

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sanja R. Jeremić

**MEHANIZMI TOLERANCIJE
SLOBODNOŽIVEĆIH BAKTERIJA
I BAKTERIJA U BIOFILMOVIMA
NA TEŠKE METALE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sanja R. Jeremić

**MECHANISMS OF HEAVY METAL
TOLERANCE IN FREE LIVING BACTERIA
AND BACTERIAL BIOFILMS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI:

**dr Jasmina Nikodinović-Runić, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

**dr Branko Jovčić, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu**

ČLANOVI KOMISIJE:

**dr Jasmina Nikodinović-Runić, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

**dr Branko Jovčić, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu**

**dr Branka Vasiljević, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

DATUM ODBRANE:

Ova teza je urađena u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Ovom prilikom bih se zahvalila:

dr Jasmini Nikodinović-Runić jer mi je pomogla da vratim veru u sebe i da shvatim da je sve moguće. Hvala joj na nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada i tokom pisanja ove teze, strpljenju, vrednim savetima i podršci...jednostavno na svemu;

dr Branki Vasiljević, za ukazano poverenje i pruženu šansu davne 2007. godine, za korisne savete koji su mi pomogli tokom eksperimentalnog rada, kao i za kritičku ocenu teze;

dr Branku Jovčiću, na savetima i kritičkoj oceni rada;

svojim kolegama iz laboratorije, Ivani, Nadi, Tanji, Sandri, Lidiji, Saši, Vanjici, Goci i Mini za svu pomoć i divnu radnu atmosferu;

Liki i Tanjici za pomoć i savete u eksperimentalnom radu, razumevanje mojih „problema“, za kafe i kolače...hvala za divno prijateljstvo;

kumi Neveni i drugarkama sa fakulteta Tamaru, Ivani, Ivani M., Ani, Milici i Kristini na trenucima razbibrige i bodrenju;

mojim roditeljima bez čije bezuslovne ljubavi, podrške, strpljenja i razumevanja ovo ne bih uspela...hvala im što su najdivniji mama i tata na svetu.

Mehanizmi tolerancije slobodnoživećih bakterija i bakterija u biofilmovima na teške metale

REZIME:

Teški metali, čija se koncentracija u sredini sve više povećava kao rezultat povećane industrijske aktivnosti i tehnološkog razvoja, ubrajaju se u najčešće zagađivače životne sredine. Kada su prisutni u većim koncentracijama toksični su i predstavljaju ozbiljnu pretnju kako za životnu sredinu tako i za zdravlje ljudi, jer se ne mogu razgraditi i jer se nagomilavaju u lancima ishrane. Sa druge strane, ovakve sredine predstavljaju dobar izvor mikroorganizama tolerantnih na teške metale, sa potencijalnom primenom u biološkom uklanjanju (bioremedijaciji) i oslobađanju (bioluženju) teških metala. Cilj ovog rada je bila izolacija, identifikacija, analiza diverziteta i aplikativnog potencijala novih bakterijskih sojeva sa sposobnošću tolerancije visokih koncentracija teških metala iz površinskog i podzemnog sedimenta iz rudnika bakra Bor. Metagenomskom analizom je detektovan veći mikrobiološki diverzitet u uzorku površinskog sedimenta u poređenju sa podzemnim sedimentom. Iz oba uzorka je izolovano 6 bakterija tolerantnih na visoke koncentracije teških metala, primenom direktne kultivacije. Ovi izolati su taksonomski identifikovani kao predstavnici rodova *Arthrobacter* i *Staphylococcus*. Pored ovih izolata, u ovu studiju je bilo uključeno još 8 sojeva za koje je tolerancija na metale prethodno opisana u literaturi, tako da je aplikativni potencijal slobodnoživećih bakterija i definisanih bakterijskih zajednica, kao i njihovih biofilmova, ispitan kod ukupno 14 sojeva. Među 14 testiranih sojeva, 6 sojeva je imalo sposobnost rasta u prisustvu nikla, 6 u prisustvu kadmijuma, 4 u prisustvu bakra, 3 u prisustvu hroma i 1 je imao sposobnost rasta u prisustvu žive, dok nijedan od sojeva nije imao sposobnost rasta u prisustvu gvožđa i cinka. Izdvojio se izolat *Staphylococcus* sp. MSI08, koji je jedini imao sposobnost rasta u prisustvu tri teška metala (nikl, kadmijum, hrom). Analizom genetičkih determinanti mehanizama tolerancije na teške metale, kod 2 soja je detektovano prisustvo gena za determinantu tolerancije na kadmijum, kod 2 soja prisustvo gena za determinantu tolerancije na hrom i kod 2 soja je detektovano prisustvo gena za determinantu tolerancije na bakar. Svi testirani sojevi su imali sposobnost formiranja biofilmova, s tim što su najveći potencijal za formiranje

biofilmova pokazali *Staphylococcus* sp. MUI10, *Arthrobacter* sp. MSI31, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i *Cupriavidus metallidurans* CH34, dok su *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113, *Pseudomonas putida* KT2440 i *Cupriavidus necator* H16 pokazali nešto slabiji potencijal za formiranje biofilmova. U uslovima višednevnog izlaganja bakterijskih biofilmova dejstvu teških metala pokazano je da biofilmovi sojeva *Rhodococcus* sp. TN113, *Cupriavidus metallidurans* CH34 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 imaju povećanu toleranciju na teške metale u poređenju sa slobodnoživećim bakterijama. Pokazano je takođe da se na problem kompleksnog zagađenja sredine teškim metalima može odgovoriti upotrebom soja *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kao i upotrebom četiri definisane bakterijske zajednice, koji su imali sposobnost rasta u prisustvu smeše bakra, kadmijuma i hroma. U ovom radu je prvi put testiran uticaj tri odabrana biofilma sojeva koji ne učestvuju aktivno u procesu bioluženja na proces bioluženja pomoću *Acidithiobacillus ferrooxidans* i pokazano je da ti biofilmovi mogu povećati efikasnost bioluženja pojedinih metala i da se ovaj pristup može dalje optimizovati u pravcu poboljšanja procesa bioluženja.

KLJUČNE REČI: mikrobiološki diverzitet, teški metali, bioremedijacija, bioluženje, mehanizmi tolerancije, biofilmovi

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija, modul: Prokarioti

UDK BROJ: [[546.48+546.562+546.76]::579.22]:579.262

DODATNA POSEBNA KLASIFIKACIONA OZNAKA ZA DATU OBLAST:

Mechanisms of heavy metal tolerance in free living bacteria and bacterial biofilms

SUMMARY:

Heavy metals are one of the most common environmental pollutants due to increased industrial activities and technological development. When present in excessive concentrations, heavy metals are highly toxic and they pose a serious threat both to environment and human health, due to their persistence in nature and accumulation in the food chain. On the other hand, polluted sites have proven to be valuable sources of bacteria capable to tolerate increased concentration of heavy metals that could be potentially applied in biological removal (bioremediation) and release (bioleaching) of heavy metals. The aim of this study was to obtain, identify, analyze diversity and application potential of novel bacterial strains with the ability to tolerate high heavy metal concentrations from surface and underground sediments from the copper mine Bor. Metagenomic analysis revealed a higher microbial diversity in surface sediment compared to underground sediment. From both sediments, 6 bacterial strains able to tolerate high heavy metal concentrations were isolated using direct cultivation approach. These isolates were taxonomically identified as members of *Arthrobacter* and *Staphylococcus* genus. In addition, this study involved 8 more strains with heavy metal tolerance previously described in the literature. Thus, 14 bacterial strains were included in analysis and evaluation of heavy metal tolerance and application potential of free living bacteria and defined bacterial consortia, as well as their biofilms. Among 14 tested strains, 6 strains had the ability to grow in the presence of nickel, 6 in the presence of cadmium, 4 in the presence of copper, 3 in the presence of chromium and 1 had the ability to grow in the presence of mercury, while none of the strains had the ability to grow in the presence of iron and zinc. *Staphylococcus* sp. MSI08 singled out as the only strain with the ability to grow in the presence of three heavy metals (nickel, cadmium, chromium). Analysis of genetic determinants conferring heavy metal tolerance revealed presence of cadmium tolerance genes in 2 strains, chromium tolerance genes in 2 strains, and copper tolerance genes were also detected in 2 strains. All strains showed ability to form biofilms, but *Staphylococcus* sp. MUI10, *Arthrobacter* sp. MSI31, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Cupriavidus metallidurans* CH34 demonstrated the

highest potential for the biofilm formation, while *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113, *Pseudomonas putida* KT2440 and *Cupriavidus necator* H16 were less successful in biofilm formation. When exposed to heavy metals for several days, *Rhodococcus* sp. TN113, *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms exhibited enhanced tolerance to heavy metals compared to free living bacteria. It has been demonstrated that *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and four defined bacterial consortia could be employed in solving problem of complex heavy metals pollution, since they had the ability to grow in the simultaneous presence of copper, cadmium and chromium. In this study the influence of 3 selected biofilms, consisting of non-bioleaching bacterial strains, on *Acidithiobacillus ferrooxidans* bioleaching was examined for the first time. It has been shown that these biofilms could increase the bioleaching efficiency for certain metals and this approach can be further optimized in order to improve the bioleaching process.

KEY WORDS: microbial diversity, heavy metals, bioremediation, bioleaching, tolerance mechanisms, biofilms

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology, Modul: Prokaryotes

UDC NUMBER: [[546.48+546.562+546.76]::579.22]:579.262

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Teški metali u životnoj sredini.....	1
1.1.1. Teški metali: biološka uloga i toksičnost.....	1
1.1.2. Rudarstvo kao izvor zagađenja teškim metalima.....	6
1.1.3. Rudarsko-topioničarski basen Bor	8
1.2. Biotehnološka primena mikroorganizama u cilju uklanjanja i oslobađanja teških metala.....	10
1.2.1. Mikrobiološki diverzitet u sredinama zagađenim teškim metalima	11
1.2.1.1. <i>Metagenomika</i>	11
1.2.1.2. <i>Kultivacija bakterija</i>	12
1.2.2. Bioremedijacija sredina zagađenih teškim metalima uz pomoć bakterija	13
1.2.3. Bioluženje	16
1.2.3.1. <i>Bioluženje bakra</i>	19
1.3. Mehanizmi tolerancije na teške metale.....	22
1.3.1. <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 – model organizam za proučavanje bakterijskog odgovora na prisustvo teških metala.....	26
1.3.2. Tolerancija na bakar	27
1.3.3. Tolerancija na kadmijum	28
1.3.4. Tolerancija na hrom	29
1.3.5. Tolerancija na živu	30
1.3.6. Tolerancija na nikel	31

1.4. Bakterijski biofilmovi	31
1.4.1. Bakterijski biofilmovi i tolerancija na teške metale.....	32
2. CILJEVI.....	34
2.1. Specifični ciljevi rada.....	34
3. MATERIJAL I METODE.....	36
3.1. Uzorkovanje i hemijska analiza sedimenata iz rudnika bakra	36
3.1.1. Osnovna mikroanaliza sedimenata.....	36
3.1.2. Određivanje prisustva teških metala u uzorcima sedimenata	37
3.2. Analiza mikrobiološkog diverziteta u sedimentima iz rudnika bakra.....	38
3.2.1. Metagenomska analiza.....	38
3.2.1.1. <i>Izolovanje metagenomske DNK.....</i>	38
3.2.1.2. <i>Konstrukcija 16S rDNK biblioteka.....</i>	39
3.2.1.3. <i>Analiza 16S rDNK biblioteka</i>	41
3.2.2. Izolovanje i gajenje bakterija iz uzoraka sedimenata metodom direktne kultivacije	43
3.2.2.1. <i>Određivanje broja vijabilnih bakterija.....</i>	43
3.2.2.2. <i>Kultivacija bakterija na 9K podlozi</i>	43
3.2.2.3. <i>Kultivacija bakterija na Tornton-glukoza podlozi</i>	44
3.2.2.4. <i>Taksonomska identifikacija kultivisanih bakterija</i>	44
3.3. Selekcija i karakterizacija bakterijskih izolata tolerantnih na teške metale	45
3.3.1. Sposobnost rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala.....	45

3.3.2. Taksonomska identifikacija i filogenetska analiza bakterija tolerantnih na teške metale.....	46
3.3.3. Sposobnost bakterijskih izolata da formiraju biofilm u mikrotitarskim pločama.....	47
3.3.4. Standardni biohemijski testovi za identifikaciju bakterija	48
3.4. Mehanizmi tolerancije na teške metale.....	50
3.4.1. Umnožavanje gena za determinante rezistencije na teške metale.....	50
3.4.2. Istovremena tolerancija slobodnoživećih bakterija na više teških metala	52
3.4.3. Tolerancija bakterijskog biofilma na prisustvo pojedinačnih teških metala.....	53
3.4.4. Tolerancija biofilma na prisustvo više teških metala istovremeno	54
3.5 Uticaj bakterijskih biofilмова na <i>in vitro</i> proces luženja	55
3.5.1. Gajenje bakterijskog biofilma na većoj skali	55
3.5.2. Karakterizacija bakterijskog biofilma.....	55
3.5.2.1. Spektroskopija sa infracrvenom Furijeovom transformacijom (FT-IR) .	55
3.5.2.2. Elementalna organska mikroanaliza.....	56
3.5.2.3. Ekstrakcija i kvalitativna analiza šećera iz bakterijskih biofilмова.....	56
3.5.2.4. Bojenje živih i mrtvih bakterijskih ćelija u biofilmu.....	56
3.5.3. Uticaj bakterijskog biofilma na rast soja <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	57
3.5.4. <i>In vitro</i> model bioluženja	57
3.6. Opšte molekularno biološke i analitičke metode	59
3.6.1. Agarozna gel elektroforeza	59
3.6.2. Sekvenciranje DNK	59

3.6.3. Izolacija i određivanje koncentracije ukupnih proteina iz bakterijskih kultura	60
3.6.4. Esej oksidacije 2,6-dimetoksifenola	61
3.6.5. Mikroskopiranje	61
3.6.5.1. <i>Fluorescentna mikroskopija</i>	61
3.6.5.2. <i>Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)</i>	62
4. REZULTATI.....	63
4.1. Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka sedimenata iz rudnika bakra	63
4.2. Mikrobiološki diverzitet u sedimentima iz rudnika bakra	65
4.2.1. Metagenomska analiza mikrobiološkog diverziteta.....	65
4.2.2. Diverzitet bakterija izolovanih iz uzoraka sedimenata metodom direktne kultivacije	69
4.3. Selekcija bakterijskih izolata tolerantnih na teške metale za potencijalnu primenu u bioremedijaciji	71
4.3.1. Sposobnost rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala.....	71
4.3.2. Identifikacija izolata tolerantnih na teške metale na osnovu nukleotidne sekvence gena za 16S rRNK i filogenetska analiza	73
4.3.3. Sposobnost bakterijskih izolata da formiraju biofilm	74
4.3.4. Prisustvo gena za determinante rezistencije na teške metale	76
4.4. Karakterizacija odabranih bakterijskih izolata tolerantnih na teške metale	82
4.4.1. Dinamika rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala u tečnoj kulturi.....	82
4.4.2. Osnovne biohemijske karakteristike	83

4.5. Mehanizmi tolerancije bakterijskih izolata na teške metale.....	85
4.5.1. Istovremena tolerancija slobodnoživećih bakterija na više teških metala u tečnoj kulturi.....	86
4.5.1.1. <i>Sposobnost rasta pojedinačnih bakterija i definisanih zajednica u prisustvu smeše metala</i>	86
4.5.1.2. <i>Sposobnost rasta zajednica bakterija tolerantnih na isti teški metal u prisustvu tog metala.....</i>	88
4.5.2. Tolerancije bakterijskih biofilmova na prisustvo pojedinačnih teških metala	89
4.5.3. Tolerancija bakterijskih biofilmova na prisustvo više teških metala istovremeno	95
4.5.4. Aktivnost enzima multi bakar oksidaze	98
4.6. Uticaj bakterijskih biofilmova na <i>in vitro</i> proces luženja	100
4.6.1. Hemijska karakterizacija biofilma i uticaj metala na bakterijski biofilm	101
4.6.1.1. <i>FT-IR spektroskopija</i>	101
4.6.1.2. <i>Elementalna organska mikroanaliza i analiza šećera biofilmova</i>	102
4.6.1.3. <i>Bojenje slobodnoživećih bakterija i biofilmova</i>	104
4.6.2. Rast bakterijskog biofilma u prisustvu <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	106
4.6.3. <i>In vitro</i> model luženja	108
5. DISKUSIJA.....	111
5.1. Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka sedimenata iz rudnika bakra	111
5.2. Mikrobiološki diverzitet uzoraka sedimenata iz rudnika bakra.....	112
5.2.1. Metagenomski pristup u analizi diverziteta	112

5.2.2. Analiza diverziteta direktnom kultivacijom.....	114
5.3. Aplikativni potencijal izolata tolerantnih na teške metale.....	116
5.3.1. Sposobnost rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala u čvrstoj podlozi	116
5.3.2. Sposobnost rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala u tečnoj podlozi	118
5.3.3. Prisustvo genetičkih determinanti za toleranciju na teške metale.....	119
5.3.4. Sposobnost rasta u prisustvu više teških metala istovremeno.....	121
5.4. Aplikativni potencijal bakterijskih biofilмова	122
5.4.1. Sposobnost bakterijskih izolata da formiraju biofilm	123
5.4.2. Tolerancije bakterijskih biofilмова na prisustvo pojedinačnih i više teških metala istovremeno	124
5.4.3. Uticaj biofilмова na <i>in vitro</i> proces bioluženja.....	126
6. ZAKLJUČCI.....	128
LITERATURA	131
PRILOZI	146
Prilog I: Poravnanja nukleotidnih sekvenci gena za determinante rezistencije na teške metale, umnoženih u ovoj studiji i sekvenci gena sa kojima su pokazali najveću sličnost u GenBank bazi podataka.....	147
a) Poravnanje <i>czcA</i> gena za determinantu rezistencije na Cd ²⁺ <i>Staphylococcus</i> sp. MSI08, <i>Staphylococcus</i> sp. MUI10 i <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	147
b) Poravnanje <i>chrB</i> gena za determinantu rezistencije na Cr ⁶⁺ <i>Staphylococcus</i> sp. MSI08, <i>Staphylococcus</i> sp. MUI10 i <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	150

c) Poravnanje <i>copA1</i> gena za determinantu rezistencije na Cu^{2+} <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 i <i>Pseudomonas putida</i> W619	152
d) Poravnanje <i>copA1</i> gena za determinantu rezistencije na Cu^{2+} <i>Rhodococcus</i> sp. TN113 i <i>Pseudomonas putida</i> ND6.....	154
Prilog II: Krive rasta izolata u prisustvu teških metala u tečnoj kulturi	157
Kriva rasta <i>Staphylococcus</i> sp. MSI08 u prisustvu Cd^{2+} i Cr^{6+}	157
Kriva rasta <i>Staphylococcus</i> sp. MSUI10 u prisustvu Cd^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+}	158
Kriva rasta <i>Rhodococcus</i> sp. TN113 u prisustvu Cu^{2+}	159
Kriva rasta <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 u prisustvu Cd^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+}	160
Kriva rasta <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 u prisustvu Cd^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+}	161

1. UVOD

1.1. Teški metali u životnoj sredini

Kao rezultat industrijske aktivnosti i ubrzanog tehnološkog razvoja, u životnoj sredini se neprestano povećava koncentracija teških metala koji se danas ubrajaju u najčešće zagađivače životne sredine. Kada su prisutni u većim koncentracijama, teški metali su toksični i predstavljaju ozbiljnu pretnju kako za životnu sredinu tako i za zdravlje ljudi, jer se zbog nemogućnosti razgradnje nagomilavaju u lancima ishrane (Evanko and Dzombak, 1997).

1.1.1. Teški metali: biološka uloga i toksičnost

Teški metali su grupa metala čija je atomska gustina veća od $5 \text{ g (cm}^3\text{)}^{-1}$, tako da je od 90 metala koji postoje u prirodi 53 teških, 16 lakih, a 21 pripada grupi 'nemetala' (Weast, 1984). Velika većina teških metala su prelazni elementi sa *d* orbitalama koje nisu kompletno popunjene, što katjonima teških metala omogućava da formiraju kompleksna jedinjenja koja mogu, ali i ne moraju, biti redoks aktivna. Katjoni nekih teških metala imaju važnu ulogu kao mikroelementi u biohemijskim procesima: katalizuju enzimske reakcije (Mg, Mn, Zn), učestvuju u redoks procesima (Fe, Cu, Ni) i učestvuju u procesima regulacije osmotskog balansa (K, Na) (Nies, 1999). Među teškim metalima ima i onih koji nemaju nikakvu biološku funkciju i štetni su čak i u vrlo niskim koncentracijama (Cd i Hg, Pb itd.). Međutim, u povećanim koncentracijama i esencijalni metali postaju toksični za organizam jer mogu menjati specifičnost enzima, oštetiti ćelijske membrane, narušiti strukturu DNK i normalno funkcionisanje ćelije. Stoga, koncentracija teških metala unutar svake ćelije mora biti strogo kontrolisana (Nies, 1999).

Nije moguće sva 53 teška metala razvrstati u biološki korisne ili štetne iz jednostavnog razloga što neki teški metali nisu dostupni živim ćelijama u prirodnim uslovima jer su prisutni u veoma niskoj koncentraciji ili su njihovi joni nerastvorljivi. Ukoliko bismo sastav morske vode smatrali reprezentativnim ekosistemom, zavisno od koncentracije

teških metala u toj vodi moguće je među njima razlikovati četiri grupe potencijalnih mikroelemenata:

- a) Fe, Zn i Mo, sa koncentracijama od 100 nM do 1 μ M;
- b) Ni, Cu, As, V, Mn, Sn i U, sa koncentracijama od 10 nM do 100 nM;
- c) Co, Ce, Ag i Sb, sa koncentracijama do 10nM
- d) Cd, Cr, W, Ga, Zr, Th, Hg i Pb, sa koncentracijama ispod 1nM (Weast, 1984).

Preostali teški metali, njih 31, su prisutni u veoma niskoj koncentraciji, stoga nisu ni korisni niti štetni za živu ćeliju i ćeliji nije energetski povoljno da poseduje genetičke determinante za metaboličke puteve tih metala (Nies, 1999).

Povišenim koncentracijama teških metala smatraju se koncentracije koje nekoliko puta do nekoliko stotina puta prelaze vrednosti dozvoljene za datu sredinu. Mnogobrojni teški metali kontaminiraju raznovrsna prirodna staništa u brojnim zemljama u svetu, i postoji velika raznolikost propisa, kao i koncentracija koje se smatraju dozvoljenim za teške metale. Kina danas spada među najzagađenije zemlje u svetu. Pored zagađenja poljoprivrednih zemljišta i useva, pogotovo onih u neposrednoj blizini industrijskih aktivnosti, u Kini su koncentracije teških metala povećane i u prašini na drumskim putevima i u gradskim zemljištima (Wei and Yang, 2010). Prosečne koncentracije bakra od 31,7 mg kg⁻¹, cinka od 117,7 mg kg⁻¹ i nikla od 27,5 mg kg⁻¹ u poljoprivrednim zemljištima u 12 kineskih gradova, veće su u proseku 2,5 puta u poređenju sa dozvoljenim koncentracijama propisanim u Kini (CEPA, 1995), dok su prosečne količine hroma od 58,8 mg kg⁻¹ i arsena od 10,2 mg kg⁻¹ i do 3 puta manje. Kada su u pitanju gradska zemljišta, prosečne koncentracije kadmijuma od 1,6 mg kg⁻¹, bakra od 115,1 mg kg⁻¹ i cinka od 266,4 mg kg⁻¹ su i do 5 puta veće od dozvoljenih koncentracija. Količine teških metala detektovane u prašini na drumskim putevima od 109 mg kg⁻¹ hroma, 149,6 mg kg⁻¹ bakra, 665,9 mg kg⁻¹ cinka, 56,7 mg kg⁻¹ nikla i 2,1 mg kg⁻¹ kadmijuma, višestruko premašuju dozvoljene koncentracije (Wei and Yang, 2010).

Za potrebe ove studije, kao povećane koncentracije uzete su u obzir koncentracije naznačene kao maksimalno dozvoljene prema Pravilniku o dozvoljenim količinama

opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje, i metodama njihovog ispitivanja u Srbiji (EPA/Serbia, 1994). Dozvoljene maksimalne koncentracije pojedinih teških metala u zemljištu u Srbiji su prikazane u tabeli 1. Za svaki od metala predstavljenih u tabeli 1 dat je sažet prikaz biološke uloge, toksičnosti i efekta na životnu sredinu (Smith *et al.*, 1995).

Tabela 1. Maksimalne dozvoljene koncentracije teških metala u zemljištu u Srbiji (EPA/Serbia, 1994).

Metal	MDK*, mg l⁻¹
Cu	100
Cd	3
Cr	100
Fe	2
Hg	2
Ni	50
Zn	300

*MDK=maksimalno dozvoljena količina

1. Bakar (Cu)

Najvažnija biološka uloga bakra je to što je ključni deo kompleksa citohrom C oksidaze. Ovaj element može se naći u vidu Cu^+ i Cu^{2+} , i usled jednog nesporenog elektrona u elektronskoj strukturi, bakar lako interaguje sa radikalima, posebno sa molekulskim kiseonikom, što ga i čini veoma toksičnim. Cu^{2+} je najtoksičniji oblik bakra, mada je toksičnost detektovana i kod CuOH^+ i $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$. Bakar lako formira komplekse sa humusnim kiselinama. U anaerobnim uslovima kad je prisutan sumpor, bakar će formirati CuS . U aerobnim sredinama dominantna rastvorljiva forma bakra je CuCO_3 , mada su česti i Cu^{2+} , CuOH^+ i $\text{Cu}(\text{OH})_2$. U životnoj sredini glavni izvor kontaminacije bakrom predstavlja rudarstvo.

2. *Kadmijum (Cd)*

Kadmijum se najčešće nalazi u vidu Cd^{2+} , različitih kompleksa kadmijuma i cijanida ili $Cd(OH)_2$. U sredinama sa visokim pH vrednostima dominiraju $Cd(OH)_2$ i $CdCO_3$, dok Cd^{2+} dominira pri vrednostima manjim od pH 8. U uslovima redukcije, u prisustvu sumpora, kadmijum precipitira formirajući CdS . Takođe, do precipitacije kadmijuma dolazi i u prisustvu fosfata, arsenata, hromata i drugih anjona. Iz prirodnih voda kadmijum se uklanja precipitacijom i adsorpcijom na mineralne površine, posebno minerale oksida, pri vrednostima većim od pH 6.

Izvori kontaminacije kadmijumom su galvanizacija i odlaganje otpada koji sadrže kadmijum. Kako je veoma toksičan, predmet je proučavanja velikog broja studija, sa posebnim akcentom na toksični efekat kadmijuma na mikroorganizme (Nies, 1999). Štetan uticaj ovog teškog metala na mikroorganizme vezuje se za denaturaciju proteina, vezivanje tiola, interakciju sa metabolizmom kalcijuma i narušavanje integriteta ćelijske membrane.

3. *Hrom (Cr)*

Hrom se najčešće javlja u vidu trovalentnog (Cr^{3+}) i heksavalentnog (Cr^{6+}) stanja. Cr^{6+} je dominantniji oblik u aerobnim sredinama, i može se redukovati do Cr^{3+} u anaerobnim uslovima koji su prisutni npr. u dubokim podzemnim vodama. Cr^{3+} je dominantna forma hroma u uslovima niskog pH (< 4). Hrom se u zagađenim sredinama najčešće nalazi u vidu Cr^{6+} koji je toksičniji od Cr^{3+} . Cr^{6+} se najčešće javlja u vidu hromata (CrO_4^{2-}) i dihromata ($Cr_2O_7^{2-}$) koji lako precipitiraju u prisustvu katjona metala. Glavni izvori kontaminacije hromom su otpadne vode iz elektrohemijskih postrojenja i odlaganje otpada koji sadrži hrom. Hrom se može iz zagađenog zemljišta isprati u podzemne vode, i to ispiranje je intenzivnije što je pH zemljišta veći. Većina hroma dospelog u vode na kraju završi deponovano u sedimentima.

4. *Gvožđe (Fe)*

Gvožđe se nalazi u tri oksidaciona stanja: Fe^{2+} , Fe^{3+} i malim delom kao Fe^{4+} . Zbog slabe rastvorljivosti Fe^{3+} nije toksičan za aerobne bakterije, a anaerobne bakterije ga koriste kao akceptor elektrona, tako da je u anaerobnim uslovima Fe^{2+} dominantni jon gvožđa. U

životnoj sredini je gvožđe deseti najrasprostranjeniji element, a najzastupljeniji je i među elementima koji čine planetu Zemlju. Jedna od najpoznatijih bioloških uloga ovog metala je to što je sastavni deo molekula hemoglobina. U industriji od svih metala gvožđe ima najveću primenu. Usled niske cene a velike primene, nezamenljiv je u industriji, pri čemu je čelik najpoznatija legura gvožđa. Toksični efekat po zdravlje ljudi gvožđe ima ukoliko se nagomila u tkivima, a u životnoj sredini najveću pretnju predstavlja Fe (III)-O-arsenit koji opstaje u vodi, vazduhu i biljkama.

5. Živa (Hg)

Glavni izvor žive je ruda cinabarit. Kontaminacija živom potiče od oslobađanja ovog teškog metala prilikom sagorevanja uglja, a zagađenju doprinosi i živa oslobođena iz manometara. Nakon oslobađanja u životnu sredinu, živa se može naći u vidu elementarne žive Hg^0 , u vidu Hg^{2+} , Hg_2^{2+} , ili alkilovane forme. Redoks potencijal i pH vrednost sredine određuju u kom obliku će živa biti zastupljena. Hg^{2+} i Hg_2^{2+} su stabilniji u oksidacionim uslovima, dok se u uslovima blage redukcije organska ili neorganska živa redukuju do elementarne forme, koja se zatim pretvara u alkilovane forme, biotičkim ili abiotičkim procesima. Živa je najtoksičnija kada je u alkilovanom obliku jer je tad rastvorljiva u vodi i isparljiva na vazduhu. U anaerobnim uslovima, i neorganske i organske forme žive mogu se pretvoriti u alkilovane oblike aktivnošću mikororganizama kao što su sumpor-redukujuće bakterije. Hg^{2+} formira komplekse sa različitim neorganskim i organskim ligandima. Mehanizmi za uklanjanje ovog teškog metala obuhvataju adsorpciju na zemljište, sedimente ili humusni materijal, kao i koprecipitaciju sa sulfidima.

6. Nikl (Ni)

Nikl se najčešće javlja u oksidacionim stanjima Ni^{2+} i Ni^{3+} . Ovaj teški metal ima biološku ulogu u katalizi kompleksnih molekulskih rearanžmana, a [NiFe] hidrogenaza i ureaza samo su neki od enzima kojima je nikl kofaktor. U industriji se nikl koristi u izradi legura. Legure nikla odlikuju se snagom i otpornošću na koroziju i toplotu. Glavni izvor zagađenja vazduha niklom su elektrane. Iz vazduha, nakon kiša, nikl se spušta na zemlju ili u površinske vode. Većina jedinjenja nikla koja se nađu u životnoj sredini adsorbuju za sedimente ili čestice tla i postaju nepokretni. Međutim, u kiselom zemljištu nikl postaje pokretniji i često se iz zemljišta ispere u podzemne vode.

7. Cink (Zn)

Cink se isključivo javlja u vidu dvovalentnog katjona (Zn^{2+}) i formira komplekse sa brojnim anjonima, amino kiselinama i organskim kiselinama. Kako su mu *d* orbitale kompletno popunjene, katjon cinka ne podleže redoks promenama u fiziološkim uslovima. Ovaj teški metal ulazi u sastav više od 70 enzima koji su uključeni u metabolizam proteina, lipida i ugljenih hidrata. U industiji se cink koristi kao nerđajući premaz za gvožđe ili čelik. U uslovima neutralne i niske pH vrednosti cink je prisutan u vidu rastvorljivih jedinjenja, dok na većim pH vrednostima cink može formirati komplekse karbonata i hidroksida koji utiču na njegovu rastvorljivost. U veoma zagađenim sredinama, kada je prisutan u visokim koncentracijama, cink lako precipitira.

1.1.2. Rudarstvo kao izvor zagađenja teškim metalima

Rudarstvo predstavlja jednu od najvećih antropogenih aktivnosti koje dovode do povećanja koncentracije teških metala u životnoj sredini, posebno u zemljištu, što predstavlja veliki ekološki problem današnjice (Passariello *et al.*, 2002). Pored negativnog uticaja na vegetacioni pokrivač i kvalitet useva, teški metali kontaminiraju i lance ishrane i vodene resurse čime direktno ugrožavaju zdravlje ljudi. Ljudski organizam nema sposobnost da razgradi i odstrani metale, i kao posledica toga oni se nagomilavaju u mnogim unutrašnjim organima sa različitim posledicama koje mogu biti čak i letalne.

Najstariji poznati rudnik, iz arheoloških zapisa, je "Lion Cave" u Svazilendu, za koji se pretpostavlja da je star 43 000 godina (<http://www.sntc.org.sz/>, Retrieved July 1, 2013). U ovom rudniku paleolitski ljudi su eksploatisali hematit radi dobijanja crvenog pigmenta. Danas, u XXI veku, došlo je do globalizacije rudarstva i nastanka velikog broja multinacionalnih korporacija širom sveta, među kojima su najveće „BHP Billiton“ (Australija), „Vale“ (Brazil) i „Rio Tinto“ (Australija i Ujedinjeno Kraljevstvo). Prema podacima o ukupnoj proizvodnji u 2011. godini, Evropska Unija i Sjedinjene Američke Države doprinele su samo sa 3,5% i 4,2%, dok su zemlje u razvoju koje su bogate resursima doprinele sa približno 22%. Od razvijenih zemalja, Kanada i Australija su ukupnoj proizvodnji metala doprinele sa 13,3% i 2,6% (ICMM, 2012). Pretpostavlja se da

će u narednih 10 godina primat u rudarskoj industriji imati Amerika, Afrika i delovi Azije. Većina postojećih mineralnih sirovina svakako neće biti istrošena u bliskoj budućnosti, ali globalna eksploatacija i proizvodnja postaju sve veći izazov. Evidentno je opadanje kvaliteta ruda koje dovodi do pomaka od jeftinije i jednostavnije eksploatacije do skuplje i kompleksnije, što predstavlja kako ekonomski tako i veliki ekološki problem.

Razvojem rudarske industrije dolazi do konstantnog porasta koncentracije teških metala u zemljištu i podzemnim vodama. Za uklanjanje teških metala iz zagađenih sredina dostupne su različite tehnologije koje se često kombinuju radi postizanja veće efikasnosti i koje prema autorima Evanko i Dzombak (Evanko and Dzombak, 1997) obuhvataju:

- izolaciju – kojom se sprečava širenje teških metala i kontaminacije;
- imobilizaciju – kojom se redukuje pokretljivost teškog metala menjanjem fizičkih osobina zagađene sredine, pri čemu su najčešće korišćene metode imobilizacije očvršćavanje i stabilizacija;
- smanjenje toksičnosti i/ili pokretljivosti – koje se postiže upotrebom hemijskih ili bioloških metoda;
- fizičko odvajanje – koje podrazumeva upotrebu određenih karakteristika metala i zemljišta u cilju razdvajanja kontaminiranog dela od ostatka zemljišta;
- ekstrakciju – kojom se izdvaja kontaminirano zemljište upotrebom rastvora ili elektrokinetičkim procesima.

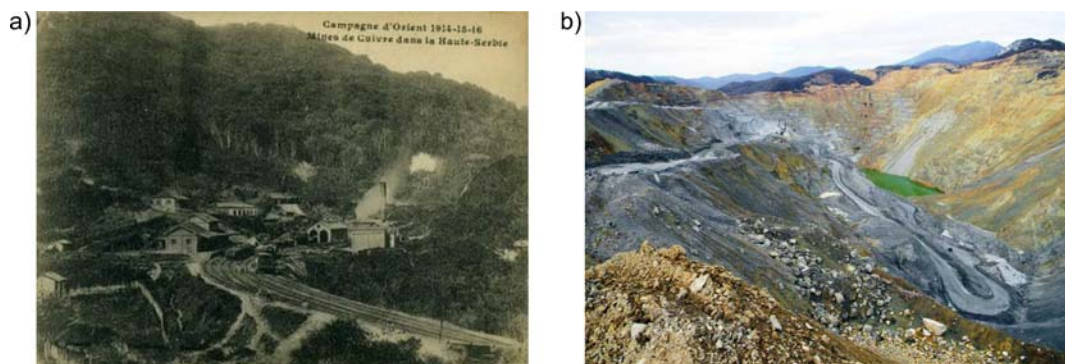
Navedene metode, međutim, veoma su skupe i nisu dovoljno efikasne, pogotovo kad je u pitanju kontaminacija veće površine (Lloyd, 2002). Biološki pristupi nude efikasnije, ekološki i ekonomski isplativije rešenje problema kontaminacije teškim metalima (Johnson, 1998; Johnson and Hallberg, 2005). Postoje dve biološke metode koje se danas primenjuju u sanaciji zagađene sredine i to su bioremedijacija i biorударstvo (Johnson, 1998; Johnson and Hallberg, 2005). *Bioremedijacija* u ovom slučaju podrazumeva upotrebu mikroorganizama za modifikovanje teških metala u lakše rastvorljive ili manje toksične forme i uklanjanje metala iz zagađene sredine, a *biouradarstvo* podrazumeva upotrebu

mikroorganizama za ekstrakciju metala iz nerastvornih ruda i obuhvata bioluženje i biooksidaciju.

1.1.3. Rudarsko-topioničarski basen Bor

Srbija je bogata mineralnim sirovinama i trenutno je širom Srbije aktivno približno 150 rudnika (UNEP, 2003). Po eksploataciji uglja poznat je region Kolubare i Kostolca, rude olova i cinka koncentrisane su u regionu Kopaonika, a depoziti ruda bakra su koncentrisani u regionu Bora.

Rudarsko-topioničarski basen Bor (RTB Bor) se nalazi u istočnoj Srbiji, jedan je od najvećih rudnika bakra u Evropi i jedini domaći proizvođač bakra i plemenitih metala (Slika 1). Kompanija se od 1999. godine naziva RTB Bor Grupa i sastoji se od 4 preduzeća: RTB Bor – matično preduzeće, Rudnici bakra Bor, Rudnici bakra Majdanpek i Topionica i rafinacija bakra Bor.



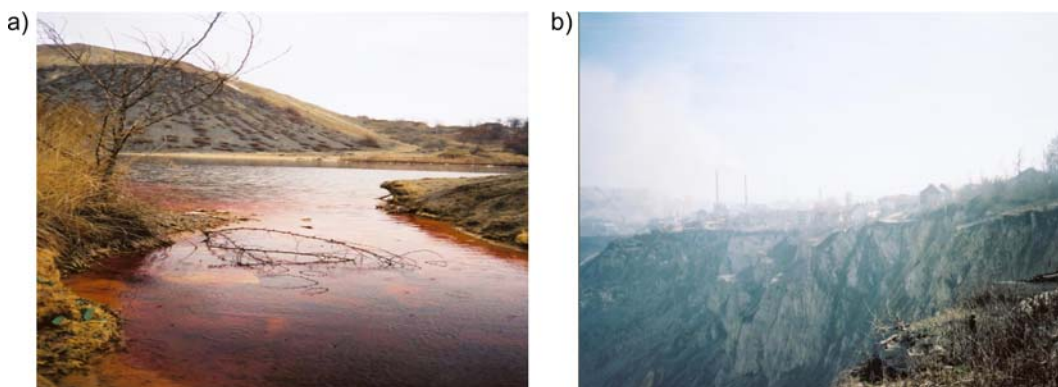
Slika 1. Rudnik bakra Bor a) nekada i b) danas. (Fotografije su preuzete sa sajtova www.digitalnizavicaj.com i www.rtb.rs).

U sastavu Rudnika bakra Bor posluju dva rudnika bakra sa površinskom eksploatacijom (ležišta Veliki Krivelj i Cerovo) i jedan sa podzemnom eksploatacijom (rudnik Jama), kao i dva pogona za pripremu mineralnih sirovina (flotacije u Krivelju i Boru) i jedan rudnik nemetala. Rudarstvo u Boru počelo je davne 1903. godine podzemnom eksploatacijom rudnika Jama. Ležište „Cerovo – Cementacija 1“ otkopavano je u periodu od 1993. do

2002. godine. Tada je eksploatacija obustavljena i to nakon otkopavanja blizu 20 miliona tona rude i proizvodnje 97,5 hiljada tona bakra u koncentratu, 1,2 tone zlata i 8,3 tone srebra. Eksploatacija ležišta Veliki Krivelj počela je 1983. godine i do danas je otkopano oko 194,6 miliona tona rude sa prosečnim sadržajem bakra od 0,34%. Prve rezerve rude bakra u Majdanpeku utvrđene su krajem 1953. godine i tada su iznosile 85 miliona tona rude sa prosečnim sadržajem bakra u težinskim procentima od 0,83%, a tri godine kasnije počela je izgradnja rudnika. Pored površinskog kopa u Majdanpeku postoji i flotacija bakra Majdanpek.

Otpadni materijal nakon obrade ruda završava u jalovištima. Jalovišta mogu biti potoci ili jezera koji se nalaze u blizini rudnika i u koje se ispušta otpadni materijal iz rudnika, ili jezera napravljena posebno za tu svrhu u koje se smešta otpad. (Mendez *et al.*, 2007). U okviru RTB Bor postoje dva flotaciona jalovišta: Bor i Veliki Krivelj. Jalovište Bor zauzima površinu od oko 86,4 ha i prvobitno je izgrađeno u oblasti površinskog kopa a zatim prošireno na Borsku reku koja je pregrađena. Jalovište Veliki Krivelj se nalazi u dolini Kriveljske reke i nastalo je pregrađivanjem reke uzvodno i nizvodno. Izgrađena su dva simetrična flotaciona jalovišta zapremina 94,3 miliona i 89,4 miliona m³ (UNEP, 2003). Teški metali, koji konvencionalnim tehnikama nisu efikasno ekstrahovani iz ruda, završavaju u jalovištima, te ona predstavljaju sa jedne strane veliku ekološku pretnju a sa druge strane potencijalnu sirovinu za ekstrakciju teških metala biološkim metodama.

Više od jednog veka rudarskih aktivnosti ostavilo je vidljive posledice na region Bora: mrtve reke, zagađen vazduh, oštećeno i uništeno poljoprivredno zemljište sa prosekom od 11000 tona otpada po stanovniku (Kovacevic *et al.*, 2010). RTB Bor predstavlja najveći izvor zagađenja u regionu istočne Srbije sa emisijom preko 200000 tona sumpor-dioksida, 300-500 tona sumporne kiseline, 300 tona As, 30-100 tona Pb i 10-35 tona Zn godišnje. Otpadne materije iz rudarske industrije, sa visokim sadržajem bakra i drugih teških metala, dospevaju do zemljišta okolnih sela i reka. RTB Bor stoga predstavlja rizik za čitav region s obzirom da putem Borske reke i drugih pritoka toksične materije dospevaju do Dunava (Slika 2 a) (UNEP, 2003). Kako se površinski rudnici u Boru nalaze veoma blizu ljudskih naselja, prašina takođe predstavlja veliki ekološki problem za žitelje Bora, Krivelja i Oštrelja, koji su više od jednog veka izloženi dejstvu toksičnih supstanci (Slika 2 b).



Slika 2. Zagađenje u Boru. a) Borska reka i b) vazдушna isparenja u regionu Bora. (Fotografije su preuzete sa sajta www.bytebacksupport.myzen.co.uk).

1.2. Biotehnološka primena mikroorganizama u cilju uklanjanja i oslobađanja teških metala

Zagađenje sredine visokim koncentracijama teških metala utiče nepovoljno kako na brojnost i raznovrsnost mikroorganizama u zagađenim staništima, tako i na njihovu biomasu i aktivnosti. Međutim, ovakve sredine su istovremeno dobar izvor mikroorganizama tolerantnih na teške metale. Usled selektivnog pritiska, autohtone bakterije iz zagađenih sredina najčešće razvijaju neki od brojnih mehanizama tolerancije na štetno dejstvo povišenih koncentracija teških metala. Iako bakterije ne mogu da uklone teške metale iz sredine, one mogu da ih prevedu u oblike koji se mogu lakše odstraniti iz kontaminiranog područja, a u najboljem slučaju ponovno iskoristiti u metalurškoj obradi. Iz tog razloga je uvek aktuelna potraga za novim bakterijama upravo u kontaminiranim sredinama, koje bi potencijalno mogle biti korišćene za uklanjanje i oslobađanje (luženje) teških metala.

Prirodni uslovi koji vladaju u kontaminiranoj sredini i sposobnosti organizama koji tu sredinu naseljavaju mogu biti sami po sebi povoljni za bioremedijaciju, i tada dolazi do *prirodne atenuacije*, odnosno procesa bioremedijacije bez spoljašnje intervencije. Ukoliko su u kontaminiranoj sredini ograničeni nutrijenti onda je moguće primeniti autohtone mikroorganizme za bioremedijaciju ali uz dodavanje nutrijenata koje će pospešiti njihov rast, što je proces poznat kao *biostimulacija*. Moguće je takođe u zagađenu sredinu uvesti

egzogene mikroorganizme, koji nisu karakteristični za datu sredinu ali imaju sposobnost uklanjanja polutanta kojim je ta sredina zagađena. Ovaj proces se naziva *bioaugmentacija* i ponekada podrazumeva upotrebu genetički modifikivanih mikroorganizama. Bioremedijacija se može upotrebiti na samom mestu zagađenja (*in situ*) ili pak na zagađenom uzorku koji je uklonjen sa izvorne lokacije (*ex situ*).

1.2.1. Mikrobiološki diverzitet u sredinama zagađenim teškim metalima

Bakterije, kao najzastupljeniji organizmi na Zemlji, imaju važnu ulogu u funkcionisanju i homeostazi životne sredine. Procenjeno je da na Zemlji ima približno 5×10^{30} bakterija, što je nekoliko redova veličine više od broja zvezda u svemiru (Guazzaroni *et al.*, 2010). Međutim, podaci o broju bakterijskih vrsta i njihovim ekološkim funkcijama su još uvek nepotpuni.

Zemljište kao najraznovrsniji terestrijalni ekosistem je sredina sa ogromnim mikrobiološkim diverzitetom koji je u velikoj meri neistražen i neiskorišćen prirodni resurs. Procenjuje se da se u netaknutom zemljištu nalazi približno 10 000 različitih bakterijskih vrsta, čiji je diverzitet prvenstveno kontrolisan edafskim faktorima i odraz je fizičko-hemijskih karakteristika samog zemljišta (Torsvik *et al.*, 1996; Van Horn *et al.*, 2013). Kontaminacija teškim metalima smanjuje diverzitet bakterija u zemljištu ukazujući na veoma toksično dejstvo metala posebno na retke taksonomske vrste (Gans *et al.*, 2005). Od presudnog značaja za razumevanje mikrobiološkog sastava sredine kontaminirane teškim metalima, kao što su rudnici i njihova okolina, jeste identifikacija mikroorganizama koji je čine, čime se stvara mogućnost za eksploataciju njihovog potencijala u bioremedijaciji ili bioluženju. Danas se u analizi diverziteta koristi sprega metagenomskog pristupa i tradicionalnih tehnika kultivacije bakterija.

1.2.1.1. Metagenomika

Metagenomika obuhvata svako istraživanje koje uključuje primenu savremenih tehnika genomike u proučavanju mikrobioloških zajednica direktno u njihovom prirodnom okruženju, zaobilazeći izolaciju, gajenje u laboratorijskim uslovima i posmatranje pojedinačnog organizma (Xu, 2010). Termin „metagenomika“ skovao je Jo Handelsman

1998. godine (Handelsman *et al.*, 1998) kako bi opisao novo polje istraživanja koje analizira ukupan genetski materijal dobijen direktno iz sredinskog uzorka na sličan način kao pojedinačni genom. Metagenomska analiza obuhvata izolovanje ukupne DNK iz uzoraka životne sredine, kloniranje DNK u odgovarajući vektor, transformaciju ćelija domaćina tim vektorom i nakon toga analizu dobijenih transformanata. Kada je cilj ispitivanje diverziteta mikroorganizama u određenom sredinskom uzorku, kloniraju se i sekvenciraju geni za 16S rRNK, zbog visoke konzerviranosti sekundarne strukture i stabilnosti primarne sekvence, koja evoluira relativno konstantnom stopom.

Metagenomska analiza bioloških zajednica značajno doprinosi razumevanju diverziteta, funkcije i interakcija među mikroorganizmima, što je posebno važno ukoliko su predmet istraživanja bakterije koje mogu da budu primenjene u bioluženju i bioremedijaciji kontaminiranih sredina. Međutim, iako se metagenomskim pristupom stiče potpuniji uvid u biodiverzitet i prisutnost potencijalno aplikativnih mikroorganizama, ovim pristupom se ne izoluju mikroorganizmi, već se samo dobijaju podaci o njihovom prisustvu.

1.2.1.2. Kultivacija bakterija

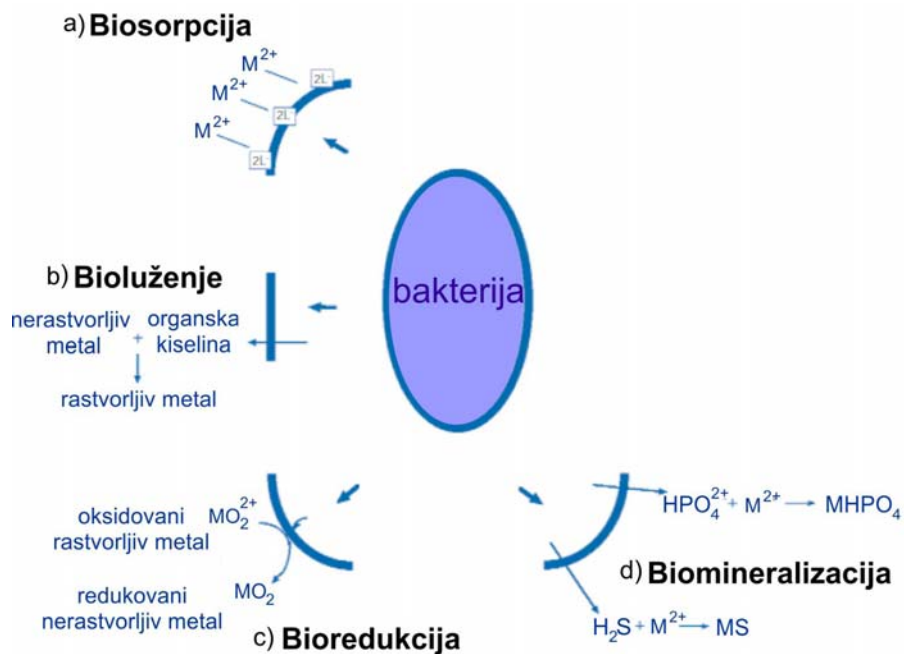
Do uvođenja metagenomike, kultivacija bakterija je bila jedini izvor informacija o njihovom diverzitetu u određenom staništu. Uobičajene tehnike kultivacije daju ograničen uvid u mikrobiološki diverzitet – više od 99% vrsta mikroorganizama se ne može gajiti u standardnim laboratorijskim uslovima (Xu, 2010). Čak i ukoliko je neke mikroorganizme moguće kultivisati, veštačka sredina koja im je obezbeđena u laboratorijskim uslovima gajenja u mnogome se razlikuje od njihove prirodne ekološke niše, što rezultira u različitoj ekspresiji gena, proteinskim i metaboličkim profilima (Cole *et al.*, 2010). Već prvobitna istraživanja u oblasti metagenomike pokazala su da je diverzitet u mikrobiološkim zajednicama daleko kompleksniji nego što se pretpostavljalo i da je zapravo upotrebom tradicionalnih metoda kultivacije taj diverzitet potcenjen. Međutim, i pored brojnih mana, tradicionalne tehnike kultivacije i dalje imaju nekoliko suštinskih prednosti zato što omogućavaju fiziološku i funkcionalnu analizu izolata kao i ispitivanje njihove primenljivosti.

1.2.2. Bioremedijacija sredina zagađenih teškim metalima uz pomoć bakterija

Tradicionalne fizičko-hemijske metode za uklanjanje zagađivača iz životne sredine često su neefikasne, veoma su skupe, i njihova upotreba dovodi do stvaranja intermedijernih jedinjenja sa potencijalno toksičnijim efektom od polaznih zagađivača. Sa druge strane, bioremedijacija, biološka metoda koja podrazumeva upotrebu mikroorganizama ili biljaka (fitoremedijacija) u cilju uklanjanja zagađivača, je efikasnija i istovremeno ekonomski i ekološki prihvatljivija (Megharaj *et al.*, 2011).

