

Ewa Oleńska^{1*}, Wanda Małek²

¹Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, Białystok

²Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Metale ciężkie – występowanie i toksyczność. 2. Bakteryjne mechanizmy oporności na metale ciężkie. 2.1. Modyfikacje osłon komórkowych uniemożliwiający wnikanie jonów metali do cytoplazmy. 2.2. Usuwanie jonów metali z cytoplazmy na zewnątrz komórki. 2.3. Enzymatyczna detoksyfikacja jonów metali. 2.4. Pozakomórkowe wiązanie jonów metali przez metabolity bakterii. 2.5. Wewnątrzkomórkowe wiązanie jonów metali. 3. Podsumowanie

Mechanisms of heavy metal resistance in bacteria

Abstract: Bacteria play a substantial role in the biogeochemical cycles of metals, many of which exhibit toxicity towards various organisms. These unicellular bacteria are persistently exposed to the intoxication by heavy metals which are natural components of the environment. Intensive industrialization and extensive anthropogenic exploitation of the environment resulted in the release of heavy metals formerly deposited as minerals in rocks and as a consequence, in the pollution increase of all environmental constituents the soil, air and water. Bacteria have evolved various mechanisms of heavy metal resistance. The two most important mechanisms are: (i) heavy metal exclusion by the cellular barrier permeability and their immobilization outside the cell by bacterium metabolites, and (ii) the detoxification of toxic metal ions which entered the cytoplasm by different chemiosmotic and/or energy-dependent efflux systems as well as by intracellular sequestration mechanisms involving low molecular weight proteins such as cysteine-rich metallothioneins. The development of various mechanisms of heavy metal resistance enables bacteria to survive in harsh conditions and also allows us to apply them in the remediation of metal contaminated areas.

1. Heavy metals – their occurrence and toxicity. 2. Mechanisms of bacterial resistance to heavy metals. 2.1. Modifications of the cellular barrier preventing metal ion penetration into the cytoplasm. 2.2. Efflux of metal ions out of the cell. 2.3. Enzymatic conversion of metal ions. 2.4. Extracellular sequestration of metal ions by bacterial metabolites. 2.5. Intracellular sequestration of metal ions. 3. Summary

Słowa kluczowe: detoksyfikacja, metale ciężkie, systemy oporności na metale ciężkie

Key words: detoxification, heavy metals, heavy metals resistance systems

1. Metale ciężkie – występowanie i toksyczność

Metale ciężkie są pierwiastkami o gęstości względnej przekraczającej 5 g/cm³. Metale te, jak na przykład kadm (Cd), ołów (Pb), nikiel (Ni), żelazo (Fe), miedź (Cu), kobalt (Co), chrom (Cr) czy cynk (Zn) są postrzegane głównie jako zanieczyszczenia środowiskowe, jakkolwiek są one naturalnymi komponentami środowiska i stanowią elementarny składnik litosfery [18]. W skorupie ziemskiej metale ciężkie występują w postaci minerałów, np. w formie: galeny (PbS), smitsonitu (ZnCO₃), sfalerytu (ZnS), arsenolitu (As₂O₃) czy chalkozynu (Cu₂S). Głównym naturalnym źródłem metali ciężkich w środowisku jest erozja skał i aktywność wulkaniczna, jednak największy ich ładunek dociera do środowiska w wyniku intensywnej działalności człowieka tj. z przemysłu wydobywczego, hutnictwa, rolnictwa oraz z odpadów komunalnych [49]. Metale ciężkie uruchomione z minerałów drogą naturalną bądź antropogeniczną,

wnikają do łańcucha troficznego i mogą oddziaływać negatywnie na wszystkie organizmy żywe, w tym również bakterie [14]. Niektóre metale, tj. Fe, Cu, Co, Ni, Cr czy Zn w niskim stężeniu są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania mikroorganizmów, np. katalizują reakcje biochemiczne, stabilizują strukturę białek i bakteryjne osłony komórkowe, są komponentami białek enzymatycznych np. peroksydaz (Fe), katalazy (Fe), dysmutaz (Cu, Zn, Fe, Mn), nitrogezy (Mo, Fe), wchodzą w skład kompleksów oksydo-redukcyjnych np. cytochromów, uczestniczą w syntezie białek i kwasów nukleinowych, czy też biorą udział w regulacji ciśnienia osmotycznego komórki (K⁺) [8]. Kobalt jest kofaktorem kobalaminy oraz aminopeptydazy metioninowej, bromopeptydazy nitrylowej oraz aminomutazy-2,3-lizynowej [20], miedź, ze względu na względnie wysoki potencjał oksydo-redukcyjny, jest kluczowym składnikiem grup prostetycznych enzymów zaangażowanych w redukcję azotanów i tlenków azotu [57], natomiast

