$  onemogoči  $Hg^{2+}$ , da bi se metiliral in bioakumuliral (Barkay in sod, 1997). Frakcije humičnih in fulvičnih kislin iz DOM sodelujejo pri redukciji ionskega Hg v hlapen Hg in s tem povečajo izhajanje Hg iz vode in zemlje v zrak (Alberts in sod., 1974). DOM poveča tvorbo  $Hg^{0}$  iz  $Hg^{2+}$  s fotokemijsko reakcijo (Ravichandran, 2004) in s tem zmanjša dostopnost Hg za metilacijo in bioakumulacijo.

Na speciacijo kovin v vodnem okolju vplivajo anorganski in organski ligandi prisotni v vodi. Kompleksacija kovine z ligandom je odvisna od koncentracije kovine in koncentracije liganda ter jakosti vezave kovine z ligandom (konstante stabilnosti). V vodnem okolju so za speciacijo Hg med anorganskimi ligandi pomembni hidroksidi, kloridi in sulfidi (tvorijo najmočnejše vezi s Hg) (Ravichandran in sod., 1999). Ob odsotnosti kateregakoli pomembnega helatorja, Hg tvori Hg-hidroksidne komplekse (Hg(OH)<sub>2</sub>, HgOH<sup>+</sup>). Pri nizkem pH in visokih koncentracijah kloridov, Hg tvori živosrebrove kloridne komplekse (HgCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>). V vodah, ki vsebujejo raztopljene sulfide Hg tvori živosrebrove-sulfidne spojine (Benoit in sod., 2001). Med organskimi ligandi, žveplovi ligandi vežejo živo srebro veliko močneje kot kisikovi ligandi (Ravichandran, 2004).

Anorganski sulfidi zelo močno vežejo živo srebro in zato imajo pomembno vlogo pri speciaciji Hg v anoksičnem okolju. Živo srebrov speciacijski model izračunan kot

funkcija koncentracij sulfidov in pH predpostavlja, da so  $HgS_{aq}^{0}$ ,  $Hg(S_{2}H)^{-}$ ,  $Hg(SH)_{2}^{0}$  in HgS<sub>sol</sub> najpomembnejše oblike Hg kompleksov. Konstante stabilnosti so:

- $Hg^{2+} + HS^{-} \leftrightarrow HgS^{0}_{aq} + H^{+}$   $K = 10^{26,5}$   $Hg^{2+} + 2HS^{-} \leftrightarrow Hg(S_{2}H)^{-} + H^{+}$   $K = 10^{32,0}$   $Hg^{2+} + 2HS^{-} \leftrightarrow Hg(SH)_{2}^{0}$   $K = 10^{37,5}$

Ob primerjavi konstant stabilnosti za anorganske Hg-S komplekse, so konstante stabilnosti za Hg-DOM komplekse precej manjše.

•  $\operatorname{Hg}^{2+} + \operatorname{RS}^{-} \leftrightarrow \operatorname{HgRS}^{+} \qquad K = 10^{22,1}$ 

Zaradi nizke Hg-DOM konstante stabilnosti, mnogo študij predpostavlja, da je speciacija Hg v anoksičnih pogojih kontrolirana s sulfidom in ne z DOM (Benoit in sod., 2001).

Pri visokih koncentracijah Hg<sup>2+</sup> lahko poleg mikroorganizmov in fotolize, tudi humične snovi povzročijo redukcijo Hg<sup>2+</sup> v Hg<sup>0</sup>. V tem primeru na redukcijo Hg vplivajo koncentracije raztopljenega kisika in klorida ter pH. V abiotskem okolju brez svetlobe, ob prisotnosti humičnih snovi, pri nizkih koncentracijah Hg, do redukcije Hg ne pride. Pri nizkem pH, je DOC manj negativno nabit in zato težje veže Hg, pri čemer ga več ostane dostopnega za metilirajoče bakterije (Miskimmin in sod., 1992; Barkay in sod., 1997; Haitzer in sod., 2003, Kelly in sod., 2003).

## 2.1.2.5 Živo srebro v Idrijci

V Idriji se nahaja rudnik živega srebra, ki je drugi največji tovrstni rudnik na svetu. Deloval je 500 let in v njem je bilo pridelanih več kot 140.000 ton Hg (Gosar in sod., 1997). Zaradi rudarjenja je Idrija z okolico močno onesnažena s Hg. Še v času aktivnega taljenja rude, se je na dan sprostilo po 20 kg Hg iz talilniškega rudnika. Koncentracije Hg v zemlji se gibljejo med 0,005 mg/kg pa vse do 100 mg/kg (Biester in sod., 1999), medtem ko so koncentracije Hg v sedimentih reke Idrijce celo do 1000 mg/kg (Gosar in sod., 1997). Celokupne koncentracije THg v vodi se nad rudnikom živega srebra gibljejo med 2,8 in 6,9 ng/l, ob viru onesnaženja pa do 200 ng/l. Od vira onesnaženja navzdol se gibljejo med 10 in 60 ng/l po Idrijci in Soči in dosežejo najmanjše koncentracije v morju (med 0,2 in 2 ng/l) (Horvat in sod., 2002).

Večina Hg, ki se nahaja v reki je posledica erozije materiala iz rudnika, nekaj tudi iz zraka in zemlje. Med delovanjem rudnika se je veliko rudniškega materiala spiralo direktno v reko in le-ta se še vedno prenaša po reki Idrijci in naprej po Soči vse do Jadranskega morja.

V reki Idrijci sta prevladujoči obliki živega srebra v rečnih sedimentih in reki HgS, ki mu sledi Hg<sup>0</sup> (Kocman in sod., 2004). Ti dve obliki živega srebra sta biološko nedostopni (Ravichandran in sod., 1998). Toda v Idrijci sta HgS in Hg<sup>0</sup> vključena v biogeokemijski cikel živega srebra, pri čemer se s pomočjo bioloških in kemijskih procesov pretvarjata v biološko dostopne oblike živega srebra. Koncentracije metil-Hg v reki ne kažejo enakega trenda. Poleg rudnika so namreč koncentracije manjše (med 0,1 in 0,2 ng/l) kot po reki navzdol (0,05–0,53 ng/l) in v morju (0,06–0,08 ng/l). Tudi koncentracije metil-Hg v sedimentu nimajo enakega trenda kot THg. Visoke koncentracije metil-Hg se pojavljajo v sedimentu z glineno frakcijo in frakcijo mulja. Koncentracije metil-Hg v mulju in glini so nad rudnikom okrog 5 µg/g in narastejo na vrednost 700 µg/g pod rudnikom (Horvat in sod., 2002). Poleg meritev Hg v sedimentih in vodi, so bile merjene tudi koncentracije Hg v živih organizmih. Meritve so pokazale, da so THg koncentracije v živih organizmih (algah, perifitonu in nevretenčarjih) v korelaciji s THg v sedimentih in vodi (Žižek in sod., 2007).

HgS se v Idrijci v največji meri akumulira v grobo strukturiranih sedimentih poplavnih ravnic in v povprečju sestavlja več kot 80 % THg. Ne-cinabaritne frakcije Hg se bogatijo na področjih, kjer se kopiči fini material in dosežejo do 60 % THg (Biester in sod., 2000). Ne cinabaritna frakcija Hg (Hg topen v vodi, topen v kislinah in vezan na organsko snov) je v pozitivni korelaciji s hlapnim Hg<sup>0</sup>, zaradi česar se predpostavlja, da ravno ta frakcija vpliva na mobilnost in biološko dostopnost Hg (Kocman in sod., 2004).

## 2.2 BIOSENZORJI

Onesnaženje okolja s težkimi kovinami se običajno ugotavlja s kemijskimi analizami po tretiranju vzorcev z močnimi kislinami. Toda slabost kemijskih metod je, da ne ločijo med biološko dostopno in biološko nedostopno frakcijo kovin. Le biološko dostopne frakcije težkih kovin so nevarne za organizme (Ivask in sod., 2001). Biološko dostopna frakcija je definirana kot raztopljena ekstrahirana frakcija (npr. s šibkimi kislinami) iz celokupne koncentracije (Stone in Marsalek, 1996). Biološko dostopnost so določevali že na različne načine. Stone in sod. (2011) so si kot posredni indikator biološke dostopnosti Hg izbrali meritve akumuliranega Hg v zooplanktonu in mišicah rib. Drugi

so uporabili celokupne koncentracije metil-Hg kot meritve biološko dostopnega Hg (Regnell in Tunlid, 1991). Nobena od teh metod ne pokaže mikroorganizmom dostopne frakcije Hg. Nobena analitska metoda ne loči biološko dostopnih oblik Hg (Rasmussen in sod., 2000).

#### 2.2.1 Biosenzorji, ki temeljijo na bioluminiscenci

Bioluminiscentni biosenzorji temeljijo na genetsko modificiranih mikroorganizmih, ki so skonstruirani s fuzijo *lux* genov z inducibilnim promoterjem za testiranje toksičnosti in biološke dostopnosti.

Mikrobni biosenzorji, ki temeljijo na emisiji svetlobe iz bioluminiscentnih bakterij, se uporabljajo kot občutljivi, hitri in neinvazivni postopki v mnogih bioloških sistemih (Burlage in Kuo, 1994). V naravi najdemo bioluminiscentne bakterije v vseh habitatih od morskega (Vibrio fischeri) do kopenskega (Photorhabdus luminiscens). Po večini so bioluminiscentni biosenzorji skonstruirani z gensko modificiranimi mikroorganizmi. Najpogosteje se uporabljajo za monitoring organskih onesnaženj, pesticidov in težkih kovin. Gensko modificirani mikroorganizmi imajo vstavljen plazmid z zapisom genov za luciferazo, ki so regulirani s promoterjem, ki prepozna analit, ki ga merimo. Ko tako modificiran mikroorganizem metabolizira organski polutant, se sproži promoter in začne se sinteza luciferaze, ki oddaja svetlobo, ki jo lahko izmerimo z luminometrom. Enostavna detekcija transkripcijske aktivacije je omogočena s fuzijo promoterskega elementa z reporterskimi geni. Uporaben reporterski sistem odgovoren za emisijo svetlobe je sestavljen iz 5 strukturnih genov, v zaporedju luxCDABE, kloniranih iz bioluminiscentnega operona bakterije Vibrio fischeri. luxCDE geni kodirajo multiencimski maščobno kislinski reduktazni kompleks s proteini (reduktaza, transferaza in sintetaza), ki sintetizirajo substrat za luciferazo z uporabo prekurzerjev iz maščobnokislinskega cikla. *luxAB* gena pa kodirata luciferazo (Meighen, 1991; Rasmussen in sod., 2000).

Reporterski geni, ki se uporabljajo pri bioluminiscentnih biosenzorjih so lahko zelo različni. Narejena je bila medsebojna primerjava različnih reporterskih genov, na podlagi spodnje meje detekcije in hitrosti odgovora. Primerjani so bili sledeči geni: luciferaza kresničke (*Photinus pyralis, lucFF*), bakterijski luciferazni operon (*Photorhabdus luminescens, luxCDABE*), zeleni fluorescentni protein (*Aequorea victoria gfp*) in rdeči fluorescentni protein (*Discosoma* sp. *Dsred*). Reporterski geni so bili vključeni v plazmid pod kontrolo *mer* promoterja (za živo srebro) ali pa *ars* promoterja (za arzenit). Izkazalo se je, da najnižjo mejo detekcije analita in najhitrejši

odgovor zagotovijo reporterski geni *lucFF* in *luxCDABE*. Zeleni in rdeči fluorescentni protein sta se odzivala po veliko daljšem inkubacijskem času in pri bistveno višjih koncentracijah analita (Hakkila in sod., 2002).

### 2.2.1.1 mer-lux biosenzor

Tovrstni biosenzorji imajo združene gene med regulatorno regijo *mer* operona (*merR*) in bakterijskimi luminiscentnimi geni (*luxCDABE*), ki kvantitativno odgovarjajo na Hg<sup>2+</sup> (Selifonova in sod., 1993; Barkay in sod., 1997). *Mer* promoter se aktivira z vezavo Hg<sup>2+</sup> na MerR, pri čemer pride do transkripcije *lux* genov in nenazadnje emisije svetlobe, ki jo lahko izmerimo z luminometrom. Odgovor je kvantitativen. Pri višjih koncentracijah Hg<sup>2+</sup>, je *mer* promoter aktiviran močneje in pride do večjih emisij svetlobe. Spodnja meja detekcije tovrstnega senzorja je bila celo 1,4 ng Hg<sup>2+</sup>/l (Rasmussen in sod., 1997). Ravno meja detekcije je ključni faktor delovanja biosenzorja in je pogosto vir težav (Virta in sod., 1995). Tovrstne biosenzorje so uporabili tako za meritve biološko dostopnega Hg v vodah kot tudi v zemlji (Ivask in sod., 2002).

Najpogosteje pri genetskih modifikacijah uporabijo *lux* gene iz bakterij skupine *Vibrio*. Obstaja pa tudi možnost genetsko modificirati bakterije z genom prenešenim iz evkariontske celice. Tako so namreč iz kresničke prenesli gene za luciferazo in jih vgradili za *mer* promoterjem transpozona Tn21 in nov genetski konstrukt vstavili v *E. coli* MC1061. Tako delujoči senzor je imel spodnjo mejo detekcije pri 0,1 tM (Virta in sod., 1995).

## 2.2.1.1.1 Mer operon

*Mer* operon je natančno reguliran genetski sistem sestavljen iz 4–5 strukturnih genov, ki kodirajo transport in transformacije Hg, ter regulatornih genov. MerP protein je sestavljen iz 72 amino kislin, ki vežejo Hg<sup>2+</sup> preko dveh cisteinskih ostankov. To je prvi mer-specifični protein s katerim se sreča Hg<sup>2+</sup> med njegovim vstopom v celico (Hamlett in sod., 1992). MerP nato reagira z notranjim membranskim proteinom MerT, ki je sestavljen iz 116 aminokislin, ki tvorijo 3 transmembranske helikse in 2 cisteinska para. Proksimalen par, lociran na prvem transmembranskem heliksu, sprejme Hg<sup>2+</sup> od MerP (Morby in sod., 1995) in reagira z distalnim MerT cisteinskim parom, ki je nameščen na prvi citoplazemski zanki, da se Hg<sup>2+</sup> prenese skozi notranjo membrano (Brown in sod., 2002). Znotraj celice se Hg<sup>2+</sup> lahko direktno veže z N-terminalnim cisteinskim parom encima ali pa se veže na nizko molekularen sulfhidrilni agens (npr. glutation). Še dva proteina, ki sta vključena v transmembranski transport Hg<sup>2+</sup>, sta MerC in MerF, katerih

gena se nahajata le v *mer* operonih nekaterih mikroorganizmov, običajno med *merP* in *merA* genoma (Barkay in sod., 2003). MerC in MerF pomembno prispevata k rezistenci proti  $Hg^{2+}$  ob odstotnosti MerT, saj oba omogočata vezavo  $Hg^{2+}$  na izolirane membranske vezikle (Sahlman in sod., 1997; Wilson in sod., 2000). Pri nekaterih *mer* operonih se za genom *merD* pojavi tudi majhen odprt bralni okvir, *merE*. Predvideva se, da ima vlogo transporta čez notranjo membrano (Barkay in sod, 2003).

Glavni gen *mer* operona, ki omogoča rezistenco proti  $Hg^{2+}$ , je *merA* gen. MerA protein je encim živosrebrova reduktaza, ki deluje kot dimer. Vsak MerA protein je sestavljen iz treh domen. Analiza tridimenzionalne strukture je pokazala, da je aktivno mesto sestavljeno iz interakcije med centralno domeno ene podenote s C-terminalno domeno druge podenote. Centralna domena je sorodna veliki skupini piridin nukleotid disulfid oksidoreduktaz, kot je glutation reduktaza. Na tem mestu se zgodi kataliza, prenos dveh elektronov iz NADPH preko FAD na  $Hg^{2+}$  in redoks aktiven cisteinski par igra pomembno vlogo pri prenosu naboja (Engst in Miller, 1999). Na nasprotnem koncu se nahaja N-terminalna domena, NmerA, katere sekvenca je močno homologna aminokislinski sekvenci proteina MerP. Reduktaze se med mikroorganizmi razlikujejo po številu NmerA. Vloga NmerA je prenos  $Hg^{2+}$  na aktivno mesto. Domneva se, da je NmerA pomembna v celicah z nizko koncentracijo sulfhidrilnih agensov, kjer je dovod tioliranega  $Hg^{2+}$  na aktivno mesto omejen (Barkay in sod., 2003).

Rezistenco proti organoživosrebrovim spojinam (metil-Hg) in sintezo  $Hg^0$  iz le teh omogoča organoživosrebrova liaza, zapisana z genom *merB*. Liaza je zapisana na plazmidu R831b. Liaza je encim, ki katalizira protonolizo C-Hg vezi v mnogih alkilnih in arilnih živosrebrovih spojinah, pri čemer nastane reduciran organski del (v primeru metil-Hg, CH<sub>4</sub>) in  $Hg^{2+}$  (Begley in sod., 1986).  $Hg^{2+}$  se nato reducira z živosrebrovo reduktazo (MerA), v hlapen  $Hg^0$ .

Protein MerG, ki ni prisoten v vseh *mer* operonih, naj bi povečeval odpornost proti organskim Hg spojinam pri bakterijah brez proteina MerB (Barkay in sod., 2003). *merG* kodira periplazemski protein, ki zaščiti celice pred herbicidom fenilživosrebro, najverjetneje z zmanjšanjem celične permeabilnosti za organoživosrebrove spojine (Kiyono in Pan-Hou, 1999).

Ekspresija *mer* operona je kontrolirana z regulatornima proteinoma MerR in MerD in s koncentracijo  $Hg^{2+}$  (Brown in sod., 2003). Ob odsotnosti  $Hg^{2+}$  je *mer* operon zavrt, ob prisotnosti  $Hg^{2+}$  pa se *mer* operon inducira. Koncentracije  $Hg^{2+}$ , ki lahko inducirajo *mer* operon, določene na podlagi *in vivo* in *in vitro* študij, so v nanomolarnem območju. Z uporabo posebnega biosenzorja (rmer) in natančno kontrolo pogojev pri poskusu, so

bile izmerjene celo subpikomolarne koncentracije  $Hg^{2+}$  (Golding in sod., 2002; Kelly in sod., 2003). Ob tako nizkih koncentracijah indukcija ne more biti učinkovita kljub prisotnosti aktivne živosrebrove reduktaze (Yu in sod., 1996).

MerR je glavni regulatorni element rmer sistema, ki zavre svojo transkripcijo in regulira transkripcijo strukturnih genov *rmer*. Pri G- bakterijah, se MerR veže kot dimer na operator-promotersko regijo operona, s čimer spodbudi RNA polimerazo, da tvori trojni kompleks v katerem sta ob odsotnosti Hg<sup>2+</sup>, dve sekvenci napačno poravnani, zaradi česar je transripcija strukturnih genov zavrta. Ob prisotnosti Hg<sup>2+</sup>, se le-ta veže na domeno za vezavo kovin na C koncu MerR, kar povzroči konformacijsko spremembo, tako da se regiji -10 in -35 poravnata, DNA se razvozla, s čimer je omogočena transkripcija operona (Brown in sod., 2003; Summers, 1992).

Negativni operator rmer je MerD protein, ki se nahaja na koncu operona. Odgovoren je za zaustavitev ekspresije ob zmanjšanju koncentracije Hg<sup>2+</sup> (Mukhopadhyay in sod., 1991).

## 2.3 CIANID PRODUCIRAJOČE BAKTERIJE

V naravi so znane bakterije, ki so sposobne sintetizirati cianid. Cianid producirajoče bakterije lahko živijo v zelo različnih okoljih od vodnega do kopenskega (Castric K. F. in Castric P. A., 1983) do človeka (Pessi in Haas, 2000). Glede na habitat v katerem živijo tovrstne bakterije, imajo tudi različno funkcijo. Npr. v rizosferi pomembno pripomorejo k obrambi rastline pred herbivori in patogeni, pri človeku je vloga podobna; na svežih opeklinskih ranah preprečujejo razvoj patogenov in zajedalcev (Pessi in Haas, 2000). Cianid je inhibitor citokrom c oksidaze, končne komponente dihalne verige pri mnogih organizmih, in drugih pomembnih metaloencimov (Peesi in Haas, 2000; Knowles in Bunch, 1986). V naravi se pri pH 7 cianid nahaja v obliki HCN. Glede na to, da je pKa HCN 9,3, je HCN manj gost od zraka in zelo hlapen, zaradi česar lahko hitro difundira v zrak (Blumer in Haas, 2000). Sinteza cianida poteka lokalno in običajno ne dosega koncentracij, ki bi bile toksične za višje organizme. Te koncentracije so pod 1 mM. Toda tudi v primeru, ko so gostiteljske celice okužene s cianogenim mikroorganizmom (npr. Pseudomonas aeruginosa) in so koncentracije cianida precej višje, so le te sposobne prenašati različne učinke cianida (Goldfarb in Margraf, 1967).

Ena izmed najbolj raziskanih vlog cianogenih mikroorganizmov je lastna zaščita in posledično tudi zaščita rastlinskih korenin v rizosferi pred patogeni in herbivori (Jousset in sod., 2006). Bakterije s sintezo cianida lahko ustvarijo številčnejše populacije in

imajo daljšo življensko dobo. Znane bakterije, ki so sposobne sinteze cianida so: proteobakterija *Chromobacterium violaceum*, fluorescentne pseudomonade (različni sevi *P. aeruginosa* in *P. fluorescens* ter nekateri izolati *P. aureofaciens* and *P. chlororaphis*), cianobakterije (*Anacystis nidulans, Nostoc muscorum* and *Plectonema boryanum*), nekateri sevi *Rhizobium leguminosarum*, sevi *Burkholderia cepacia* (Castric K. F. in Castric P. A., 1983; Knowles in Bunch, 1986; Ryall in sod., 2008). Cianogeneza se polega bakterij pojavlja še pri algah (Gewitz in sod., 1976), glivah (Knowles in Bunch, 1986) in rastlinah (Yip in Yang, 1988; Jones, 1998). Čeprav še ni bila ugotovljena funkcija cianida pri glivah ali algah, je cianogeneza pri rastlinah široko razširjena z namenom kemijske obrambe rastline pred herbivori in patogeni. Rastline uporabljajo cianogene glikozide kot prekurzorje za sintezo cianida (npr. amigdalin) (Jones, 1998), s čimer se ta hidrolitska pot močno razlikuje od biosintetske poti cianida pri bakterijah.

#### 2.3.1 Sinteza cianida

Biološki prekurzorji za sintezo cianida so aminokisline. Pri rastlinah so to tirozin, fenilalanin, valin ali izoleucin, ki se metabolizirajo do cianogenih glikozidov, ti pa se razgradijo v cianid. Pri bakterijah in glivah je prekurzor za cianid, glicin, ki je pri sintezi cianida vir ogljika (Slika 4). Cianid nastane z oksidativno dekarboksilacijo glicina (Castric, 1977). Dejstvo, da glicin stimulira sintezo cianida pri bakterijah, je bilo ugotovljeno že leta 1948 (Lorck). Z radiooznačevanjem je bilo dokazano, da se lahko cianid sintetizira poleg glicina. *P. aeruginosa* je sposoben treonin pretvoriti v glicin. Serin sicer ne stimulira sinteze cianida, ampak deluje kot prekurzor. Prav tako je bilo z radiooznačevanjem dokazano, da metionin pri sintezi cianida ne deluje kot prekurzor, ampak kljub vsemu pozitivno vpliva na stimulacijo sinteze cianida (Castric, 1977).

Sinteza cianida pri *P. aeruginosi* poteka na koncu eksponentne faze rasti in na začetku stacionarne faze, kar je značilno za sekundarni metabolizem (Castric, 1975). Poleg tega na sekundarni metabolizem kaže ozko temperaturno območje, znotraj katerega se tvori cianid, v primerjavi s temperaturnim območjem, ki omogoča normalno rast bakterij (Bunch and Knowles, 1982; Humair in sod., 2009). Castric in sod. (1979) je za zmožnost bakterijske kulture, da sintetizira cianid, uvedel izraz cianogena kapaciteta. Iz tega sledi, da je cianogena kapaciteta na začetku in na sredini eksponentne faze rasti nizka, in se sproži v pozni eksponentni fazi na prehodu v stacionarno fazo (Castric, 1977; Pessi in Haas, 2000; Askeland in Morrison, 1983). Ko so koncentracije cianida zelo visoke in so toksične za celice (Castric, 1977), kar je običajno v stacionarni fazi

rasti, ga bakterije začnejo razgrajevati in ga popolnoma razgradijo. Izguba aktivnosti cianidne sintaze je po vsej verjetnosti posledica avtodestrukcije encima in ne prisotnosti drugih specifičnih metabolitov ali proteaz (Castric in sod., 1979). Npr. pri cianidnem producentu *Pseudomonas aeruginosi* PAO1, razgradnja cianida poteka s cianidno žveplovo transferazo (rodaneza, RhdA), ki spremeni cianid v bistveno manj toksičen tiocianat (Cipollone in sod., 2007). Med razgradnjo cianida, se začne v gojišču nalagati  $\beta$ -cianoalanin (Macadam in Knowles, 1984).

Na sintezo cianida vplivajo koncentracije železa in fosfatov v gojišču ter temperatura. Pri povečanih koncentracijah enega ali drugega pride do stimulacije sinteze cianida, pri prenizkih koncentracijah pa do zavrtja sinteze cianida. Optimalna koncentracija fosfata naj bi bila 300 mM. Koncentracija železa in cianogeneza sta (v območju med 3 in 300  $\mu$ M Fe) v linearnem odnosu (Askeland in Morrison, 1983). Ob pomanjkanju železa pride do zavrtja cianogeneze, saj železo vpliva na regulacijo ANR (anaerobni regulator) (Blumer in Haas, 2000) (Slika 5). Prav tako lahko pride do zavrtja sinteze cianida pri previsokih koncentracijah fosfatov (nad 10 mM) (Castric in sod., 1979; Castric, 1975). Pri *P. fluorescens* je ekspresija *hcnA* gena manjša pri 35 °C kot pri 30 °C (Humair in sod., 2009). Največja cianogeneza je značilna med 25 °C in 30 °C ter pH med 6,6 in 8,9 (Askeland in Morrison, 1983).



Slika 4: Prepostavljeni model oksidacije glicina v HCN preko nestabilnega vmesnega produkta imino acetilne kisline (Blumer in Haas, 2000: 171)

Cianid se pri *Pseudomonas fluorescens* v mikroaerofilnih pogojih sintetizira iz glicina. Pri sintezi sodelujejo *hcnABC* geni, ki sintetizirajo HCN sintazo, ki se pri *E. coli* izraža pod kontrolo T7 promoterja. Analiza nukleotidnih zaporedij *hcnABC* genov je pokazala, da je vsaka podenota HCN sintaze podobna že znanim encimom, ki sodelujejo pri prenosu vodika. Tako je zaporedje HcnA podoben format dehidrogenazi, HcnB in HcnC pa amino kislinski oksidazi. HCN sintaza ima pri reakciji nastanka HCN in CO<sub>2</sub> iz glicina vlogo dehidrogenaze, na kar kažejo vezavna mesta na HcnB in HcnC za NAD(P) in flavin adenin dinukleotid. HCN sintaza je občutljiva na kisik (Laville in sod., 1998).
Regulacijo sinteze cianida omogoča ANR regulator (anaerobni regulator), ki regulira *hcnA* promoter. ANR je podoben FNR regulatorju (fumarat in nitrat reduktazni regulator) (Winteler in Haas, 1996). Nukleotidni zaporedji ANR pri *P. fluorescens* CHA0 in *P. aeruginosi* sta si zelo podobni. Pomen ANR za regulacijo sinteze cianida v aerobnih pogojih je bil ugotovljen z *anr* mutanto pri *P. fluorescens* CHA21, katera je tvorila zelo malo cianida in pri kateri ni prišlo do izražanja *hcnA-lacZ* genov, medtem ko je pri naravnem sevu *P. fluorescens* CHA0 v mikroaerofilnih pogojih prišlo do izražanja genov *hcnA-lacZ* (Laville in sod., 1998).



Slika 5 : Regulacija cianogeneze pri Pseudomonas fluorescens CHA0 (Blumer in Haas, 2000: 174)

Promoterska regija *hcn* operona in aktivacija z ANR regulatorjem pri *P. fluorescens* CHA0. Do aktivacije sinteze cianida pride v primeru prisotnosti železa in v pogojih brez kisika.

Pri *P. aeruginosi* je sinteza virulenčnih faktorjev in sekundarnih metabolitov, med drugim tudi cianida (gena *hcnA*), regulirana s sistemom »zaznavanja celične gostote« (quorum sensing), pri katerem sodeluje signalna molekula N-acetilhomoserin lakton. Sinteza le tega poteka z mehanizmom avtoindukcije, na katero vpliva gostota celic. Več kot je celic, večje so koncentracije signalne molekule. Ko le te dosežejo zgornjo mejo, se aktivira LuxR-tip transkripcijskega regulatorja, ki kontrolira ekspresijo tarčnih genov s prepoznavanjem lux lokus-a (Egland in Greenberg, 1999; Fuqua in Greenberg, 1998). *P. aeruginosa* ima dva med seboj odvisna sistema »zaznavanja celične gostote«, LasRI in RhlRI (Slika 6) (Pearson in sod., 1997; Winson in sod., 1995; Pesci in sod., 1997). Pri LasRI, protein LasI usmerja sintezo N-(3-oksodo-dekanoil)-homoserin laktona (OdDHL), ki sproži LasR transkripcijski aktivator, da povzroči ekspresijo virulenčnih faktorjev. LasI gen je avtoreguliran. Poleg samega sebe pa OdDHL regulira še RhlR sistem in RhlI protein, ki usmerja sintezo N-butanoil-homoserin laktona (BHL). RhlRI sistem pa je odgovoren za sintezo različnih sekundarnih produktov, med drugim cianida

(Seed in sod., 1995; Winson in sod., 1995; Latifi in sod., 1995). Lux lokus, ki je sestavni del obeh sistemov »zaznavanja celične gostote«, je nujno potreben pri izražanju *hcn* genov. Brez LasR in RhlR, ANR ne more aktivirati hcn promoterja (Pessi in Haas, 2000).



Slika 6: Model prepoznavanja promoterja T2 na *hcn* operonu z regulatorji ANR, LasR in RhlR ter njihova povezava z RNA polimerazo (Peesi in Haas, 2000: 6947)

Med pomanjkanjem kisika ANR zavre transkripcijo na mestu T1 z vezavo na -10 sekvenco. Podenoti RNA polimeraze, αCTD (C-terminalna domena) in αNTD (N-terminalna domena), sta prikazani kot ločeni podenoti povezani z črto (Pessi in Haas, 2000).

Pri *P. fluorescens* je izražanje cianidnih genov odvisno od Gac/Rsm signalne transdukcijske poti (Zuber in sod., 2003). Regulacija poteka tako, da ob visoki koncentraciji celic, dvokomponentni sistem GacS/GacA aktivira transkripcijo treh majhnih RNA (Slika 7) (RsmX, RsmY, RsmZ) (Heeb in Haas, 2001; Heeb in sod., 2002; Valverde in sod., 2003; Kay in sod., 2005). Te RNA se vežejo na RNA vezavne proteine iz družine RsmA/CsrA (RsmA in RsmE), pri čemer tarčna mRNA postane prosta za ribosome in translacijo (Reimmann in sod., 2005; Lapouge in sod., 2007; Lapouge in sod., 2008). Mutacija v sistemu GacS/GacA privede do zelo majhnih koncentracij sekundarnih metabolitov (Haas in Defago, 2005; Zuber in sod., 2003; Laville in sod., 1992). Ekspresija translacije *hcnA-lacZ* genov je odvisna od GacA, medtem ko transkripcija *hcnA-lacZ* ni odvisna od GacA (Blumer in sod., 1999). Pri drugih vrstah pseudomonad (*P. aeruginosa, P. syringae* in *P. aureofaciens*) pa na regulacijo sistema GacS/GacA pozitivno vplivajo tudi od celične gostote odvisni N-acetil homoserin laktoni (Laville in sod., 1992; Reimmann in sod., 1997; Chancey in sod., 1999).



# Slika 7: Model GacS/GacA signalne transdukcije pri *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (Haas in Defago, 2005: 9)

GacS senzorska kinaza je sestavljena iz treh domen: avtofosforilacijska (H), fosfoakceptorska (D) in histidin fosfotransferna domena (H). Ob interakciji GacS z bakterijsko signalno molekulo, se GacS avtofosforilira, pri čemer se fosfati prenesejo na akceptorsko domeno GacA. Pri tem se nato aktivira (direktno ali posredno) transkripcija treh majhnih RNA genov (rsmX, rsmY in rsmZ). RsmA in RsmE proteini so vezani na ribosomskem mestu na mRNA in ob sintezi majhnih mRNA, se le ti odcepijo iz ribosomskega mesta in se vežejo na majhne mRNA in sinteza HCN sintaze lahko poteče (Haas in Defago, 2005).