Iako mikroorganizmi ne mogu razgraditi teške metale, oni mogu menjati njihove hemijske karakteristike različitim mehanizmima, a neki od tih mehanizama se mogu iskoristiti za sanaciju kontaminacije teškim metalima (Slika 3). U mehanizme koji se mogu upotrebiti u sanaciji spadaju:

- Biosorpcija metala;*
- Heterotrofno bioluženje metala;*
- Enzimski katalizovane transformacije metala - bioredukcija;*
- Biomineralizacija.*



Slika 3. Interakcije mikroorganizama i metala koje imaju potencijalnu primenu u procesu bioremedijacije. (Slika je preuzeta i prerađena iz rada (Lloyd, 2002)).

a) *Biosorpcija metala*

Biosorpcija je najjednostavniji način za uklanjanje metala kada se nađu u rastvoru i mnoge bakterije kao što su *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus* i *Klebsiella aerogenes* biosorpcijom obezbeđuju preživljavanje u prisustvu teških metala (Bruins *et al.*, 2000). Biosorpcija podrazumeva metabolički nezavisan proces sorpcije teških metala na biomasu. Kako površina bakterijske ćelije nosi negativno naelektrisanje na neutralnoj pH vrednosti, zahvaljujući prisustvu karboksi, amino, hidroksilnih, fosfatnih i sulfhidrilnih grupa, može adsorbovati značajne količine katjona metala (Slika 3 a) (Lloyd, 2002). Prednost ovog mehanizma je što se za sorpciju metala može upotrebiti jeftina otpadna biomasa, a mane su osetljivost na promene pH vrednosti i nedostatak specifičnosti, što se može rešavati upotrebom metoda molekularne biotehnologije.

b) *Heterotrofno bioluženje metala*

Neke heterotrofne bakterije (na primer *Acidobacterium capsulatum* i *Ferrimicrobium acidiphilum* (Ñancuqueo and Johnson, 2010) proizvode organske kiseline (citratna, glukonska, oksalna) pomoću kojih mogu pretvoriti metal iz nerastvorljivog oblika u rastvorljivi (Slika 3 b), čime se omogućava uklanjanje metala iz kontaminirane sredine. Pored primene u sanaciji zagađenja, ovaj mehanizam mobilizacije metala vekovima ima primenu i u luženju metala iz ruda slabog kvaliteta.

c) *Enzimski katalizovane transformacije metala - bioredukcija*

Bakterije su razvile širok spektar biohemijskih puteva koji im obezbeđuju toleranciju na prisustvo teških metala, a mogu se takođe upotrebiti u procesima bioremedijacije. Primer za ovakav vid interakcije je enzimski katalizovana redukcija žive, kojom se veoma toksični Hg^{2+} jon prevodi u netoksičan elementarni Hg^0 delovanjem enzima živa reduktaze (Slika 3 c). I Gram-pozitivne (*Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*) i Gram-negativne bakterije (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*) mogu redukovati Hg^{2+} (Bruins *et al.*, 2000). Na ovaj način mikroorganizam preživljava prisustvo žive, a ujedno je prevodi u nerastvorljivi elementarni oblik koji je lakše ukloniti iz kontaminirane sredine. Pored bakterija koje redukuju živu postoji veliki broj drugih bakterija koje u anaerobnim uslovima imaju sposobnost da koriste metale sa visokom valentnošću kao akceptore elektrona. Neki

od metala koji se na ovaj način mogu redukovati su Fe^{2+} , Cr^{6+} i As^{5+} , čime se u određenim slučajevima drastično menja njihova solubilnost i olakšava uklanjanje.

d) *Biominalizacija*

Pored direktne redukcije metala korišćenjem reduktaza, anaerobne bakterije mogu redukovati i zatim precipitirati veliki broj metala indirektnim mehanizmom. Biominalizacijom metala bakterije proizvode nerastvorljive sulfidne i fosfatne minerale (Slika 3 d). Ovim mehanizmom teški metali se uklanjaju iz sredine tako što se „zarobe“ unutar sedimenata ili zemljišta. Primeri ovog mehanizma su Fe^{2+} katalizovana redukcija Cr^{6+} i Tc^{7+} , nakon čega dolazi do precipitacije nastalih Cr^{3+} i Tc^{4+} . Sulfat-redukujuće bakterije kao što su predstavnici roda *Acidithiobacillus* takođe mogu uklanjati metale iz sredine indirektnim mehanizmom (Lloyd, 2002). U ovom slučaju, precipitacija, ponekad istovremeno sa redukcijom, odvija se preko sulfida koji nastaje kada se u procesu respiracije sulfat koristi kao terminalni akceptor elektrona.

Iako bioremedijacija najčešće podrazumeva upotrebu mikroorganizama, u pojedinim slučajevima i biljke imaju ulogu u remedijaciji bilo direktno putem fitoremedijacije, bilo kao potpora za rast mikroorganizama. Biljke koje rastu na zemljištima zagađenim teškim metalima imaju sposobnost da akumuliraju u svojim tkivima velike količine metala, bez da pokazuju simptome trovanja (Marschner, 1995) i ta osobina može biti iskorišćena za uklanjanje metala (Slika 4). Iako nije predmet ove studije, vredno je pomenuti da se termin fitoremedijacija odnosi na skup različitih tehnologija koje koriste prirodne ili genetski modifikovane biljke kako bi sanirale kontaminiranu sredinu i obuhvata četiri različita pristupa: rizofiltracija, fitostabilizacija, fitovolatilizacija i fitoekstrakcija. U sredinama kakva su jalovišta, fokus je na upotrebi autohtonih biljaka s obzirom da su adaptirane na specifične uslove sredine i predstavljaju temelj za prirodno ekološko nasleđe.



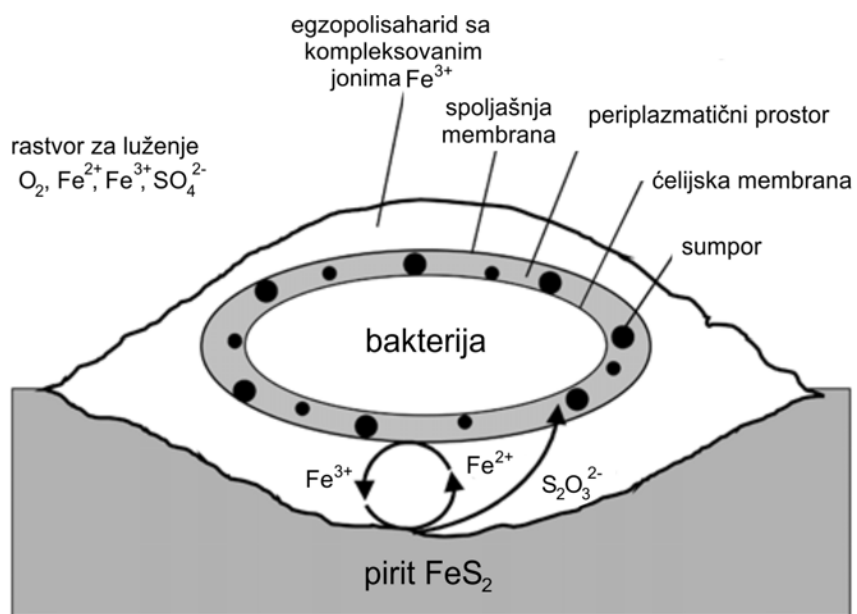
Slika 4. Biljke raži rasute po jalovištu. (Fotografija preuzeta sa sajta <http://www.otago.ac.nz>).

Bioremedijacija sredina zagađenih teškim metalima predstavlja veliki izazov, pogotovo ako se uzme u obzir da je životna sredina oko rudnika najčešće zagađena kompleksnom smešom različitih teških metala kao i drugih organskih i neorganskih zagađivača. Pored teških metala koji su prisutni u visokim koncentracijama, jalovišta odikuje i odsustvo vegetacije, organske materije, azota, fosfora kao i niska pH vrednost (Ye *et al.*, 2002). Na efikasnost procesa bioremedijacije u mnogome utiče i dostupnost nutrijenata, pre svega azota i fosfora (Van Hamme *et al.*, 2003). Može se zaključiti da pored velikog potencijala bioremedijacija ima i ograničavajuće faktore, i da danas kada je sirovih ruda sve manje, jalovišta rudnika koja predstavljaju veliki ekološki problem postaju središte novih aktivnosti, tokom kojih bi se metali koji su zaostali ponovo odvajali i iskoristili.

1.2.3. Bioluženje

Primena mikroorganizama u rudarskoj industriji postojala je mnogo pre uvođenja termina bioluženje i razumevanja konkretne uloge mikroorganizama u ekstrakciji metala. *Bioluženje* predstavlja upotrebu mikroorganizama za ekstrakciju metala iz nerastvornih ruda. Metali koji se u rudama nalaze u obliku sulfida metala, a koji se na ovaj način mogu ekstrahovati su bakar, gvožđe, kobalt, nikl, cink i uranijum (Rohwerder *et al.*, 2003). Među tipičnim Gram-negativnim bakterijama koje luže metale su bakterije roda *Acidithiobacillus*,

sa predstavnicima *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans* i *A. caldus*, zatim bakterije roda *Acidiphilium*, sa predstavnikom *A. acidophilum* kao i bakterije roda *Leptospirillum* (Rohwerder *et al.*, 2003). Shematski prikaz luženja piritu pomoću *A. ferrooxidans* prikazan je na slici 5. Među Gram-pozitivnim bakterijama koje luže metale su predstavnici rodova *Acidimicrobium*, *Ferromicrobium* i *Sulfobacillus*. Vrste *Leptospirillum ferrooxidans* i *Leptospirillum ferriphilum* mogu da rastu isključivo oksidujući Fe^{2+} jone u aerobnim uslovima, dok *A. ferrooxidans* ima izrazito širok metabolički kapacitet. Ovaj mikroorganizam može da oksiduje redukovana jedinjenja sumpora, vodonik, mravlju kiselinu, jone Fe^{2+} i drugih metala (Rohwerder *et al.*, 2003).

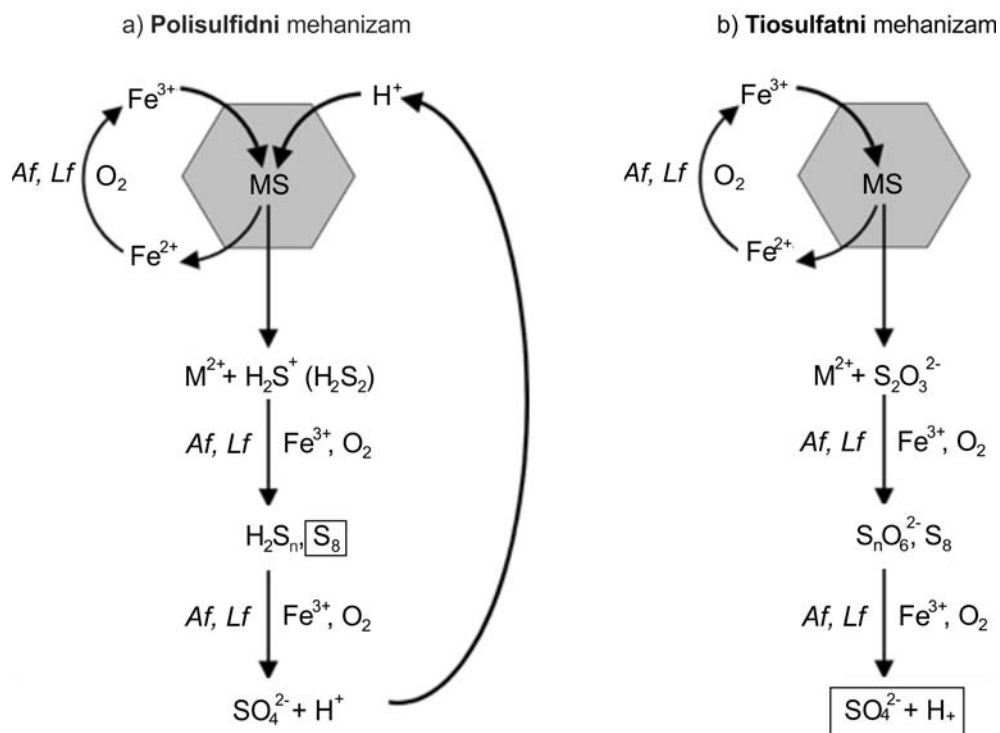


Slika 5. Model luženja piritu pomoću bakterije *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Bakterija je „zarobljena“ u sopstvenom egzopolisaharidu koji je elektrostatičkim interakcijama vezan za pirit. (Slika je preuzeta i prerađena iz rada (Rohwerder *et al.*, 2003)).

Nekada se smatralo da se rastvaranje sulfida metala u bioluženju odvija jednim od dva mehanizma: direktnim ili indirektnim (Sand *et al.*, 2001). Međutim, intenziviranim istraživanjima u ovoj oblasti razjašnjen je mehanizam oksidacije sumpora, koji leži u osnovi bioluženja i predložen je novi model bioluženja (Sand *et al.*, 2001).

Prema novom modelu, joni Fe^{3+} oksiduju sulfide metala u reakciji koja nije enzimski katalizovana, nakon čega dolazi do enzimski katalizovane oksidacije nastalog jona Fe^{2+} (Sand *et al.*, 2001). Joni Fe^{3+} su poreklom iz bakterijskih egzopolisaharida gde su u

kompleksima sa glukuronskom kiselinom (slika 6). Lokalizacijom u egzopolisaharidima bakterije zapravo olakšavaju proces oksidacije time što približavaju Fe^{3+} sulfidu metala.



Slika 6. Shematsko poređenje a) polisulfidnog i b) tiosulfatnog mehanizma oksidacije sulfida metala; MS – sulfid metala, Af – *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Lf – *Leptospirillum ferrooxidans*; uokvireni su glavni produkti reakcija koji se akumuliraju u odsustvu sumpor-oksidujućih bakterija (Shema je preuzeta i prerađena iz rada (Rohwerder *et al.*, 2003)).

Sulfidi metala se mogu oksidovati jednim od dva mehanizma: polisulfidnim ili tiosulfatnim. Koji će se mehanizam pokrenuti zavisi od rastvorljivosti sulfida u kiseloj sredini. Sulfidi metala koji su u kiseloj sredini rastvorljivi (sfalerit ZnS , galenit PbS , halkopirit CuFeS_2) oksiduju se polisulfidnim mehanizmom (Slika 6 a), dok se nerastvorljivi sulfidi (pirit Fe_2S , molibdenit MOS_2) oksiduju tiosulfatnim mehanizmom (Slika 6 b). U reakcijama oksidacije, jon Fe^{3+} napada sulfid metala uzimajući mu elektron, i redukuje se u Fe^{2+} . Kao rezultat, sulfid otpušta katjon metala i intermedijerno jedinjenje sumpora. Gvožđe (II)-oksidujuće bakterije kao što su *A. ferrooxidans* i *L. ferrooxidans* katalizuju

proces recikliranja jona Fe^{3+} u kiseloj sredini. U slučaju polisulfidnog mehanizma, dešava se i dodatni napad protona na sulfid metala. Jedinjenja sumpora koja nastaju se oksiduju abiotički i pomoću bakterija *A. ferrooxidans* i *L. ferrooxidans* koje mogu oksidovati i jedinjenja sumpora (Rohwerder *et al.*, 2003).

Oksidacijom sulfida metala smanjuje se pH vrednost sredine, što pogoduje razvoju acidofilnih bakterija, koje imaju dominantnu ulogu u bioluženju. Acidofilne bakterije svojom aktivnošću ubrzavaju process oksidacije čime se dodatno smanjuje pH vrednost, nekad čak i ispod pH 1. Na ovaj način, u rudnicima nastaju kiseli drenažni rastvori. Iako kisele drenažne rastvore karakterišu ekstremni uslovi, pokazano je da je bakterijski diverzitet u ovim sredinama veći nego što je očekivano (Johnson, 1998), sa čak 11 redova bakterija koje opstaju u ovim uslovima (Baker and Banfield, 2003). Zahvaljujući sve većem broju podataka dobijenih sekvenciranjem gena za 16S rRNK, opisan je veliki broj novih bakterijskih vrsta sa sposobnošću luženja metala, dok su već poznati sojevi ponovo klasifikovani.

1.2.3.1. Bioluženje bakra

Proizvodnja bakra u svetu konstantno se povećavala u periodu od 1964 – 2008. godine od 9 Mt to 18 Mt godišnje. U 2008. godini na prvom mestu po proizvodnji bakra nalazio se Čile, sa čak 5 Mt proizvedenog bakra, dok se Srbija nalazila na 37. mestu sa proizvedenih 11 Kt (Toovey, 2010). Ovi podaci se odnose na totalnu proizvodnju bakra, pri čemu se 20% ukupne količine dobija primenom bioluženja.

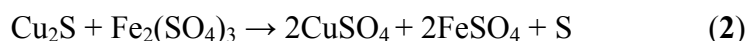
Bioluženje bakra odvija se na tri načina: obradom sekundarnih sulfida u nasipima ili gomilama, obradom ruda lošijeg kvaliteta u jalovištima i bioluženjem koncentrata ruda u reaktorima na visokim temperaturama. Bioluženje bakra u nasipima postalo je uobičajena praksa u industriji. Od 1980. godine je pokrenuto najmanje 13 pogona za ekstrakciju bakra u nasipima, koji se nalaze u Australiji, Peruu i najvećim delom u Čileu (Brierley and Brierley, 2001). Na ovaj način produkuje se približno 10 Kt bakra godišnje u manjim pogonima a 100 Kt godišnje u velikim pogonima (Olson *et al.*, 2003). Bakterije koje učestvuju u bioluženju su autohtone gvožđe-oksidujuće, sumpor-oksidujuće i heterotrofne bakterije. Navedene bakterije tokom bioluženja stvaraju acidofilnu sredinu koja svakako

nije pogodna za rast drugih bakterija, tako da je nepotrebno potencirati sterilnost procesa bioluženja u nasipima (Rawlings, 2002). Dobar primer za komercijalnu primenu bioluženja u nasipima je pogon „Quebrada Blanca“ u severnom Čileu koji je aktivan od 1994. godine i u kome se proizvede 75 Kt bakra godišnje. U ovom pogonu aktivnost bakterija je poboljšana aeracijom pomoću ventilatora niskog pritiska i vazdušnih linija postavljenih ispod nasipa. Nasip za bioluženje je moguće dodatno inokulirati bakterijama, međutim ne zna se sa sigurnošću da li bi te bakterije bile konkurentne u nesterilnim uslovima procesa i da li bi inokulacija uopšte ubrzala proces (Rawlings, 2002). Pažljiva konstrukcija pogona, kao i unapređivanje bakterijske aktivnosti, dovode do povećane efikasnosti tako da se proces bioluženja kompletira za nekoliko meseci umesto nekoliko godina (Brierley and Brierley, 2001).

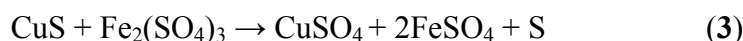
RTB Bor je u okviru Šestog istraživačkog okvirnog programa (FP6) Evropske Unije projektom „BioMine“ otpočeo istraživanje bioluženja kao nove tehnološke metode proizvodnje bakra iz primarnih i sekundarnih materijala, ruda, koncentrata, metalurških šljaka i flotacijskih jalovina, sa ciljem prevazilaženja niskog industrijskog iskorišćenja bakra i velikih gubitaka (Cvetkovski *et al.*, 2006; Gericke *et al.*, 2008). Eksperimenti bioluženja još uvek se izvode u laboratorijskim uslovima, inokulacijom substrata sa autohtonim mezofilnim bakterijama poreklom iz rudnog tela „Tilva Roš“ (Conic *et al.*, 2009; Cvetkovski *et al.*, 2009).

Rude bakra koje se luže upotrebom mikroorganizama su halkopirit (CuFeS_2), koji je najzastupljenija ruda bakra u prirodi sa čak 70% svetskih rezervi bakra koje se nalaze u ovoj rudi, zatim kovelit (CuS), halkocit (Cu_2S) i bornit (Cu_5FeS_2).

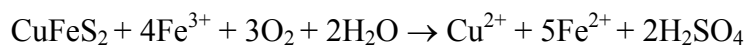
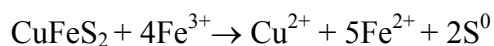
Bakar se uspešno ekstrahuje iz rude halkocit (Cu_2S) pomoću kiseline (jednačina 1) ili pomoću jona Fe^{3+} nastalog bakterijskom oksidacijom jona Fe^{2+} (jednačina 2).



Nastali kovelit (CuS) se zatim luži takođe pomoću jona Fe^{2+} (jednačina 3).



Joni Fe^{3+} nastali bakterijskom oksidacijom jona Fe^{2+} učestvuju u luženju rude halkopirit (CuFeS_2) na sledeći način:



Mezofilne bakterije koje se koriste za bioluženje bakra iz halkocita nisu dovoljno efikasne za luženje ovog metala iz rude halkopirit. Kako bi se ovaj problem prevazišao razvijene su nove tehnologije koje koriste termofilne mikroorganizme. Otkriće ekstremno termofilnih mikroorganizama u kiselim sredinama podstaklo je ispitivanje sposobnosti ovih vrsta da oksiduju rude kao što su halkopirit (CuFeS_2) i molibdenit (MoS_2), za koje je bioluženje mezofilima slabo efikasno. Oksidacijom sulfida metala proizvodi se toplota, što ne predstavlja problem kada se koriste termofilne bakterije, jer porast temperature u ovom slučaju ubrzava reakciju oksidacije, čime se čitav proces poboljšava.

Bioluženje halkocita u nasipima se vrši na rudi koja je izgnječena do čestica veličine od 1 do 4 cm. Izmrvljena ruda se zakišeljava sumpornom kiselinom, grupiše u aglomerate i slaže do visine 6-10 m u nasipima koji mogu ići stotinama metara u dužinu i širinu. Rastvor za luženje se dodaje navodnjavanjem, kap po kap. Nakon prolaska kroz nasip sa rudom (Slika 7), rastvor za luženje se obogaćuje bakar sulfatom i dalje se bakar izdvaja iz rastvora elektrohemijskim procesima.



Slika 7. Bioluženje bakra u nasipima. (Slika je preuzeta i prerađena iz rada (Watling, 2008)).

Bioluženje drugih metala

Bioluženje, kao proces ekstrakcije metala iz ruda, primenjuje se uspešno i za nikl, cink i kobalt (Viera *et al.*, 2007). Nikl se luži iz ruda pentlandit ((Fe,Ni)₉S₈) i milerit (NiS), cink iz sfalerita (ZnS) i pirita (FeS₂), a kobalt iz ruda koje sadrže sulfid.

Kada je u pitanju luženje zlata i srebra, mikroorganizmi se koriste samo za oksidaciju sulfida metala kao što su pirit (FeS₂) ili arsenopirit (FeAsS), koji zaklanjaju plemeniti metal unutar rude, omogućavajući na taj način izlaganje zlata ili srebra. Ovaj proces se naziva biooksidacija. Nakon pretretmana biooksidacijom, otkriveni plemeniti metal se ekstrahuje tradicionalnim hidrometalurškim procesima kao što je npr. cijanidno luženje (Rohwerder *et al.*, 2003). Iako je bioluženje kao metoda za poboljšanje ekstrakcije plemenitih metala u upotrebi od 1986. godine (Olson *et al.*, 2003), tek 1999. godine je kompanija „Newmont Mining“ pokrenula pogon za biooksidaciju, kao pretretman u ekstrakciji rude zlata (Tempel, 2003). U ovom pogonu je, upotrebom mezofilnih bakterija *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, umereno termofilnih vrsta roda *Sulfobacillus* i termofilnih arhea *Acidianus* sp. i *Metallosphaera* sp. ekstrakcija zlata porasla sa 30–39% ekstrahovanog zlata pre, do 49–61% ekstrahovanog zlata posle biooksidacije (Olson *et al.*, 2003).

1.3. Mehanizmi tolerancije na teške metale

Mikroorganizmi su se u životnoj sredini oduvek susretali sa različitim metalima i stoga nije iznenađujuće što se tolerancija na teške metale razvila ubrzo nakon nastanka bakterija i što postoji kod skoro svake bakterijske vrste (Ji and Silver, 1995). U literaturi se pojmovi „tolerancija“ i „rezistencija“ koriste kao sinonimi, kada je reč o odgovoru bakterija na teške metale, a da nigde nije razjašnjeno značenje pojmova niti razlika među njima. Moguće je razgraničiti termine tolerancije i rezistencije na metale na sličan način kao što su razgraničeni termini višestruke tolerancije (*eng.* multidrug tolerance) i rezistencije (*eng.* multidrug resistance) na antimikrobne agense (Gefen and Balaban, 2009). Za rezistenciju su odgovorni geni stečeni horizontalnim transferom gena ili mutacijom, koji se nasleđuju i obezbeđuju sposobnost rasta u povišenim koncentracijama antimikrobnih agenasa. Za razliku od rezistencije, tolerancija je prolazni fenotip koji se ne nasleđuje. Smatra se da je

tolerancija uzrokovana posebnim fiziološkim stanjem određene subpopulacije ćelija, koje je reverzibilno i koje omogućava preživljavanje te subpopulacije ćelija u prisustvu antimikrobnog agensa. S obzirom da u literaturi pojmovi tolerancije i rezistencije nisu jasno razgraničeni, bar kad je u pitanju odgovor bakterija na prisustvo teških metala, a da su mehanizmi kojima bakterije preživljavaju prisustvo teških metala ispitani i razjašnjeni do različitih nivoa i da se ne zna genetika svakog mehanizma, u ovoj studiji će biti korišćen termin tolerancija.

U literaturi se mogu naći raznovrsne podele mehanizama tolerancije, kojima se odgovori mikroorganizama na prisustvo metala grupišu prema različitim faktorima i stoga se podele međusobno ne mogu uskladiti. Osnovnom podelom može se smatrati podela na 6 mehanizama kojima bakterije obezbeđuju toleranciju na teške metale i to su: (a) uklanjanje metala promenom propustljivosti i biosorpcijom, (b) uklanjanje metala aktivnim transportom, (c) unutarćelijsko i (d) ekstraćelijsko „zarobljavanje“ metala i (e) enzimaska detoksifikacija/redukcija metala (Rouch *et al.*, 1995). Svaka bakterija može posedovati jedan ili nekoliko mehanizama tolerancije.

a) *Uklanjanje metala promenom propustljivosti i biosorpcijom*

Bilo koje promene ćelijskog zida ili membrane kojima bakterija pokušava da zaštiti esencijalne ćelijske komponente od toksičnog dejstva teških metala, primeri su ovog mehanizma tolerancije. Jedan od primera je uklanjanje bakra koje vrši *Escherichia coli*, gde dolazi do promena u sintezi membranskog proteina porina, čime se smanjuje propustljivost membrane za jone metala (Rouch *et al.*, 1995). Kod *Staphylococcus aureus*, promenama konformacije membrane menja se propustljivost za kadmijum i druge metale (McEntee *et al.*, 1986). Sa druge strane, bakterije mogu sprečiti jone metala da interaguju sa ćelijskim komponentama, vezujući i adsorbujući ih nespecifično za površinu ćelijskog zida ili za egzopolisaharide ukoliko ih produkuju. Ovaj proces je poznat kao biosorpcija i može naći primenu u bioremedijaciji zagađenih sredina (odjeljak 1.2.2.) (Scott and Palmer, 1990). Biosorpcija je pasivan proces koji ne zavisi od ćelijskog metabolizma.

b) *Uklanjanje metala aktivnim transportom*

Aktivni transport, tj. efluks transportni sistem, predstavlja najrasprostranjeniji mehanizam tolerancije na teške metale. Kako bi ostvarili svoju fiziološku ili toksičnu ulogu, teški metali moraju prvo da uđu u bakterijsku ćeliju (Nies, 1999). Mnogi dvovalentni katjoni metala, kao što su Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} , slične su strukture. Stoga, da bi bakterijska ćelija mogla da razlikuje strukturno slične jone metala, sistem kojim ona „usvaja“ jone metala iz sredine mora biti strogo kontrolisan. U prirodnim, normalnim uslovima, bakterije za usvajanje jona metala iz sredine koriste nespecifične transportne sisteme, koji su konstitutivno eksprimirani. Međutim, kada se u citoplazmi metali nađu u višku, sintetišu se specifični efluks transportni sistemi za izbacivanje viška metala iz ćelije. Ovi efluks sistemi mogu biti zavisni i nezavisni od ATP molekula, a takođe mogu biti specifični za anjon ili katjon koji transportuju. Mnogi mikroorganizmi, kao što su *E. coli*, *S. aureus* i vrste rodova *Bacillus* i *Listeria*, obezbeđuju toleranciju na teške metale njihovim efluksom iz ćelije (Nies, 1992).

c) *Unutarćelijsko „zarobljavanje“ metala*

Ovaj mehanizam, poznat kao bioakumulacija, predstavlja akumulaciju metala unutar citoplazme, čime se sprečava interakcija sa ćelijskim komponentama. Najčešće, bakterije produkuju metalotioneine ili proteine bogate cisteinom, koji im omogućavaju „zarobljavanje“ metala unutar citoplazme. Bioakumulacija je aktivan proces i zavisi od ćelijskog metabolizma. Metali koji se ovim mehanizmom mogu akumulirati su kadmijum, bakar i cink, a proces je karakterističan za *Synechococcus* sp. i *Pseudomonas* sp. (Silver and Phung, 1996).

d) *Vanćelijsko „zarobljavanje“ metala*

Mehanizam tolerancije vanćelijskim zarobljavanjem teških metala zasnovan je na produkciji i sekreciji komponenti i jedinjenja koje sa metalima mogu formirati komplekse i opisan je, pored bakterija *Citrobacter* sp. i *Klebsiella aerogenes*, i kod nekoliko vrsta kvasaca i gljiva (McEntee *et al.*, 1986; Scott and Palmer, 1990). Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* obezbeđuje toleranciju na nikel produkujući velike količine glutationa koji se

vezuje za teške metale, dok neke vrste gljiva rezistentnih na bakar proizvode oksalate koji formiraju komplekse sa metalima.

e) *Enzimska detoksifikacija/redukcija metala*

Najbolji primer enzimske detoksifikacije/redukcije metala je tolerancija na živu redukcijom do manje toksične forme, što se može iskoristiti u procesima bioremedijacije (odjeljak 1.2.2.). Živa svoju toksičnost ispoljava vezujući i inaktivirajući tjele koji su delovi enzima i proteina. Tolerancija na živu detektovana je i kod Gram-pozitivnih (*Bacillus* sp., *S. aureus*) i kod Gram-negativnih bakterija (*P. aeruginosa*, *A. ferrooxidans*) (Bruins *et al.*, 2000). Najčešće bakterije poseduju nekoliko gena koji formiraju *mer* operon i ti geni, pored enzima za redukciju, kodiraju i proteine za vezivanje i transport metala. Još jedan primer ovog mehanizma je redukcija arsena do toksičnijeg oblika, koji se zatim uklanja iz bakterijske ćelije efluks sistemom, koji je kodiran genima istog operona kao i arsen reduktaza.

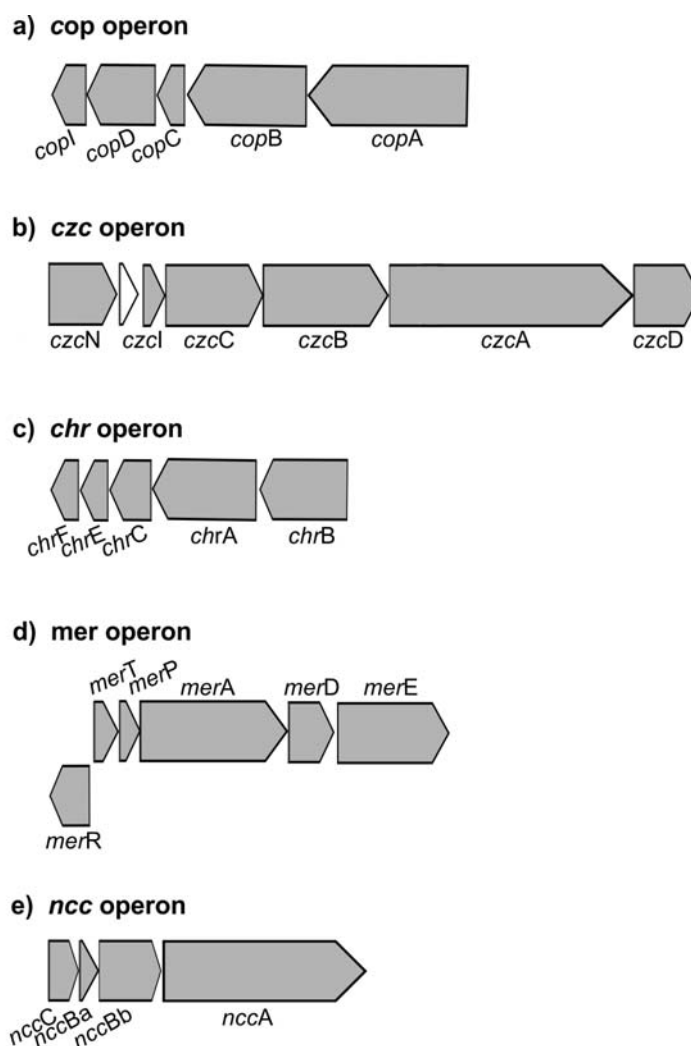
f) *Promena osetljivosti ćelijskih komponenti na teške metale*

Neki mikroorganizmi, kao što su *E. coli* i *Pseudomonas* sp., se adaptiraju na prisustvo metala tako što utiču na osetljivost ćelijskih komponenti, što zapravo predstavlja prirodnu toleranciju (Rouch *et al.*, 1995). Tolerancija se postiže mutacijama koje smanjuju osetljivost ćelijskih komponenti na metale ali ne utiču na njihovu funkciju, ili pak povećanjem produkcije određene ćelijske komponente na koju bi prisustvo metala moglo nepovoljno da utiče.

Tolerancija na teške metale je često povezana sa rezistencijom na antibiotike (Belliveau *et al.*, 1991), i obe se, često zajedno, mogu prenositi među mikroorganizmima putem konjugacije ili transdukcije. Geni koji kodiraju rezistencije na veliki broj teških metala mogu biti locirani na bakterijskim hromozomima, plazmidima i transpozonima. Tolerancija na esencijalne teške metale je uglavnom kodirana genima na hromozomima. Mehanizmi tolerancije zasnovani na efluksu toksičnih jona najčešće su kodirani genima lociranim na plazmidima (Bruins *et al.*, 2000).

1.3.1. *Cupriavidus metallidurans* CH34 – model organizam za proučavanje bakterijskog odgovora na prisustvo teških metala

Cupriavidus metallidurans CH34, soj ranije poznat kao *Alcaligenes eutrophus* a zatim kao *Ralstonia eutropha*, je Gram-negativna bakterija izolovana iz otpadnih voda fabrike cinka u Belgiji, tačnije iz mulja koji je bio kontaminiran visokim koncentracijama nekoliko teških metala (Mergeay *et al.*, 1985). Ovaj zemljišni mikroorganizam poseduje veliki broj gena odgovornih za rezistenciju na teške metale, što ga čini dobrim model organizmom za proučavanje odgovora bakterija na kontaminaciju teškim metalima (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz genskih operona odgovornih za rezistenciju na Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} i Hg^{2+} kod soja *Cupriavidus metallidurans* CH34.

Do danas nije otkrivena ni jedna druga bakterija sa tolikim brojem genetičkih determinanti za rezistenciju na teške metale. Genom *C. metallidurans* CH34, koji čine dva hromozoma i dva megaplazmida (pMOL28 and pMOL30), sekvenciran je i detaljno analiziran (Mergeay *et al.*, 2003). Mnoge genetičke determinante rezistencije na metale povezane su sa transpozonima, što i objašnjava kako je ovaj mikroorganizam stekao fenotip tolerancije na metale (Monsieurs *et al.*, 2011).

Mehanizmi tolerancije na nikel, kadmijum, hrom, bakar i živi biće detaljnije opisani u sledećim odeljcima, s obzirom da su ovi metali i genetičke determinante njihove rezistencije bili tema ove studije.

1.3.2. Tolerancija na bakar

Iako je bakar neophodan kao kofaktor mnogih enzima, lakoća sa kojom ovaj teški metal interaguje sa radikalima čini ga veoma toksičnim (Nies, 1999). Stoga je koncentracija bakra unutar eukariotskih i prokariotskih ćelija veoma dobro regulisana, i mehanizmi tolerancije na bakar postoje u svim živim organizmima. Genetičke determinante tolerancije na bakar mogu se naći kako na hromozomima tako i na plazmidima bakterija.

Za toleranciju *C. metallidurans* CH34 na bakar odgovoran je *cop* operon (Slika 8 a). CopA je multi bakar oksidaza, periplazmatični protein koji poseduje region bogat metionima, za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u vezivanju bakra (Wernimont *et al.*, 2003). Multi bakar oksidaze obezbeđuju toleranciju na bakar na dva načina. Jedna mogućnost je da multi bakar oksidaze sprečavaju unošenje Cu^+ u citoplazmu oksidujući ga do Cu^{2+} , oblika koji se ne unosi u ćeliju. Dodatno, oksidacijom Cu^+ do Cu^{2+} sprečava se nastanak oksidativnih oštećenja u citoplazmi (Grass and Rensing, 2001). Druga mogućnost je da se multi bakar oksidaze sekretuju u periplazmatični prostor sa već vezanim bakrom. U ovom slučaju sinteza i sekrecija ovih proteina dovela bi to efluksa bakra iz citoplazme. Međutim, poznato je na primeru *Pseudomonas syringae* da jedan molekul CopA može da veže približno 11 atoma bakra (Cha and Cooksey, 1991), te je malo verovatno da je samo efluks bakra obezbeđen na ovaj način dovoljan da obezbedi toleranciju na bakar. Verovatnije je da je za potpunu toleranciju na bakar neophodno uključivanje oba mehanizma.

CopA multi bakar oksidaza homologna je multi bakar oksidazama bakterija *P. syringae* – CopA i *E. coli* – PcoA, koje su takođe kodirane genima na plazmidima (Grass and Rensing, 2001). *E. coli* poseduje i dva mehanizma tolerancije na bakar kodirana genima lociranim na hromozomu, a za jedan od tih mehanizama odgovoran je CueR protein, koji reguliše dva gena: *copA* koji kodira ATP-azu P tipa i *cue* koji kodira CueO multi bakar oksidazu (Grass and Rensing, 2001). CueO multi bakar oksidaza homologna je multi bakar oksidazama CopA *C. metallidurans* CH34, CopA *P. syringae* i PcoA *E. coli* (Grass and Rensing, 2001). Dok su CopA *C. metallidurans* CH34, CopA *P. syringae* i PcoA *E. coli* u velikoj meri međusobno identični i verovatno imaju slične funkcije, stepen sličnosti između ova tri proteina i CueO je znatno manji, što ukazuje da su u daljoj vezi.

1.3.3. Tolerancija na kadmijum

Kadmijum je neesencijalni metal koji je toksičan čak i u malim koncentracijama. U bakterijsku ćeliju ulazi preko transportnog sistema za dvovalente jone. Kada se nađe u ćeliji, kadmijum se može vezati za sulfhidrilne grupe na esencijalnim proteinima, narušavajući na taj način važne ćelijske funkcije i uzrokujući jednolančane prekide DNK (Nies, 1992).

Tolerancija na kadmijum može se ostvariti svim prethodno navedenim mehanizmima, osim enzimskom detoksifikacijom. Naime, enzimskom redukcijom kadmijuma nastaje oblik koji je nestabilniji i toksičniji, i koji ne napušta bakterijsku ćeliju, već podleže oksidaciji do prvobitnog stanja (Nies, 1992). Geni koji kodiraju determinante tolerancije na kadmijum mogu biti locirani na hromozomima, plazmidima ili transpozonima. Najpoznatiji mehanizam tolerancije na kadmijum je uklanjanje kadmijuma iz ćelija efluks pumpama.

Najbolje opisani efluks sistemi, kodirani genima na plazmidima, su: *czc* sistem *C. metallidurans* CH34 kao primer Gram-negativnih bakterija i *cad* sistem *S. aureus* kao primer Gram-pozitivnih bakterija. Pored ova dva, postoji i treći efluks sistem, kodiran genima na hromozomu.

Czc efluks sistem funkcioniše kao cink-proton antiporter, uklanja jone kadmijuma, cinka i kobalta i ne zavisi od ATP molekula (Nies, 1992). Operon *czc* prvobitno je okarakterisan u

C. metallidurans CH34 i čine ga 6 gena: *czcA*, *czcB*, *czcC*, *czcD*, *czcI* i *czcN*, koji su locirani na plazmidu pMOL30 (Slika 8 b). Četiri gena, *czcA*, *czcB*, *czcC* i *czcD*, kodiraju proteine koji čine efluks pumpu. CzcA protein jedini ima sposobnost formiranja membranskog tunela u unutrašnjoj membrani bakterijske ćelije, što ga čini esencijalnim za transport katjona (Nies, 1992). Iako ne poseduje mesta za vezivanje ATP-a, CzcA može samostalno da omogući spori transport kadmijuma kroz membranu, obezbeđujući na taj način toleranciju. Produkti *czcB* i *czcC* gena se najverovatnije nalaze u periplazmatičnom prostoru. Dok CzcB ima ulogu u vezivanju jona, CzcC najverovatnije ima ulogu u izmeni supstrata (kadmijum, cink i kobalt) za efluks pumpu i u formiranju otvora u spoljašnjoj membrani za transport katjona metala. Produkt *czcD* gena je uključen u aktivaciju efluks sistema. Funkcije *czcI* i *czcN* još uvek nisu rasvetljene. Ukratko, mehanizam efluksa kadmijuma podrazumevao bi izbacivanje metala iz citoplazme pomoću CzcA, transfer metala od unutrašnje do spoljašnje membrane bez kontakta sa periplazmom pomoću CzcB, i izbacivanje metala u spoljašnju sredinu pomoću CzcC (Bruins *et al.*, 2000).

1.3.4. Tolerancija na hrom

Hromat (Cr^{6+}), kao toksičnija forma hroma, ulazi u bakterijsku ćeliju putem transportnog sistema za sulfate. Tolerancija na hromat zasnovana je na dva mehanizma: redukciji hromata do trovalentnog hroma (Cr^{3+}) u aerobnim i anaerobnim uslovima, i efluksu.

C. metallidurans CH34 obezbeđuje toleranciju na hromat produktom *chrA* gena koji se nalazi na pMOL28 plazmidu i koji je konstitutivno eksprimiran (Slika 8 c). ChrA je membranski protein koji je odgovoran za smanjeni unos hromata u ćeliju, bilo direktno smanjivanjem prvobitnog unosa, ili aktivnim efluksom hromata kroz ćelijsku membranu, što je verovatnije. Pored *chrA* gena, na pMOL28 plazmidu *C. metallidurans* CH34 nalazi se i *chrB* gen čija funkcija još nije rasvetljena, ali se zna da je neophodan kako bi se postigla maksimalna tolerancija na hromat. ChrB može imati ili ulogu u aktivaciji ChrA efluks sistema ili pak u redukciji heksavalentnog hroma pre izbacivanja putem ChrA efluks pumpe (Aguilar-Barajas *et al.*, 2008). *chrA* gen se nalazi i na pMU505 plazmidu *P. aeruginosa*. ChrA *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* pokazuju 29% identičnosti na nivou aminokiselinske sekvence, ali njihovi geni nisu pokazali sposobnost međusobne

hibridizacije, bez obzira na to što im je funkcija veoma slična. I *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* poseduju još po jedan otvoreni okvir čitanja (ORF od eng. Open Reading Frame) u okviru *chr* operona. Identičnost aminokiselinskih sekvenci ova dva ORF-a je 53%, funkcija je još uvek nepoznata ali se zna da nije neophodan za toleranciju na hrom (Badar, 2003).

Prvi mikroorganizam kod kojeg je detektovana tolerancija na hromat je *Pseudomonas fluorescens* LB300, kod kog je tolerancija obezbeđena redukcijom hromata. Mora se uzeti u obzir da ovaj mehanizam tolerancije omogućava samo privremeno oslobađanje od toksične forme hroma, s obzirom da se u fiziološkim uslovima konstantno odvijaju oksido-redukcione reakcije kojima hrom prelazi iz jedne forme u drugu (Weast, 1984). Trajnije rešenje problema kontaminacije hromom nude biljke, u čijim korenovima se hromat odmah redukuje do Cr³⁺ oblika, koji se retko transportuje dalje u izdanke, što bi značilo da je upotreba fitoremedijacije u ovom slučaju za uklanjanje Cr⁶⁺ bolja opcija u odnosu na mikrobiološku bioremedijaciju.

1.3.5. Tolerancija na živu

Živa manifestuje svoje toksično delovanje vezivanjem i inaktivacijom esencijalnih tiola, koji su delovi proteina (Bruins *et al.*, 2000). Tolerancija na ovaj teški metal se obezbeđuje enzimskom redukcijom žive i kod nekih bakterija su geni odgovorni za toleranciju grupisani u *mer* operon (Slika 8 d) (Misra, 1992). *merA* gen kodira enzim reduktazu žive. Ovaj enzim je homodimer i specifičan je za jone žive, tako da ne oksiduje i ne redukuje ni jedan drugi teški metal. U okviru *mer* operona, uzvodno od *merA* nalaze se i geni za transportne proteine, *merC*, *merP* i *merT*. Najviše proučavani region *mer* operona je svakako *merR* gen, koji kontroliše regulaciju čitavog operona produkcijom MerR proteina. Kod nekih bakterija, kao što su *S. aureus* i neke vrste rodova *Pseudomonas* i *Bacillus* (Chien *et al.*, 2010), u okviru *mer* operona postoji i *merB* gen, lociran nizvodno od *merA*, koji kodira monomerni enzim liazu žive, sa širokim spektrom substrata na koje deluje (Misra, 1992).

1.3.6. Tolerancija na nikl

Nikl ulazi u ćelije bakterija i *Saccharomyces cerevisiae* uglavnom putem CorA sistema (Hmiel *et al.*, 1989). Kod *C. metallidurans* CH34 detektovan je dodatni transporter nikla u ćelije, prototip HoxN transportnih proteina (Eberz *et al.*, 1989). Tolerancija bakterije *C. metallidurans* CH34 na nikl je obezbeđena efluksom pomoću familije RND efluks pumpi. Opisana su dva sistema: Cnr, koji obezbeđuje toleranciju na nikl i kobalt (Liesegang *et al.*, 1993), i Ncc sistem koji obezbeđuje visok nivo tolerancije na nikl, kobalt i kadmijum (Slika 8 e) (Schmidt and Schlegel, 1994). Produkti gena *ncc* lokusa pokazuju veliku sličnost sa proteinima *czc* lokusa, koji je opisan u odeljku 1.3.3. i *cnr* lokusa (Schmidt and Schlegel, 1994).

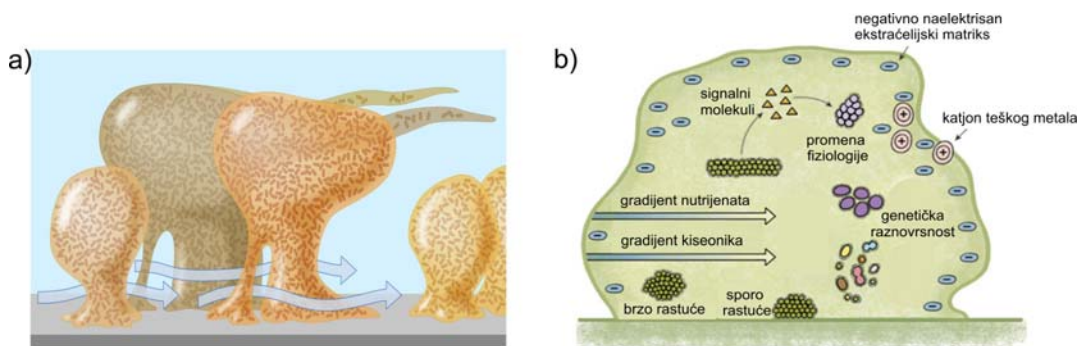
1.4. Bakterijski biofilmovi

Biofilmovi bi se mogli definisati kao kompleksne zajednice mikroorganizama vezanih za različite površine i obično obloženih vanćelijskim matriksom koji sami proizvode (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009) (Slika 9 a). Biofilmovi se mogu sastojati od populacije jedne bakterijske vrste ili od više vrsta mikroorganizama, što je češći slučaj. Sposobnost formiranja biofilma je univerzalna osobina bakterija i moguće je da se razvila usled toga što pruža ekološku prednost u preživljavanju. Iako je nekada važno da mikroorganizmi žive kao usamljeni entiteti, danas se biofilmovi smatraju zastupljenijim oblikom života mikroorganizama i mogu nastati u prirodnom, medicinskom i industrijskom okruženju (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Formiranje biofilma na medicinskim uređajima, kao što su kateteri ili implantati, često uzrokuje hronične infekcije kod ljudi koje je teško lečiti (Donlan, 2008). Takođe, bakterijski biofilmovi se mogu formirati i na zubima ljudi, koži ili pak u urinarnom traktu. Formiranjem biofilma, mikroorganizmi stiču značajne prednosti, kao što je tolerancija na mnoga toksična jedinjenja poput teških metala i antibiotika, kao i zaštita od odbrambenih mehanizama domaćina (Anderson and O'Toole, 2008). Smatra se da je za prednosti koje biofilmovi poseduju u odnosu na slobodnoživeće forme života odgovoran proces ćelijske specijalizacije koji se odvija u biofilmu i koji je analogan procesu diferencijacije kod višećelijskih organizama (Purevdorj-Gage *et al.*, 2005).

1.4.1. Bakterijski biofilmovi i tolerancija na teške metale

Strukturu i funkcionisanje biofilma najbolje je opisati kroz mehanizme kojima biofilmovi ostvaruju povećanu toleranciju na teške metale u odnosu na slobodnoživeće ćelije. Efekat teških metala na bakterijski biofilm se razlikuje od uticaja antibiotika i ostalih nepovoljnih uticaja životna sredine, s obzirom da različiti teški metali ostvaruju svoj toksični efekat različitim biohemijskim putevima. S obzirom da biofilmovi mogu imati primenu u bioremedijaciji zagađenja teškim metalima, proučavanju povećane tolerancije biofilмова na metale posvećena je velika pažnja (Harrison *et al.*, 2007).

Nekoliko različitih faktora odgovorno je za povećanu toleranciju biofilma na teške metale u poređenju sa slobodnoživećim ćelijama (Slika 9 b).



Slika 9. Shematski prikaz bakterijskog biofilma. a) bakterijske ćelije obložene vanćelijskim matriksom i b) neki od faktora koji utiču na toleranciju biofilma na teške metale. (Sheme su preuzete i prerađene iz rada (Kovaleva *et al.*, 2013) i sa sajta www.biotechnologyforums.com).

Bakterijske ćelije u biofilmu su obložene vanćelijskim matriksom koji same produkuju i koji se sastoji od DNK, RNK, proteina i polisaharida. Postojanje vanćelijskog matriksa, ometa difuziju jona metala kroz biofilm, štiteći na taj način bakterije u biofilmu od štetnog dejstva metala (Teitzel and Parsek, 2003). Međutim, vanćelijski matriks ometa i difuziju manjih molekula (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009), tako da je unutar biofilma difuzija nutrijenata, kiseonika i metabolita sporija, što dovodi do formiranja metaboličkog gradijenta kroz biofilm. Ovakav gradijent utiče na stopu rasta bakterijskih ćelija, tako da u biofilmu mogu postojati ćelije u različitim fiziološkim stadijumima rasta. Bakterije koje su

najbliže površini za koju je biofilm vezan, su u zoni bez kiseonika i sporo rastu, za razliku od bakterijskih ćelija u spoljašnjim aerobnim slojevima biofilma, koje rastu brže (Walters III *et al.*, 2003). Sporo rastuće bakterije zbog odsustva kiseonika imaju smanjenu produkciju kiseoničnih reaktivnih vrsta, i drugačiju fiziologiju, stoga su tolerantnije na prisustvo teških metala. Metabolička heterogenost prisutna u bakterijskom biofilmu povećava produkciju sekundarnih metabolita (antibiotici, pigmenti) koji imaju ulogu signalnih molekula koji iniciraju ili pak inhibiraju proces formiranja biofilma. Među krajnjim produktima metabolizma mikroorganizama nalaze se i razna jedinjenja koja mogu da interaguju sa jonima metala i precipitiraju ih, čime sprečavaju metale da dospeju do bakterijskih ćelija. Ulogu mrtvih bakterijskih ćelija, prisutnih u ukupnoj populaciji biofilma, u toleranciji na teške metale ne treba zanemariti. Naime, mrtve ćelije su značajna biomasa koja omogućava biosorpciju teških metala i njihovu precipitaciju, čime štiti žive ćelije od toksičnog dejstva metala.