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok; tel. (85) 7457297; fax. (85) 7457301, chwelat@uwb.edu.pl

nikiel wchodzi w skład metalozależnej ureazy, hydrogenazy tlenku węgla, glioksylazy, dekarbonylacyetylo-CoA oraz dysmutazy ponadtlenkowej [33].

Wyróżniono dwa szlaki wnikania jonów metali do wnętrza komórki bakteryjnej. Pierwszy, niespecyficzny substratowo, funkcjonuje na zasadzie niezależnego energetycznie gradientu chemiosmotycznego, który wykorzystuje różnicę stężeń substancji w poprzek błony cytoplazmatycznej, natomiast drugi wymaga dostarczenia energii w postaci ATP i jest wysoce specyficzny w stosunku do substratów. Jeżeli stężenie jonów metali niezbędnych przekracza ich poziom fizjologiczny w komórce, wówczas jony te mogą wywołać efekty toksyczne, podobnie jak jony metali balastowych, zbędnych dla procesów metabolicznych, tj. Cd, Pb, rtęć (Hg), arsen (As) czy srebro (Ag). Jony metali ciężkich, ze względu na podobną wielkość promienia jonowego i wartościowość, mogą zastępować na zasadzie tzw. „mimikry jonowej” jony metali niezbędnych, np. Zn czy Fe w centrach aktywnych białek enzymatycznych [6]. Substytucja jonów niezbędnych dla prawidłowego przebiegu metabolizmu oraz ich wypieranie z komórki są podstawowymi mechanizmami cytotoxyczności metali ciężkich wobec komórek bakterii. Rezultatem negatywnego oddziaływania metali ciężkich na poziomie komórki są zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, zmiany potencjału osmotycznego komórki oraz modyfikacje konformacyjne makrocząsteczek. W efekcie tych zmian może dojść do dezintegracji struktury błon komórkowych, zaburzenia procesów transportu, zahamowania aktywności metabolicznej komórek, a nawet śmierci organizmu [56]. W warunkach eksperymentalnych u bakterii glebowych, narażonych na intoksykację wysokimi stężeniami jonów metali ciężkich, obserwowano zmiany morfologiczne, zmniejszenie aktywności życiowej oraz ograniczenie tempa wzrostu [22, 51]. Mikroorganizmy w warunkach naturalnych są narażone na stres oksydacyjny wynikający z jednoczesnego wpływu wielu różnych metali [1]. W wyniku synergistycznego oddziaływania jonów metali ciężkich, ich indywidualna toksyczność ulega spotęgowaniu (potencjacja). Metale różnią się indywidualną toksycznością wobec mikroorganizmów. Według Bååth'a [4] pięć wybranych metali ciężkich można uporządkować w następujący sposób zgodnie z ich zmniejszającą się indywidualną toksycznością wobec komórek bakterii: Ag>Cu>Cd>Zn>Pb.