#### 2.4 SINTEZA IN VLOGA SIDEROFOROV PRI BAKTERIJAH

#### 2.4.1 Kaj so siderofori?

Siderofor je helator specifičnih železovih ionov z nizko molekularno težo, ki ga sproščajo bakterije in glive, ki rastejo na področju s pomanjkanjem železa. Siderofori imajo vlogo privzemanja železa iz okolja in spremembo le tega v mineral, dostopen mikrobnim celicam. Sintetizirajo jih lahko le mikroorganizmi in glive (razen kvasovk), ne pa tudi živali in rastline (Neilands, 1995).

#### 2.4.2 Železo v naravi in njegov pomen za mikroorganizme

V naravi se železo nahaja v obliki oksihidroksida = FeO(OH), ki je slabo topen. Koncentracija prostih železovih ionov pri neutralnem pH je odvisna od konstante topnosti železovega hidroksida. Maksimalna količina nevezanih železovih ionov v raztopini pri biološkem pH običajno ni večja od 10<sup>-18</sup> M (Nielands, 1995).

Mikroorganizmi potrebujejo železo za 1) redukcijo kisika pri sintezi ATP, 2) redukcijo ribotidnega prekurzorja DNA, 3) tvorbo hema. Za svojo optimalno rast potrebujejo 1  $\mu$ M železa na dan. Znani so tudi mikroorganizmi, ki za svojo rast ne potrebujejo železa, kot so npr. bakterije rodu *Lactobacillus* (Weinberg, 1997; Nielands, 1995). Mikroorganizmi lahko še na druge načine omogočajo privzem železa v celice, kot so: 1) redukcija železa na površini v bolj topne produkte, 2) znižanje pH, 3) uporaba hema in 4) ekstrakcija proteinov, ki kompleksirajo kovine (Nielands, 1995).

### 2.4.3 Fizikalno-kemijske lastnosti sideroforov

Siderofore delimo, glede na njihove železo vezavne skupine v 5 različnih skupin: 1) kateholni, 2) fenolatni, 3) hidroksamatni, 4) karboksilatni in 5) mešani tip (Slika 8) (Crosa, 1989; Miethke in Marahiel, 2007). Kateholni siderofori imajo pKa vrednost od 6,5–8 pri disociaciji prvega vodika in okrog 11,5 pri drugem vodiku iz kateholnih hidroksilnih skupin. Hidroksamatni imajo pKa med 8 in 9, medtem ko imajo karboksilatni med 3,5 in 5, kar jim omogoča dobro učinkovitost v okolju z nizkim pH, za katerega sta kateholni in hidroksamatni tip preveč protonirana. Tako mikrobi, ki živijo v kislih habitatih, za mobilizacijo železa uporabljajo predvsem karboksilatne siderofore (Miethke in Marahiel, 2007).

Siderofori tvorijo kinetično labilne helate z železovim ionom in so specifični za  $Fe^{3+}$ . Siderofori imajo visoko afiniteto za galij ter nizko za aluminij in divalentne ione. Razlika med siderofori in hemom je v tem, da imajo siderofori močno afiniteto le za železo z visokim oksidacijskim stanjem, hem v osnovi deluje le kot učinkovit prenosnik elektronov (Nielands, 1995).



#### Slika 8: Primeri različnih tipov sideroforov (Miethke in Marahiel, 2007: 415)

Vezavna mesta za železo so obarvana z različnimi barvami: kateholna je rdeče barve, fenolatna je oranžne barve, hidroksamatna je rumene barve,  $\alpha$ -hidroksi-karboksilatna je zelene barve in  $\alpha$ -keto-karboksilatna je modro-zelene barve.

#### 2.4.4 Biosinteza sideroforov

Znanje o biosintezi sideroforov je pomembno ne le iz stališča znanosti ampak tudi iz stališča zdravstva, saj je znanje o naravni sintezi sideroforov uporabno pri umetni sintezi zdravil. Biosinteza sideoroforov poteka na dva načina:

- Reakcija katalizirana z neribosomalno peptidno sintetazo (NRPS)
- Reakcija brez NRPS

Neribosomalna peptidna sintetaza je velik multiencimski kompleks, ki aktivira in sestavlja široko mrežo amino, karboksi in hidroksi kislin, zaradi česar so nastali makrociklični peptidni produkti med seboj zelo različni (Miethke in Marahiel, 2007). Sinteza sideroforov z NRPS je značilna za večino človeških bakterijskih patogenov, kot so: enterobaktin (*E. coli, Salmonella enetrica, Klebsiella, Shigella*), jersiniabaktin (*Yersinia*), piohelin in pioverdin (*Pseudomonas aeruginosa*), vibriobaktin (*Vibrio cholerae*) in mikobaktin (*Mycobacterium tuberculosis*) (Crosa in Walsh, 2002).

Neribosomalna peptidna sintetaza je sestavljena iz treh domen: adenilacijske, tiolacijske in kondenzacijske domene. Adenilacijska domena je odgovorna za selekcijo substrata in njegovo vezavo na fosfo-panteinsko vejo tiolacijske domene kot tioester, preko intermediata AMP-derivata. Kondenzacijska domena katalizira tvorbo peptidnih vezi, z njo poteka elongacija, epimerizacija substrata, N-metilacija in heterociklizacija. Tioesterazna domena je odgovorna za ciklizacijo peptida in njegovo sprostitev (Strieker s sod., 2010).

Biosinteza sideroforov, ki poteka neodvisno od NRPS, se dogaja preko različnih encimskih aktivnosti kot so: monooksigenazna, dekarboksilazna, aminotrasferazna, acetiltransferazna, ligazna in aldolazna. Na ta način se sintetizirajo hidroksamatni in karboksilatni siderofori, kot so: aerobaktin v entero bakterijah, alkaligin (*Bacillus pertussis, Bacillus bronchiseptica*), staphylobactin (*Staphyloccocus aureus*), petrobaktin (*Bacillus anthracis*), ki predstavljajo virulenčne faktorje patogenov (Miethke in Marahiel, 2007).

### 2.4.5 Sekrecija sideroforov

Siderofori se izločajo iz celice s pomočjo iztočnih črpalk. Pri tem sodelujejo tri skupine črpalk: MFS ali »major facilitator superfamily«, RND ali »resistance, nodulation and cell division superfamily« in ABC ali »ATP binding cassette superfamily« (Miethke in Marahiel, 2007).

### 2.4.6 Prenos Fe iz siderofora v celico

Fe lahko preide v celico na 2 načina (Miethke in Marahiel, 2007):

- 1. kot ion, ki se že zunaj celice z redukcijo sprosti iz siderofora v ekstracelularni prostor
- 2. kot Fe-sideroforni kompleks

Pri glivah in kvasovkah sta poznana oba načina privzema Fe, saj imajo na membrani vezano ferisiderofor reduktazo, ki lahko zunaj celic reducira Fe vezano na siderofore. Pri bakterijah pa je sistem za zunajcelično redukcijo Fe vezanega na siderofor slabo poznan. Glavna pot naj bi bila privzem celega kompleksa Fe-siderofor v citosol (Miethke in Marahiel, 2007). Pri G- bakterijah poteka transport Fe-siderofornega kompleksa skozi zunanjo membrano s pomočjo zunanje membranskih receptorjev, ki dobijo energijo preko protonske gonilne sile TonB kompleksa. TonB kompleks je sestavljen iz treh proteinskih podenot: TonB protein, ki sestavlja sidro citoplazemske

membrane in sega v periplazmo ter v citoplazemsko membrano vgrajena proteina ExbB in ExbD. TonB je v kontaktu z zunanje membranskim receptorjem preko C-terminalne domene in se spaja z N-koncem zunanjega membranskega receptorja (Higgs s sod., 2002). Zunanje membranski receptorji imajo veliko afiniteto za Fe-sideroforni kompleks in so specifični za ligande. *E. coli* K-12 ima pet različnih zunanje membranskih receptorjev za privzem različnih sideroforov: FepA za Fe-enterobaktina (Pierce s sod., 1983), Cir in Fiu za linerane degradacijske produkte Fe-enterobaktina (Curtis in sod., 1988), FecA za železov dicitrat (Wagegg in Braun, 1981), FhuA za ferikrom (Kadner s sod., 1980), FhuE za Fe-rodotorulat in Fe-koprogen (Hantke, 1983).

Prenos železa iz periplazme v citoplazmo poteka z ABC sistemom, ki vključuje ekstracitoplazemske substrat vezavne proteine, ki v primeru G- bakterij krožijo po periplazmi, v primeru G+ bakterij pa so pritrjeni na zunanjo površino citoplazemske membrane (Sutcliffe in Russell, 1995). Ob vezavi Fe-S kompleksa na protein, se le-ta spusti po kanalčku preko membrane v citoplazmo. Ta transport dobi energijo s citoplazemskimi ABC podenotami, na katerih pride ob vezavi NTP in/ali hidrolizi do dimerizacije in konformacijskih sprememb, ki porinejo substrat preko transmembranskega kanalčka (Karpowich s sod., 2001). Pri G- bakterijah so bili najdeni 4 tipi ABC transportnih sistemov. Prvi in najbolj običajen podtip je sestavljen iz 4 domen in vsaka s svojo polipeptidno verigo: substrat vezavni protein v periplazemskem prostoru, 2 integralna membranska proteina, ki tvorita kanal in citoplazemska ABC podenota, ki je povezana s podenotami kanala na citoplazemski strani membrane (E. coli FepBDGC Fe-enterobaktin). Drugi podtip E.coli FhuDCB je podoben prvemu podtipu, kjer transmembranska komponenta obsega eno samostojno polipeptidno verigo FhuB, ki je obravnavana kot zlitje dveh normalnih transmembranskih podenot. Tretji podtip obsega membranske lipoproteine za vezavo substrata. Sprva je bil opisan kot velika prednost ABC transportnega sistema pri G+ bakterijah, kasneje pa je bil najden tudi pri G- bakterijah. (ViuP za Fe-vibriobaktin in Fe-enterobaktin pri Vibrio cholere, FatB za Fe-anguibaktin pri Vibrio anguillarum, Ceu za Fe-enterobaktin pri Campylobacter jejuni in Campylobacter coli). Četrti podtip ABC importerjev je bil najden pri privzemu Fe-jersiniobaktina (YbtP in YbtQ). Pri tem tipu je prišlo do fuzije proteinskih domen in nastali sta domena TMS (transmembranski segment) in domena NBF (nukleotid vezavna zanka). Peti podtip pa je sestavljen iz 4 zlitih domen IroC. Ta je še slabo raziskan. Znano je, da se uporablja pri privzemu Fe-salmohelina (Miethke in Marahiel, 2007).

Pri G+ bakterijah sta znana 2 podtipa transportnih sistemov. Oba sta odvisna od ATP. Prvi vključuje substrat vezavni protein z modificiranim proteinom. Najbolj verjetna razlaga za prisotnost substrat vezavnih proteinov na membrani je odsotnost periplazemskega prostora, ki onemogoča prosto ekstracitoplazemsko difuzijo vezavnih proteinov (kar se dogaja pri G- bakterijah). Drug podtip je bil kasneje odkrit in je odgovoren za prenos Fe-karboksimikobaktina pri *M. tuberculosis* (Rodriguez in Smith, 2006). Organizacija domen pri IrtAB je podobna kot pri G- pri YbtPQ. IrtA vsebuje N-terminalno domeno, za katero se predvideva da je to domena na katero se veže siderofor. IrtA predstavlja zlitje treh proteinskih domen ekstracelularne vezave, transmembranskih kanalov in citoplazemske ATP hidrolize, ki deluje skupaj z dvema domenama IrtB (Miethke in Marahiel, 2007).

#### 2.4.7 Mehanizmi sproščanja železa iz sideroforov

Znana sta 2 glavna mehanizma sproščanja železa iz sideroforov:

- Redukcija Fe<sup>3+</sup> vezanega na siderofor v Fe<sup>2+</sup>, čemur sledi spontana sporostitev Fe<sup>2+</sup> iz siderofora ali pa kompetitivna zamenjava z reducirano spojino
- 2. Specializiran encim, ki povzroči zmanjšanje stabilnosti kompleksa Fesiderofor, čemur sledi redukcija ali pa interakcija s celičnimi železo vezavnimi komponentami

Prevladoval naj bi prvi način sprostitve Fe iz sideroforov, ki vključuje feri-siderofor reduktazo (Miethke in Marahiel, 2007).

#### 2.4.8 Vloga sideroforov pri preperevanju mineralov

Mikroorganizmi lahko s siderofori privzemajo tudi železo vezano v mineralih. Kateholne oblike sideroforov, ki jih sintetizirajo *Azotobacter* in *Steptomyces*, naj bi povečale raztapljanje železo vsebujočih mineralov (olivin, glaukonit, goethit) ali amfibolov (Uroz in sod., 2009). Prav tako je bilo ugotovljeno, da lahko siderofori vplivajo na raztapljanje hematita (Hersman in sod., 1995). Siderofori kot helatorji železa in še drugih prehodnih kovin, z vezavo na površini minerala povzročijo raztapljanje kationov z močno vezavo z njimi (Uroz in sod., 2009).

#### **3 MATERIAL IN METODE**

#### 3.1 VPLIV BIOLOŠKO NEDOSTOPNIH OBLIK ŽIVEGA SREBRA NA POJAVLJANJE Hg REZISTENTNIH BAKTERIJ V REKI IDRIJCI

#### 3.1.1 Vzorčenje vode in biofilmov v reki Idrijci

Vzorčenje je potekalo na 2 načina:

- sezonsko vzorčenje vode in biofilmov pozimi, zgodaj in pozno poleti, na 5 vzorčnih mestih: Bela, Idrija, Sp. Idrija, Kozarska Grapa in Bača pri Modreju (Slika 9).
- gradientno vzorčenje biofilmov, kjer je bilo zgoraj omenjenim 5 vzorčnim mestom iz sezonskega vzorčenja dodanih še 11 vzorčnih mest na razdalji 4 km. Štiri izmed dodatnih vzorčnih mest so bila zgoščena okrog vira onesnaženja, sedem pa jih je bilo razporejenih na 500 m razdaljah od vira onesnaženja navzdol. Vzorčenje je potekalo pozno poleti (Slika 10, Preglednica 1).

Vzorci vode so bili nabrani v sterilne plastenke. Vzorci biofilmov so bili na vsaki izmed lokacij nabrani s ščetkanjem obrasti na treh naključno nabranih kamnih. Za ščetkanje so bile uporabljene sterilne ščetke in sterilne centrifugirke za shranjevanje vzorcev. Vzorci so bili v času terenskega dela shranjeni v hladilni skrinji. Po prihodu v laboratorij je bilo 0,5 l posameznega vzorca vode prefiltriranega skozi filter s porami premera 0,22  $\mu$ m (Milipore, ZDA) in filter zamrznjen na -20 °C. Vzorci biofilmov so bili centrifugirani pri 3000 rpm, 4 °C, 10 min. Po centrifugiranju je bil supernatant zavržen, usedline biofilmov pa zamrznjene pri -20 °C.

Pri gradientnem vzorčenju so bili z elektrodnim multimetrom (Multi 350i/SET, WTW Wissenschaftlich – Technische Werkstätten GmbH, Nemčija) izmerjeni tudi fizikalno kemijski parametri vode: pH, kisik, prevodnost in temperatura.



#### Slika 9: Razporeditev glavnih vzorčnih mest sezonskega vzorčenja na razdalji 40 km

Legenda: C – kontrolno mesto nad virom onesnaženja, P1 – Idrija, mesto na viru onesnaženja, P4, P10 in P11 – vzorčna mesta pod virom onesnaženja

# Figure 9: Distribution of the main sampling sites along the 40 km section on the Idrijca River used for a general sampling

Legende: C – control site, above the source of pollution, P1 – Idrija, the source of pollution, P4, P10 and P11 – sampling sites downstream the source of pollution



#### Slika 10: Razporeditev vzorčnih mest na razdalji 4 km pri gradientnem vzorčenju

V desnem kotu spodaj je prikazano povečano področje na viru onesnaženja, kjer je bilo skoncentriranih 5 vzorčnih mest (P1a–P1e) na krajših razdaljah. P2–P9 so vzorčna mesta razporejena na medsebojnih razdaljah 500 m, od vira onesnaženja navzdol.

## Figure 10: Distribution of the sampling sites used for a gradient sampling along the 4 km section downstream from the pollution source

On the right corner magnified region is shown at the P1 sites (P1a–P1e), which are densely distributed at the pollution source. P2–P9 are the sampling sites distributed 500 m between each other, downstream the pollution source.

# Preglednica 1: Koordinate vzorčnih mest in fizikalno kemijski parametri, izmerjeni ob gradientnem vzorčenju pozno poleti

Cable 1: Sampling site coordinates and physico-chemical parameters, measured at the gradien
ampling in the late summer

Vzorčno mesto	Lon	Lat	pН	<b>O</b> <sub>2</sub>	Prevodnost	Temperatura
			-	(mg/l)	(µS/cm)	vode (°C)
C = pri izviru, nad	13° 54'	46° 0'	8,38	10,3	322	12,3
pritokom Belce (P1d	56,556"	13,1034"				
<b>– 8 km</b> )						
P1a	14° 1'	46° 0'	8,24	11,22	338	12
	44,544"	30,744"				
P1b	14° 1'	46° 0'	8,23	10,58	342	12,4
	44,004"	30,06"				
P1c	14° 1'	46°0'	8,27	10,94	345	12,2
	44,832"	31,3194"				
P1d = Idrija (vir	14° 1'	46° 0'	8,30	11,35	351	12,3
onesnaženja)	44,328"	33,228"				
Ple	14° 1'	46° 0'	8,21	11,2	340	12
	43,5714"	35,784"				
P2	14° 1'	46° 0'	8,26	10,94	534	12,9
	39,144"	54,2874"				
P3	14° 1'	46° 1'	8,35	10,83	528	13,2
	47,244"	13,908"				
P4 = Sp. Idrija (P1d	14° 1'	46° 1'	8,42	11,5	527	13,4
+ 1,5 km)	43,32"	30,5754"				
P5	14° 1'	46° 1'	8,54	11,52	521	13,8
	32,9874"	40,4034"				
P6	14° 1'	46° 1'	8,55	11,83	520	13,9
	36,6234"	56,208"				
P7	14° 1'	46° 2'	8,65	11,6	514	14,4
	9,9474"	0,1314"				
P8	14° 1'	46° 2'	8,74	13,6	473	14,3
	25,464"	19,104"				
P9	14° 1'	46° 2'	8,82	12,62	488	14,4
	11,3514"	34,6914"				<u>.</u>
P10 = Kozarska	13° 55'	46° 7' 3,9"	8,42	11,94	365	nd <sup>*</sup>
grapa (P1d + 18,5	18,048"					
km)						
P11 = Bača pri	13° 46'	46° 8'	8,55	14,17	344	18,8
Modreju (P1d + 32	2,2434"	37,0314"				
km)						

#### 3.1.2 Izolacija in identifikacija izoliranih Hg rezistentnih sevov

Pri sezonskem vzorčenju zgodaj poleti so bili nabrani tudi vzorci za kvantifikacijo in karakterizacijo HgR sevov. Na hranilni agar (Nutrient Broth No. 1, SigmaAldrich) in hranilni agar z dodanim HgCl<sub>2</sub> (8,4  $\mu$ g/ml) je bila nacepljena (100  $\mu$ l) serija redčitev

vzorcev vode (do  $2x10^{-1}$ ) in biofilmov (do  $1x10^{-7}$  pri gojišču brez dodanega Hg in do  $1x10^{-5}$  pri gojišču z dodanim Hg) ter 7 dni inkubirana na sobni temperaturi. Po inkubaciji so bile po morfologiji različne kolonije preštete, izolirane in nagojene v čiste bakterijske kulture, iz njih pa je bila izolirana DNA s kitom SmartHelix® EZextract 96 kit (Sekvenator Ltd., Slovenija).

3.1.2.1 Verižna reakcija s polimerazo za 16S rRNA gen

V vzorcih iz čistih HgR kultur izolirane DNA je bil z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) pomnožen gen 16S rRNA, dobljeni produkti pa pripravljeni za sekvenciranje. Uporabljena sta bila oligonukleotidna začetnika 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3') in 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGCTACGA-3') (Bianciotto in sod., 1996).

PCR mešanica za skupni volumen 50 µl je bila:

-	MiliQ voda	37,5 µl
-	10x pufer	5 µl
-	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
-	dNTP (20 mM)	2 µl
-	oligonukleotidni začetnik 27f (10 pmol/µl)	0,5 µl
-	oligonukleotidni začetnik 1495r (10 pmol/µl)	0,5 µl
-	Taq polimeraza (5 U/µl) (Perkin Elmer, ZDA)	0,125 µl

Program pomnoževanja DNA je bil sledeč:

-	•	•
-	94 °C	5 min
-	5 ciklov:	
	94 °C	30 s
	60 °C	30 s
	72 °C	4 min
-	5 ciklov:	
	94 °C	30 s
	55 °C	30 s
	72 °C	4 min
-	30 ciklov:	
	94 °C	30 s
	50 °C	30 s
	72 °C	4 min
-	72 °C	7 min

#### 3.1.2.2 Sekvenciranje in filogenetska analiza izoliranih rezistenčnih sevov

PCR produkti so bili poslani v Macrogen (Južna Koreja) na sekvenciranje z oligonukleotidnim začetnikom 27f. Dobljene sekvence so bile poravnane v ClustalX, ki uporablja progresivni algoritem. Nato so bile na podlagi Kimura 2 parametrične matrike (Kimura, 1980) izračunane filogenetske razdalje ter narisana filogenetska drevesa z »neighbor joining« algoritmom (Saitou and Nei, 1987) z Mega5 programsko opremo (Tamura s sod., 2007). Filogenetska drevesa so bila evaluirana z »bootstrapping« analizo.

#### 3.1.3 Izolacija in čiščenje DNA iz okoljskih vzorcev

Iz zamrznjenih filtrov in usedlin biofilmov je bila z metodo fenol/ kloroform (Lapanje in sod., 2008) izolirana DNA. Izolirana DNA je bila nato prečiščena skozi Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) kolonce, narejene po protokolu iz Miller in sod. (1999), da so bili odstranjeni PCR inhibitorji. Po čiščenju je bila DNA koncentrirana s precipitacijo z etanolom in amonijevim acetatom (Sambrook in sod., 1989). Izmerjena je bila celokupna koncentracija DNA (ng/ml) vzorcev s Qubit fluorometrom s kitom Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies Corporation).

#### 3.1.4 Analiza mikrobnih združb v vzorcih biofilmov iz reke Idrijce

Analiza mikrobnih združb je bila narejena z metodo TTGE (Temporal temperature gradient gel electrophoresis) na napravi Dcode universal mutation system (Biorad, Francija). Elektroforeza je bila narejena z 8 % poliakrilamidnim gelom v 1,25x TAE elektroforeznem pufru. Potekala je 20 h pri 70 V, od 54 °C do 68 °C, s hitrostjo rasti temperature 0,7 °C/h.

8 % poliakrilamidni gel je bil sestavljen iz:

-	Raztopina akrilamid : N,N' metilen bisakrilamid (37,5 : 1)	40 %
-	Urea	8 M
-	TAE pufer	1,25x
-	TEMED	40 µl
-	10 % amon persulfat	400 µl

Gel je bil 20 min barvan z etidijevim bromidom (1 mg/ml etidijevega bromida v 1,25x TAE pufru) in nato v 5 min razbarvan v destilirani vodi. Gel je bil nato fotografiran z

UVI foto sistemom za slikanje gelov (Uvitec, VB). Rezultat TTGE-ja je bil analiziran s programsko opremo GelManager 1.5 (Biosystematica, VB). Iz izračunanih Pearsonovih koeficientov podobnosti so bila s pomočjo programa GelManager 1.5 narisana UPGMA drevesa.

#### 3.1.5 Kvantifikacija merA gena

*MerA* gen je bil kvantificiran s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR). qPCR mešanica je bila sestavljena iz:

- 600 nM oligonikleotidni začetnik A5-nR,
- 600 nM oligonikleotidni začetnik A1S-nF,
- 2x Master Mix Power Sybr Green (Applied Biosystems)
- ddH<sub>2</sub>O

Celokupni volumen qPCR mešanice za 1 vzorec je bil 29  $\mu$ l, ki mu je bil dodan 1  $\mu$ l vzorca. Nukleotidno zaporedje oligonukeotidnega začetnika A5-nR je bilo 5`-ACCAT-CGTCAGRTARGGRAAVA-3`, nukleotidno zaporedje oligonukleotidnega začetnika A1s-nF pa 5`-TCCGCAAGTNGCVACBGTNGG-3`.

Program pomnoževanja DNA s qPCR je bil sledeč:

-	50 °C	2 min
-	50 ciklov:	
	95 °C	10 min
	94 °C	10 s
	62 °C	1 min
-	disociacija:	
	95 °C	15 s
	60 °C	1 min
	95 °C	15 s

qPCR je bil narejen z napravo 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, ZDA). Za standard so bile uporabljene redčitve plazmida pBR831.

#### 3.1.6 Meritve celokupnega živega srebra

Meritve celokupnega živega srebra (THg) so bile opravljene na Institutu »Jožef Stefan« s tehniko atomske absorpcijske spektrometrije hladnih par (AAS HP).

### 3.2 VPLIV BAKTERIJ NA POVEČANJE BIOLOŠKO DOSTOPNE FRAKCIJE ŽIVEGA SREBRA V SEDIMENTIH

# **3.2.1** Vpliv bakterijskih izvenceličnih produktov na povečevanje biološko dostopne frakcije Hg v sedimentih

#### 3.2.1.1 Vzorčenje sedimenta na treh lokacijah v reki Idrijci

V reki Idrijci so bili v mesecu decembru vzorčeni sedimenti na mestih Idrija, Sp. Idrija in Bela (vzorčna mesta P1d, P4 in C) (Slika 9). Sediment je bil z obžgano žličko vzorčen v sterilno plastenko.

#### 3.2.1.2 Izpostavitev bakterijskih izvenceličnih produktov sedimentom

Preko noči so bile bakterije *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* in *E. coli* nagojene v hranilnem gojišču (Nutrient broth No.1, Sigma-Aldrich), *E. coli* tudi v LB (Luria-Bertani broth, Sigma-Aldrich) gojišču. Prekonočne kulture so bile centrifugirane pri 10.000 rpm in supernatanti prefiltrirani skozi filter s porami 0,22 µl (Milipore, ZDA).

V sterilne 15 ml centrifugirke je bilo natehtano 2,5 g sedimenta, ki mu je bilo dodano 3 ml sterilnega supernatanta. Vzorci so bili inkubirani na vorteksu (Vortex 3, Ika, Nemčija) na 1500 rpm, na sobni temperaturi, 12 h in 36 h. Po posameznem inkubacijskem času je bilo iz vzorcev odvzeto 200 µl tekočega vzorca za meritve BDHg ter po 12 h inkubaciji tudi 1 ml tekočega vzorca za meritve celokupnega Hg. Vzorci so bili shranjeni na -20 °C do izvedbe meritev biološko dostopnega živega srebra (BDHg).

3.2.1.3 Meritve biološko dostopnega živega srebra

3.2.1.3.1 Izvor in sestava senzorskih in konstitutivnih celic

Senzorske in konstitutivne *E. coli* celice so bile pripravljene v sodelovanju z Biotehniško fakulteto.

Senzorske celice *E. coli* (*E. coli* IND) so bile pripravljene tako, da je bil s procesom elektroporacije plazmid pmerRlux vstavljen v *E. coli* MC1061 celice. Celice imajo *merR* gen ter gene *lux* operona vezane na skupni promoter *merP*, ki se sproži ob prisotnosti  $Hg^{2+}$  ionov. Tako se celice ob prisotnosti  $Hg^{2+}$  ionov odzivajo s povečano sintezo luciferina in luciferaze, kar smo merili kot luminiscenten odziv.

Konstitutivne *E. coli* (*E. coli* CON) celice vsebujejo plazmid pDNlux. Geni za luminiscenco delujejo pod kontrolo T7 promoterja in se izražajo ne glede na prisotnost živega srebra.



Slika 11: Shematski prikaz pmerR lux plazmida vstavljenega v *E. coli* MC1061 celice, pri čemer so nastale *E. coli* IND celice

Figure 11: Schematic presentation of pmerR lux plasmid inserted into *E. coli* MC1061 cells, which resulted in *E. coli* IND cells





Figure 12: Schematic presentation of pDNlux plasmid inserted into *E. coli* MC1061 cells, which resulted in *E. coli* CON cells

#### 3.2.1.3.2 Priprava Hg standardov

V steklenički je bila pripravljena 100 mM založna raztopina  $HgCl_2$ , ki je bila v nadaljevanju uporabljena za pripravo standardov. Standardi so bili za vsako serijo meritev, izvedeno v enem dnevu, pripravljeni na novo, saj se lahko Hg s časom reducira. Standardi so bili pripravljeni za enkratno uporabo v 4 ml stekleničkah s pokrovčkom na navoj.

M HgCl <sub>2</sub>	Priprava ustrezne molarnosti
2 x 10 <sup>-2</sup> M	100 μl 100 mM HgCl <sub>2</sub> + 400 μl MiliQ
2 x 10 <sup>-3</sup> M	$100 \ \mu l \ 2 \ x \ 10^{-2} \ M \ HgCl_2 + 900 \ \mu l \ MiliQ$
2 x 10 <sup>-4</sup> M	$100 \ \mu l \ 2 \ x \ 10^{-3} \ M \ HgCl_2 + 900 \ \mu l \ MiliQ$
2 x 10 <sup>-5</sup> M	$100 \ \mu l \ 2 \ x \ 10^{-4} \ M \ HgCl_2 + 900 \ \mu l \ MiliQ$
6 x 10 <sup>-6</sup> M	300 μl 2 x 10 <sup>-5</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 700 μl MiliQ
2 x 10 <sup>-6</sup> M	100 μl 2 x 10 <sup>-5</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
6 x 10 <sup>-7</sup> M	100 μl 6 x 10 <sup>-6</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
2 x 10 <sup>-7</sup> M	100 μl 2 x 10 <sup>-6</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
8 x 10 <sup>-8</sup> M	$400 \ \mu l \ 2 \ x \ 10^{-7} \ M \ HgCl_2 + 600 \ \mu l \ MiliQ$
6 x 10 <sup>-8</sup> M	100 μl 6 x 10 <sup>-7</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
4 x 10 <sup>-8</sup> M	$200 \ \mu l \ 2 \ x \ 10^{-7} \ M \ HgCl_2 + 800 \ \mu l \ MiliQ$
2 x 10 <sup>-8</sup> M	$100 \ \mu l \ 2 \ x \ 10^{-7} \ M \ HgCl_2 + 900 \ \mu l \ MiliQ$
6 x 10 <sup>-9</sup> M	100 μl 6 x 10 <sup>-8</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
2 x 10 <sup>-9</sup> M	100 μl 2 x 10 <sup>-8</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
$6 \ge 10^{-10} M$	100 μl 6 x 10 <sup>-9</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
$2 \times 10^{-10} M$	100 μl 2 x 10 <sup>-9</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
6 x 10 <sup>-11</sup> M	100 μl 6 x 10 <sup>-10</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
2 x 10 <sup>-11</sup> M	$100 \ \mu l \ 2 \ x \ 10^{-10} \ M \ HgCl_2 + 900 \ \mu l \ MiliQ$
6 x 10 <sup>-12</sup> M	100 μl 6 x 10 <sup>-11</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
2 x 10 <sup>-12</sup> M	$100 \ \mu l \ 2 \ x \ 10^{-11} \ M \ HgCl_2 + 900 \ \mu l \ MiliQ$
6 x 10 <sup>-13</sup> M	100 μl 6 x 10 <sup>-12</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 μl MiliQ
$2 \times 10^{-13} \text{ M}$	$100 \ \mu l \ 2 \ x \ 10^{-12} \ M \ HgCl_2 + 900 \ \mu l \ MiliQ$
$6 \ge 10^{-14} M$	100 $\mu$ l 6 x 10 <sup>-13</sup> M HgCl <sub>2</sub> + 900 $\mu$ l MiliQ
$2 \times 10^{-14} M$	$100  \mu\text{l} 2  x 10^{-13}  M  \text{HgCl}_2 + 900  \mu\text{l}  \text{MiliO}$

Preglednica 2: Seznam uporabljenih koncentracij HgCl <sub>2</sub> in njihova priprav	a
Table 2: List of the HgCl <sub>2</sub> concentrations used and their preparation	

#### 3.2.1.4 Meritve luminiscence

V gojišče LB z dodanim ampicilinom (100  $\mu$ g/ml) je bila nacepljena 1 kolonija *E. coli* IND, v gojišče LB z dodanim Tc (10  $\mu$ g/ml) pa 1 kolonija *E. coli* CON. Prekonočni kulturi sta bili precepljeni v sveže LB gojišče z dodanim ustreznim antibiotikom in bili

nagojeni do eksponentne faze rasti (OD<sub>600</sub> bil med 0,45 in 0,55). V bele mikrotiterske plošče (Corning, Costar 3693, ZDA) je bilo napipetiranega po 100  $\mu$ l posameznega Hg standarda in po 100  $\mu$ l posameznega vzorca. Predhodno so bile pripravljene redčitve vzorcev. Nato je bilo v vse jamice (standardi + vzorci) napipetirano še 100  $\mu$ l senzorskih celic. Plošča z vzorci je bila inkubirana 1 h pri 37 °C in 500 rpm (Vortex 3, Ika, Nemčija), nato pa je bila izmerjena luminiscenca (Viktor X Multilabel Plate Readers, PerkinElmer, ZDA). Po enakem postopku so bile izvedene še meritve s konstitutivnimi celicami.