S obzirom na sve veći ekološki problem kontaminacije teškim metalima i mogućnost upotrebe biofilmova u remedijaciji zagađenih sredina, nije neobično što biofilmovi i dalje predstavljaju predmet istraživanja velikog broja studija, sa ciljem što boljeg razumevanja strukture i funkcije ove višećelijske zajednice mikroorganizama.

2. CILJEVI

Teški metali predstavljaju česte zagađivače životne sredine, pre svega zemljišta i sedimenata. Uobičajene fizičko-hemijske metode koje se koriste za uklanjanje teških metala iz životne sredine često su neefikasne, mogu biti veoma skupe, najčešće stvaraju veliku količinu toksičnih intermedijera i remete prirodne procese u sredini. Bioremedijacija, biološka metoda koja podrazumeva upotrebu mikroorganizama u svrhu uklanjanja zagađivača, mogla bi predstavljati metodu izbora kako sa ekološkog tako i sa ekonomskog stanovišta. Do danas je opisan veliki broj bakterija sa sposobnošću tolerancije prisustva pojedinačnih teških metala, međutim životna sredina je obično zagađena smešom različitih teških metala kao i drugih organskih i neorganskih zagađivača. Formiranje biofilмова kod bakterija povećava toleranciju na kompleksna zagađenja životne sredine. Stoga, potencijal izolata za primenu u bioremedijaciji i bioluženju zavisi od njihove sposobnosti da tolerišu istovremeno prisustvo različitih teških metala i da formiraju biofilm, što je predmet ove studije.

Sveobuhvatni cilj ovog rada je izolacija, identifikacija, analiza diverziteta i aplikativnog potencijala novih bakterijskih sojeva sa sposobnošću tolerancije visokih koncentracija teških metala iz sedimenata iz rudnika bakra Bor u cilju njihove primene u bioremedijaciji i bioluženju.

2.1. Specifični ciljevi rada

- uzorkovanje i analiza površinskog i podzemnog sedimenta iz rudnika bakra Bor;
- analiza mikrobiološkog diverziteta u sedimentima iz rudnika bakra Bor upotrebom metagenomskog pristupa i tradicionalne izolacije i kultivacije bakterijskih sojeva;
- izolovanje i selekcija bakterija sa sposobnošću tolerancije prisustva visokih koncentracija teških metala;
- poređenje izolovanih bakterija sa referentnim sojevima iz literature i tolerantnim sojevima iz laboratorijske kolekcije;
- selekcija bakterijskih izolata sa sposobnošću formiranja biofilma;

- selekcija bakterijskih izolata koji poseduju gene za determinante tolerancije na teške metale;
- detaljnija karakterizacija mehanizama tolerancije izolata na prisustvo teških metala: selekcija izolata i bakterijskih biofilmova sa sposobnošću istovremene tolerancije prisustva visokih koncentracija različitih teških metala;
- analiza uticaja bakterijskih biofilmova na *in vitro* proces bioluženja jalovine uz pomoć *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje i hemijska analiza sedimenata iz rudnika bakra

U ovom radu su korišćeni uzorci sedimenata prikupljeni u junu 2010. godine iz dva rudnika bakra u okviru rudarsko-topioničarskog basena Bor (RTB Bor). RTB Bor se nalazi u istočnoj Srbiji (44°04'53,09" N; 22°05'54,90" E) i jedan je od najvećih rudnika bakra u Evropi. Jedan uzorak sedimenta je prikupljen iz rudnika bakra sa površinskom eksploatacijom (MS), dok je drugi prikupljen iz rudnika sa podzemnom eksploatacijom (MU). Uzorci su uzeti sa 1-10 cm dubine sedimenta (100 g) u triplikatu, nakon čega su kombinovani kako bi se dobio reprezentativan uzorak svakog sedimenta. Uzorci su čuvani na 4°C do hemijske analize i izolacije bakterija.

3.1.1. Osnovna mikroanaliza sedimenata

Deo uzorka sedimenta (1 g vlažne mase) resuspendovan je u 9 ml destilovane vode i pH vrednost tako napravljenog rastvora je izmerena pH-metrom HI 9321 (Hanna Instruments, Roud Ajland, SAD). Postotak vlažnosti u uzorku sedimenta je određen iz razlike vlažne i suve mase sedimenta koja je izmerena nakon sušenja 1 h na 100°C.

Standardna mikroanaliza je urađena iz alikvota uzorka (5 g) koji je u potpunosti osušen (60 min, 100°C) korišćenjem Vario EL III aparata za elementalnu analizu (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Nemačka; Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu). Mikroanaliza je zasnovana na modifikaciji i primeni klasičnog Pregl – Dumas metoda (Patterson, 1973). Alikvot osušenog uzorka (1 mg) je automatizovanim procesom ubačen u kapsulu koja je potom prenetu u vertikalnu kvarcnu tubu za sagorevanje, pri čemu je sistem održavan na temperaturi od 1020°C, sa konstantnim protokom helijuma. Po ubacivanju uzorka u vertikalnu kvarcnu tubu, helijum je povremeno obogaćivan čistim kiseonikom. U prisustvu kiseonika i reagenasa za sagorevanje uzorak je u potpunosti sagoren i redukovan do osnovnih gasova: CO₂, H₂O, N₂ i SO₂. Proizvodi sagorevanja su potom propuštani kroz zonu kontrole gasa u kojoj je dolazilo do njihovog mešanja. Odnos gasova je održavan pri

konstantnom pritisku, zapremini i temperaturi. Nakon ove homogenizacije gasovi su razdvajani frontalnom hromatografijom, eluirani i izmereni uz pomoć detektora termalne provodljivosti. Sva merenja su urađena u duplikatu.

3.1.2. Određivanje prisustva teških metala u uzorcima sedimenata

Za utvrđivanje koncentracije metala osušeni uzorci oba sedimenta (0,5 g) su digerirani u mikrotalasnoj pećnici Milestone Ethos One (Bergamo, Italija; Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu), u zatvorenim politetrafluoroetilenskim (PTFE od *eng.* Polytetrafluoroethylene) sudovima. Za ekstrakciju metala je korišćena smeša azotne (HNO_3) i hlorovodonične (HCl) kiseline u odnosu 1:3 (v/v), pri čemu je za alikvot uzorka (0,5 g) korišćeno 12 ml ove kiseline. Uzorci su zatim tretirani toplotom korišćenjem sledećeg programa pečenja: 165°C u trajanju od 10 min, potom je temperatura podizana do 175°C u trajanju od 3 min i uzorak je inkubiran na 175°C sledećih 10 min. Nakon toga su uzorci ohlađeni, razblaženi destilovanom vodom do zapremine od 100 ml i prebačeni u volumetrijske sudove. Determinacija koncentracije metala (Zn, Hg, Ni, Pb i Cd) je urađena uz pomoć indukujućeg kuplovanog plazma/optičkog emisionog spektrometra (*eng.* inductively coupled plasma/optical emission spectrometer - ICP/OES) THERMO iCAP 6500 Duo (Thermo Fisher Scientific, Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo; Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu). Kao eksterni standardi su korišćeni rastvori metala koncentracije 1000 mg l^{-1} . Da bi se smanjio efekat interferencije različitih metala, pripremljen je kalibracioni standard koji je sadržao smešu metala u odnosu koji odgovara odnosu metala u uzorku. I standardi i blank su pripremani u istom matriksu u kom je vršena ekstrakcija metala, čime se umanjivao efekat matriksa i omogućavala korekcija pozadinskog šuma. Sva merenja su urađena u duplikatu.

3.2. Analiza mikrobiološkog diverziteta u sedimentima iz rudnika bakra

3.2.1. Metagenomska analiza

Metagenomska analiza podrazumeva izolovanje totalne DNK prisutne u samom uzorku. Od svojstava uzorka i uslova u kojima se nalazio, transportovao i čuvao, zavisi i uspešnost primene metagenomskog pristupa u analizi mikrobiološkog diverziteta.

3.2.1.1. Izolovanje metagenomske DNK

Metagenomska DNK je izolovana iz uzoraka površinskog (MS) i podzemnog (MU) sedimenta iz rudnika bakra Bor. Za izolaciju metagenomske DNK su korišćene dve metode, jedna zasnovana na tretiranju uzorka mikrotalasima (Orsini and Romano-Spica, 2001) a druga zasnovana na upotrebi MoBio PowerSoil komercijalnog kita (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, Kalifornija, SAD). Dobijena DNK je vizualizovana korišćenjem agarozne (0,6%, w/v) gel elektroforeze (odjeljak 3.5.1.), dok su kvalitet i kvantitet izolovane DNK utvrđeni spektroskopski očitavanjem apsorbancije $A_{260/280}$ (NanoVue, GE Healthcare, Bakinghemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Izolovanje metagenomske DNK korišćenjem mikrotalasne pećnice

Svež uzorak sedimenta (0,5 g) resuspendovan je u puferu (500 μ l; 0,8% (w/v) NaCl; 0,02% (w/v) KCl; 0,144% (w/v) Na_2HPO_4 i 0,024% (w/v) KH_2PO_4 ; pH 8) u mikro epruveti zapremine 1,5 ml i centrifugiran (1 min, 5 600 \times g, Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg, Nemačka). Supernatant je odliven a pelet je resuspendovan u puferu za ispiranje (1 ml; 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 25 mM EDTA, pH 8 (*eng.* Ethylenediaminetetraacetic acid); 0,1% (w/v) SDS (*eng.* Sodium Dodecyl Sulfate) i 0,1% (w/v) PVP (*eng.* Polyvinylpyrrolidone)). Nakon centrifugiranja (1 min, 5 600 \times g, Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg, Nemačka) i odstranjivanja supernatanta, pelet je tretiran puferom za lizu (350 μ l; 50 mM Tris-HCl, pH 8; 25 mM EDTA, pH 8; 3% (w/v) SDS i 1,2% (w/v) PVP) i mikrotalasima u mikrotalasnoj pećnici 45 s na 600-700 W (Panasonic NN-E442W, Panasonic, London, Ujedinjeno Kraljevstvo). Potom je u uzorak dodat rastvor za ekstrakciju (400 μ l; 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8; 0,3 M natrijum acetat i

1,2% (w/v) PVP) koji je prethodno temperiran na 65°C. DNK je prečišćena dodavanjem jednake zapremine (750 µl) rastvora fenol:hloroform:izoamil alkohola (25:24:1, Sigma-Aldrich, St Louis, Misuri, SAD), nakon čega je uzorak dobro promešan i centrifugiran (5 min, 15 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg, Nemačka). Vodena faza je prebačena pipetom sa širokim vrhom u čistu mikro epruvetu zapremine 2 ml i korak prečišćavanja je ponovljen. Potom je u uzorak dodata jednaka zapremina hloroforma i nakon mešanja invertovanjem 5-10 puta, uzorak je centrifugiran (5 min, 15 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg, Nemačka). Nakon prebacivanja gornje vodene faze u čistu mikro epruvetu zapremine 1,5 ml, dodata je jednaka zapremina izopropanola i uzorak je jedan put invertovan i potom inkubiran 5 min na ambijentalnoj temperaturi a zatim centrifugiran (30 min, 20 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Nemačka). DNK talog je opran 70% (v/v) etanolom (500 µl) i osušen strujanjem vazduha, a zatim je DNK rastvorena u TE puferu (1 mM Tris-HCl, pH 7,5 i 0,1 mM EDTA, pH 8).

Izolovanje metagenomske DNK korišćenjem komercijalnog „MoBio Power Soil“ kita

Metagenomska DNK je izolovana iz uzorka sedimenta (0,25 g) korišćenjem komercijalnog kita MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, Kalifornija, SAD), prateći protokol proizvođača. MoBio PowerSoil DNA Isolation kit se zasniva na patentiranoj tehnologiji koja se temelji na intenzivnoj homogenizaciji i mešanju uzorka sa staklenim komadićima određene veličine i oštine ivica. Ovako homogenizovan uzorak se dalje lizira upotrebom kako mehaničkih tako i hemijskih metoda. Prednost ovog komercijalnog kita je što i efikasno uklanja inhibitore prisutne u uzorku, tako da je izolovana DNK obično čista i spremna za dalju upotrebu.

3.2.1.2. Konstrukcija 16S rDNK biblioteka

U ovom radu konstruisane su dve 16S rDNK biblioteka: MS i MU. Jednu biblioteku čine klonovi sa 16S rDNK fragmentima umnoženim iz metagenomske DNK površinskog sedimenta (MS), dok drugu biblioteku čine klonovi sa 16S rDNK fragmentima umnoženim iz metagenomske DNK podzemnog sedimenta (MU).

Umnožavanje gena za 16S rRNK

Kako bi se umnožili geni za 16S rRNK iz uzoraka metagenomske DNK korišćena je reakcija lančane polimerizacije (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR), koja se zasniva se na tri procesa koji se sukcesivno ponavljaju: *in vitro* denaturacija dvolančane DNK matrice, hibridizacija (aniling od *eng.* annealing) prajmera sa matricom na osnovu komplementarnosti baza i ekstenzija prajmera DNK polimerazom (White, 1997). Tokom ove studije za sintezu DNK u reakciji lančane polimerizacije korišćen je aparat GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, Foster City, Kalifornija, SAD). U PCR reakcijama je korišćen KAPA Hifi PCR kit (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, Masačusets, SAD), po uputstvu proizvođača, univerzalni bakterijski prajmeri 27f (5'AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3') i 1492r (5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD) (Lane, 1991) i sledeći program: jedan ciklus inicijalne denaturacije (5 min, 95°C); 35 ciklusa denaturacije (20 s, 98°C), anilinga prajmera (15 s, 60°C) i elongacije (1 min, 72°C); finalna elongacija (5 min, 72°C). Umnoženi 16S rDNK fragmenti su prečišćeni upotrebom QIAquick PCR Purification kita (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka).

Kloniranje gena za 16S rRNK

Za kloniranje prečišćenih 16S rDNK fragmenata korišćen je vektor pCR®-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD). Ligaciona smeša (10 µl) je sadržala 1 × ligacioni pufer, 4 U T4 DNK ligaze, 20 ng vektora i 350 ng umnoženog i prečišćenog DNK fragmenta. DNK fragment i vektor su prvo odvojeno inkubirani 5 min na 50°C, a zatim dodati u ligacionu smešu i inkubirani 1 h vremena na ambijentalnoj temperaturi, a potom 12 h na 4°C.

Priprema kompetentnih Escherichia coli ćelija i elektroporacija

Ligacionom smešom transformisane su *Escherichia coli* DH5α ćelije (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD). Elektrokompentne *E. coli* ćelije pripremane su za jednokratnu upotrebu. Ćelije su gajene u LB (*eng.* Luria Broth) hranljivoj podlozi (10 g l⁻¹ baktotriptonu, 10 g l⁻¹ NaCl i 5 g l⁻¹ kvašćevog ekstrakta), na 37°C u orbitalnom šejkeru uz mešanje od 180 obrt min⁻¹, do apsorbancije 0,9 na 600 nm (A₆₀₀, GeneQuant pro,

Amersham Biosciences, Bakinghemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo). Nakon toga ćelijski rast je zaustavljen hlađenjem kulture (30 min, 4°C). Ohlađena kultura je taložena (10 min, $3\ 000 \times g$, 4°C, Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka) i ćelije iz taloga su dva puta isprane resuspendovanjem u jednakoj zapremini hladne sterilne vode. Posle poslednjeg centrifugiranja i odbacivanja supernatanta, ćelije su pažljivo resuspendovane u zaostaloj vodi. Alikvoti (50 μ l) ovako dobijene ćelijske suspenzije odmah su korišćeni za transformaciju. Zapremina ligacione smeše dodavana u ćelijsku suspenziju bila je 1 μ l. Suspenzija ćelija sa ligacionom smešom inkubirana je 5 min na ledu, a zatim je dodata u ohlađenu kivetu za elektroporaciju razmaka 0,1 cm (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD). Elektroporacija je vršena pri parametrima: 1,8 kV, 25 mF, 200 Ω (Gene Pulser, BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD). Po primenjenom strujnom impulsu u kivetu je odmah dodat 1 ml SOC medijuma (20 g l⁻¹ bakto-triptona; 5 g l⁻¹ kvašćevog ekstrakta; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄ i 20 mM glukoza, pH 7,5) (Hanahan, 1983). Suspenzija ćelija je oživljavana inkubiranjem 1,5 h na 37°C uz umereno mešanje, zatim zasejavana na čvrstu LB podlogu (15 g l⁻¹ agara u LB) sa dodatkom kanamicina (50 μ g ml⁻¹; Sigma-Aldrich, St Louis, Misuri, SAD) i inkubirana na 37°C do pojave transformanata (24-48 h).

3.2.1.3. Analiza 16S rDNK biblioteka

Transformanti (odeljak 3.2.1.2.) su presejani na svežu LB podlogu razlivenu u Petri šolje koje su bile obeležene mrežom, što je omogućilo numeričko obeležavanje transformanata.

Provera klonova PCR analizom

Kako bi se detektovali klonovi kod kojih je ukloniran fragment odgovarajuće dužine (1465 bp), transformanti (odeljak 3.2.1.2.) su proveravani PCR reakcijom iz pojedinačne kolonije uz pomoć KAPA2G Robust HotStart ReadyMix Kit-a (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, Masačusets, SAD) po uputstvu proizvođača, koristeći kao matricu DNK izolovanu iz pojedinačne kolonije upotrebom KAPA Express Extract kita (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, Masačusets, SAD). Fragmenti su umnoženi korišćenjem M13 univerzalnih prajmera (M13-F (-20): 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3', M13-R: 5'-CAGG AAACAGCTATGAC-3') (Messing, 1983) i sledećeg programa: jedan ciklus inicijalne

denaturacije (3 min, 95°C); 35 ciklusa denaturacije (15 s, 95°C), anilinga prajmera (15 s, 60°C) i elongacije (15 s, 72°C); finalna elongacija (10 min, 72°C).

Izolovanje plazmidne DNK i restrikciona analiza

E. coli transformanti, koji su PCR proverom pokazali prisustvo fragmenta odgovarajuće dužine, gajeni su 12 h u LB medijumu (5 ml) sa dodatkom kanamicina (50 µg ml⁻¹) u orbitalnom šejkeru (37°C, 180 obrt min⁻¹). Izolacija plazmida je rađena pomoću QIAprep Spin Miniprep kita (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Za analizu klonova korišćena je ARDRA/RFLP metoda (*eng.* Amplified Ribosomal DNA Restiction Analysis/Restriction Fragment Lenght Polymorphysm), koja podrazumeva sečenje plazmida restrikcionim enzimima i njihovo grupisanje u operativne taksonomske jedinice OTU (*eng.* Operational Taxonomic Unit) na osnovu profila elektroforetske pokretljivosti na agaroznom gelu (odeljak 3.5.1.). ARDRA analiza je rađena sa enzimom *RsaI* i odgovarajućim "Tango" puferom (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). Smeša za digestiju (10 µl), koja je sadržala 1 U *RsaI* enzima, 1 × "Tango" pufer i 300 ng plazmida, inkubirana je 3 h na 37°C. Nakon digestije čitava reakciona smeša je nanošena na agarozni gel i fragmenti analizirani kao što je opisano u odeljku 3.6.1.

Taksonomska analiza klonova

Klonovi 16S rDNK biblioteka taksonomski su identifikovani na osnovu sekvenciranja dela gena za 16S rRNK (odeljak 3.6.2.). Geni za 16S rRNK umnoženi su korišćenjem izolovanih plazmida (odeljak 3.2.1.3.) kao matrice i univerzalnih bakterijskih prajmera (odeljak 3.2.1.2.). Sekvencirano je 500 bp dobijenih PCR proizvoda, a dobijene sekvence su analizirane i preklapane u DNA Star SeqMan Pro softveru (DNASTAR, Inc., Madison, Viskonsin, SAD) i identifikovane pomoću BLASTN algoritma (Altschul *et al.*, 1997). Za pretraživanje sličnih sekvenci deponovanih u GenBank bazi podataka korišćen je BLASTN program na NCBI serveru.

3.2.2. Izolovanje i gajenje bakterija iz uzoraka sedimenata metodom direktne kultivacije

Bakterije su metodom direktne kultivacije izolovane iz svežih uzoraka sedimenata korišćenjem dve čvrste podloge: 9K (ime podloge potiče od koncentracije jona gvožđa u podlozi koja iznosi 9000 mg l^{-1}) (Silverman and Lundgren, 1959) i Tornton-glukoza podloge (TG) (Sørheim *et al.*, 1989).

3.2.2.1. Određivanje broja vijabilnih bakterija

Za procenu ukupnog broja vijabilnih bakterija (CFU, eng. Colony Forming Unit) napravljena su serijska razblaženja uzorka sedimenta (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) u fosfatnom puferu (20 mM, pH 7,4) koja su zasejana na čvrstu TG podlogu i nakon 48 h rasta na 30°C prebrojane su izrasle kolonije. Broj bakterijskih ćelija po mililitru uzorka je određivan na sledeći način:

$$\text{CFU ml}^{-1} = \frac{\text{br. poraslih kolonija} \times \text{razblaženje}^{-1}}{\text{zapremina razblaženja}}$$

3.2.2.2. Kultivacija bakterija na 9K podlozi

Čvrsta 9K podloga (pH 3,5) sadržala je: $44,8 \text{ g l}^{-1} \text{ FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $3 \text{ g l}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $0,5 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$; $0,5 \text{ g l}^{-1} \text{ MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $0,1 \text{ g l}^{-1} \text{ KCl}$; $0,01 \text{ g l}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; i 15 g l^{-1} agara. Ovaj hranljivi medijum najčešće se koristi za izolaciju gvožđe-oksidujućih bakterija iz uzoraka koji imaju niže pH vrednosti, kao što su obično uzorci iz rudnika. Svež uzorak sedimenta (1 g) je inkubiran u sterilnom fosfatnom puferu (9 ml; 100 mM, pH 6,5) u orbitalnom šejkeru (12 h, 25°C , 100 obrt min^{-1}). Nakon toga su napravljena serijska razblaženja suspenzije (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) u fosfatnom puferu (20 mM, pH 7,4) koja su zasejana (po 100 μl) na 9K podlogu. Petri šolje su inkubirane 5-15 dana na 30°C .

3.2.2.3. Kultivacija bakterija na Thornton-glukoza podlozi

Minimalnu TG podlogu čine tri komponente: ekstrakt zemljišta, rastvor soli (*eng.* Thornton's salt solution) i glukoza kao izvor ugljenika. Ekstrakt zemljišta je pripreman tako što je u 1,5 l destilovane vode dodato baštensko zemljište (1 kg) i nakon sterilizacije autoklaviranjem (40-50 min, 121°C) ekstrakt je profiltriran, zapremina podešena na 1 l, i ekstrakt ponovo sterilisan autoklaviranjem pod istim uslovima. Rastvor soli je sadržao: 1 g l⁻¹ K₂HPO₄; 5 g l⁻¹ NH₄NO₃; 2 g l⁻¹ MgSO₄ × 7H₂O; 1 g l⁻¹ CaCl₂ × 2H₂O; 1 g l⁻¹ NaCl; 0,1 g l⁻¹ Fe(Cl)₃ × 6H₂O; pH 6,7. Uzorak sedimenta (0,1 g) je resuspendovan u sterilnom fosfatnom puferu (10 ml; 100 mM, pH 6,5) i inkubiran 12 h na 4°C. Napravljena su serijska razblaženja suspenzije (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) u fosfatnom puferu (20 mM, pH 7,4) i zasejana (po 100 µl) na čvrstu TG podlogu (10% (v/v) ekstrakt zemljišta, 10% (v/v) rastvor soli, 1 g l⁻¹ glukoza, 15 g l⁻¹ agar) u koju je dodato 75 mg l⁻¹ cikloheksimida (Sigma-Aldrich, St Louis, Misuri, SAD). Ovako inokulirane Petri šolje su inkubirane 5-15 dana na 30°C, a rast bakterija je proveravan svaki dan. Nakon toga, sve morfološki različite kolonije su presejane na sveže TG podloge i korišćene za dalju karakterizaciju.

Kultivisani sojevi su pripremani za dugoročno čuvanje tako što su alikvoti kultura bakterija (600 µl) gajenih 12 h u odgovarajućem tečnom medijumu mešani sa sterilnim glicerolom (400 µl). Stokovi su čuvani na -80°C.

3.2.2.4. Taksonomska identifikacija kultivisanih bakterija

Taksonomska identifikacija bakterija izolovanih direktnom kultivacijom rađena je na osnovu sekvenciranja 500 bp gena za 16S rRNK (odjeljak 3.6.2.), kao što je opisano u odeljku 3.2.1.3. Kao matrica u reakciji umnožavanja gena za 16S rRNK korišćena je genomski DNK izolovana iz pojedinačnih kolonija upotrebom komercijalnog KAPA Express Extract kita (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, Masačusets, SAD).

3.3. Selekcija i karakterizacija bakterijskih izolata tolerantnih na teške metale

Za ispitivanje tolerancije na teške metale i mehanizme tolerancije (odjeljak 3.4.), pored sojeva izolovanih u ovom radu korišćeni su i sojevi za koje je tolerancija na metale prethodno opisana u literaturi i koji su navedeni u tabeli 2. Sojevi *Rhodococcus* sp. TN101, *Bacillus* sp. TN102, *Rhodococcus* sp. TN113 i *Rhodococcus* sp. TN401 su poreklom iz laboratorijske kolekcije sojeva.

Tabela 2. Poznati sojevi okarakterisani kao tolerantni na teške metale korišćeni u radu.

Bakterijski soj	Referenca
<i>Rhodococcus</i> sp. TN101	(Narancic, 2012)
<i>Bacillus</i> sp. TN102	(Narancic, 2012)
<i>Rhodococcus</i> sp. TN113	(Narancic, 2012)
<i>Rhodococcus</i> sp. TN401	(Narancic, 2012)
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	ATCC 43123
<i>Cupriavidus necator</i> H16	ATCC 23440
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	ATCC 15692
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	ATCC 47054

3.3.1. Sposobnost rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala

Da bi se ispitala sposobnost rasta izolata iz sedimenata rudnika (odjeljak 3.2.2.) u prisustvu teških metala korišćen je MT medijum (*eng. Metal Toxicity*) (Sani *et al.*, 2001). Ovaj medijum je sadržao: 5,1 g l⁻¹ Na-laktata; 2,1 g l⁻¹ Na₂SO₄; 0,06 g l⁻¹ anhidrovanog CaCl₂; 1 g l⁻¹ NH₄Cl; 1 g l⁻¹ MgSO₄; 0,05 g l⁻¹ ekstrakta kvasca; 0,5 g l⁻¹ triptona i 10,9 g l⁻¹ 1,4-piperazindietansulfonske kiseline (PIPES), pH 7. U čvrstu MT podlogu dodavano je 15 g l⁻¹ agara (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nju Džersi, SAD). Ispitana je sposobnost rasta u prisustvu sledećih metalnih jona: Ni²⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺ i Fe³⁺ čije su soli (NiCl₂, CdSO₄, K₂Cr₂O₇, CuSO₄, HgCl₂, ZnCl₂ i FeCl₃; Sigma-Aldrich,

St Louis, Misuri, SAD) dodavane u MT medijum. Korišćene koncentracije su preračunate u odnosu na koncentracije dozvoljene Pravilnikom Ministarstva za zaštitu životne sredine Tabela 1 (EPA/Serbia, 1994) i bile su 20 puta veće od dozvoljenih: 2,2 g l⁻¹ NiCl₂; 111,2 mg l⁻¹ CdSO₄; 11 g l⁻¹ K₂Cr₂O₇; 5 g l⁻¹ CuSO₄; 54 mg l⁻¹ HgCl₂; 12,6 g l⁻¹ ZnCl₂ i 114 mg l⁻¹ FeCl₃. Takođe, testiran je i rast u prisustvu viših koncentracija istih soli, koje odgovaraju 100 mM koncentraciji odgovarajućih metalnih jona što preračunato na količinu soli tih metala iznosi: 12,9 g l⁻¹ NiCl₂; 20,9 g l⁻¹ CdSO₄; 28,5 g l⁻¹ K₂Cr₂O₇; 15,9 g l⁻¹ CuSO₄; 27 g l⁻¹ HgCl₂; 13,6 g l⁻¹ ZnCl₂ i 16,2 g l⁻¹ FeCl₃. Izolati su zasejani na čvrsti MT medijum i inkubirani na 30°C a rast je praćen u toku 5-7 dana.

Krive rasta izolata su određivane u tečnom MT medijumu (Sani *et al.*, 2001). Izolati su prvo gajeni u MT medijumu (5 ml) 12 h na 30°C u orbitalnom šejkeru uz mešanje od 180 obrt min⁻¹, nakon čega je inokulum ove predkulture (2%, v/v) zasejavan u svež MT medijum sa dodatim solima metala. Kulture su gajene 24 h na 30°C uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru, i u određenim vremenskim intervalima uzimani su alikvoti kulture kojima je izmerena apsorbanacija na 600 nm (A₆₀₀, Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences, Bakinghemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo). Koncentracije metala su inkrementalno povećavane po 10 – 20% do dostizanja koncentracija na kojima izolati nisu pokazivali rast.

3.3.2. Taksonomska identifikacija i filogenetska analiza bakterija tolerantnih na teške metale

Kako bi se bakterije koje su pokazale sposobnost rasta u prisustvu teških metala taksonomski identifikovale, prvo su umnoženi geni za 16S rRNK (odjeljak 3.2.1.2.) korišćenjem genomske DNK izolovane iz pojedinačnih kolonija (odjeljak 3.2.2.4.) kao matrice. U ovom slučaju sekvencirano je 1300 bp dobijenih 16S rDNK fragmenata za razliku od taksonomske identifikacije klonova 16S rDNK biblioteka dobijenih metagenomskim pristupom (kada je sekvencirano početnih 500 bp). Sekvence su deponovane u GenBank bazi podataka sa pristupnim brojevima: JX036476 - JX036481.

Dobijene sekvence 16S rRNK gena izolata su korišćene za pronalaženje sličnih sekvenci u okviru Ribosomal Database Project-II Release 10 (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>; (Cole *et*

al., 2009)). Nakon skraćivanja svih sekvenci do jednake dužine rađeno je poređenje sekvenci izolata sa sekvencama tipskih sojeva preuzetih iz RDP baze uz pomoć CLUSTALW algoritma (Thompson *et al.*, 1994). Filogenetska stabla su konstruisana korišćenjem „neighbor-joining“ (NJ) algoritma sa Jukes-Cantor korekcijom udaljenosti (oba algoritma su uključena u PHYLIP programski paket: <http://bioweb2.pasteur.fr/>; (Felsenstein, 1989)). Filogenetsko stablo je ukorenjeno korišćenjem sekvence gena za 16S rRNK *Pseudomonas putida* DSM 291^T.

3.3.3. Sposobnost bakterijskih izolata da formiraju biofilm u mikrotitarskim pločama

Sposobnost izolata iz sedimenata rudnika bakra koji su rasli u prisustvu teških metala i preselektovanih poznatih sojeva (Tabeli 2) da formiraju biofilm ispitana je kvantitativnim esejem u polistirenskim mikrotitarskim pločama sa 96 otvora (SARSTEDT, Newton, Severna Karolina, SAD) po opisanoj metodi (Heilmann *et al.*, 1996).

Za potrebe ovog eksperimenta korišćeni su TSB medijum (30 g l⁻¹; *enl.* Tryptic Soy Broth; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nju Džersi, SAD) sa dodatkom glukoze (0,25%, w/v) i MT medijum (odjeljak 3.3.1.) sa dodatkom hidrolizata kazeina (0,1%; 1%; 1,5% i 2%; w/v). Izolati su prvo gajeni u 5 ml TSB i MT medijuma 12 h na 30°C uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru. Ovako dobijenim predkulturama (1% inokulum, v/v) inokulirane su mikrotitarske ploče sa TSB i MT medijumima (200 µl medijuma po otvoru). Posle inkubacije u orbitalnom šejkeru (3-7 dana, 30°C, 30 obrt min⁻¹) mikrotitarske ploče su pažljivo isprane dva puta sterilnim PBS puferom (*eng.* Phosphate Buffered Saline; 200 µl po otvoru; 8 g l⁻¹ NaCl; 0,2 g l⁻¹ KCl; 1,78 g l⁻¹ Na₂HPO₄ × 2 H₂O; 0,27 g l⁻¹ KH₂PO₄; pH 7,4). A zatim, mikrotitarske ploče su sušene strujanjem vazduha (15 min) a preostale adsorbovane ćelije na dnu svakog otvora su bojene 30 s 0,1% (v/v) vodenim rastvorom safranina u 20% (v/v) etanolu (Sigma-Aldrich, St Louis, Misuri, SAD). Nakon bojenja izmerena je apsorbancija na 490 nm pomoću čitača Multiskan RC 351 microplate reader (MTX LabSystems Inc., Vienna, Vajoming, SAD). Kao kontrola, korišćeni su neinokulirani otvori koji su sadržali odgovarajući medijum.

3.3.4. Standardni biohemijski testovi za identifikaciju bakterija

Za fenotipsku karakterizaciju selektovanih izolata iz sedimenata rudnika, koji su mogli da rastu u prisustvu bar jednog teškog metla, korišćen je set standardnih biohemijskih testova (Tindall *et al.*, 2007).

Lipaza test. Prisustvo lipaze je testirano na osnovu sposobnosti izolata da hidrolizuju Tween 80 (polioksietilen sorbitan monooleat) na oleinsku kiselinu i sorbitol. Izolati su zasejani na podlogu (10 g l⁻¹ peptona; 5 g l⁻¹ NaCl; 0,1 g l⁻¹ CaCl₂; 20 g l⁻¹ agara i 0,5 g l⁻¹ Tween 80) koja je sterilisana u autoklavu (30 min, 110°C). Zasejane podloge su inkubirane 24 h na 30°C i ukoliko je reakcija bila pozitivna oko kolonija su detektovane zone prosvetljenja.

Redukcija nitrata. Ovim biohemijskim testom dokazivana je sposobnost izolata da redukuju nitrate u nitrite. Podloga za ovaj test sastojala se od 0,2 g l⁻¹ KNO₃ i 5 g l⁻¹ peptona. Podloga je razlivana u epruvete i sterilisana u autoklavu (20 min, 121°C). Izolati su zasejavani u ovako pripremljenu podlogu i inkubirani 96 h na 30°C. Nakon perioda inkubacije u epruvete je dodat rastvor A (100 µl; 0,8% (w/v) sulfanilna kiselina u glacijalnoj sirćetnoj kiselini), potom i rastvor B (100 µl; 0,5% (w/v) alfa-naftilamin u glacijalnoj sirćetnoj kiselini). Pojava crvene boje bila je znak pozitivne reakcije.

Korišćenje različitih izvora ugljenika. Sposobnost izolata da koriste različite izvore ugljenika (fruktoza, glukoza, ksiloza, saharoza, maltoza, glicerol i manitol) testirana je u MSM (*eng.* Mineral Salts Medium) tečnom medijumu (9 g l⁻¹ Na₂HPO₄ × 12H₂O; 1,5 g l⁻¹ KH₂PO₄; 0,2 g l⁻¹ MgSO₄ × 7H₂O; 0,002 g l⁻¹ CaCl₂; 1 g l⁻¹ NH₄Cl; 1 ml rastvora soli (Schegel *et al.*, 1961) i 15 g l⁻¹ bakteriološkog agara) uz dodatak supstrata (1%, w/v) kao jedinog izvora ugljenika. Kulture su gajene 48 h na 30°C uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru.

Rast u prisustvu NaCl i NaF. Ispitivani sojevi su zasejani u MT medijum (odjeljak 3.3.1.) sa dodatim NaCl (10%, w/v), odnosno NaF (1%, w/v) i inkubirani u orbitalnom šejkeru (30°C, 180 obrt min⁻¹). Rast izolata je praćen 5 dana.

Rast na niskim pH vrednostima. Sposobnost izolata da rastu na pH 2 i pH 4 testirana je u MT medijumu (sa dodatkom 1,5 % (w/v) hidrolizata kazeina) kome je pH vrednost podešena upotrebom koncentrovane HCl. Nakon inkubacije 24 h na 30°C u orbitalnom šejkeru uz mešanje od 180 obrt min⁻¹, kulturama je izmerena apsorbancija na 600 nm (A₆₀₀, GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Bakinghemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo). Kao kontrola rasta korišćene su bakterijske kulture gajene u MT medijumu pH 7.

Hidroliza eskulina. Izolati su gajeni u 5 ml eskulin bujona (komercijalna podloga, Torlak, Srbija) 48 h na 30°C. Detekcija je vršena dodavanjem nekoliko kapi 10% (w/v) FeCl₃. Crna boja predstavljala je indikaciju da soj razlaže eskulin.

Korišćenje citrata. Pripremljen je Simonsov citratni agar (0,2 g l⁻¹ MgSO₄ × 7H₂O; 1 g l⁻¹ NH₄H₂PO₄; 1 g l⁻¹ KH₂PO₄; 2 g l⁻¹ natrijum citrata; 5 g l⁻¹ NaCl; 0,08 g l⁻¹ brom timol plave boje i 15 g l⁻¹ agara). Izolati su zasejani na podlogu i inkubirani 48 h na 30°C. Promena boje podloge iz zelene u plavu ukazivala je da ispitivani soj koristi citrate kao izvor energije.

Ispitivanje prisustva katalaze. Ezom je zahvaćena velika količina ćelija sa čvrste LB podloge koje su potom nanete na sterilnu Petri šolju. Na ćelije je sipano 1-2 kapi 3% (v/v) vodonik peroksida (Zorka Pharma, Srbija). Ukoliko je ispitivani soj posedovao enzim katalazu, dolazilo je do burne reakcije uz oslobađanje mehurića kiseonika.

Hidroliza uree. „Christensen urea agar“ (gotova podloga, Torlak, Srbija) je nakon sterilizacije (20 min, 121°C) razliven u iskošene epruvete. Ohlađene i stegnute podloge imale su žutu boju. Zasejavanje je vršeno po kosini, a zasejana podloga je inkubirana 24-72 h na 30°C. Pojava crvene boje bila je indikator da izolat ima sposobnost da razlaže ureu.

Proizvodnja indola. Izolati su zasejani u podlogu (20 g l⁻¹ peptona i 5 g l⁻¹ NaCl) i inkubirani 24 h na 30°C, nakon čega je dodavan reagens po Ehrlich-u (1 ml; 8 g *p*-dimetilaminobenzaldehida, 760 ml 96% etanola i 160 ml koncentrovane HCl). Pojava crvenog prstena označavala je da mikroorganizam proizvodi indol.

Hemoliza. Za ispitivanje hemolitičke sposobnosti izolata korišćena je komercijalna podloga „Columbia blood agar“ (Neogen Corporation, Škotska, Ujedinjeno Kraljevstvo) koja sadrži ovčiju krv. Sveže pripremljena podloga je crvene boje. Izolati su na ovom medijumu gajeni 12 h na 37°C. Ukoliko su bakterije stvarale hemolizine, oko bakterijskih kolonija su se pojavila prosvetljenja tj. zone hemolize u kojima je došlo do liziranja eritrocita. Na osnovu izgleda zone hemolize razlikuju se α i β -hemoliza. β -hemoliza se odlikuje kompletnom lizom eritrocita i gubitkom obojenosti hemoglobina zbog čega je zona hemolize potpuno svetla, dok α -hemoliza podrazumeva delimičnu lizu eritrocita i redukciju hemoglobina u methemoglobin zbog čega je zona zelenkaste boje (Ryan and Ray, 2004).

3.4. Mehanizmi tolerancije na teške metale

3.4.1. Umnožavanje gena za determinante rezistencije na teške metale

Kako bi se ispitali mehanizmi potencijalno odgovorni za toleranciju izolata na teške metale, umnožavani su geni (Tabela 3) čiji produkti obezbeđuju rezistenciju na Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} i Zn^{2+} . Korišćen je aparat GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, Foster City, Kalifornija, SAD), prajmeri navedeni u tabeli 4 i programi navedeni u tabeli 5.

Tabela 3. Odabrani geni čiji produkti obezbeđuju rezistenciju na teške metale.

Gen	Funkcija proteina koji kodira	Metali na koje obezbeđuje rezistenciju	Referenca	Očekivana dužina fragmenta, bp
<i>nccA</i>	komponenta Ncc sistema za efluks	Ni^{2+} , Co^{2+} i Cd^{2+}	(Schmidt and Schlegel, 1994)	1161
<i>czcA</i>	komponenta CzcABC efluks pumpe	Co^{2+} , Zn^{2+} i Cd^{2+}	(Nies, 1992)	1885
<i>chrB</i>	transkripcioni aktivator ChrA efluks pumpe	Cr^{6+}	(Juhnke <i>et al.</i> , 2002)	450
<i>copA1</i>	oksidaza bakra	Cu^{2+}	(Nies, 1999)	1186
<i>merA</i>	reduktaza žive	Hg^{2+}	(Misra, 1992)	779

Kao matrica u reakcijama umnožavanja korišćena je ukupna genomska DNK (odjeljak 3.2.2.4.) izolata iz rudnika koji su pokazali sposobnost rasta u prisustvu teških metala i bakterijskih sojeva navedenih u tabeli 2.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za umnožavanje i sekvenciranje gena odgovornih za rezistenciju na teške metale.

Naziv	Sekvenca (5' – 3')	Referenca
<i>nccA_F</i>	ACGCCGGACATCACGAACAAG	(Abou-Shanab <i>et al.</i> , 2007)
<i>nccA_R</i>	CCAGCGCACCGAGACTCATCA	(Abou-Shanab <i>et al.</i> , 2007)
<i>czcA_F</i>	GTTTGAACGTATCATTAGTTTC	(Trajanovska <i>et al.</i> , 1997)
<i>czcA_R</i>	GTAGCCATCCGAAATATTCG	(Trajanovska <i>et al.</i> , 1997)
<i>chrB_F</i>	GCGAAAGCAAGATGTCGATCG	(Abou-Shanab <i>et al.</i> , 2007)
<i>chrB_R</i>	GTCGTTAGCTTGCCAACATC	(Abou-Shanab <i>et al.</i> , 2007)
<i>merA_F</i>	ACGGTCGCCACTTGCGGAT	(Davis, 2011)
<i>merA_R</i>	CACGCCAAGTACGAAGGCAT	(Davis, 2011)
<i>copA_F</i>	TGAGTCATCATCGTGTGCGTT	(Rojas <i>et al.</i> , 2011)
<i>copA_R</i>	GGCAGCTACTGGTATCAC	(Rojas <i>et al.</i> , 2011)

Reakcije za PCR su pripremane na sledeći način: reakciona smeša sadržala je, pored genomske DNK, svaki od prajmera u koncentraciji od 100 pmol μl^{-1} , dNTP smešu (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) u finalnoj koncentraciji od 2 mM, 1,25 U IMMOLASE polimeraze (Bioline, London, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1 \times IMMOLASE puffer i 2,5 mM MgCl_2 . Rezultati PCR reakcija analizirani su horizontalnom elektroforezom (odjeljak 3.6.1.), a odgovarajući fragmenti isečeni iz gela, prečišćeni upotrebom komercijalnog QIAquick Gel Extraction kita (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) i sekvencirani (odjeljak 3.6.2.) korišćenjem prajmera navedenih u tabeli 4.

Tabela 5. Programi korišćeni za umnožavanje gena odgovornih za rezistenciju na teške metale.

	Temperatura	Vreme, min	Faza reakcije	Broj ciklusa
Umnožavanje <i>nccA</i> , <i>czcA</i> i <i>chrB</i> gena	95°C	7	Denaturacija DNK	1
	95°C	1		
	57°C	1.5	*Umnožavanje DNK	35
	72°C	2		
	72°C	3	Finalna elongacija	1
Umnožavanje <i>copAI</i> gena	95°C	7	Denaturacija DNK	1
	95°C	1		
	55°C	1	*Umnožavanje DNK	35
	72°C	1		
	72°C	5	Finalna elongacija	1
Umnožavanje <i>merA</i> gena	95°C	5	Denaturacija DNK	1
	94°C	1.5		
	56°C	1	*Umnožavanje DNK	35
	70°C	3		
	70°C	7	Finalna elongacija	1

*Pod umnožavanjem DNK se podrazumeva denaturacija DNK, aniling prajmera i elongacija.

3.4.2. Istovremena tolerancija slobodnoživećih bakterija na više teških metala

Za analizu sposobnosti slobodnoživećih bakterija da rastu u prisustvu više teških metala istovremeno, korišćen je MT medijum (odeljak 3.3.1.) u koji je dodat 1,5% (w/v) hidrolizat kazeina kako bi se pospešio rast izolata, i smeša sledećih metala: 5 mM Cu²⁺, 2,5 mM Cd²⁺ i 1,5 mM Cr⁶⁺. Korišćene koncentracije metala su određene uzimajući u obzir maksimalne koncentracije pojedinačnih metala u prisustvu kojih su izolati rasli u tečnom MT medijumu (odeljak 3.3.1.). Kao kontrolni eksperiment, pojedinačni izolati su zasejani u medijum sa pojedinačnim metalima u prisustvu kojih imaju sposobnost rasta, a korišćene su koncentracije jednake pojedinačnim koncentracijama metala u smeši.

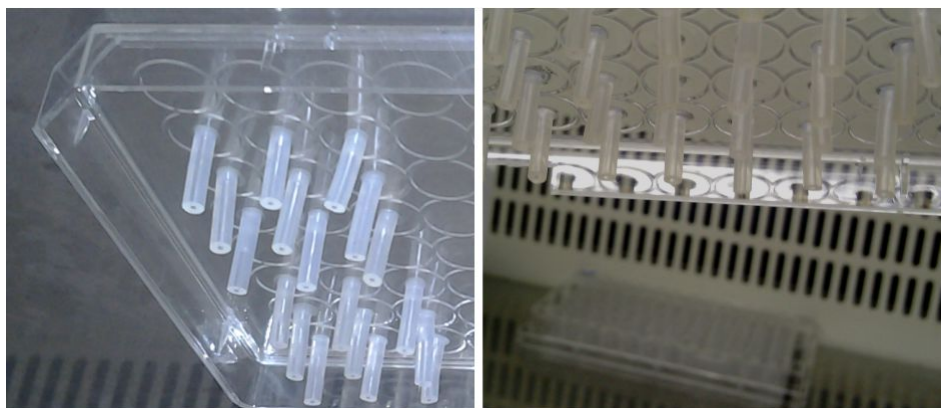
Pored rasta pojedinačnih izolata, analiziran je i rast bakterijskih zajednica, koje su definisane imajući u vidu sposobnost izolata da rastu u prisustvu pojedinačnih teških metala (odeljak 3.3.1.) kao i sposobnost formiranja biofilma (odeljak 3.3.2.). Dodatno, bakterijski

sojevi koji su pokazali sposobnost rasta u prisustvu istog teškog metala su u zajednici testirani na rast u prisustvu tog metala.

Predkulture, dobijenjem gajenjem pojedinačnih izolata u 5 ml MT medijuma (30°C, 180 obrt min⁻¹) do apsorbancije 0,8 na 600 nm, korišćene su kao inokulumi (4%, v/v) koji su zasejavani u svež MT medijum (5 ml) u koji je dodata smeša soli metala. Prilikom zasejavanja bakterijskih zajednica korišćena je količina predkulture svakog pojedinačnog izolata do 4% (v/v) inokuluma. Uzorci su inkubirani 48 h na 30°C u orbitalnom šejkeru uz mešanje od 180 obrt min⁻¹. Nakon inkubacije, precizno je odmereno po 4 ml kulture i centrifugirano (10 min, 3 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka). Supernatanti su zatim odliveni a talozi sušeni 3 dana na 65°C i izmerena je suva ćelijska masa (CDW od *eng.* Cell Dry Weight) na analitičkoj vagi (Sartorius, Getingen, Nemačka).

3.4.3. Tolerancija bakterijskog biofilma na prisustvo pojedinačnih teških metala

Inicijalno, sposobnost izolata da formiraju biofilm analizirana je u standardnim polistirenskim mikrotitarskim pločama gde se biofilm formira na dnu svakog otvora (odeljak 3.3.3.). Za analizu tolerancije biofilma na prisustvo jednog ili više teških metala, biofilmovi su formirani na silikonskim cevčicama u formatu ploče sa 96 otvora, što je omogućavalo prenošenje i uranjanje tako formiranih biofilmova u medijume sa povećanim koncentracijama metala (Slika 10).



Slika 10. Mikrotitarska ploča sa 96 otvora i pričvršćenim silikonskim cevčicama na poklopcu za gajenje bakterijskog biofilma.

Bakterijski biofilmovi su gajeni na cevčicama, napravljenim od silikonskog creva (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemačka), dužine 1 cm, spoljašnjeg prečnika 2,5 mm i unutrašnjeg prečnika 0,5 mm, koje su bile pričvršćene za poklopac mikrotitarske ploče (Slika 10). Prilikom zatvaranja poklopca, ove silikonske cevčice potpuno su uranjale u otvore mikrotitarske ploče, na taj način pružajući potporu za formiranje biofilma. U otvore mikrotitarske ploče sipan je MT medijum (odeljak 3.3.1.) (200 μ l po otvoru; sa dodatkom 1,5% (w/v) hidrolizata kazeina). Medijum je inokuliran bakterijskim predkulturama (1% inokulum, v/v), dobijenim gajenjem pojedinačnih izolata u 5 ml MT medijuma 12 h na 30°C u orbitalnom šejkeru uz mešanje od 180 obrt min^{-1} . Mikrotitarske ploče su inkubirane 3 dana na 30°C u orbitalnom šejkeru uz mešanje od 30 obrt min^{-1} . Nakon inkubacije poklopac sa silikonskim cevčicama na kojima je biofilm, je bio prebačen na novu mikrotitarsku ploču sa MT medijumom (200 μ l po otvoru; sa dodatkom 1,5% (w/v) hidrolizata kazeina) sa dodatim solima metalima u odgovarajućim koncentracijama. Korišćene su maksimalne koncentracije metala u prisustvu kojih su slobodnoživeće bakterije pokazale sposobnost rasta (odeljak 3.3.1.; 1 mM – 3 mM Cr^{6+} , 2 mM – 10 mM Cu^{2+} , 5mM Cd^{2+}), a korišćene su i dvostruko veće koncentracije. Ovako pripremljena mikrotitarska ploča je inkubirana sledeća 3 dana na 30°C u orbitalnom šejkeru uz mešanje od 30 obrt min^{-1} . Nakon toga poklopac sa cevčicama na kojima je biofilm je bio prebačen na novu ploču, sa PBS puferom (200 μ l po otvoru; odeljak 3.3.3.) koja je čitava izložena delovanju ultrazvučnih talasa, frekvencije od 20 kHz do 400 kHz, u trajanju od 5 min u vodenom kupatilu za sonifikaciju (Aquasonic 250 HT Ultrasonic Cleaner, VWR International, Radnor, Pensilvanija, SAD; Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu). Bakterije koje su na ovaj način uklonjene sa biofilma serijski su razblažene (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) u PBS puferu i zasejane na čvrstu LB podlogu. Bakterije su inkubirane (24 - 48 h, 30°C) i broj vijabilnih bakterija određen je kao u odeljku 3.2.2.1.

3.4.4. Tolerancija biofilma na prisustvo više teških metala istovremeno

Bakterijski biofilmovi su gajeni na silikonskim cevčicama kao što je opisano u odeljku 3.4.3. Umesto pojedinačnih soli metala, MT (odeljak 3.3.1.) medijumu je dodata smeša soli Cu^{2+} , Cd^{2+} i Cr^{6+} . Korišćene su dve smeše sledećih koncentracija: 5 mM Cu^{2+} , 2,5 mM Cd^{2+} i 1,5 mM Cr^{6+} , odnosno 10 mM Cu^{2+} , 5 mM Cd^{2+} i 3 mM Cr^{6+} . Analiziran je rast

biofilmova pojedinačnih izolata i bakterijskih zajednica, definisanih uzimajući u obzir sposobnost rasta zajednica slobodnoživećih bakterija u prisustvu više metala istovremeno (odjeljak 3.4.2).