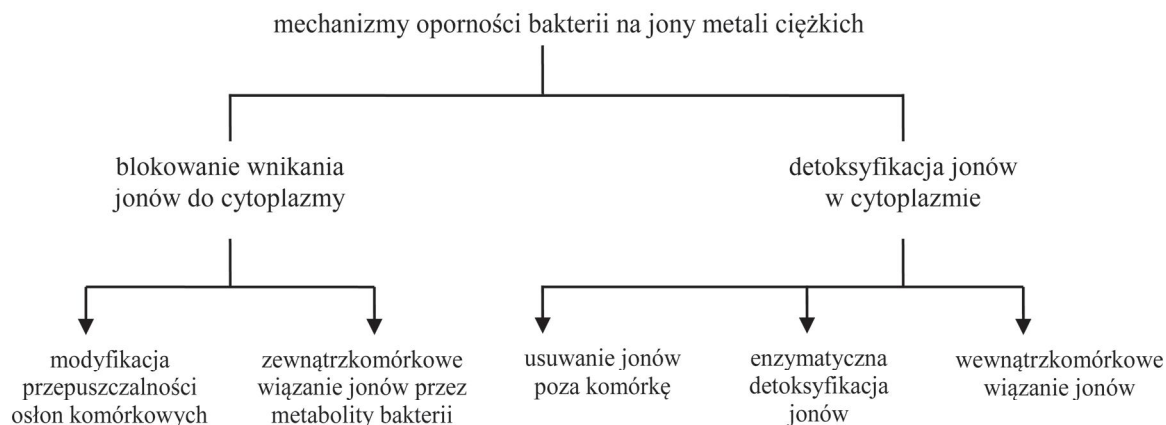
Toksyczność metali wobec komórek bakteryjnych jest uzależniona nie tylko od rodzaju i stężenia metalu, ale również jest wypadkową wielu innych czynników wpływających na ich mobilność i biodostępność. Warunki edaficzne, takie jak: odczyn gleby, pojemność sorpcyjna, warunki natlenienia (potencjał redox) oraz możliwość tworzenia ruchliwych połączeń kompleksowych (chelatów) jonów metali ze związkami orga-

nicznymi, są kluczowymi czynnikami warunkującymi przyswajalność metali przez organizmy żywe. Rozpuszczalne związki metali są łatwiej pobierane przez organizmy, a przez to są bardziej toksyczne niż trudno rozpuszczalne kompleksy metali czy ich rudy. Kwaśny odczyn środowiska sprzyja lepszej rozpuszczalności związków metali, a tym samym zwiększa ich mobilność. Pojemność sorpcyjna gleby, zależna od zawartości i rodzaju minerałów ilastych, zawartości próchnicy, uwodnionych tlenków glinu i żelaza w glebie, wpływa na unieruchamianie jonów metali, ponieważ wszystkie te elementy gleby silnie absorbują metale na swojej powierzchni [21].

Tolerancja metali ciężkich przez bakterie, często ma związek z jednoczesną opornością na antybiotyki, co nazywamy kotolerancją [2]. Stwierdzono, że geny determinujące oporność na metale oraz antybiotyki zazwyczaj są ze sobą sprzężone i są zlokalizowane głównie na plazmidach [50, 60–62]. Na przykład, na plazmidzie pHCM1 *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18, są zlokalizowane geny warunkujące oporność na trimetoprim (*dhfrIb*), sulfonamid (*sulII*), chloramfenikol (*catI*), ampicylinę (*bla*) czy streptomycynę (*strAB*) oraz występuje na nim operon determinujący oporność na rtęć [40].

2. Bakteryjne mechanizmy oporności na metale ciężkie

Bakterie generalnie wykazują szerokie spektrum adaptacji do różnych, skrajnie trudnych warunków środowiska (ekstremofile), w tym do wysokich stężeń metali ciężkich w podłożu. Wzrost i rozwój tej grupy mikroorganizmów w środowisku zanieczyszczonym metalami ciężkimi jest możliwy dzięki wykształceniu szeregu mechanizmów oporności [52]. Mechanizmy warunkujące zdolność przeżycia bakterii w warunkach wysokiego stężenia jonów metali ciężkich w podłożu są determinowane genetycznie [26]. U bakterii geny oporności na sole metali ciężkich są zlokalizowane na chromosomie oraz pozachromosomowo na plazmidach. Zasadniczą funkcją plazmidowych produktów genów oporności jest warunkowanie tolerancji na metale, natomiast rolą systemów kodowanych chromosomowo jest głównie utrzymywanie homeostazy jonowej organizmu [45]. Plazmidowa lokalizacja genów determinujących oporność bakterii na metale ciężkie sprzyja ich przeniesieniu na inne organizmy, drogą horyzontalnego transferu genów (HTG) [43]. Systemy oporności na metale ciężkie występują u wielu rodzajów i gatunków bakterii, co może wskazywać, że oporność na negatywne oddziaływanie toksycznych metali ciężkich mogła wyewoluować tuż po powstaniu komórki prokariotycznej w odpowiedzi na stały kontakt z metalami występującymi w środowisku [17]. W Domenie *Bacteria*



Rys. 1. Mechanizmy oporności na toksyczne działanie jonów metali ciężkich u bakterii

wyodrębniono kilka typów mechanizmów tolerancji na metale ciężkie (Rys.1) [28]:

1. Modyfikacje osłon komórkowych uniemożliwiające wnikanie jonów metali do cytoplazmy;
2. Usuwanie toksycznych jonów metali z cytoplazmy na zewnątrz komórki;
3. Enzymatyczna detoksyfikacja jonów metali;
4. Pozakomórkowe wiązanie jonów metali przez metabolity bakterii;
5. Wewnątrzkomórkowe wiązanie jonów metali.