### 3.2.1.4.1 Obdelava rezultatov meritev biološko dostopnega Hg

Iz rezultatov luminiscence *E. coli* IND izpostavljenih HgCl<sub>2</sub> standardom je bila narisana standardna krivulja, CPS luminiscence v odvisnosti od koncentracije standardov. Nato so bile iz standardnih krivulj izračunane koncentracije HgCl<sub>2</sub> za posamezne vzorce. Koncentracije HgCl<sub>2</sub> so ekvivalent koncentracijam biološko dostopnega Hg (BDHg). Rezultati *E. coli* CON pa so bili uporabljeni za določitev redčitve vzorca, pri kateri je rezultat luminiscence na senzorskih celicah najbolj verodostojen, in sicer glede na spodnjo mejo detekcije in glede na možno prisotnost inhibitorjev (zaradi previsokih Hg koncentracij, toksičnih substanc ali virusov).

#### 3.2.1.5 Kemijske meritve celokupnega živega srebra

V vzorcih, na katerih je bil izmerjen BDHg z bioluminiscentnimi celicami, je bilo izmerjeno tudi celokupno živo srebro z atomsko absorpcijsko spektrometrijo hladnih par (CVAAS). Meritve so bile narejene na Inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani.

Priprava vzorca: 1 ml vzorca (supernatant 12 h inkubiran v sedimentu) je bil redčen do 50 ml in vzorec nato zakisan s 50 µl Suprapur 30 % HCl.

# **3.2.2** Vpliv metabolno različnih mikroorganizmov na povečanje biološko dostopne frakcije Hg v sedimentih

3.2.2.1 Vzorčenje sedimenta iz reke Idrijce v Idriji

V reki Idrijci so bili v mesecu juliju vzorčeni sedimenti v Idriji pri Kolektorju (vzorčno mesto P1d) (Slika 9). Sediment je bil na 4 mikrolokacijah z obžgano žličko nabran v

sterilne plastenke. Med izvajanjem poskusov je bil sediment shranjen v hladilniku pri 4 °C.

## 3.2.2.2 Izbor bakterij in njihovih rastnih pogojev

#### Preglednica 3: Seznam uporabljenih sevov in gojišč

#### Table 3: A list of the strains and media used

Ime bakterijskega seva	Posebnost v metabolizmu, kot motivacija za eksperimentalno delo	Rastni pogoji
Bacillus subtilis NCIB 3610	Redukcija nitrata v nitrit, amilaza, hialuronska kislina, siderofori (kateholi)	hranilno gojišče z dodatkom MNSO <sub>4</sub> ; 30°C
Bacillus atrophaeus DSM 2277	Endospore, siderofori	hranilno gojišče z dodatkom MNSO <sub>4</sub> ; 30°C
Pseudomonas fluorescens CHA0	Fluorescentni difuzni pigment, siderofori, cianid, oksalat, piruvat, citrat, glukonat	Hranilno gojišče; 28°C
Pseudomonas stutzeri Nico Boon	Denitrifikacija, uporaba tiosulfata za energijo, sinteza H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , oksalat, piruvat, citrat, glukonat	Hranilno gojišče; 30°C
Escherichia coli BL21	Enterobakterija, acetat	Luria broth; 37°C
Janthinobacterium lividum DSM 1522	Tvorba pigmenta violaceina; quorum sensing, oksalat, piruvat	Hranilno gojišče; 25°C
Nitrobacter vulgaris DSM 10236	Oksidacija nitrita v nitrat	Heterotrofno gojišče za Nitrobacter (DSM 765); 28°C
Lactobacillus acidofilus DSM 20079	Fermentacija mlečne kisline, laktat, acetat	Mikroaerofilni anaerob; MRS gojišče (DSMZ 11); 37°C
Azotobacter vinelandii DSM 85	Fiksacija dušika; siderofori, dihidroksibenzoična kislina	Gojišče za Azotobacter (DSM 3); 30°C
Rhizobium pisi DSM 30132	Fiksacija dušika	Gojišče za Rhizobium (DSM 98); 26°C
Brevundimonas diminuta DSM 7234	Ne fermentatira ogljikovih hidratov, nima hemolize	Hranilno gojišče OXOID CM3 z dodanim fosfatom (DSM 605a); 28°C
Shewanella oneidensis LMG 19005	Redukcija železa	Triptik sojino gojišče; 28°C

Priprava gojišč:

Hranilno gojišče (NB) za gojenje bakterijskih sevov: Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas stutzeri, Bacillus subtilisa, Bacillus atrophaeusa in Janthinobacterium lividum:

pepton 5 g mesni ekstrakt 3 g Sestavini sta bili raztopljeni v 1 l vode, pH uravnan na 7 in gojišče avtoklavirano pri 121 °C, 15 min.

Pri gojenju sevov *Bacillusa* je bilo dodano še 10 mg MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O.

Heterotrofno	gojišče za Nitrobacter vulg	garis:

•••	
kvasni ekstrakt	1,5 g
pepton	1,5 g
Na-piruvat	0,55 g
NaNO <sub>2</sub>	2 g
raztopina elementov v sledovih <sup>*1</sup>	1 ml
založna raztopina <sup>*2</sup>	100 ml

Priprava raztopine elementov v sledovih<sup>\*1</sup>:

MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	33,8 mg
$H_3BO_3$	49,4 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	43,1 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	37,1 mg
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	97,3 mg
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	25 mg

Sestavine so bile raztopljene v 1 l destilirane vode.

Priprava založne raztopine <sup>*2</sup> :	
CaCO <sub>3</sub>	0,07 g
NaCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g

Sestavine so bile raztopljene v 1 l destilirane vode.

Gojišče, s pH uravnanim na 7,4 z NaOH je bilo avtoklavirano pri 121 °C, 15 min.

<u>Gojišče za Rhizobium pisi:</u>	
kvasni ekstrakt	1 g
manitol	10 g
ekstrakt prsti <sup>*1</sup>	200 ml
destilirana voda	800 ml
Priprava ekstrakta prsti <sup>*1</sup> :	
prst (vrtna zemlja)	80 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,2 g
destilirana voda	200 ml

Suspenzija prsti je bila avtoklavirana 1 h pri 121 °C, po tem, ko se je prst posedla je bil tekoči del še dodatno centrifugiran na 9.000 rpm, 10 min, pri čemer je nastal bister ekstrakt prsti. Ekstraktu je bil nato pH uravnan na 7,2.

Gojišče za Rhizobium, s pH uravnanim na 7, je bilo avtoklavirano pri 121 °C, 15 min.

pepton iz kazeina	10 g
mesni ekstrakt	10 g
kvasni ekstrakt	5 g
glukoza	20 g
Tween 80	1 g
$K_2HPO_4$	2 g
Na-acetat	5 g
$(NH_4)_2$ citrat	2 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,05 g

MRS gojišče za Lactobacillus acidofilus (11):

Gojišče, s pH uravnanim na 6,5 je bilo avtoklavirano pri 101 °C, 20 min.

Gojišče Luria - Bertani (LB) za Escherichio coli:

20 g gojišča LB (Sigma- L3522) je bilo raztopljenega v 1 l destilirane vode in avtoklaviranega pri 121 °C, 15 min.

|--|

mesni ekstrakt	1 g
kvasni ekstrakt	2 g
pepton	5 g
NaCl	5 g
$KH_2PO_4$	0,45 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,39 g

Sestavine so bile raztopljene v 1 l destilirane vode, pH uravnan na 6,8 ter avtoklavirane pri 121 °C, 15 min.

Triptik sojino gojišče	(TSB) za	Schewanello oneidensis:
lasitor	. ,	15 ~

Kazitoli	15 g
sojiton	5 g
NaCl	5 g

Sestavine so bile raztopljene v 1 l destilirane vode, pH uravnan na 7,3, avtoklaviranje pa izvedeno pri 121 °C, 15 min.

Gojišče za Azotobacter vinelandii:

glukoza	5 g
manitol	5 g
$CaCl_2 \ge 2 H_2O$	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
$Na_2MoO_4 \ge 2 H_2O$	5 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g
CaCO <sub>3</sub>	5 g

V 50 ml destilirane vode sta bila raztopljena glukoza in manitol, ki sta bila ločeno sterilizirana pri 100 °C, 20 min. Preostale sestavine so bile raztopljene v 950 ml destilirane vode in avtoklavirane pri 121 °C, 15 min.

# 3.2.2.3 Izpostavitev celičnih kultur, izvenceličnih produktov in čistega gojišča sedimentu

Sediment iz reke Idrijce je bil presejan preko mreže z velikostjo por  $1 \text{ mm}^2$ . Sediment, nabran na 4 mikrolokacijah, je bil združen v en skupen vzorec. V steklene posode prostornine 0,5 l je bilo natehtanega 50 g homogenega sedimenta, ki mu je bilo dodano:

1) 50 ml gojišča + 50 ml prekonočne bakterijske kulture, ali 2) 100 ml centrifugirane in prefiltrirane prekonočne kulture, ali 3) 100 ml svežega gojišča. Med inkubacijo so bili ob 4 različnih časih odvzeti vzorci za meritve BDHg (1 h, 3 h, 6 h, 24 h). Ob posameznem vzorčenju je bilo odvzeto 3 ml tekočega vzorca (2 x 1,5 ml). Vzorci so bili centrifugirani pri 16.000 rpm in sobni temperaturi, supernatant pa je bil prestavljen v nove epice in zamrznjen pri -20 °C do meritev BDHg.

# 3.2.3 Vpliv izvenceličnih produktov in direktnega kontakta celic na povečanje biološko dostopne frakcije Hg v sedimentu

Pri poskusu smo preverjali vpliv direktnega kontakta celic s sedimentom in vpliv izvenceličnih produktov na povečanje biološke dostopnosti živega srebra iz sedimenta.

3.2.3.1 Izbor sedimenta in bakterijskih sevov

Pri poskusu je bil uporabljen sediment iz Idrijce, nabran v Idriji pri Kolektorju (vzorčno mesto P1d) (Slika 9).

Pri poskusu so bili uporabljeni spodaj našteti bakterijski sevi:

*Escherichia coli* BL21, *Pseudomonas fluorescens* CHA0, *Pseudomonas stutzeri* Nico Boon, *Bacillus subtilis* NCIB 3610, *Bacillus atrophaeus* DSM 2277 in *Janthinobacterium lividum* DSM 1522. Za rast sevov sta bili uporabljeni hranilno gojišče in Luria gojišče.

3.2.3.2 Vpliv izvenceličnih produktov na sediment

15 ml supernatanta bakterijske kulture, ustavljene v eksponentni fazi rasti, je bilo inkubiranega s 6 g sedimenta. Vzorci so bili stresani na stresalniku pri 500 rpm in 25 °C. Inkubacija je potekala 1 h in 3 h. Za posamezen vzorec so bile pripravljene 3 biološke paralelke za vsak inkubacijski čas. Po končani inkubaciji sta bila iz tekoče faze odpipetirana 2 ml vzorca v epico, centrifugirana pri 10.000 rpm, 5 min in sobni T, supernatant odpipetiran v novo epico in vzorec shranjen pri -20 °C do meritev BDHg. 13 ml preostalega tekočega vzorca je bilo prelitega v centrifugirko, centrifugiranega pri 9.000 rpm, 5 min in sobni T. Supernatant je bil prelit v stekleničko in vzorec shranjen pri -20 °C do meritev THg.

#### 3.2.3.3 Vpliv direktnega kontakta celic na sediment

Prekonočna kultura izbranega seva je bila redčena s svežim gojiščem (OD<sub>600</sub> 0,1 do 0,15) in inkubirana do OD<sub>600</sub> med 0,7 in 0,8 v 4 erlenmajericah po 50 ml. Kulture iz vseh štirih erlenmajeric so bile združene, izmerjena je bila optična gostota pri 600 nm (USB2000, OceanOptics, ZDA). Kultura je bila centrifugirana pri 9.000 rpm, 5 min. Supernatant je bil odlit v sterilno čašo, usedlina celic pa resuspendirana v 10 ml 0,9 % NaCl in centrifugiran pri 9.000 rpm, 5 min. Celice so bile nato 3x sprane z 0,9 % NaCl. Po zadnjem spiranju je bila usedlina celic resuspendirana v 7 ml 0,9 % NaCl. Po 1 ml resuspendiranih celic je bilo napipetiranih v epice, centrifugiranih pri 10.000 rpm, 5 min, supernatant pa zavržen. K celicam je bilo dodano  $250 \pm 5$  mg sedimenta in 30 µl MiliQ vode, s čimer je bila zagotovljena nasičenost sedimenta z vodo. Volumen 30 µl je bil določen s predhodnim preliminarnim testom, kjer je bil z dodajanjem vode sedimentu v kolonci določen volumen, potreben za nasičenost sedimenta z vodo. Celice in sediment so bili premešani s sterilnim zobotrebcem in inkubirani določen časovni interval (1 h in 3 h).

Po inkubaciji je bilo v vzorec dodano 1 ml 0,9 % NaCl, epice 3x obrnjene ter centrifugirane pri 2.000 rpm, 1 min. Supernatant je bil prenešen v sveže epice (za meritve izvenceličnega BDHg in THg) oz. v epice s steklenimi kroglicami (za meritve znotrajceličnega BDHg).

#### 3.2.3.3.1 Meritve izvenceličnega BDHg

V vzorcih je bila izmerjena optična gostota pri 600 nm valovne dolžine. Nato je bil vzorec centrifugiran pri 10.000 rpm, 5 min in supernatant odpipetiran v sveže epice, ter shranjen pri -20 °C do meritev BDHg. Usedlina celic je bila uporabljena za meritve THg v celicah.

#### 3.2.3.3.2 Meritve znotrajceličnega BDHg

Mikrocentrifugirke z vzorcem in steklenimi kroglicami so bile stresane na stresalniku Mill Mix 20 (Tehtnica, Slovenija) pri 30 Hz, 5–15 min, odvisno od vrste bakterije. Po stresanju je bil vzorec centrifugiran pri 10.000 g, 5 min, supernatant odpipetiran, ter shranjen pri -20 °C do meritev BDHg. Dolžina razbijanja celic je bila določena s preliminarnim testom, kjer so bile celice stresane na 30 Hz in vsakih 5 min izmerjena koncentracija proteinov s kitom Protein quantification kit – Rapid (Fluka, 51254) po protokolu »Standard assay for microplate reader«. Po času, ko koncentracija proteinov ni več naraščala, je bilo stresanje prekinjeno.

Preglednica 4: Časovni intervali razbijanja celic za posamezne bakterijske seve Table 4: Time intervals for cell breaking of the specific bacterial strains

Bakterijski sev	Časovni interval stresanja
Escherichia coli BL21	5 min
Pseudomonas fluorescens CHA0	5 min
Pseudomonas stutzeri Nico Boon	5 min
Bacillus subtilis NCIB 3610	10 min
Bacillus atrophaeus DSM 2277	5 min
Janthinobacterium lividum DSM 1522	15 min

#### 3.2.3.3.3 Meritve koncentracije proteinov

Koncentracija proteinov je bila izmerjena s kitom Protein quantification kit – Rapid (Fluka) po protokolu »Standard assay for microplate reader«. Absorpcija je bila izmerjena pri valovni dolžini 590 nm. Valovna dolžina je bila določena z meritvijo spektra absorpcije. Iz rezultatov je bila določena valovna dolžina, pri kateri je bila absorpcija najvišja. Za meritev absorpcije je bila uporabljena naprava SynergyH4 (BioTek, ZDA).

3.2.3.4 Meritve THg v vzorcih supernatantov in v usedlini celic

#### THg v supernatantih:

Vzorec gojišča s celicami iz sedimenta je bil centrifugiran pri 10.000 rpm, 5 min, sobna T ter bil zakisan z raztopino  $K_2Cr_2O_7$  v razmerju 1:100. Raztopina  $K_2Cr_2O_7$  je bila pripravljena tako, da je bilo v 50 ml koncentrirane HNO<sub>3</sub> raztopljeno 0,5 g  $K_2Cr_2O_7$  in dodano še 50 ml MiliQ vode. Zakisanim vzorcem so na Inštitutu za zdravstveno varstvo Maribor z metodo atomske fluorescentne spektrometrije izmerili koncentracije THg.

#### THg v celicah:

Vzorec gojišča s celicami vzet iz sedimenta je bil centrifugiran. Supernatant je bil zavržen, usedlina celic pa združena z usedlino, ki je ostala pri vzorcih za meritve izvenceličnega BDHg. V usedlini celic so z metodo atomske absorpcijske spektromerije izmerili THg na Inštitutu za zdravstveno varstvo Maribor.

#### 3.2.3.5 Rastne krivulje

Za bakterijske seve *E. coli* BL21, *P. fluorescens* CHA0, *P. stutzeri* Nico Boon in *J. lividum* DSM 1522 so bile, za potrebe normalizacije rezultatov BDHg in THg, narejene rastne krivulje. Bakterije so bile nacepljene v ustrezno gojišče in pri 6 različnih vrednostih optične gostote izmerjene pri 600 nm (OD<sub>600</sub>) valovne dolžine, celice pa preštete pod mikroskopom s pomočjo Petroff-Hauser komore. Nato so bili narisani grafi odvisnosti OD<sub>600</sub> od števila celic.

## 3.3 VPLIV CIANID IN SIDEROFOR PRODUCIRAJOČIH BAKTERIJ NA BIOLOŠKE TRANSFORMACIJE CINABARITA IN ELEMENTARNEGA ŽIVEGA SREBRA

### **3.3.1** Izolacija siderofor in cianid producirajočih bakterij iz sedimentov reke Idrijce

#### 3.3.1.1 Vzorčenje sedimenta na štirih lokacijah po reki Idrijci

Vzdolž reke Idrijce je bil na 4 različnih lokacijah vzorčen sediment. Vzorčna mesta so bila: Bela (tik nad zapornico, ki je nameščena nad pritokom Jezerščice iz Divjega jezera), Idrija – Kolektor (pri Kolektorju), Idrija – dimnik (potoček, ki teče po vznožju hriba na katerem stoji rudniški dimnik) in Spodnja Idrija (v naselju, pri mostu čez Idrijco). Na vsaki lokaciji je bil nabran sediment s sterilno žličko na treh različnih mikrolokacijah v sterilne centrifugirke.

Po prihodu v laboratorij so bili vzorci združeni v 3 centrifugirke. Iz posamezne centrifugirke je bilo vzeto 20 g sedimenta. Skupno 60 g sedimenta je bilo dodano 30 ml vode. Tako pripravljeni vzorci so bili stresani v 100 ml plastenkah na 3D rotacijskem stresalniku preko noči na sobni temperaturi.

Po inkubaciji s stresanjem sta bila iz posameznega vzorca odpipetirana 2 ml vzorca v epico. Iz vzorca so bile pripravljene redčitve od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ . Redčitve vzorcev od  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  so bile nacepljene na gojitvene plošče: hranilni agar (HA), 10x redčen hranilni agar (HA/10), hranilni agar z dodanim Hg (8,4 µg/ml) (HAHg), KingB plošče in KingB z dodanim Hg (8,4 µg/ml) (KingBHg). Plošče so bile inkubirane na 26 °C, 2 dni.

Kolonije, ki so se med seboj razlikovale po barvi, obliki ali velikosti so bile precepljene na nove plošče. Vse na novo zrastle precepljene kolonije so bile testirane za produkcijo cianida in sideroforov. Narejen je bil popis izoliranih kolonij, ki so bile razporejene glede na jakost produkcije cianida in sideroforov.

3.3.1.1.1 Priprava gojitvenih plošč

<u>Hranilni agar:</u>

Uporabljen je bil predpripravljen Nutrient agar No.1 (Sigma-Aldrich)

KingB plošče (1 l):

Pepton	20 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
Agar	15 g

#### Gojišča z dodanim živim srebrom:

Avtoklavirano gojišče je bilo ohlajeno na 50 °C, ki mu je bila dodana raztopina  $HgCl_2 v$  končni koncentraciji 8  $\mu g/ml$ .

3.3.1.1.2 Testiranje sevov na produkcijo sideroforov

<u>Priprava Chromazurol S (CAS) agarnih plošč</u> (Schwyn in Neilands, 1987), sestavljenih iz raztopine z barvilom in raztopine Pipes-a:

- Raztopina z barvilom (sestavljena iz Chromazurol S raztopine in HDTMA raztopine):

*Chromazurol S raztopina*: 60,5 mg Chromazurol S je bilo raztopljenega v 50 ml destilirane vode ter mu dodano 10 ml železo (III) raztopine. Železo (III) raztopina je bila pripravljena tako, da je bilo v 10 ml destilirane vode raztopljeno 2,7 mg FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O in dodano 8,29  $\mu$ l 37 % HCl.

*HDTMA raztopina*: V drugi čaši je bila pripravljena HDTMA raztopina tako, da je bilo 72,9 mg HDTMA raztopljenega v 40 ml vode.

Nato je bila med stalnim mešanjem Chromazurol S raztopina počasi prelita v HDTMA raztopino, da ni prišlo do penjenja. Raztopina je bila avtoklavirana pri 121 °C, 15 min.

- Raztopina Pipes-a

V 750 ml destilirane vode je bilo dodano 30,24 g Pipesa, 15 g agarja in 12 g 50 % raztopine NaOH. Raztopina je bila avtoklavirana pri 121 °C, 15 min.

Po avtoklaviranju raztopine z barvilom in raztopine Pipesa je bila raztopina z barvilom prelita v raztopino Pipesa, tako da se ni tvorila pena. Gojišče je bilo prelito v petrijevke.

Ko se je gojišče strdilo, je bila polovica gojišča odrezana s sterilnim skalpelom in prestavljena v novo petrijevko. Tako so bile dobljene petrijevke do polovice napolnjene s CAS agarjem. V drugo polovico petrijevke pa je bilo prilito eno izmed gojišč, ki je bilo uporabljeno pri izolaciji bakterijskih sevov iz sedimentov (NA, NAHg, KingB, KBHg, NA/10) (Slika 13).



Slika 13: Prikaz izdelane gojitvene plošče za preverjanje bakterijskih sevov za sintezo sideroforov Figure 13: Demonstration of a produced culture plate for the analysis of bacterial strains for the synthesis of siderophores

3.3.1.1.3 Testiranje sevov za produkcijo cianida

S HCN hemoglobinskim testom je bilo preverjeno, kateri izolati iz sedimenta so sposobni sintetizirati cianid. Test je povzet po članku von Rohr in sod. (2009).

#### Predpriprava bakterijskih kultur

Bakterijske kulture so bile nacepljene iz trdnega gojišča v 750 µl tekočega LB gojišča z glicinom. Gojišča so bila inkubirana preko noči. Zjutraj je bilo po 200 µl kulture napipetirano na mikrotitersko ploščo za meritev optične gostote (CellGrade<sup>TM</sup> 781960, BRAND, Nemčija). Preostala kultura je bila centrifugirana pri 14.000 rpm, 5 min in sobni T. Supernatant je bil uporabljen za meritev koncentracije HCN.

#### Izvedba hemoglobinskega testa

- Priprava reagenta:

Pripravljen je bil 4 mM NaNO<sub>2</sub> in 0,1 M PBS pufer. Nato je bilo zatehtano 17 mg hemoglobina (iz goveje krvi, H2500, Sigma-Aldrich), ki je bil raztopljen v 2,5 ml raztopine NaNO<sub>2</sub> in 2,5 ml PBS pufra.

- Priprava standardov:

Pripravljena je bila 50 mM KCN založna raztopina. Nato je bila iz založne raztopine pripravljena koncentracijska vrsta standardov (0, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu$ M).

- Meritev:

Na mikrotitersko ploščo za merjenje absorpcije, je bilo v jamice za standarde napipetirano 190 µl posameznega standarda in 10 µl reagenta, v jamice za vzorce pa 140 µl vode, 50 µl vzorca in 10 µl reagenta. Poleg vzorcev je bila v meritev vključena tudi negativna kontrola vzorca, kjer je bilo 50 µl vzorca zamenjanega s 50 µl svežega gojišča ter negativno kontrolo reagenta, kjer sta bila v jamice napipetirana le gojišče in voda brez reagenta. Tako pripravljena mikrotiter plošča je bila inkubirana 30 min v digestoriju, nato pa pri 425 nm izmerjena absorpcija z napravo SynergyH4 (BioTek, ZDA).

- Analiza rezultatov:

Iz rezultatov absorpcije standardov je bila narisana standardna krivulja absorpcije v odvisnosti od koncentracije HCN. Za vzorce je bila iz standardne krivulje izračunana koncentracija cianida.

#### 3.3.1.2 Izbor sevov

Iz seznama izoliranih bakterijskih sevov so bile izbrane 3 različne skupine Hg rezistentnih sevov: HCN+S-, HCN-S+ in HCN-S-. Sevi HCN+ sintetizirajo cianid, HCN- ne sintetizirajo cianida, S+ sintetizirajo siderofore in S- ne sintetizirajo sideroforov. Znotraj vsake skupine so bili izbrani po 4 predstavniki iz katerih je bila izolirana DNA, vzorci pa poslani na sekvenciranje (Macrogen, Nizozemska).

#### 3.3.1.2.1 Izolacija DNA iz čistih kultur

Po 100  $\mu$ l sterilne 5 % Chelex raztopine je bilo napipetirano v PCR epice. V raztopino je bila dodana 1 kolonija izbranega seva. Nato so bile epice inkubirane na 100 °C, 15 min. Po inkubaciji so bile epice centrifugirane 10 min pri 3000 rpm. 70  $\mu$ l tekoče faze je bilo odpipetirano v sveže epice.

#### 3.3.1.2.2 PCR izolirane DNA

PCR mešanica je bila sestavljena iz (1 vzorec):

-	10x Pufer (Life Technologies Corporation)	2,5 µl
-	MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
-	dNTP	0,5 µl
-	oligonukleotidni začetnik 27F (Jena Bioscience)	0,5 µl
-	oligonukleotidni začetnik 1495R (Jena Bioscience)	0,5 µl
-	Taq polimeraza (Life Technologies Corporation)	0,15 µl
-	MiliQ voda	18,35 µl
-	Vzorec	1 µl

Program pomnoževanja je bil sledeč:

- 35 ciklov: 95 °C 45 s 54 °C 45 s 72 °C 2 min - 72 °C 10 mi	-	95 °C	3 min
95 °C 45 s 54 °C 45 s 72 °C 2 min - 72 °C 10 mi	-	35 ciklov:	
54 °C 45 s 72 °C 2 min - 72 °C 10 mi		95 °C	45 s
72 °C 2 min - 72 °C 10 mi		54 °C	45 s
- 72 °C 10 mi		72 °C	2 min
	-	72 °C	10 min

#### 3.3.1.2.3 Preverjanje uspešnosti PCR

Uspešnost pomnoževanja genov je bila preverjena z agarozno gelsko elektroforezo, z 1 % agaroznim gelom, pripravljenim z 0,5x TBE pufrom (45 mM Tris baza, 45 mM borova kislina, 1 mM EDTA pH 8). Za vsak PCR produkt je bila pripravljena mešanica: 1,5 µl Loading Dye (#L0611, Thermo Scientific), 2 µl 2x Sybr Green I-a (Fluka,

BioChemika) in 4  $\mu$ l PCR produkta. Elektroforeza je potekala na 100 V za 25 min, v 0,5x TBE pufru. Nato je bil gel pregledan pod UV transiluminatorjem (BioRad, ZDA).

#### 3.3.1.2.4 Analiza rezultatov sekvenciranja

Dobljene sekvence so bile vnesene v RDPII bazo podatkov in bile primerjane s 16S rRNA zaporedji iz baze podatkov. Določen je bil rod posameznih sevov.

#### 3.3.2 Posreden kontakt cianid in siderofor producirajočih bakterij s HgS in Hg<sup>0</sup>

3.3.2.1 Izbor sevov in gojišč

Preglednica 5: Izbor sevov in njihovih gojišč za testiranje vpliva siderofor in cianid producirajočih bakterij na povečanje biološke dostopnosti Hg s posrednim kontaktom

 Table 5: The selection of strains and their media for testing the impact of siderophore and cyanide producing bacteria on an increase of the Hg bioavailability through an indirect contact

Rod in fenotip seva	Gojišče
Pseudomonas, HgR+HCN+S-	KingB modificirano gojišče
Arthrobacter, HgR+HCN-S+	Glukozno minimalno gojišče
Exiguobacterium, HgR+HCN-S-	Hranilno gojišče (glej poglavje 3.2.2.2.1)

#### 3.3.2.1.1 Priprava gojišč

KingB modificirano gojišče:

Pepton	20 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,5 g
$KH_2PO_4$	1,5 g

Sestavine so bile raztopljene v 1 l destilirane vode in gojišče avtoklavirano pri 121 °C, 15 min.

#### Glukozno minimalno gojišče (GMM) (1 l):

Glukoza	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	7,6 g
$KH_2PO_4$	3 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,24 g
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g

## 3.3.2.2 Izpostavitev izbranih bakterijskih sevov Hg<sup>0</sup> in HgS

Pred izvajanjem poskusa je bila vsa steklovina namočena vsaj 3 dni v 0,1 M HCl in pomita s Citranox detergentom (Alconox, Sigma), s čimer so bile odstranjene kovine v sledovih.

Poskus je bil izveden za vsak sev posebej. Stacionarna kultura izbranega seva je bila nacepljena v 9 erlenmajeric:

- $3 \text{ x gojišče s sterilno dializno vrečko z 1 ml Hg}^0$
- 3 x gojišče s sterilno dializno vrečko z 1 ml HgS raztopine 0,4 g/ml
- 3 x gojišče brez dodanega HgS ali Hg<sup>0</sup>

Predhodno pripravljene dializne vrečke so bile sterilizirane v čaši z vodo z avtoklaviranjem pri 100 °C za 20 min. Tik pred izvedbo poskusov so bile dializne vrečke s sterilno kapalko napolnjene z 1 ml Hg<sup>0</sup> oz. 1 ml HgS s koncentracijo 0,4 g/ml. Napolnjene dializne vrečke so bile še na drugem koncu zaprte s sponko in nameščene v erlenmajerico, v kateri je bilo 50 ml gojišča.

Vzorci so bili inkubirani na stresalniku v digestoriju na 150 rpm in sobni temperaturi (26–30 °C). Po 2 h, 4,5 h, 7 h in 23 h je bilo iz erlenmajeric vzetega 1 ml vzorca za meritev  $OD_{600}$  in 3 ml vzorca za meritve BDHg. Vzorci za meritve BDHg so bili centrifugirani pri 10.000 rpm, 5 min, sobna T. Supernatant je bil odpipetiran v sveže epice in bil shranjen pri -20 °C za meritve BDHg, koncentracije cianida in koncentracije sideroforov. Usedlina celic je bila prav tako shranjena pri -20 °C za izolacijo RNA.

#### 3.3.2.2.1 Meritve BDHg

V gojišče LB z dodanim ampicilinom (100  $\mu$ g/ml) je bila nacepljena 1 kolonija *E. coli* IND, v gojišče LB z dodanim tetraciklinom (10  $\mu$ g/ml) pa 1 kolonija *E. coli* CON. Prekonočni kulturi sta bili precepljeni v sveže LB gojišče z dodanim ustreznim antibiotikom in bili nagojeni do eksponentne faze rasti (OD<sub>600</sub> med 0,45 in 0,55). V mikrotiterske plošče (Corning, Costar 3693, ZDA) je bilo napipetirano po 75  $\mu$ l posameznega Hg standarda in po 75  $\mu$ l posameznega vzorca. Za vzorce so bile predhodno pripravljene redčitve. Nato je bilo v vse jamice (standardi in vzorci) napipetirano še 75  $\mu$ l celic (*E. Coli* IND/ *E. Coli* CON). Plošče z vzorci so bile inkubirane 1 h na 37 °C in 1.000 rpm (BioSchake, QInstruments, Nemčija), nato pa izmerjena luminiscenca (SynergyH4, BioTek, ZDA). Iz vrednosti luminiscence *E. coli* IND pri standardih je bila narisana standardna krivulja CPS v odvisnosti od

koncentracije HgCl<sub>2</sub> z upoštevanjem 4 parametričnega sistema. Iz izrisane funkcije je bila preračunana koncentracija Hg v vzorcih. Vsak vzorec je bil izmerjen 3x pri različnih redčitvah (med 10x in 1000x). Med biološkimi paralelkami posameznega vzorca so bili izračunani standardni odkloni. Rezultati luminiscence *E. coli* CON so bili uporabljeni za preverjanje morebitnih inhibicij.