3.5 Uticaj bakterijskih biofilmova na *in vitro* proces luženja

3.5.1. Gajenje bakterijskog biofilma na većoj skali

Tri bakterijska biofilma (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1; zajednica - *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1; zajednica - *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *Cupriavidus metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1) su gajena na većoj skali u TSB medijumu. Izolati su prvo gajeni u 5 ml TSB medijuma 12 h na 30°C uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru. Ove predkulture korišćene su za inokulaciju (1% inokulum, v/v) svežeg TSB medijuma (10 ml) u koji je dodato i parče silikonskog creva (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemačka), dužine 2 cm, spoljašnjeg prečnika 5 mm i unutrašnjeg prečnika 3 mm, koje je prethodno sterilisano rastvorom etanola (70%, v/v). Prilikom gajenja biofilma bakterijskih zajednica korišćena je količina predkulture svakog pojedinačnog izolata do 1% (v/v) inokuluma. Kulture su inkubirane četiri dana na 30°C uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru, a nakon toga još 5 dana na 30 °C, bez mešanja. Za potrebe ispitivanja uticaja metala na preživljavanje ćelija u biofilmu, u TSB medijum je prilikom inokulacije dodavana smeša 5 mM Cu²⁺, 2,5 mM Cd²⁺ i 1,5 mM Cr⁶⁺.

3.5.2. Karakterizacija bakterijskog biofilma

3.5.2.1. Spektroskopija sa infracrvenom Furijeovom transformacijom (FT-IR)

Uzorci za FT-IR spektroskopiju (*eng. Fourier transform infrared spectroscopy*) su pripremljeni mešanjem uzoraka bakterijskih biofilmova (odjeljak 3.5.1.) sa KBr i smeša je pod visokim pritiskom komprimovana u tablete. Analiza je urađena na uređaju ATR-IR Nicolet 380 (Thermo Fisher Scientific, Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo; Hemijski

fakultet, Univerzitet u Beogradu). Dobijeni spektri predstavljaju 64 uzastopna snimka u rasponu talasnog broja od od 4000 do 400 cm^{-1} , pri rezoluciji od 4 cm^{-1} .

3.5.2.2. Elementalna organska mikroanaliza

Uzorci bakterijskih biofilmova odgajani na većoj skali (odjeljak 3.5.1.) su u potpunosti osušeni (60 min, 100°C), nakon čega je odmereno po 0,5 g uzorka za elementalnu analizu koja je rađena kao što je opisano u odeljku 3.1.1.

3.5.2.3. Ekstrakcija i kvalitativna analiza šećera iz bakterijskih biofilmova

Uzorci bakterijskih biofilmova gajeni su na većoj skali (odjeljak 3.5.1.) do 300 mg vlažne mase i ispirani su vodom kako bi se uklonile komponente podloge. Posle sušenja etanolom urađena je hidroliza uzoraka sa rastvorom tri-fluor sirćetne kiseline (2 M, 15 ml) u trajanju od 12 h. Monosaharidne komponente u hidrolizatu analizirane su silaznom hromatografijom na filter papiru Whatman No.1 (GE Healthcare, Bakinghemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo) u razvijaču etil-acetat-piridin-voda (10:4:3, v/v/v). Posle razvijanja i sušenja, hromatogram je izazivan acetonskim rastvorom AgNO_3 i alkoholnim rastvorom NaOH (Ivany and Heimer, 1973). Monosaharidne komponente su kvalitativno identifikovane poređenjem sa standardima.

3.5.2.4. Bojenje živih i mrtvih bakterijskih ćelija u biofilmu

Kombinacija boja SYTO[®] 9 i propidijum jodid (PI) (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD) boji intaktne bakterijske ćelije zelenom bojom (SYTO[®] 9), a bakterije sa oštećenom ćelijskom membranom (mrtve) crvenom bojom (PI) (Saravanan *et al.*, 2006).

Biofilmovi su gajeni kao što je opisano u odeljku 3.5.1., s tim što je u medijum umesto silikonskog creva stavljano pokrovno borosilikatno stakalce za mikroskopiranje na kome se tokom inkubacije formirao biofilm. Nakon inkubacije, pokrovno stakalce sa biofilmom je izvađeno iz medijuma i osušeno pod strujom vazduha. Potom je na stakalce naneta vodena smeša boja (50 μl ; 15 μM SYTO[®] 9 i 15 μM propidijum jodid) i uzorak je inkubiran 15 min na ambijentalnoj temperaturi u mraku, nakon čega je pokrovno stakalce stavljeno na mikroskopsku pločicu i uzorak je analiziran mikroskopiranjem (odjeljak 3.6.5.)

3.5.3. Uticaj bakterijskog biofilma na rast soja *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Kako se za procese bioluženja uglavnom koriste gvožđe-oksidujuće bakterije kao što je *Acidithiobacillus ferrooxidans*, za potrebe ove studije ispitana je sposobnost rasta ovog mikroorganizma u prisustvu jednog od tri bakterijska biofilma: *P. aeruginosa* PAO1; zajednice *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1; zajednice *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1. *A. ferrooxidans* je izolovan iz RTB Bor i deo je kolekcije mikroorganizama Centra za hemiju, IHTM, Univerziteta u Beogradu.

Bakterijski biofilmovi pojedinačnih izolata iz rudnika i bakterijskih zajednica tolerantnih na prisustvo teških metala gajeni su na silikonskim cevčicama kao što je opisano u odeljku 3.4.3. Korišćeni su biofilmovi gajeni u MT tečnoj podlozi sa dodatkom 1,5% (w/v) hidrolizata kazeina. Poklopac sa silikonskim cevčicama na kojima je biofilm prebačen je na novu mikrotitarsku ploču inokuliranu sojem *A. ferrooxidans* u 9K tečnoj podlozi (odeljak 3.2.2.2.) (Karavaiko *et al.*, 1988a). Mikrotitarske ploče su inkubirane 14 dana na 28°C, a rast bakterija je proveravan svaki dan.

3.5.4. *In vitro* model bioluženja

In vitro model bioluženja rađen je na uzorku jalovine uzete iz flotacije Veliki Krivelj (RTB Bor), sa osnovnim karakteristikama prikazanim u tabeli 6. Smeša za bioluženje sadržala je 100 ml 9K medijuma, 10^{11} ml⁻¹ ćelija *A. ferrooxidans*, 1% (w/v) jalovine i 0,36% (w/v, vlažne mase) jednog od tri biofilma (*P. aeruginosa* PAO1; zajednica *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1; zajednica *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1). Odgovarajući kontrolni eksperimenti bez biofilma i bez *A. ferrooxidans* su takođe bili uključeni u eksperiment. Ovako napravljene smeše su inkubirane 7 dana u staklenim erlenmajer sudovima zapremine 250 ml, na 28°C uz mešanje od 150 obr min⁻¹ u orbitalnom šejkeru (Karavaiko *et al.*, 1988b). Za potrebe ovog eksperimenta bakterijski biofilmovi su gajeni kao što je opisano u odeljku 3.5.1.

Nakon inkubacije, reakciona smeša je profiltrirana kroz filter membranu otvora 0,45 μm (Filtropur S, SARSTEDT, Newton, Severna Karolina, SAD) i analizirana pomoću ICP/OES THERMO iCAP 6500 Duo (Thermo Fisher Scientific, Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo; Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu).

Tabela 6. Fizičko-hemijske karakteristike, mikroanaliza i prisustvo teških metala u uzorku jalovine iz flotacije Veliki Krivelj, RTB Bor.

Karakteristika	Uzorak jalovine	
pH u H_2O	9.83	
pH u 0.01M CaCl_2	9.85	
Vlažnost, % (w/w)	1.77	
Gubitak žarenjem na 550 °C, %	3.57	
CO_2 (%)	1.8	
	N	/
Mikroanaliza (g kg^{-1})	C	3.2
	H	4.8
	S	38.1
	Fe	32584
	Ti	888
	Cu	485
	Sn	363
	Mn	270
	Sr	130.8
	V	106
Metal* (mg kg^{-1})	Zn	97.8
	Cr	42.3
	Co	25.6
	Mo	12.4
	Ni	9.2
	Se	5.3
	Pb	3.1
	Sb	1.9
	B	1.7

* detektovane koncentracije As, Bi, Cd, Te, Tl su bile $< 0.5 \text{ mg kg}^{-1}$

3.6. Opšte molekularno biološke i analitičke metode

3.6.1. Agarozna gel elektroforeza

Rezultati izolacije metagenomske i genomske DNK, reakcije lančane polimerizacije i sečenja DNK restrikcionim enzimima analizirani su horizontalnom elektroforezom na agaroznim gelovima (0,6-1%, w/v) pripremljenim u TBE puferu (TBE od Tris, Borna kiselina, EDTA; 10,9 g l⁻¹ TRIS; 5,56 g l⁻¹ borne kiseline i 0,93 g l⁻¹ EDTA). Etidijum bromid je dodavan u gel za elektroforezu u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg ml⁻¹. Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 8 V po dužnom centimetru gela. Razdvajanje uzoraka praćeno je kretanjem fronta indikatorske boje (bromfenol plavo ili oranž G), a detekcija uzoraka na gelu vršena je osvetljavanjem gela ultraljubičastom svetlošću talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Nemačka).

Veličina DNK fragmenata je određivana poređenjem njihove elektroforetske pokretljivosti sa pokretljivošću standarda poznate molekulske mase. Kao marker molekulskih veličina korišćeni su λ DNA – *EcoRI/HindIII* (564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3503, 4268, 4973, 5248, 21226 bp), O'RangeRuler™ 100 bp DNK marker (100 – 1500 bp; Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija), O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker (100 – 3000 bp; Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija) i 1 kb DNK marker (250 – 10 000 bp; NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dren, Nemačka).

3.6.2. Sekvenciranje DNK

PCR proizvodi i restrikciono provereni plazmidi (odeljak 3.2.1.3.) su sekvencirani na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), uz upotrebu komercijalnog kita za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD).

Reakciona smeša za sekvenciranje (8 µl) sadržala je: „Ready Reaction Mix“ (3 µl), prajmer kojim je vršeno sekvenciranje (3,2 pmol) i DNK koja se sekvencira (1-2 ng na 100 bp

ukoliko se sekvencira PCR proizvod, odnosno 150 - 300 ng plazmida). Prvi korak sekvenciranja rađen je na PCR aparatu (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) korišćenjem sledećeg programa: jedan ciklus inicijalne denaturacije (1 min, 96°C) i 25 ciklusa denaturacije (10 s, 96°C), anilinga prajmera (5 s, 55°C) i elongacije (4 min, 60°C).

Nevezani obeleženi nukleotidi su uklonjeni dodavanjem 40 µl rastvora A (1,2 ml 3M CH₃COONa, pH 5,2; 25 ml 96% (v/v) etanola i 5,8 ml destilovane vode) i centrifugiranjem (10 min, 10 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5415 D, Hamburg, Nemačka). Nakon odlivanja supernatanta talog je ispran 70% (v/v) etanolom (200 µl) i centrifugiran (10 min, 10 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5415 D, Hamburg, Nemačka). Po odlivanju supernatanta korak ispiranja ponovljen je još jednom. Talog je osušen i rastvoren u 25 µl formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD).

Analiza sekvenci rađena je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer programom SeqAnalyzer, u okviru softverskog paketa samog čitača.

3.6.3. Izolacija i određivanje koncentracije ukupnih proteina iz bakterijskih kultura

Ukupni proteini iz uzoraka bakterijskih kultura izolovani su korišćenjem reagensa BugBuster Protein Extraction Reagent po uputstvu proizvođača (Novagen, Merck KGaA, Darmstad, Nemačka). Izolati su gajeni u TSB medijumu (5 ml); (odjeljak 3.3.3.) uz dodatak 2 mM Cu²⁺, 12 h na 30°C uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru, nakon čega je izmerena apsorbancija kultura na 600 nm i one su centrifugirane (5 min, 3 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka). Potom je odliven supernatant, a talozi su resuspendovani u odgovarajućoj zapremini PBS pufera, tako da u 1 ml svakog resuspendovanog uzorka apsorbancija na 600 nm bude 20. Uzorci (1 ml) su zatim centrifugirani (5 min, 3 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka), odliveno je 700 µl supernatanta, a talozi su resuspendovani u prestalih 300 µl i dodat je BugBuster Protein Extraction Reagent (30 µl). Nakon inkubacije 15 min na 37°C u aparatu Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) uz mešanje od 500 obrt min⁻¹, uzorci su centrifugirani (20 min, 20 000 × g, 4°C, Eppendorf Centrifuge 5417 D, Hamburg, Nemačka) i izdvojeni su supernatanti.

Koncentracija proteina određena je metodom po Bradford-u (Bradford, 1976), koja se zasniva na upotrebi bojenog reagensa CBB G-250 (BioRad Protein Assay, BioRad Laboratories, Kalifornija, SAD). Za određivanje koncentracije proteina u 1 ml bojenog reagensa dodavano je 20 μ l smeše ukupnih proteina nepoznate koncentracije. Nakon inkubacije od 15 min na 25°C izmerena je apsorbancija na 595 nm (A_{595} , Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences, Bakinghemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo). Koncentracija proteina je određena na osnovu standardne krive koja predstavlja odnos poznatih koncentracija proteinskog standarda (BSA, od *eng.* Bovin Serum Albumine) i odgovarajućih A_{595nm} vrednosti.

3.6.4. Esej oksidacije 2,6-dimetoksifenola

Kvantitativno određivanje aktivnosti enzima multi bakar oksidaze (CopA) u okviru ukupnog proteinskog ekstrakta bakterija zasnivalo se na oksidaciji 2,6-dimetoksifenola (DMP od *eng.* 2,6-dimethoxyphenol; Acros Organics, Gil, Belgija) (Hsiao *et al.*, 2011), pri čemu nastaje bojeni proizvod 3,3',5,5'-tetrametoksidifenilhinon (Solano *et al.*, 2001). Reakciona smeša (900 μ l) sadržala je 2 mM DMP u fosfatnom puferu (0,1M, pH 5) i 0,1mM Cu^{2+} . Reakcija je otpočeta dodavanjem 100 μ l supernatanta sa ukupnim proteinima uzorka (odjeljak 3.6.3.) u reakcionu smešu, i nakon inkubacije 10 min na 37°C očitana je apsorbancija smeše na 468 nm (A_{468} , Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences, Bakinghemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3.6.5. Mikroskopiranje

3.6.5.1. Fluorescentna mikroskopija

Uzorci za mikroskopiranje su bojeni smešom boja SYTO[®] 9 i propidijum jodid (PI) (odjeljak 3.5.2.4.) a zatim posmatrani na Olympus BX51 fluorescentnom mikroskopu (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan), korišćenjem odgovarajućih filtera za detekciju PI i SYTO[®] 9 boja i analizirani upotrebom Cytovision 3.1 softverskog paketa (Applied Imaging Corporation, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Maksimum ekscitacije tj. emisije za SYTO[®] 9 je 480/500 nm, a za propidijum jodid 490/635 nm.

Pored bakterijskih biofilmova (odjeljak 3.5.2.4.), kombinacijom boja PI i SYTO[®] 9 bojene su i slobodnoživeće pojedinačne bakterije i bakterijske zajednice. Slobodnoživeće bakterije i zajednice su gajene u TSB medijumu (10 ml), bez metala i sa dodatkom smeše metala, 12 h na 30°C uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru. Nakon inkubacije, kulture (2 ml) su centrifugirane (45 s, 15 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg, Nemačka), supernatant je odliven i talog je resuspendovan u 1 ml PBS pufera. Nakon centrifugiranja (30 s, 15 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg, Nemačka) i odlivanja supernatanta, talog je resuspendovan u 500 µl PBS pufera. Ovako pripremljenim uzorcima dodata je vodena smeša boja (200 µl; 15 µM SYTO[®] 9 i 15 µM propidijum jodid) i oni su inkubirani 15 min na ambijentalnoj temperaturi u mraku. Zatim je 50 µl uzorka naneto na mikroskopsku pločicu, pokriveno pokrovnim stakalcem i posmatrano pod mikroskopom.

3.6.5.2. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Uzorci za transmisionu elektronsku mikroskopiju uzimani su nakon 48 h gajenja bakterijskih kultura na 30°C uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru u tečnom MT medijumu bez dodatka metala i sa dodatkom 3 mM Cr⁶⁺. Priprema uzoraka za mikroskopiranje je rađena prema metodi O'Donnell *et al.* (O'Donnell *et al.*, 1993), a za mikroskopiranje je korišćen aparat Phillips CM12 TEM (Royal Philips Electronics, Amsterdam, Holandija). I pripremna obrada uzoraka i mikroskopiranje urađeni su u Centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

4. REZULTATI

4.1. Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka sedimenata iz rudnika bakra

Rudarstvo predstavlja jednu od glavnih antropogenih aktivnosti koje dovode do zagađenja sredine teškim metalima (Passariello *et al.*, 2002). Ovakvi uslovi životne sredine su veoma nepovoljni, jer zagađenje narušava osnovne procese, a samim tim i funkcionisanje zemljišnog ekosistema i prisutnu zajednicu mikroorganizama. Ukoliko su prisutne, očekivano je da se u sredini zagađenoj teškim metalima nalaze bakterije koje su prilagođene životu u prisustvu teških metala. Iz tog razloga su za potrebe ove studije uzorci za izolaciju bakterija uzimani u okviru rudarsko-topioničarskog basena Bor, u kome se uglavnom eksploatišu bakar i zlato. Uzorci sedimenata prikupljeni su iz dva rudnika bakra, kao što je opisano u odeljku 3.1. Uzorak označen sa MS je bio sediment iz rudnika bakra sa površinskom eksploatacijom, dok je uzorak označen sa MU bio sediment iz rudnika sa podzemnom eksploatacijom.

Najpre je urađena hemijska analiza uzoraka koja je podrazumevala merenje pH, određivanje postotka vlažnosti, elementalnu analizu i analizu prisustva teških metala (Tabela 7). pH vrednost površinskog MS uzorka je bila 5,2, i ovaj uzorak je sadržao 40% (w/w) vode, dok je podzemni MU uzorak imao pH 3,9 i 76% (w/w) vode. Određivanjem sastava osnovnih elemenata uzoraka, odnosno ukupne količine ugljenika, azota, vodonika i sumpora, pokazano je da je u uzorku MS bilo 3,3 puta više ukupnog ugljenika, 2,3 puta više azota i 1,3 puta više vodonika u odnosu na MU uzorak, dok je količina ukupnog sumpora bila 45 puta viša u MU uzorku u odnosu na MS uzorak, što ukazuje na njegovo neorgansko poreklo (Tabela 7).

Kvalitativnom i kvantitativnom procenom teških metala u uzorcima površinskog i podzemnog sedimenta, u oba uzorka su detektovane približno iste koncentracije Co i Zn, dok su koncentracije drugih metala varirale između dva uzorka. U površinskom MS uzorku detektovano je više As, Cr i Ni, dok je u podzemnom MU uzorku bilo više Cu i Cd

(Tabela 7). Najveća razlika detektovana je za As i Cr, čije su koncentracije bile 2000 i 85 puta veće u MS uzorku, dok je 9,6 puta više Cu detektovano u MU uzorku (Tabela 7).

Tabela 7. Fizičko-hemijske karakteristike, mikroanaliza i prisustvo teških metala u uzorcima sedimenata iz rudnika bakra sa površinskom eksploatacijom (MS) i podzemnom eksploatacijom (MU).

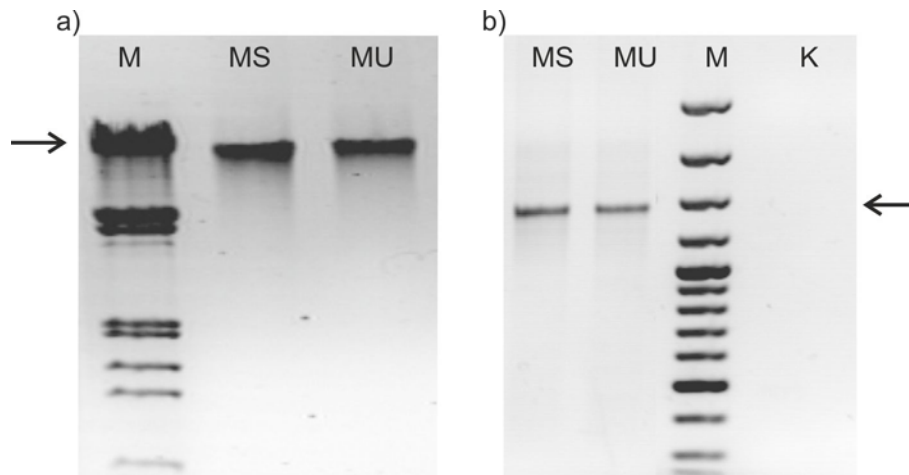
Karakteristika	Uzorci sedimenata		
	MS	MU	
pH	5.2	3.9	
Vlažnost, % (w/w)	40	76	
Mikroanaliza (g kg ⁻¹)	N	2.3	1
	C	25.6	7.7
	H	11.5	15.2
	S	2.2	100.5
Metali (mg kg ⁻¹)	Al	4661	510
	Cd	75×10^{-6}	140×10^{-6}
	Co	3	1
	Cr	3	0.035
	Cu	23	222
	Fe	3650	1336
	Mn	140	49
	Ni	1643×10^{-6}	722×10^{-6}
	Zn	11	19
As	24	0.009	

4.2. Mikrobiološki diverzitet u sedimentima iz rudnika bakra

Kako bi se stekao kompletniji uvid u mikrobiološki diverzitet u sedimentima iz rudnika bakra sa površinskom i sa podzemnom eksploatacijom, primenjene su dve metode – metagenomski i pristup tradicionalne izolacije i kultivacije bakterijskih sojeva.

4.2.1. Metagenomska analiza mikrobiološkog diverziteta

Metagenomska DNK je uspešno izolovana iz oba uzorka sedimenta (Slika 11). U ovu svrhu korišćene su dve metode. Metoda zasnovana na tretiranju uzoraka mikrotalasima (odeljak 3.2.1.1.) dala je slab prinos metagenomske DNK, koja nije bila odgovarajuće čistoće kako bi se koristila kao matrica u PCR reakciji za umnožavanje gena za 16S rRNK (rezultati nisu prikazani). Komercijalnim MoBio PowerSoil kitom izolovana je metagenomska DNK sa boljim prinosom i zadovoljavajućeg kvaliteta za direktno korišćenje u PCR reakcijama bez dodatnog prečišćavanja (Slika 11).

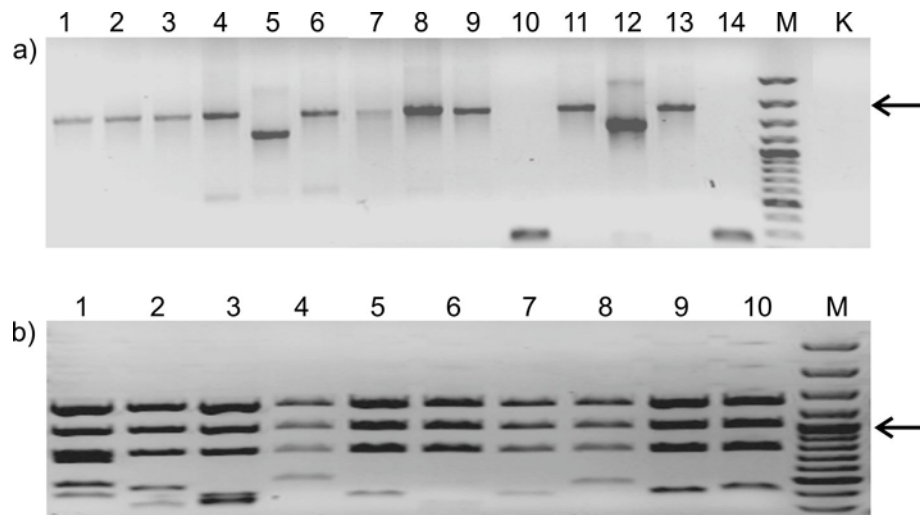


Slika 11. a) Izolovana metagenomska DNK iz uzoraka sedimenta površinskog (MS) i podzemnog (MU) kopa rudnika bakra Bor; M – λ DNA *EcoRI/HinDIII* marker, strelica pokazuje dužinu trake od 21226 baznih parova; b) PCR proizvod dobijen umnožavanjem gena za 16S rRNK korišćenjem metagenomske DNK uzoraka površinskog (MS) i podzemnog (MU) sedimenta kao matrice, M – O'GeneRuler (Fermentas) marker, strelica ukazuje na dužinu trake od 1500 baznih parova; K – negativna kontrola.

Količina izolovane metagenomske DNK iz MS uzorka bila je $7,2 \mu\text{g g}^{-1}$ uzorka a količina izolovana iz MU uzorka bila je $6 \mu\text{g g}^{-1}$ uzorka. Odnos izmerenih apsorbancija na 260 nm i 280 nm za oba uzorka bio je približno 1,9 što je ukazivalo na odgovarajuću čistoću izolovane DNK (Slika 11 a).

Geni za 16S rRNK su umnoženi iz metagenomske DNK oba uzorka (MS i MU) korišćenjem univerzalnih bakterijskih prajmera kao što je opisano u odeljku 3.2.1.2. Dobijeni su fragmenti DNK dužine 1465 bp sa tupim (*eng. blunt*) krajevima (Slika 11 b), koji su nakon prečišćavanja iz gela uspešno uklonirani u pCR®-Blunt vektor. Ovako dobijenim ligacionim smešama su transformisane elektrokompetentne *Escherichia coli* DH5 α ćelije, a selekcija transformanata je vršena u prisustvu kanamicina na čvrstoj podlozi. Na 35 ng DNK, koliko se nalazilo u 1 μl ligacione smeše (odeljak 3.2.1.2.) kojom su transformisane *E. coli* DH5 α ćelije, dobijeno je 435 transformanata iz MS i 296 transformanata iz MU uzorka. Ovaj broj transformanata je smatran zadovoljavajućim za sticanje opšte slike o diverzitetu iz sedimenata.

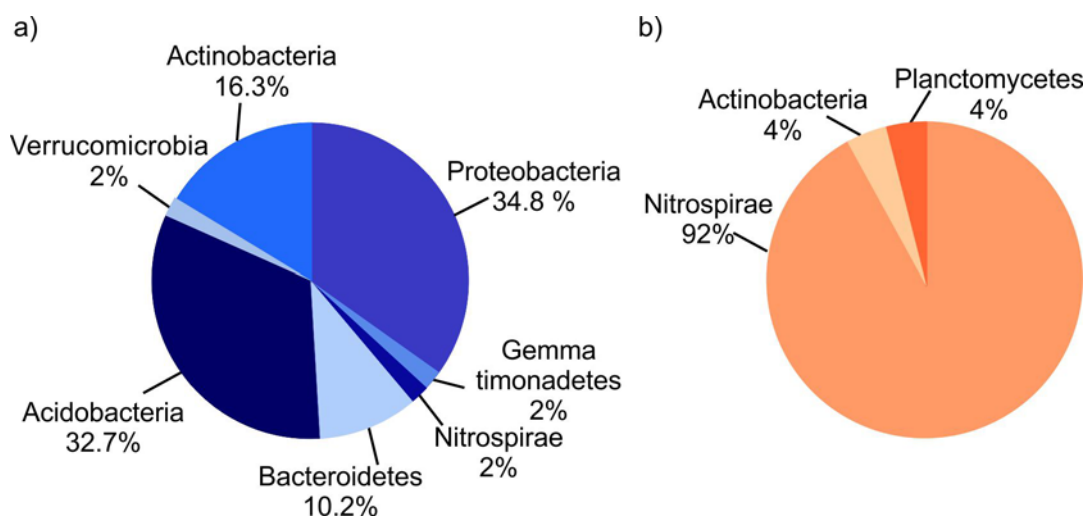
Da bi se detektovali klonovi koji nose 16S rDNK fragment odgovarajuće dužine (1465 bp), transformanti su provereni PCR reakcijom korišćenjem univerzalnih M13 prajmera (odeljak 3.2.1.3., Slika 12 a). Ukoliko se u vektoru nalazi 16S rDNK fragment očekivano je dobijanje PCR proizvoda dužine od 1700 bp, jer univerzalni prajmeri umnožavaju i dodatnih 150 bp vektorske sekvence sa obe strane inserta. Od 435 MS transformanata 124 je nosilo fragment odgovarajuće dužine i oni su činili MS biblioteku, a od 296 MU transformanata 194 je nosilo odgovarajući fragment i oni su činili MU biblioteku. Na slici 12 a prikazana je izolovana DNK iz 14 transformanata MS biblioteke, brojevima 1-4, 6-9, 11 i 13 su obeleženi klonovi sa trakom odgovarajuće dužine. Iako je totalni broj dobijenih transformanata bio 1,5 puta veći za biblioteku površinskog MS sedimenta, 2,3 puta više transformanata sa insertom prave dužine je detektovano u MU biblioteci. Tako da je na kraju ukupan broj transformanata sa odgovarajućim insertom bio 1,5 puta veći za MU u odnosu na MS biblioteku.



Slika 12. Provera odabranih 16S rDNK klonova iz biblioteka površinskog (MS) i podzemnog (MU) sedimenta: a) PCR analizom korištenjem univerzalnih M13 prajmera; M – O’GeneRuler (Fermentas) marker, strelica ukazuje na dužinu trake od 2000 baznih parova; b) restrikcijom analizom sa *RsaI* enzimom, M – O’RangeRuler (Fermentas) marker, strelica ukazuje na dužinu trake od 1000 baznih parova; K – negativna kontrola.

Klonovi sa odgovarajućim fragmentom su analizirani pomoću ARDRA/RFLP metode (odjeljak 3.2.1.3.). Ova metoda podrazumeva sečenje plazmida restrikcijom enzimima koji statistički češće seku DNK, i njihovo grupisanje u operativne taksonomske jedinice (OTU), na osnovu čega se izolati mogu filogenetski okarakterisati. Za analizu klonova u ovom radu je korišćen enzim *RsaI* koji prepoznaje i seče četiri nukleotidna para (GT[^]AC). Na osnovu profila elektroforetske pokretljivosti na agaroznom gelu klonovi MS biblioteke grupisani su u 7 OTU, a klonovi MU biblioteke u 5 OTU. Na slici 12 b prikazani su rezultati restrikcione analize za 10 MS klonova. Klonovi obeleženi brojevima 1, 2, 3 i 6 su bili jedini predstavnici svojih grupa, dok su klonovi obeleženi brojevima 4 i 8 pripadali istoj OTU, kao i 5 i 7, odnosno 9 i 10 (Slika 12 b). Kako bi se rezultati ARDRA/RFLP analize smatrali statistički značajnim, neophodno je koristiti najmanje tri restrikciona enzima za analizu. Dobijeni rezultati ukazali su na postojanje značajne raznovrsnosti filogenetskih grupa u MS i MU uzorku, ali s obzirom na olakšanu dostupnost sekvenciranja i na relativno mali broj uzoraka, odlučili smo se da filogenetsku analizu klonova biblioteka

uradimo delimičnim sekvenciranjem gena za 16S rRNK (do 500 bp) a ne detaljnijom ARDRA/RFLP analizom.



Slika 13. Raspodela filogenetskih grupa u dvema bibliotekama 16S rDNK klonova: a) iz površinskog sedimenta (MS) i b) iz podzemnog sedimenta (MU).

Za inicijalno sekvenciranje nasumično je odabrano po 10% od ukupnog broja klonova za obe biblioteke (12 klonova MS i 19 klonova MU biblioteke). Kako su rezultati sekvenciranja ukazivali na ograničeni diverzitet u MU biblioteci (više od 90% sekvenciranih klonova pripadali su rodu *Leptospirillum*) a na značajniji diverzitet među MS klonovima, odlučeno je da se dodatno sekvencira još 10 klonova MU biblioteke i još 46 klonova MS biblioteke, kako bi se stekla šira slika o diverzitetu klonova. Finalno, u MS biblioteci klonova podjednako dominantne grupe bile su *Proteobacteria* i *Acidobacteria* sa ukupno 67,5% klonova, dok je u MU biblioteci dominirala bila grupa *Nitrospirae* sa 92% klonova (Slika 13). Iako detektovane među klonovima obe biblioteke, grupa *Actinobacteria* bila je 4 puta više zastupljena u MS biblioteci, dok je grupa *Nitrospirae* bila 46 puta zastupljenija u MU biblioteci. Veći diverzitet, sa 7 različitih filogenetskih grupa, detektovan je među klonovima MS biblioteke (Slika 13 a). Pored dominantnih grupa *Proteobacteria* i *Acidobacteria* kojima je pripadalo 34,8% i 32,7% klonova, detektovana je i grupa *Actinobacteria* kojoj je pripadalo 16,3% klonova, zatim

Bacterioidetes sa 10,2 % i *Nitrospirae*, *Verrucomicrobia* i *Gemmatimonadetes* sa po 2% klonova. Klonovi MU biblioteke su grupisani u tri različite filogenetske grupe: dominantna grupa *Nitrospirae* sa *Leptospirillum* sp. kao jedinim detektovanim predstavnikom, dok su grupe *Actinobacteria* i *Planctomycetes* bile zastupljene sa po 2% klonova (Slika 13 b). Prisustvo *Leptospirillum* sp. u velikom procentu nije neobično, s obzirom da se ove vrste često mogu naći u sredinama sa nižim pH vrednostima, kao što su podzemni sedimenti rudnika (Schrenk *et al.*, 1998).

4.2.2. Diverzitet bakterija izolovanih iz uzoraka sedimenata metodom direktne kultivacije

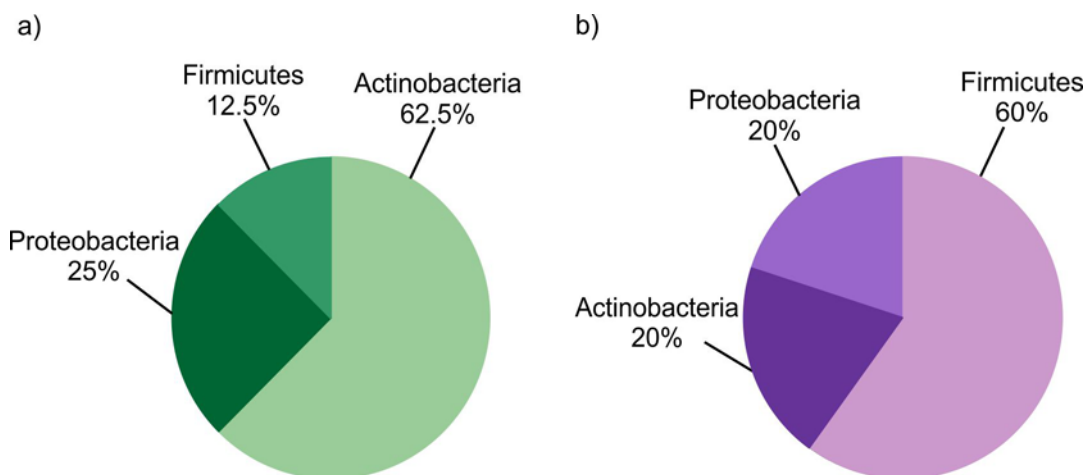
Pored metagenomske analize diverziteta, bakterije koje su bile prisutne u sedimentima izolovane su metodom direktne kultivacije upotrebom dve različite čvrste podloge. Podloga 9K (odjeljak 3.2.2.2.) sa niskom pH vrednošću od 3,5, koristi se za selektivnu izolaciju gvožđe-oksidujućih bakterija iz uzoraka koji takođe imaju niže pH, kao što su obično uzorci iz rudnika. S obzirom da su pH vrednosti MS i MU uzoraka bile 5,2, odnosno 3,9 (Tabela 7), upotreba ove podloge bila je opravdana, međutim broj bakterija izolovanih na ovoj podlozi bio je neočekivano mali, a uporediv za oba uzorka (Tabela 8).

Kako bi se obezbedila veća raznovrsnost izolovanih bakterija, korišćena je i druga podloga, Tornton-glukoza podloga (odjeljak 3.2.2.3.), karakteristična za izolaciju bakterija iz uzoraka zemljišta (Sørheim *et al.*, 1989). Nakon rasta bakterija na TG podlozi prebrojan je broj kolonija i uočeno je da je ukupan broj vijabilnih bakterija u oba uzorka istog reda veličine a 100 puta veći u odnosu na vijabilne bakterije izolovane korišćenjem 9K podloge (Tabela 8). Za dalji rad su odabrana 32 morfološki različita MS izolata (označeni kao MSI izolati) iz uzorka sedimenta rudnika sa površinskom eksploatacijom, i 30 morfološki različitih MU izolata (označeni kao MUI izolati) iz uzorka sedimenta rudnika sa podzemnom eksploatacijom.

Tabela 8. Procena ukupnog broja vijabilnih bakterija u uzorcima sedimenata iz rudnika bakra sa površinskom (MS) i podzemnom eksploatacijom (MU).

	medijum	Uzorci sedimenata	
		MS	MU
CFU ml ⁻¹	9K	3×10^5	2×10^5
	TG	0.9×10^7	3×10^7

Odabrani izolati su taksonomski identifikovane do nivoa roda sekvenciranjem početnih 500 bp gena za 16S rRNK (odjeljak 3.2.2.4). Utvrđeno je da su izolati iz oba uzorka pripadali jednoj od tri filogenetske grupe: *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ili *Firmicutes* (Slika 14). Među MSI izolatima dominirao je red *Actinobacteria*, sa 5 puta više predstavnika nego *Firmicutes* i 2,5 puta više predstavnika nego *Proteobacteria* (Slika 14 a). Među MUI izolatima predstavnika reda *Firmicutes* je bilo 3 puta više nego predstavnika *Actinobacteria* i *Proteobacteria* (Slika 14 b). Kada se uporede MSI i MUI izolati, ujednačen udeo (25% i 20%) pripadao je grupi *Proteobacteria*, dok je tri puta više MSI izolata pripadalo grupi *Actinobacteria* u poređenju sa MUI izolatima, među kojima je bilo skoro pet puta više pripadnika *Firmicutes* (Slika 14).



Slika 14. Raspodela bakterija izolovanih na Torntnon-glukoza podlozi iz uzoraka: a) površinskog sedimenta (MS) i b) podzemnog sedimenta (MU) po filogenetskim grupama.

Metagenomskom analizom detektovan je veći diverzitet u sedimentima iz rudnika bakra u poređenju sa tradicionalnim pristupom, međutim nije pokazano prisustvo pojedinih sojeva koji su uspešno kultivisani.

4.3. Selekcija bakterijskih izolata tolerantnih na teške metale za potencijalnu primenu u bioremedijaciji

4.3.1. Sposobnost rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala

S obzirom da su u ovom radu korišćeni uzorci sedimenata poreklom iz sredine zagađene teškim metalima, izolovani MSI i MUI sojevi su testirani da li imaju sposobnost rasta u prisustvu teških metala na čvrstoj podlozi (Tabela 9). Pored bakterijskih sojeva izolovanih u ovom radu, za ispitivanje sposobnosti rasta u prisustvu teških metala korišćeni su i sojevi za koje je tolerancija na metale prethodno opisana u literaturi, i koji su navedeni u tabeli 2 (odeljak 3.3.). Od metala detektovanih u uzorcima sedimenata za testiranje je na osnovu koncentracije i dostupnosti rastvornih soli datih metala, odabrano njih sedam: Ni, Cd, Cr, Cu, Hg, Fe i Zn (Tabela 7). Iako Al, Co, Mn i As predstavljaju potencijalne zagađivače, oni nisu ušli u okvir ove studije. Kada su upotrebljene koncentracije metala 20 puta veće u odnosu na maksimalne koncentracije dozvoljene Pravilnikom o štetnim materijama Ministarstva životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja (EPA/Serbia, 1994), 6 sojeva je pokazalo rast u prisustvu 17 mM Ni²⁺, 6 u prisustvu 535 μM Cd²⁺, četiri u prisustvu 31,5 mM Cu²⁺, tri u prisustvu 38,5 mM Cr⁶⁺ i jedan soj je rastao u prisustvu 270 μM Hg²⁺ (Tabela 9). Nijedan od sojeva nije rastao u prisustvu 892 μM Fe³⁺ i 92,5 mM Zn²⁺. Među bakterijskim sojevima izolovanim u ovom radu, *Staphylococcus* sp. MSI08 je jedini rastao u prisustvu tri teška metala (Ni²⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺), čije su koncentracije bile 20 puta veće u odnosu na maksimalne koje su dozvoljene. Izolat *Staphylococcus* sp. MUI10 je rastao u prisustvu povišenih koncentracija Cd²⁺ i Cr⁶⁺, a *Staphylococcus* sp. MUI28 u prisustvu Cd²⁺ i Ni²⁺. Tri *Arthrobacter* sp. izolata (MSI30, MSI31 i MSI32) su rasla u prisustvu povišene koncentracije samo Ni²⁺. Među MSI izolatima ukupno 12,5% bilo je tolerantno na jedan ili više teških metala: 12,5% bilo je tolerantno na prisustvo Ni²⁺, 3% na

Cd²⁺ i 3% na Cr⁶⁺. U slučaju MUI izolata 6% je imalo sposobnost rasta u prisustvu teških metala: 6% tolerantnih na Cd²⁺, 3% na Ni²⁺ i 3% na Cu²⁺.

Tabela 9. Sojevi sa sposobnošću rasta u prisustvu teških metala na čvrstoj podlozi.

Soj	17 mM Ni ²⁺	535 µM Cd ²⁺	38.5 mM Cr ⁶⁺	31.5 mM Cu ²⁺	270 µM Hg ²⁺
MSI08	+ ^a	+	+		
MSI30	+				
MSI31	+				
MSI32	+				
MUI10		+		+	
MUI28	+	+			
<i>Rhodococcus</i> sp. TN101					+
<i>Bacillus</i> sp. TN102				+	
<i>Rhodococcus</i> sp. TN113				+	
<i>Rhodococcus</i> sp. TN401				+	
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34		+	+		
<i>Cupriavidus necator</i> H16	+				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1		+	+		
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440		+			

^a += rast

Kada su upotrebljene koncentracije koje odgovaraju 100 mM koncentraciji metalnog jona, broj sojeva koji su mogli tolerisati ove metale je značajno redukovan. U prisustvu 100 mM Cu²⁺ rasli su *Rhodococcus* sp. TN113, *Rhodococcus* sp. TN401 i *Bacillus* sp. TN102. U prisustvu 100 mM Hg²⁺ mogao je da raste *Rhodococcus* sp. TN101, a u prisustvu 100 mM Ni²⁺ rastao je soj *Cupriavidus necator* H16 (rezultati nisu prikazani).

4.3.2. Identifikacija izolata tolerantnih na teške metale na osnovu nukleotidne sekvence gena za 16S rRNK i filogenetska analiza

Šest sojeva izolovanih u ovoj studiji, za koje se pokazalo da imaju sposobnost rasta u prisustvu barem jednog teškog metala, identifikovano je na osnovu sekvenciranja 1300 bp gena za 16S rRNK (Tabela 10). Tri izolata su svrstana u rod *Staphylococcus* (MSI08, MUI10 i MUI28), dok su tri izolata svrstana u rod *Arthrobacter* (MSI30, MSI31 i MSI32). Pristupni brojevi sekvenci ovih izolata u NCBI bazi podataka su JX036476 - JX036481.

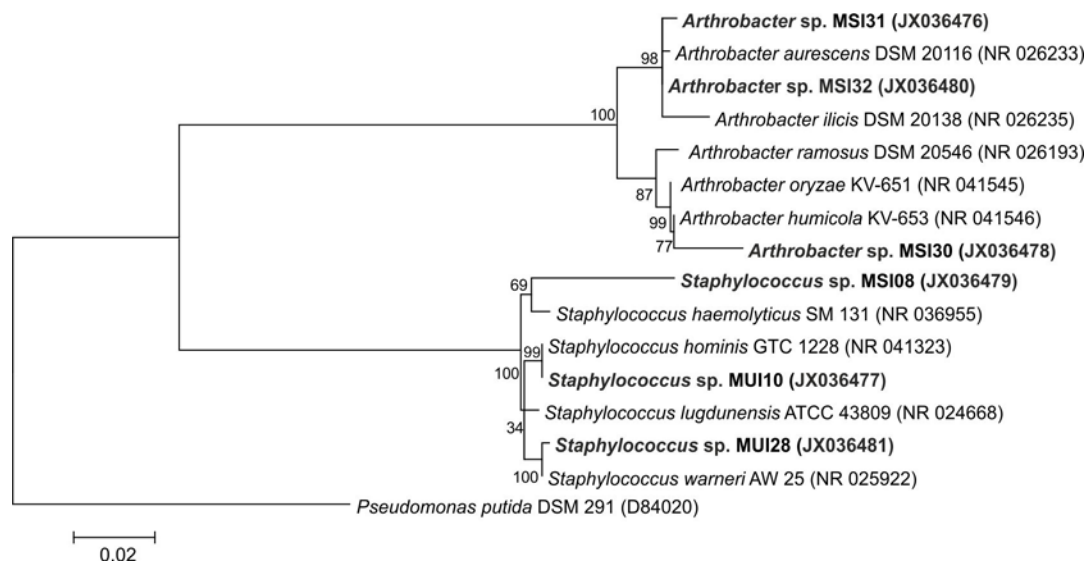
Tabela 10. Taksonomska identifikacija izolata tolerantnih na teške metale poređenjem sekvenci njihovih gena za 16S rRNK sa sličnim sekvencama deponovanim u GenBank bazi podataka.

Izolat	Najbolje poklapanje u GenBank bazi podataka		
	klasifikacija	pristupni broj	% identičnosti
MSI08	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	EU867340	95
MSI30	<i>Arthrobacter oryzae</i>	AB648969	98
MSI31	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	FN908762	99
MSI32	<i>Arthrobacter aurescens</i>	HQ597008	99
MUI10	<i>Staphylococcus hominis</i>	JQ660295	99
MUI28	<i>Staphylococcus aureus</i>	JF431908	99

U tabeli su prikazani sojevi sa čijim sekvencama gena za 16S rRNK je pokazano najveće poklapanje.

Da bi se utvrdio filogenetski odnos izolovanih sojeva sa već opisanim bakterijskim vrstama konstruisano je filogenetsko stablo koje se sastojalo od dve nezavisne klade: *Actinomycetales* (*Arthrobacter*) i *Bacillales* (*Staphylococcus*) (Slika 15). Svi izolati su pokazivali od 95% do 99% homologije sekvenci gena sa najrodnijim sekvencama deponovanim u GenBank bazi podataka.

Izolati MSI08, MUI10 i MUI28, koji su pripadali rodu *Staphylococcus*, međusobno su pokazivali od 93% do 95% sličnosti u sekvenci, a MSI30, MSI31 i MSI32, koji su bili svrstani u rod *Arthrobacter*, međusobno su pokazivali od 93% do 97% sličnosti u sekvenci gena za 16S rRNK.



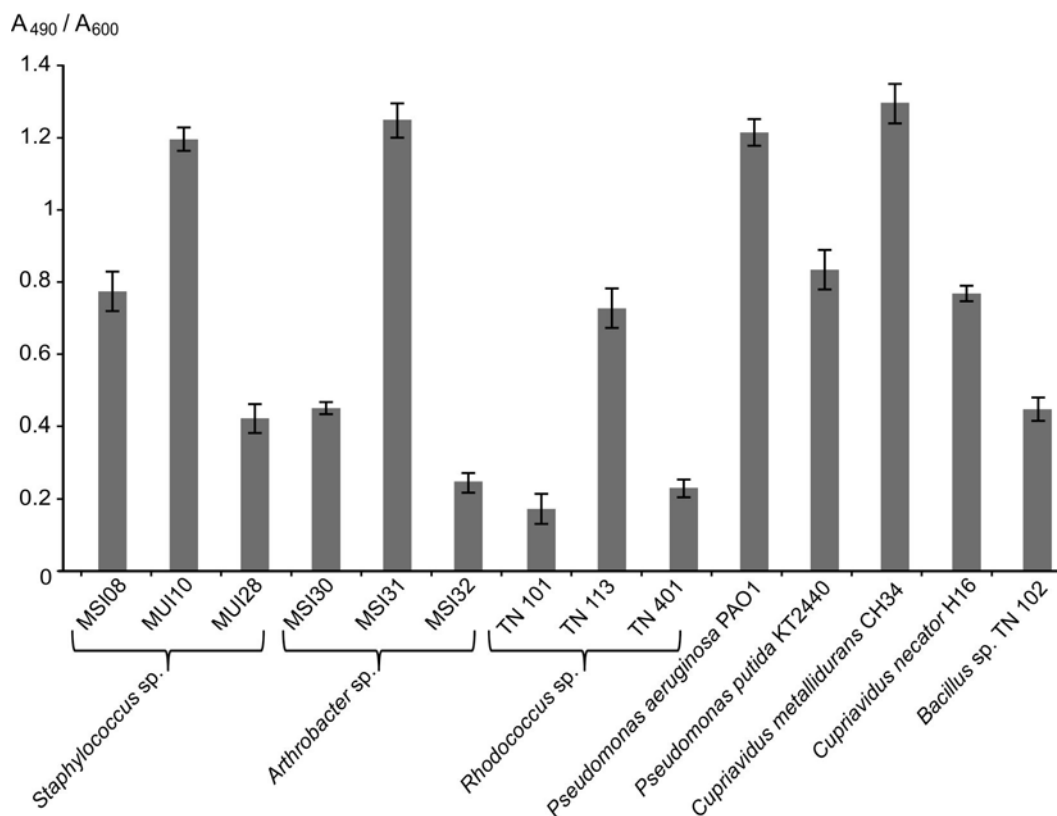
Slika 15. Filogenetsko stablo izolata tolerantnih na teške metale konstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci gena za 16S rRNK. Bakterije tolerantne na teške metale koje su izolovane u ovom radu prikazane su podebljanim slovima.

4.3.3. Sposobnost bakterijskih izolata da formiraju biofilm

Kako je sposobnost formiranja biofilma povezana sa povećanom tolerancijom na različite negativne sredinske uticaje, svi sojevi sa sposobnošću rasta u prisustvu povećanih koncentracija teških metala na čvrstoj podlozi (Tabela 9) testirani su za sposobnost formiranja biofilma u polistirenskim mikrotitarskim pločama sa 96 otvora (odjeljak 3.3.3.).

Pokazano je da testirani sojevi imaju sposobnost formiranja biofilma na polistirenu do različitog nivoa (Slika 16). Preliminarni eksperiment gajenja bakterijskog biofilma u MT medijumu ukazao je na znatno sporiji rast sojeva u ovim uslovima u odnosu na TSB medijumu, te je odlučeno da se rast bakterija optimizuje dodavanjem hidrolizata kazeina u MT medijumu. Rast slobodnoživećih bakterija meren je očitavanjem apsorbancije na 600 nm (A_{600}). Dodavanjem 0,1% i 1% (w/v) hidrolizata kazeina rast bakterija nije značajnije

pospešen i nakon 7 dana gajenja vrednosti A_{600} bile su manje od 0,4. Dodavanjem 1,5% i 2% (w/v) hidrolizata kazeina u MT medijum izolati su dostizali A_{600} od 0,6 do 0,8 na 600 nm već nakon 4 dana gajenja, tako da je u daljim eksperimentima korišćen MT medijum sa dodatkom 1,5% (w/v) hidrolizata kazeina. Mikrotitarske ploče su inkubirane 4 dana, a rast bakterijskog biofilma meren je očitavanjem apsorbancije na 490 nm (A_{490}) nakon bojenja safraninom (odjeljak 3.3.3.). Smatralo se da izolati sa izmerenom vrednošću A_{490} u rasponu od 1,5 do 2 čvrsto adsorbuju za zidove otvora mikrotitarskih ploča i imaju visoku sposobnost za formiranje biofilma (Heilmann *et al.*, 1996). Kako bi se stekao uvid u sposobnost formiranja biofilma, pored jačine adsorpcije ćelija u biofilmu koja je predstavljena sa A_{490} neophodno je uzeti u obzir i vrednost A_{600} koja ukazuju na rast samih izolata. Vrednosti odnosa A_{490} i A_{600} dobijene za izolate gajene u MT medijumu sa dodatkom 1,5% (w/v) hidrolizata kazeina (Slika 16) bile su uporedive sa vrednostima dobijenim za TSB medijum (rezultati nisu prikazani).



Slika 16. Sposobnost sojeva tolerantnih na teške metale da formiraju biofilm testirana u polistirenskim mikrotitarskim pločama gajenjem izolata 4 dana u MT medijumu sa dodatkom 1,5% (w/v) hidrolizata kazeina.