2.1. Modyfikacje osłon komórkowych uniemożliwiające wnikanie jonów metali do cytoplazmy

Osłony komórek bakterii są zbudowane z błony komórkowej i ściany komórkowej. Błony komórkowe bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych mają podobną, typową budowę białkowo-lipidową i pełnią podstawowe funkcje, tj. uczestniczą w transporcie substancji pokarmowych, wydalaniu zbędnych produktów metabolizmu, procesach oksydo-redukcyjnych, w tworzeniu ściany komórkowej czy wydzielaniu egzoenzymów hydrolitycznych. Natomiast struktura ściany komórkowej u bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich nie jest jednakowa. U bakterii Gram-dodatnich ścianę komórkową buduje wiele warstw mureiny połączonej wiązaniami kowalencyjnymi z kwasami teichojowymi lub teichuronowymi. Mureina jest polimerem zbudowanym z powtarzających się jednostek utworzonych z N-acetyloglukozaminy oraz kwasu N-acetylmuraminowego, połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Z kolei ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych składa się maksymalnie z trzech warstw mureiny, lipoproteiny oraz błony zewnętrznej i nie zawiera kwasów teichojowych. Lipoproteina łączy mureinę z błoną zewnętrzną. Błona zewnętrzna składa się z białek, fosfolipidów oraz lipopolisacharydów. Białka błony zewnętrznej zwane porynami, uczestniczące w transporcie substancji, mogą być specyficzne lub niespecyficzne substratowo. Lipopolisacharyd jest

zbudowany z lipidu A, wielocukru rdzeniowego oraz O-swoistego łańcucha cukrowego. Ponadto, bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne mogą wytwarzać i wydelać substancje o charakterze polimerów, które występują po zewnętrznej stronie komórki w postaci otoczek lub egzopolisacharydu (EPS) [58].

W wyniku kontaktu jonów metali z komórką bakterii może nastąpić wiązanie jonów metali z elementami strukturalnymi ścian komórkowych lub/i otoczek. Sposób ten nie jest specyficzny substratowo i warunkuje ograniczoną ochronę przed toksycznym oddziaływaniem metali ze względu na szybkie tempo wysycenia jonami metali grup funkcyjnych związków chemicznych wchodzących w skład tych struktur. Otoczka polisacharydowa umożliwia zewnątrzkomórkowe wiązanie metali u wielu gatunków bakterii, np. *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* czy *Arthrobacter viscosus* [8]. Badania Mergea'ya [29] wskazują, że szczepy *K. aerogenes* wytwarzające otoczki akumulują istotnie mniej kadmu w cytoplazmie w porównaniu do tych pozbawionych otoczek. Ponadto, jony metali mogą być wiązane również w przestrzeni peryplazmatycznej. Zmiany w przepuszczalności barier komórkowych, a więc ograniczenie kontaktu toksycznych metali ciężkich z kluczowymi składnikami komórki bakteryjnej, mogą być rezultatem mutacji. Na przykład, u *Escherichia coli* w wyniku pojedynczej mutacji punktowej zachodzi zmiana w syntezie poryn, stanowiących kanał dyfuzyjny w błonie zewnętrznej i w rezultacie zablokowanie transportu jonów miedzi do komórki.