#### 3.3.2.2.2 Meritve koncentracije sideroforov

Koncentracije sideroforov so bile izmerjene s SideroTec Assay kitom (Accuplex Diagnostics Ltd., Irska).

#### 3.3.2.2.3 Izolacija RNA

Modificirana metoda po Chomczynski in Sacchi (2006). Vsi reagenti so bili pripravljeni z deionizirano vodo, obdelano z dietil pirokarbonatom (DEPC voda). Ves uporabljen potrošni material je bil certificiran kot RNAze-free. Vse delovne površine so bile pred začetkom temeljito očiščene z etanolom in RNAze ZAP raztopino (Ambion, Life Technologies Corporation).

#### Priprava DEPC vode:

V 100 ml deionizirane vode je bilo dodano 0,2 ml DEPC, dobro premešano, stalo 15 min. Nato je bil DEPC inaktiviran z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 min.

#### Priprava denaturacijske raztopine:

Denaturacijska raztopina je vsebovala 4 M gvanidinijev izotiocianat, 25 mM natrijev citrat s pH 7 in 0,5 % (w/v) N-laurilsarkozin. Raztopina je bila pripravljena v steklovini, predhodno tretirani z DEPC in avtoklavirani. Raztopina je bila sterilizirana s filtracijo skozi injekcijski filter s porami velikosti 0,22  $\mu$ m (Milipore, ZDA). Tik pred uporabo je bil raztopini dodan še 0,7 % (v/v) 2-merkaptoetanol.

#### Priprava 2M natrijevega acetata:

16 g natrijevega acetata (brezvodnega) je bilo raztopljenega v 40 ml DEPC vode in 35 ml glacialne ocetne kisline. pH je bil z ocetno kislino uravnan na 4. Nato je bil z DEPC vodo volumen dopolnjen do 100 ml.

#### Postopek izolacije RNA:

V usedlino celic, ki je bila shranjena po gojitvenem poskusu pri -20 °C je bilo napipetirano 500  $\mu$ l denaturacijske raztopine. Vzorec celic resuspendiranih v

denaturacijski raztopini je bil prestavljen v epice s steklenimi kroglicami. Suspenzija je bila stresana 2 min v stresalniku Mill Mix 20 (Tehtnica, Slovenija) na 30 Hz. Po stresanju je bilo dodano 50 µl 2 M natrijevega acetata (pH 4), dobro premešano na vorteksu, dodano še 500 µl hladnega fenol/ kloroform/ izoamilalkohola (25:24:1, pH 4-5, Roth, Nemčija) in ponovno premešano na vorteksu. Mešanica je bila spet stresana 2 min pri 30 Hz, nato pa vzorci hlajeni na ledu 15 min. Po ohlajanju so bili vzorci centrifugirani pri 16.000 rpm, 4 °C, 20 min, vodna faza pa prenešena v nove sterilne epice. RNA je bila oborjena z dodatkom 500 µl izopropanola, vzorci inkubirani najmanj 1 h na -20 °C. Po inkubaciji so bili vzorci centrifugirani pri 16.000 rpm, 4 °C, 20 min in supernatant odlit. Precipitacija RNA je bila ponovljena tako, da je bila najprej raztopljena v 300 µl denaturacijske raztopine, dodano je bilo 300 µl izopropanola in vzorci inkubirani 30 min pri -20 °C. Po inkubaciji so bili vzorci centrifugirani pri 16.000 rpm, 4 °C, 15 min in supernatant odlit. Oborina je bila sprana z dodatkom 1 ml 75 % etanola, vorteksirana in inkubirana 5-10 min na sobni T. Nato je bila centrifugirana pri 16.000 rpm, 4 °C, 20 min, supernatant odpipetiran in oborina posušena v koncentratorju (Concentrator plus, Eppendorf, Nemčija). Posušene oborine so bile raztopljene v 40 µl DEPC vode ter vzorci shranjeni na -80 °C.

#### 3.3.2.2.4 Meritev koncentracije RNA

Koncentracije RNA so bile izmerjene s Take3 protokolom na SynergyH4. V posamezen razdelek sta bila napipetirana 2 µl vzorca in s SynergyH4 izmerjena absorpcija.

#### 3.3.2.2.5 Odstranitev DNA iz vzorcev izolirane RNA

Uporabljeni so bili reagenti Fermentas DNAze I (#EN0521, Fermentas, Life Technologies Corporation) in priloženi protokol nekoliko modificiran.

V 1  $\mu$ g RNA vzorca je bilo dodano 0,5  $\mu$ l RNAznega inhibitorja (20 U/ $\mu$ l; Life Technologies Corporation), 1  $\mu$ l 10x DNAznega pufra, 1,5  $\mu$ l DNAze in DEPC vode do 10  $\mu$ l. Vzorci so bili inkubirani 90 min na 37 °C. Nato je bila DNAzna aktivnost ustavljena z dodatkom 1  $\mu$ l 50 mM EDTA in inkubirana še 10 min pri 65 °C.

#### 3.3.2.2.6 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je bila narejena s High-capacity cDNA reverse transcription kit (kat. št. 4374966, Life Technologies Corporation) po originalnih navodilih.

V 10 µl vzorca tretiranega z DNAzo je bilo dodano 2 µl 10x RT pufra, 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10x RT naključnih primerjev, 1 µl encima Multiscribe<sup>TM</sup> reverzne transkriptaze, 1 µl RNaznega inhibitorja in 3,2 µl vode. Vzorec je bil narahlo premešan s pipeto in inkubiran v PCR bloku pod pogoji:

- 10 min 25 °C
- 120 min 37 °C
- 5 min 85 °C

3.3.2.2.7 Meritev koncentracije kopirane DNA

Koncentracija kopirane DNA (cDNA) je bila izmerjena z metodo DNAfluoroquant (interni protokol IMZT).

V sterilno epico je bil pripravljen Mastermix (za 1 vzorec):

-	sybr green I (5x koncentriran)	8 µl
-	MiliQ	30 µl

Mastermix je bil pripravljen za vse vzorce in za dva standarda. Standarda sta bila vzeta iz kita Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies Corporation) v koncentracijah 0 in 10 ng/ml DNA.

V jamice mikrotiterske plošče za merjenje fluorescence sta bila napipetirana po 2  $\mu$ l standardov in vzorcev ter dodano 38  $\mu$ l mastermix-a. Vzorci so bili inkubirani 5 min na sobni T, nato pa izmerjena fluorescenca na napravi SynergyH4. Eksitacija je bila pri 497 nm, emisija pa pri 520 nm. Iz vnesenih standardov je program iz linearne zveze med koncentracijo DNA in fluorescenco, izračunal koncentracijo DNA v vzorcu.

3.3.2.2.8 qPCR meritev ekspresije merA gena

Vzorcem po reverzni transkripciji je bila z metodo qPCR določena ekspresija gena *merA*. Sestava qPCR mešanice:

- voda	6,6 µl
- oligonukleotidni začetnik A5-nR (600nM)	1,2 µl
- oligonukleotidni začetnik A1s-nF (600 nM)	1,2 µl
- Maxim Sybr Green/ ROX qPCR Master mix (Thermo Scientific, ZDA	) 10 µl
- vzorec/ standard pR831b	1 µl
Program pomnoževanja je opisan v poglavju 3.1.5.	

#### 3.3.2.2.9 Priprava qPCR standarda

Izolacija plazmida za alkalno lizo (modificirano po Sambrook in Russell, 2001): Predpriprava raztopin:

Raztopina I glukoza 50 mM Tris HCl pH 8 25 mM EDTA 10 mM Raztopina II NaOH 0,2 M SDS 1 %

Ocetna kislina 11,5 ml Voda do 100 ml

Izolacijski postopek:

V LB gojišče z dodanim ampicilinom je bila nacepljena *E. coli* R831, kultura pa inkubirana preko noči na 37 °C, 250 rpm. 1,4 ml prekonočne kulture je bilo centrifugirane pri 14.000 rpm, sobni T, 6 min. Supernatant je bil odpipetiran in zavržen, usedlina celic pa resuspendirana v 100  $\mu$ l ledeno hladne raztopine I, nato pa vzorci inkubirani 5 min na sobni T. Po inkubaciji je bilo dodano 200  $\mu$ l raztopine II in vzorci premešani z rahlim obračanjem v epicah. Za precipitacijo je bilo dodano 150  $\mu$ l raztopine III, vorteksirano ter inkubirano 5 min na ledu. Po precipitaciji so bili vzorci centrifugirani 7 min na 14.000 rpm in sobni T. Supernatant (400  $\mu$ l) je bil prestavljen v nove epice, dodan je bil 2x volumen 96 % etanola (800  $\mu$ l) in vzorec precipitiran na sobni T 5 min. Po precipitaciji so bili vzorci centrifugirani pri 14.000 rpm, 5 min, na sobni T. Supernatant je bil odlit in v oborino dodano 750  $\mu$ l 70 % etanola. Sledilo je centrifugiranje pri 14.000 rpm, 5 min, na sobni T. Supernatant je bil odpipetiran in ob plinskem gorilniku oborina posušena. Posušena oborina je bila resuspendirana v 30  $\mu$ l MiliQ vode ter vzorec shranjen na -20 °C.

3.3.2.2.10 Obdelava rezultatov qPCR

Na vsako qPCR ploščo je bila poleg vzorcev nanešena tudi redčitvena vrsta standarda pR831b. Uporabljene so bile redčitve med  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ . Standardu je bila predhodno
izmerjena koncentracija z metodo DNAfluoroquant (opisana v poglavju 3.3.2.2.7). Iz Ct (treshold cycle) vrednosti, ki so bile dobljene iz različnih qPCR meritev so bile izračunane povprečne vrednosti, iz katerih je bil narisan graf odvisnosti Ct-ja od logaritemske vrednosti koncentracije standarda. Iz standardne krivulje so bile izračunane kopije gena v vzorcu. Nato je bilo iz kopij gena izračunano število molekul v vzorcu. Rezultati so bili normalizirani na celokupno koncentracijo cDNA. Koncentracije cDNA so bile izmerjene z metodo opisano v poglavju 3.3.2.2.7.

### 3.3.3 Neposreden kontakt cianid producirajočih bakterij s HgS in Hg<sup>0</sup>

3.3.3.1 Izbor bakterijskih sevov in gojišč:

Preglednica 6: Izbor sevov in njihovih gojišč za testiranje vpliva cianid producirajočih bakterij na povečanje biološke dostopnosti Hg z neposrednim kontaktom

Table 6: The selection of strains and their media for testing the impact of the cyanide producing
bacteria on an increase of the Hg bioavailability by a direct contact

Rod in fenotip seva	Gojišče		
Pseudomonas, HgR+HCN+S-	KingB modificirano gojišče		
Pseudomonas, HgR-HCN+S-	KingB modificirano gojišče		
Exiguobacterium, HgR+HCN-S-	Hranilno gojišče (glej poglavje 3.2.2.2.1)		
NB9, HgR-HCN-S-	Hranilno gojišče (glej poglavje 3.2.2.2.1)		

3.3.3.2 Izpostavitev izbranih bakterijskih sevov Hg<sup>0</sup> in HgS

Stacionarna kultura izbranega seva je bila nacepljena v 9 erlenmajeric:

- $3 \text{ x gojišče z dodanim 1 ml Hg}^0$
- 3 x gojišče z dodanim 0,2 g HgS
- 3 x gojišče brez dodanega HgS ali Hg<sup>0</sup>

 $Hg^0$  je bil dodan v 20 ml gojišča tik pred pričetkom izvedbe poskusa. HgS pa je bil predhodno natehtan v stekleničke, v katerih se je izvajal poskus, in bil skupaj s stekleničkami avtoklaviran. Po avtoklaviranju je bilo dodano 20 ml gojišča.

Vzorci so bili inkubirani na stresalniku v digestoriju na 150 rpm in sobni temperaturi (22-25 °C). Po 1 h, 3 h, 6 h in 22 h je bilo iz erlenmajeric vzetega 1 ml vzorca za nacepljanje na LB gojitvene plošče, za štetje celic in 3 ml vzorca za meritve BDHg. Vzorci za meritve BDHg so bili centrifugirani na 10.000 rpm, 5 min, sobna T. Supernatant je bil odpipetiran v nove epice in shranjen na -20 °C za meritve BDHg (glej

protokol v poglavju 3.3.2.2.1) in koncentracije HCN (glej protokol v poglavju 3.3.1.1.3).

### 3.3.3.2.1 Nacepljanje vzorcev na plošče

Iz vzorcev so bile pripravljene redčitvene vrste glede na predvideno število celic v vzorcu. Nato so bile zadnje 4 redčitve iz vrste kapljično nacepljene na LB plošče, po 50  $\mu$ l vzorca na kapljico. Pred nacepljanjem so bile plošče vsaj pol ure v stresalniku na 37 °C, da so bolje vpijale kapljice vzorcev. Ko so se kapljice posušile, so bile plošče postavljene v inkubator na 26 °C, da so kolonije zrasle do mere, ko jih je bilo mogoče prešteti.

3.3.3.3 Vpliv koncentracije živega srebra na sintezo cianida pri Hg nerezistentnem bakterijskem sevu

Preko noči je bil nagojen sev Pseudomonas, HgR-HCN+S-. Prekonočna kultura je bila prelita v centrifugirke in centrifugirana pri 9.000 rpm, 10 min. Supernatant je bil prelit v sterilno čašo, celice pa 3x sprane z 0,9 % NaCl. Po zadnjem spiranju so bile resuspendirane v 25 ml 0,9 % NaCl. V jamice na mikrotiterski plošči je bilo napipetirano po 5 ml gojišča KingB. Gojišču je bila dodana ustrezna količina raztopine HgCl<sub>2</sub> (končne koncentracije so bile: 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10000  $\mu$ g/l HgCl<sub>2</sub>). Kontrola ni vsebovala Hg. Vsi vzorci so imeli tri biološke paralelke. Po 2 h, 4 h in 6 h inkubacije je bilo vzeto 500  $\mu$ l vzorca za nacepitev vzorca na LB agarne plošče, za štetje celic, ter za meritve koncentracije cianida s HCN hemoglobinskim testom (glej protokol v poglavju 3.3.1.1.3).

### 4 REZULTATI

### 4.1 VPLIV BIOLOŠKO NEDOSTOPNIH OBLIK ŽIVEGA SREBRA NA POJAVLJANJE BAKTERIJ ODPORNIH NA ŽIVO SREBRO V REKI IDRIJCI

# 4.1.1 Vpliv onesnaženja z živim srebrom na sestavo bakterijskih združb v biofilmih

V reki Idrijci smo z analizami mikrobnih združb v biofilmih želeli ugotoviti, kakšen vpliv ima onesnaženje z živim srebrom na sestavo mikrobne združbe. Za analizo mikrobne združbe v biofilmih smo se odločili zaradi predpostavke, da so mikrobne združbe v biofilmih zaradi pritrjenosti na podlago in zaščite z zunanjim polisaharidnim ovojem dalj časa izpostavljene onesnaženju v primerjavi s planktonsko živečimi mikroorganizmi v vodi.

TTGE profili 16S rRNA genov bakterijskih združb se razlikujejo med posameznimi vzorčenji (zima, zgodnje poletje, pozno poletje). Na različno sestavo bakterijskih združb kažejo seštevki razdalj posameznih vej, kjer majhen seštevek pomeni manjše razlike v zgradbi bakterijskih združb med vzorci in obratno. Dendrogam narisan iz zimskih vzorcev ima zgoščene veje in seštevek razdalj je majhen (0,69) (Slika 14 A). Pri dendrogramu za zgodnje poletje je seštevek vej malo višji (1,06) (Slika 14 B), pri poznem poletju pa najvišji (1,45) (Slika 14 C). V zimskem času so si bile bakterijske združbe med seboj zelo podobne in TTGE profili 16S rRNA so se združili v le 2 skupini, medtem ko so se bakterijske združbe pozno poleti med vzorčnimi mesti dobro razlikovale, kar se kaže tudi v višji vrednosti skupnega seštevka razdalj posameznih vej.

Sestava bakterijske združbe na mestu onesnaženja (P1d) se je le v zimskem času jasno ločila od bakterijskih združb preostalih vzorčnih mest (Slika 14 A). Pri zgodnje poletnih vzorcih je po sestavi združbe najbolj izstopalo mesto P10 (Slika 14 B), pri pozno poletnih pa kontrolno mesto (C) (Slika 14 C).

Med sestavo mikrobnih združb (določena s TTGE metodo) in koncentracijo THg ni statistično značilne korelacije v katerikoli od sezonskih vzorčenj (Spearmanov korelacijski koeficient 0.6 pri p > 0.5).

А



В





Figure 14: Dendrograms calculated from the TTGE profiles of 16S rRNA genes sampled in the winter (A), the early summer (B) and the late summer (C) season

#### 4.1.2 Spremljanje števila in vrstne sestave na živo srebro odpornih bakterij

Ker analiza bakterijske združbe ni pokazala vpliva onesnaženja z živim srebrom na sestavo bakterijske združbe, smo se osredotočili na analizo številčnosti in diverzitete HgR bakterij, temelječo na klasičnih mikrobioloških metodah. Analizo smo naredili na vzorcih vode (planktonskih mikroorganizmih) in biofilma (pritrjenih mikroorganizmih).

A



В



Slika 15: Delež HgR bakterij med sezonami pri vzorcih vode (A) in biofilmov (B) Figure 15: Seasonal dependence of the HgR bacteria share in samples of water (A) and biofilms (B)

Delež HgR bakterij je bil glede na vse kulturabilne bakterije v vodnih vzorcih višji (najvišji delež HgR 28,5 %) kot v vzorcih biofilmov (najvišji delež HgR 6,5 %). Na kontrolnem vzorčnem mestu (C) so bile v vseh letnih časih HgR bakterije, tako

planktonske kot živeče v biofilmih odsotne, ali z deležem nižjim od 1 %. Na nasprotni strani se je delež HgR bakterij na viru onesnaženja ali na vzorčnih mestih po viru onesnaženja povečal tudi na 29 % (na mestu P1d, vzorec vode, pozno poleti) (Slika 15A).

V poletnih vzorcih vode so bili izmerjeni največji deleži HgR sevov na mestu P1d, čemur je sledilo postopno zmanjšanje tega deleža po reki navzdol (Slika 15A). Rezultati na mestu P1d niso statistično značilno različni od rezultatov na mestu P4 (p = 0,08 za par P1d/P4 pozno poleti in zgodaj poleti). V zimskem času smo izmerili največji delež HgR sevov na mestu vzorčenja P10, pri čemer rezultati na vzorčnih mestih P1d, P4 in P10 med seboj niso statistično značilno različni (p = 0,3 za para P1d/P4 in P4/P10, p =0,1 za par P1d/P10). Kontrolno mesto (C) se z nizkim deležem HgR bakterij razlikuje od onesnaženih območij v vseh letnih časih (p < 0,05; zgodaj poleti in pozimi je bilo število HgR enako nič).

Največji delež HgR sevov v biofilmih je bil izmerjen na mestu P4 zgodaj poleti in pozimi ter na mestu P10 pozno poleti (Slika 15B). Zgodaj poleti se mesto P4 močno (32,5x) razlikuje od mesta P1d (p < 0,05), medtem ko se pozimi deleži HgR sevov na mestih P1d in P4 niso statistično značilno razlikovali (p = 0,3 za par P1d/P4, meja zaupanja p = 0,05). Iz količine HgR sevov v vzorcih biofilmov je tako mogoče domnevati, da je vir onesnaženja med P1d in P4.

V nadaljevanju smo za vzorce zgodnjega poletja naredili še analizo bakterijskih vrst. Pridobljenih je bilo 27 HgR sevov iz vodnih vzorcev in 25 iz biofilma. Kulturabilne HgR bakterije so pripadale pretežno skupini Gamaproteobakterij. Med HgR bakterijami so prevladovale predstavnice rodu *Pseudomonas*. Poleg omenjenih so bile iz vzorcev vode izolirane še bakterije rodov: *Acinetobacter*, *Brevundimonas* in *Comamonas* (Slika 17) in vzorcev biofilmov: *Flavobacterium*, *Shewanella* in *Aeromonas* (Slika 16).

Največja raznolikost HgR bakterij je bila pri vzorcih vode na mestu P4 (7 različnih vrst, H = 1,305), najmanjša pa na mestih C (H = 0,692) in P10 (H = 0,656) (H = Schannanov diverzitetni indeks). Pri vzorcih biofilmov je bila največja raznolikost HgR bakterij na mestu P10 (9 različnih vrst, H = 1,891), najmanjša pa na mestu C (H = 0,735). Nizek diverzitetni indeks je bil opažen tudi na mestu P4 (H = 0,898). Korelacija med diverzitetnim indeksom H in THg ni bila statistično značilno različna (Spearmanov korelacijski koeficient = 0,2, p > 0,5).



Slika 16: Filogenetsko drevo narisano na podlagi zaporedij 16S rRNA genov izoliranih iz HgR bakterij v vzorcih biofilma

Figure 16: Phylogenetic tree drawn on the basis of the 16S rRNA gene sequences isolated from the HgR bacteria in the biofilm samples





Figure 17: Phylogenetic tree calculated on the basis of the 16S rRNA gene sequences isolated from the HgR bacteria in the water samples

### 4.1.3 Meritve *merA* gena v vzorcih vode in biofilma v različnih letnih časih

Rezultati prerazporejanja HgR bakterij so pokazali, da se deleži HgR bakterij med vzorčnimi mesti spreminjajo z letnimi časi. V nadaljevanju nas je zanimalo, kako letni časi vplivajo na prerazporejanje gena (*merA*) odgovornega za živo srebrovo rezistenco pri planktonskih mikroorganizmih (vzorci vode) in pritrjenih mikroorganizmih (vzorci biofilma).

Najnižja količina genov *merA* (p < 0.05) je bila izmerjena na kontrolnem mestu (C), in sicer pri vseh treh vzorčenjih (zgodnje poletno, pozno poletno in zimsko vzorčenje) tako v vzorcih vode, kakor tudi v vzorcih biofilmov (Slika 18).

V vzorcih vode je bilo najvišje število kopij gena *merA* izmerjeno na mestu P1d tako v poznem poletju (število kopij gena 2145,5  $\pm$  789, p < 0,05), kot tudi pozimi (število kopij gena 42,1  $\pm$  13,8, p < 0,05 za vse kombinacije para). V vzorcih poznega poletja je bilo opaženo postopno zniževanje števila kopij *merA* gena od mesta P1d do mesta P11 (P1: 2145  $\pm$  788,9; P4: 630,9  $\pm$  226,6; P10: 270,9  $\pm$  62,3; P11: 36,7  $\pm$  1,7, lokacije imajo medsebojno precej različno količino genov, p < 0,05). Za vzorce, zbrane v zgodnjem poletju in pozimi, ni bilo opaziti trenda linearnega zniževanja kopij *merA* gena od mesta P1d navzdol (Slika 18A).

V vzorcih biofilmov je bilo najvišje število kopij gena *merA* ugotovljeno na mestu P4 (6069 ± 511, p < 0,05) v zgodnje poletnih vzorcih, na mestu P10 (15232 ± 1858, p < 0,05) v pozno poletnih vzorcih in na mestu P4 (102.053 ± 724, p < 0.05) v vzorcih zime (Slika 18B).

Spearmanov koeficient korelacije med koncentracijo genov *merA* in CFU vrednostmi izolatov HgR je bil visok (Spearmanov test > 0.8; p < 0.5).





В

Slika 18: Število kopij *merA* gena normaliziranih na celokupno koncentracijo DNA v vzorcu pri sezonskem vzorčenju vode (A) in biofilmov (B)

Figure 18: The number of the gene *merA* normalized to the total DNA concentration in the seasonal sampling samples in the water (A) and the biofilms (B)

#### 4.1.4 Meritve merA gena in THg v vzorcih gradienta

Z namenom, da bi ugotovili kako se koncentracije *merA* gena spreminjajo z gradientom onesnaženosti in ali le-te korelirajo s koncentracijami THg, smo naredili analizo *merA* gena od vira onesnaženja navzdol. Analizo smo naredili v pozno poletnem času. Rezultati *merA* gena so bili normalizirani tako na celokupno koncentracijo DNA (Sliki 19A, 19B), kot tudi na število kopij 16S rRNA gena (Sliki 20A, 20B). Najvišja koncentracija THg je bila izmerjena na mestu pri viru onesnaženja (P1a) (Sliki 19A, 20A). Najvišje število *merA* gena je bilo pri normalizaciji na celokupno koncentracijo

DNA izmerjeno pri čistilni napravi (P3) (Slika 19A), pri normalizaciji na število kopij 16S rRNA gena pa na mestih P1c in P7 (Slika 20A).

300 P1a R<sup>2</sup>=0,0071 250 THg (µg/g suhe teže) 200 150 100 P1c P2 P4 50 P3 P1 0 P8 P5 P9 Pf <sup>C</sup> 0 P10 5 10 15 št. kopij merA gena/ celokupna DNA 70  $R^2 = 0,83$ 60 P2 50 P4 THg (µg/g suhe teže) 40 P6 30 P 20 P5⊮ P7 P8 10 10 0 2 5 6 7 6 1 3 4 št. kopij merA gena/ celokupna DNA

А

В

Slika 19: Korelacija med THg in številom kopij gena *merA*, normaliziranim na celokupno koncentracijo DNA ob upoštevanju vseh vzorčnih mest (A) in po izključitvi vzorčnih mest z diskrepanco (B)

Figure 19: Correlation between the THg and the number of gene *merA* copies normalized to the total concentration of DNA for all the sampling sites (A) and for the sampling sites where the sites with discrepances are excluded (B)

Porazdelitvi koncentracij THg v vzorcih biofilmov z zelo podobnim vzorcem sledijo vrednosti števila kopij *merA* gena, razen treh izjem (vzorčna mesta P1, P3 in P7). Na grafu korelacije med THg in količino gena *merA*, normaliziranega na totalno koncentracijo DNA, je prišlo na vzorčnem mestu P1a (visoke koncentracije THg in majhno št. *merA* genov) in P3 (majhna koncentracija THg in veliko število *merA* genov) do diskrepance med koncentracijo THg in številom *merA* genov, kar je pripeljalo do

odsotnosti korelacije med THg in *merA* genom ( $P^2 = 0$ ) (Sliki 19A, 20A). Po izključitvi petih lokacij v bližini vira onesnaženja (mesta P1a do P1e), je bilo pri analizi korelacij opaženo postopno povečanje koeficienta korelacije. Dodatna izključitev mesta P3 iz analize, zaradi vpliva odpadnih voda iz čistilne naprave, je vodila do linearnega regresijskega koeficienta R<sup>2</sup> = 0,83 (Slika 19B) pri rezultatih normaliziranih na celokupno koncentracijo DNA. Še večji linearni regresijski koeficient smo izračunali med številom *merA* kopij gena normaliziranih na 16S rRNA in koncentracijo THg, saj je le-ta ob izključitvi mesta P7 iz analize dosegel vrednost R<sup>2</sup> = 0,94 (Slika 20B).

300  $R^2 = 0.0002$ P1a 250 THg (µg/g suhe teže) 200 150 100 P1b P2 P4 P1c  $\overline{\diamond}$ ⊣∕≻ 50 P1d 0 P7 10 P110 2 3 4 1 5 št. kopij merA gena/ št. kopij 16S rRNA 70  $R^2 = 0.94$ 60 P2 THg (µg/g suhe teže) 50 40 P6 30 P9 P5 20 P8 10 P1 10 0 C 0 0,25 0,5 0,75 1 1,25 1,5 št. kopij merA gena/ št. kopij 16S rRNA

Slika 20: Korelacija med THg in številom kopij gena *merA*, normaliziranim na število kopij gena 16S rRNA ob upoštevanju vseh vzorčnih mest (A) in po izključitvi vzorčnih mest z diskrepanco (B)

Figure 20: Correlation between the THg and the number of gene *merA* copies normalized to the number of copies of the 16S rRNA gene for all the sampling sites (A) and for sampling sites where the sites with discrepances are excluded (B)

#### А

В

#### 4.2 VPLIV BAKTERIJ NA POVEČANJE BIOLOŠKO DOSTOPNE FRAKCIJE ŽIVEGA SREBRA V SEDIMENTIH

# 4.2.1 Vpliv bakterijskih izvenceličnih produktov na povečanje biološko dostopne frakcije živega srebra v sedimentih

V preliminarnem poskusu, kjer smo testirali vpliv izvenceličnih produktov na povečevanje biološke dostopnosti živega srebra v sedimentih reke Idrijce, smo po 12 h in 36 h inkubaciji supernatantov stacionarnih celičnih kultur s sedimenti iz Idrijce z biosenzorskimi celicami izmerili povečane koncentracije BDHg v vzorcih Idrije in Spodnje Idrije. V sedimentih iz Bele (kontrolno mesto, nad virom onesnaženja) so bile pri vseh vzorcih koncentracije BDHg pod mejo detekcije.

Med vzorci, ki so bili inkubirani v sedimentih iz Idrije, so po 12 h inkubaciji najbolj k povišanju koncentracij BDHg pripomogli celični produkti *P. aeruginose*, najmanj pa sveže hranilno gojišče (NB). Med vzorci, ki so bili 12 h inkubirani v sedimentih iz Spodnje Idrije, so k povečanju BDHg najbolj pripomogli celični produkti *P. fluorescens*, najmanj pa NB. Celični produkti *E. coli*, gojene v Luria gojišču (LB), so po 12 h in 36 h izpostavitvi, v primerjavi s svežim LB gojiščem, statistično značilno različno (p < 0,05) manj pripomogli k luženju živega srebra iz sedimentov. Večje koncentracije BDHg so bile izmerjene tudi pri negativni kontroli, ultra čisti vodi, kjer se je v Idrijskih sedimentih po 12 h izpostavitvi izlužilo kar 6 µg/l BDHg, le-ta pa je po 36 h izpostavitvi padel pod spodnjo mejo detekcije (Slika 21).

Po 36 h inkubaciji so se pri večini vzorcev koncentracije BDHg zmanjšale pod spodnjo mejo detekcije, razen pri vzorcu *P. aeruginosi* in NB, kjer so se koncentracije za 2x oz. 3x povečale ob izpostavitvi sedimentu iz Idrije. Pri vzorcih, izpostavljenih sedimentom iz Sp. Idrije, je bilo mogoče izmeriti BDHg le pri NB (Slika 21B).

V vzorcih *P. aeruginose*, *P. fluorescens*, *B. subtilis*, *E. coli* gojenih v NB ter svežem NB, ki so bili izpostavljeni sedimentu iz Sp. Idrije, smo tudi kemijsko izmerili koncentracije THg, toda le-te so bile pod mejo detekcije. Vzrok je bil verjetno v predpripravi vzorcev, za katere predvidevamo, da so bili preveč redčeni.