Prvu grupu sojeva, sa najvećim potencijalom za formiranje biofilma, činili su sojevi *Staphylococcus* sp. MUI10, *Arthrobacter* sp. MSI31, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Slika 16). U drugoj grupi bili su sojevi *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113, *Pseudomonas putida* KT2440 i *Cupriavidus necator* H16, čiji je prosečni potencijal za formiranje biofilma bio 1,6 puta manji od prosečnog potencijala sojeva iz prve grupe. Treću grupu sojeva sa najmanjim prosečnim potencijalom za formiranje biofilma, koji je bio 3,8 puta manji od prosečnog potencijala prve grupe, činili su sojevi *Staphylococcus* sp. MUI28, *Arthrobacter* sp. MSI30, *Arthrobacter* sp. MSI32, *Rhodococcus* sp. TN101, *Rhodococcus* sp. TN401 i *Bacillus* sp. TN102. Generalno, najveću sposobnost formiranja biofilma imali su predstavnici rodova *Pseudomonas* i *Cupriavidus*, i ona je bila u proseku od 2,6 do 1,3 puta veća u odnosu na predstavnike roda *Rhodococcus*, odnosno *Staphylococcus* (Slika 16).

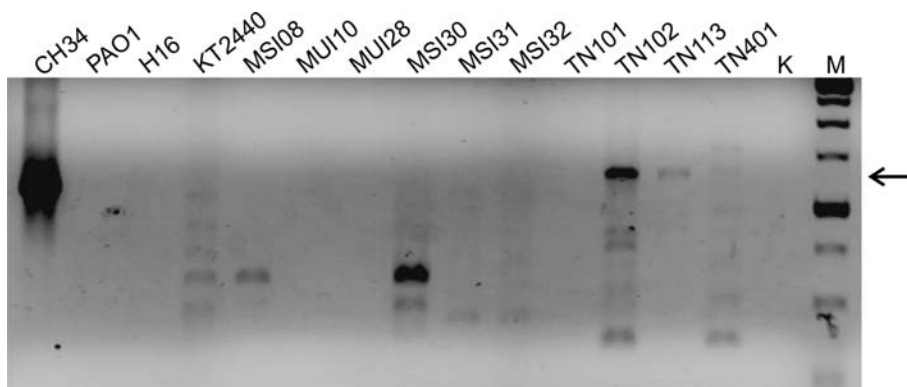
Među *Staphylococcus* sp. izolatima, MUI10 je pokazao najveći potencijal za formiranje biofilma, 1,5 i 2,8 puta veći od MSI08 i MUI28 izolata. Potencijal *Arthrobacter* sp. MSI31 bio je 2,7 puta veći od potencijala *Arthrobacter* sp. MSI30, i čak pet puta veći od potencijala MSI32. Među *Rhodococcus* sp. izolatima TN113 je imao najveći potencijal za formiranje biofilma, u poređenju sa TN101 i TN401 izolatima čiji su potencijali bili 4,3 i 3,2 puta manji.

4.3.4. Prisustvo gena za determinante rezistencije na teške metale

Rezistencija na teške metale kod bakterija predstavlja kompleksno regulisan sistem koji se sastoji od višestrukih nivoa zaštite (Nies, 2003). Bakterije poseduju različite mehanizme tolerancije na prisustvo teških metala i ti mehanizmi su najčešće kodirani genima lociranim na plazmidima, ali poznato je da su neki geni za determinante rezistencije i na hromozomima (Abou-Shanab *et al.*, 2007). Najbolji primer je soj *C. metallidurans* CH34 koji poseduje dva velika plazmida sa genetičkim determinantama rezistencije na veliki broj teških metala, uključujući i metale korišćene u ovoj studiji. Geni koji obezbeđuju rezistenciju na Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} i Cr^{6+} umnoženi su korišćenjem odgovarajućih prajmera navedenih u tabeli 4 (odjeljak 3.4.1.), dok je *C. metallidurans* CH34 korišćen kao

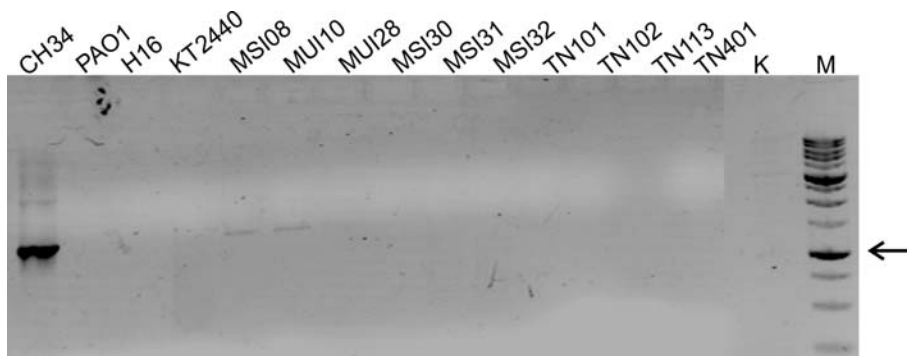
pozitivna kontrola. Prisustvo gena testirano je kod svih sojeva sa sposobnošću rasta u prisustvu povećanih koncentracija teških metala na čvrstoj podlozi (Tabela 9).

Od svih testiranih sojeva, sposobnost rasta u prisustvu Ni^{2+} imalo je 6 izolata (Tabela 9). Fragment gena za NccA efluks protein očekivane dužine od 1161 bp umnožen je samo kod pozitivne kontrole tj. soja *C. metallidurans* CH34 koji na čvrstoj podlozi nije rastao u prisustvu 17 mM Ni^{2+} , ali se iz literature zna da poseduje *nccA* gen (Slika 17). Fragment dužine malo iznad očekivane umnožen je kod izolata *Bacillus* sp. TN102 i *Rhodococcus* sp. TN113, od kojih *Bacillus* sp. TN102 nije rastao u prisustvu Ni^{2+} na čvrstoj podlozi, dok je *Rhodococcus* sp. TN113 mogao da raste pod tim uslovima (Tabela 9). Kod *Arthrobacter* sp. MSI30 umnožen je diskretan fragment dužine od približno 700 bp. PCR proizvodi neadekvatnih dužina su sekvencirani i pokazano je da umnoženi fragmenti nisu delovi *nccA* gena već je došlo do nespecifičnog vezivanja prajmera (rezultati nisu prikazani).



Slika 17. Analiza PCR proizvoda dobijenih umnožavanjem gena čiji produkt obezbeđuje rezistenciju na Ni^{2+} (*nccA*, 1161 bp); M – 1 kb DNK (NIPPON Genetics) marker; strelica pokazuje na očekivanu veličinu fragmenta; K – negativna kontrola.

Od 6 izolata sa sposobnošću tolerancije Cd^{2+} na čvrstoj podlozi kod sojeva *C. metallidurans* CH34, *Staphylococcus* sp. MSI08 i *Staphylococcus* sp. MUI10 umnoženo je 1885 bp gena za komponentu CzcABC efluks pumpe (Slika 18).



Slika 18. Analiza PCR proizvoda dobijenih umnožavanjem gena čiji produkt obezbeđuje rezistenciju na Cd^{2+} (*czcA*, 1885 bp); M – 1 kb DNK (NIPPON Genetics) marker; strelica pokazuje na očekivanu veličinu fragmenta; K – negativna kontrola.

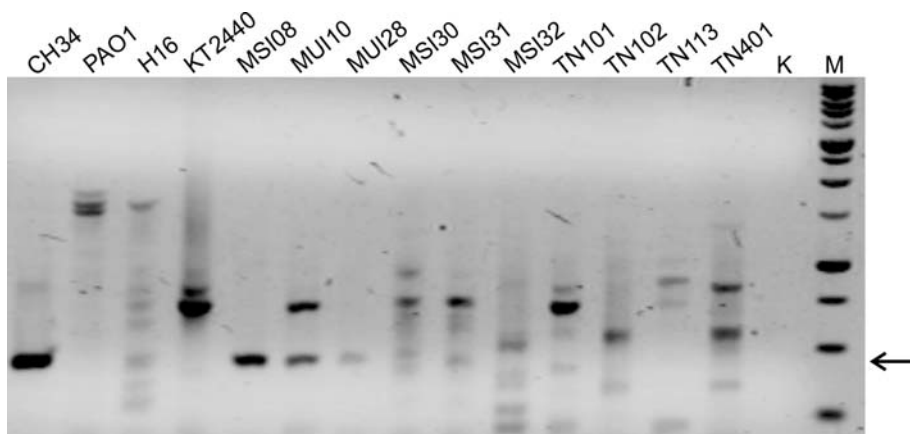
Sekvenciranjem PCR proizvoda kod *Staphylococcus* sp. MSI08 i *Staphylococcus* sp. MUI10 izolata potvrđeno je prisustvo *czcA* gena, čije sekvence su najveću sličnost na nukleotidnom nivou pokazale sa *czcA* genom soja *C. metallidurans* CH34 (Tabela 11). Grafički prikaz analize homologije dobijenih sekvenci i *czcA* gena soja *C. metallidurans* CH34 dat je u Prilogu I.

Tabela 11. Analiza sekvenci umnoženih gena za rezistenciju na teške metale.

Izolot	Umnožavan gen	Umnožavana dužina, bp	Dužina sekvenciranog fragmenta, bp	Najbolje poklapanje u GenBank bazi podataka		
				anotacija gena	% poklapanja	% identičnosti
MSI08	<i>czcA</i>	1885	1023	CzcA efluks pumpa <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	97	96
	<i>chrB</i>	450	426	Regulatorni protein ChrB <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	94	99
MUI10	<i>czcA</i>	1885	991	CzcA efluks pumpa <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	97	98
	<i>chrB</i>	450	432	Regulatorni protein ChrB <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	93	94
TN113	<i>copA1</i>	1186	1017	Bakar rezistentni protein CopA <i>Pseudomonas putida</i> ND6	98	99
PA01	<i>copA1</i>	1186	991	Bakar rezistentni protein CopA <i>Pseudomonas putida</i> W619	99	99

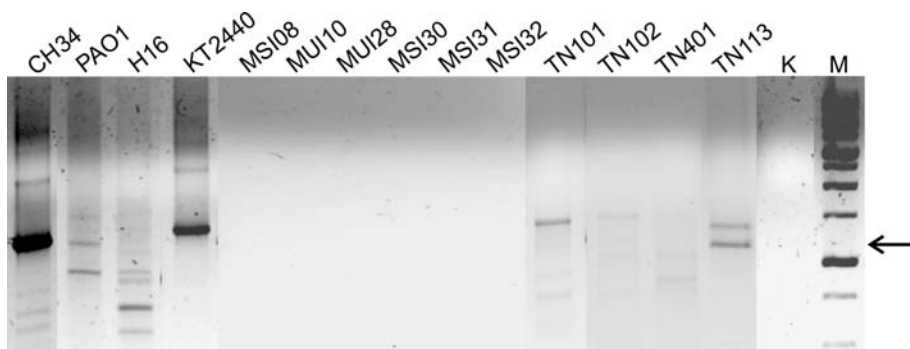
Iako su samo tri soja pokazala sposobnost rasta u prisustvu 38,5 mM Cr⁶⁺ na čvrstoj podlozi (Tabela 9), fragment *chrB* gena očekivane dužine od 450 bp umnožen je kod čak 6 izolata (Slika 19). Za soj *C. metallidurans* CH34 je iz literature poznato da poseduje gen za transkripcioni aktivator efluks pumpe, dok su PCR proizvodi dobijeni za ostale sojeve sekvencirani. Nakon sekvenciranja prisustvo *chrB* gena potvrđeno je samo kod izolata *Staphylococcus* sp. MSI08 i *Staphylococcus* sp. MUI10. Najbolje poklapanje u GenBank

bazi podataka *chrB* geni ova dva izolata pokazali su sa sekvencama *chrB* gena soja *C. metallidurans* CH34 (Tabela 11).



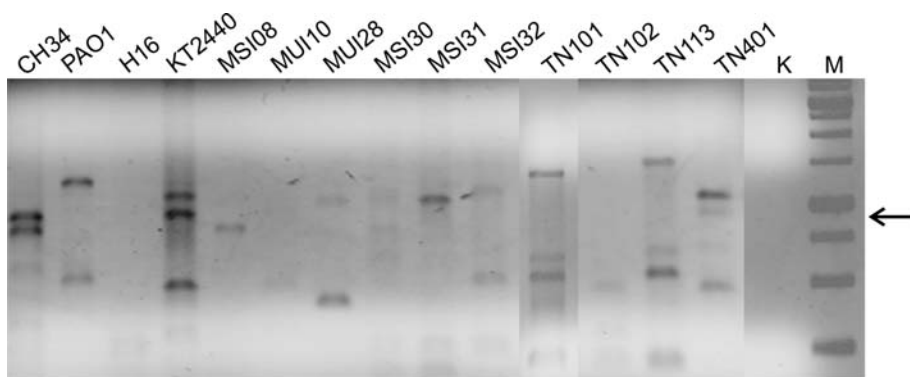
Slika 19. Analiza PCR proizvoda dobijenih umnožavanjem gena čiji produkt obezbeđuje rezistenciju na Cr^{6+} (*chrB*, 450 bp); M – 1 kb DNK (NIPPON Genetics) marker; strelica pokazuje na očekivanu veličinu fragmenta; K – negativna kontrola.

Među testiranim sojevima, kod četiri izolata koji su rasli na čvrstoj podlozi u prisustvu Cu^{2+} (Tabela 9) nije detektovano prisustvo gena za multi bakar oksidazu (Slika 20). Fragment *copA1* gena odgovarajuće dužine (1186 bp) umnožen je kod *C. metallidurans* CH34, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1, koji nisu pokazali sposobnost rasta u prisustvu Cu^{2+} na čvrstoj podlozi. Sekvenciranjem ovih PCR proizvoda potvrđeno je prisustvo *copA1* gena kod *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1, čija je nukleotidna sekvenca najveću sličnost pokazala sa sekvencom *copA* gena sojeva *P. putida* ND6 i W619 (Tabela 11). Kod soja *P. putida* KT2440 umnožen je diskretan fragment nešto veće dužine od očekivanog (Slika 20), čijim je sekvenciranjem pokazano da nije *copA1* gen, već je došlo do nespecifičnog vezivanja prajmera.



Slika 20. Analiza PCR proizvoda dobijenih umnožavanjem gena čiji produkt obezbeđuje rezistenciju na Cu^{2+} (*copA1*, 1186 bp); M – 1 kb DNK (NIPPON Genetics) marker; strelica pokazuje na očekivanu veličinu fragmenta; K – negativna kontrola.

Korišćenjem prajmera *merA_F* i *merA_R* (Tabela 4), fragment odgovarajuće dužine (779 bp) umnožen je kod soja *P. putida* KT2440, koji na čvrstoj podlozi nije imao sposobnost rasta u prisustvu $270\mu\text{M Hg}^{2+}$ (Slika 21). Sekvenciranje PCR proizvoda pokazalo je da umnoženi fragment nije *merA* gen (rezultati nisu prikazani). Kod *Rhodococcus* sp. TN101, koji je tolerisao Hg^{2+} na čvrstoj podlozi, nije detektovano prisustvo gena za rezistenciju na ovaj metal (Slika 21).



Slika 21. Analiza PCR proizvoda dobijenih umnožavanjem gena čiji produkt obezbeđuje rezistenciju na Hg^{2+} (*merA*, 779 bp); M – 1 kb DNK (NIPPON Genetics) marker; strelica pokazuje na očekivanu veličinu fragmenta; K – negativna kontrola.

4.4. Karakterizacija odabranih bakterijskih izolata tolerantnih na teške metale

Uzimajući u obzir rast izolata u prisustvu povećanih koncentracija teških metala (Tabela 9), sposobnost izolata da formiraju biofilm (Slika 16) i prisustvo gena za rezistenciju na teške metale (Slike 17-21) za dalji rad odabrano je sledećih pet sojeva:

1. *Staphylococcus* sp. MUI10 koji je pored velikog potencijala za formiranje biofilma imao i sposobnost rasta na Cd^{2+} i Cr^{6+} , kao i prisustvo gena za determinantu rezistencije na ta dva metala;
2. *Staphylococcus* sp. MSI08 koji je pored značajne sposobnosti za formiranje biofilma imao i sposobnost rasta u prisustvu Ni^{2+} , Cd^{2+} i Cr^{6+} i prisustvo *czcA* i *chrB* gena;
3. *Rhodococcus* sp. TN113 koji je pored sposobnosti formiranja biofilma i rasta u prisustvu 100 mM Cu^{2+} takođe posedovao i *copA1* gen;
4. *C. metallidurans* CH34 koje je pored posedovanja velikog broja gena za determinante rezistencije na različite teške metale takođe pokazao sposobnost formiranja biofilma i
5. *P. aeruginosa* PAO1, poznat u literaturi po svojoj sposobnosti formiranja biofilma, a takođe sa sposobnošću rasta u prisustvu Cu^{2+} zahvaljujući *copA1* genu.

4.4.1 Dinamika rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala u tečnoj kulturi

Uobičajeno je da neke bakterije koje imaju sposobnost rasta u prisustvu teških metala, veću toleranciju na povišene koncentracije teških metala pokazuju na čvrstoj podlozi u poređenju sa tečnom podlogom (Hassen *et al.*, 1998; Yilmaz, 2003). U ovom radu to je i pokazano određivanjem dinamike rasta pet odabranih izolata u tečnom MT medijumu sa dodatkom odgovarajućih metala (odjeljak 3.3.1.). Koncentracije Cd^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+} su inkrementalno povećavane po 10 – 20% do dostizanja koncentracija na kojima izolati nisu pokazivali rast.

Maksimalne koncentracije ova tri teška metala na kojima su odabrani izolati pokazivali rast prikazane su u tabeli 12, dok su reprezentativne krive rasta prikazane u Prilogu II.

Tabela 12. Rast pet odabranih bakterijskih sojeva u prisustvu teških metala u tečnoj kulturi.

Soj	Maksimalne koncentracije metala na kojima je pokazan rast (mM)		
	Cd ²⁺	Cr ⁶⁺	Cu ²⁺
<i>Staphylococcus</i> sp. MSI08	-*	3	-
<i>Staphylococcus</i> sp. MUI10	-	1	2
<i>Rhodococcus</i> sp. TN113	-	-	10
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	5	-	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	5	-	10

* - = odsustvo rasta

4.4.2. Osnovne biohemijske karakteristike

Kako je jedan od ciljeva ove studije bio selekcija izolata sa aplikacionim potencijalom u bioremedijaciji sredina zagađenih teškim metalima, bilo je neophodno detaljno okarakterisati nove sojeve.

Pored sposobnosti izolata MSI08 da toleriše prisustvo povišenih koncentracija Ni²⁺, Cd²⁺ i Cr⁶⁺ (odjeljak 4.3.1.), pokazano je da može da raste u prisustvu 10% (w/v) NaCl, kao i da ima sposobnost rasta u MT medijumu pH vrednosti 4 (Tabela 13). Izolat MUI10 je, pored sposobnosti rasta u prisustvu Cd²⁺ i Cu²⁺, mogao da raste i u MT medijumu sa dodatkom 10% NaCl, ali za razliku od MSI08 izolata nije mogao da raste u MT podlozi na nižim pH vrednostima medijuma. Preostala tri soja, iako nisu mogli da rastu u medijumima sniženih pH vrednosti, imali su sposobnost rasta u prisustvu 10% (w/v) NaCl i 1% (w/v) NaF.

Tabela 13. Sposobnost rasta izolata u tečnoj kulturi na nižim pH vrednostima i u prisustvu povišenih koncentracija NaCl i NaF.

Soj	Prisustvo karakteristike			
	pH 2	pH 4	10% (w/v) NaCl	1% (w/v) NaF
<i>Staphylococcus</i> sp. MSI08	-*	+	+	-
<i>Staphylococcus</i> sp. MUI10	-	-	+	-
<i>Rhodococcus</i> sp. TN113	-	-	+	+
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	-	-	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	-	-	+	+

* - = odsustvo rasta; + = rast

Standardni set biohemijskih testova za identifikaciju bakterija pokazao je značajne razlike između dva izolata roda *Staphylococcus*. Dok je *Staphylococcus* sp. MSI08 mogao da koristi skoro sve ponuđene izvore ugljenika, *Staphylococcus* sp. MUI10 je mogao da koristi samo glukozu i arabinozu (Tabela 14). *Staphylococcus* sp. MSI08 je pokazivao sposobnost hidrolize eskulina ali ne i uree, dok je *Staphylococcus* sp. MUI10 mogao da hidrolizuje ureu ali ne eskulin. Izolat *Rhodococcus* sp. TN113 je jedini pokazao sposobnost rasta u prisustvu 100 mM Cu²⁺. Pokazano je da može da toleriše prisustvo 10% NaCl i 1% NaF u MT medijumu, ali nije mogao da raste na nižim pH vrednostima medijuma (Tabela 13). *Rhodococcus* sp. TN113 je mogao da koristi samo glukozu kao izvor ugljenika, dok je od ponuđenih izvora nitrata mogao da koristi sve sem L-piroglutaminske kiseline. Kao i *Staphylococcus* sp. MUI10 pokazivao je sposobnost hidrolize uree ali ne i eskulina (Tabela 14).

Tabela 14. Biohemijske karakteristike izolata *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10 i *Rhodococcus* sp. TN113.

Biohemijski test		Prisustvo karakteristike		
		Izolat		
		MSI08	MUI1	TN113
Korišćenje izvora ugljenika	Trehaloza	+*	-	-
	Laktoza	+	-	-
	Saharoza	+	-	-
	Glukoza	+	+	+
	Manitol	+	-	-
	Maltotrijoza	+	-	-
	Arabinoza	-	+	-
	Glicerol	-	-	-
	Fruktoza	+	-	-
Korišćenje izvora azota	L-arginin	-	+	+
	L-valin	-	-	+
	L-fenilalanin	-	-	+
	L-piroglutaminska kiselina	+	-	-
	L-triptofan	-	+	+
	L-izoleucin	-	-	+
Prisustvo enzima za hidrolizu substrata	Urea	-	+	+
	Eskulin	+	-	-
	β -D-celobiozid	-	-	-
	β -D-glukozid	+	+	+
	α -D-maltozid	+	+	+
	α -D-galaktozid	-	-	-
	Fosfat	+	+	+

* + = rast; - = odsustvo rasta

4.5. Mehanizmi tolerancije bakterijskih izolata na teške metale

Do sada je u literaturi opisan veliki broj bakterija sa sposobnošću tolerancije pojedinačnih teških metala, međutim, u zagađenoj sredini se najčešće nalaze kompleksne smeše različitih metala kao i drugih organskih i neorganskih zagađivača. Za rešavanje problema

kontaminacije neke sredine upotrebom bioremedijacije, od velikog su značaja bakterije sposobne da opstanu u prisustvu većeg broja teških metala istovremeno. U ovoj studiji korišćena je smeša tri teška metala (Cu^{2+} , Cd^{2+} i Cr^{6+}) koji su izabrani na osnovu podataka elementalne analize uzoraka i karakteristika rezistencije slobodnoživećih bakterija tolerantnih na teške metale.

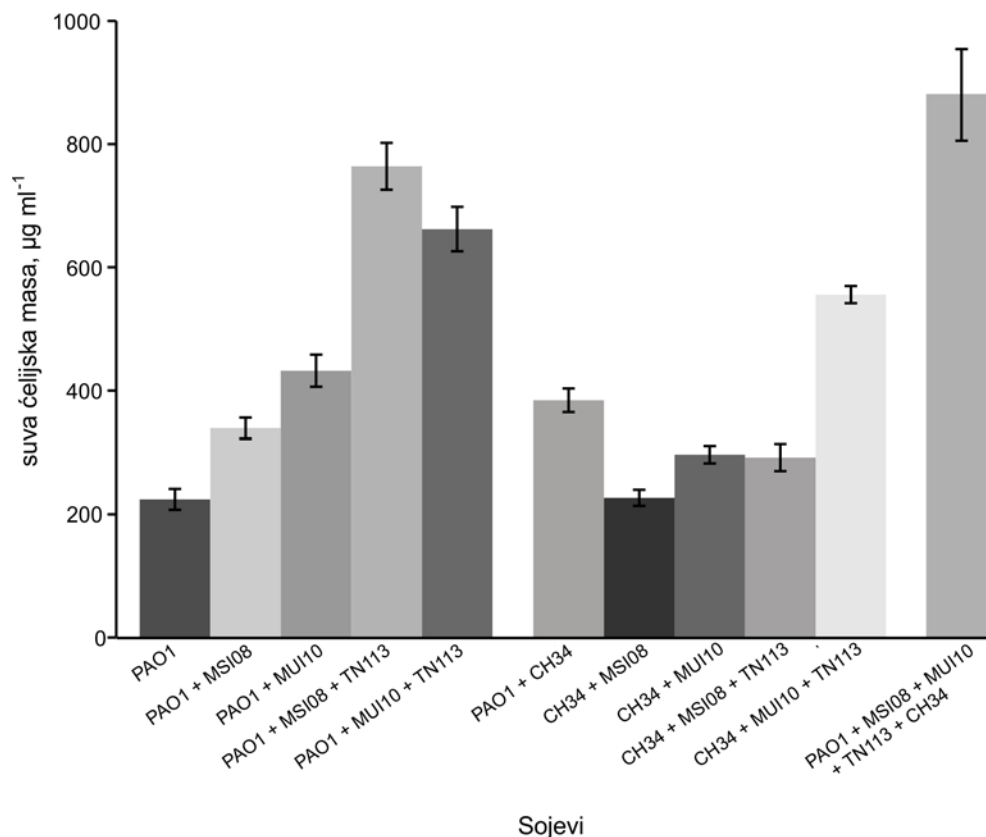
4.5.1. Istovremena tolerancija slobodnoživećih bakterija na više teških metala u tečnoj kulturi

Uzimajući u obzir maksimalne koncentracije pojedinačnih metala na kojima su izolati pokazali sposobnost rasta u tečnoj kulturi (odjeljak 4.3.6.), definisana je smeša tri metala (5 mM Cu^{2+} , 2,5 mM Cd^{2+} i 1,5 mM Cr^{6+}) u čijem prisustvu su gajene bakterijske kulture, a rast određivan i izražen kao suva ćelijska masa.

4.5.1.1. Sposobnost rasta pojedinačnih bakterija i definisanih zajednica u prisustvu smeše metala

Od pet bakterijskih sojeva (odjeljak 4.4.) pokazano je da je samo *P. aeruginosa* PAO1 mogao da toleriše istovremeno prisustvo tri metala (Slika 22). Stoga je tolerancija na smešu teških metala testirana i kod bakterijskih zajednica koje su definisane imajući u vidu sposobnost pojedinačnih izolata da rastu u prisustvu pojedinačnih teških metala pri čemu je kao kriterijum uzimana u obzir i sposobnost formiranja biofilma. Jedna vrsta definisanih zajednica bile su kombinacije *P. aeruginosa* PAO1 sa *C. metallidurans* CH34, *Staphylococcus* sp. MSI08 ili *Staphylococcus* sp. MUI10, kako bi se testiralo da li ovi sojevi pospešuju akumulaciju biomase PAO1 koji je već imao sposobnost rasta na sva tri metala istovremeno. Kod ovako definisanih zajednica bilo je moguće detektovati prisustvo gena za determinante rezistencije na sva tri metala (Tabela 11) ili rast u tečnoj kulturi na svakom od tri pojedinačna metala (Tabela 12). Dodatkom *Staphylococcus* sp. MSI08 akumulacija ukupne suve ćelijske mase povećala se 1,5, odnosno 1,9 puta dodatkom *Staphylococcus* sp. MUI10, u odnosu na ćelijsku masu koja je dobijena kada je *P. aeruginosa* PAO1 gajen pojedinačno u prisustvu smeše metala (Slika 22). Dodatno, ispitane su i zajednice *P. aeruginosa* PAO1 sa *Staphylococcus* sp. MSI08 ili sa

Staphylococcus sp. MUI10, kojima je dodat *Rhodococcus* sp. TN113, pri čemu je dodatak ovog soja povećao ukupnu ćelijsku masu 2,25, odnosno 1,53 puta u poređenju sa zajednicom dva odgovarajuća soja (Slika 22).



Slika 22. Sposobnost rasta pojedinačnih bakterija i definisanih zajednica u prisustvu smeše 2,5 mM Cd²⁺, 1,5 mM Cr⁶⁺ i 5 mM Cu²⁺. Bakterije su gajene 48 h u MT medijumu sa smešom metala, nakon čega je izmerena suva ćelijska masa. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

Dodavanje soja *C. metallidurans* CH34, koji je posedovao gene za rezistenciju na sva tri metala, a nije mogao da raste u prisustvu Cr⁶⁺ pojedinačno, a ni u smeši tri metala u tečnoj kulturi, povećalo je ćelijsku masu 1,7 puta u odnosu na dobijenu masu kada je *P. aeruginosa* PAO1 gajen pojedinačno u prisustvu smeše metala. Stoga je definisana druga grupa zajednica u kojoj su soju *C. metallidurans* CH34 dodavani izolati kao u primeru sa *P. aeruginosa* PAO1. Kako *C. metallidurans* CH34 samostalno nije mogao da raste u prisustvu smeše tri metala, dodavanje bilo kog soja ili kombinacije sojeva

omogućavalo je rast zajednice u prisustvu smeše metala. Suva ćelijska masa ovako definisanih zajednica bila je uporediva sa masom dobijenom kada je *P. aeruginosa* PAO1 gajen pojedinačno u prisustvu smeše metala, osim u slučaju zajednice *C. metallidurans* CH34, *Staphylococcus* sp. MUI10 i *Rhodococcus* sp. TN113, čija je biomasa bila 2,5 puta veća od mase *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 22).

Najefikasnija akumulacija ćelijske mase postignuta je u zajednici koju je činilo svih pet sojeva (*Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1). Dobijena masa je bila četiri puta veća od mase dobijene gajenjem *P. aeruginosa* PAO1 pojedinačno u prisustvu smeše metala.

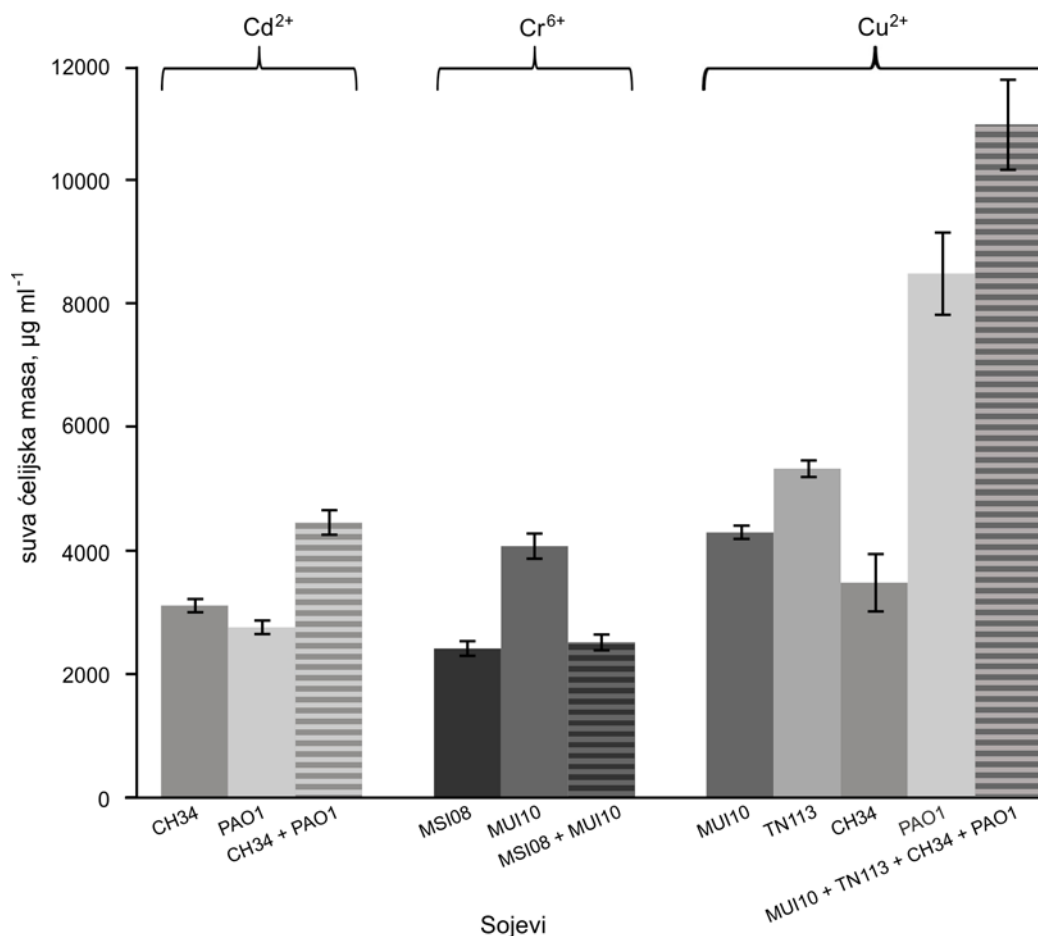
4.5.1.2. Sposobnost rasta zajednica bakterija tolerantnih na isti teški metal u prisustvu tog metala

Zajednice bakterija tolerantnih na isti metal, testirane su na sposobnost rasta u prisustvu tog metala u koncentraciji u kojoj se taj metal nalazio u smeši (Slika 23).

C. metallidurans CH34 i *P. aeruginosa* PAO1 su rasli u prisustvu Cd^{2+} i nosili su gen za determinante rezistencije na Cd^{2+} . Kombinacija ova dva soja dovela je do porasta izmerene suve ćelijske mase 1,5 puta u poređenju sa masama izmerenim za pojedinačne sojeve.

Staphylococcus sp. MSI08 i *Staphylococcus* sp. MUI10 su rasli u prisustvu Cr^{6+} i nosili su genetičke determinante rezistencije na ovaj metal. Suva ćelijska masa izmerena za zajednicu dva *Staphylococcus* sp. izolata bila je približno jednaka masi izmerenoj za *Staphylococcus* sp. MSI08, a 1,6 puta manja od mase *Staphylococcus* sp. MUI10, što ukazuje da je kombinovanjem dva *Staphylococcus* sp. izolata došlo do inhibicije rasta jednog od njih.

Iako su čak četiri soja imala sposobnost rasta u prisustvu Cu^{2+} , za *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1 je pokazano da poseduju gen za multi bakar oksidazu, dok se za *Staphylococcus* sp. MUI10 ne zna kojim je mehanizmom tolerancija na Cu^{2+} obezbeđena. Kada je sastavljena zajednica ova četiri soja izmerena masa se povećala 2 puta u odnosu na prosečnu vrednost pojedinačnih sojeva, što je ukazalo na postojanje sinergističkog delovanja među ovim izolatima.



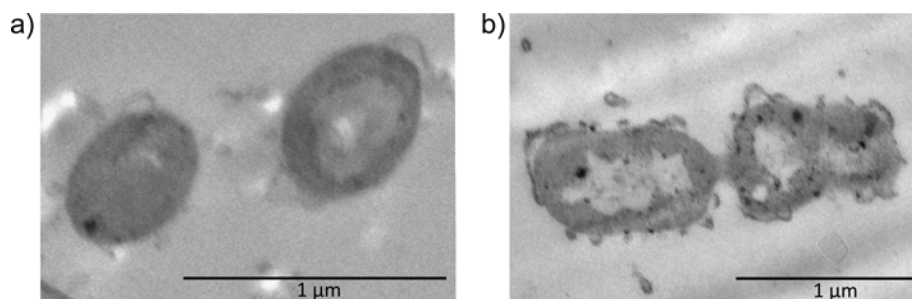
Slika 23. Sposobnost rasta zajednice bakterija tolerantnih na isti teški metal u prisustvu tog metala. Bakterije su gajene 48 h u MT medijumu sa dodatim odgovarajućim metalom: 2,5 mM Cd²⁺, 1,5 mM Cr⁶⁺ ili 5 mM Cu²⁺, nakon čega je izmerena suva ćelijska masa. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

4.5.2. Tolerancije bakterijskih biofilmova na prisustvo pojedinačnih teških metala

Bakterijski biofilmovi predstavljaju specifičan mehanizam kojim bakterije povećavaju toleranciju na teške metale prisutne u sredini (Harrison *et al.*, 2007). U ovoj studiji testirane su tolerancije pojedinačnih biofilmova pet odabranih sojeva: *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1, na prisustvo pojedinačnih metala: Cd²⁺, Cr⁶⁺ i Cu²⁺ u dve različite koncentracije. Prva koncentracija je bila maksimalna koncentracija metala na kojoj je određeni slobodnoživeći soj rastao u tečnoj kulturi (Tabela 12). Druga koncentracija je bila

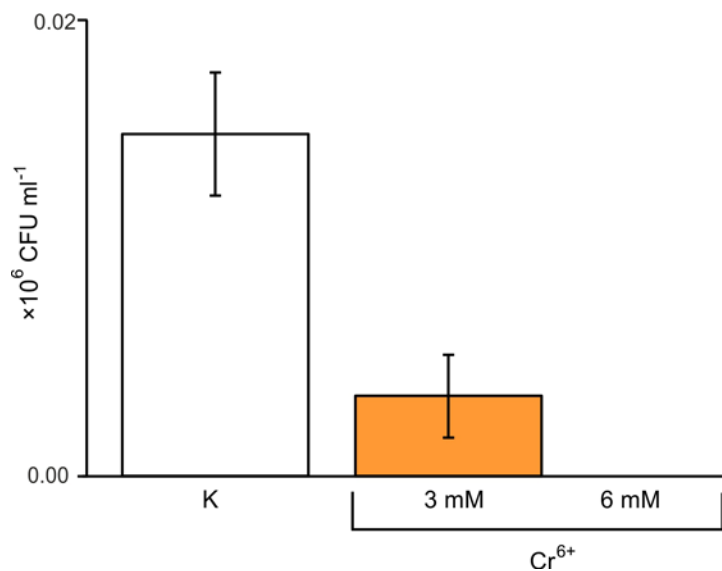
dva puta veća za svaki od metala. Nakon inkubacije biofilma u prisustvu metala određivan je broj vijabilnih ćelija uklanjanjem biofilma sa silikonskih cevčica u PBS pufer uz pomoć ultrazvučnih talasa i određivanjem CFU takvog rastvora (odjeljak 3.4.3.).

Izolat *Staphylococcus* sp. MSI08 je na čvrstoj podlozi rastao u prisustvu Cd^{2+} i Cr^{6+} , i posedovao je gene za determinante rezistencije na ova dva metala, ali je u tečnoj kulturi imao sposobnost rasta samo u prisustvu 3 mM Cr^{6+} . Da bi se detaljnije utvrdilo kakav uticaj prisustvo metala ima na slobodnoživeće ćelije u tečnoj kulturi, za ovaj izolat urađena je i transmisiona elektronska mikroskopija uzoraka tečne kulture gajene bez prisustva metala (Slika 24 a) i u prisustvu 3 mM Cr^{6+} (Slika 24 b). U oba slučaja ćelije *Staphylococcus* sp. MSI08 bile su sličnih dimenzija i oblika, ali sa određenim morfološkim razlikama. Bakterijske ćelije gajene u prisustvu 3 mM Cr^{6+} posedovale su ekstraćelijski matriks (Slika 24 b), što je uobičajeno za ćelije koje rastu u prisustvu visokih koncentracija teških metala. Na slici 24 b može se uočiti ćelija u deobi, što ukazuje da i u prisustvu povećane koncentracije Cr^{6+} *Staphylococcus* sp. MSI08 ima sposobnost aktivne deobe i rasta.



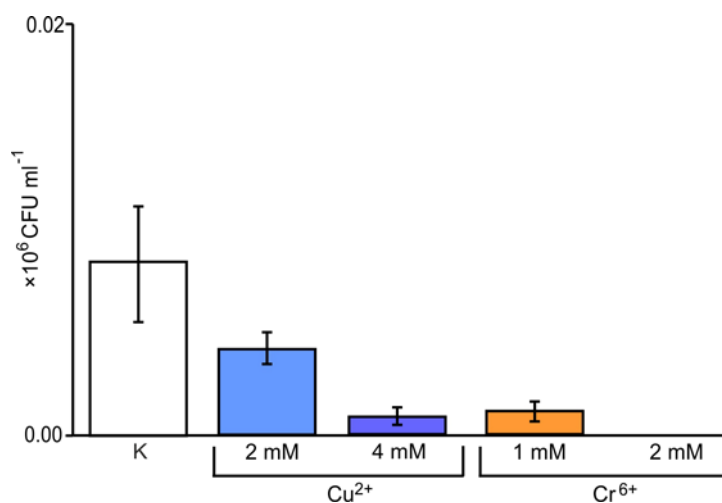
Slika 24. Transmisiona elektronska mikroskopija izolata *Staphylococcus* sp. MSI08 gajenog u MT medijumu a) bez dodatka metala i b) sa dodatkom 3 mM Cr^{6+} .

Biofilm izolata *Staphylococcus* sp. MSI08 testiran je na sposobnost rasta u prisustvu 3 mM i 6 mM Cr⁶⁺. Poređenjem dobijenih rezultata sa kontrolnim eksperimentom u kom je biofilm gajen u MT medijumu bez dodatog Cr⁶⁺ zaključili smo da je biofilm *Staphylococcus* sp. MSI08 slabo rastao u prisustvu 3 mM Cr⁶⁺, i da nije tolerisao prisustvo 6 mM Cr⁶⁺ (Slika 25).



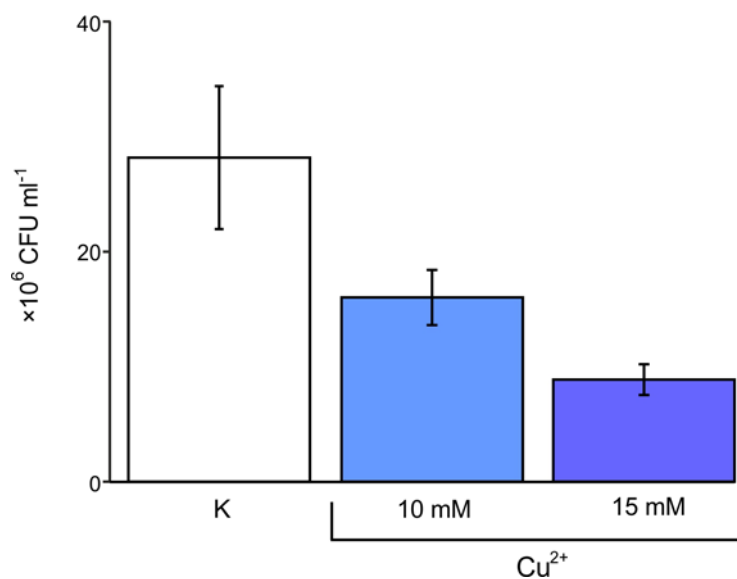
Slika 25. Tolerancija biofilma *Staphylococcus* sp. MSI08 na prisustvo Cr⁶⁺. K – rast biofilma u MT medijumu bez dodatog Cr⁶⁺. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

Slobodnoživeći *Staphylococcus* sp. MUI10 rastao je u tečnoj kulturi u prisustvu 1 mM Cr⁶⁺ i 2 mM Cu²⁺ (za čiju rezistenciju je posedovao i gene). Međutim, kad je testirana sposobnost rasta biofilma na ovim, i dvostruko većim koncentracijama Cr⁶⁺ i Cu²⁺ odvojeno, detektovan je rast biofilma samo u prisustvu 4 mM Cu²⁺ (Slika 26). Uzimajući u obzir da je dobijena vrednost 8 puta manja od vrednosti kontrole, ne može se jednoznačno zaključiti da je biofilm *Staphylococcus* sp. MUI10 rastao i da je tolerantniji od slobodnoživećih formi ovog izolata.



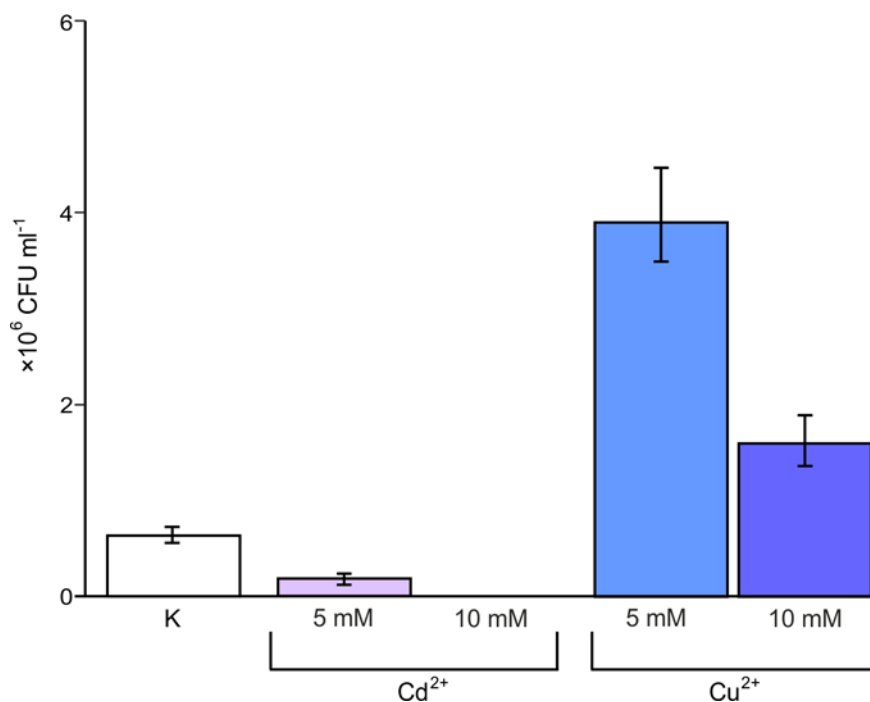
Slika 26. Tolerancija biofilma *Staphylococcus* sp. MUI10 na prisustvo Cu²⁺ i Cr⁶⁺. K – rast biofilma u MT medijumu bez dodatih metala. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

Rhodococcus sp. TN113 je bio tolerantan na prisustvo Cu^{2+} , kako na čvrstoj podlozi tako i u tečnom medijumu, i ta tolerancija je bila obezbeđena *copA1* genom koji kodira enzim multi bakar oksidazu. Dok je u tečnoj kulturi slobodnoživeći *Rhodococcus* sp. TN113 rastao u prisustvu maksimalne koncentracije od 10 mM Cu^{2+} , biofilm rastao u prisustvu 10 mM ali i 15 mM Cu^{2+} , iako 1,8 puta slabije (Slika 27), što je ukazalo na to da biofilm *Rhodococcus* sp. TN113 može da poveća toleranciju ovog izolata na Cu^{2+} .



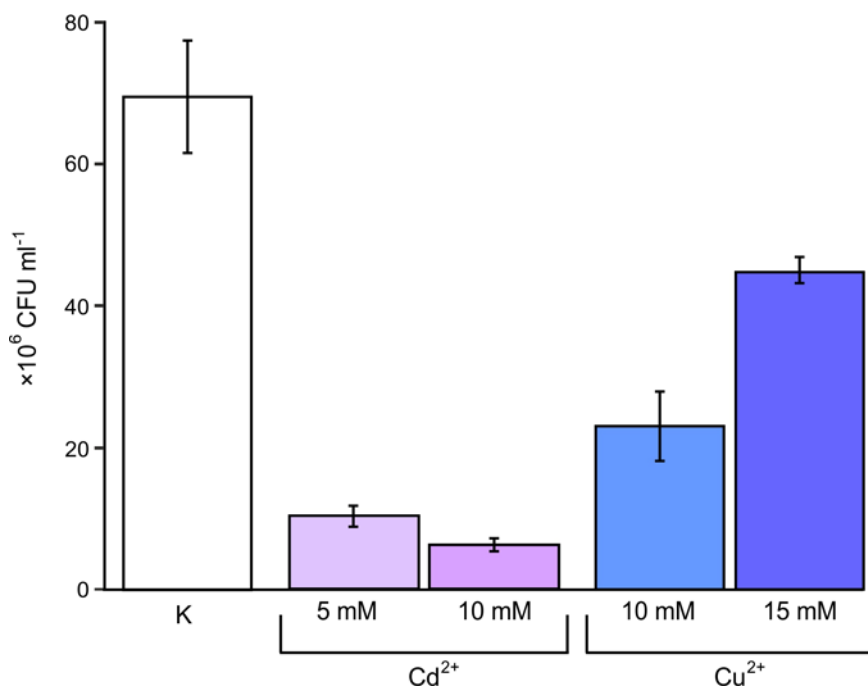
Slika 27. Tolerancija biofilma *Rhodococcus* sp. TN113 na prisustvo Cu^{2+} . K – rast biofilma u MT medijumu bez dodatog Cu^{2+} . Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

C. metallidurans CH34, izolat koji poseduje gene za determinante rezistencije na sve metale testirane u ovoj studiji (Tabela 12), rastao je u tečnoj kulturi samo u prisustvu 5 mM Cd^{2+} i 5 mM Cu^{2+} (Slika 28). Dobijeni rezultati pokazali su da biofilm *C. metallidurans* CH34 nije tolerantniji na prisustvo Cd^{2+} u poređenju sa slobodnoživećim oblikom, s obzirom da nije rastao u prisustvu 10 mM Cd^{2+} . Sa druge strane, biofilm *C. metallidurans* CH34 je rastao u prisustvu obe testirane koncentracije Cu^{2+} . Iako 2,4 puta manji nego u prisustvu 5 mM Cu^{2+} , rast biofilma u prisustvu 10 mM Cu^{2+} ukazao je na povećanu toleranciju biofilma u odnosu na slobodnoživeću bakteriju.



Slika 28. Tolerancija biofilma *Cupriavidus metallidurans* CH34 na prisustvo Cd^{2+} i Cu^{2+} . K – rast biofilma u MT medijumu bez dodatih metala. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

Soj *P. aeruginosa* PAO1 je na čvrstoj podlozi rastao u prisustvu Cd^{2+} i Cr^{6+} , a PCR reakcijom je detektovano prisustvo gena (*copA1*) za determinantu rezistencije na Cu^{2+} . Međutim, u tečnoj kulturi, *P. aeruginosa* PAO1 nije rastao u prisustvu pojedinačnog Cr^{6+} , već je mogao da toleriše samo prisustvo 5 mM Cd^{2+} i 10 mM Cu^{2+} . Rezultati testiranja tolerancije biofilma *P. aeruginosa* PAO1 su prikazani na slici 29 i pokazali su da je biofilm ovog soja tolerantniji na prisustvo Cd^{2+} i Cu^{2+} u poređenju sa slobodnoživećim sojem, s obzirom da je imao sposobnost rasta u prisustvu 10 mM Cd^{2+} i 15 mM Cu^{2+} , što su koncentracije koje slobodnoživeći soj nije mogao da toleriše.



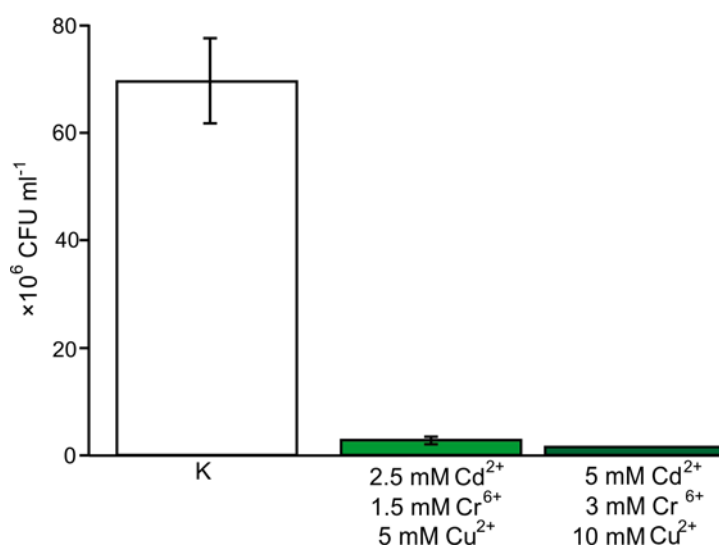
Slika 29. Tolerancija biofilma *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 na prisustvo Cd^{2+} i Cu^{2+} . K – rast biofilma u MT medijumu bez dodatih metala. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

4.5.3. Tolerancija bakterijskih biofilмова na prisustvo više teških metala istovremeno

U cilju ispitivanja sposobnosti bakterijskog biofilma da raste u prisustvu smeše Cu^{2+} , Cd^{2+} i Cr^{6+} korišćene su koncentracije metala navedene u odeljku 4.3.1. (5 mM Cu^{2+} , 2,5 mM Cd^{2+} i 1,5 mM Cr^{6+}) kao i dvostruko veće koncentracije koje slobodnoživeće bakterije nisu mogle da tolerišu u tečnoj kulturi (10 mM Cu^{2+} , 5 mM Cd^{2+} i 3 mM Cr^{6+}). Rast bakterijskog biofilma u prisustvu dvostruko većih koncentracija metala u smeši, potvrdio bi

pretpostavku da je biofilm tolerantnija forma od slobodnoživeće i da predstavlja jedan od načina da se potencijalno reši problem kompleksnih zagađenja.