2.2. Usuwanie toksycznych jonów metali na zewnątrz komórki

Drugi typ oporności na metale polega na transporcie jonów poza komórkę bakterii (*efflux system*) i jest wykorzystywany do usuwania toksycznych jonów metali z cytoplazmy. Koszt energetyczny utrzymania wielu, wysoce substratowo specyficznych systemów eksportu jonów metali jest większy w porównaniu do innych

mechanizmów oporności, np. mechanizmu enzymatycznej detoksyfikacji metali. Mimo to, wiele takich, bardzo różnych mechanizmów usuwania toksycznych jonów z komórki funkcjonuje w świecie mikroorganizmów [8]. U bakterii wyodrębniono siedem głównych typów pomp usuwających jony metali na zewnątrz komórki [53]. Dwa typy pomp to ATP-azy: jedna jest ATP-azą typu P, natomiast druga to ATP-aza ABC. Kolejne trzy pompy są chemiosmotycznymi antyporterami jon/ H^+ o względnie szerokim spektrum substratów. Należą do nich następujące rodziny białek: nadrodzina białek MFS (*Major Facilitator Superfamily*), w której skład wchodzi 17 rodzin o charakterze uniportera, symportera i antyportera [39], które transportują związki niskocząsteczkowe w odpowiedzi na chemiosmotyczny gradient jonów, rodzina białek CDF (*cation diffusion facilitator*) stymulujących przepływ kationów, do której należy białko CzcD warunkujące oporność na Cd(II), Zn(II) i Co(II) oraz rodzina białek CzcCBA transportująca na zewnątrz jony tych metali. Pozostałe dwie rodziny stanowią chemiosmotyczne systemy transportujące o wąskim spektrum substratu, tj. system transportu chromu (Cr) ChrA oraz transporter ArsB dla arseniu (III) i antymonu (III). W warunkach fizjologicznych białkowe transportery błonowe o szerokim spektrum substratu, przenoszą zarówno jony metali niezbędnych dla przebiegu procesów metabolicznych jak i jony metali balastowych naśladujące niezbędne jony [6]. Gdy stężenie jonów metali wewnątrz komórki przekracza określony poziom, co wywołuje efekt toksyczny, komórka uruchamia mechanizm usuwania jonów z cytoplazmy do otaczającego ją środowiska. Dotychczas opisano kilka systemów oporności na toksyczne oddziaływanie metali, związanych z ich transportem z cytoplazmy poza komórkę, a dotyczą one np. arseniu, cynku, kadmu czy miedzi.

Organizmy żywe są narażone na toksyczne oddziaływanie arseniu, występującego głównie w formie arsenianów As(V), molekularnych analogów fosforanów oraz arseninów As(III) [13]. Transport arsenianów do komórki bakterii może przebiegać dwiema drogami. Pierwszy to konstytutywny i niespecyficzny substratowo system przenoszenia składników odżywczych Pit, za którego pośrednictwem arsen dostaje się do komórki, gdy występuje nadmiar fosforanów w podłożu. Natomiast w przypadku deficytu fosforu jest indukowany specyficzny dla fosforanów system Pst. System Pst jest stukrotnie bardziej specyficzny względem fosforu niż arseniu [36]. Niektóre bakterie mogą regulować stężenie jonów arseniu w cytoplazmie komórki poprzez modyfikację systemu transportu fosforanów; inne bakterie, jak na przykład *E. coli*, wykształciły system usuwania toksycznych jonów arseniu z cytoplazmy za pośrednictwem specyficznego systemu detoksyfikacji, tzw. systemu ArsC. Determinanty genetyczne tego systemu

mogą znajdować się na chromosomach lub plazmidach w postaci operonu *ars* [13]. Za ekspresję operonu *ars* jest odpowiedzialne białko regulatorowe ArsR, produkt genu *arsR*, którego ekspresja jest indukowana arsenianami, arseninami, antymonem oraz bizmutem. Białko ArsR, zdolne do łączenia się z DNA jest dimerem zawierającym dwie cząsteczki cysteiny, za pomocą których wiąże się z aktywującymi je jonami arseniu. Ponadto, w operonie *ars*, znajdującym się u *E. coli* na plazmidzie R773, poza *arsR*, występuje drugi gen regulatorowy – *arsD*. Gen *arsD* determinuje białko, które nie jest niezbędne w regulacji ekspresji genów *ars* na podstawowym poziomie, działa *in trans* niezależnie od czynników indukujących [9]. Głównym enzymem operonu *ars* jest cytoplazmatyczna reduktaza arsenianowa kodowana przez gen *arsC*. Reduktaza arsenianowa katalizuje redukcję As(V) do As(III), który następnie jest usuwany poza komórkę za pomocą specyficznego transportera As(III) – ArsB. Białko ArsA jest wewnątrz błonową ATP-azą aktywowaną obecnością jonów arseniu, która przyłącza się jako dimer do błonowego transportera tj. białka ArsB, tworząc kompleks ArsA-ArsB i poprzez hydrolizę ATP dostarcza energii do transportu jonów arseniu (III) poza komórkę [17]. Szczególną właściwością pompy usuwającej jony arseniu jest jej dualistyczny charakter. Pompa ta może funkcjonować chemiosmotycznie, bez nakładu energii pochodzącej z ATP przy udziale białka ArsB, jak również przy wykorzystaniu energii pochodzącej z ATP, z udziałem kompleksu ArsA-ArsB [53]. Ponadto wykazano, że operon *ars*, zlokalizowany u *E. coli* na plazmidzie R773, może warunkować oporność na tellur. Za usuwanie jonów telluru poza komórkę są odpowiedzialne produkty trzech genów strukturalnych: *arsA*, *arsB* i *arsC*. System Ars nie gwarantuje jednoczesnej kotolerancji na tellur i arsen u wszystkich gatunków bakterii np. u *Staphylococcus aureus* nie wykryto takiej właściwości. Oporność na arsen u niektórych bakterii może mieć związek z aktywnością oksydazy arseninowej. Oksydaza arseninowa przekształca wysoce toksyczny arsenin do względnie mniej toksycznego arsenianu [32, 53].