25 20 HgCl2 (µg/l) 15 10 🗆 Bela 5 🗆 Idrija ■ <sub>Sp.</sub> 0 E.COIILB E.COHNB ultratista vodi P. aerueinosa P. Huorescens B. subtilis 20 Idrija oznaka vzorca 25 20 HgCl2 (µg/l) 15 10 5 🗆 Bela 0 utratista voda E.COIILB Idrija E.COIINB Subtilis NB P. 3eruginos P. Huoresce ■ <sub>Sp.</sub> Idrija

oznaka vzorca

Slika 21: Koncentracije BDHg po (A) 12 h in (B) 36 h izpostavitvi supernatantov stacionarnih celičnih kultur različnih bakterijskih vrst sedimentom iz Bele, Idrije in Sp. Idrije

Legenda: NB – hranilno gojišče, LB – Luria gojišče, E. coli NB – E. coli gojena v NB, E. coli LB – E. coli gojena v LB, E. – Escherichia, P. – Pseudomonas, B. – Bacillus

Figure 21: Concentrations of the BAHg after (A) 12 h and (B) 36 h exposure of supernatants of stationary cell cultures of different bacterial species to the sediments from Bela, Idrija and Sp. Idrija

Legend: NB - nutrient broth, LB - Luria agar, E. coli NB - E. coli grown in NB, E. coli LB - E. coli grown in LB, E. – Escherichia, P. - Pseudomonas, B. - Bacillus

# 4.2.2 Vpliv metabolno različnih mikroorganizmov na povečanje biološko dostopne frakcije živega srebra v sedimentih

Pri testiranju vpliva po metabolizmu različnih mikroorganizmov na koncentracije BDHg v sedimentih, so bili rečnemu sedimentu iz Idrije izpostavljeni: (1) supernatant

А

prekonočne kulture (S), (2) suspenzija bakterijskih celic (C), ali pa (3) sveže gojišče (G). Vsi vzorci so bili inkubirani v štirih različnih časovnih intervalih (1 h, 3 h, 6 h in 24 h). Rezultati na sliki 22 nam prikazujejo izmerjene koncentracije BDHg za posamezen vzorec v vseh časovnih intervalih. Vzorci S, pri katerih so bile koncentracije BDHg v vseh časovnih intervalih najvišje (nad 1 µg/l), so: *B. subtilis, B. atrophaeus, J. lividum, L. acidofilus* in *S. oneidensis*. Vzorci S, pri katerih je bila koncentracija BDHg le po 24 h inkubaciji nad 1 µg/l, so: *N. vulgaris, E. coli* in *B. diminuta*. Vzorci C, pri katerih so bile koncentracije BDHg v vseh časovnih intervalih najvišje, so: *B. subtilis, B. atrophaeus, J. lividum*. Vzorci G, pri katerih so bile koncentracije BDHg v vseh časovnih intervalih najvišje, so: *Bacillus, N. vulgaris, E. coli* in *S. oneidensis*. Pri vzorcih *R. pisi* S, C in G so bile pri vseh časovnih inkubacijah koncentracije BDHg najnižje in pod 1 µg/l. Pri vzorcih *A. vinelandii* S, C in G pa so bile koncentracije BDHg pod spodnjo mejo detekcije. Vzorci *P. fluorescens* S, C in *P. stuteri* S so imeli koncentracije BDHg v vseh časovnih intervalih v rangu 1 µg/l.



Slika 22: Koncentracije BDHg (μg/l) vzorcev 1) supernatantov izbranih stacionarnih kultur (S), 2) suspenzije bakterijskih celic izbranih bakterijskih sevov (C) in 3) gojišč, v katerih so bili posamezni sevi gojeni (G), izpostavljenih sedimentu iz reke Idrijce v štirih časovnih intervalih (1 h, 3 h, 6 h in 24 h)

Standardni odkloni prikazujejo odklone med biološkimi paralelkami. Legenda: B. subtilis - Bacillus subtilis, B. atrophaeus - Bacillus atrophaeus, J. - Janthinobacterium, N. - Nitrobacter, R. - Rhizobium, L. - Lactobacillus, E. - Escherichia, B. diminuta - Brevundimonas diminuta, S. - Schewanella, A. - Azotobacter, P. - Pseudomonas

Figure 22: BAHg concentration ( $\mu g/l$ ) of samples of 1) supernatants of selected stationary cultures (S), 2) suspension of bacterial cells of selected bacterial strains (C) and 3) media, in which individual strains were grown (G), exposed to the sediment from the Idrijca river for four time intervals (1 h, 3 h, 6 h and 24 h)

The standard deviations show the deviations between biological replikates. Legend: B. subtilis - Bacillus subtilis, B. atrophaeus - Bacillus atrophaeus, J. - Janthinobacterium, N. - Nitrobacter, R. - Rhizobium, L. - Lactobacillus, E. - Escherichia, B. diminuta - Brevundimonas diminuta, S. - Schewanella, A. - Azotobacter, P. - Pseudomonas

Z namenom, da bi lažje med seboj primerjali rezultate posameznih sevov in določili kateri izmed sevov najbolj pripomorejo k povečevanju koncentracij BDHg, smo izračunali deleže BDHg pri S in C glede na koncentracijo BDHg v G. Rezultati deležev BDHg glede na kontrolo (Slika 23) pokažejo, da so med vzorci S v prvih treh časovnih intervalih (1 h, 3 h in 6 h) največji vpliv na povečevanje BDHg imeli sevi: *P. fluorescens, P. stutzeri* in *L. acidofilus.* Sledijo jim sevi *J. lividum, B. atrophaeus* in *B. subtilis* in nazadnje *R. pisi.* Enak rezultat je viden tudi za vzorce C, pri čemer odvzamemo vzorec *P. stutzeri.* Vzorca *B. diminuta* S in C sta po le 1 h inkubaciji minimalno pripomogla k povečanju BDHg, vzorec *S. oneidensis* po 1 h in 24 h ter vzorec *P. stutzeri* C po 1 h in 3 h. Vzorci *N. vulgaris* S in C, *E. coli* S in C ter *S. oneidensis* C niso v nobenem časovnem intervalu pripomogli k povečanju BDHg.



Slika 23: Deleži BDHg za vzorce supernatantov izbranih stacionarnih kultur (S) in suspenzije bakterijskih celic (C) izračunanih iz koncentracij BDHg, glede na koncentracije BDHg v gojišču (G)

Legenda: B. subtilis - Bacillus subtili, B. atrophaeus – Bacillus atrophaeus, J. – Janthinobacterium, N. – Nitrobacter, R. – Rhizobium, L. – Lactobacillus, E. – Escherichia, B. diminuta – Brevundimonas diminuta, S. – Schewanella, A. – Azotobacter, P. – Pseudomonas

Figure 23: The BAHg shares for selected samples of supernatants of stationary cultures (S) and the suspension of bacterial cells (C) calculated from the BAHg concentrations, in the dependence on the BAHg concentration in the medium (G)

Legend: B. subtilis - Bacillus subtilis, B. atrophaeus - Bacillus atrophaeus, J. - Janthinobacterium, N. -Nitrobacter, R. - Rhizobium, L. - Lactobacillus, E. – Escherichia, B. diminuta - Brevundimonas diminuta, S. - Schewanella, A. - Azotobacter, P. – Pseudomonas

# 4.2.3 Vpliv izvenceličnih produktov in direktnega kontakta celic na povečanje biološko dostopne frakcije živega srebra v sedimentih

Z namenom, da bi ugotovili na kakšen način, posredno preko produktov metabolizma ali neposredno z direktnim kontaktom celic, bakterije vplivajo na povečanje biološko

dostopne frakcije Hg, smo naredili serijo poskusov, kjer smo na manjših vzorcih sedimenta še enkrat testirali vpliv izvenceličnih produktov ter vpliv direktnega kontakta celic s sedimentom na povečevanje koncentracij BDHg. Pri poskusih smo uporabili seve, za katere se je v predhodnih poskusih izkazalo, da vplivajo na povečevanje biološko dostopne frakcije Hg iz sedimentov. Poleg tega smo ponovili poskuse še z *E. coli*, kjer biološko dostopno frakcijo Hg ne povečuje bakterijski sev, ampak gojišče (LB), v katerem bakterija raste.

### 4.2.3.1 Vpliv izvenceličnih produktov na povečanje koncentracije BDHg v sedimentih

Tokrat smo pri poskusu testiranja izvenceličnih produktov na povečevanje koncentracij BDHg iz sedimentov supernatante stacionarnih bakterijskih kultur inkubirali z nesterilnim sedimentom le 2 krajša časovna intervala, z namenom, da zaznamo učinek sekundarnih metabolitov izbranih bakterijskih sevov in ne učinka mikroorganizmov, ki so bili naravno prisotni v sedimentu. Bakterija E. coli je bila gojena v LB gojišču, vse preostale bakterije pa v NB gojišču. Rezultati koncentracij BDHg (Slika 24) in iz le-teh preračunanega deleža BDHg glede na koncentracije BDHg v kontroli (LB) (Slika 25) so ponovno pokazali, da sekundarni metaboliti E. coli nimajo vpliva na transformacije živega srebra. Po 1 h in 3 h izpostavitvi je bil namreč delež BDHg vzorca E. coli manjši od BDHg LB gojišča. Poleg vzorca E. coli, je bil delež BDHg v primerjavi s kontrolo (NB) manjši tudi pri P. stutzeri. K povečevanju BDHg so že po 1 h inkubaciji prispevali vzorci: J. lividum, B. atrophaeus, B. subtilis in P. fluorescens, po 3 h inkubaciji pa: B. atrophaeus, B. subtilis in P. fluorescens. Statistično značilni rezultati v primerjavi z NB gojiščem so pri vzorcih B. atrophaeus, B. subtilis in P. stutzeri. Pri 3 h inkubaciji se kaže preobrat, saj nobeden izmed vzorcev ni tvoril statistično značilno več BDHg kot kontrola NB. Pri inkubaciji ultra čiste vode s sedimentom ni prišlo do tvorbe BDHg. Pri večini vzorcev ni bilo statistično značilne razlike med 1 h in 3 h inkubacijo (razen vzorcev P. stutzeri in NB).



## Slika 24: Primerjava koncentracij BDHg v vzorcih izvenceličnih produktov in njihovih kontrol (LB, NB, ultra čista voda), izpostavljenih sedimentu v dveh časovnih intervalih (1 h in 3 h)

Standardni odkloni prikazujejo odklone med biološkimi paralelkami. Bakterija *E. coli* je bila gojena v LB gojišču, vse preostale bakterije pa v NB gojišču. Legenda: *E. – Escherichia, J. – Janthinobacterium, B. – Bacillus, P. – Pseudomonas,* LB – Luria gojišče, NB – hranilno gojišče

## Figure 24: A comparison of the BAHg concentrations in the samples of extracellular products and their controls (LB, NB, ultra pure water), exposed to the sediment in two time intervals (1 h, 3 h)

The standard deviations show the deviations between biological replicates. The bacterium *E. coli* was grown in LB medium, and all the remaining bacteria in the NB medium. Legend: *E. – Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas*, LB - Luria broth, NB - nutrient broth



#### Slika 25: Deleži BDHg vzorcev, izračunani glede na koncentracije BDHg kontrole

Pri vzorcu *E. coli* je bil za kontrolo upoštevan vzorec LB, pri vseh ostalih bakterijskih sevih pa vzorec NB. Legenda: *E. – Escherichia, J. – Janthinobacterium, B. – Bacillus, P. – Pseudomonas* 

## Figure 25: Shares of the BAHg samples calculated according to the concentrations of the BDHg control

In the case of sample *E. coli* has been taken into account for the control sample of LB, all other bacterial strains, the sample NB. Legend: *E. – Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas* 

V vzorcih supernatanta stacionarnih bakterijskih kultur, 1 h inkubiranega v sedimentu, smo izmerili tudi koncentracije THg (Slika 26). Pri rezultatih THg v vzorcu ultra čiste vode, inkubiranega s sedimentom se pokaže, da ne le, da ultra čista voda nima vpliva na tvorbo BDHg, ampak da se tudi nobena druga oblika živega srebra ni izlužila v vodo, kljub inkubaciji s stresanjem. Če primerjamo vzorce z njihovimi kontrolami (Slika 27), ugotovimo, da je bilo največ THg v vzorci *P. fluorescens*, sledijo mu *B. subtilis, E. coli* in *P. stutzeri*. Pri *B. atrophaeus*-u je bil delež BDHg v primerjavi s kontrolo zelo podoben, pri *J. lividum* pa za 10 % manjši. Statistično značilni rezultati v primerjavi s kontrolo so le pri vzorci *P. fluorescens*.



## Slika 26: Primerjava koncentracij THg v vzorcih izvenceličnih produktov in njihovih kontrol (LB, NB, ultra čista voda) 1 h izpostavljenih sedimentu

Bakterija *E. coli* je bila gojena v LB gojišču, vse preostale bakterije pa v NB gojišču. Standardni odkloni prikazujejo odklone med biološkimi paralelkami. Legenda: *E. – Escherichia, J. – Janthinobacterium, B. – Bacillus, P. – Pseudomonas,* LB – Luria gojišče, NB – hranilno gojišče

## Figure 26: Comparison of the THg concentrations in samples of extracellular products and their controls (LB, NB, ultra-pure water) for 1 h exposure to the sediment

The bacterium *E. coli* was grown in LB broth, and all the other bacteria in the NB broth. The standard deviations show the deviations between biological replicates. Legend: *E. – Escherichia, J. – Janthinobacterium, B. – Bacillus, P. – Pseudomonas,* LB – Luria broth, NB – nutrient broth



#### Slika 27: Deleži THg izračunani glede na koncentracije THg kontrole

Pri vzorcu *E. coli* je bil za kontrolo upoštevan vzorec LB, pri vseh ostalih bakterijskih sevih pa vzorec NB. Legenda: *E. - Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas* 

#### Figure 27: THg shares calculated according to the concentration of the THg control

In the case of *E. coli*, LB sample has been taken into account for the control, while the pattern NB has been taken for all other bacterial strains. Legend: *E. - Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas* 

Iz koncentracij BDHg in THg smo za vse vzorce izračunali deleže BDHg glede na THg (Slika 28). Največji delež BDHg se je tvoril v LB gojišču, med bakterijskimi vzorci pa pri *E. coli*. Med vzorci *E. coli*, *J. lividum* in *B. atrophaeus* so razlike minimalne v rangu 0,1 %. Najmanjši delež BDHg v primerjavi s THg je bil pri vzorcu *P. stutzeri*. Pri ultra čisti vodi so bile koncentracije BDHg in THg pod spodnjo mejo detekcije.



Slika 28: Deleži BDHg glede na THg pri vzorcih supernatantov stacionarnih bakterijskih kultur

Legenda: E. - Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas

Figure 28: BAHg shares in dependence on the THg in the samples of supernatants of the stationary bacterial cultures

Legend: E. - Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas

# 4.2.3.2 Razvoj metode za preverjanje vpliva direktnega kontakta bakterijskih celic na povečanje koncentracij BDHg v sedimentih

Ker iz literature še ni bilo nič znanega o tovrstnih testiranjih smo morali sprva s preliminarnimi poskusi optimizirati protokol. Testirali smo štiri različne protokole za preverjanje vpliva direktnega kontakta celic na biološke transformacije Hg v sedimentih. Rezultati testiranja so pokazali, da so celice sposobne najbolj učinkovito transformirati Hg iz sedimentov v biološko dostopno obliko Hg, kadar so v direktnem kontaktu s sedimentom (Slika 29 – oznaka »suho«), brez dodanega vodnega medija (MiliQ, LB, NaCl).



## Slika 29: Primerjava koncentracij THg znotraj *E. coli* celic pri testiranju štirih metodologij inkubacije celic s sedimentom

Legenda: Suho – celice so bile premešane s sedimentom brez dodane kakršnekoli tekočine, MiliQ – celice smo resuspendirali z 1 ml MiliQ vode in jim dodali sediment, LB - celice smo resuspendirali z 1 ml LB gojišča in jim dodali sediment, NaCl - celice smo resuspendirali z 1 ml 0,9 % NaCl raztopine in jim dodali sediment (MiliQ – ultra čista voda; LB – Luria gojišče)

## Figure 29: Comparison of the THg concentrations within *E. coli* cells when tested by four incubation methodologies of cells with sediment

Legend: Suho - cells were mixed with the sediment without any liquid added, MiliQ - cells were resuspended with 1 ml of MiliQ water and were incubated with sediment, LB - the cells were resuspended with 1 ml of LB broth and were incubated with sediment, NaCl - cells were resuspended with 1 ml of 0,9 % NaCl solution and were incubated with sediment (MiliQ - ultra pure water; LB - Luria broth)

4.2.3.3 Vpliv direktnega kontakta celic na povečanje koncentracij BDHg v sedimentih

Pri testiranju neposrednega kontakta celic na povečanje koncentracije BDHg iz sedimenta smo BDHg izmerili zunaj celic (izvenceličen BDHg) in znotraj celic (znotrajceličen BDHg). Pri poskusu smo uporabili seve *E. coli* rastoče v LB gojišču in

J. lividum, B. atrophaeus, B. subtilis, P. stutzeri in P. fluorescens, ki so rastle v NB gojišču.

Rezultati izvenceličnega BDHg (Slika 30) kažejo statistično značilne razlike v koncentraciji BDHg med bakterijskimi vzorci. Izkazalo se je, da so bile bakterije *J. lividum* in *B. atrophaeus* najbolj učinkovite pri zunajceličnem povečevanju biološko dostopne frakcije živega srebra iz sedimentov, medtem ko *B. subtilis* in *P. fluorescens* nimata zunajceličnega vpliva na biološke pretvorbe živega srebra. Primerjava rezultatov 1 h in 3 h inkubacije je pokazala, da med njimi ni statistično značilne razlike.



Slika 30: Primerjava koncentracij BDHg zunaj celic med različnimi bakterijskimi vzorci

Standardni odkloni prikazujejo odklone med biološkimi paralelkami. Legenda: E. – Escherichia, J. – Janthinobacterium, B. – Bacillus, P. – Pseudomonas

## Figure 30: Comparison of the BAHg concentrations outside the cells between different bacterial samples

The standard deviations show the deviations between biological replicates. Legend: *E. – Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas* 

Rezultati vsebnosti BDHg znotraj celic (Slika 31) prikazujejo najvišjo koncentracijo BDHg pri vzorcu *B. atrophaeus*, ki je vsaj za 1,2x višja od koncentracij preostalih vzorcev. Seva, ki prav tako kažeta na privzem Hg v celice, sta *P. fluorescens* in *P. stutzeri*. Pri *J. lividum* so bile vrednosti BDHg na meji detekcije, pri *E. coli* in *B. subtilisu* pa so bile vrednosti BDHg pod mejo detekcije.



Slika 31: Primerjava koncentracij BDHg znotraj celic med različnimi bakterijskimi vzorci

Standardni odkloni prikazujejo odklone med biološkimi paralelkami. Legenda: E. – Escherichia, J. – Janthinobacterium, B. – Bacillus, P. – Pseudomonas

**Figure 31: Comparison of the BAHg concentrations within cells between different bacterial samples** The standard deviations show the deviations between biological replicates. Legend: *E. – Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. – Pseudomonas* 

Vsebnost Hg znotraj celic je bila izmerjena tudi s kemijskimi meritvami. Meritve kažejo na največjo prisotnost Hg v celicah *P. stutzeri*, z večjimi odstopanji med biološkimi paralelkami. Najmanjše koncentracije THg so bile izmerjene pri *J. lividum* (Slika 32).



Slika 32: Primerjava koncentracij THg znotraj celic med različnimi bakterijskimi vzorci

Standardni odkloni prikazujejo odklone med biološkimi paralelkami. Legenda: E. – Escherichia, J. – Janthinobacterium, B. – Bacillus, P. – Pseudomonas

#### Figure 32: Comparison of the THg concentrations within cells between different bacterial samples

The standard deviations show the deviations between biological replicates. Legend: *E. – Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas* 



Slika 33: Koncentracija THg in koncentracija BDHg normalizirani na število celic v vzorcu

Standardni odkloni prikazujejo odklone med biološkimi paralelkami. Legenda: E. – Escherichia, J. – Janthinobacterium, B. – Bacillus, P. – Pseudomonas

Figure 33: The THg and BAHg concentrations normalized to the number of cells in the sample

The standard deviations show the deviations between biological replicates. Legend: E. – Escherichia, J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas

Rezultate znotrajceličnega BDHg smo normalizirali na število celic, ki smo jih preračunali iz rastnih krivulj. Ob upoštevanju števila celic se izkažejo celice seva *P. stutzeri* kot najbolj učinkovite pri privzemanju Hg v celice. V te rezultate ni bilo mogoče vključiti še sevov *B. subtilisa* in *B. atrophaeusa*, ker sta tvorila nitaste strukture, zaradi katerih ni bilo mogoče šteti posamičnih celic (Slika 33).



Slika 34: Delež BDHg glede na koncentracije THg Legenda: *E. – Escherichia, J. – Janthinobacterium, B. – Bacillus, P. – Pseudomonas* Figure 34: BAHg share in dependence on the of the THg concentration

Legend: E. - Escherichia J. - Janthinobacterium, B. - Bacillus, P. - Pseudomonas

Deleži BDHg, izračunani glede na koncentracije THg, so bili pri vseh vzorcih bakterijskih celic, kjer smo BDHg normalizirali na število celic, pod 1 % (Slika 34). Največji delež BDHg je bil v celicah *P. fluorescens*, najmanjši pa pri *E. coli*, kjer so bile koncentracije BDHg pod mejo detekcije.

### 4.3 VPLIV CIANID IN SIDEROFOR PRODUCIRAJOČIH BAKTERIJ NA BIOLOŠKE TRANSFORMACIJE CINABARITA IN ELEMENTARNEGA ŽIVEGA SREBRA

V rezultatih druge hipoteze se je pokazalo, da bakterije lahko doprinesejo k povečevanju biološke dostopnosti Hg. Pri tem je, glede na delež BDHg v primerjavi s THg, izstopal sev *P. fluorescens*, tako pri testiranju vpliva celičnih produktov kot testiranju direktnega kontakta celic na povečevanje biološko dostopne frakcije Hg. Poleg tega smo iz rezultatov prve hipoteze ugotovili, da so Pseudomonade najbolj zastopana skupina bakterij v reki Idrijci. Po teh spoznanjih smo se začeli spraševati, s katerimi sekundarnimi metaboliti lahko bakterije vplivajo na povečevanje biološko dostopne frakcije Hg. Ker sta znana sekundarna metabolita pri Pseudomonadah cianid in siderofori, smo na področju reke Idrijce naredili popis sevov, ki sintetizirajo cianid in/ali siderofore.

### 4.3.1 Pojavljanje cianid in siderofor producirajočih mikroorganizmov v reki Idrijci

Rezultati popisa siderofornih in cianidnih producentov po reki Idrijci kažejo na odvisnost pojavljanja le teh od onesnaženosti s Hg (Slika 35). Med sevi, ki so bili izolirani na gojitvenih ploščah brez dodanega Hg, je bilo največ siderofornih producentov izoliranih v Sp. Idriji in pri dimniku (stranski pritok Idrijce, ki teče po vznožju hriba, na katerem stoji rudniški dimnik). Cianidnih producentov je bilo največ izoliranih v Idriji in več kot 2x manj pri dimniku. Sevov, ki so sintetizirali tako siderofore kot cianid, je bilo izoliranih največ pri Beli. Tu je bilo prav tako izoliranih največ sevov, ki niso sintetizirali niti cianida niti sideroforov.



# Slika 35: Deleži siderofornih producentov, cianidnih producentov, sevov, ki sintetizirajo siderofore in cianid ter sevov, ki ne sintetizirajo niti cianida niti sideroforov, izoliranih na gojitvenih ploščah brez dodanega Hg, iz rečnih sedimentov reke Idrijce na štirih vzorčnih mestih

Legenda: Bela – nad virom onesnaženja, Idrija – pri Kolektorju, Sp. Idrija – v mestu, pri mostu čez reko, Dimnik – v stranskem pritoku reke Idrijce, ki teče po vznožju hriba, na katerem stoji rudniški dimnik, S+ - producenti sideroforov, HCN+ - producenti cianida, HCN+S+ - izolati, ki so sintetizirali siderofore in cianid, HCN-S- - izolati, ki niso sintetizirali niti sideroforov niti cianida

# Figure 35: Shares of siderophore producers, cyanide producers, strains synthesizing siderophores and cyanide and strains that do not synthesize neither cyanide nor siderophores isolated on the cultivation plates with no mercury added, from Idrijca river sediments at four sampling sites

Legend: Bela – upstreams from the source of pollution, Idrija - at the Kolektor, Sp. Idrija – in the city, at the bridge over the river, Dimnik - in a side tributary of Idrijca River, which flows through the bottom of the hill on which the mine chimney stands, S+ - sideropohore producers, HCN+ - cyanide producers, HCN+S+ - isolates that produce siderophores and cyanide, HCN-S- - isolates that not produce neither cyanide nor siderophores

Med sevi, ki so bili izolirani na gojitvenih ploščah z dodanim Hg, je bilo največ siderofornih producentov izoliranih pri Beli in cianidnih producentov pri dimniku. Sevov, ki sintetizirajo cianid in siderofore, je bilo največ izoliranih v Idriji in na dimniku ter sevov, ki niso sintetizirali nobenega od sekundarnih metabolitov, največ v Sp. Idriji in Beli (Slika 36).



# Slika 36: Deleži siderofornih producentov, cianidnih producentov, sevov, ki sintetizirajo siderofore in cianid ter sevov, ki ne sintetizirajo niti cianida niti sideroforov, izoliranih na gojitvenih ploščah z dodanim Hg, iz rečnih sedimentov reke Idrijce na štirih vzorčnih mestih

Legenda: Bela – nad virom onesnaženja, Idrija – pri Kolektorju, Sp. Idrija – v mestu, pri mostu čez reko, Dimnik – v stranskem pritoku reke Idrijce, ki teče po vznožju hriba, na katerem stoji rudniški dimnik, S+ - producenti sideroforov, HCN+ - producenti cianida, HCN+S+ - izolati, ki so sintetizirali siderofore in cianid, HCN-S- - izolati, ki niso sintetizirali niti sideroforov niti cianida

Figure 36: Shares of siderophore producers, cyanide producers, strains, which are synthesizing siderophores and cyanide, as well as strains that do not synthesize neither cyanide nor siderophores, isolated in the cultivation plates with Hg added, from river Idrijca sediments at four sampling sites

Legend: Bela – upstreams from the source of pollution, Idrija - at the Kolektor, Sp. Idrija – in the city, at the bridge over the river, Dimnik - in a side tributary of Idrijca River, which flows through the bottom of the hill on which the mine chimney stands, S+ - sideropohore producers, HCN+ - cyanide producers, HCN+S+ - isolates that produce siderophores and cyanide, HCN-S- - isolates that not produce niether cyanide nor siderophores

# **4.3.2** Vpliv Hg rezistentnega cianidnega in siderofornega producenta na biološko pretvorbo Hg<sup>0</sup> – posredni kontakt

Izmed izoliranih cianid in siderofor producirajočih sevov smo izbrali po 1 sev, ki sintetizira cianid ali siderofore ali ne sintetizira nič od tega. Nekaj sevov, ki so sintetizirali večje količine cianida ali sideroforov smo sekvencirali. Tako smo pri poskusih uporabili za cianidnega producenta sev iz rodu Pseudomonas, za siderofornega producenta sev rodu Arthrobacter in za sev, ki ne sintetizira nobenega izmed omenjenih sekundarnih metabolitov, rod Exiguobacterium (Preglednica 7). Bakterijske seve smo posredno izpostavili Hg<sup>0</sup> in HgS, tako, da sta bila Hg<sup>0</sup> in HgS v dializnih vrečkah.

Oznaka vzorca	lokus	Dolžina sekvence	delež ujemanja	Bakterijski sev
KBHg B16	S000390082	512 bp	0,970	Arthrobacter sp.
	S000417358	475 bp	0,972	Arthrobacter sp.
	S000417359	494 bp	0,975	Arthrobacter sp.
KBHg SPID4	S000769414	1283 bp	0,913	Pseudomonas sp.
	S001093498	1239 bp	0,930	Pseudomonas sp.
	S001093504	1240 bp	0,919	Pseudomonas sp.
KBHg SPID4	S000629421	791 bp	0,955	Exiguobacterium sp.
	S000805710	798 bp	0,962	Exiguobacterium undae
	S001265480	374 bp	0,978	Exiguobacterium sp.

#### Preglednica 7: Rezultati sekvenciranja

**Tabel 7: Results of sequencing** 

#### 4.3.2.1 Rezultati meritev BDHg

Rezultati inkubacije (a) cianidnega producenta, (b) seva, ki je sintetiziral siderofore in (c) seva, ki ni sintetiziral niti cianida niti sideroforov, s HgS v dializnih vrečkah so bili pod mejo detekcije, zato na slikah 37, 38 in 39 niso prikazani.



Slika 37: Koncentracije BDHg in rast bakterijskega seva, ki sintetizira cianid, izpostavljenega Hg<sup>0</sup> in HgS s posrednim kontaktom



Rezultati inkubacije cianidnega producenta s  $Hg^0$  v dializnih vrečkah so pokazali naraščanje BDHg z rastjo bakterij, ki se kaže v naraščajočem linearnem trendu koncentracij BDHg v odvisnosti s časom inkubacije (Slika 37). Med 2 h in 4,5 h inkubacijo ni statistično značilne razlike. Rezultata 7 h in 22 h inkubacije pa sta statistično značilno različna od rezultatov pri 2 h in 4,5 h inkubaciji. Šele po 22 h

inkubaciji je vrednost BDHg v vzorcu bakterijske kulture presegla vrednost BDHg pri negativni kontroli (gojišče KB).



Slika 38: Koncentracije BDHg in rast bakterijskega seva, ki sintetizira siderofore, izpostavljenega  $Hg^0$  in HgS s posrednim kontaktom

Figure 38: BAHg concentrations and growth of a bacterial strain that synthesizes siderophores, exposed to  $Hg^0$  and HgS through the indirect contact



Slika 39: Koncentracije BDHg in rast bakterijskega seva, ki ne sintetizira niti cianida niti sideroforov, izpostavljenega Hg<sup>0</sup> in HgS s posrednim kontaktom

Figure 39: BAHg concentration and growth of bacterial strain that does not synthesize neither cyanide nor siderophores, exposed to  $Hg^0$  and HgS through the indirect contact

Na nasprotni strani je bila koncentracija BDHg v praznem gojišču vse inkubacijske čase približno enaka, vrednost po 22 h inkubaciji ni bila statistično značilno različna od BDHg preostalih inkubacijskih časov (Slika 37). Statistično značilna razlika je vidna le med vzorcema po 2 h in 7 h inkubaciji. Rast cianidnega producenta je bila v gojišču z

dodanim  $Hg^0$  v dializnih vrečkah hitrejša in končno število celic je bilo večje (OD<sub>600</sub>  $Hg^0$ ) kot v gojišču brez dodanega  $Hg^0$  (OD<sub>600</sub> K).

Pri sevu, ki je sintetiziral siderofore, je bilo največ BDHg po 7 h inkubaciji, 1,5x manj pa po 22 h inkubaciji, pri čemer rezultata nista statistično značilno različna (Slika 38). Po 2 h inkubaciji ni bilo statistično značilne razlike med izmerjenim BDHg v vzorcu ali gojišču. Po 7 h in 22 h pa so bile vrednosti BDHg v gojišču precej manjše od BDHg izmerjenega v vzorcu. Bakterijska rast, spremljana z meritvami optične gostote, je bila ob prisotnosti živega srebra v gojišču hitrejša (Slika 38).

Rezultati koncentracije sideroforov kažejo na to, da sev ni tvoril sideroforov ob prisotnosti  $Hg^0$  ali HgS. Koncentracija sideroforov je bila izmerjena le pri vzorcu kontrole in je po 22 h inkubaciji znašala 28,3 µg/ml.

Rezultati bakterije, ki ni sintetizirala cianida ali sideroforov, kažejo na postopno povečevanje koncentracije BDHg skupaj z rastjo bakterij. Rast bakterij je bila v gojišču z dodanim Hg<sup>0</sup> ali HgS hitrejša kot pri kontroli. Pri kontroli (gojišču NB) so bile koncentracije BDHg skozi vse inkubacijske čase približno enake, brez statistično značilnih razlik (Slika 39).

4.3.2.2 Rezultati meritev koncentracij HCN

V vzorcih cianidnega producenta so bile izmerjene tudi koncentracije HCN v gojišču. Pri vseh vzorcih so koncentracije cianida do 7 h inkubacije naraščale, po 23 h, ko je bila kultura že nekaj ur v stacionarni fazi, pa je koncentracija HCN padla. Koncentracije HCN se med vzorci niso statistično značilno spreminjale, iz česar sledi, da je sev sintetiziral cianid neodvisno od izpostavljenosti  $Hg^0$  ali HgS (Slika 40).





Figure 40: Concentrations of cyanide when the cyanide producer was exposed to Hg<sup>0</sup>, HgS or with no Hg (K) in four time intervals

#### 4.3.2.3 Rezultati ekspresije merA gena

Z namenom, da bi ugotovili, če bakterije ob izpostavitvi  $Hg^0$  ali HgS aktivirajo obrambni mehanizem, zapisan na *mer* operonu, smo bakterijam, ki so bile izpostavljene  $Hg^0$  in HgS izolirali RNA in s qPCR izmerili število *merA* genov.



Slika 41: Število kopij *merA* gena pri cianidnem producentu izpostavljenemu HgS, Hg<sup>0</sup> ali brez Hg (K)

Figure 41: The number of *merA* gene copies at the cyanide producer exposed to HgS, Hg<sup>0</sup> or with no Hg (K)

Rezultati ekspresije *merA* gena pri HgR cianid producirajoči bakteriji prikazujejo pozitivno ekspresijo gena le pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni Hg<sup>0</sup>. Pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni HgS ali pa kontroli, do ekspresije gena ni prišlo. Ekspresija gena pri vzorcu izpostavljenem Hg<sup>0</sup> je bila povečana po 7 h in 22 h inkubaciji, kjer rezultata nista statistično značilno različna (Slika 41).