P. aeruginosa PAO1 je jedini soj koji je samostalno rastao u prisustvu smeše metala (Slika 22). Međutim, biofilm ovog soja rastao je u prisustvu smeše metala nižih koncentracija 2000 puta slabije nego u MT medijumu bez metala, a u prisustvu dvostruko većih koncentracija metala u smeši rast je bio 7000 puta manji od kontrolnog tako da možemo zaključiti da je biofilm znatno slabije rastao (Slika 30).



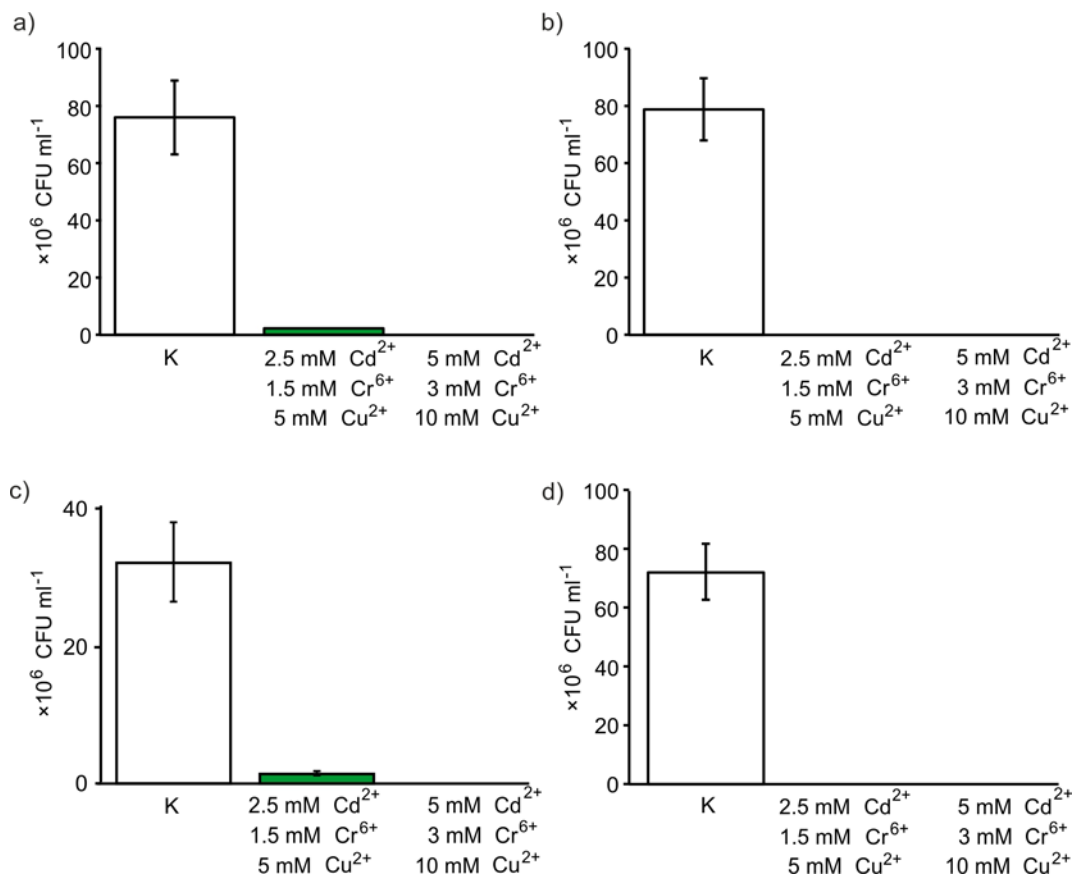
Slika 30. Tolerancija biofilma *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 u prisustvu smeše Cd $^{2+}$, Cr $^{6+}$ i Cu $^{2+}$. K – rast biofilma u MT medijumu bez smeše metala. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

Na osnovu sposobnosti bakterijskih zajednica, sastavljenih od slobodnoživećih bakterija, da rastu u prisustvu smeše Cu^{2+} , Cd^{2+} i Cr^{6+} (Slika 22) odabrane su četiri bakterijske zajednice sa najvećom sposobnošću tolerancije smeše metala i testirana je tolerancija njihovih biofilmova:

- *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 31 a);
- *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 31 b);
- *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113 i *C. metallidurans* CH34 (Slika 31 c);
- *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 31 d).

Biofilm zajednice koju su činili *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1 je u prisustvu smeše metala nižih koncentracija, koje toleriše i zajednica slobodnoživećih bakterija, rastao 86 puta slabije nego u MT medijumu bez metala (Slika 31 a). Biofilm zajednice koju su činili *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113 i *C. metallidurans* CH34 (Slika 31 c) u prisustvu smeše metala nižih koncentracija pokazao je 23 puta slabiji rast od kontrolnog rasta u MT medijumu bez metala. U prisustvu smeše metala viših koncentracija, koje zajednice slobodnoživećih bakterija nisu mogle da tolerišu, nije bilo rasta ni navedenih biofilmova.

Biofilmovi preostale dve zajednice (Slika 31 b i d) nisu pokazali sposobnost rasta u prisustvu smeše metala, za razliku od istih zajednica sastavljenih od slobodnoživećih bakterija, koje su tolerisale smešu metala nižih koncentracija.

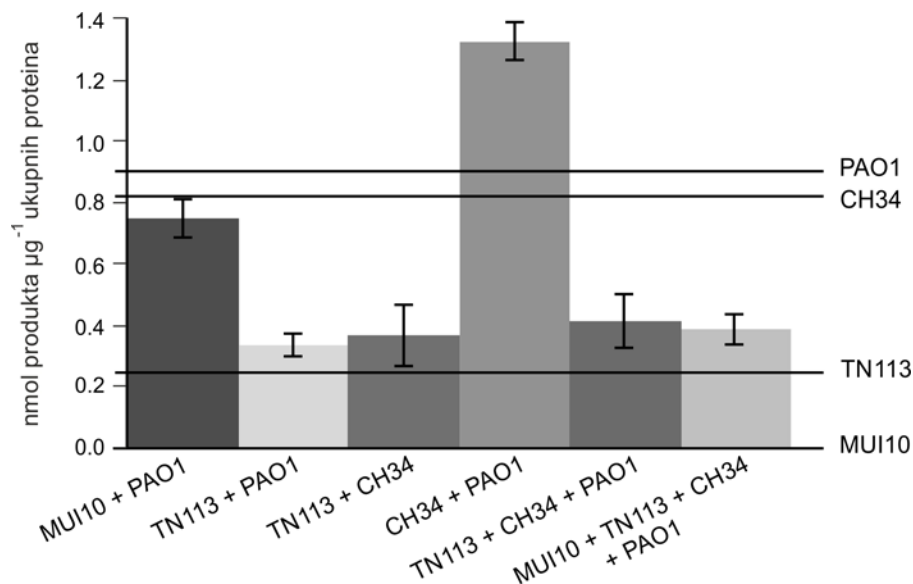


Slika 31. Tolerancija na prisustvo smeše Cd²⁺, Cr⁶⁺ i Cu²⁺ kod biofilmova bakterijskih zajednica sastavljenih od: a) *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; b) *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; c) *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113 i *Cupriavidus metallidurans* CH34 i d) *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *Cupriavidus metallidurans* CH34 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. K – rast biofilma u MT medijumu bez smeše metala. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

4.5.4. Aktivnost enzima multi bakar oksidaze

Multi bakar oksidaze su enzimi koji oksiduju jednovalentni bakar, koji može da ulazi u bakterijske ćelije, do dvovalentnog koji nema tu sposobnost. Kako su ovo obično periplazmatični enzimi, oni svojom aktivnošću onemogućavaju ulazak bakra u ćelije i njegovo toksično delovanje na ćelijske komponente (Grass and Rensing, 2001).

Iako je u ovoj studiji među testiranim izolatima detektovano postojanje *copA1* gena koji kodira multi bakar oksidazu (CopA), to nije bio pokazatelj postojanja aktivnog CopA enzima i aktivnog mehanizma tolerancije. Kako CopA ima sposobnost oksidacije 2,6-dimetoksifenola u prisustvu Cu^{2+} , to je iskorišćeno za indirektno određivanje aktivnosti CopA (odjeljak 3.6.4.). Četiri soja su imala sposobnost rasta u prisustvu Cu^{2+} u tečnoj kulturi i to su: *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1, pri čemu samo kod *Staphylococcus* sp. MUI10 nije detektovano prisustvo gena za CopA, što je ukazalo da neki drugi mehanizam obezbeđuje toleranciju ovog soja na Cu^{2+} . Aktivnosti enzima pojedinačnih sojeva prikazane su horizontalnim linijama na slici 32. Aktivnost CopA nije detektovana kod soja *Staphylococcus* sp. MUI10, što je i očekivano s obzirom na nepostojanje gena za ovaj enzim. *P. aeruginosa* PAO1 je imao najveću aktivnost CopA enzima, 1,1 put veću od aktivnosti CopA *C. metallidurans* CH34 i 3,7 puta veću od CopA *Rhodococcus* sp. TN113. Aktivnost CopA detektovana kod bakterijskih zajednica ova četiri soja prikazana je vertikalnim stupcima na slici 32. Zajednica sojeva *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1 povećala je aktivnost CopA enzima 1,5 puta u odnosu na aktivnost enzima pojedinačnih izolata. Zajednica *Rhodococcus* sp. TN113 sa *C. metallidurans* CH34 ili sa *P. aeruginosa* PAO1 smanjuje aktivnost enzima u poređenju sa pojedinačnim sojevima i to 2,7 puta kad je u pitanju *P. aeruginosa* PAO1, odnosno 2,2 puta u slučaju *C. metallidurans* CH34. Aktivnost CopA enzima zajednice *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1 smanjila se 3,2 puta dodavanjem *Rhodococcus* sp. TN113. Pokazano je da *Rhodococcus* sp. TN113 smanjuje aktivnost CopA u zajednicama tako što inhibira rast *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1 (rezultati nisu prikazani). Dodavanje *Staphylococcus* sp. MUI10 nije uticalo na nivo aktivnosti, što je i očekivano.



Slika 32. Aktivnost enzima multi bakar oksidaze (CopA) izražena kao količina produkta nastalog oksidacijom 2,6-dimetoksifenola po 1 μg ukupnih proteina. Vertikalni stupci pokazuju nivo aktivnosti CopA enzima bakterijskih zajednica, dok horizontalne linije pokazuju aktivnost CopA enzima pojedinačnih bakterijskih sojeva. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta.

4.6. Uticaj bakterijskih biofilmova na *in vitro* proces luženja

Na osnovu sposobnosti pojedinačnih izolata i bakterijskih zajednica da rastu u prisustvu više metala istovremeno (Slika 22) odabrani su:

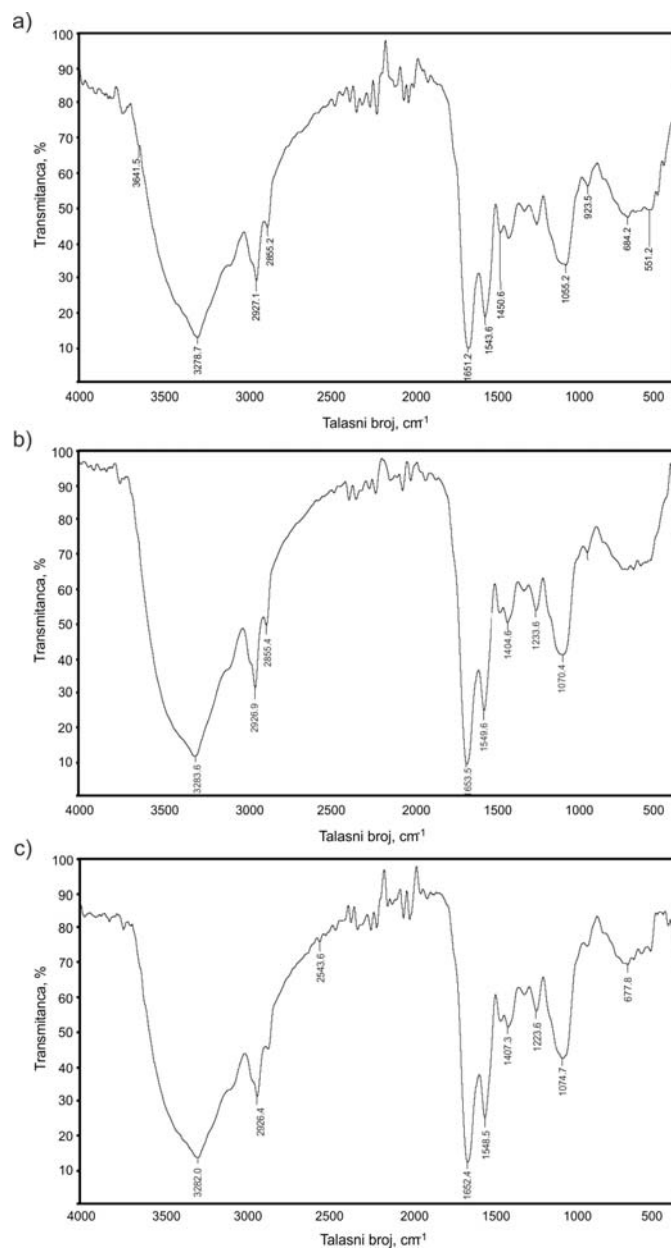
1. *P. aeruginosa* PAO1, kao jedini izolat koji je samostalno mogao da raste u prisustvu smeše metala,
2. zajednica koju su činili *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1 i
3. zajednica koju su činili *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1

koji su pokazali najbolji rast u prisustvu smeše metala i ispitan je uticaj njihovih biofilмова na process bioluženja *in vitro*. Prvo su biofilmovi hemijski okarakterisani, i analiziran je uticaj prisustva teških metala na preživljavanje ćelija u biofilmu.

4.6.1. Hemijska karakterizacija biofilma i uticaj metala na bakterijski biofilm

4.6.1.1. FT-IR spektroskopija

Analizom FTIR spektara tri testirana biofilma utvrđeno je prisustvo karakterističnih apsorpcionih traka koje odgovaraju strukturama tipičnim za polisaharidne i proteinske molekule (Slika 33). Široka kompleksna apsorpciona traka u oblasti 3000 – 3500 cm^{-1} odgovara valentnim vibracijama O-H grupa kao i simetričnim i asimetričnim vibracijama istezanja N-H veza. Apsorpcioni pik u oblasti 2920 – 2940 cm^{-1} odnosi se na valentne vibracije metilenskih $-\text{CH}_2$ grupa. Traka na 1020 cm^{-1} pripisuje se valentnim vibracijama C-O-C veza i preklapa se sa pikom na 1000-1100 cm^{-1} koji se odnosi na vibracije istezanja C-C veza i C-O-C veza glikozidno vezanih heksopiranoza. Prisustvo većeg sadržaja proteina u ispitivanim uzorcima može se uočiti na osnovu intenzivne apsorpcije na 1635 cm^{-1} , zatim pikova na 1520 cm^{-1} i 1412 cm^{-1} kao i široke trake u regionu 3000 – 3500 cm^{-1} . Intenzivna traka na 1635 cm^{-1} preklapa se sa apsorpcijom aromata, (C=C i C=O vibracije istezanja), što bi bila indikacija prisustva aromatičnih amino kiselina, na šta ukazuje i traka na oko 1540 cm^{-1} koja takođe potiče od aromata. Traka na oko 1407 cm^{-1} potiče od alifatičnih grupa. Karakteristične trake slabog intenziteta i to pik na oko 890 cm^{-1} ukazuje na β -glikozidne veze, dok se trake na 920 cm^{-1} i 850 cm^{-1} odnose na prisustvo α -glikozidnih veza u polisaharidnoj strukturi biofilma.



Slika 33. FT-IR spektri biofilmova: a) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; b) zajednice koju su činili *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; c) zajednice koju su činili *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *Cupriavidus metallidurans* CH34 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

4.6.1.2. Elementalna organska mikroanaliza i analiza šećera biofilmova

Ukupan sadržaj azota (N), ugljenika (C), kiseonika (O) i sumpora (S) testiranih biofilmova (odeljak 4.6.) prikazan je u tabeli 15.

Tabela 15. Rezultati elementalne organske mikroanalize uzoraka biofilmova.

Uzorak biofilma	Mikroanaliza (g kg ⁻¹)			
	N	C	H	S
PAO1	76.9	431.9	26.4	/
MSI08 TN113 PAO1	81.0	441.6	42.0	/
MSI08 MUI10 TN113 PAO1 CH34	79.0	426.6	68.6	/

Sadržaj ukupnog azota je varirao od 76,9 do 81,0 g kg⁻¹ suve mase biofilma u zavisnosti sastava biofilma. Sadržaj ugljenika bio je ujednačen u sva tri testirana biofilma, dok je sadržaj ukupnog vodonika u biofilmu sastavljenom od svih pet izolata bio 1,6 puta veći od biofilma sastavljenog od tri izolata i 2,6 puta veći od sadržaja vodonika u biofilmu *P. aeruginosa* PAO1. Ni u jednom uzorku biofilma nije detektovano prisustvo sumpora (Tabela 15).

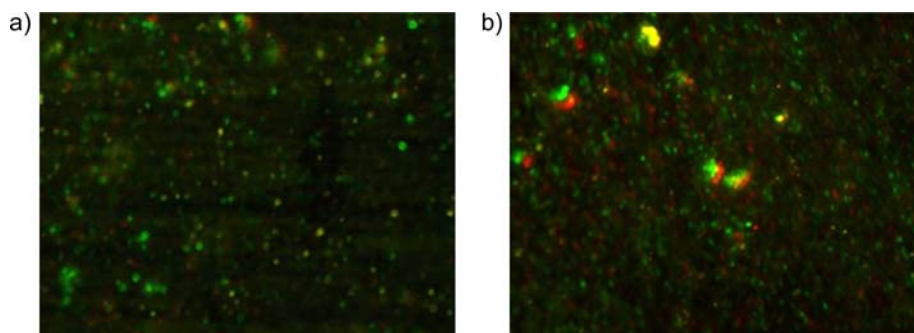
Određivanje sadržaja proteina iz sadržaja ukupnog azota se dobija množenjem sa konverzionim faktorom 6,25 (Nitrogen to Protein Factor–NP Factor) koji se uobičajeno koristi za preračunavanje sadržaja ukupnih proteina iz sadržaja ukupnog azota. Dobijeni rezultati pokazuju da se sadržaj proteina u ispitivanim biofilmovima nalazio u opsegu od 480 – 506 g kg⁻¹ suve mase biofilma, pri čemu je bio najveći u biofilmu sastavljenom od tri izolata.

Sastav šećera u uzorcima biofilmova određen je na osnovu hromatografske pokretljivosti poređenjem sa standardima. Utvrđeno je da je D-glukopiranoza bila dominantna komponenta u sva tri ispitana biofilma, dok su D-galaktopiranoza i D-manopiranoza bile zastupljene u znatno manjem stepenu.

4.6.1.3. Bojenje slobodnoživećih bakterija i biofilmova

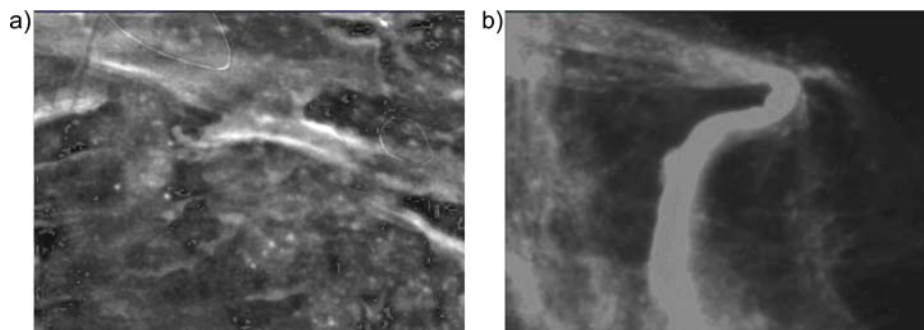
Slobodnoživeće bakterije i bakterijski biofilmovi (odjeljak 4.6.) uspješno su bojani kombinacijom boja: SYTO[®] 9 koja boji intaktne bakterijske ćelije zeleno i propidijum jodid koji boji mrtve bakterijske ćelije sa oštećenom ćelijskom membranom crveno.

Bojenjem slobodnoživećih bakterija i bakterijskih zajednica gajenih pod istim uslovima sa jedinom razlikom u prisustvu to jest odsustvu smeše metala, pokazano je da u kulturama koje su gajene bez prisustva metala ima manje mrtvih bakterijskih ćelija (Slika 34 a) u poređenju sa kulturama gajenim u prisustvu metala (Slika 34 b).



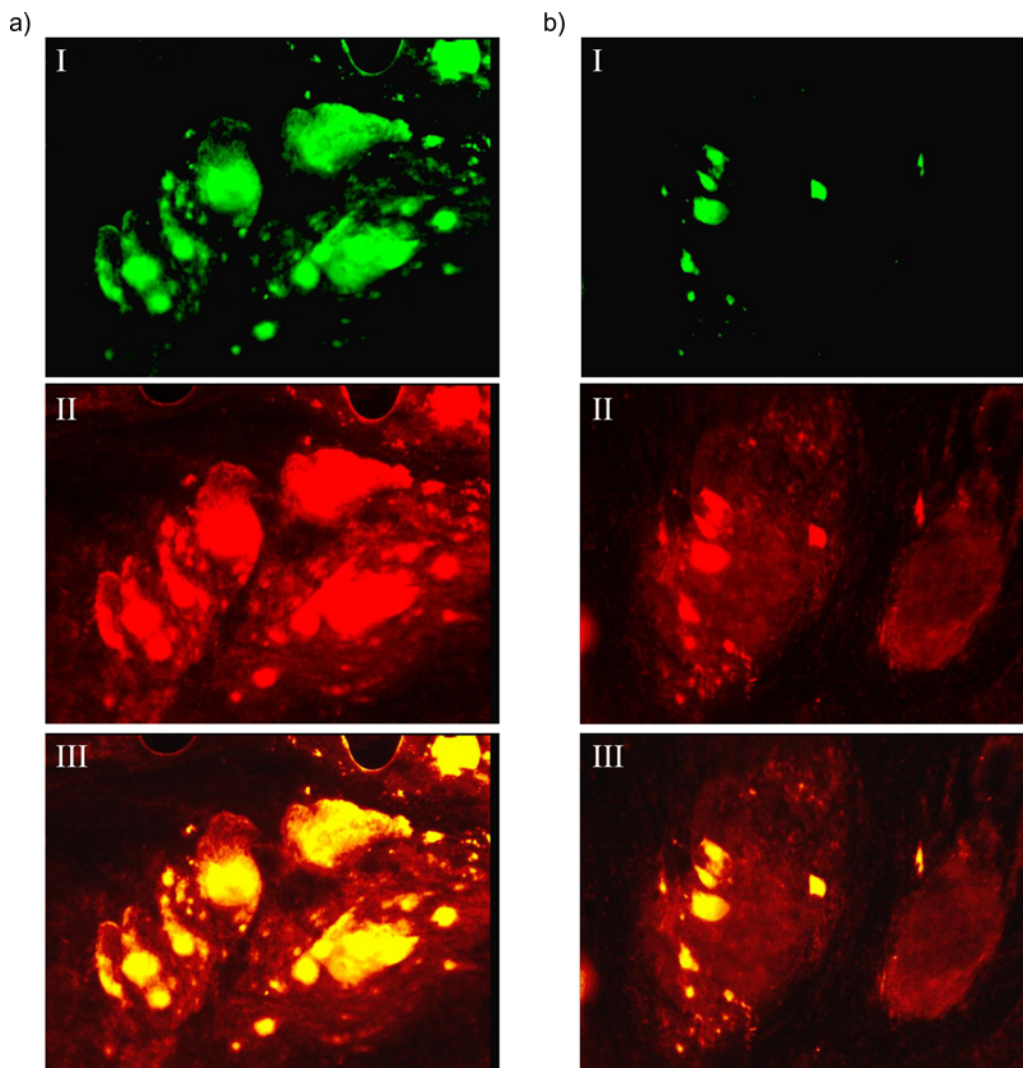
Slika 34. Bojenje zajednica slobodnoživećih bakterija *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *Cupriavidus metallidurans* CH34 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 gajenih: a) bez metala i b) u prisustvu smeše metala. (Za mikroskopiranje je korišćeno uveličanje 40×).

Svi bakterijski biofilmovi gajeni bez metala i u prisustvu smeše metala posmatrani su pod mikroskopom bez bojenja i izgledali su ujednačeno sa karakterističnim egzopolisaharidnim sluzavim strukturama, tako da su prikazani rezultati mikroskopiranja biofilma zajednice svih pet sojeva (Slika 35).



Slika 35. Bakterijski biofilmovi zajednice *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *Cupriavidus metallidurans* CH34 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a) gajeni bez metala i b) gajeni u prisustvu smeše metala, posmatrani na mikroskopu bez bojenja. (Za mikroskopiranje je korišćeno uveličanje 40 \times).

Međutim, bojenjem je utvrđeno da kod biofilmova gajenih u prisustvu smeše metala ima manje živih bakterijskih ćelija, što je i očekivano (Slika 36 b, rezultati bojenja prikazani samo za biofilm zajednice pet sojeva). Pokazano je da, bez obzira na smanjeni broj živih ćelija, i u prisustvu metala dolazi do formiranja biofilmova koji se po strukturi ne razlikuju od biofilmova gajenih bez metala (Slika 36 a).

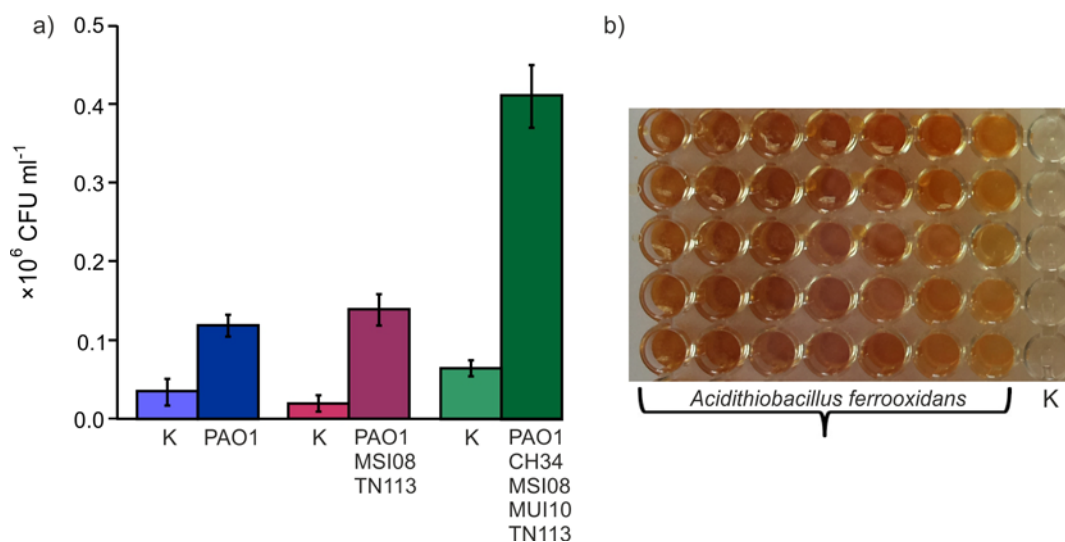


Slika 36. Bakterijski biofilmovi zajednice *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *Cupriavidus metallidurans* CH34 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a) gajeni bez metala i b) gajeni u prisustvu smeše metala; I – bojenje živih ćelija, II – bojenje mrtvih ćelija, III – preklopljene slike živih i mrtvih ćelija. (Za mikroskopiranje je korišćeno uveličanje 40×).

4.6.2. Rast bakterijskog biofilma u prisustvu *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Kao prvi korak u utvrđivanju mogućnosti primene biofilмова u procesima bioluženja, bilo je neophodno utvrditi da li bakterijski biofilmovi (odjeljak 4.6.) mogu da opstanu u medijumu niske pH vrednosti kao sto je medijum 9K (pH 3,5), i da li utiču na rast soja *A. ferrooxidans* koji se tradicionalno koristi u bioluženju. Kada su pojedinačni sojevi

gajeni u medijumu pH vrednosti 2 i 4, samo je jedan izolat imao sposobnost rasta u ovakvim uslovima (Tabela 13). Međutim u eksperimentu na mikrotitarskim pločama (odjeljak 3.5.3.) utvrđeno je da formirani biofilmovi mogu da prežive uslove gajenja u medijumu niske pH vrednosti (kontrolne na slici 37 a), kao i da mogu da opstanu u takvom medijumu zajedno sa *A. ferrooxidans* tokom 10 dana inkubacije (Slika 37 a). Takođe je pokazano da veći broj ćelija može da preživi uslove niske pH vrednosti medijuma kada je soj *A. ferrooxidans* prisutan. Dok je broj preživelih bakterijskih ćelija bio ujednačen za *P. aeruginosa* PAO1 i zajednicu *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1, u slučaju zajednice svih pet sojeva (*Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1) nisku pH vrednost i prisustvo *A. ferrooxidans* preživelo je 3 puta više bakterijskih ćelija (Slika 37). S druge strane, *A. ferrooxidans* je rastao neometano u prisustvu sva tri testirana biofilma (Slika 37 b).

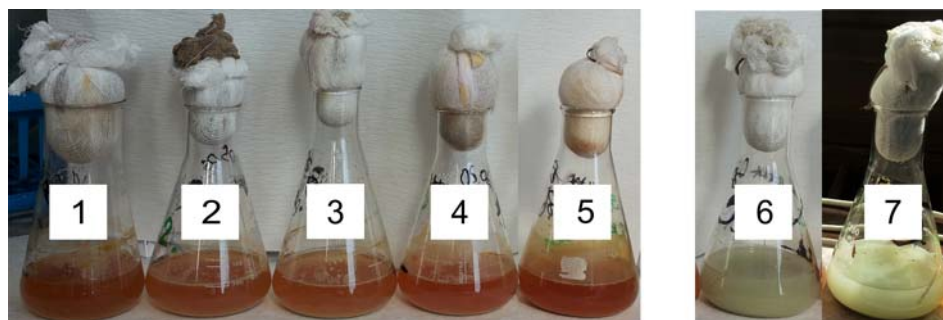


Slika 37. a) Sposobnost rasta 3 biofilma u prisustvu *A. ferrooxidans* u 9K medijumu, K – rast biofilma u 9K medijumu; b) rast *A. ferrooxidans* u prisustvu biofilma, K – 9K medijum.

4.6.3. *In vitro* model luženja

Za *in vitro* eksperiment bioluženja jalovine u 9K medijumu, koji je rađen je kao što je opisano u odeljku 3.5.4., pored *A. ferrooxidans* korišćene su i tri vrste biofilmova, a u postavku eksperimenta su bila uključena i tri kontrolna modela (Slika 38). U svaki erlenmajer, pored 9K medijuma, dodavan je *A. ferrooxidans*, biofilmovi i jalovina poznatog sastava i karakteristika (Tabela 6) po sledećoj shemi:

1. *A. ferrooxidans* i jalovina;
2. *A. ferrooxidans*, biofilm soja *P. aeruginosa* PAO1 i jalovina;
3. *A. ferrooxidans*, biofilm zajednice *P. aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i jalovina;
4. *A. ferrooxidans*, biofilm zajednice *P. aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i jalovina;
5. kontrolni rast *A. ferrooxidans* u 9K medijumu, bez dodate jalovine;
6. kontrolni rast sva tri biofilma u 9K medijumu sa dodatom jalovinom;
7. kontrola 9K medijuma sa dodatom jalovinom.



Slika 38. Eksperiment bioluženja jalovine u 9K medijumu pomoću soja *Acidithiobacillus ferrooxidans* i biofilmova. 1 – kontrolno luženje jalovine samo sa sojem *A. ferrooxidans*, 2 – dodat biofilm soja *P. aeruginosa* PAO1, 3 – dodat biofilm zajednice *P. aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113, 4 – dodat biofilm zajednice *P. aeruginosa* PAO1, *Cupriavidus metallidurans* CH34, *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113; 5 – kontrolni rast *A. ferrooxidans* u 9K medijumu; 6 – kontrolni rast sva tri biofilma sa jalovinom u 9K medijumu; 7 – samo jalovina u 9K medijumu.

Tokom inkubacije, crvena boja nastala u uzorcima 1 – 5 ukazivala je na normalan i ujednačen rast *A. ferrooxidans* u 9K medijumu (slično kao što je prikazano na slici 37 b). Kao što je bilo očekivano, u odsustvu *A. ferrooxidans* nije došlo do oksidacije gvožđa iz samog medijuma sa jalovinom, bez obzira na prisustvo biofilmova (Slika 38 uzorci 6 i 7). Ovi rezultati su se ogledali i u vrednostima pH i oksido-redukcionim potencijalima izmerenim u medijumima nakon luženja (Tabela 16). pH vrednost se snizila za 0,23 jedinice, a oksido-redukциони potencijal se nije promenio u uzorku gde su bili prisutni samo biofilmovi i jalovina (uzorak 6). U ostalim uzorcima pH vrednost se snizila za 0,44 – 0,75 jedinica tokom bioluženja, dok se oksido-redukциони potencijal povećao od 1,64 – 1,76 puta (Tabela 16). Najveća promena i pH vrednosti i oksido-redukcionog potencijala izmerena je u uzorku 4, gde je pored *A. ferrooxidans* bio prisutan uzorak biofilma zajednice svih pet izolata (Tabela 16).

Tabela 16. pH i oksido-redukциони potencijal medijuma na kraju eksperimenta *in vitro* luženja.

Uzorak	pH	oksidoredukциони potencijal, mV
1	1.74	740
2	1.78	785
3	1.72	785
4	1.69	795
5	1.70	780
6	2.22	450
Podloga 9K	2.45	450

Nakon procesa bioluženja, pomoću ICP optičke emisije spektroskopije, određene su koncentracije elementarnih metala u rastvorima (Tabela 17). Vrednosti prikazane u tabeli 17 se odnose na količine metala izlužene isključivo iz jalovine (oduzimanjem vrednosti uzorka 5 u kom je u medijumu bio prisutan samo *A. ferrooxidans*, bez dodate jalovine). Na ovaj način je bilo moguće pratiti uticaj prisustva biofilmova na proces bioluženja jalovine pomoću *A. ferrooxidans*. Prikazani su takođe i rezultati luženja jalovine pomoću sva tri biofilma, a bez prisustva *A. ferrooxidans* (osenčena kolona; Tabela 17).

Tabela 17. Količina elemenata (mg kg⁻¹) izluženih iz jalovine.

Element	Prisustvo bakterija				
	<i>A. ferrooxidans</i>	<i>A. ferrooxidans</i>	<i>A. ferrooxidans</i>	<i>A. ferrooxidans</i>	/
	Biofilm PAO1	Biofilm PAO1, MSI08 i TN113	Biofilm PAO1, MSI08, MUI10, TN113 i CH34	Sva tri biofilma	
B	1.6	0.9	6.3	7.9	-6.5
Ba	1.9	0.1	0.2	0	0
Cr	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1
Cu	0.6	0.4	0.6	11.6	0.5
Fe	407	184	19	-256	-696
Sr	1.7	0.2	1.0	0.8	-0.3
Ti	1.5	0.6	1.1	0.3	-0.7

U eksperimentalnim uslovima koji su korišćeni za *in vitro* bioluženje jalovine pomoću *A. ferrooxidans*, najbolje je izluženo gvožđe (Fe) sa 407 mg kg⁻¹, nešto manje su izluženi B, Ba, Sr i Ti, dok su najlošiji rezultati dobijeni za Cr i Cu, sa svega 0,3 i 0,6 mg kg⁻¹ izluženih metala (Tabela 17). Uticaj prisustva biofilmova na luženje metala iz jalovine pomoću *A. ferrooxidans*, pod testiranim uslovima, bio je raznolik. Dodavanje nekog od tri različita biofilma uglavnom je negativno uticalo na proces izluživanja metala. Najveće smanjenje količine izluženog metala detektovano je u prisustvu biofilma sastavljenog od svih pet sojeva, kada se količina izluženog gvožđa smanjila 21,4 puta. Međutim, prisustvo biofilmova zajednica tri soja i svih pet sojeva pozitivno je uticalo na luženje B, povećavajući količinu izluženog B 4, odnosno 5 puta. Biofilm zajednice svih pet sojeva povećao je i količinu izluženog Cu čak 19 puta ukazujući na potencijal daljeg razvijanja ovog pristupa optimizacije bioprocasa (Tabela 17).

5. DISKUSIJA

5.1. Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka sedimenata iz rudnika bakra

U ovoj studiji su korišćeni uzorci površinskog i podzemnog sedimenta prikupljeni iz rudnika bakra u okviru rudarsko-topioničarskog basena Bor. Oba uzorka sedimenata su bila relativno kisela, sa pH vrednostima 5,2 i 3,9, za površinski i podzemni kop respektivno (Tabela 7). Ovi rezultati su uporedivi sa literaturnim podacima, gde su uzorci sedimenata iz neposredne blizine napuštenog rudnika Avoca u Irskoj imali pH vrednosti u rasponu 5,7 – 6,8 (Herr and Gray, 1997), dok je uzorak podzemnog sedimenta iz rudnika bakra Shen-bu u Kini imao pH vrednost 3,5 (Yang *et al.*, 2008). U poređenju sa drugim studijama rudnika bakra Bor, prema kojima je detektovana pH vrednost jamske vode u rasponu 1,93 – 2,19, pH vrednosti uzoraka sedimenata detektovane u ovoj studiji su očekivano veće (Conic *et al.*, 2009).

Neočekivano, koncentracije analiziranih metala u sedimentima bile su u okvirima dozvoljenih vrednosti prema Pravilniku o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje (EPA/Serbia, 1994). Jedino je koncentracija bakra bila 2,5 puta veća od dozvoljene (Tabela 7). Koncentracije kobalta, bakra, cinka, nikla i arsena koje su u ranijim studijama detektovane u rudnicima kao i kontaminiranim sredinama oko rudnika, uglavnom su veće u poređenju sa uzorkom površinskog sedimenta iz rudnika bakra Bor (Passariello *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009). Passariello i saradnici su prilikom procene kontaminacije napuštenog rudnika stibnita (ruda antimona, Sb_2S_3) pronašli kadmijum i cink u koncentracijama koje su 15600 i 21 put veće od koncentracija detektovanih u uzorku površinskog sedimenta iz rudnika bakra Bor (Passariello *et al.*, 2002). Koncentracije hroma i bakra detektovane u zemljištu u okviru rudnika bakra Zhuji Lipu u Kini su bile do 30 puta veće, dok je koncentracija cinka bila 426 puta veća od odgovarajućih koncentracija površinskog sedimenta rudnika bakra Bor (Sun *et al.*, 2012). Količine bakra pronađene u rudniku bakra Zhong Tiaoshan u Kini su bile slične vrednostima detektovanim u uzorku podzemnog sedimenta rudnika bakra Bor, dok su količine kobalta, arsena i nikla bile 16, 43 i 20000 puta veće (He *et al.*, 2007).

Slično, u uzorku iz rudnika bakra Shen-bu u Kini, i bakar je detektovan u koncentraciji koja je 19 puta veća, a kobalt, cink, kadmijum i hrom u koncentracijama koje su 10, 91, 38500 i 46 puta veće od izmerenih u uzorku podzemnog sedimenta rudnika u Boru (Yang *et al.*, 2008). Može se zaključiti da su uporedivi uzorci sedimenata iz rudnika bakra Bor u odnosu na uzorke sedimenata iz rudnika u Kini siromašniji u količinama različitih metala što može biti pripisano kako samim karakteristikama nalazišta, načinu uzorkovanja i izboru sedimenata, tako i načinu eksploatacije.

5.2. Mikrobiološki diverzitet uzoraka sedimenata iz rudnika bakra

Kako bi se dobio potpuniji uvid u strukturu mikrobioloških zajednica sedimenata površinskog i podzemnog lokaliteta iz rudnika bakra Bor, primenjena su metagenomska analiza i tradicionalni pristup direktnom kultivacijom.

5.2.1. Metagenomski pristup u analizi diverziteta

Korišćenjem metagenomskog pristupa u analizi mikrobiološkog diverziteta formirane su dve biblioteke 16S rDNK klonova (odjeljak 4.2.1.). Biblioteku klonova iz površinskog sedimenta (MS) činila su 124 klona, a biblioteku iz podzemnog sedimenta (MU) 194 klona. ARDRA analizom klonova, na osnovu profila elektroforetske pokretljivosti na agaroznom gelu, klonovi MS biblioteke su grupisani u 7 OTU, a klonovi MU biblioteke u 5 OTU. Broj detektovanih OTU u ovoj studiji u odnosu na ukupan broj klonova MS i MU biblioteka je bio mali u poređenju sa rezultatima drugih sličnih studija. Međutim, u ovoj studiji je ARDRA analiza rađena samo jednim restrikcionim enzimom, dok su u drugim studijama uglavnom korišćena dva enzima, pa samim tim su i prijavljeni rezultati u drugim studijama naizgled kompletniji. He i saradnici su metagenomskim pristupom analizirali bakterijski diverzitet jamske vode Zhong Tiaoshan rudnika, i među 57 klonova detektovali čak 8 OTU (He *et al.*, 2007). Ovi autori su u drugoj studiji diverziteta u okviru Dongxiang rudnika bakra i Yinshan rudnika olova i cinka, među 480 klonova iz 4 biblioteke detektovali ukupno 31 OTU (He *et al.*, 2008), a Yang i saradnici su analizirali uzorke sa 3 lokaliteta u okviru rudnika Shen-bu, i ukupno 384 klona iz tri biblioteke grupisali u 39

OTU (Yang *et al.*, 2008). Upotreba ARDRA metode u analizi diverziteta ima ograničenja, jer ne pruža dovoljno jednoznačnih informacija o vrsti mikroorganizama u uzorku i dobijene profile je često veoma teško analizirati gel elektroforezom (Rastogi and Sani, 2011). Uzimajući u obzir mane ARDRA metode kao i olakšanu dostupnost sekvenciranja i relativno mali broj uzoraka, filogenetska analiza klonova MS i MU biblioteka finalno je urađena sekvenciranjem dela gena za 16S rRNK (do 500 bp) a ne detaljnijom ARDRA/RFLP analizom.

Među klonovima MS biblioteke sekvenciranjem je detektovan veći diverzitet, sa 7 različitih filogenetskih grupa, u odnosu na MU biblioteku, čiji klonovi su bili raspoređeni u tri filogenetske grupe (Slika 13). U poređenju sa rezultatima ARDRA metode, broj filogenetskih grupa detektovan u MS biblioteci poklapa se sa brojem dobijenih OTU, dok u slučaju MU biblioteke dolazi do odstupanja. Naime, sekvenciranjem su detektovane tri filogenetske grupe, dok su ARDRA metodom klonovi MU biblioteke grupisani u pet OTU, ali imajući u vidu ograničenja ARDRA metode, jasno je da broj OTU ne ukazuje jednoznačno i na broj filogenetskih grupa.

Raspodela filogenetskih grupa u MS biblioteci klonova je u korelaciji sa rezultatima drugih sličnih studija, prema kojima su *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, i *Acidobacteria* najzastupljenije filogenetske grupe terestrijalnih ekosistema, kako netaknutih tako i onih koji su kontaminirani teškim metalima (Gremion *et al.*, 2003; Jansen, 2006; Lin *et al.*, 2011). Iako su filogenetske grupe *Bacteroidetes*, *Nitrospirae*, *Verrucomicrobia* i *Gemmatimonadetes*, bile slabije zastupljene među klonovima MS biblioteke, njihovo prisustvo nije bilo neočekivano u sredini zagađenoj teškim metalima. Međutim, među klonovima MS biblioteke nisu detektovani predstavnici roda *Firmicutes*, dok je u sličnim studijama ova filogenetska grupa bila među najzastupljenijim (Yang *et al.*, 2008; Islam and Sar, 2011).

Smanjeni diverzitet među klonovima MU biblioteke je bio očekivan, s obzirom na ekstremne uslove prisutne u sedimentima podzemnog kopa (Tabela 7). 92% klonova MU biblioteke pripadalo je redu *Nitrospirae* sa *Leptospirillum* sp. kao jedinim detektovanim predstavnikom, dok su preostali klonovi pripadali rodovima *Actinobacteria* i *Planctomycetes* (Slika 13). Prisustvo *Leptospirillum* sp. u MU uzorku u ovako velikom

procentu nije neobično, s obzirom da se predstavnici ovog roda često mogu naći u sredinama sa niskim pH vrednostima, kao što su podzemni sedimenti rudnika (Schrenk *et al.*, 1998). Ovi rezultati su uporedivi i sa rezultatima sličnih studija. He i saradnici su među klonovima iz jamske vode Zhong Tiaoshan rudnika bakra detektovali 29,2%, a iz uzoraka rudnika Dongxiang 50% klonova koji su pripadali redu *Nitrospirae* (He et al., 2007; He et al., 2008). Sa druge strane, Yang i saradnici su u uzorku podzemne vode Shenbu rudnika pronašli predstavnike rodova *Acidobacteria*, *Proteobacteria* i *Firmicutes*, ali ne i predstavnike reda *Nitrospirae* (Yang et al., 2008), iako je uzorak imao slične fizičko-hemijske karakteristike kao i sediment podzemnog kopa korišćen u ovoj studiji.

5.2.2. Analiza diverziteta direktnom kultivacijom

Prilikom analize mikrobiološkog diverziteta tradicionalnim pristupom, mogu se koristiti različite selektivne i neselektivne podloge za kultivaciju bakterija, zavisno od ciljeva studije. Islam i Sar su za izolaciju bakterija iz rude uranijuma koristili 4 različita medijuma: R2A (pH 7) i bogati PTYG (pH 7) medijum za kultivaciju heterotrofnih neutrofilnih bakterija, MGY (pH 3) medijum za kultivaciju heterotrofnih acidofilnih bakterija i 9K (pH 2,3) za kultivaciju umereno acidofilnih bakterija (Islam and Sar, 2011). Druge grupe autora su prilikom kultivacije bakterija iz uzoraka kontaminiranih teškim metalima koristile uglavnom različite vrste hranljivih agara (Ellis *et al.*, 2003; Piotrowska-Seget *et al.*, 2005; Rajbanshi, 2008; Xie *et al.*, 2010; Islam and Sar, 2011). U ovoj studiji, upotrebom 9K medijuma (pH 3,5) dobijeno je svega nekoliko kolonija iz uzoraka sedimenata površinskog i podzemnog kopa rudnika bakra Bor (iako je bilo očekivano prisustvo acidofilnih bakterija u uzorku podzemnog sedimenta) koje su izuzetno slabo rasle presejavanjem na svežu podlogu. Kako je jedan od ciljeva ove studije bio ispitivanje ukupnog mikrobiološkog diverziteta, druga podloga koja je korišćena je neselektivni bogati TG medijum karakterističan za izolaciju bakterija iz uzoraka zemljišta. Dobijeni rezultati za oba uzorka (Tabela 8) u skladu su sa rezultatima sličnih studija. U radu autora Piotrowska-Seget, upotrebom hranljivog agara, izolovan je približno isti broj bakterija kao i u ovoj studiji upotrebom TG medijuma, dok je u radu Ellis i saradnika iz zemljišta kontaminiranog teškim metalima izolovano u proseku oko 10% manje bakterija (Ellis *et al.*, 2003; Piotrowska-Seget *et al.*, 2005).

Trideset dva izolata iz površinskog sedimenta (MSI) i 30 izolata iz podzemnog sedimenta (MUI) taksonomski su identifikovani (odjeljak 4.2.2.) i među izolatima iz oba uzorka je detektovano prisustvo predstavnika rodova *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria* (Slika 14). Dok su među izolatima iz površinskog sedimenta dominirali predstavnici roda *Actinobacteria*, većina izolata iz podzemnog sedimenta je pripadala rodu *Firmicutes* (Slika 14), što nije u skladu sa rezultatima dobijenim metagenomskom analizom, po kojima predstavnici roda *Firmicutes* uopšte nisu detektovani u podzemnom sedimentu. Međutim, ovi rezultati su u korelaciji sa rezultatima Islam i Sar, koji su iz uzoraka rude uranijuma direktnom kultivacijom detektovali predstavnike istih rodova: sa 84,5% predstavnika roda *Proteobacteria* – što je 3,4 i 4 puta više od detektovanih *Proteobacteria* među MSI i MUI izolatima, zatim 12,4% predstavnika *Actinobacteria* – što je 5 i 1,6 puta manje od predstavnika ovog roda među MSI i MUI izolatima i 3,1% predstavnika *Firmicutes* – što je 4 i 19 puta manje od predstavnika ovog roda među MSI i MUI izolatima. U radu Ellis i saradnika, pored predstavnika ova tri roda detektovani su i predstavnici rodova *Bacteroidetes* i *Deinococcus-Thermus*. U navedenom radu raspodela filogenetskih grupa zavisila je od količine detektovanih metala u uzorku, tako da je u uzorcima sa najvećom količinom teških metala dominirala grupa *Firmicutes*, slično kao među izolatima iz podzemnog sedimenta (Ellis *et al.*, 2003).

Može se zaključiti da je u ovoj studiji veći mikrobiološki diverzitet detektovan upotrebom metagenomskog pristupa. Međutim, direktnom kultivacijom su dobijene neke bakterijske vrste koje metagenomskim pristupom nisu detektovane. Ovo se može objasniti time što je kod pojedinih bakterija, kao što su predstavnici roda *Firmicutes*, veoma teško lizirati ćelije i izolovati DNK u metagenomskom pristupu (Donachie *et al.*, 2007), što je pretpostavlja se, bio slučaj i u ovom radu. Rezultati ove i drugih studija pomenutih studija (Ellis *et al.*, 2003; Islam and Sar, 2011) samo ističu značaj primene obe metode u analizi diverziteta, kako bi se u podacima o strukturi mikrobioloških zajednica izbegle praznine.

5.3. Aplikativni potencijal izolata tolerantnih na teške metale

Iako zagađenja sredine visokim koncentracijama teških metala predstavljaju ozbiljnu pretnju kako za životnu sredinu tako i za zdravlje ljudi, ove sredine ujedno predstavljaju i dobar izvor mikroorganizama tolerantnih na teške metale, koji imaju potencijal za primenu u bioremedijaciji i bioluženju. Preduslov za primenu u bioremedijaciji ili bioluženju jeste analiza sposobnosti ovih bakterija da tolerišu povišene koncentracije kako pojedinačnih teških metala, tako i više njih istovremeno, kao i razumevanje mehanizama kojima tu toleranciju ostvaruju.

5.3.1. Sposobnost rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala u čvrstoj podlozi

Sposobnost rasta u prisustvu Cu^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} i Zn^{2+} u koncentracijama 20 puta većim u odnosu na maksimalne koncentracije dozvoljene Pravilnikom o štetnim materijama Ministarstva životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja (EPA/Serbia, 1994) (Tabela 1), analizirana je kod bakterija izolovanih u ovoj studiji kao i kod sojeva za koje je tolerancija na metale prethodno opisana u literaturi (Tabela 2). Od ukupno 62 soja izolovana u ovoj studiji, njih 6 (približno 10%) je tolerisalo povišene koncentracije jednog ili više navedenih metala (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} i Ni^{2+}) (Tabela 9), pri čemu su tri soja pripadala rodu *Arthrobacter* a tri rodu *Staphylococcus* (Tabela 10). Sojevi roda *Arthrobacter* su imali sposobnost rasta samo u prisustvu Ni^{2+} . U literaturi postoje podaci o toleranciji pripadnika ovog roda na prisustvo Ni^{2+} (Stoppel and Schlegel, 1995), pri čemu su Margesin i saradnici izolovali, iz zagađenih industrijskih sredina, vrste roda *Arthrobacter* sposobne da rastu u prisustvu 25 mM Ni^{2+} , što je 1,5 puta veće od koncentracije korišćene u ovoj studiji (Margesin and Schinner, 1996). U literaturi postoje podaci i o toleranciji vrsta roda *Staphylococcus* na prisustvo teških metala. *Staphylococcus* sp. izolat iz otpadnih voda fabrike u Indiji (Sagar *et al.*, 2012) mogao je da raste u prisustvu slične koncentracije Ni^{2+} koja je korišćena u ovoj studiji, dok je koncentracija Cr^{2+} bila dva puta manja od koncentracije koju su tolerisali pojedini sojevi izolovani u ovoj studiji. U radu autora Islam i Sar, sojevi izolovani iz rude uranijuma, bili su sposobni da tolerišu

Ni^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+} , ali u koncentracijama koje su 8,5, 77 i 21 put niže od koncentracija korišćenih u ovom radu. Slično, autohtoni sojevi izolovani u studiji Albarracín i saradnika (Albarracín *et al.*, 2005), mogli su da tolerišu koncentracije Cu^{2+} pet puta manje od koncentracija na kojima su sojevi iz ove studije mogli da rastu. Ovo ukazuje na značaj rezultata ove studije, pogotovo ako se uzme u obzir da su u radovima navedenih autora ispitivanja tolerancije na teške metale rađena na podlogama koje su poznate po mogućnosti da kompleksuju teške metale, te se ne može sa sigurnošću tvrditi da su korišćene koncentracije metala ostale nepromenjene u podlozi, dok je u ovom radu korišćen MT medijum kod kog su precipitacija i kompleksovanje teških metala svedeni na minimum (Sani *et al.*, 2001). Iz tog razloga se i rezultati Nithya i saradnika mogu uzeti sa rezervom, jer je u ovoj studiji prijavljena tolerancija izolovanih sojeva na 300 mM koncentracije Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} i Zn^{2+} (Nithya *et al.*, 2011), ali u hranljivom agaru, gde prisustvo fosfata značajno utiče na kompleksovanje teških metala i time smanjuje koncentraciju slobodnih jona metala u podlozi.