Oporność bakterii na Cd(II) i Zn(II) jest determinowana przez geny zlokalizowane głównie na plazmidach [23]. Dotychczas, u bakterii Gram-dodatnich (np. *Staphylococcus aureus*) opisano dwa mechanizmy oporności na te metale: CadA i CadB determinowane odpowiednio przez operony *cadA* i *cadB*. Operon *cadA* zmapowano u *S. aureus* na plazmidzie pI258. Składa się on z dwóch genów: *cadA* i *cadC*. Gen *cadA* determinuje 727 aminokwasowe białko CadA, które jest ATP-azą typu P i funkcjonuje jako pompa jonowa. Pompa ta czerpie energię do eksportu jonów metali poza komórkę z hydrolizy ATP [45]. CadA składa się z sześciu domen, obejmujących m.in. cytoplazmatyczny region wiążący metale, domenę uczestniczącą w przenoszeniu jonów

na powierzchnię błony komórkowej, domenę o potencjalnej funkcji kanału transportującego kationy oraz wewnątrzkomórkową konserwatywną domenę wiążącą ATP [8, 17]. Jony metali Cd(II), czy Zn(II) są przyłączane do CadA prawdopodobnie za pośrednictwem jednego z dwóch motywów: Cys-Pro-Cys lub Cys-Pro-His zlokalizowanych w regionach odpowiedzialnych za specyficzność tego białka wobec substratu. W obecności jonów metali następuje fosforylacja CadA przy udziale ATP i w konsekwencji zmiana konformacji białka. Usunięciu jonów metali poza błonę komórkową towarzyszy hydroliza ATP i uwolnienie energii [35]. Drugim białkiem operonu *cadA* jest znacznie mniejsze białko CadC, składające się ze 122 aminokwasów. Białko to pełni funkcję regulatora transkrypcji operonu *cadA*, który może działać *in cis* lub *in trans* [11]. Wiedza na temat mechanizmu funkcjonowania drugiego systemu oporności na toksyczne działanie jonów Cd i Zn, tzw. systemu *CadB* jest ograniczona. Operon *cadB* zmapowano u *S. aureus* na plazmidzie pII147 i w jego obrębie zidentyfikowano dwa geny: *cadB* i *cadX*. Przypuszcza się, że ochronne działanie systemu *CadB* nie wynika z usuwania toksycznych jonów metali poza komórkę, a raczej polega na immobilizacji jonów w błonie komórkowej.