Slika 42: Število kopij *merA* gena pri producentu sideroforov izpostavljenemu HgS, Hg<sup>0</sup> ali brez Hg Figure 42: The number of copies of the gene *merA* at the siderophore producer exposed to HgS, Hg<sup>0</sup> or with no Hg (K)





Figure 43: The number of the *merA* gene copies in strain, which did not form neither cyanide nor siderophores, exposed to HgS,  $Hg^0$  or with no Hg (K)

Pri sevu, ki je sintetiziral siderofore, se je ekspresija gena pri vzorcih izpostavljenih Hg pokazala šele po 22 h inkubaciji. Med vzorcem Hg<sup>0</sup> in kontrolo je statistično značilna

razlika v ekspresiji genov. Pri vzorcu HgS je bila ekspresija statistično značilno večja od kontrole, ni pa bila statistično značilno različna od vzorca Hg<sup>0</sup> (Slika 42).

Ekspresije gena *merA* pri sevu, ki ni sintetiziral niti cianida niti sideroforov, ni bilo. Po 22 h inkubaciji smo sicer zaznali ekspresijo *merA* gena v primerjavi z ostalimi inkubacijskimi časi, toda koncentracija le tega se ni statistično značilno razlikovala od koncentracije *merA* gena pri kontroli (Slika 43).

# **4.3.3** Vpliv Hg rezistentnega in Hg nerezistentnega cianidnega producenta na biološko pretvorbo Hg<sup>0</sup> – neposredni kontakt

### 4.3.3.1 Rezultati meritev BDHg

Koncentracije BDHg pri HgR+ in HgR- cianidnem producentu so naraščale s časom inkubacije in dosegle svoj vrh pri 22 h inkubaciji. Prav tako je vrh pri 22 h inkubaciji dosegla kontrola (KB s Hg<sup>0</sup>), pri kateri sicer koncentracije BDHg niso naraščale linearno s časom inkubacije. Rezultati vseh vzorcev so po 22 h inkubaciji podobni, brez statistično značilnih razlik. Hitrost rasti HgR+ seva v gojišču s Hg<sup>0</sup> je skokovito narastla med 3 h in 6 h inkubacijo in se po 6 h ponovno upočasnila. Rast Hg- seva v gojišču s Hg<sup>0</sup> pa je že od samega začetka padala in pri 6 h ni bilo več mogoče zaznati živih celic (Slika 44).

Koncentracije cianida pri HgR- sevu izpostavljenem  $Hg^0$  so z inkubacijo padale skupaj s padanjem rasti seva. Pri HgR+ sevu izpostavljenem  $Hg^0$ , se koncentracije cianida niso statistično značilno spreminjale s časom inkubacije, v primerjavi s kontrolo, kjer je koncentracija cianida naraščala skupaj z rastjo bakterije (Slika 45).



## Slika 44: Koncentracije BDHg in število kolonij (CFU/ml) HgR+ in HgR- cianidnih producentov, neposredno izpostavljenih Hg<sup>0</sup> v štirih časovnih intervalih

Legenda: Stolpčni graf se nanaša na HgCl2 concentracije, črtni pa na CFU vrednosti

Figure 44: BAHg concentration and the number of colonies (CFU/ml) of HgR+ and HgR- cyanide producers, directly exposed to  $Hg^0$  in four intervals

Legend: Bar graph refers to the HgCl<sub>2</sub> concentrations, line graph refers to the CFU values

Rezultati BDHg za HgR+ in HgR- seva, ki ne sintetizirata niti cianida niti sideroforov, prikazujejo statistično neznačilne razlike s kontrolo izpostavljeno Hg<sup>0</sup> (NB s Hg<sup>0</sup>), razen rezultatov po 6 h inkubaciji. Rasti HgR+ seva v Hg<sup>0</sup> ni bilo zaznati in po 22 h inkubaciji ni bilo več živih celic. Pri HgR- sevu se je rast ustavila takoj po izpostavitvi Hg<sup>0</sup> in že po 3 h inkubaciji na gojitvenih ploščah ni zrasla nobena kolonija (Slika 46).



Slika 45: Koncentracije cianida in število kolonij (CFU/ml) pri HgR+ in HgR- sevih, izpostavljenih Hg $^0$ 

Legenda: Stolpčni graf se nanaša na concentracije cianida, črtni pa na CFU vrednosti

## Figure 45: Cyanide concentrations and the number of colonies (CFU/ml) of HgR+ and HgR-strains, exposed to $\mathrm{Hg}^{0}$

Legend: Bar graph refers to the cyanide concentrations, line graph refers to the CFU values



## Slika 46: Koncentracije BDHg in število kolonij (CFU/ml) HgR+ in HgR- sevov brez produkcije cianida neposredno izpostavljenih Hg<sup>0</sup> v štirih časovnih intervalih

Legenda: Stolpčni graf se nanaša na concentracije HgCl<sub>2</sub>, črtni pa na CFU vrednosti

Figure 46: BAHg concentrations and the number of colonies (CFU/ml) of HgR+ and HgR- strains without cyanide production, directly exposed to Hg<sup>0</sup> in four time intervals

Legend: Bar graph refers to the HgCl<sub>2</sub> concentrations, line graph refers to the CFU values

Rezultati HgR+ in HgR- cianidnih producentov inkubiranih s HgS kažejo na to, da je le HgR+ sev sposoben pretvoriti HgS v BDHg. Pri vzorcih gojišča BDHg ni bilo mogoče izmeriti. Pri HgR- sevu pa smo zaznali le zelo majhne (3  $\mu$ g/l) koncentracije BDHg po 22 h inkubaciji. Rast bakterij je bila pri HgR+ sevu brez dodanega HgS najhitrejša, pri preostalih pa je bila približno enaka (Slika 47).



# Slika 47: Koncentracije BDHg in število kolonij (CFU/ml) HgR+ in HgR- cianid producirajočih sevov, neposredno izpostavljenih HgS v štirih časovnih intervalih

Legenda: Stolpčni graf se nanaša na concentracije HgCl2, črtni pa na CFU vrednosti

Figure 47: BAHg concentrations and the number of colonies (CFU/ml) of HgR+ and HgR- cyanide producing strains, directly exposed to HgS in four time intervals

Legend: Bar graph refers to the HgCl<sub>2</sub> concentrations, line graph refers to the CFU values

Pri izpostavitvi cianidnih producentov HgS se koncentracije cianida pri HgR- sevu niso razlikovale od kontrole, pri HgR+ sevu pa so bakterije ob prisotnosti HgS za več kot za 4x povečale sintezo cianida v primerjavi s kontrolo (Slika 48).

Rezultati HgR+ in HgR- sevov, ki ne sintetizirata cianida, prikazujejo več 100x nižje koncentracije BDHg v primerjavi s cianidnim producentom. Koncentracija BDHg pri HgR+ sevu je pri 3 h inkubaciji presegla vrednosti koncentracije BDHg kontrole in nato naraščala do 22 h inkubacije skupaj z rastjo bakterije. Pri HgR- sevu se koncentracije BDHg niso vidno spreminjale s časom inkubacije in rastjo bakterije (Slika 49).


Slika 48: Koncentracije cianida in število kolonij (CFU/ml) pri HgR+ in HgR- sevih izpostavljenih HgS

Legenda: Stolpčni graf se nanaša na concentracije cianida, črtni pa na CFU vrednosti

# Figure 48: Cyanide concentrations and the number of colonies (CFU/ml) of HgR+ and HgR-strains, exposed to HgS $\,$

Legend: Bar graph refers to the cyanide concentrations, line graph refers to the CFU values



# Slika 49: Koncentracije BDHg in število kolonij (CFU/ml) HgR+ in HgR- cianid neproducirajočih sevov, neposredno izpostavljenih HgS v štirih časovnih intervalih

Legenda: Stolpčni graf se nanaša na concentracije HgCl2, črtni pa na CFU vrednosti

# Figure 49: BAHg concentrations and the number of colonies (CFU/ml) of HgR+ and HgR- cyanide non-producing strains, directly exposed to HgS in four time intervals

Legend: Bar graph refers to the HgCl<sub>2</sub> concentrations, line graph refers to the CFU values

# 4.3.3.2 Vpliv koncentracije živega srebra na sintezo in meritev cianida pri Hg nerezistentnem bakterijskem sevu

Z namenom, da bi ugotovili, pri katerih koncentracijah Hg nerezistenten sev še sintetizira cianid in pri katerih koncentracijah Hg se pokaže vpliv Hg na meritev koncentracij HCN, smo rastoči sev HgR-HCN+ in supernatant stacionarne kulture tega istega seva izpostavili različnim koncentracijam HgCl<sub>2</sub>. Rezultate rastočega seva smo analizirali po 4 h inkubaciji.

Rezultati vpliva koncentracije HgCl<sub>2</sub> na sintezo cianida prikazujejo, da koncentracija 5  $\mu$ M negativno vpliva na rast bakterije in posledično je bila pri tej koncentraciji izmerjena manjša koncentracija cianida. Pri vzorcu prekonočnega gojišča, ki je vseboval približno 50  $\mu$ M cianida, pa se je koncentracija cianida v gojišču zmanjšala pri 0,5  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>. Iz rezultatov lahko sklepamo, da je koncentracija HgCl<sub>2</sub>, ki negativno vpliva na rast bakterije in s tem na sintezo cianida nekje v območju med 0,5 in 5  $\mu$ M (Slika 50).



Slika 50: Koncentracije cianida in število celic (CFU/ml) v odvisnosti od koncentracije HgCl<sub>2</sub> Figure 50: The concentration of cyanide and the number of cells (CFU/ml) as a function of HgCl<sub>2</sub> concentration

#### 5 RAZPRAVA

## 5.1 VPLIV BIOLOŠKO NEDOSTOPNIH OBLIK ŽIVEGA SREBRA NA POJAVLJANJE BAKTERIJ ODPORNIH NA ŽIVO SREBRO V REKI IDRIJCI

Onesnaženost okolja z živim srebrom se največkrat ocenjuje s kemijskimi meritvami živega srebra v vzorcu vode, zemlje ali sedimenta, redkeje tudi z meritvami z biosenzorji. Kemijske meritve živega srebra v okolju pokažejo, kako močno je okolje onesnaženo s toksično kovino, ne pokažejo pa koliko živega srebra je biološko dostopnega in tako potencialno nevarnega za organizme. Kemijsko lahko sicer izmerimo Hg<sup>2+</sup> obliko živega srebra, toda le-ta se hitro veže na npr. organske spojine, partikulatni material, ali pa vstopa v mikroorganizme, kjer se z mehanizmom rezistence reducira v Hg<sup>0</sup>. Zaradi stalno spreminjajočega se stanja živega srebra v biogeokemijskem ciklu, samo s kemijskimi meritvami ne moremo oceniti vpliva onesnaženja s Hg na organizme. V preteklosti je bilo narejenih nekaj meritev ekspresije merA gena (Nazaret in sod., 1994; Hines in sod., 2000), ki so dober pokazatelj trenutnega vpliva živega srebra na mikroorganizme, saj ekspresijo merA gena sprožijo le biološko dostopne oblike Hg (ionski Hg). Dolgoročni vpliv onesnaženosti živega srebra na mikrobne združbe pa lahko opazujemo z meritvami količine merA gena, ki je direktni pokazatelj stopnje prilagojenosti mikrobne združbe na živo srebro v nekem okolju. Poleg tega so naši rezultati pokazali, da količina merA gena močno korelira s koncentracijo THg v gradientu onesnaženja od vira onesnaženja po reki navzdol. Korelacija se je pojavila v koncentracijskem območju med 1 µg/g in 60 µg/g suhe teže THg (Sliki 19B, 20B). Pri koncentracijah, ki so bile pod 1 µg/g, korelacije ni bilo več mogoče zaznati. Mer operon naj bi se sicer sprožil že pri nižjih koncentracijah živega srebra, kot je 1 µg/g. Vzrok za zabrisano korelacijo v območju nizkih koncentracij Hg lahko iščemo v 1) prisotnosti še drugih splošnih mehanizmov rezistence (črpanje ionov iz celice skozi membrano, vezava Hg na površino celice, precipitacija s sulfidi in oksidi na površini celice) (Wood in Wang, 1983), ki pri manjših koncentracijah lažje in bolj vidno omilijo Hg stres, ter 2) dejstvu, da je velik delež THg v sedimentih v biološko nedostopni obliki (Kocman in sod., 2004). Koncentracij v sedimentih sicer ne moremo direktno primerjati s koncentracijami v biofilmih, ki imajo nižjo gostoto kot sedimenti. To bi namreč vodilo v detekcijo manjše količine Hg na volumsko enoto v biofilmih v primerjavi s sedimenti. Poleg tega se znotraj THg različne kemijske oblike Hg različno prerazporejajo med vzorčnimi mesti (Žižek in sod., 2011). Rezultati THg in količine merA gena se progresivno zmanjšujejo od vira onesnaženja po reki navzdol, kar je lahko poleg manjšega onesnaženja tudi posledica spreminjanja vrst Hg. V reki Idrijci je bilo namreč opaženo, da metilirane oblike Hg naraščajo po reki navzdol (Žižek in sod., 2011).

Pri iskanju korelacije med THg in kopijami *merA* gena je na treh lokacijah prišlo do neskladja. Prvi razkorak se je pojavil na mestu vira onesnaženja in druga dva pri izlivu odplak iz čistilne naprave in komunalnih odplak. Stopnje *merA* genov na prvih petih mestih poleg vira onesnaženja so bile precej nizke v primerjavi z visokimi koncentracijami THg (Sliki 19A, 20A). Ta rezultat lahko razložimo z neutralno teorijo (Ofiţeru in sod., 2010), ki zagovarja, da se mikroorganizmi iz neonesnaženega območja nad virom onesnaženja konstantno naseljujejo po reki navzdol na onesnažena mesta, kljub temu, da tam ne delujejo optimalno. Predvidevamo, da je ravno zaradi tovrstnih migracij mikroorganizmov v našem primeru na viru onesnaženja manjša količina *merA* gena. Poleg tega smo zaznali zelo hiter upad koncentacije THg v zgolj nekaj metrih po reki navzdol, kar je prav tako vpliv vodnega toka neonesnaženo vodo na mestu onesnaženja (Turner in Lindberg, 1978).

Naslednja dva faktorja, ki sta negativno vplivala na korelacijo med THg in kopijami merA gena, sta izliv čistilne naprave (vzorčno mesto P3) in izliv iz kanalizacijskega sistema (P7). Na teh mestih smo zaznali povečane količine merA gena in majhne koncentracije THg (Sliki 19A, 20A). Za tovrstne okoljske niše je značilno, da se v njih naseljujejo mikroorganizmi s povečano antibiotsko rezistenco in posledično rezistenco na kovine (Harnisz, 2013). Znano je namreč, da se rezistenca na kovine med mikroorganizmi prenaša skupaj z rezistenco na antibiotike, saj sta ti dve rezistenci običajno zapisani na skupnem plazmidu ali transpozonu (Summers in sod., 1993; Ferreira da Saliva in sod., 2007; Baker-Austin in sod., 2006). V Idriji je seveda pričakovano, da so odpadne vode iz čistilne naprave gosto naseljene s Hg odpornimi mikroorganizmi, ki se še dodatno obogatijo v čistilni napravi. Čeprav je znano, da se količina bakterij pri procesu čiščenja odpadnih voda zmanjša za 99 %, iztoki še vedno vsebujejo več kot 10<sup>4</sup> CFU/ml bakterij, kar je še vedno dovolj, da vidno vplivajo na mikrobno združbo poleg iztoka (Korzeniewska in Harnisz, 2012). Ta učinek se je sicer v našem primeru izgubil že po 0,5 do 1 km razdalje od čistilne naprave, kar je bilo opaženo tudi v drugih raziskavah (Batt in sod., 2006; Middleton in Salierno, 2012). Predvideva se, da mikroorganizmi iz čistilnih naprav težko preživijo v naravnem okolju (Geldreich in Litsky, 1976; Haller in sod., 2009).

Čeprav zgradba bakterijske združbe običajno korelira s koncentracijami kovin v biofilmih (Ancion in sod., 2013), in bi smatrali, da se mikrobne združbe v onesnaženih okoljih ohranjajo zaradi rezistenčnih mehanizmov znotraj združbe in posledično razvoja mikrobne združbe odporne na onesnaženje, se je v našem primeru izkazalo drugače. Na viru onesnaženja ni bilo mogoče zaznati nobene specifične združbe (Slike 14A, B, C). Združbe so se spreminjale z vzorčenji. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi

raziskovalci, ki so spremljali fizikalno kemijske učinke, ali pa učinke onesnaženja na mikrobne združbe s profiliranjem združb (Kandeler in sod., 2000; Bouskill in sod., 2010; Lapanje in sod., 2007), ali hitrim paralelnim sekvenciranjem (Lapanje in sod., 2010; Vishnivetskaya in sod., 2011). Učinke onesnaženja je na epilitsko mikrobno združbo težko ovrednotiti, saj na njeno kolonizacijo in razvoj biofilmov vplivajo najrazličnejši dejavniki, kot so: vodni tok, velikost kamnov, zgradba površine in sestava kamnov, tip in količina organskega materiala, temperatura, pH in količina kisika (Guasch in sod., 2010).

Gradientne meritve in iskanje korelacije med THg in *merA* genom smo izvedli v pozno poletnem času. Odločitev je bila sprejeta na podlagi Hg tokov, intenzivnosti vodnih tokov in razvoja združbe. V času poznega poletja so bile izmerjene najvišje koncentracije THg v različnih okoljih (Covelli in sod., 1999, 2006; Razavi in sod., 2013; Balogh in sod., 1996). V Soči, v katero se Hg izliva iz reke Idrijce, koncentracije Hg naraščajo od zime do poznega poletja (Covelli in sod., 2006). Po predhodnih raziskavah (Kocman in sod., 2011; Covelli in sod., 2006) se največ materiala prerazporeja po reki ob ekstremnih hidrometeoroloških pogojih, ko se živo srebro prerazporeja tudi iz sedimentov na rečnih bregovih. V reki Idrijci se ponavljata dva ekstremna dogodka, daljše časoven visok vodostaj spomladi zaradi taljenja snega (med marcem in junijem) in kratek, toda bolj intenziven jesenski visok vodostaj v oktobru in novembru. Ti dogodki visokega vodostaja imajo velik učinek tudi na vrstno sestavo biofilmov in zameglijo učinek onesnaženja s Hg. Analiza mikrobne združbe pri zimskih vzorcih je pokazala zelo skrčeno UPGMA drevo (Slika 14A), kar nakazuje, da se mikrobne združbe med vzorčnimi mesti niso zelo razlikovale. Zaradi upada ekstremnih razmer čez poletje, so tudi veje UPGMA drevesa pri pozno poletnem vzorčenju bolj razpotegnjene (Slika 14C).

Pri sezonskem vzorčenju vode je bila količina *merA* genov v skladu z meritvami raztopljenega THg in partikulatnega THg, ki so jih izmerili Žižek in sod. (2011), medtem ko tega ni bilo zaznati pri vzorcih biofilma. THg je namreč v vseh letnih časih največ na viru onesnaženja, *merA* genov v biofilmih pa ne. Razlog lahko ponovno iščemo v večjih stopnjah imigracije bakterij nad virom onesnaženja, še posebno v zgodnje poletnem obdobju, ko so še prisotni visoki vodostaji.

Korelacija se je pojavila tudi med številom rezistentnih bakterij in količino *merA* genov, kar ponovno podpre naše spoznanje, da lahko določimo PICT (z onesnaženjem povzročeno toleranco združbe) na podlagi kvantifikacije gena. Analiza kulturabilnih bakterij je sicer precej pristranska, saj vemo da mnogi mikroorganizmi niso kulturabilni. V naših rezultatih so v vzorcih biofilmov in vode prevladovale bakterije rodu *Pseudomonas*. Pseudomonade so sicer bakterije, ki so najpogosteje izolirane z gojenjem na bogatih gojiščih, zato ker lahko za energijo uporabljajo zelo različne vire ogljika (Molina in sod., 2000).

# 5.2 VPLIV BAKTERIJ NA POVEČANO KOLIČINO BIOLOŠKO DOSTOPNEGA ŽIVEGA SREBRA V SEDIMENTIH

O vplivu mikroorganizmov na biološko dostopnost živega srebra v sedimentih, kjer prevladujejo biološko slabo dostopne oblike živega srebra, je zelo malo znanega. Sedimenti so kompleksen ekosistem v katerem se prepletajo abiotski in biotski učinki na kroženje Hg. Dosedanje raziskave so bile narejene že pred časom in govorijo le o pozitivnih učinkih mikroorganizmov na pretvorbe biološko nedostopnega Hg<sup>0</sup> v biološko dostopen Hg<sup>2+</sup> s procesom oksidacije (Holm in Cox, 1975), medtem ko v sedimentih prevladuje HgS oblika živega srebra in je o njegovi mobilizaciji z mikroorganizmi zelo malo znanega (Baldi in Olson, 1987). Fagerström in Jernelöv sta že leta 1971 ugotovila, da se HgS v aerobnih sedimentih lahko počasi metilira v metil-Hg. V raziskavi smo preverili, ali lahko bakterije s svojim neposrednim (procesi na celični membrani in znotraj celice), ali posrednim (s sproščanjem metabolitov, ki pospešijo pretvorbe biološko slabo dostopnih oblik Hg v BDHg) kontaktom s Hg onesnaženim sedimentom, pomembno pripomorejo k pretvorbam biološko slabo dostopnih oblik Hg v BDHg. Rezultati vpliva mikroorganizmov na biološke pretvorbe živega srebra iz sedimenta so pokazali, da lahko nekateri mikroorganizmi povečujejo biološko dostopne frakcije živega srebra v sedimentih, na posreden in/ ali neposreden način. Ob preverjanju vpliva izvenceličnih produktov nekaterih mikroorganizmov na koncentracije BDHg v sedimentu, so rezultati izpostavitve supernatanta stacionarnih bakterijskih kultur pokazali povečane koncentracije BDHg, v primerjavi s koncentracijami BDHg v MiliQ vodi. Pri poskusu vpliva izvenceličnih produktov na koncentracije BDHg v vzorcih sedimenta iz Bele, Idrije in Sp. Idrije, so bile povišane koncentracije BDHg pri vzorcih bakterij P. aeruginosa, P. fluorescens in E. coli gojenih v hranilnem gojišču (Slika 21). Pri poskusu vpliva izvenceličnih produktov na koncentracije BDHg pri metabolno različnih mikroorganizmih, kjer smo vpliv bakterijskih sekundarnih metabolitov ocenili s primerjavo vzorca s svežim gojiščem, ki je bil uporabljen pri posameznem sevu (zaradi pod mejo detekcije izmerjenih koncentracij BDHg v MiliQ vodi in ocenjenega manjšega vpliva stresanja na oksidacijo sedimenta), so bile povišane koncentracije BDHg opazne pri: B. atrophaeus, J. lividum, L. acidophilus, P. fluorescens in P. stutzeri ter v zelo majhnih deležih tudi pri B. subtilis in R. pisi (Sliki 22, 23). Pri bakterijah rodu Bacillus in Pseudomonas je rezultat nekoliko podoben študiji Holm in Cox-a (1975), kjer je bilo že dokazano, da P. fluorescens, P.

aeruginosa, B. subtilis in B. megaterium oksidirajo Hg<sup>0</sup>. Toda v našem sedimentu je bilo poleg Hg<sup>0</sup> tudi veliko HgS, ki je celo prevladoval, kar potrjujejo predhodne raziskave (Kocman in sod., 2004). O oksidaciji HgS z mikroorganizmi je zelo malo znanega. Znano je le, da lahko bakterija Thiobacillus ferooxidans raztaplja HgS ob prisotnosti FeSO<sub>4</sub> (Silver in Torma, 1974). Več pa je znanega o vplivu mikroorganizmov na preperevanje mineralov. Bakterije lahko s sproščanjem kratko verižnih maščobnih kislin (acetat, oksalat, laktat, citrat, piruvat) in sideroforov (pseudobaktin, katehol) vplivajo na topnost mineralov (Uroz in sod., 2009). Tudi v našem primeru smatramo, da so mikroorganizmi vplivali na preperevanje HgS z izločanjem: 1) kratko verižnih maščobnih kislin, 2) sideroforov in /ali 3) cianida. Kratko verižne maščobne kisline s procesom acidifikacije s protoni znižajo pH in s tem vplivajo na izločanje kationov iz mineralov. Siderofori z vezavo na površino minerala in vezavo na katione povečajo topnost kationov v mineralih (Uroz in sod., 2009). Cianid pa s procesom kompleksacije z živim srebrom (Gomes in sod., 1997) lahko vpliva na topnost HgS (Shaw in sod., 2006). Vpliv cianidnih producentov je bil sicer proučevan pri preperevanju granita (Wongfun in sod., 2014). Pseudomonadi sta na topnost HgS lahko vplivali s sproščanjem oksalata (Hamel in Appanna, 2003), citrata (Madsen in Alexander, 1985), piruvata (Wongfun in sod., 2014), glukonata (Wongfun in sod., 2014), cianida (Blumer in Haas, 2000) in sideroforov (pseudobaktin, pioverdin) (Miethke in Marahiel, 2007), Bacillus-a s sproščanjem sideroforov (Wilson in sod., 2006), J. lividum s sproščanjem oksalata (Frey in sod., 2010) in piruvata (Wongfun in sod., 2014), L. acidophilus sproščanjem lactata in acetata (Silva in sod., 1987) ter E. coli s sproščanjem acetata (Åkesson in sod., 1999).

Poleg omenjenih bakterijskih sevov so se povečane koncentracije BDHg pojavile tudi pri svežem LB gojišču, izpostavljenem sedimentu iz Idrije. Pri LB gojišču so se pojavile celo 4x višje koncentracije BDHg kot pri NB gojišču. Zanimivo je, da sta že Holm in Cox (1974) ugotovila, da gojišče, ki vsebuje kvasni ekstrakt, in je izpostavljeno Hg<sup>0</sup>, absorbira 2x več živega srebra kot gojišče brez kvasnega ekstrakta. Sklepala sta, da je za oksidacijo Hg<sup>0</sup> odgovoren organski ogljik, prisoten v kvasnem ekstraktu. V našem primeru je bila koncentracija BDHg po 12 h izpostavitvi sedimentu v LB 4x večja od koncentracije BDHg v hranilnem gojišču in le malo večja od koncentracije BDHg v MiliQ vodi (Slika 21A). Toda po 36 h izpostavitvi se stanje obrne in je koncentracija BDHg, v primerjavi z MiliQ in LB, v hranilnem gojišču največja (v območju LB po 12 h) (Slika 21B). Močna oksidacijska sposobnost LB gojišča se je ponovila še v preostalih dveh poskusih znotraj 2. hipoteze (Sliki 22 – vzorec E.coliG, 24). Organski ogljik je bil v našem primeru prisoten v obeh gojiščih (NB in LB), gojišči sta bili izpostavljeni nesterilnemu sedimentu, v katerem se nahajajo poleg Hg<sup>0</sup> in HgS še druge oblike Hg (metil-Hg, dimetil-Hg, Hg-POM, Hg-DOM, Hg<sup>2+</sup>). Zato predpostavljamo, da je na naše rezultate poleg kemijske oksidacije živega srebra vplivalo tudi dejstvo, da je bil uporabljeni sediment nesterilen. Rast mikroorganizmov pa je bolj pospešilo LB gojišče, kot pa hranilno gojišče. Hranilno gojišče je počasneje pripomoglo k rasti mikroorganizmov in oksidaciji Hg, kar je opazno po 36 h izpostavitvi. Ti mikroorganizmi pa so bili po vsej verjetnosti v veliki meri odporni na Hg, saj je bil sediment nabran v Idriji pri Kolektorju, kjer so koncentracije Hg najvišje.

Iz zgornjih rezultatov nismo izvedeli, ali ima pri nekem sevu vpliv na biološko pretvorbo Hg sekundarni metabolit s posrednim delovanjem, ali celica z neposrednim delovanjem. Zato smo na sevih, za katere se je v prvih dveh poskusih izkazalo, da imajo vpliv na Hg, naredili še serijo poskusov, kjer smo preverili način delovanja seva na Hg. Optimizacija protokola je pokazala, da je mogoče izmeriti najvišje koncentracije Hg pri direktnem vplivu celic na sediment v primeru, ko usedlino celic zmešamo s sedimentom nasičenem z vodo, brez dodane dodatne količine vode, NaCl ali gojišča (Slika 29). Tako smo z optimiziranim protokolom prišli do rezultatov, ki so pokazali, da B. subtilis ne oksidira Hg niti zunaj niti znotraj celic (Sliki 30, 31), medtem ko B. atrophaeus od vseh sevov najbolje oksidira Hg znotraj celic (v primeru normalizacije rezultatov na količino proteinov, Slika 31). Sledita mu P. fluorescens in P. stutzeri. Slednja se je izkazala za najučinkovitejši sev za privzemanje Hg v celico v primeru normalizacije koncentracije Hg na število celic (Slika 33). Izkazalo se je, da so celice P. stutzeri vsebovale največje koncentracije tako BDHg kot tudi THg. Znano je, da določene bakterije vplivajo na topnost mineralov z oksidoredukcijskimi reakcijami na površini minerala z direktnim kontaktom celične membrane s površino minerala. Tak primer je tudi anaerobna oksidacija elementarnega žvepla in nastanek kovinskih sulfidov pri različnih mineralnih sulfidih (npr. pirit) (Uroz in sod., 2009). Prepostavljamo, da so tudi B. atrophaeus, P. fluorescens in P. stutzeri s procesom anaerobne oksidacije lahko pripomogli k pretvorbam HgS v BDHg.

Način, s katerim smo ocenili vpliv bakterijskih celic na povečevanje BDHg, je bila meritev luminiscence biosenzorskih celic. Z biosenzorskimi celicami smo lahko merili le ionsko, biološko dostopno obliko Hg. Tovrstni biosenzorji imajo lahko zelo nizko mejo detekcije, celo 0,1 fM (Virta in sod., 1995). V našem primeru je bila meja detekcije pri 0,06 pM. Ker je znano, da se cinabarit in Hg<sup>0</sup> lahko oksidirata že z abiotskimi dejavniki, smo v poskusu izpostavili sedimentu tudi MiliQ vodo. V poskusu vpliva bakterijskih izvenceličnih produktov na povečanje biološko dostopne frakcije živega srebra v sedimentih smo po 12 h izpostavitvi v MiliQ vzorcu izmerili kar visoke koncentracije BDHg (6  $\mu$ g/l), pri čemer so bile koncentracije izmerjene v sedimentih iz Idrije večje, kot v sedimentih iz Sp. Idrije. To nam ponovno potrdi že dobro znano dejstvo o največji onesnaženosti okolja s Hg v Idriji, dokazano s kemijskimi in

genetskimi analizami (Sliki 19, 20). Na drugi strani pa so bile pri poskusu vpliva po metabolizmu različnih mikroorganizmov na povečanje biološko dostopne frakcije živega srebra v sedimentih koncentracije BDHg pod mejo detekcije. Predpostavljamo, da je do omenjene razlike prišlo zaradi različnega postopka izvedbe poskusa. V drugem poskusu so se namreč vsi vzorci stresali na 3-D rotacijskem stresalniku s hitrostjo 60 rpm, v primerjavi s prvim poskusom, kjer so se vzorci stresali pri 1500 rpm. Večja kot je hitrost stresanja, več kisika prihaja v vzorec in pride do večje kemijske oksidacije živega srebra. Na naraščajočo stopnjo oksidacije HgS s povečevanjem hitrosti stresanja so opozorili tudi Barnett in sod. (2001). Iz tega sledi, da je v naravi zelo malo biološko dostopne frakcije Hg, ki je mi z našimi senzorskimi celicami nismo mogli izmeriti. Možni vzroki za tako majhno prisotnost BDHg v sedimentih so: 1) hitra vezava Hg<sup>2+</sup> na organske in anorganske spojine; 2) redukcija Hg<sup>2+</sup> s procesom detoksifikacije z mikroorganizmi; 3) metilacija Hg<sup>2+</sup> z mikroorganizmi (Barkay in sod., 2003; Ravichandran, 2004), pri čemer je delež metiliranega Hg najmanjši. Znano je namreč, da se lahko izmed vsega BDHg metilira le 4 % živega srebra.