Među *Staphylococcus* izolatima iz sedimenta površinskog kopa, koji su tolerisali povišene koncentracije teških metala, posebno se istakao izolat MSI08, koji je na čvrstoj podlozi rastao u prisustvu Ni^{2+} , Cd^{2+} i Cr^{6+} (Tabela 9). Ovaj izolat je najveći procenat identičnosti nukleotidne sekvence gena za 16S rRNK (95%) pokazao sa sojem *Staphylococcus haemolyticus* CCGE3068 (Tabela 10), međutim od ovog soja se razlikovao po svojoj sposobnosti korišćenja eskulina ali ne i arginina i glicerola (Tabela 14). Stoga je ovaj soj označen kao potencijalno nova vrsta roda *Staphylococcus*. Da bi se ovo potvrdilo, neophodno je pored biohemijskih testova sprovesti i detaljniju genetsku analizu koja bi podrazumevala DNK-DNK hibridizaciju i analizu hromozomalnog G – C sadržaja.

Sojevi za koje su već postojali literaturni podaci o toleranciji na povišene koncentracije metala, očekivano su rasli u prisustvu metala, pri čemu je pet sojeva moglo da toleriše i 100 mM koncentracije pojedinih metala (rezultati nisu prikazani). Među poznatim sojevima tri su pripadala rodu *Rhodococcus*, po dva soja rodovima *Cupriavidus* i *Pseudomonas*, i jedan soj je pripadao rodu *Bacillus*. Soj *Cupriavidus metallidurans* CH34, koji poseduje genetičke determinante tolerancije na veliki broj različitih teških metala, pokazao je sposobnost rasta samo u prisustvu povišenih koncentracija Cd^{2+} i Cr^{6+} (Tabela 9), što

ukazuje da su korišćeni uslovi eksperimenta aktivirali samo mehanizme tolerancije na Cd^{2+} i Cr^{6+} . U radu Zhao i saradnika, izolovan je soj *C. metallidurans* (99% sličnosti sa *C. metallidurans* CH34) sa sposobnošću tolerancije Cd^{2+} u koncentraciji duplo većoj, a Ni^{2+} i Cu^{2+} u koncentracijama 5,6 i 9 puta manjim od korišćenih u ovoj studiji (Zhao *et al.*, 2012), s tim što su Zhao i saradnici testove tolerancije radili samo u tečnoj podlozi. Kada su u pitanju ostali rodovi, u literaturi postoje podaci i o njihovoj toleranciji na teške metale. Malik i Jaiswal su iz zemljišta tretiranog otpadnim vodama izolovali sojeve roda *Pseudomonas*, koji su tolerisali 26 puta veću koncentraciju Cd^{2+} i 1,25 puta manju koncentraciju Cr^{6+} nego sojevi roda *Pseudomonas* korišćeni u ovom radu (Malik and Jaiswal, 2000). U radu Alam i saradnika, u zemljištu kontaminiranom teškim metalima, detektovano je prisustvo rodova *Pseudomonas* i *Bacillus*, sa sposobnošću tolerancije različitih metala. Koncentracije Cr^{6+} i Cd^{2+} korišćene u toj studiji, bile su 1,6 i 3,3 puta veće, dok je koncentracija Cu^{2+} bila 2,5 puta manja u poređenju sa koncentracijama korišćenim u ovoj studiji (Alam *et al.*, 2011). I u radovima drugih grupa autora izolovani su sojevi *Pseudomonas* i *Bacillus*, tolerantni na različite teške metale čije su koncentracije bile manje od koncentracija korišćenih u ovom radu (Hassan *et al.*, 2008; Velusamy *et al.*, 2011), međutim autori ovih radova su za testove tolerancije koristili minimalni medijum sa ciljem smanjenja kompleksovanja teških metala sa komponentama medijuma. Sojevi roda *Rhodococcus* korišćeni u ovom radu, pokazali su sposobnost rasta u prisustvu Cu^{2+} i Hg^{2+} . Iako postoje literaturni podaci o toleranciji roda *Rhodococcus* na različite teške metale, kao što su Cd^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Cr^{6+} , informacije o toleranciji na bakar su oskudne (Oyetibo *et al.*, 2010).

5.3.2. Sposobnost rasta slobodnoživećih bakterija u prisustvu teških metala u tečnoj podlozi

Uobičajeno je da neke bakterije koje imaju sposobnost rasta u prisustvu teških metala, veću toleranciju na povišene koncentracije teških metala pokazuju na čvrstoj podlozi u poređenju sa tečnom podlogom (Hassen *et al.*, 1998; Yilmaz, 2003), što je pokazano i za pet odabranih izolata iz ovog rada (odjeljak 4.4.) (Tabela 12). Razlog za to su različiti uslovi difuzije, kompleksovanja i dostupnosti teških metala u tečnim medijumima u poređenju sa čvrstim (Yilmaz, 2003). *Staphylococcus* izolat MSI08, tolerantan na prisustvo 3 metala na

čvrstoj podlozi, u tečnoj kulturi je rastao samo u prisustvu Cr^{6+} , i to na koncentraciji koja je bila 13 puta manja od koncentracije na kojoj je rastao na čvrstoj podlozi. Drugi *Staphylococcus* izolat, MUI10, na čvrstom medijumu tolerantan na Cd^{2+} i Cu^{2+} , tolerisao je 16 puta manju koncentraciju Cu^{2+} , ali nije imao sposobnost rasta u prisustvu Cd^{2+} u tečnoj kulturi. Međutim, iako ovaj soj na čvrstom medijumu nije rastao u prisustvu Cr^{6+} , u tečnoj kulturi je mogao da toleriše i ovaj teški metal (Tabela 12). *Rhodococcus* sp. TN113 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 su u tečnoj kulturi tolerisali tri puta manju koncentraciju Cu^{2+} , a *C. metallidurans* CH34 6 puta manju koncentraciju Cu^{2+} od one korišćene za čvrste podloge, iako i *P. aeruginosa* PAO1 i *C. metallidurans* CH34 na čvrstoj podlozi nisu tolerisali prisustvo Cu^{2+} , a tolerisali su Cr^{6+} za koji nisu pokazali rast u tečnoj kulturi. Međutim, kada je u pitanju Cd^{2+} , na kom su navedena dva soja rasla na čvrstoj podlozi, u tečnom medijumu je maksimalna tolerisana koncentracija ovog teškog metala bila čak 10 puta veća od maksimalne korišćene za čvrste podloge. Sličan trend za Cd^{2+} su dobili i Xie i saradnici, u čijem radu su testirani sojevi u tečnoj kulturi mogli da rastu u prisustvu 1,8 puta veće koncentracije Cd^{2+} nego na čvrstom medijumu, s tom razlikom što su testirani sojevi u ovoj studiji nekoliko generacija gajeni u prisustvu Cd^{2+} pre nego što su dostigli prijavljenu koncentraciju (Xie *et al.*, 2010). Generalno, češća je pojava smanjenja tolerancije teških metala u tečnoj u odnosu na čvrstu podlogu, što je u svom radu pokazao i Yilmaz (Yilmaz, 2003). Maksimalne tolerisane koncentracije teških metala u tečnoj kulturi koje je Yilmaz u svom radu prijavio, bile su manje od koncentracija prijavljenih u ovoj studiji, i to koncentracija Cd^{2+} 2,5 puta, a koncentracija Cu^{2+} pet puta manja (Yilmaz, 2003). Sa ovim rezultatima su uporedivi i rezultati Wei i saradnika, kod kojih su maksimalne tolerisane koncentracije Cu^{2+} i Cd^{2+} u tečnoj kulturi bile 2 mM (Wei *et al.*, 2009). Rezultati ove studije prate trend smanjenja tolerancije teških metala u tečnoj podlozi u poređenju sa čvrstom, a prijavljene maksimalne tolerisane koncentracije metala mogu se smatrati preciznim s obzirom da je za testove korišćena podloga u kojoj je kompleksovanje teških metala svedeno na minimum.

5.3.3. Prisustvo genetičkih determinanti za toleranciju na teške metale

Prisustvo genetičkih determinanti za toleranciju na pet teških metala (Tabela 3) analizirano je kod ukupno 14 sojeva: 6 sojeva tolerantnih na teške metale koji su izolovani u ovoj

studiji i 8 sojeva za koje je tolerancija na metale prethodno opisana u literaturi, od kojih su 4 soja deo laboratorijske kolekcije (Tabela 2). *C. metallidurans* CH34 je korišćen kao pozitivna kontrola, s obzirom da je iz literature poznato da poseduje gene za determinante rezistencije na sve teške metale testirane u ovoj studiji. Ukoliko ne računamo rezultate dobijene za *C. metallidurans* CH34, od 13 testiranih sojeva dva soja su posedovala gen za toleranciju na Cu^{2+} (*Staphylococcus* sp. MSI08 i *Staphylococcus* sp. MUI10), dva na Cd^{2+} (*Staphylococcus* sp. MSI08 i *Staphylococcus* sp. MUI10) i dva na Cu^{2+} (*Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1), što je potvrđeno i sekvenciranjem PCR produkata (Tabela 11). Ne računajući *C. metallidurans* CH34, od 6 sojeva tolerantnih na Ni^{2+} na čvrstoj i u tečnoj podlozi, ni kod jednog soja nije detektovana genetička determinanta te tolerancije, kao što ni kod jedinog soja tolerantnog na Hg^{2+} nije uočeno prisustvo gena za toleranciju na Hg^{2+} . Od pet sojeva tolerantnih na Cd^{2+} , gen za toleranciju detektovan je kod dva soja. Od tri soja koji su tolerisali Cu^{2+} bilo na čvrstoj bilo u tečnoj podlozi, dva su posedovala genetičku determinantu te tolerancije, a od četiri soja tolerantna na Cr^{6+} , takođe su samo dva posedovala odgovarajući gen.

Sličnu, ali opsežniju studiju sproveli su i Abou-Shanab i saradnici 2007. godine, kada su izolovali bakterije iz sedimenata obogaćenih Ni^{2+} i iz rizosfere biljke *Alyssum murale* (Abou-Shanab *et al.*, 2007). Testirajući 45 izolata tolerantnih na teške metale, na prisustvo četiri gena za toleranciju ova grupa autora je potvrdila prisustvo gena za toleranciju na Cd^{2+} kod svih 11 izolata koji su rasli u prisustvu ovog teškog metala, kao i prisustvo gena za toleranciju na Cr^{6+} kod svih 11 izolata tolerantnih na Cr^{6+} . Međutim, od 11 izolata sa sposobnošću rasta u prisustvu Hg^{2+} , njih 6 je posedovalo genetičku determinantu tolerancije, a od 14 izolata tolerantnih na prisustvo Ni^{2+} , samo dva su imala gen za toleranciju na ovaj metal (Abou-Shanab *et al.*, 2007).

U principu, svaki soj kod kog je u ovom radu detektovano prisustvo gena za toleranciju na neki teški metal, mogao je i da raste u prisustvu tog teškog metala, bilo na čvrstoj podlozi, bilo u tečnom medijumu. Zanimljivo je da je izolat *Staphylococcus* sp. MUI10 i na čvrstoj i u tečnoj podlozi imao sposobnost tolerancije Cu^{2+} , ali nije posedovao genetičku determinantu za toleranciju na ovaj metal, što potvrđuje da *Staphylococcus* sp. MUI10 poseduje neki drugi mehanizam kojim aktivno i uspešno reguliše homeostazu Cu^{2+} . Ovo je

potvrđeno i eksperimentom oksidacije 2,6-dimetoksifenola (DMP), kojim je ispitana aktivnost enzima multi bakar oksidaze, odgovornog za toleranciju na Cu^{2+} , kod sojeva koji su posedovali gen za ovaj enzim. Naime, sojevi *Rhodococcus sp.* TN113, *P. aeruginosa* PAO1 i *C. metallidurans* CH34, kod kojih je detektovano prisustvo gena za multi bakar oksidazu, imali su aktivan enzim (Slika 32). *Staphylococcus sp.* MUI10 koji, iako je rastao u prisustvu Cu^{2+} , nije posedovao gen za toleranciju, niti je imao aktivan enzim multi bakar oksidazu. Međutim, ne treba zanemariti podatak da *Staphylococcus sp.* MUI10, kada se doda u zajednicu tri soja koji poseduju gen za multi bakar oksidazu, svojim mehanizmom tolerancije doprinosi ukupnoj toleranciji ovakve zajednice na povišene koncentracije Cu^{2+} (Slika 23).

5.3.4. Sposobnost rasta u prisustvu više teških metala istovremeno

Kako je životna sredina kontaminirana kompleksnim smešama teških metala i drugih zagađivača, za proces remedijacije posebno su značajne bakterije sposobne da se izbore sa istovremenim prisustvom više teških metala. Ovakvi mikroorganizmi su izuzetno pogodni za primenu u aktivnoj bioremedijaciji ili potencijalno u procesima izluživanja metala, jer smanjuju potrebu za uvođenjem više različitih sojeva u zagađenu sredinu. Sposobnost rasta u istovremenom prisustvu Cu^{2+} , Cd^{2+} i Cr^{6+} , ispitana je kod pet sojeva iz ove studije koji su odabrani za dalju analizu (odjeljak 4.4), međutim, jedino je *P. aeruginosa* PAO1 mogao da toleriše smešu metala (Slika 22). Već je pokazano da vrste roda *Pseudomonas* mogu imati sposobnost tolerancije i do 8 teških metala istovremeno na čvrstoj podlozi u koncentracijama znatno većim od koncentracija metala koje su korišćene u ovoj studiji (Malik and Allem, 2011). Treba istaći da su Malik i Allem sve testove tolerancije na teške metale radili na hranljivom agaru. Ovo dovodi u pitanje tačnost koncentracija metala navedenih u ovom radu, jer poznato je da bogati medijumi kompleksuju jone teških metala, stoga se ne mogu sa sigurnošću znati koncentracije prisutnih slobodnih jona odgovarajućih metala.

Pošto je utvrđeno da je samo jedan soj (*P. aeruginosa* PAO1) mogao da raste u prisustvu tri teška metala u slobodnoživećem obliku, na problem istovremene tolerancije pokušali smo da odgovorimo definisanjem bakterijskih zajednica na osnovu rezultata dobijenih u

početnoj analizi (Tabela 9, Slika 16). Od 10 testiranih bakterijskih zajednica, četiri su se posebno istakle po sposobnosti rasta u istovremenom prisustvu Cu^{2+} , Cd^{2+} i Cr^{6+} :

- *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1;
- *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1;
- *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113 i *C. metallidurans* CH34;
- *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1

od kojih je zajednica sačinjena od pet sojeva pokazala najbolji rast (Slika 22). Iako je za proces bioremedijacije poželjnije koristiti jedan soj sa sposobnošću istovremene tolerancije više metala, u ovom slučaju pokazalo se da zajednica koju čini pet sojeva ipak efikasnije raste pod ovim uslovima.

Problematikom istovremenog uklanjanja više teških metala iz zagađene sredine biosorpcijom bavi se veliki broj studija (Bueno *et al.*, 2008; MacHado *et al.*, 2010; Nanda *et al.*, 2011; Siddiquee *et al.*, 2013). Uklanjanje zagađivača biosorpcijom je pasivan proces, za koji je dovoljna i mrtva biomasa. Tako su Bueno i saradnici ispitivali uklanjanje Pb^{2+} , Cr^{3+} i Cu^{2+} pomoću bakterije *Rhodococcus opacus*, i detaljno analizirali kinetiku i međusobni uticaj prisustva različitih kombinacija metala na efikasnost procesa biosorpcije (Bueno *et al.*, 2008). Iz rezultata sličnih studija može se zaključiti da je biomasa različitih vrsta gljiva efikasnija u procesima uklanjanja više metala. Sposobnost tolerancije i biosorpcije Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{3+} i Cu^{2+} je pokazana kod filamentoznih gljiva roda *Trichoderma* (Siddiquee *et al.*, 2013), dok je *Saccharomyces cerevisiae* bio efikasan u uklanjanju Cr^{6+} , Cu^{2+} i Ni^{2+} iz otpadnih voda poreklom iz procesa galvanizacije (MacHado *et al.*, 2010).

5.4. Aplikativni potencijal bakterijskih biofilmova

Biofilmovi, kao specifično organizovane zajednice mikroorganizama vezanih za različite površine, pružaju bakterijama prednosti koje u slobodnoživećem obliku ne poseduju. Formiranjem biofilmova bakterije povećavaju toleranciju na negativne sredinske uticaje

kao što su ekstremne vrednosti pH i temperature, isušivanje, prisustvo antibiotika i teških metala. Ove karakteristike biofilmova su sa medicinskog aspekta nepovoljne, jer tretiranje upornih infekcija uzrokovanih veoma tolerantnim bakterijskim biofilmovima predstavlja veliki problem. Sa druge strane, zbog velike biomase i sposobnosti biofilmova da imobilizuju teške metale, otvara se mogućnost njihove primene u remedijaciji zagađenih sredina.

5.4.1. Sposobnost bakterijskih izolata da formiraju biofilm

Kod svih sojeva koji su u ovom radu pokazali toleranciju na prisustvo povećanih koncentracija teških metala na čvrstoj podlozi (Tabela 9) ispitana je i pokazana sposobnost formiranja biofilma u polistirenskim mikrotitarskim pločama sa 96 otvora (Slika 16). Ovaj rezultat nije bio neočekivan, jer su sojevi koji su pokazali veliki potencijal za formiranje biofilmova pripadali rodovima *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* i *Cupriavidus*, o čijim sposobnostima formiranja biofilmova postoje i brojni literaturni podaci. Pokazano je da formiranje biofilmova utiče i na povećanje tolerancije na antimikrobijalne agense što je vrlo često i uzročnik mnogih upornih i hroničnih infekcija (Costerton *et al.*, 1999). Uobičajena bakterija koja se javlja na koži, *Staphylococcus epidermidis*, nekad je smatrana bezopasnom, a danas se zna da je oportunistički patogen i da je, zahvaljujući biofilmovima koje formira, čest uzročnik infekcija ljudi posredstvom katetera (Götz, 2002). Pored vrsta roda *Staphylococcus* i predstavnici roda *Pseudomonas* su poznati po formiranju biofilmova, zapravo *S. epidermidis* predstavlja model organizam za biofilmove Gram-pozitivnih bakterija, a *P. aeruginosa* za biofilmove *Proteobacteria* (Klausen *et al.*, 2003). Dok su Diels i saradnici pokazali da *C. metallidurans* CH34, zahvaljujući sposobnosti formiranja biofilma, može preživeti i u veoma nepovoljnim uslovima sredine (Diels *et al.*, 2009), u radu Orr i saradnika pokazano je da *Rhodococcus ruber* ima sposobnost formiranja biofilma na polietilenu, što mu olakšava proces biodegradacije ovog substrata (Orr *et al.*, 2004). U ovoj studiji, sposobnost formiranja biofilma *in vitro* je uvršćena kao kriterijum za odabir izolata koji su pokazali rast u prisustvu povećanih koncentracija teških metala, kako bi se zatim testirala tolerancija tih biofilmova na prisustvo jednog ili više teških metala, sve sa ciljem eventualne primene takvih izolata u bioremedijaciji i poboljšanju procesa bioluženja.

5.4.2. Tolerancije bakterijskih biofilmova na prisustvo pojedinačnih i više teških metala istovremeno

U ovoj studiji testirane su tolerancije pojedinačnih biofilmova pet odabranih sojeva: *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1 na prisustvo Cd^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+} , kao i tolerancija biofilma *P. aeruginosa* PAO1 i biofilmova 4 odabrane zajednice (odjeljak 4.5.3.) na prisustvo smeše ova tri metala. Povećana tolerancija biofilma na prisustvo teških metala u odnosu na slobodnoživeće forme pokazana je za tri soja: *Rhodococcus* sp. TN113 (Slika 27), *C. metallidurans* CH34 (Slika 28), čiji biofilmovi su bili tolerantniji na prisustvo Cu^{2+} , kao i za *P. aeruginosa* PAO1, čiji je biofilm sem na Cu^{2+} , veću toleranciju pokazao i na prisustvo Cd^{2+} (Slika 29). Povećana tolerantnost biofilmova na prisustvo metalnih jona nije dovoljno razjašnjena u literaturi, zbog dužine izlaganja biofilmova dejstvu teških metala. Tako su autori Teitzel i Parsek pokazali da je biofilm *P. aeruginosa* PAO1 tolerantniji na prisustvo Cu^{2+} , Zn^{2+} i Pb^{2+} od slobodnoživeće forme u uslovima kratkog izlaganja biofilma (4 h) dejstvu teških metala (Teitzel and Parsek, 2003). Ovakve rezultate su dobili i Harrison i saradnici pod sličnim uslovima izlaganja biofilma (2-6 h) *P. aeruginosa* i *S. aureus* dejstvu čak 17 različitih metala (Harrison *et al.*, 2004). Međutim, u istoj studiji pod uslovima dužeg izlaganja istih biofilmova teškim metalima (24 h), pokazano je da su biofilmovi tolerisali iste koncentracije metala kao i slobodnoživeće bakterije (Harrison *et al.*, 2004). Stoga se može zaključiti da postoji vremenska zavisnost tolerancije biofilmova od dužine izlaganja metalima, i da povećana tolerantnost nije nepromenljivo svojstvo biofilmova. Tokom ove studije nedvosmisleno je pokazano da biofilmovi *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1 pokazuju povećanu toleranciju na prisustvo Cd^{2+} i Cu^{2+} , čak i nakon tri dana izlaganja dejstvu ovih metala.

Iako su podaci o toleranciji biofilmova vrsta roda *Rhodococcus* na prisustvo teških metala retki, interesantno je da je Gao tokom svoje studije izolovao *Rhodococcus* sp. iz vode za piće čiji biofilm je pokazivao sličan nivo tolerancije na prisustvo Ag^{2+} kao i slobodnoživeći oblik (Gao, 2011). Iako predstavlja model soj za izučavanje genetičkih determinanti koje obezbeđuju tolerantnost na teške metale, *C. metallidurans* CH34 nije izučavan u smislu

tolerantnosti njegovog biofilma na teške metale, ali je poznato da biofilmovi *C. metallidurans* CH34 imaju sposobnost biomineralizacije zlata (Reith *et al.*, 2009). Naime, *C. metallidurans* CH34 može da formira biofilm na zrnima zlata i akumulira u citoplazmi toksične Au^{3+} komplekse iz sredine, nakon čega se formiraju $\text{Au}^{1+} - \text{S}$ kompleksi koji se transportuju u periplazmatični prostor. Slično kao joni drugih metala, i Au kompleksi su toksični za bakterije i kao odgovor na njihovo prisustvo *C. metallidurans* CH34 indukuje ekspresiju gena za toleranciju na teške metale i oksidativni stres, i kombinacijom efluksa, redukcije i verovatno metilacije Au kompleksa, dovodi do formiranja $\text{Au}^{1+} - \text{C}$ jedinjenja i Au^0 nanočestica (Reith *et al.*, 2009; Wiesemann *et al.*, 2013). Postoje indicacije da je sistem pomoću kog *C. metallidurans* CH34 reguliše homeostazu Cu , takođe odgovoran i za biomineralizaciju Au (Wiesemann *et al.*, 2013). Ovaj aspekt je veoma zanimljiv za našu studiju, s obzirom da je detektovana povećana tolerancija biofilma *C. metallidurans* CH34 na prisustvo Cu^{2+} , što zajedno sa sposobnošću biomineralizacije Au može učiniti *C. metallidurans* CH34 pogodnim sojem za remedijaciju rudnika bakra u Boru.

Uzimajući u obzir da je, u poređenju sa slobodnoživećim oblikom, biofilm *P. aeruginosa* PAO1 bio tolerantniji na Cu^{2+} i Cd^{2+} (Slika 29), a da je slobodnoživeći oblik tolerisao prisustvo smeše Cd^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+} (Slika 22), pretpostavljeno je da će biofilm *P. aeruginosa* PAO1 biti tolerantniji i na smešu tri metala, međutim to nije pokazano (Slika 30). Takođe, ni biofilmovi četiri odabrane zajednice, koji su u slobodnoživećoj formi rasli u prisustvu smeše tri metala (Slika 22), nisu pokazali sposobnost rasta. Mogući razlozi za to su sami uslovi eksperimenta. Naime, ukoliko nije nagajena dovoljna količina biofilma i/ili ako je on zatim predugo bio izlagan dejstvu smeše metala, to je moglo uticati na dobijene rezultate, što ostavlja mogućnost dalje optimizacije ovog pristupa.

Kao i u slučaju slobodnoživećih formi bakterija (odjeljak 5.3.4.), više teških metala je moguće istovremeno ukloniti iz zagađene sredine biosorpcijom pomoću bakterijskih biofilmova. Bakterijski biofilmovi imaju veliku biomasu i stoga veliki potencijal da adsorbuju teške metale i tako ih uklone iz sredine. Pokazano je da biofilmovi zajednice vrsta *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* mogu biosorpcijom ukloniti Cr^{3+} iz otpadnih voda fabrika (Sundar *et al.*, 2011). Takođe je pokazano da su biofilmovi *Escherichia coli* bili

efikasni u uklanjanju Cr^{6+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} i Ni^{2+} iz otpadnih voda biosorpcijom (Quintelas *et al.*, 2009a; Quintelas *et al.*, 2009b). Izražena sposobnost biosorpcije kod biofilmova koristi se i u uklanjanju drugih polutanata kao što su aromatična jedinjenja, sintetičke boje i plastičan otpad (Das *et al.*, 2012).

5.4.3. Uticaj biofilmova na *in vitro* proces bioluženja

Poznato je iz literature da bakterije koje učestvuju u bioluženju, kao što su vrste roda *Acidithiobacillus*, imaju sposobnost formiranja biofilmova i ti biofilmovi utiču na sam proces bioluženja (Fu *et al.*, 2004; Donati *et al.*, 2009). U procesu bioluženja veoma je važna interakcija mikroorganizma sa površinom metala. Prvi kontakt *A. ferrooxidans* sa površinom metala je nespecifičan i zasniva se na elektrostatičkim, hidrofobnim i hidrofilnim interakcijama. Nakon što se uspostavi prvi kontakt, u toku sledećih nekoliko dana formira se biofilm i površina metala se prekriva vanćelijskim matriksom koji omogućava kontakt bakterije i izvora energije, a time je omogućeno i dalje formiranje biofilma i interakcije bakterija sa substratom (Vu *et al.*, 2009). Međutim, u sredini u kojoj se odvija bioluženje prisutne su i druge, autohtone bakterije koje svakako opstaju u toj sredini i imaju određenu ekološku ulogu u zajednici mikroorganizama. Proučavanjem dostupne literature nije pronađena studija koja se bavila mogućim efektom biofilma bakterija koje nisu poznate po sposobnosti bioluženja na taj proces.

Tokom ove studije je po prvi put ispitivan uticaja biofilmova *P. aeruginosa* PAO1 i dve odabrane bakterijske zajednice (odjeljak 4.6.) na *in vitro* proces bioluženja pomoću *A. ferrooxidans*. Pokazano je da pomenuti biofilmovi opstaju u prisustvu *A. ferrooxidans*, kao i da mogu imati različit uticaj na efikasnost ovog procesa (Tabela 17). Iako je prisustvo biofilma uglavnom imalo negativan uticaj, u tri slučaja je dovelo do povećanja količine izluženog metala. Mehanizam kojim ovi biofilmovi utiču na proces bioluženja nije poznat. Sa jedne strane, oni mogu poboljšati interakcije *A. ferrooxidans* sa površinom metala, dok sa druge strane mogu proizvoditi signalne molekule ili organske kiseline koje pospešuju rast odnosno aktivnost bakterije *A. ferrooxidans*. Dodavanjem biofilmova sa ovakvim pozitivnim efektom na proces bioluženja u bioreaktore za luženje koncentrata

ruda, mogla bi se poboljšati efikasnost procesa. Dobijeni rezultati ostavljaju otvorenom mogućnost daljeg razvijanja ovog pristupa optimizacije procesa bioluženja.

6. ZAKLJUČCI

- Analiza prisustva teških metala u uzorcima površinskog i podzemnog sedimenta poreklom iz rudnika bakra Bor pokazala je neočekivano nizak sadržaj metala. Osim povišene koncentracije bakra u uzorku podzemnog sedimenta, koncentracije drugih teških metala bile su u okvirima dozvoljenih vrednosti prema Pravilniku Republike Srbije o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje.
- Metagenomskom analizom je u sedimentima iz rudnika bakra Bor detektovan veći mikrobiološki diverzitet u poređenju sa tradicionalnim pristupom, međutim nije pokazano prisustvo pojedinih sojeva koji su tradicionalnim pristupom uspešno kultivisani. Metagenomska analiza je pokazala veći mikrobiološki diverzitet u uzorku površinskog sedimenta, sa 7 identifikovanih filogenetskih grupa, u odnosu na uzorak podzemnog sedimenta sa 3 identifikovane filogenetske grupe.
- Testiranjem sposobnosti rasta ukupno 70 izolata u prisustvu povišenih koncentracija teških metala pokazano je da je 14 sojeva (20%) imalo sposobnost rasta u prisustvu jednog ili više metala:
 - 6 sojeva je raslo u prisustvu nikla, 6 u prisustvu kadmijuma, 4 u prisustvu bakra, 3 u prisustvu hroma i 1 je rastao u prisustvu žive.
 - Nijedan od sojeva nije rastao u prisustvu gvožđa i cinka.
 - Izdvojio se izolat *Staphylococcus* sp. MSI08 koji je jedini rastao u prisustvu tri teška metala.
 - Među testiranim izolatima njih 5 je raslo u prisustvu izuzetno visokih (100mM) koncentracija metala.
- Među 13 sojeva kod kojih je ispitano prisustvo genetičkih determinanti za toleranciju na teške metale kod dva soja je detektovano prisustvo gena za toleranciju na kadmijum, kod dva soja prisustvo gena za toleranciju na hrom i kod dva soja je

detektovano prisustvo gena za toleranciju na bakar. Aktivnost gena za toleranciju na bakar je potvrđena enzimskim esejem.

- Testiranje sposobnosti 14 sojeva da formiraju biofilmove pokazalo je da svi sojevi imaju sposobnost formiranja biofilma na polistirenu, ali do različitog nivoa. Najveći potencijal za formiranje biofilмова su pokazali *Staphylococcus* sp. MUI10, *Arthrobacter* sp. MSI31, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i *Cupriavidus metallidurans* CH34, dok su *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113, *Pseudomonas putida* KT2440 i *Cupriavidus necator* H16 pokazali nešto slabiji potencijal za formiranje biofilмова.
- U uslovima višednevnog izlaganja bakterijskih biofilмова dejstvu teških metala pokazano je da biofilmovi sojeva *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1 imaju povećanu toleranciju na teške metale u poređenju sa slobodnoživećim bakterijama.
- Analizom tolerancije slobodnoživećih bakterija i bakterijskih zajednica na teške metale, pokazano je da se na problem zagađenja sredine sa više različitih teških metala može odgovoriti:
 - Upotrebom soja *P. aeruginosa* PAO1.
 - Upotrebom četiri definisane bakterijske zajednice:
 - *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1;
 - *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1;
 - *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113 i *C. metallidurans* CH34;
 - *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1

koji su imali sposobnost rasta u prisustvu smeše bakra, kadmijuma i hroma.

- Ispitivanjem uticaja biofilмова na *in vitro* proces bioluženja pomoću *Acidithiobacillus ferrooxidans* pokazano je da biofilmovi:

- *P. aeruginosa* PAO1;
- *Staphylococcus* sp. MSI08, *Rhodococcus* sp. TN113 i *P. aeruginosa* PAO1;
- *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10, *Rhodococcus* sp. TN113, *C. metallidurans* CH34 i *P. aeruginosa* PAO1

moгу povećati efikasnost procesa bioluženja pojedinih metala i da se ovaj pristup može dalje optimizovati u pravcu poboljšanja procesa bioluženja.

LITERATURA

- Abou-Shanab, R., P. van Berkum and J. Angle (2007). "Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*." Chemosphere **68**: 360-367.
- Aguilar-Barajas, E., E. Paluscio, C. Cervantes and C. Rensing (2008). "Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*." FEMS Microbiology Letters **285**: 97-100.
- Alam, M. Z., S. Ahmad and A. Malik (2011). "Prevalence of heavy metal resistance in bacteria isolated from tannery effluents and affected soil." Environmental Monitoring and Assessment **178**: 281-291.
- Albarracín, V. H., M. J. Amoroso and C. M. Abate (2005). "Isolation and characterization of indigenous copper-resistant actinomycete strains." Chemie der Erde **65**: 145-156.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Research **25**: 3389-3402.
- Anderson, G. G. and G. A. O'Toole (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. Heidelberg, Springer.
- Badar, U. (2003). "Studies of copper and chromium resistance and their remediation by indigenous bacterial strains." Department of Genetics: University of Karachi.
- Baker, B. J. and J. F. Banfield (2003). "Microbial communities in acid mine drainage." FEMS Microbiology Ecology **44**: 139-152.
- Belliveau, B. H., M. E. Starodub and J. T. Trevors (1991). "Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediment." Canadian Journal of Microbiology **37**: 513-520.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.

- Brierley, J. A. and C. L. Brierley (2001). "Present and future commercial applications of biohydrometallurgy." Hydrometallurgy **59**: 233-239.
- Bruins, M. R., S. Kapil and F. W. Oehme (2000). "Microbial resistance to metals in the environment." Ecotoxicology and Environmental Safety **45**: 198-207.
- Bueno, M. Y. B., M. L. Torem, F. Molina and L. M. S. de Mesquita (2008). "Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies." Minerals Engineering **21**: 65-75.
- CEPA (1995). Environmental Quality Standard for Soils (GB15618-1995). Beijing, Chinese Environmental Protection Administration.
- Cha, J. S. and D. A. Cooksey (1991). "Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins." PNAS **88**: 8915-8919.
- Chien, M.-F., M. Narita, K.-H. Lin, K. Matsui, C.-C. Huang and G. Endo (2010). "Organomercurials removal by heterogeneous *merB* genes harboring bacterial strains." Journal of Bioscience and Bioengineering **110**: 94-98.
- Cole, J., K. T. Konstantinidis, R. J. Farris and J. M. Tiedje (2010). Microbial diversity and phylogeny: extending from rRNAs to genomes. Environmental Molecular Biology. W.-T. Liu and J. K. Jansson. Norwich, UK, Horizon Scientific Press.
- Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity and J. M. Tiedje (2009). "The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis." Nucleic Acids Research **37**: 141-145.
- Conic, V., V. Cvetkovski, E. Pozega, M. Vukovic and M. Cvetkovska (2009). "Razvoj mezofilnih bakterija iz podzemne eksploatacije Rudnika bakra Bor." Hemijska industrija **63**: 47-50.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**: 1318-1322.
- Cvetkovski, V., V. Conic, M. Vukovic and M. Cvetkovska (2009). "Mesophilic leaching of copper sulphide sludge." Journal of the Serbian Chemical Society **74**: 213-221.
- Cvetkovski, V., Z. Vaduvesković, S. Stanković and M. Cvetkovska (2006). "Prezentacija ogleđnog postrojenja za biohidrometaluršku proizvodnju bakra iz koncentrata,

- flotacijskih jalovina, metalurških šljaka, jamskih voda, rastvora elektrolize i pepela termoelektrana/energana." Bakar **31**: 9-26.
- Das, N., L. V. B. Basak, J. A. Salam and E. A. Abigail M (2012). "Application of biofilms on remediation of pollutants – An overview." Journal of Microbiology and Biotechnology Research **2**: 783-790.
- Davis, B. (2011). "Identification and characterisation of bacterial genes associated with resistance to and/or degradation of environmental pollutants." School of Engineering and Science: Victoria University.
- Diels, L., S. Van Roy, S. Taghavi and R. Van Houdt (2009). "From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*." Antonie van Leeuwenhoek **96**: 247-258.
- Donachie, S. P., J. S. Foster and M. V. Brown (2007). "Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity." The ISME Journal **1**: 97-102.
- Donati, E. R., M. R. Viera, E. L. Tavani, M. A. Giaveno, T. L. Lavallo and P. A. Chiacchiarini (2009). "Characterization of biofilm formation by the bioleaching acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a microarray transcriptome analysis." Advanced Materials Research **71-73**: 175-178.
- Donlan, R. M. (2008). "Biofilms on central venous catheters: is eradication possible?" Current Topics in Microbiology and Immunology **322**: 133-161.
- Eberz, G., T. Eitinger and B. Friedrich (1989). "Genetic determinants of a nickel-specific transport system are part of the plasmid-encoded hydrogenase gene cluster in *Alcaligenes eutrophus*." Journal of Bacteriology **171**: 1340-1345.
- Ellis, R. J., P. Morgan, A. J. Weightman and J. C. Fry (2003). "Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil." Applied and Environmental Microbiology **69**: 3223-3230.
- EPA/Serbia (1994). Sluzbeni Glasnik: Regulation on the content of hazardous materials in soil and fresh water - Pravilnik o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje, Serbian Ministry of Environment.
- Evanko, C. R. and D. A. Dzombak (1997). Remediation of metals-contaminated soils and groundwater, Technology Evaluation Report.

- Felsenstein, J. (1989). "PHYLIP -Phylogeny Inference Package (Version 3.2)." Cladistics **5**: 164-166.
- Fu, J., Y. Hu, G. Qiu, J. Liu and J. Xu (2004). "Biofilm forming and leaching mechanism during bioleaching chalcopyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*." Transactions of Nonferrous Metals Society of China **14**: 383-387.
- Gans, J., M. Wolinsky and J. Dunbar (2005). "Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil." Science **309**: 1387-1390.
- Gao, Q. H. (2011). "The tolerance of a *Rhodococcus* drinking water isolate and *Zoogloea ramigera* to silver nanoparticles in biofilm and planktonic cultures." The University of Texas
- Gefen, O. and N. Q. Balaban (2009). "The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress." FEMS Microbiology Reviews **33**: 704-717.
- Gericke, M., V. Conic, D. Milanovic and V. Cvetkovski (2008). "Novi tretman flotacijskih koncentrata iz Rudnika bakra RTB-a Bor." Rudarski Radovi **2**: 89-106.
- Götz, F. (2002). "*Staphylococcus* and biofilms." Molecular Microbiology **43**: 1367-1378.
- Grass, G. and C. Rensing (2001). "Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **183**: 2145-2147.
- Gremion, F., A. Chatzinotas and H. Harms (2003). "Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that *Actinobacteria* might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil." Environmental Microbiology **5**: 896-907.
- Guazzaroni, M. E., P. N. Golyshin and M. Ferrer (2010). Analysis of complex microbial communities through metagenomics survey. Cordoba, Argentina, Caister Academic Press.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton and P. Stoodley (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." Nature Reviews Microbiology **2**: 95-108.
- Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley (2009). "Evolving concepts in biofilm infections." Cell Microbiology **11**: 1034-1043.

- Hanahan, D. (1983). "Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**: 557-580.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy and R. M. Goodman (1998). "Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products." Chemistry & biology **5**: 245-249.
- Harrison, J., H. Ceri and R. Turner (2007). "Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms." Nature Reviews Microbiology **5**: 928-938.
- Harrison, J. J., H. Ceri, C. A. Stremick and R. J. Turner (2004). "Biofilm susceptibility to metal toxicity." Environmental Microbiology **6**: 1220-1227.
- Hassan, S. H. A., R. N. N. Abskharon, S. M. F. Gad El-Rab and A. A. M. Shoreit (2008). "Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt " Journal of Basic Microbiology **48**: 168-176.
- Hassen, A., N. Saidi, M. Cherif and A. Boudabous (1998). "Resistance of environmental bacteria to heavy metals." Bioresource Technology **64**: 7-15.
- He, Z., S. Xiao, X. Xie and Y. Hu (2008). "Microbial diversity in acid mineral bioleaching systems of Dongxiang copper mine and Yinshan lead-zinc mine." Extremophiles **12**: 225-234.
- He, Z., X. Xie, S. Xiao, J. Liu and G. Qiu (2007). "Microbial diversity of mine water at Zhong Tiaoshan copper mine, China." Journal of Basic Microbiology **47**: 485-495.
- Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack and F. Gotz (1996). "Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*." Molecular Microbiology **20**: 1083-1091.
- Herr, C. and N. F. Gray (1997). "Metal contamination of riverine sediments below the Avoca mines, south east Ireland." Environmental Geochemistry and Health **19**: 73-82.
- Hmiel, S. P., M. D. Snavely, J. B. Florer, M. E. Maguire and C. G. Miller (1989). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci." Journal of Bacteriology **171**: 4742-4751.

- Hsiao, Y.-M., Y.-F. Liu, P.-Y. Lee, P.-C. Hsu, S.-Y. Tseng and Y.-C. Pan (2011). "Functional characterization of *copA* gene encoding multicopper oxidase in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*." Journal of agricultural and food chemistry **59**: 9290-9302.
- <http://www.sntc.org.sz/> (Retrieved July 1, 2013). Swaziland Natural Trust Commission, "Cultural Resources - Malolotja Archaeology, Lion Cavern"
- ICMM (2012). "Trends in the mining and metals industry." International Council on Mining & Metals.
- Islam, E. and P. Sar (2011). "Culture-dependent and -independent molecular analysis of the bacterial community within uranium ore." Journal of Basic Microbiology **51**: 372-384.
- Ivany, J. W. and E. P. Heimer (1973). "Quick paper chromatography of monosaccharides." Journal of Chemical Education **50**: 562.
- Jansen, P. H. (2006). "Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes." Applied and Environmental Microbiology **72**: 1719-1728.
- Ji, G. and S. Silver (1995). "Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern." Journal of Industrial Microbiology **14**: 61-75.
- Johnson, D. B. (1998). "Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms." FEMS Microbiology Ecology **27**: 307-317.
- Johnson, D. B. and K. B. Hallberg (2005). "Acid mine drainage: remediation options." Science of the Total Environment **338**: 3-14.
- Juhnke, S., N. Peitzsch, N. Hübener, C. Grosse and D. H. Nies (2002). "New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34." Archives of Microbiology **179**: 15-25.
- Karavaiko, G. I., G. Rossi, A. D. Agate, S. N. Groudev and Z. A. Avakyan (1988a). Biogeotechnology of metals: manual. Moscow, Centre for International projects GKNT.
- Karavaiko, G. I., G. Rossi, A. D. Agate, S. N. Groudev and Z. A. Avakyan (1988b). Biogeotechnology of metals: manual. Moscow, Centre for International projects GKNT.

- Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jørgensen, S. Molin and T. Tolker-Nielsen (2003). "Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants." Molecular Microbiology **48**: 1511-1524.
- Kovacevic, R., M. Jovasevic-Stojanovic, V. Tasic, N. Milosevic, N. Petrovic, S. Stankovic and S. Matic-Besarabic (2010). "Preliminary analysis of levels of arsenic and other metallic elements in PM₁₀ sampled near Copper smelter Bor (Serbia)." Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly **16**: 269-279.
- Kovaleva, J., F. T. Peters, H. C. van der Mei and J. E. Degener (2013). "Transmission of infection by flexible gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy." Clinical Microbiology Reviews **26**: 231-254.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematic. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester, UK, John Wiley and Sons, Inc.: 115-175.
- Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui and H.-G. Schlegel (1993). "Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34." Journal of Bacteriology **175**: 767-778.
- Lin, Y., K. Jangid, W. B. Whitman, D. C. Coleman and C. Chiu (2011). "Soil bacterial communities in native and regenerated perhumid montane forests." Applied and Environmental Microbiology **47**: 111-118.
- Lloyd, J. R. (2002). "Bioremediation of metals; the application of micro-organisms that make and break minerals." Microbiology Today **29**: 67-69.
- MacHado, M. D., H. M. V. M. Soares and E. V. Soares (2010). "Removal of chromium, copper and nickel from an electroplating effluent using a flocculent Brewer's yeast of *Saccharomyces cerevisiae*." Water, Air and Soil Pollution **212**: 199-204.
- Malik, A. and A. Allem (2011). "Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater." Environmental Monitoring and Assessment **178**: 293-308.
- Malik, A. and R. Jaiswal (2000). "Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater." World Journal of Microbiology and Biotechnology **16**: 177-182.

- Margesin, R. and F. Schinner (1996). "Bacterial heavy metal-tolerance - extreme resistance to nickel in *Arthrobacter* spp. strains." Journal of Basic Microbiology **36**: 269-282.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. New York, Academic Press.
- McEntee, J. D., J. R. Woodrow and A. V. Quirk (1986). "Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp." Applied and Environmental Microbiology **51**: 515-520.
- Megharaj, M., B. Ramakrishnan, K. Venkateswarlu, N. Sethunathan and R. Naidu (2011). "Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective." Environment International **37**: 1362–1375.
- Mendez, M. O., E. P. Glenn and R. M. Maier (2007). "Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes." Journal of Environmental Quality **31**: 245-253.
- Mendez, M. O., J. W. Neilson and R. M. Maier (2008). "Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site." Applied and Environmental Microbiology **74**: 3899-3907.
- Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaeys, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie and R. Wattiez (2003). "*Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes." FEMS Microbiology Reviews **27**: 385-410.
- Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles and F. Van Gijsegem (1985). "*Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals." Journal of Bacteriology **162**: 328-334.
- Messing, J. (1983). "New M13 vectors for cloning." Methods in Enzymology **101**: 20-78.
- Misra, T. K. (1992). "Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials." Plasmid **27**: 4-16.
- Monsieurs, P., H. Moors, R. V. Houdt, P. J. Janssen, A. Janssen, I. Coninx, M. Mergeay and N. Leys (2011). "Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network." Biomaterials **24**: 1133-1151.
- Ñancuqueo, I. and D. B. Johnson (2010). "Production of glycolic acid by chemolithotrophic iron- and sulfur-oxidizing bacteria and its role in delineating and sustaining

- acidophilic sulfide mineral-oxidizing consortia." Applied and Environmental Microbiology **76**: 461-467.
- Nanda, M., D. Sharma and A. Kumar (2011). "Removal of heavy metals from industrial effluent using bacteria." International Journal of Environmental Sciences **2**: 781-787.
- Narancic, T. M. (2012). "Metabolička raznovrsnost bakterija izolovanih iz površinskog rečnog sedimenta pod uticajem petrohemijskih efluenata: *Pseudomonas* sp. TN301 kao proizvođač polihidroksialkanoata." Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo: Univerzitet u Beogradu.
- Nies, D. H. (1992). "Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes." Plasmid **27**: 17-28.
- Nies, D. H. (1999). "Microbial heavy-metal resistance." Applied Microbiology and Biotechnology **51**: 730-750.
- Nies, D. H. (2003). "Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes." FEMS Microbiology Reviews **27**: 313-339.
- Nithya, C., B. Gnanalakshmi and S. K. Pandian (2011). "Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria." Marine Environmental Research **71**: 283-294.
- O'Donnell, A. G., C. Falconer, M. Goodfellow, A. C. Ward and E. Williams (1993). "Biosystematics and diversity amongst novel carboxydrotrophic actinomycetes." Antonie Van Leeuwenhoek **64**: 325-340.
- Olson, G. J., J. A. Brierley and C. L. Brierley (2003). "Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries." Applied Microbiology and Biotechnology **63**: 249-257.
- Orr, I. G., Y. Hadar and A. Sivan (2004). "Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*." Applied Microbiology and Biotechnology **65**: 97-104.
- Orsini, M. and V. Romano-Spica (2001). "A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples." Letters in Applied Microbiology **33**: 17-20.
- Oyetibo, G. O., M. O. Ilori, S. A. Adebusoye, O. S. Obayori and O. O. Amund (2010). "Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and

- antibiotics in Nigerian contaminated systems." Environmental Monitoring and Assessment **168**: 305-314.
- Passariello, B., V. Giuliano, S. Quaresima, M. Barbaro, S. Caroli, G. Forte, G. Carelli and I. Iavicoli (2002). "Evaluation of the environmental contamination at an abandoned mining site." Microchemical Journal **73**: 245-250.
- Patterson, R. K. (1973). "Automated Pregl-Dumas technique for determining total carbon, hydrogen, and nitrogen in atmospheric aerosols." Analytical Chemistry **45**: 605-609.
- Piotrowska-Seget, Z., M. Cycoń and J. Kozdrój (2005). "Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil." Applied Soil Ecology **28**: 237-246.
- Purevdorj-Gage, B., W. J. Costerton and P. Stoodley (2005). "Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Microbiology **151**: 1569–1576.
- Quintelas, C., Z. Rocha, B. Silva, B. Fonseca, H. Figueiredo and T. Tavares (2009a). "Biosorptive performance of an *Escherichia coli* biofilm supported on zeolite NaY for the removal of Cr(VI), Cd(II), Fe(III) and Ni(II)." Chemical Engineering Journal **152**: 110-115.
- Quintelas, C., Z. Rocha, B. Silva, B. Fonseca, H. Figueiredo and T. Tavares (2009b). "Removal of Cd(II), Cr(VI), Fe(III) and Ni(II) from aqueous solutions by an *E. coli* biofilm supported on kaolin " Chemical Engineering Journal **149**: 319-324.
- Rajbanshi, A. (2008). "Study on heavy metal resistant bacteria in Guheswori sewage treatment plant." Our Nature **6**: 52-57.
- Rastogi, G. and R. K. Sani (2011). Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. New York, Springer New York.
- Rawlings, D. E. (2002). "Heavy metal mining using microbes." Annual Review of Microbiology **56**: 65-91.
- Reith, F., B. Etschmann, C. Grosse, H. Moors, M. A. Benotmane, P. Monsieurs, G. Grass, C. Doonan, S. Vogt, B. Lai, G. Martinez-Criado, G. N. George, D. H. Nies, M. Mergeay, A. Pring, G. Southam and J. Brugger (2009). "Mechanisms of gold

- biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*." PNAS **106**: 17757-17762.
- Rodríguez, L., E. Ruiz, J. Alonso-Azcárate and J. Rincón (2009). "Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in Spain." Journal of Environmental Management **90**: 1106-1116.
- Rohwerder, T., T. Gehrke, K. Kinzler and W. Sand (2003). "Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation." Applied Microbiology and Biotechnology **63**: 239-248.
- Rojas, L., C. Yanez, M. Gonzalez, S. Lobos, K. Smalla and M. Seeger (2011). "Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 generated for mercury bioremediation." PLoS One **6**: e17555.
- Rouch, D. A., B. T. Lee and A. P. Morby (1995). "Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance." Journal of Industrial Microbiology **14**: 132-141.
- Ryan, K. J. and C. G. Ray (2004). Sherris medical microbiology: An introduction to infectious diseases, McGraw Hill Professional.
- Sagar, S., A. Dwivedi, S. Yadav, M. Tripathi and S. D. Kaistha (2012). "Hexavalent chromium reduction and plant growth promotion by *Staphylococcus arlettae* strain Cr11." Chemosphere **86**: 847-852.
- Sand, W., T. Gehrke, P. G. Jozsa and A. Schippers (2001). "(Bio)chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching." Hydrometallurgy **59**: 159-175.
- Sani, R. K., G. Geesey and B. M. Peyton (2001). "Assessment of lead toxicity to *Desulfovibrio desulfuricans* G20: influence of components of Lactate C medium." Advances in Environmental Research **5**: 269-276.
- Saravanan, P., Y. V. Nancharaiah, V. P. Venugopalan, T. S. Rao and S. Jayachandran (2006). "Biofilm formation by *Pseudoalteromonas ruthenica* and its removal by chlorine." Biofouling **22**: 371 – 381.
- Schegel, H. G., H. Kaltwasser and G. Gottschalk (1961). "A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies." Archiv fuer Mikrobiologie **38**: 209-222.