# 5.3 VPLIV CIANID IN SIDEROFOR PRODUCIRAJOČIH BAKTERIJ NA BIOLOŠKE TRANSFORMACIJE CINABARITA IN ELEMENTARNEGA ŽIVEGA SREBRA

V naravi živijo mikroorganizmi, ki si s sproščanjem specifičnih sekundarnih metabolitov (cianid, antibiotiki, siderofori) omogočijo lažje preživetje v določenem okolju. S sekundarnimi metaboliti si lahko omogočijo lažje privzemanje za rast pomembnih snovi iz okolja (siderofori), ali pa onemogočijo rast njim škodljivih ali celo drugim organizmom škodljivih mikroorganzmov v svoji okolici (cianid, antibiotiki) (Haas in Defago, 2005). Mikroorganizme, ki sintetizirajo cianid, so našli v sladkovodnem in zemeljskem okolju (Castric K. F. in Castric P. A., 1983). Najbolj preučevani so mehanizmi zaviranja rastlinskih patogenov (bakterijskih in glivnih) v rizosferi (Haas in Defago, 2005; Schippers in sod., 1987; Zdor in Anderson, 1992). Ker nas je zanimala prisotnost cianogenih mikroorganizmov v okolju onesnaženem z živim srebrom, smo z gojitvenimi tehnikami preverili deleže mikroorganizmov, ki sintetizirajo cianid v reki Idrijci. Izkazalo se je, da v okolju s povečanim onesnaženjem z živim srebrom (vzorčni mesti Idrija in »dimnik«), živi tudi večji delež Hg rezistentnih mikrooganizmov, ki sintetizirajo cianid in cianid ter siderofore skupaj (Slika 36). Oba sekundarna metabolita sta značilna za bakterije rodu Pseudomonas, ki so tudi v reki Idrijci najštevilčneje zastopane (filogenetska analiza, Sliki 16 in 17). Medtem pa so bili Hg rezistentni mikroorganizmi, ki niso sintetizirali nobenega izmed omenjenih sekundarnih metabolitov, najbolje zastopani na manj onesnaženih vzorčnih mestih

(Bela, Sp. Idrija). Pomena cianidnih producentov v okolju onesnaženem z živim srebrom ni preučeval še nihče. Rezultati naše raziskave so pokazali, da imajo cianidni producenti, ki so rezistentni na živo srebro, pomembno vlogo v biogeokemijskem ciklu živega srebra, saj vplivajo tako na topnost Hg<sup>0</sup> kot HgS. Posredna izpostavitev (z dializno vrečko) Hg rezistentnega cianidnega producenta Hg<sup>0</sup> je pokazala linearno postopno zviševanje koncentracij BDHg (Slika 37), ki so pri najdaljši časovni inkubaciji za več kot 2x presegle koncentracije BDHg, ki so se tvorile pri kontroli, zaradi kemijskih (organske snovi, dovod kisika) in/ ali fizikalnih dejavnikov (stresanje). Pri tem se je pojavila tudi ekspresija merA gena, ki je bila največja ob 7 h inkubaciji, po 22 h pa je že upadla na račun propadanja bakterijske kulture. Koncentracije cianida se niso med inkubacijami razlikovale od kontrole. Iz tega sklepamo, da bakterije ob stiku s Hg<sup>0</sup> ne povečajo produkcije cianida, ampak ga sintetizirajo ne glede na koncentracije živega srebra v okolju. Toda posledično cianid, ki pride v stik s Hg<sup>0</sup>, z njim reagira, pri čemer nastane BDHg, ki pri Hg rezistentnih mikroorganizmih aktivira mer operon. Do razlik v koncentracijah cianida ni prišlo, ker je sinteza cianida regulirana s sistemom »zaznavanja celične gostote« (quorum sensing) (Pearson in sod., 1997; Pesci in sod., 1997). Bakterije s sintezo cianida nehote vplivajo na topnost Hg<sup>0</sup>, pri čemer povečujejo koncentracije BDHg, ki pa predstavljajo toksično okolje za nerezistentne mikroorganizme. Sicer se je v poskusu neposredne izpostavitve mikroorganizmov Hg<sup>0</sup> izkazalo, da je Hg<sup>0</sup> v visokih koncentracijah toksičen tudi za rezistentne necianidne producente. V našem poskusu, kjer so bile koncentracije Hg<sup>0</sup> visoke, je preživel le rezistenten cianidni producent, kar kaže na močno kompeticijsko prednost rezistentnih mikroorganizmov, ki sintetizirajo cianid, v okolju onesnaženem s Hg. Kompeticijsko prednost jim najverjetneje omogočata dve lastnosti: 1) sposobnost cianida za vezavo na prehodne kovine (Penneman in Jones, 1961; Gomes in sod., 1997) in 2) rezistenca na Hg. Cianid zaradi svoje sposobnosti kompleksacije kovin raztaplja Hg<sup>0</sup>, pri čemer nastaja  $Hg^{2+}$ . Nekaj  $Hg^{2+}$  se veže nazaj s cianidom, saj je znano, da živo srebro reagira z v vodi raztopljnim cianidom in tvori različne HgCN komplekse ((Hg(CN)<sub>4</sub>, Hg(CN)<sub>3</sub>, Hg(CN)<sub>2</sub>Cl<sup>-</sup>, Hg(CN<sub>3</sub>Cl)) (Penneman in Jones, 1961; Gomes in sod., 1997). V naši raziskavi smo pokazali, da se pri 50 µM HgCl<sub>2</sub> veže ravno 50 µM cianida (Slika 50). Preostali  $Hg^{2+}$  pa bakterije reducirajo z *mer* operonom. V našem primeru se je izkazalo, da mehanizem rezistence pri visokih koncentracijah Hg<sup>0</sup> ne omogoči preživetja bakteriji, prav tako ni mogla preživeti nerezistentna bakterija, ki je sintetizirala cianid. Iz tega sklepamo, da cianid pomembno pripomore k preživetju bakterij v okolju močno onesnaženem s Hg<sup>0</sup>.

Na drugi strani se je ob neposredni izpostavitvi (brez dializne vrečke) Hg rezistentnega mikroorganizma cinabaritu izkazalo, da bakterije ob stiku s HgS povečajo koncentracije BDHg za več kot 60x (Slika 47). Toda v nasprotju z izpostavitvijo Hg<sup>0</sup>, v tem primeru

bakterija poveča tudi produkcijo cianida za več kot 4x v primerjavi s kontrolo (Slika 48). Iz kemijskih poskusov je znano, da raztopina CN močno poveča topnost cinabarita (Shaw in sod., 2006). Predvidevamo, da regulacija sinteze cianida v tem primeru ne poteka zgolj s sistemom »zaznavanja celične gostote« (quorum sensing), ampak še z nam neznanim mehanizmom, ki je reguliran nad omenjenim mehanizmom. Indukcijo sinteze cianida bi lahko v tem primeru spodbudile npr. produkcija reaktivnih kisikovih spojin, ali pa poškodbe celic. Predpostavljamo, da bakterije s sproščanjem cianida povečujejo topnost cinabaritu, s čimer se povečujejo koncentracije BDHg. Posledično cianidni producenti s tem ustvarjajo toksično okolje za nerezistentne organizme, za katere sam HgS ni toksičen, kar kažejo tudi naši rezultati (Sliki 47 in 49).

Na topnost Hg<sup>0</sup> ali HgS vpliva tudi kontakt celic z omenjenima oblikama Hg. Pri posredni izpostavitvi rezistentnega cianidnega producenta cinabaritu ni prišlo do nikakršnega učinka, saj po vsej verjetnosti cianid, ki so ga sintetizirale bakterijske celice, ni imel možnosti za kompleksacijo s HgS preko dializne vrečke. Medtem je pri enaki izpostavitvi istega seva Hg<sup>0</sup> prišlo do transformacij Hg<sup>0</sup> v BDHg, le-te pa so bile več kot 20x manjše kot pri neposredni izpostavitvi enaki količini Hg<sup>0</sup>. Rezultati kažejo na to, da bakterije z direktnim kontaktom bistveno bolj pripomorejo k pretvorbam Hg, v primerjavi s kontaktom preko dializne vrečke, zaradi česar je tudi toksičnost za celice večja. Rezistenten necianidni producent je ob posredni izpostavitvi imel namreč celo pospešeno rast, medtem ko je pri neposredni izpostavitvi propadel. Pri posredni izpostavitvi pore v dializni vrečki postopoma prepuščajo manjše količine ionov Hg, ki jih bakterija sproti reducira preko *mer* operona in ji tako ne predstavljajo nevarnosti. Enak učinek je viden tudi pri rezistentnem cianidnem in siderofornem producentu.

Razlika med posredno in neposredno izpostavitvijo je bila opazna tudi pri izpostavitvi gojišča  $Hg^0$ . Pri posredni izpostavitvi so bile koncentracije BDHg za vse intervale izpostavitve približno enake (Sliki 37, 39). Pri rezultatih neposredne izpostavitve gojišča KingB  $Hg^0$  pa se kažejo razlike v koncentracijah BDHg s časovnimi inkubacijami (Slika 44). Po 3 h in 6 h inkubaciji se je namreč pojavil upad koncentracije BDHg, glede na koncentracije po 1 h in 22 h inkubaciji. Ta pojav bi lahko pripisali trenutni oksidirajoči aktivnosti gojišča KingB po 1 h inkubaciji, ki ji sledi kompleksacija BDHg z organskimi komponentami gojišča. Po 6 h pride do nasičenja. Zaradi zaprtega sistema in stresanja je po 22 h oksidacija še vedno večja od redukcije. KingB namreč vsebuje veliko količino peptona, ki lahko tako kot kvasni ekstrakt oksidira  $Hg^0$  zaradi velike vsebnosti organskih spojin (Holm in Cox, 1974). V bakterijski kulturi do kemijske oksidacije ne pride, saj mikroorganizmi organske snovi porabijo za svojo rast. Tako koncentracija BDHg linearno narašča z rastjo bakterijske kulture.

Bakterija, ki sintetizira siderofore, je ob posrednem kontaktu s HgS ali Hg<sup>0</sup> prenehala sintetizirati siderofore v primerjavi s kontrolo, kjer je bila sinteza sideroforov visoka. Koncentracije BDHg so se sicer povečevale s časom inkubacije, vendar verjetno na račun rezistence mikroorganizma. Tako vpliva sideroforov na povečanje biološke dostopnosti HgS in Hg<sup>0</sup> nismo ugotovili. Predpostavljamo dva različna možna vzroka, zaradi katerih bakterija ni sintetizirala sideroforov: 1) redoks aktivnost Hg in 2) napaka v delovnem postopku. Živo srebro je v vodnem mediju zelo redoks aktivno, pri čemer se tvorijo reaktivne kisikove spojine. Le-te pa negativno vplivajo na produkcijo sideroforov. Po drugi strani pa dopuščamo tudi možnost, da je prišlo v delovnem postopku do napake. Iz literature je namreč znano, da se pri P. aeruginosi ob prisotnosti težkih kovin zmanjša sinteza sideroforov za več kot polovico, pri P. fluorescens pa ostane približno enaka. Poleg tega so poskusi tudi pokazali, da omenjeni bakteriji ne zmanjšata sinteze sideroforov ob prisotnosti železa, skupaj s težkimi kovinami v gojišču (Braud s sod., 2006), kar se sicer zgodi ob dodatku samega železa gojišču. Pri poskusu smo zagotovili steklovino, očiščeno s kislino, in minimalno gojišče. Glede na to, da je kontrola sintetizirala siderofore in da se le-ti niso sintetizirali pri kulturah z dodanim HgS ali Hg<sup>0</sup>, sklepamo, da je bilo lahko železo vnešeno v gojišče ob dodajanju omenjenih kovin v dializno vrečko. V HgS je bilo lahko vnešeno dovolj železa že s tehtanjem HgS z železno spatulo. Pri Hg<sup>0</sup> pa je bila težava že v izvorni kovini, ki ni bila popolnoma čista. Tako iz danih rezultatov ne moremo podati nikakršnega zaključka.

### 6 SKLEPI

Kvantitativna detekcija *merA* gena v biofilmih reke Idrijce je pokazala visoko korelacijo s koncentracijami THg v koncentracijskem območju med 1 µg/g in 60 µg/g suhe teže. Sklepamo, da lahko mikroorganizmi v biofilmih, v območju onesnaženem z živim srebrom, razvijejo z onesnaženjem povzročeno toleranco združbe (PICT). Biofilmska združba je v primerjavi s planktonsko statična, zaradi česar je pod večjim vplivom različnih vrst živega srebra, ki se lahko pretvarjajo znotraj biofilmov, kar vodi v selekcijo rezistentnih celic.

Na prisotnost *merA* gena v rečnih biofilmih lahko poleg živega srebra vplivajo različni dejavniki, ki negativno vplivajo na korelacijo med THg in številom kopij gena *merA*. Sklepamo, da na korelacijo negativno vplivajo selitve mikrobnih združb iz neonesnaženih področij na onesnažena z vodnim tokom, izlivi komunalnih odplak in iztoki iz čistilnih naprav.

Analiza mikrobnih združb med različnimi letnimi časi je pokazala, da se na viru onesnaženja ni razvila nobena specifična mikrobna združba. Sklepamo, da je učinke onesnaženja na epilitsko mikrobno združbo težko ovrednotiti, saj na njeno kolonizacijo in razvoj biofilmov vplivajo najrazličnejši dejavniki, kot so: vodni tok, velikost kamnov, zgradba površine in sestava kamnov, tip in količina organskega materiala, temperatura, pH in količina kisika.

Raziskava vpliva izvenceličnih produktov na povečevanje biološko dostopne frakcije živega srebra v sedimentih iz Idrijce je pokazala, da imajo bakterije *Bacillus atrophaeus*, *Lactobacillus acidofilus*, *Janthinobacterium lividum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli* in v manjši meri tudi *Bacillus subtilis* ter *Rhizobium pisi*, pozitiven vpliv na povečanje koncentracij BDHg. Sklepamo, da omenjene bakterije vplivajo na povečevanje BDHg s sproščanjem izvenceličnih produktov, ki vplivajo na topnost živo srebrovih spojin, predvsem cinabarita. Takšni izvencelični produkti so lahko različne vrste kratko verižnih maščobnih kislin, siderofori in/ ali cianid.

Raziskava vpliva neposrednega kontakta celic s sedimentom bogatim s HgS in Hg<sup>0</sup> na povečevanje biološko dostopne frakcije živega srebra v sedimentih je pokazala, da imajo bakterije *Bacillus atrophaeus*, *Pseudomonas fluorescens* in *Pseudomonas stutzeri* pozitiven vpliv na povečanje koncentracij BDHg. Sklepamo, da na povečevanje BDHg vplivajo z oksidoredukcijskimi procesi na površini minerala HgS.

Cianidni producenti so bili bolje zastopani na mestih onesnaženih s Hg. Predpostavljamo, da cianid s svojo sposobnostjo kompleksacije težkih kovin omogoča bakterijam lažje preživetje v okolju, onesnaženem s Hg.

Testiranje vpliva Hg rezistentnih cianidnih producentov na topnost  $Hg^0$  je pokazalo, da mikrooganizmi ob posrednem kontaktu s  $Hg^0$  povečajo koncentracije BDHg, pri čemer ne spremenijo sinteze cianida. Poleg tega se v mikroorganizmih poveča ekspresija *merA* gena. Iz rezultatov lahko sklepamo, da cianidni producenti s sintezo cianida nehote vplivajo na topnost  $Hg^0$ , pri čemer se povečajo biološko dostopne frakcije Hg, ki aktivirajo *mer* operon.

Testiranje vpliva Hg rezistentnih cianidnih producentov na HgS je pokazalo, da se ob neposrednem kontaktu celic s HgS koncentracije BDHg v primerjavi s kontrolo povečajo za več kot 60x. Poleg tega bakterija poveča produkcijo cianida za 4x. Sklepamo, da je povečana koncentracija BDHg posledica povečanih koncentracij cianida. Bakterija, ki je rezistentna proti Hg, povečuje BDHg s sproščanjem cianida v okolje, bogato s HgS. S tem onemogoča rast nerezistentnim bakterijam, medtem ko je sama zaščitena pred toksičnimi vplivi Hg, saj z mehanizmom rezistence pretvori BDHg v njej netoksične oblike Hg (Hg<sup>0</sup>, metil-Hg).

Bakterije, ki producirajo cianid, so bile zaradi sinteze cianida, ki lahko raztaplja Hg<sup>0</sup> in HgS v BDHg, evolucijsko prisiljene v hitrejši razvoj rezistence proti Hg. Posledično so v takem okolju kompeticijsko uspešnejše, kar vodi v pozitivno selekcijo HgR sevov. Po drugi strani pa cianid producirajoče bakterije povzročajo negativno selekcijo sevov, ki ne sintetizirajo cianida. Ti sevi namreč kljub rezistenci na Hg ne preživijo pri visokih koncentracijah Hg.

#### 7 POVZETEK (SUMMARY)

#### 7.1 POVZETEK

Živo srebro (Hg) je v naravnem okolju v veliki meri biološko težko dostopno. Takšne oblike živega srebra so cinabarit (HgS), elementarno živo srebro (Hg<sup>0</sup>) in živo srebro vezano s partikulatnim materialom (Hg-POM) in raztopljenim organskim materialom (Hg-DOM). V reki Idrijci je cinabarit prevladujoča oblika Hg, ki ji sledi elementarno živo srebro. V prvem delu naloge nas je zanimalo, ali je kljub prevladujočim biološko slabo dostopnim ali celo nedostopnim oblikam živega srebra (Hg<sup>0</sup>, HgS, Hg-POM, Hg-DOM) selekcijski pritisk dovolj velik, da je količina nedostopnih oblik živega srebra v korelaciji s količino bakterij odpornih na živo srebro. Iz mikrobnih združb v biofilmih reke Idrijce smo izolirali DNA in s kvantitativnim PCR določili koncentracije merA gena v vzorcih gradienta onesnaženja z živim srebrom. Koncentracije gena merA so bile v koncentracijskem območju med 1 µg/g in 60 µg/g suhe teže v korelaciji s koncentracijami THg ( $R^2 = 0.94$ ). Na korelacijo pa lahko negativno vplivajo človeški in abiotski dejavniki. Ugotovili smo namreč, da na količino merA gena vpliva vodni tok, ki prinaša mikroorganizme iz neonesnaženih področij na onesnažena (neutralna teorija) ter izlivi komunalnih odplak in čistilnih naprav. Poleg tega smo z metodo TTGE analizirali mikrobne združbe in ugotovili, da na mestu onesnaženem s Hg ne obstaja nobena specifična združba. Združbe se spreminjajo z letnimi časi in na njihovo vrstno sestavo vpliva še veliko drugih okoljskih dejavnikov, ne le onesnaženje s Hg. Sklepamo, da bakterijske združbe v biofilmih, ki so zaradi svojega pritrjenega načina življenja pod močnim vplivom onesnaženja, razvijejo od onesnaženja povzročeno toleranco združbe (PICT), ki jo lahko določimo z meritvami kopij merA gena.

V nadaljevanju nas je zanimalo zakaj obstaja korelacija med koncentracijo *merA* in THg glede na to, da v reki Idrijci prevladujejo biološko nedostopne oblike Hg. Ali lahko bakterije vplivajo na topnost živega srebra v sedimentih Idrijce z direktnim kontaktom s sedimentom ali pa morda z izvenceličnimi produkti? Znano je, da lahko nekateri mikroorganizmi oksidirajo Hg<sup>0</sup> (*Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli, Citrobacter* sp., *Bacillus subtilis in Bacillus megaterium*). Oksidacija naj ne bi potekala s pomočjo encimov, ampak je običajno rezultat interakcije Hg<sup>0</sup> z metabolnimi produkti mikroorganizmov. Nič pa ni znanega o bioloških transformacijah HgS. V prvem delu naše raziskave smo izbrali po metabolizmu različne mikroorganizme in jih kot celično kulturo ali pa supernatant stacionarne kulture izpostavili sedimentu. Po izpostavitvi smo z biosenzorskimi celicami izmerili koncentracije BDHg v vzorcih. Ugotovili smo, da so bakterije *Bacillus atrophaeus, Janthinobacterium lividum, Lactobacillus acidofilus, Pseudomonas fluorescens, fluorescens*,

*Pseudomonas stutzeri, Escherichia coli* in v manjši meri tudi *Bacillus subtilis* in *Rhizobium pisi* povečale koncentracije BDHg v vzorcih. Sklepamo, da lahko omenjeni mikroorganizmi povečujejo biološko dostopne frakcije Hg s sproščanjem kratko verižnih maščobnih kislin, sideroforov in/ ali cianida. Poleg tega smo tudi celice (brez gojišča) omenjenih bakterijskih sevov izpostavili direktnemu kontaktu s sedimentom. Izkazalo se je, da *Bacillus atrophaeus, Pseudomonas fluorescens* in *Pseudomonas stutzeri* privzamejo BDHg v celice. Predpostavljamo, da celice z oksidoredukcijskimi procesi ob vezavi na površino HgS v sedimentih vplivajo na njegovo topnost.

V prvem delu doktorske naloge je bilo dokazano, da v Idrijci prevladujejo bakterije iz rodu Pseudomonas. To je v naravi splošno razširjena skupina bakterij, ki tvori siderofore, nekatere med njimi pa tudi cianid. Zanimalo nas je, ali lahko bakterije z izločanjem sideroforov ali HCN, pripomorejo k topnosti Hg<sup>0</sup> in HgS, in s tem k povečanju biološko dostopne frakcije živega srebra. Iz reke Idrijce smo izolirali producente sideroforov in cianida. Ob popisu smo ugotovili, da je na območju Idrije, kjer je onesnaženje največje, tudi delež rezistentnih cianidnih producenov največji. Sprva smo izpostavili Hg rezistenten cianidni producent in Hg rezistenten sideroforni producent elementarnemu živemu srebru preko dializne vrečke. Pri izpostavitvi Hg rezistentnega cianidnega producenta  $Hg^0$  se je koncentracija  $Hg^{2+}$  povečala, pri čemer bakterija ni spremenila produkcije cianida. Sklepamo, da je cianid vplival na topnost  $Hg^0$ , pri čemer se je sproščal  $Hg^{2+}$ , ki je povzročil ekspresijo *merA* gena. Izkazalo se je, da bakterije s produkcijo cianida nehote povečujejo koncentracije BDHg, iz česar sklepamo, da so bile v evoluciji prisiljene hitreje razviti rezistenco na Hg. Pri izpostavitvi siderofornega producenta Hg<sup>0</sup> pa HgR sev ni produciral sideroforov. Predpostavljamo, da do sinteze sideroforov ni prišlo zaradi močne redoks aktivnosti Hg. Reaktivne kisikove spojine, ki pri tem nastanejo, zavrejo sintezo sideroforov in prisilijo celice v stradanje s Fe. V nadaljevanju smo Hg rezistenten in Hg nerezistenten cianidni producent izpostavili Hg<sup>0</sup> in HgS z neposrednim kontaktom (HgS/Hg<sup>0</sup> v celični kulturi, brez dializne vrečke). Ob neposredni izpostavitvi HgR cianidnega producenta HgS so se prav tako povečale koncentracije  $Hg^{2+}$ , toda v tem primeru je tudi bakterija pričela sintetizirati večje količine cianida v primerjavi s kontrolo. Bakterija s povečevanjem sproščanja cianida povzroča vse večje raztapljanje cinabarita in s tem toksično okolje za Hg nerezistentne mikroorganizme. Cianid tako na eni strani povzroča pozitivno selekcijo Hg rezistentnih cianidnih producentov, na drugi strani pa negativno selekcijo cianid neproducirajočih mikroorganizmov, tako nerezistentnih kot rezistentnih. Iz rezultatov lahko povzamemo, da so cianidni producenti kompeticijsko močnejši v okolju onesnaženem z živim srebrom.

#### 7.2 SUMMARY

Mercury (Hg) is commonly non-bioavailable in the natural environment. Such forms of mercury are cinnabar (HgS), elemental mercury (Hg<sup>0</sup>) and mercury bound to particulate material and to dissolved organic material. In Idrijca river cinnabar is a dominant form of Hg, followed by elemental mercury. In the first part of the study we were interested in whether, despite the dominant non-bioavailable forms of mercury (Hg<sup>0</sup>, HgS, Hg-POM, Hg-DOM), the selection pressure is large enough that the amount of total mercury correlates with the amount of bacteria resistant to mercury. DNA was isolated from microbial communities in river Idrijca biofilms and the concentrations of merA gene in samples of the mercury gradient pollution were determined using PCR. Concentrations of *merA* gene in the concentration range between 1  $\mu$ g/g and 60  $\mu$ g/g of dry weight were in correlation with the concentrations of the THg ( $R^2 = 0.94$ ). The observed correlation, however, can be under a negative impact by anthropomorphic and abiotic factors. We observed a variation in merA gene amounts in relation to microorganism inflow from un-contaminated upstream areas to contaminated ones, as well as in relation to municipal wastewaters and treatment plants outflows. Further on we analysed microbial communities using the TTGE method, with results indicating that Hg contaminated areas did not contain a specific community. Such microbial communities are affected by the seasons and other factors as well as Hg pollution. We conclude that bacterial communities in biofilms, which are highly exposed to contamination due to being attached to a surface, develop a Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) that can be determined by measuring merA gene copies.

Further on, we were interested in the cause of the correlation between the merA gene concentration and THg, regarding the fact that non-bioavailable forms of Hg are dominant in Idrijca River. Can bacteria affect the solubility of mercury in river Idrijca sediments by a direct contact with sediment or with extra-cellular products? Some microorganisms, such as Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli, Citrobacter, Bacillus subtilis and Bacillus megaterium are known to oxidize Hg<sup>0</sup>, but biological transformations of HgS are unknown. The oxidation should not take be enzymatic, but is usually a result of the interactions of Hg<sup>0</sup> with metabolic products of microorganisms. Little is known about biological transformation of cinnabar. In the first part of our study, we have selected microorganisms, differing in their metabolism. They were exposed to sediment as a cell culture or as a stationary culture supernatant. After the exposure, concentration of  $Hg^{2+}$  in the samples was measured using the biosensor cells. We found, that the bacteria Bacillus subtilis, Bacillus atrophaeus, Janthinobacterium lividum, Lactobacillus acidofilus, Pseudomonas fluorescens and Psedomonas stutzeri increased the concentrations of Hg<sup>2+</sup>

in the samples. We conclude that the above mentioned microorganisms increase the bioavailable fractions of Hg by releasing short chain fatty acids, siderophore and cyanide. In addition, cells (without broth) of the mentioned bacterial strains were exposed to a direct contact with the sediment. It has been shown that *Bacillus atrophaeus*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas stutzeri* are embracing Hg<sup>2+</sup> into the cells. We conclude that by binding to the surface of HgS in sediments cells affect it's solubility with oxidation-reduction processes.

In the first part of the doctoral thesis it was shown that in Idrijca River bacteria of the genus Pseudomonas are dominating. This is a widespread group of bacteria in nature, forming siderophores, as well as cyanide by some group members. We were interested in whether the bacteria can contribute to the solubility of Hg<sup>0</sup> and HgS, and thus to an increase in bioavailable fraction of mercury by secretion of siderophores or cyanide. Siderophores and cyanide producers were isolated from Idrijca River. During the sampling it was found that the greatest proportion of cyanide producers is located in the area of town Idrija, where Hg pollution is highest. Firstly, we have exposed Hg resistant cyanide producer and Hg resistant siderophore producer to elemental mercury using a dialysis bag. At the exposer of Hg resistant cyanide producer to Hg<sup>0</sup> the concentration of  $Hg^{2+}$  increased, whereby the bacteria did not change the production of cyanide. We conclude that cyanide has influenced the solubility of Hg<sup>0</sup>, whereby the Hg<sup>2+</sup> was released, resulting in the expression of merA gene. When exposing the siderophore producer to Hg<sup>0</sup>, the strain did not produce siderophores, probably because of redox activity of Hg. Further on, Hg-resistant and Hg non-resistant cyanide producers were exposed to Hg<sup>0</sup> and HgS by a direct contact (HgS/Hg<sup>0</sup> in a cell culture, without a dialysis bag). At a direct Hg resistant cyanide producer exposure to HgS, the concentration of Hg<sup>2+</sup> was also increased, but in this case the bacteria also started to synthesize large quantities of cyanide, compared to a control. By an increasing release of cyanide bacteria causes an increasing level of dissolution of cinnabar and through this a toxic environment for Hg non-resistant microorganisms and, consequently, the selection of resistant determinants. This way the results indicate that cyanide producing microorganisms are competitively advanced in a Hg polluted environment.

#### 8 VIRI

- Alberts J. J., Schindler J. E., Miller R. W., Nutter D. E. 1974. Elemental mercury evolution mediated by humic acid. Science, 184, 4139: 895-897
- Åkesson M., Karlsson E. N., Hagander P., Axelsson J. P., Tocaj A. 1999. On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients. Biotechnology and Bioengineering, 64, 5: 590-598
- Amyot M., Gill G. A., Morel F. M. 1997. Production and loss of dissolved gaseous mercury in coastal seawater. Environmental Science and Technology, 31, 12: 3606-3611
- Ancion P. Y., Lear G., Dopheide A., Lewis G. D. 2013. Metal concentrations in stream biofilm and sediments and their potential to explain biofilm microbial community structure. Environmental Pollution, 173: 117-124
- Askeland R. A., Morrison S. M. 1983. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, 45, 6: 1802-1807
- Babiarz C. L., Hurley J. P., Hoffmann S. R., Andren A. W., Shafer M. M., Armstrong D. E. 2001. Partitioning of total mercury and methylmercury to the colloidal phase in freshwaters. Environmental Science and Technology, 35, 24: 4773-4782
- Baldi F., Olson G. J. 1987. Effects of cinnabar on pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and cinnabar mobilization by a mercury-resistant strain. Applied and Environmental Microbiology, 53, 4: 772-776
- Balogh S. J., Meyer M. L., Johnson D. K. 1996. Mercury and suspended sediment loadings in the lower Minnesota River. Environmental Science and Technology, 31, 1: 198-202
- Baker-Austin C., Wright M. S., Stepanauskas R., McArthur J. V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends in Microbiology, 14, 4: 176-182
- Barnett M. O., Turner R. R., Singer P. C. 2001. Oxidative dissolution of metacinnabar (β-HgS) by dissolved oxygen. Applied Geochemistry, 16, 13: 1499-1512
- Barkay T., Gillman M., Turner R. R. 1997. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. Applied and Environmental Microbiology, 63, 11: 4267-4271
- Barkay T., Miller S.M., Summers A. O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiology Reviews, 779: 1-30
- Barkay T., Wagner Döbler I. 2005. Microbial transformations of mercury: potentials, challenges, and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. Advances in Applied Microbiology, 57: 1-52
- Ben-Bassat D., Mayer A. M. 1978. Light-Induced Hg volatilization and O<sub>2</sub> evolution in Chlorella and the effect of DCMU and methylamine. Physiologia Plantarum, 42, 1: 33-38
- Batt A. L., Bruce I. B., Aga D. S. 2006. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. Environmental Pollution, 142, 2: 295-302
- Begley T. P., Walts A. E., Walsh C. T. 1986. Mechanistic studies of a protonolytic organomercurial cleaving enzyme: bacterial organomercurial lyase. Biochemistry, 25, 22: 7192-7200

- Benoit J. M., Mason R. P., Gilmour C. C., Aiken G. R. 2001. Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolates from the Florida Everglades. Geochimica et Cosmochimica Acta, 65, 24: 4445-4451
- Biester H., Gosar M., Müller G. 1999. Mercury speciation in tailings of the Idrija mercury mine. Journal of Geochemical Exploration, 65, 3: 195-204
- Biester H., Gosar M., Covelli S. 2000. Mercury speciation in sediments affected by dumped mining residues in the drainage area of the Idrija mercury mine, Slovenia. Environmental Science and Technology, 34, 16: 3330-3336
- Bloom N. S., Preus E., Katon J., Hiltner M. 2003. Selective extractions to assess the biogeochemically relevant fractionation of inorganic mercury in sediments and soils. Analytica Chimica Acta, 479, 2: 233-248
- Blumer C., Heeb S., Pessi G., Haas D. 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 24: 14073-14078
- Blumer C., Haas D. 2000. Iron regulation of the *hcnABC* genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Microbiology, 146, 10: 2417-2424
- Bouskill N. J., Barker-Finkel J., Galloway T. S., Handy R. D., Ford T. E. 2010. Temporal bacterial diversity associated with metal-contaminated river sediments. Ecotoxicology, 19, 2: 317-328
- Braud A., Jézéquel K., Vieille E., Tritter A., Lebeau T. 2006. Changes in extractability of Cr and Pb in a polycontaminated soil after bioaugmentation with microbial producers of biosurfactants, organic acids and siderophores. Water, Air, and Soil Pollution: Focus, 6, 3-4: 261-279
- Brown N. L., Shih Y. C., Leang C., Glendinning K. J., Hobman J. L., Wilson J. R. 2002. Mercury transport and resistance. Biochemical Society Transactions, 30, 4: 715-718
- Brown N. L., Stoyanov J. V., Kidd S. P., Hobman J. L. 2003. The MerR family of transcriptional regulators. FEMS Microbiology Reviews, 27, 2-3: 145-163
- Bunch A. W., Knowles C. J. 1982. Production of the secondary metabolite cyanide by extracts of *Chromobacterium violaceum*. Journal of General Microbiology, 128, 11: 2675-2680
- Burlage R. S., Kuo C. 1994. Living biosensors for the management and manipulation of microbial consortia. Annual Reviews in Microbiology, 48, 1: 291-309
- Burkstaller J. E., McCarty P. L., Parks G. A. 1975. Oxidation of cinnabar by iron (III) in acid mine waters. Environmental Science and Technology, 9, 7: 676-678
- Castric P. A. 1975. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. Canadian Journal of Microbiology, 21, 5: 613-618
- Castric P. A. 1977. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. Journal of Bacteriology, 130, 2: 826-831
- Castric P. A., Ebert R. F., Castric K. F. 1979. The relationship between growth phase and cyanogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Current Microbiology, 2, 5: 287-292
- Castric K. F., Castric P. A. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 45, 2: 701-702

- Chancey S. T., Wood D. W., Pierson L. 1999. Two-Component transcriptional regulation of N-Acyl-Homoserine lactone production in *Pseudomonas* aureofaciens. Applied and Environmental Microbiology, 65, 6: 2294-2299
- Cipollone R., Frangipani E., Tiburzi F., Imperi F., Ascenzi P., Visca P. 2007. Involvement of *Pseudomonas aeruginosa rhodanese* in protection from cyanide toxicity. Applied and Environmental Microbiology, 73, 2: 390-398
- Cossa D., Sanjuan J., Noel J. 1994. Mercury transport in waters of the Strait of Dover. Marine Pollution Bulletin, 28, 6: 385-388
- Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Brambati A. 1999. Porewater distribution and benthic flux measurements of mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). Estuarine, Coastal and Shelf Science, 48, 4: 415-428
- Covelli S., Piani R., Kotnik J., Horvat M., Faganeli J., Brambati A. 2006. Behaviour of Hg species in a microtidal deltaic system: The Isonzo River mouth (northern Adriatic Sea). Science of the Total Environment, 368, 1: 210-223
- Crosa J. H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. Microbiological Reviews, 53, 4: 517-530
- Crosa J. H., Walsh C. T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66, 2: 223-249
- Curtis N. A., Eisenstadt R. L., East S. J., Cornford R. J., Walker L. A., White A. J. 1988. Iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12 and mechanism of action of catechol-substituted cephalosporins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 32, 12: 1879-1886
- De Magalhães M. E. A., Tubino M. 1995. A possible path for mercury in biological systems: the oxidation of metallic mercury by molecular oxygen in aqueous solutions. Science of the Total Environment, 170, 3: 229-239
- Devars S., Avilés C., Cervantes C., Moreno-Sánchez R. 2000. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. Archives of Microbiology, 174, 3: 175-180
- Di Toro D. M., Mahony J. D., Hansen D. J., Scott K. J., Carlson A. R., Ankley G. T. 1992. Acid volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. Environmental Science and Technology, 26, 1: 96-101
- Ebinghaus R., Kock H. H., Temme C., Einax J. W., Löwe A. G., Richter A., Burrows J. P., Schroeder, W. H. 2002. Antarctic springtime depletion of atmospheric mercury. Environmental Science and Technology, 36, 6: 1238-1244
- Egland K. A., Greenberg E. P. 1999. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. Molecular Microbiology, 31, 4: 1197-1204
- Engst S., Miller S. M. 1999. Alternative routes for entry of HgX<sub>2</sub> into the active site of mercuric ion reductase depend on the nature of the X ligands. Biochemistry, 38, 12: 3519-3529
- Fabbri D., Lombardo M., Trombini C., Vassura I., Zavoli E., Horvat M. 2001. Mercury contamination of a coastal lagoon (Pialassa Baiona, Ravenna, Italy). Materials and Geoenvironment, 48, 1: 186-192
- Fagerström T., Jernelöv A. 1971. Formation of methyl mercury from pure mercuric sulphide in aerobic organic sediment. Water Research, 5, 3: 121-122
- Fernández-Martínez R., Rucandio M. I. 2005. Study of the suitability of HNO<sub>3</sub> and HCl as extracting agents of mercury species in soils from cinnabar mines. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 381, 8: 1499-1506

- Fernández-Martínez R., Rucandio M. I. 2003. Study of extraction conditions for the quantitative determination of Hg bound to sulfide in soils from Almaden (Spain). Analytical and Bioanalytical Chemistry, 375, 8: 1089-1096
- Ferreira da Silva M., Vaz-Moreira I., Gonzalez-Pajuelo M., Nunes O. C., Manaia C. M. 2007. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. FEMS Microbiology Ecology, 60, 1: 166-176
- Fitzgerald W. F., Clarkson T. W. 1991. Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. Environmental Health Perspectives, 96: 159-166
- Frey B., Rieder S. R., Brunner I., Plötze M., Koetzsch S., Lapanje A., Brandl H., Furrer G. 2010. Weathering-associated bacteria from the Damma glacier forefield: physiological capabilities and impact on granite dissolution. Applied and Environmental Microbiology, 76, 14: 4788-4796
- Fuqua C., Greenberg E. P. 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. Current Opinion in Microbiology, 1, 2: 183-189
- Gavis J., Ferguson J. F. 1972. The cycling of mercury through the environment. Water Research, 6, 9: 989-1008
- Geldreich E. E., Litsky, W. 1976. Fecal coliform and fecal streptococcus density relationships in waste discharges and receiving waters. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 6, 4: 349-369
- Gewitz H. S., Pistorius E. K., Voss H., Vennesland B. 1976. Cyanide formation in preparations from Chlorella vulgaris Beijerinck: effect of sonication and amygdalin addition. Planta, 131, 2: 145-148
- Goldfarb W. B., Margraf H. 1967. Cyanide production by *Pseudomonas* aeruginosa. Annals of Surgery, 165, 1: 104-110
- Golding G. R., Kelly C. A., Sparling R., Loewen P. C., Rudd J. W., Barkay T. 2002. Evidence for facilitated uptake of Hg (II) by Vibrio anguillarum and Escherichia coli under anaerobic and aerobic conditions. Limnology and Oceanography, 47, 4: 967-975
- Gomes M. T. S., Silva A. A. F., Oliveira J. A. 1997. Optimisation of the experimental conditions of a new method, based on a quartz crystal microbalance, for the determination of cyanide. Analyst, 122, 10: 1139-1142
- Gosar M., Pirc S., Bidovec M. 1997. Mercury in the Idrijca River sediments as a reflection of mining and smelting activities of the Idrija mercury mine. Journal of Geochemical Exploration, 58, 2: 125-131
- Guasch H., Serra A., Corcoll N., Bonet B., Leira M. 2010. Metal ecotoxicology in fluvial biofilms: potential influence of water scarcity. V: The handbook of Environmental Chemistry/ Water Scarcity in the Mediterranean: Perspectives Under Global Change. Sabater S., Barceló D. (eds.). Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 41-53
- Guimaraes J. R. D., Betancourt O., Miranda M. R., Barriga R., Cueva E., Betancourt S. 2011. Long-range effect of cyanide on mercury methylation in a gold mining area in southern Ecuador. Science of the Total Environment, 409, 23: 5026-5033
- Haas D., Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescens pseudomonads. Nature Reviews Microbiology, 3, 4: 307-319
- Hakkila K., Maksimow M., Karp M., Virta M. 2002. Reporter Genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. Analytical Biochemistry, 301, 2: 235-242

- Haller L., Amedegnato E., Poté J., Wildi W. 2009. Influence of freshwater sediment characteristics on persistence of fecal indicator bacteria. Water, Air, and Soil Pollution, 203, 1-4: 217-227
- Hamel R., Appanna V. D. 2003. Aluminum detoxification in *Pseudomonas fluorescens* is mediated by oxalate and phosphatidylethanolamine. Biochimica et Biophysica Acta, 1619, 1: 70-76
- 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 Bacteriology, 174, 20: 6377-6385
- Hantke K. 1983. Identification of an iron uptake system specific for coprogen and rhodotorulic acid in *Escherichia coli* K12. Molecular and General Genetics MGG, 191, 2: 301-306
- Harnisz M. 2013. Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment. Environmental Pollution, 174: 85-92
- Heeb S., Haas D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14, 12: 1351-1363
- Heeb S., Blumer C., Haas D. 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmAdependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Journal of Bacteriology, 184, 4: 1046-1056
- Hersman L., Lloyd T., Sposito G. 1995. Siderophore-promoted dissolution of hematite. Geochimica et Cosmochimica Acta, 59, 16: 3327-3330
- Higgs P. I., Larse, R. A., Postle K. 2002. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. Molecular Microbiology, 44, 1: 271-281
- Hines M. E., Horvat M., Faganeli J., Bonzongo J. C. J., Barkay T., Major E. B., Scott K. J., Bailey E. A., Warwick J. J., Lyons W. B. 2000. Mercury biogeochemistry in the Idrija River, Slovenia, from above the mine into the Gulf of Trieste. Environmental Research, 83, 2: 129-139
- Holm H. W., Cox M. F. 1974. Transformation of elemental mercury by bacteria. Applied Microbiology 29, 4: 491-494
- Holley E. A., James McQuillan A., Craw D., Kim J. P., Sander S. G. 2007. Mercury mobilization by oxidative dissolution of cinnabar (α-HgS) and metacinnabar (β-HgS). Chemical Geology, 240, 3: 313-325
- Horvat M., Jereb V., Fajon V., Logar M., Kotnik J., Faganeli J., Hines M. E., Bonzongo, J. C. 2002. Mercury distribution in water, sediment and soil in the Idrijca and Soča river systems. Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis, 2, 3: 287-296
- Huerta-Diaz M. A., Morse J. W. 1990. A quantitative method for determination of trace metal concentrations in sedimentary pyrite. Marine Chemistry, 29: 119-144
- Huerta-Diaz M. A., Morse J. W. 1992. Pyritization of trace metals in anoxic marine sediments. Geochimica et Cosmochimica Acta, 56, 7: 2681-2702
- Humair B., González N., Mossialos D., Reimmann C., Haas D. 2009. Temperatureresponsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. The ISME Journal, 3, 8: 955-965
- Ivask A., Hakkila K., Virta M. 2001. Detection of organomercurials with sensor bacteria. Analytical Chemistry, 73, 21: 5168-5171

- Ivask A., Virta M., Kahru A. 2002. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil. Soil Biology and Biochemistry, 34, 10: 1439-1447
- Ivask, A. Rõlova T., Kahru A. 2009. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. BMC Biotechnology, 9, 1: 41 [1-15]
- Iwahori K., Takeuchi F., Kamimura K., Sugio T. 2000. Ferrous iron-dependent volatilization of mercury by the plasma membrane of *Thiobacillus ferrooxidans*. Applied and Environmental Microbiology, 66, 9: 3823-3827
- Jones D. A. 1998. Why are so many food plants cyanogenic? Phytochemistry, 47, 2: 155-162
- Jousset A., Lara E., Wall L. G., Valverde C. 2006. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. Applied and Environmental Microbiology, 72, 11: 7083-7090
- Kadner R. J., Heller K., Coulton J. W., Braun V. 1980. Genetic control of hydroxamatemediated iron uptake in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 143, 1: 256-264
- Kandeler E., Tscherko D., Bruce K. D., Stemmer M., Hobbs P. J., Bardgett R. D., Amelung W. 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. Biology and Fertility of Soils, 32, 5: 390-400
- Karpowich N., Martsinkevich O., Millen L., Yuan Y. R., Dai P. L., MacVey K., Hunt J.F. 2001. Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an inducedfit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. Structure, 9, 7: 571-586
- Kay E., Dubuis C., Haas D. 2005. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 47: 17136-17141
- Kelly C. A., Rudd J. W., Holoka M. H. 2003. Effect of pH on mercury uptake by an aquatic bacterium: implications for Hg cycling. Environmental Science and Technology, 37, 13: 2941-2946
- Kim J. P., Fitzgerald W. F. 1986. Sea-air partitioning of mercury in the equatorial Pacific Ocean. Science, 231, 4742: 1131-1133
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16, 2: 111-120
- Kiyono M., Pan-Hou H. 1999. The *merG* gene product is involved in phenylmercury resistance in Pseudomonas strain K-62. Journal of Bacteriology, 181, 3: 726-730
- Knowles C. J., Bunch A. W. 1986. Microbial cyanide metabolism. Advances in Microbial Physiolgy, 27: 73-111
- Kocman D., Horvat M., Kotnik J. 2004. Mercury fractionation in contaminated soils from the Idrija mercury mine region. Journal of Environmental Monitoring, 6, 8: 696-703
- Kocman D., Kanduč T., Ogrinc N., Horvat M. 2011. Distribution and partitioning of mercury in a river catchment impacted by former mercury mining activity. Biogeochemistry, 104, 1-3: 183-201

- Korzeniewska E., Harnisz M. 2012. Culture-dependent and culture-independent methods in evaluation of emission of Enterobacteriaceae from sewage to the air and surface water. Water, Air, and Soil Pollution, 223, 7: 4039-4046
- Lalonde J. D., Amyot M., Kraepiel A. M., Morel F. M. 2001. Photooxidation of Hg (0) in artificial and natural waters. Environmental Science and Technology, 35, 7: 1367-1372
- Lapanje A., Rupnik M., Drobne D. 2007. Gut bacterial community structure (*Porcellio Scaber*, Isopoda, Crustacea) as a measure of community level response to long-term and short-term metal pollution. Environmental Toxicology and Chemistry, 26, 4: 755-763
- Lapanje A., Drobne D., Nolde N., Valant J., Muscet B., Leser V., Rupnik M. 2008. Long-term Hg pollution induced Hg tolerance in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). Environmental Pollution, 153, 3: 537-547
- Lapanje A., Zrimec A., Drobne D., Rupnik M. 2010. Long-term Hg pollution-induced structural shifts of bacterial community in the terrestrial isopod (*Porcellio scaber*) gut. Environmental Pollution, 158, 10: 3186-3193
- Latifi A., Winson M. K., Foglino M., Bycroft B. W., Stewart G. S., Lazdunski A., Williams P. 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Molecular Microbiology, 17, 2: 333-343
- Laville J., Blumer C., Von Schroetter C., Gaia V., Défago G., Keel C., Haas D. 1998. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Journal of Bacteriology, 180, 12: 3187-3196
- Laville J., Voisard C., Keel C., Maurhofer M., Defago G., Haas D. 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89, 5: 1562-1566
- Lapouge K., Sineva E., Lindell M., Starke K., Baker C. S., Babitzke P., Haas D. 2007. Mechanism of hcnA mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. Molecular Microbiology, 66, 2: 341-356
- Lapouge K., Schubert M., Allain F. H. T., Haas D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of γ-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. Molecular Microbiology, 67, 2: 241-253
- Leenheer J. A., Croué J. P. 2003. Peer reviewed: characterizing aquatic dissolved organic matter. Environmental Science and Technology, 37, 1: 18A-26A
- Lindberg S. E., Brooks S., Lin C. J., Scott K. J., Landis M. S., Stevens R. K., Goodsite M., Richter A. 2002. Dynamic oxidation of gaseous mercury in the Arctic troposphere at polar sunrise. Environmental Science and Technology, 36, 6: 1245-1256
- Lorck H. 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. Physiologia Plantarum, 1, 2: 142-146
- Loux N. T. 1998. An assessment of mercury-species-dependent binding with natural organic carbon. Chemical Speciation and Bioavailability, 10, 4: 127-136

- Macadam A. M., Knowles C. J. 1984. Purification and properties of β-cyano-l-alanine synthase from the cyanide-producing bacterium, Chromobacterium violaceum. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 786, 3: 123-132
- Madsen E. L., Alexander M. 1985. Effects of chemical speciation on the mineralization of organic compounds by microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 50, 2: 342-349
- Malcolm L. R. 1990. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. Analytica Chimica Acta, 232: 19-30
- Mercury and the Environment. 2013. Gatineau QC, Government of Canada, Environment Canada: 2 str.

http://www.ec.gc.ca/mercure-mercury/default.asp?lang=En&n=A177A336-1 (14.12.2013)

- Meighen E. A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. Microbiological Reviews, 55, 1: 123-142
- Middleton J. H., Salierno J. D. 2012. Antibiotic resistance in triclosan tolerant fecal coliforms isolated from surface waters near wastewater treatment plant outflows (Morris County, NJ, USA). Ecotoxicology and Environmental Safety, 88: 79-88
- Mierle G., Ingram R. 1991. The role of humic substances in the mobilization of mercury from watersheds. Water Air and Soil Pollution, 56, 1: 349-357
- Miethke M., Marahiel M. A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71, 3: 413-451
- Mikac N., Foucher D., Niessen S., Fischer J. C. 2002. Extractability of HgS (cinnabar and metacinnabar) by hydrochloric acid. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 374, 6: 1028-1033
- Mikac N., Foucher D., Niessen S., Lojen S., Fischer J. C. 2003. Influence of chloride and sediment matrix on the extractability of HgS (cinnabar and metacinnabar) by nitric acid. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 377, 7-8: 1196-1201
- Mikac N., Niessen S., Ouddane B., Fischer J. C. 2000. Effects of acid volatile sulfides on the use of hydrochloric acid for determining solid-phase associations of mercury in sediments. Environmental Science and Technology, 34, 9: 1871-1876
- Miller D. N., Bryant J. E., Madsen E. L., Ghiorse W. C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Applied and Environmental Microbiology, 65, 11: 4715-4724
- Miskimmin B. M., Rudd J. W., Kelly C. A. 1992. Influence of dissolved organic carbon, pH, and microbial respiration rates on mercury methylation and demethylation in lake water. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 49, 1: 17-22
- Molina L., Ramos C., Duque E., Ronchel M. C., García J. M., Wyke L., Ramos J. L. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. Soil Biology and Biochemistry, 32, 3: 315-321
- Morby A. P., Hobman J. L., Brown N. L. 1995. The role of cysteine residues in the transport of mercuric ions by the Tn501 MerT and MerP mercury-resistance proteins. Molecular Microbiology, 17, 1: 25-35

- Mukhopadhyay D., Yu H. R., Nucifora G., Misra T. K. 1991. Purification and functional characterization of MerD. A coregulator of the mercury resistance operon in gram-negative bacteria. Journal of Biological Chemistry, 266, 28: 18538-18542
- Nakamura K., Hagimine M., Sakai M., Furukawa K. 1999. Removal of mercury from mercury-contaminated sediments using a combined method of chemical leaching and volatilization of mercury by bacteria. Biodegradation,10, 6: 443-447
- Munthe J. 1992. The aqueous oxidation of elemental mercury by ozone. Atmospheric Environment, 26, 8: 1461-1468
- Nazaret S., Jeffrey W. H., Saouter E., Von Haven R., Barkay T. 1994. *merA* gene expression in aquatic environments measured by mRNA production and Hg (II) volatilization. Applied and Environmental Microbiology, 60, 11: 4059-4065
- Neilands J. B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. Journal of Biological Chemistry, 270, 45: 26723-26726
- Ofiţeru I. D., Lunn M., Curtis T. P., Wells G. F., Criddle C. S., Francis C. A., Sloan W. T. 2010. Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 35: 15345-15350
- Osborn A. M., Bruce K. D., Strike P., Ritchie, D. A. 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. FEMS Microbiology Reviews, 19, 4: 239-262
- Oremland R. S., Culbertson C. W., Winfrey M. R. 1991. Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. Applied and Environmental Microbiology, 57, 1: 130-137
- Oremland R. S., Miller L. G., Dowdle P., Connell T., Barkay T. 1995. Methylmercury oxidative degradation potentials in contaminated and pristine sediments of the carson river, nevada. Applied and Environmental Microbiology, 61, 7: 2745-2753
- Pacyna E. G., Pacyna J. M., Sundseth K., Munthe J., Kindbom K., Wilson S., Steenhuisen F., Maxson, P. 2010. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. Atmospheric Environment, 44, 20: 2487-2499
- Pearson J. P., Pesci E. C., Iglewski B. H. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. Journal of Bacteriology, 179, 18: 5756-5767
- Pesci E. C., Pearson J. P., Seed P. C., Iglewski B. H. 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 179, 10: 3127-3132
- Pessi G., Haas D. 2000. Transcriptional Control of the Hydrogen Cyanide Biosynthetic Genes *hcnABC* by the Anaerobic Regulator ANR and the Quorum-Sensing Regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 182, 24: 6940-6949
- Pessi G., Haas D. 2001. Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. FEMS Microbiology Letters, 200, 1: 73-78

- Penneman R. A., Jones L. H. 1961. Infra-red absorption studies of the aqueous cyanide complexes of mercury cadmium, and zinc. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 20, 1: 19-31
- Pierce J. R., Pickett C. L., Earhart C. F. 1983. Two *fep* genes are required for ferrienterochelin uptake in *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology, 155, 1: 330-336
- Rasmussen L. D., Turner R. R., Barkay T. 1997. Cell-density-dependent sensitivity of a *mer-lux* bioassay. Applied and Environmental Microbiology, 63, 8: 3291-3293
- Rasmussen L. D., Sørensen S. J., Turner R. R., Barkay T. 2000. Application of a merlux biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. Soil Biology and Biochemistry, 32, 5: 639-646
- Ravichandran M., Aiken G. R., Reddy M. M., Ryan J. N. 1998. Enhanced dissolution of cinnabar (mercuric sulfide) by dissolved organic matter isolated from the Florida Everglades. Environmental Science and Technology, 32, 21: 3305-3311
- Ravichandran M., Aiken G. R., Ryan J. N., Reddy M. M. 1999. Inhibition of precipitation and aggregation of metacinnabar (mercuric sulfide) by dissolved organic matter isolated from the Florida Everglades. Environmental Science and Technology, 33, 9: 1418-1423
- Ravichandran M. 2004. Interactions between mercury and dissolved organic matter a review. Chemosphere, 55, 3: 319-331
- Razavi N. R., Ridal J. J., de Wit W., Hickey M. B. C., Campbell L. M., Hodson, P. V. 2013. Ebullition rates and mercury concentrations in St. Lawrence river sediments and a benthic invertebrate. Environmental Toxicology and Chemistry, 32: 857-865
- Regnell O., Tunlid A. 1991. Laboratory study of chemical speciation of mercury in lake sediment and water under aerobic and anaerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology, 57, 3: 789-795
- Reimmann C., Beyeler M., Latifi A., Winteler H., Foglino M., Lazdunski A., Haas D. 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. Molecular Microbiology, 24, 2: 309-319
- Reimmann C., Valverde C., Kay E., Haas D. 2005. Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Journal of Bacteriology, 187, 1: 276-285
- Revis N. W., Osborne T. R., Holdsworth G., Hadden C. 1989. Distribution of mercury species in soil from a mercury-contaminated site. Water, Air, and Soil Pollution, 45, 1-2: 105-113
- Rodriguez G. M., Smith I. 2006. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in Mycobacterium tuberculosis. Journal of Bacteriology, 188, 2: 424-430
- Ryall B., Lee X., Zlosnik J. E., Hoshino S., Williams H. D. 2008. Bacteria of the Burkholderia cepacia complex are cyanogenic under biofilm and colonial growth conditions. BMC Microbiology, 8, 1: 108-116
- Sahlman L., Wong W., Powlowski J. 1997. A mercuric ion uptake role for the integral inner membrane protein, MerC, involved in bacterial mercuric ion resistance. Journal of Biological Chemistry, 272, 47: 29518-29526

- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 4: 406-425
- Sambrook J. F. E. F., Fritsch E. F., Maniatis T. T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1530 str.
- Sambrook J., Russell D. W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd Edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2028 str.
- Schippers B., Bakker A. W., Bakker P. A. H. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology, 25, 1: 339-358
- Schwyn B., Neilands J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160, 1: 47-56
- Seed P. C., Passador L., Iglewski B. H. 1995. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas autoinducer* PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. Journal of Bacteriology, 177, 3: 654-659
- Seigneur C., Wrobel J., Constantinou E. 1994. A chemical kinetic mechanism for atmospheric inorganic mercury. Environmental Science Technology, 28, 9: 1589-1597
- Selifonova O., Burlage R., Barkay T. 1993. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg (II) in the environment. Applied and Environmental Microbiology, 59, 9: 3083-3090
- Shaw S. A., Al T. A., MacQuarrie K. T. 2006. Mercury mobility in unsaturated gold mine tailings, Murray Brook mine, New Brunswick, Canada. Applied Geochemistry, 21, 11: 1986-1998
- Siciliano S. D., O'Driscoll N. J., Lean D. R. S. 2002. Microbial reduction and oxidation of mercury in freshwater lakes. Environmental Science and Technology, 36, 14: 3064-3068
- Silva M., Jacobus N. V., Deneke C., Gorbach S. L. 1987. Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 31, 8: 1231-1233
- Silver M., Torma A. E. 1974. Oxidation of metal sulfides by *Thiobacillus ferrooxidans* grown on different substrates. Canadian Journal of Microbiology, 20, 2: 141-147
- Smith T., Pitts K., McGarvey J. A., Summers A. O. 1998. Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg (0). Applied and Environmental Microbiology, 64, 4: 1328-1332
- Steinlin C., Huang J.-H. 2008. The role of microorganisms on mercury speciation in the environment. Zurich, ETH Zurich:16 str.
- Stone M., Marsalek J. 1996. Trace metal composition and speciation in street sediment: Sault Ste. Marie, Canada. Water, Air, and Soil Pollution, 87, 1-4: 149-169
- Stone J. J., McCutcheon C. M., Stetler L. D., Chipps S. R. 2011. Interrelationships between fish tissue mercury concentrations and water quality for South Dakota natural lakes and impoundments. Water, Air, and Soil Pollution, 222, 1-4: 337-349
- Strieker M., Tanovic A., Marahiel M. A. 2010. Nonribosomal peptide synthetases: structure and dynamics. Structural Biology, 20: 234-240

- Sugio T., Iwahori K., Takeuchi F., Negishi A., Maeda T., Kamimura K. 2001. Cytochrome c oxidase purified from a mercury-resistant strain of Acidithiobacillus ferrooxidans volatilizes mercury. Journal of Bioscience and Bioengineering, 92, 1: 44-49
- Sugio T., Fujii M., Takeuchi F., Negishi A., Maeda T., Kamimura K. 2003. Volatilization of mercury by an iron oxidation enzyme system in a highly mercury-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain MON-1. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 67, 7: 1537-1544
- Summers A. O. 1992. Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. Journal of Bacteriology, 174, 10: 3097-3101
- Summers A. O., Wireman J., Vimy M. J., Lorscheider F. L., Marshall B., Levy S. B., Benett S., Billard L. 1993. Mercury released from dental" silver" fillings provokes an increase in mercury-and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37, 4: 825-834
- Sutcliffe I. C., Russell R. R. 1995. Lipoproteins of gram-positive bacteria. Journal of Bacteriology, 177, 5: 1123
- Takeuchi F., Iwahori K., Kamimura K., Sugio T. 1999. Isolation and some properties of *Thiobacillus ferrooxidans* strains with differing levels of mercury resistance from natural environments. Journal of Bioscience and Bioengineering, 88, 4: 387-392
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24, 8: 1596-1599
- Thöming J., Kliem B. K., Ottosen L. M. 2000. Electrochemically enhanced oxidation reactions in sandy soil polluted with mercury. Science of the total environment, 261, 1: 137-147
- Turner R. R., Lindberg S. E. 1978. Behavior and transport of mercury in river-reservoir system downstream of inactive chloralkali plant. Environmental Science and Technology, 12, 8: 918-923
- Uroz S., Calvaruso C., Turpault M. P., Frey-Klett P. 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. Trends in Microbiology, 17, 8: 378-387
- Valverde C., Heeb S., Keel C., Haas D. 2003. RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Molecular Microbiology, 50, 4: 1361-1379
- Valverde C., Lindell M., Wagner E. G. H., Haas D. 2004. A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Biological Chemistry, 279, 24: 25066-25074
- Vandal G. M., Mason R. P., Fitzgerald W. F. 1991. Cycling of volatile mercury in temperate lakes. Water Air and Soil Pollution, 56,1: 791-803
- Virta M., Lampinen J., Karp M. 1995. A luminescence-based mercury biosensor. Analytical Chemistry, 67, 3: 667-669
- Vishnivetskaya T. A., Mosher J. J., Palumbo A. V., Yang Z. K., Podar M., Brown S. D., Brooks S. C., Gu B., Southworth G. R., Drake M. M., Brandt C. C., Elias, D. A. 2011. Mercury and other heavy metals influence bacterial community structure in contaminated Tennessee streams. Applied and Environmental Microbiology, 77, 1: 302-311

- von Rohr M. R., Furrer G., Brandl H. 2009. Effect of iron and phosphate on bacterial cyanide formation determined by methemoglobin in two-dimensional gradient microcultivations. Journal of Microbiological Methods, 79, 1: 71-75
- Wallschläger D., Desai M. V., Wilken R. D. 1996. The role of humic substances in the aqueous mobilization of mercury from contaminated floodplain soils. Water, Air, and Soil Pollution, 90, 3-4: 507-520
- Wallschläger D., Desai M. V., Spengler M., Windmöller C. C., Wilken R. D. 1998. How humic substances dominate mercury geochemistry in contaminated floodplain soils and sediments. Journal of Environmental Quality, 27, 5: 1044-1054
- Wagegg W., Braun, V. 1981. Ferric citrate transport in *Escherichia coli* requires outer membrane receptor protein fecA. Journal of Bacteriology, 145, 1: 156-163
- Weinberg E. D. 1997. The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. Perspectives in Biology and Medicine, 40, 4: 578-583
- Wilson J. R., Leang C., Morby A. P., Hobman J. L., Brown N. L. 2000. MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? FEBS Letters, 472, 1: 78-82
- Wilson M. K., Abergel R. J., Raymond K. N., Arceneaux J. E., Byers B. R. 2006. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 348, 1: 320-325
- Winson M. K., Camara M., Latifi A., Foglino M., Chhabra S. R., Daykin M., Bycroft B.
  W. 1995. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92, 20: 9427-9431
- Winteler H. V., Haas D. 1996. The homologous regulators ANR of *Pseudomonas aeruginosa* and FNR of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. Microbiology, 142, 3: 685-693
- Wissing F. 1974. Cyanide formation from oxidation of glycine by a Pseudomonas species. Journal of Bacteriology, 117, 3: 1289-1294
- Wongfun N., Plötze M., Furrer G., Brandl H. 2014. Weathering of granite from the Damma glacier area: the contribution of cyanogenic bacteria. Geomicrobiology Journal, 31, 2: 93-100
- Wood, J. M., & Wang, H. K. 1983. Microbial resistance to heavy metals. Environmental science and technology, 17, 12: 582A-590A
- Yamamoto M. 1995. Possible mechanism of elemental mercury oxidation in the presence of SH compounds in aqueous solution. Chemosphere, 31, 2: 2791-2798
- Yip W. K., Yang S. F. 1988. Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. Plant Physiology, 88, 2: 473-476
- Yu H., Chu L., Misra T. K. 1996. Intracellular inducer Hg<sup>2+</sup> concentration is rate determining for the expression of the mercury-resistance operon in cells. Journal of Bacteriology, 178, 9: 2712-2714
- Zdor R. E., Anderson A. J. 1992. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. Plant and Soil, 140, 1: 99-107
- Zhang H., Lindberg S. E. 2001. Sunlight and iron (III)-induced photochemical production of dissolved gaseous mercury in freshwater. Environmental Science and Technology, 35, 5: 928-935

- Zuber S., Carruthers F., Keel C., Mattart A., Blumer C., Pessi G., Haas D. 2003. GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Molecular Plant-Microbe Interactions, 16, 7: 634-644
- Žižek S., Horvat M., Gibičar D., Fajon V., Toman M. J. 2007. Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining. Science of the Total Environment, 377, 2: 407-415
- Žižek S., Milačič R., Kovač N., Jaćimović R., Toman M. J., Horvat M. 2011. Periphyton as a bioindicator of mercury pollution in a temperate torrential river ecosystem. Chemosphere, 85, 5: 883-891

## ZAHVALE

Hvala mentorju, dr. Alešu Lapanjetu, za bogato strokovno pomoč pri načrtovanju in izvajanju poskusov, interpretaciji rezultatov ter pisanju znanstvenega članka.

Hvala sodelavcem Inštituta za mikrobiološke znanosti in tehnologije za strokovno pomoč in prijetno preživljanje časa v službi.

Hvala prof. dr. Mileni Horvat iz Inštituta »Jožef Stefan« in ga. Piji Rep iz Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor za opravljene meritve celokupnega živega srebra.

Hvala agenciji Spirit in Inštitutu za mikrobiološke znanosti in tehnologije za finančno podporo študijskega programa.



Hvala Maretu za pomoč pri pisanju doktorske disertacije in Svitu za potrpežljivo čakanje na »mami«.

Hvala mojim in Maretovim staršem za pomoč pri skrbi za Svita in ostala gospodinjska opravila.

Hvala vsem domačim in prijateljem, ki ste mi s spodbudami stali ob strani.