- Schmidt, T. and H. G. Schlegel (1994). "Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A." Journal of Bacteriology **176**: 7045-7054.
- Schrenk, M., K. Edwards, R. Goodman, R. Hamers and J. Banfield (1998). "Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage." Science **279**: 1519-1522.
- Scott, J. A. and S. J. Palmer (1990). "Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption." Applied and Environmental Microbiology **33**: 221-225.
- Siddiquee, S., S. N. Aishah, S. A. Azad, S. N. Shafawati and L. Naher (2013). "Tolerance and biosorption capacity of Zn²⁺, Pb²⁺, Ni³⁺ and Cu²⁺ by filamentous fungi (*Trichoderma harzianum*, *T. aureoviride* and *T. virens*)." Advances in Bioscience and Biotechnology **4**: 570-583.
- Silver, S. and L. T. Phung (1996). "Bacterial heavy metal resistance: new surprises." Annual Review of Microbiology **50**: 753-789.
- Silverman, M. P. and D. G. Lundgren (1959). "Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields." Journal of Bacteriology **77**: 642-647.
- Smith, L. A., J. L. Means, A. Chen, B. Alleman and C. C. Chapman (1995). Remedial options for metals-contaminated sites. Boca Raton, Florida, Lewis Publishers.
- Solano, F., P. Lucas-Elio, D. Lopez-Serrano, E. Fernandez and A. Sanchez-Amat (2001). "Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins." FEMS Microbiology Letters **204**: 175-181.
- Sørheim, R., V. L. Torsvik and J. Goksøyr (1989). "Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media." Microbial Ecology **17**: 181-192.
- Stoppel, R. D. and H. G. Schlegel (1995). "Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems." Applied and Environmental Microbiology **61**: 2276-2285.
- Sun, H., J. Li and X. Mao (2012). "Heavy metals' spatial distribution characteristics in a copper mining area of Zhejiang Province." Journal of Geographic Information System **4**: 46-54.

- Sundar, K., I. M. Sadiq, A. Mukherjee and N. Chandrasekaran (2011). "Bioremoval of trivalent chromium using *Bacillus* biofilms through continuous flow reactor." Journal of Hazardous Materials **196**: 44-51.
- Teitzel, G. and M. Parsek (2003). "Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*." Applied and Environmental Microbiology **69**: 2313-2320.
- Tempel, K. (2003). Commercial biooxidation challenges at Newmont's Nevada operations. Society Mining, Metallurgy and Exploration Annual Meeting, Littleton, Colorado, USA.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Research **22**: 4673-4680.
- Tindall, B. J., J. Sikorski, R. A. Smibert and N. R. Krieg (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. Methods for general and molecular microbiology. C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznaketet al. Washington, D.C, ASM Press: 330-393.
- Toovey, L. M. (2010). The top 10 copper producing countries. Copper Investing News.
- Torsvik, V., R. Sørheim and J. Goksøyr (1996). "Total bacterial diversity in soil and sediment communities." Journal of Industrial Microbiology **17**: 170-178.
- Trajanovska, S., M. Britz and M. Bhave (1997). "Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site." Biodegradation **8**: 113-124.
- UNEP (2003). "Excerpt form Environmental Performance Review Yugoslavia, chapter 8."
- Van Hamme, J. D., A. Singh and O. P. Ward (2003). "Recent advances in petroleum microbiology." Microbiology and Molecular Biology Reviews **67**: 503-549.
- Van Horn, D. J., M. L. Van Horn, J. E. Barret, M. N. Gooseff, A. E. Altrichter, K. M. Geyer, L. H. Zeglin and C. D. Takacs-Vesbach (2013). "Factors controlling soil microbial biomass and bacterial diversity and community composition in a cold desert ecosystem: role of geographic scale." PLoS One **8**: e66103.

- Velusamy, P., Y. M. Awad, S. A. M. Abd El-Azeem and Y. S. Ok (2011). "Screening of heavy metal resistant bacteria isolated from hydrocarbon contaminated soil in Korea." Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences **23**: 40-43.
- Viera, M., C. Pogliani and E. Donati (2007). Recovery of zinc, nickel, cobalt and other metals by bioleaching, Springer Netherlands.
- Vu, B., M. Chen, R. J. Crawford and E. P. Ivanova (2009). "Bacterial extracellular polysaccharides Involved in biofilm formation." Molecules **14**: 2535-2554.
- Walters III, M. C., F. Roe, A. Bugnicourt, M. J. Franklin and P. S. Stewart (2003). "Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**: 317-323.
- Watling, H. R. (2008). "The bioleaching of nickel-copper sulfides." Hydrometallurgy **91**: 70-88.
- Weast, R. C. (1984). CRC handbook of chemistry and physics. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Wei, B. and L. Yang (2010). "A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China." Microchemical Journal **94**: 99-107.
- Wei, G., L. Fan, W. Zhu, Y. Fu, J. Yu and M. Tang (2009). "Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China." Journal of Hazardous Materials **162**: 50-56.
- Wernimont, A. K., D. L. Huffman, L. A. Finney, B. Demeler, T. V. O'Halloran and A. C. Rosenzweig (2003). "Crystal structure and dimerization equilibria of PcoC, a methionine-rich copper resistance protein from *Escherichia coli*." Journal of Biological Inorganic Chemistry **8**: 185-194.
- White, B. A. (1997). PCR Cloning Protocols. New Jersey, USA, Humana Press INC.
- Wiesemann, N., J. Mohr, C. Große, M. Herzberg, H. Hause, F. Reith and D. Nies (2013). "Influence of copper resistance determinants on gold transformation by *Cupriavidus metallidurans* strain CH34." Journal of Bacteriology: DOI: 10.1128/JB.01951-01912.

- Xie, X., J. Fu, H. Wang and J. Liu (2010). "Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China." African Journal of Biotechnology **9**: 4056-4066.
- Xu, J. (2010). Metagenomics and ecosystems biology: conceptual frameworks, tools and methods. Cordoba, Argentina, Caister Academic Press.
- Yang, Y., W. Shi, M. Wan, Y. Zhang, L. Zou, J. Huang, G. Qiu and X. Liu (2008). "Diversity of bacterial communities in acid mine drainage from the Shen-bu copper mine, Gansu province, China." Electronic Journal of Biotechnology **11**.
- Ye, Z. H., W. S. Shu, Z. Q. Zhang, C. Y. Lan and M. H. Wong (2002). "Evaluation of major constraints to revegetation of lead/zinc mine tailings using bioassay techniques." Chemosphere **47**: 1103–1111.
- Yilmaz, E. I. (2003). "Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1." Research in Microbiology **154**: 409-415.
- Zhao, X.-Q., R.-C. Wang, X.-C. Lu, J.-J. Lu, J. Li and H. Hu (2012). "Tolerance and biosorption of heavy metals by *Cupriavidus metallidurans* strain XXKD-1 isolated from a subsurface laneway in the Qixiashan Pb-Zn sulfide minery in Eastern China." Geomicrobiology Journal **29**: 274-286.

PRILOZI

Prilog I: Poravnanja nukleotidnih sekvenci gena za determinante rezistencije na teške metale, umnoženih u ovoj studiji i sekvenci gena sa kojima su pokazali najveću sličnost u GenBank bazi podataka

a) Poravnanje *czcA* gena za determinantu rezistencije na Cd²⁺ *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10 i *Cupriavidus metallidurans* CH34

```

MUI10 -----CTAACGATG-CTGGTC-TGCTCGCCGTG
CH34  ATGTTTGAACGTATCATTAGTTTCGCCATCCAGCAGCGATGGCTGGTCCTGCTCGCCGTG
MSI08 -----TCCA-----ATGCTTGGTCCTGCTCGCCGTG
                                     ***  *****

MUI10 TTTGGA-TGGCCGGGTTAGGGATTTTCAGCTACAACCGACTACCGATCGACGCGGTCCCT
CH34  TTTGGAATGGCCGGGTTAGGGATTTTCAGCTACAACCGACTACCGATCGACGCGGTCCCT
MSI08 TTTGGA-TGGCCGGGTTAGGGATTTTCAGCTACAACCGACTACCGATCGACGCGGTCCCT
*****

MUI10 GACATTACCAACGTTTCAGGTTTCAGGTC AATACCTCGGCACCAGGCTATTCACCGCTCGAA
CH34  GACATTACCAACGTTTCAGGTTTCAGGTC AATACCTCGGCACCAGGCTATTCACCGCTCGAA
MSI08 GACATTACCAACGTTTCAGGTTTCAGGTC AATACCTCGGCACCAGGCTATTCACCGCTCGAA
*****

MUI10 ACCGAACAGCGTGTTACGTATCCGATCGAGGTCGTGATGGCCGGCCTGCCGGGACTCGAA
CH34  ACCGAACAGCGTGTTACGTATCCGATCGAGGTCGTGATGGCCGGCCTGCCGGGACTCGAA
MSI08 ACCGAACAGCGTGTTACGTATCCGATCGAGGTCGTGATGGCCGGCCTGCCGGGACTCGAA
*****

MUI10 CAGACGCGTTCCTTCCCGCTATGGCTTGTTCGCAGGTGACGGTCATCTTCAAGGATGGC
CH34  CAGACGCGTTCCTTCCCGCTATGGCTTGTTCGCAGGTGACGGTCATCTTCAAGGATGGC
MSI08 CAGACGCGTTCCTTCCCGCTATGGCTTGTTCGCAGGTGACGGTCATCTTCAAGGATGGC
*****

MUI10 ACGGACGCTCTATTTTCGCGCGCAACTCGTCAACCAGCGCATCCAGGAAGCCAAGGACAAT
CH34  ACGGACGCTCTATTTTCGCGCGCAACTCGTCAACCAGCGCATCCAGGAAGCCAAGGACAAT
MSI08 ACGGACGCTCTATTTTCGCGCGCAACTCGTCAACCAGCGCATCCAGGAAGCCAAGGACAAT
*****

MUI10 CTGCCTGAAGGCGTTGTGCCGGCGATGGGGCCTATTTTCGACCGGCCTCGGGGAGATCTAT
CH34  CTGCCTGAAGGCGTTGTGCCGGCGATGGGGCCTATTTTCGACCGGCCTCGGGGAGATCTAT
MSI08 CTGCCTGAAGGCGTTGTGCCGGCGATGGGGCCTATTTTCGACCGGCCTCGGGGAGATCTAT
*****

MUI10 CTATGGACCGTTGAAGCCGAAGAGGGTGCTCGCAAAGCTGACGGGACTGCCTATACGCCG
CH34  CTATGGACCGTTGAAGCCGAAGAGGGTGCTCGCAAAGCTGACGGGACTGCCTATACGCCG
MSI08 CTATGGACCGTTGAAGCCGAAGAGGGTGCTCGCAAAGCTGACGGGACTGCCTATACGCCG
*****

```

MUI10 ACAGATTTGCGCGAAATCCAGGATTGGGTGGTACGGCCGCAACTGCGTAACGTGCCCGGT
CH34 ACAGATTTGCGCGAAATCCAGGATTGGGTGGTACGGCCGCAACTGCGTAACGTGCCCGGT
MSI08 ACAGATTTGCGCGAAATCCAGGATTGGGTGGTACGGCCGCAACTGCGTAACGTGCCCGGT

MUI10 GTCACCGAGATCAATACTATCGGTGGTTTCAACAAGCAGTACCTGGTCGCGCCGAGTCTT
CH34 GTCACCGAGATCAATACTATCGGTGGTTTCAACAAGCAGTACCTGGTCGCGCCGAGTCTT
MSI08 GTCACCGAGATCAATACTATCGGTGGTTTCAACAAGCAGTACCTGGTCGCGCCGAGTCTT

MUI10 GAACGGCTAGCGTCGTACGGGCTGACGCTGACCGACGTCGTCAATGCGCTGAACAAGAAC
CH34 GAACGGCTAGCGTCGTACGGGCTGACGCTGACCGACGTCGTCAATGCGCTGAACAAGAAC
MSI08 GAACGGCTAGCGTCGTACGGGCTGACGCTGACCGACGTCGTCAATGCGCTGAACAAGAAC

MUI10 AACGACAACGTGGGTGCGGGCTACATCGAGCGTAGGGGCGAGCAGTATCTGGTT-CGTGC
CH34 AACGACAACGTGGGTGCGGGCTACATCGAGCGTAGGGGCGAGCAGTATCTGGTT-CGTGC
MSI08 AACGACAACGTGGGTGCGGGCTACATCGAGCGTAGGGGCGAGCAGTATCTGGTTTCGTGC
***** *****

MUI10 GCCGGGTCAGGTT-GCGTCCGAAGACGACATCCGCAACATTATTGTCGGTACAGCGCAGG
CH34 GCCGGGTCAGGTT-GCGTCCGAAGACGACATCCGCAACATTATTGTCGGTACAGCGCAGG
MSI08 GCCGGGTCAGGTTTTCGTCCGAAGACGACATCCGCAACATTATTGTCGGTACAGCGCAGG
***** *****

MUI10 GGCAGCCGATCC-GCATTCCGCGACATCGGGGATGTGGA-GATTGGCAAGGAAGTGCCTAC
CH34 GGCAGCCGATCC-GCATTCCGCGACATCGGGGATGTGGA-GATTGGCAAGGAAGTGCCTAC
MSI08 G-CAGCCGATCCCGCATTCCGCGACATCGGGGATGTGGAAGATTGGCAAGGAAGTGCCTAC
* ***** *****

MUI10 C-GGTGCGGCAACCG-AGAATGGC-AAGGAAGT-GTGC-TGGGC-ACGGTATT-CATGCT
CH34 C-GGTGCGGCAACCG-AGAATGGC-AAGGAAGTGTGC-TGGGC-ACGGTATT-CATGCT
MSI08 CCGGTGCGGCAACCGGAGAATGGCCAAGGAAGTTGTGCCTGGGCCACGGTATTTTCATGCT
* ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

MUI10 CATCGG-CGAAAACAGCCCGG-CTGTGTCAAAGCGGTTTCGAT-GAAAAGGTCGCTTTCC
CH34 CATCGG-CGAAAACAGCCGGG-CTGTGTCAAAGCGGT-CGAT-GAAAAGGTCGCTT-CC
MSI08 CATCGGGCGAAAACAGCCCGTCTGTGTCAAAGTCGGGTCGATTGAAAAGGTCGCTTCC

```

MUI10 ATTAACCGGTACGAATGCTGCA-GGTGTGA-GATCGTA-CGGTATACGAACCGACACGTC
CH34 ATTAACCG-TACGA-TGCCGGAAGGTGTGAAGATCGTAACGGTATACGACCGGACACGTC
MSI08 ATTTA-----ACCGTA-----
      *** * * * * * * * * * *
MUI10 TGGTCGA-----ACCC-----AGGCC-----
CH34 TGGTCGACAAGGCCATTGCGACCGTCAAGAAGAACCTTCTTGAAGGCGCGGTGCTCGTCA
MSI08 -----

MUI10 ----AATT-TG-----
CH34 TCGTAATTCTGTTCCTTTTCTGGGTAACATCCGCGGGCGCTGATTACCGCGACGATCA
MSI08 -----

MUI10 -----
CH34 TTCCGCTGGCGATGTTGTTTACCTTACGGGGATGGTGAACACTACAAGATCAGTGCGAACC
MSI08 --CCGATGGCG-----GGAGGGTG--TTGCAGAAT-----

MUI10 -----
CH34 TGATGAGCTTGGGCGCGCTCGACTTCGGCATCATCATCGATGGCGGGTGGTATTGTCTG
MSI08 -----TCGTCAACGGTATGG----ATCG----

MUI10 -----
CH34 AAAACTGTGTGAGGCGACTGGCGCATGCGCAGGAACACCATGGCCGGCCATTGACGCGCT
MSI08 -----GGACATCGT-----CT

MUI10 -----
CH34 CCGAGCGGTTCCATGAGGTGTTGCCGAGCGAAGGAGGCGCGTCCCCACTGATCTTCG
MSI08 CTG-----GTTCGACACA---AGG-----GTCCAC-----

MUI10 -----
CH34 GTCAGCTCATATTATGATCGTCTACCTGCCGATCTTTCGCTGACGGGGTGAAGGCA

```


b) Poravnanje *chrB* gena za determinantu rezistencije na Cr⁶⁺ *Staphylococcus* sp. MSI08, *Staphylococcus* sp. MUI10 i *Cupriavidus metallidurans* CH34

```

MSI08 -----
CH34  CTAGCGTTTGC GCGGGCTTGAGAAATGCGTGTACAGCGAGTCGAGGACATAGCCGACTTC
MUI10 -----

MSI08 -----
CH34  ATCCAGCAGTGC GTCGTCGTTAGGGAGGCGTTC CCGGGCGCCTGCCAGCACTGCCTCAA
MUI10 -----

MSI08 -----
CH34  GCCACTGGCTTC GGC AACCGGTGTGCCGCCGACATCCAGAACATGGATCATCTGGCCGAG
MUI10 -----

MSI08 -----
CH34  GCGGGCAGCCCTT TGTCTTCGTCTAGTCCGAAGCTGGCGAGCAGCACCTCAAACGAAAC
MUI10 -----

MSI08 -----
CH34  GCGGTGCCAATGT GTGTGAACGTCGCGCCATCGAAGTCGAATCCAAGTGC GTCGTCAGG
MUI10 -----

MSI08 -----
CH34  GCACTGACGGACAT CTTGAGCCAGAGAAAAGTGGCATGGGGATCGATAAAGCGCCGGAT
MUI10 -----

MSI08 -----GTTACACCT
CH34  CAACCAAGCGCAG GCGACACGGTCTACCCATAGATGCTGGCGGGTCGCCACTGGCGCCC
MUI10 -----GTGGACACAG
                                     * *

MSI08 CT-----CTCG-----
CH34  CTGATACTGGGT CGGGTCACGTCGCGGAATGTTGCCGGCTACTCCGTGCGGCTCGCCGGG
MUI10 GT-----CTGT-----
      *                               **

MSI08 -----AGACGCA-----TCGGC-CGGGCGGA
CH34  CGAAAGCAAGATG TCGATCGCTGCATTGAAGTCGCGCCACTGCAATTCGGCACGGGCGGA
MUI10 -----GAT-----TAGGC-CGGGCGGA
                                     * *** *****

MSI08 CGCCTCGTTAGGG AAAAA-TCGACCTTGCGGATAGCGTCGATCCCTCGACCGTGCCGGCG
CH34  CGCCTCGTTAGGG AAAAAATCGACCTTGCGGATAGCGTCGATCCCTCGACCGTGCCGGCG
MUI10 CGCCTCGTTAGGG AAAAA-TCCACCTTGCGGATAGCGTCGATCTG-CGACCGTGCCGGAG
*****

```

```

MSI08 TGCCACGCGCAGCAGCTCCGCCTCGTCCGAATCGGACAATGTTGAGCGGGCGCTGGAGAG
CH34 TGCCACGCGCAGCAGCTCCGCCTCGTCCGAATCGGACAATGTTGAGCGGGCGCTGGAGAG
MUI10 TGCCACGCGCAG-AGCTCCGCCTCGTCCGAATCGGACAATGTTGAGCGGGCGCTGGAGAG
***** ** *****

MSI08 TTCCACCATCCATTCGGCATATTCGGTGGACCGGTGGAACAACGCGGATACTCCGCCTC
CH34 TTCCACCATCCATTCGGCATATTCGGTGGACCGGTGGAACAACGCGGATACTCCGCCTC
MUI10 TTCCACCATCCATTCGGCATATTCGGTGGACCGGTGGAACAACGCGTATACTCCGCCTC
** *****

MSI08 CTGTGGTTCGTGAGCGGCCTGTACGGACAGCATCCAGACCTTGCCATCCTCACTGGCCGC
CH34 CTGTGGTTCGTGAGCGGCCTGTACGGACAGCATCCAGACCTTGCCATCCTCACTGGCCGC
MUI10 CTGTGGTTCGTGAGCGACCTGTACGGACAGCATCCAAACCTTGCCATCCTCACTGGCCGC
***** *****

MSI08 ATCGGTTGCCAGTGTCTGCAAAGGTGCCCGCAGTCCTGGCAGATTGGGGAGTAGATAGGC
CH34 ATCGGTTGCCAGTGTCTGCAAAGGTGCCCGCAGTCCTGGCAGATTGGGGAGTAGATAGGC
MUI10 ATCGGTTGCCAGTGTCTGCAAAGGTGCCCGCAGTCCTGGCAGATTGGGGAGTAGATAGGC
*****

MSI08 CCCGTCCCAGTGTCTGGCGCCAAGCGCCTTGATCCCGCGCCAGAATCGCATGCGCGC
CH34 CCCGTCCCAGTGTCTGGCGCCAAGCGCCTTGATCCCGCGCCAGAATCGCATGCGCGC
MUI10 CCCGTCCCAGTGTCTGGCGCCAAGCGCCTTGATCCCGCTCCCGACACGCATGCGCGC
***** ** *

MSI08 AGTGGAGGCGGATGTTGGCAAGCTAACGACA-----
CH34 AGTGGAGGCGGATGTTGGCAAGCTAACGACGAGCAGTAGCCAGGCAGTCTCGGGAGAGGA
MUI10 AGTGGAGGCGGATGTTGGCAAGCTAACGACAATTGACCGCGAC-----
*****

MSI08 -----
CH34 TGGGAGAGCGTTCAT
MUI10 -----

```

c) Poravnanje *copA1* gena za determinantu rezistencije na Cu²⁺ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i *Pseudomonas putida* W619

```

PAO1 -----
W619 TCATTGTCACGCGGACTTCTCGGAACATGCCCATCTCCATGTGGTACATGAGGTGACA

PAO1 -----
W619 GTGATAGGCCAGCGCCGAGTGCATCTGCGGTTACGCGATAGCTTCGTTTCGAGCCAGG

PAO1 -----
W619 CGGCATATCGATCGTGTGTTTTCGCACCATGAAATTGCCGTCCTCATCCTCCAGGTCCT

PAO1 -----GGATGGGA-----
W619 CCACATGCCGTGCAGATGGATGGGGTGAGTCAATCATGGTGTGTTGACCAAGTAATACG
      *****

PAO1 ---ACGCTCGCCATATTTCA-CCGCAGCGGTTACGCGTCGGAGAATTTGATACCGTCGAA
W619 CAGGCGCTCGCCGACTTGTAGCCGCGCGGCTCTGCGTCAGAAAACCTGATCCCATCGAA
      ***** * * * * *

PAO1 CGACCACGCGAACTTCTCCATGTGGCCGGTAAGGTGCAGTTCGATTGTCCGTCAGGCTC
W619 GGACCAAGCGAACTTTTCCATATGCCCGGTAAGGTGCAGTTCGATTGTCCGGCCAGGTT
      ***** * * * * *

PAO1 TCGACCATCGGGATCGATGAAGGTGCTCCGCAGATCGGCGTACGTCAGCACTCGACGCC
W619 CCGCCGTCAGGTCGATGAAGGTGCTACGCAAATCCGAATACGTGAGAACCAGGACGCC
      * * * * *

PAO1 GTTGTGCGTAGGCCAATTCCCGGATCGTTCAGCTTTGGCGTTGGCGACATAGTCTGCAT
W619 GTTATCGCGAAGCCCGATCCCGGATCGCTCAGCTTTGGCGTAGGGGTCATGGTCTGCAT
      *** * * * * *

PAO1 ATCGACCAGTGGGTTGTTGTCTCGGAAGCCGGATGGCTTTGCATTGCGCCGCT-----
W619 ATCGACCAGAGGTTGTTGTTCGGAGGCGGGATGGTCTGCATGGCACCGCTGGCGGC
      ***** * * * * *

PAO1 -----
W619 CATATTGCTTTGGTCCATACCGGTCATGTTGCCGTGGTCCATGCCAGCCATCTTGCTATG

PAO1 ---CATGCCGGCCATGCCTTCATTGCCCATCCCAGTCATCTTGCTGTGGTCCATACCGGC
W619 GTCCATACCGGCCATGCTGCCGTGGTCCATGCCAGCCATCTTGCTATGGTCCATACCGGC
      *** ***** * * * * *

PAO1 CATGCTGCCGTGGTCCATTCCAGCCATCTTGCTGTGATCCATGCCGGCCATGCTGCCCTG
W619 CATGCTGCCGTGGTCCATGCCAGCCATCTTGCTATGGTCCATACCGGCCATGCTGCCGTG
      ***** * * * * *

PAO1 GTCCATGCCAGCCATGCTGCCATGATCCATTCGGCCATGCTGCCCTGGTCCATGCCAGC
W619 GTCCATGCCAGCCATCTTGCTATGGTCCATACCGGCCATGCTGCCGTGGTCCATGCCAGC
      ***** * * * * *

PAO1 CAT-----GCTGCCATGATCCATTCGCCCATGCTGCCGTG
W619 CATCTTGCTGTGGTCCATACCGGCCATGCTGCCGTGATCCATGCCACCCATGCTGCCGTG
      *** ***** * * * * *

PAO1 GTCCATGCCCATATCGCTCATGGCGATGATCGGGCGTGGATCTACCGCCGTTACGGGCGC
W619 GTCCATCCCCATATCACTCATGGAGATGAGAGGCCTTGGATCTACAGCCGGCACCGGTGC
      ***** * * * * *

PAO1 TTGCAAGCCTTCGCGAACTGCCAGGGTGCCTCGGGAATACCGGTACGGTCCATGGATTG
W619 CTGCAGGCCCTCACGGACAGCCAAGGTACCCCTTGAATAGCCGGTGGATCCATGGATTG
      **** * * * * *

```

PA01 CGCGAAAATCGTATAGGCCTGTTTCGTTTTTCAGGCTCGACGATGACATCGTAGGTTTCAGC
 W619 AGCAAAGATGGTGTAAAGCCTGCTCGTTTTTCAGGCTCGACAATGACATCGTAGGTTTCAGC
 * * * * *

PA01 AACGGCGATCCGGAATTCATCGACCGATACGGGTTTGACGTACTGGCCGTCGGCAGCCAC
 W619 AACGGCAATCCGGAATTCATCGATCGACACTGGCTTAACGTACTGACCGTCGGCTGCGAC
 * * * * *

PA01 AACCGTCATCTTGAGCCCAGGAATCCGGACATCGAAATAGGTTCATGGCCGAGCCGTTGAT
 W619 AACCGTCATTTCAAGCCGGGATCCGCACGTCGAAATAGGTTCATCGCCGAGCCATTGAT
 * * * * *

PA01 GAATCGCAGGCGGATCT-CTCGCCGGGCTTGAAGATACCCGTCCAGTTGCCGTC-GGAGC
 W619 AAAGCGAAGCCGGATTTCTCCCTGGCTTGAAGATTCCCGTCCAGTTCCCATTGGCGC
 * * * * *

PA01 TTGCCCGTTCATGAGGTAGGTGTAGGTATACCCGCTCACATCTGCGAGGTTTCGTTGGGCT
 W619 CTGGCCGTTTCATGAGGTAGGTGTAGGTGTGCCCGCTCACGTGAGGATCGGTTGGGCT
 * * * * *

PA01 CAATCTCCATTTTCAGGCTCAAGTCTC-CGATCCGT-ACAGC-GCGAACCAGCTTTTCTC
 W619 CA-TCCTCATCTCGG--CCCACATCTTTCGATCGGCCACAGCAGCAGACCAACCTTTCTC
 * * * * *

PA01 G-----GCTC-----
 W619 GCTCACGTCGTCGACGAAGTCGCCAACGGTGCCTTGTGGAAGTTGTAATAGTCCGACTG
 * * *

PA01 -----
 W619 TTTTTGAGCTTGGACATAACCCGCGCGGGTCTTCGTCGGTCCAATCACTCAGCATGAC

PA01 -----
 W619 GACATAGTCACGATCGTAGGTGAAAGGCTCTGGATCCTTGGCATCAATCACCAGCGCACC

PA01 -----
 W619 GTAAACACCGACCTGCTCCTGGAAGCCGAATGGCTGTGGTACCAGTAGGTGCCGTTCTG

PA01 -----
 W619 GTGGACCTTGAACCTTGTACTCGTACATGCCGTCGGGAGCGATGCCATGGAAGCTTAGACC

PA01 -----
 W619 CGGCACGCCGTCATATTCGCCGCGAGGATGATGCCGTGCCAGTGGATGGACGTGTCCTG

PA01 -----
 W619 CTTCAAGCGGTTGCGAACCCTAGCGTGACCGTGTGCGCTTCGCGCCAACGGAGTATTGG

PA01 -----
 W619 TCCTGGCAGCGAACCCTGATGCCATCGCCGTTGAGCTGCCCGGTAATGTTACCGG

PA01 -----
 W619 CAGGCCTTTGACGAATGAACGTCTCGTGGTTTTGCTTTGCAT

d) Poravnanje *copA1* gena za determinantu rezistencije na Cu^{2+} *Rhodococcus* sp. TN113 i *Pseudomonas putida* ND6

```

TN113 -----
ND6   TCATTCGTCCACACGGACTTCTCGGAACATGCCCGTTTCCATATGGAACATGAGGTGACA

TN113 -----
ND6   GTGATAGGCCAACGCCCAAAGCATCCGCAGTTACGCGATAGCTTCGTTTTGAGCCTGG

TN113 -----
ND6   TGGCATGTCGATGGTGTGTTTTTGAACCATGAAGTTGCCGTCTCATCCTCCAGGTCGCT

TN113 -----GTC--TA-----
ND   CCACATGCCATGAAGGTGGATGGGGTGAGTCATCATGGTGTGCGTTAATCAAGGTGATACG
      ***  **

TN113 ---GCGCTCTC-GTACTTGAGGCGCAGGGGGCGGCATCGGAAAACCTTGATGCCGTCGAA
ND   AAGCGCTCTCCGTACTTGAGGCGCAGGGGGCGGCATCGGAAAACCTTGATGCCGTCGAA
      *****

TN113 GGACCAGGCGAATTCTCCATGTGACCCGTCAGGTGCAGCTCGATATTCGGCTAGGCTC
ND   GGACCAGGCGAATTCTCCATGTGACCCGTCAGGTGCAGCTCGATATTCGGCTAGGCTC
      *****

TN113 TCGTCCATCTGGGTCGATGAAGGTGCTCCGCAGGTCTGCATAGGTGAGGACGTGGCGGCC
ND6   TCGTCCATCTGGGTCGATGAAGGTGCTCCGCAGGTCTGCATAGGTGAGGACGTGGCGGCC
      *****

TN113 GTTGTACGTAGCCCGATGCCCGGGTCATCCAATTTGCGGTCGGGGTCATCGTCTGCAT
ND6   GTTGTACGTAGCCCGATGCCCGGGTCATCCAATTTGCGGTCGGGGTCATCGTCTGCAT
      *****

TN113 GTCGACCAATGGGTTGTTGAGCTCTGAGTCTGGATGACTCTGCATTTCTTACTCATGCC
Nd6   GTCGACCAATGGGTTGTTGAGCTCTGAGTCTGGATGACTCTGCATTTCTTACTCATGCC
      *****

TN113 GGCCATGCTGCCGTGGTCCGTGCCAGCCATCTTGCTGTGATCCATGCCGGCCATGCTGCC
ND6   GGCCATGCTGCCGTGGTCCATGCCAGCCATCTTGCTGTGATCCATGCCGGCCATGCTGCC
      *****

TN113 GTGGTCC-----
ND   GTGGTCCATGCCAGCCATCTTGCTGTGATCCATGCCGGCCATGCTGCCGTGGTCCATGCC
      *****

TN113 -----
ND6   AGCCATCTTGCTGTGATCCATGCCGGCCATGCTGCCGTGGTCCATGCCAGCCATCTTGCT

TN113 -----
ND6   GTGATCCATGCCGGCCATGCTGCCGTGGTCCGTGCCAGCCATTTGCTGTGATCCATGCC

TN113 -----GTGCCAGCCATTTGCTGTGATCCATGCCGGCCATGCTGCT
ND6   GGCCATGCTGCCGTGGTCCGTGCCAGCCATTTGCTGTGATCCATGCCGGCCATGCTGCT
      *****

```

TN113 GTGGTCCATGCCCATATCATTCATGGAAATGAGGGGCGTGGGTCAATGGTTGGAACAGC
ND6 GTGGTCCATGCCCATATCATTCATGGAAATGAGGGGCGTGGGTCAACGGTTGGAACAGC

TN113 AGCTTGCAAGCCTTACGGATGGCCAGGGTGCCCTGGAAAAGCCCGTACGGTCCATGGA
ND AGCTTGCAAGCCTTACGGATGGCCAGGGTGCCCTGGAAAAGCCCGTACGGTCCATGGA

TN113 TTGAGCGAAGATGGTGTATGCCTGTTGCTCTTCTGGCTCAACAATGACATCGTAGGTTTC
ND6 TTGAGCGAAGATGGTGTATGCCTGTTGCTCTTCTGGCTCAACAATGACATCGTAGGTTTC

TN113 GGCTACTGCGATACGGAACCTCGTCGACCGAGACCGGATGGACATACTGCCCATCCGCTGC
ND6 GGCTACTGCGATACGGAACCTCGTCGACCGAGACCGGATGGACATACTGCCCATCCGCTGC

TN113 AACCCTGTCAATTTTCAGGCCAGGAATGCGTACATCGAAATACGTCATGGCGGAGCCGTT
ND6 AACCCTGTCAATTTTCAGGCCAGGAATGCGTACATCGAAATACGTCATGGCGGAGCCGTT

TN113 GATGAACCGAAGCCGGATTTTCTCGCCAGGCTTGAAAACACCCGTCGAATTTCCATCCGG
ND6 GATGAACCGAAGCCGGATTTTCTCGCCAGGCTTGAAAACACCCGTCGAATTTCCATCCGG

TN113 AGCCTGGCCGTTTCATGAGGTAGGTGTAGGTATACCCGCTCACATCCGCGAGATCAGTGGG
ND6 AGCCTGGCCGTTTCATGAGGTAGGTGTAGGTATACCCGCTCACATCCGCGAGATCAGTGGG

TN113 GCTCATCTTCATCTCGGGCCACATCTTGCATCGGGCCATCGCAGCAGACCAGCCATT
ND6 GCTCATCTTCATCTCGG-CCACATCTTGCATCGG-CCATCGCAGCAGACCAGCCATT

TN113 TCGCTTACGTCGTTGACGAGTTCACCCACGGTC-GCT-GTGGAG--TG TAGTAGTCAGAC
ND6 TCGCTTACGTCGTTGACGAGTTCACCCACGGTCCGCTTGTGGAAGTTG TAGTAGTCAGAC

TN113 TGGCTTCTTAGGCT--GATAGA---CGGGCAG-----
ND6 TG-CTTCTTAAGCTTGATAGAACGTGGGCAGGGTCTCATCCGTCAGTCGCTGAGCAT
** ***** ** ***** *****

TN113 -----TCTCAATC-----GGTTC-----
ND AACCACGTAATCCCGGTCATAGGCGAAAGGCTCGGGTCTTTTCGCGTCGATGACCAGTGC
* * * * *

TN113 -----
ND6 GCCATACACCCGACTTGCTCCTGGAAGCCAGAGTGGCTGTGGTACCAGTAGGTGCCGTT

TN113 -----
ND6 TTGATGGAGTTTGAAGTTGTACTCATACATGCCATCTGGTGCATGCCATGGAAGCTCAG

TN113 -----CAGGTTTCG-----
ND6 GCCTGGGACACCGTCCATGTTCCGCCGAGGATGATGCCGTGCCAGTGGATCGAGGTGC
* * *****

TN113 ---TT-----AGCGTAAC-----CCAC----GCGT
ND6 CTGTTTCAAGCGGTTGCGCACACGAAGCGTAACGATATCGCCTTACGCCACCCGAAGCGT
** * * * * *

TN113 TAGTC-----
ND6 TGGGCCAGGTACAGAACCATTGATTGCCATGGCTGTCCGTTTGCACCCGTGATATTCAC
* * *

TN113 -----
ND6 CGGCAGTTCACCGATGTAGAGATCAAAGTCGGTGCCCGTCAGCACATTCGGCTGGCCAGG

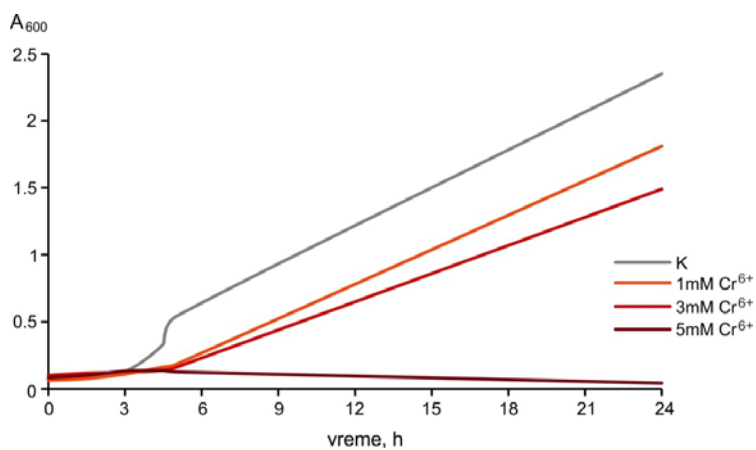
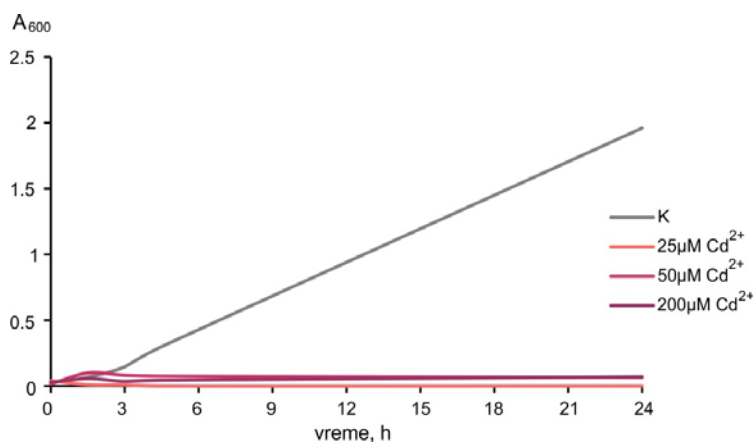
TN113 -----
ND6 ACTGGTCAAGCCCCACACTGGCATGCGCCACATACCCAACCCGCCGAGTATTCGGGTAGC

TN113 -----
ND6 AGCCAGGCCTTTGACGAAGGAGCGTCTGGTGGTTTTGCTTTGCATGCCGTTGCGTCCACT

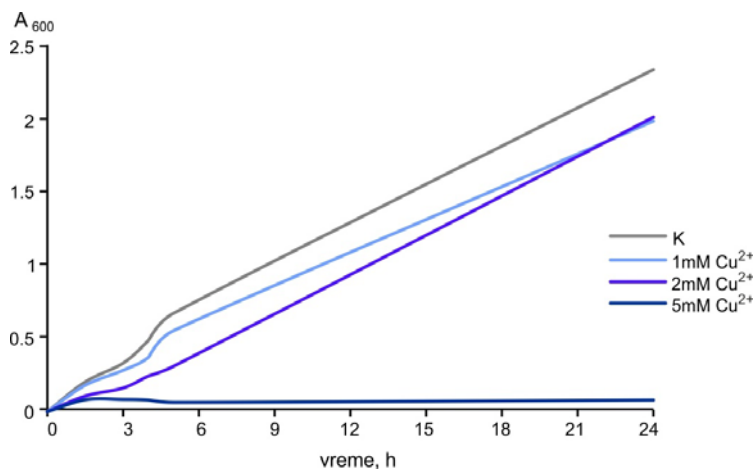
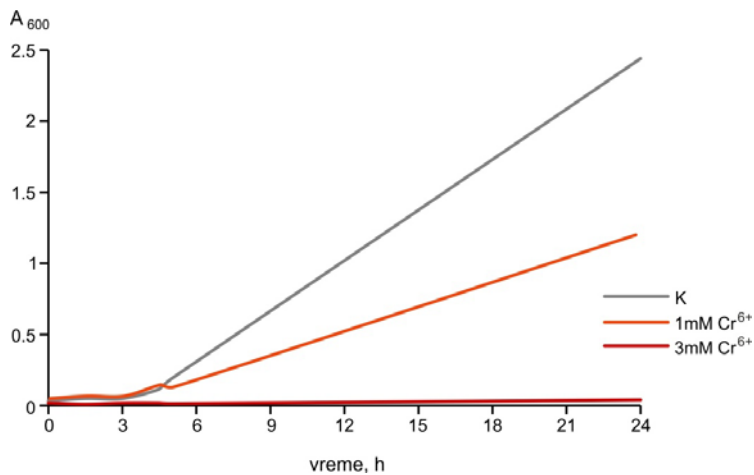
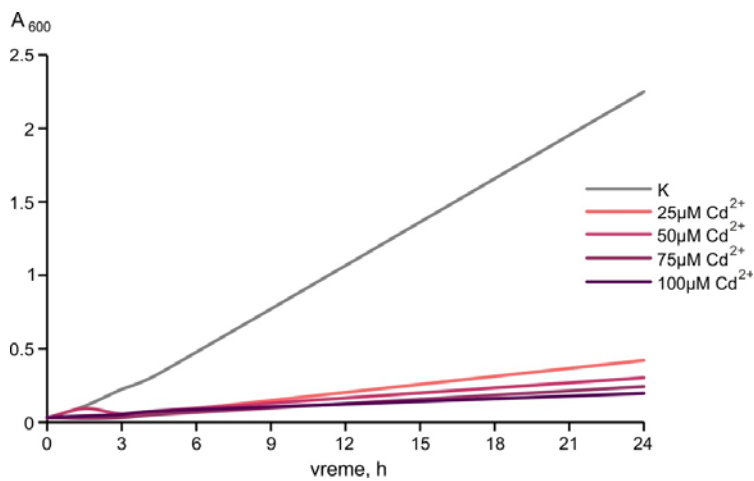
TN113 ---
ND6 CAT

Prilog II: Krive rasta izolata u prisustvu teških metala u tečnoj kulturi

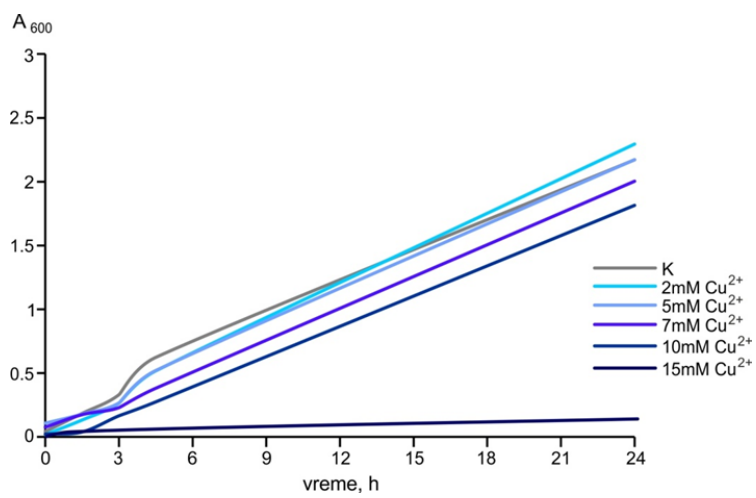
Kriva rasta *Staphylococcus* sp. MSI08 u prisustvu Cd^{2+} i Cr^{6+}



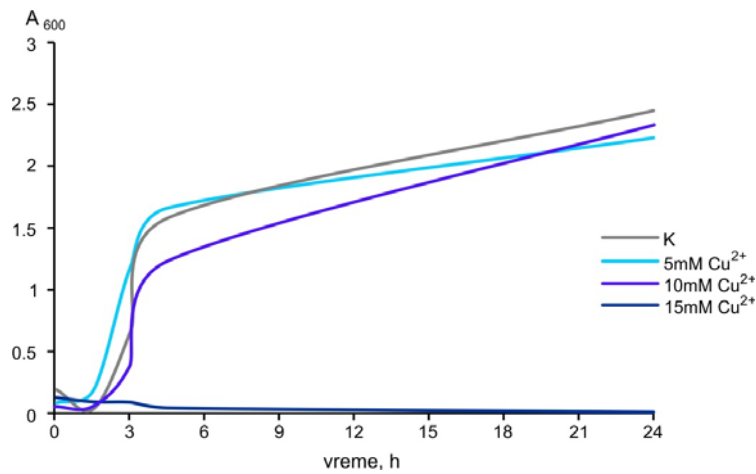
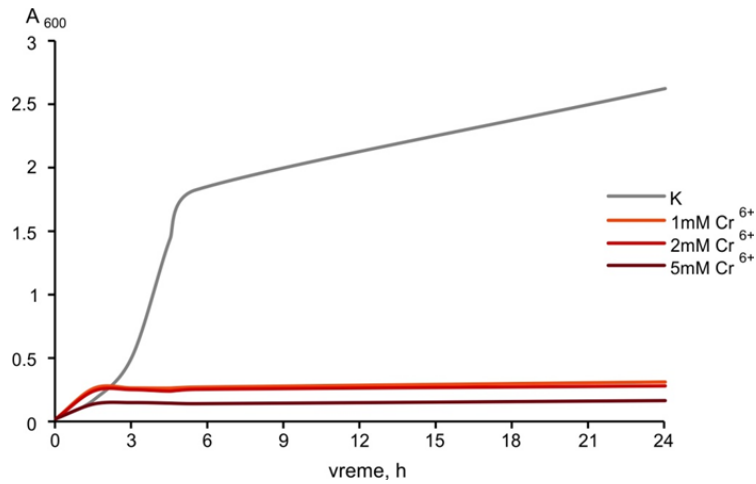
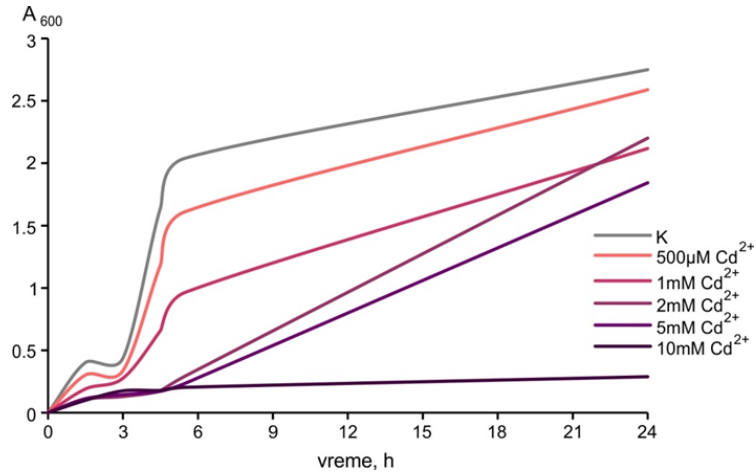
Kriva rasta *Staphylococcus* sp. MSUI10 u prisustvu Cd^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+}



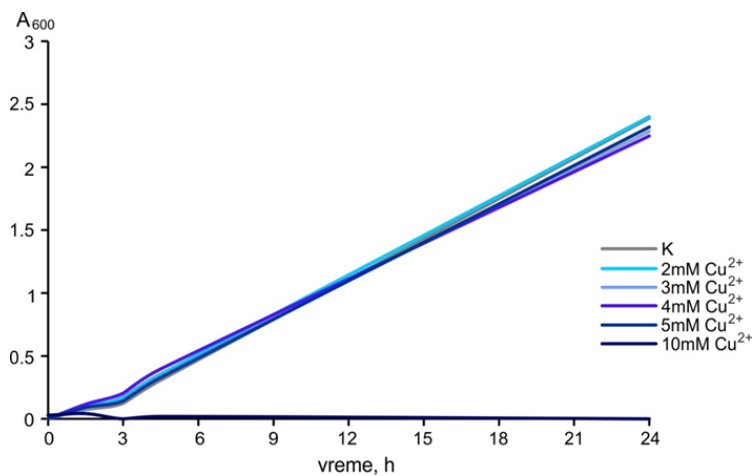
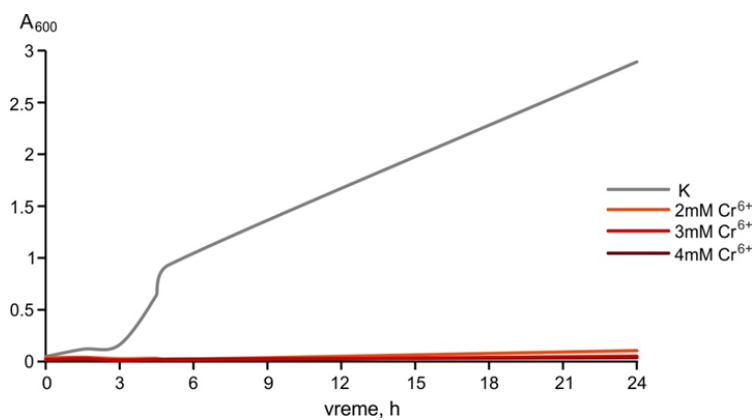
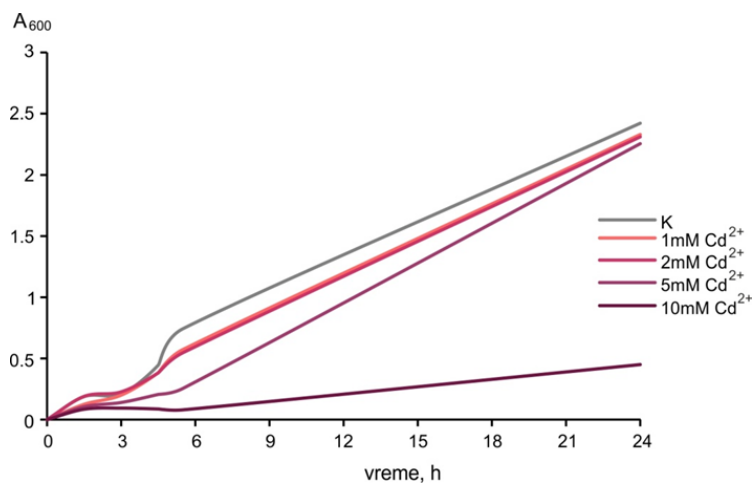
Kriva rasta *Rhodococcus* sp. TN113 u prisustvu Cu^{2+}



Kriva rasta *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 u prisustvu Cd^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+}



Kriva rasta *Cupriavidus metallidurans* CH34 u prisustvu Cd^{2+} , Cr^{6+} i Cu^{2+}



BIOGRAFIJA AUTORA

Sanja Jeremić (rođ. Bajkić) rođena je 1983. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu „France Prešern“ i IV beogradsku gimnaziju. Osnovne studije je upisala 2001. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Eksperimentalni deo diplomskog rada na temu „Ekspresija GrmA metiltransferaze iz *Micromonospora purpurea*“ uradila je pod mentorstvom dr Ivane Morić, u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Diplomirala je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9.14. Dobitnik je nagrade Fondacije „Goran Ljubijankić“ za najbolji diplomski rad iz oblasti molekularne biologije odbranjen u 2007. godini. Iste godine je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, pod mentorstvom dr Jasmine Nikodinović-Runić. Tokom svog rada bila je uključena u dva nacionalna i jedan međunarodni projekat. Do sada je kao autor ili koautor objavila četiri rada u časopisima od međunarodnog značaja i jedno poglavlje u knjizi, od čega je rad: Bajkić S., Narančić T., Đokić L., Đorđević D., Nikodinović-Runić J., Morić I., Vasiljević B. (2013). **Microbial diversity and isolation of multiple metal tolerant bacteria from surface and underground pit within Copper mining and smelting complex Bor**. Arch. Biol. Sci., 65 (1), 375-386 iz ove doktorske teze. Učestvovala je u brojnim aktivnostima vezanim za projekat popularizacije nauke „Mala škola DNKlogije“ finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, kao i FP7 projektima Noći istraživača. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Biohemijskog društva Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Сања Р. Јеремић

број индекса ИО 070002

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Механизми толеранције слободноживећих бактерија и бактерија у биофилмовима на тешке метале”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 01.08.2013.

Јеремић Сања

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Р. Јеремић

Број индекса ИО 070002

Студијски програм Молекуларна биологија, Модул: Прокариоти

Наслов рада **“Механизми толеранције слободноживећих бактерија и бактерија у биофилмовима на тешке метале”**

Ментор др Јасмина Никодиновић-Рунић и др Бранко Јовчић

Потписани/а Сања Р. Јеремић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 01.08.2013.

Јеремић Сања

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Механизми толеранције слободноживећих бактерија и бактерија у биофилмовима на тешке метале”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

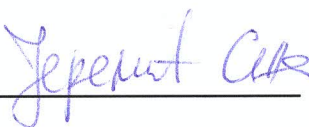
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 01.08.2013.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.