U bakterii Gram-ujemnych znane są dwa systemy zaangażowane w usuwanie jonów Cd(II), Zn(II) i Co(II) poza komórkę: system *CzcD*, który jest chemiosmotyczną, jednobiałkową pompą błonową, należącą do rodziny białek CDF (*cation diffusion facilitator*) oraz chemiosmotyczny kompleks trójpeptydowy *CzcCBA* [25, 35]. System *CzcCBA* po raz pierwszy zidentyfikowano u *Ralstonia eutropha* CH34 (wcześniej *Alcaligenes eutrophus*), a kodujące go geny zmapowano na megaplazmidzie (238 kbp) pMOL30 [12, 36]. System ten należy do dużej superrodziny pomp chemiosmotycznych zwanych RND (*Resistance Nodulation Division*) o różnorodnej funkcji, np. uczestniczą w transporcie toksycznych kationów, małych związków organicznych, a także w tworzeniu brodawek u ryzobiów i w podziałach komórkowych, np. u bakterii *E. coli*. System *CzcCBA* funkcjonuje jako ATP-niezależny antyporter proton/kation, zaangażowany w usuwanie kationów Zn^{2+} , Cd^{2+} i Co^{2+} poza komórkę [35], dla którego źródłem energii jest elektrochemiczny gradient protonów [46]. System ten jest kompleksem białkowym, w którego skład wchodzi duże, złożone z około 1000 aminokwasów białko błony wewnętrznej *CzcA*, białko błony zewnętrznej *CzcC*, należące do rodziny białek OMF (*outer membrane factors*) oraz białko peryplazmatyczne *CzcB*, które łączy białka *CzcA* i *CzcC* tworząc kanał pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem zewnętrznym komórki [53] i należy do rodziny białek MFP (*membrane fusion protein*) [35].

Efektywnym sposobem detoksyfikacji miedzi przez komórkę bakteryjną jest jej usuwanie z cytoplazmy. Miedź w postaci jonu jednowartościowego jest bardziej

toksyczna od formy Cu^{2+} [44]. Eksport miedzi poza komórkę bakteryjną może odbywać się z udziałem energii lub bez jej nakładu. Dotychczas najlepiej poznano mechanizm transportu toksycznych jonów miedzi u bakterii *E. coli*. U tego gatunku wyodrębniono następujące systemy transportu miedzi z komórki: *CopA*, *CusCFBA* oraz system oporności na miedź *Pco*. Białko *CopA* jest ATPazą typu P, wyposażoną w motywy bogate w reszty cysteinowe i histydynowe o wysokim powinowactwie do metali, zlokalizowane na N-końcu białka [47]. Chemiosmotyczny system usuwający metale na zewnątrz komórki *CusCFBA*, jest kodowany na chromosomie i obejmuje białko *CusF* wiążące miedź w peryplazmie oraz kompleks białek *CusCBA*. *CusC* jest pompą zlokalizowaną w błonie wewnętrznej, która wiąże i usuwa jony z komórki, *CusB* jest białkiem peryplazmatycznym łączącym błonę wewnętrzną z zewnętrzną, natomiast *CusA* jest poryną błony zewnętrznej [57]. Si i n g h i wsp. [54] sugerują, że ochrona komórki bakteryjnej, w pozakomórkowej przestrzeni peryplazmatycznej, może wynikać ze współdziałania systemu *CusCFBA* oraz wielomiedziowej oksydazy *CueO*. Niektóre szczepy *E. coli* są wyposażone w system oporności na miedź *Pco*, determinowany przez operon *pcoABCD*, który zidentyfikowano na plazmidzie pRJ1004. Mechanizm działania systemu *Pco* jest słabo poznany. Prawdopodobnie białko *PcoA*, należące do rodziny oksydaz wielomiedziowych uczestniczy w utlenianiu nadmiaru kationów miedzi (I), natomiast białka *PcoB*, *PcoC* i *PcoD* są zaangażowane w wiązanie jonów tego metalu oraz ich transport poza komórkę [44, 53].

2.3. Enzymatyczna detoksyfikacja jonów metali

Tolerancja metali ciężkich u bakterii może być realizowana na drodze enzymatycznej transformacji jonu metalu w formę mniej toksyczną, mniej przyswajalną przez komórkę i/lub w postać lotną [3]. Ten typ oporności dotyczy na przykład inaktywacji wysoce toksycznej rtęci (II). Toksyczność tego metalu wobec organizmów żywych wynika z łatwości przyłączania się jego formy dwuwartościowej do grup tiolowych, wchodzących w skład enzymów oraz innych białek i ich inaktywacji. System oporności na Hg^{2+} , determinowany przez operon *mer*, występuje u bakterii Gram-dodatnich, np. *S. aureus*, *Bacillus* sp. oraz u Gram-ujemnych, np. *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Serratia marcescens* i *Acidithiobacillus ferrooxidans* [15, 17, 64]. Wśród operonów *mer* wyróżniono operony o szerokim spektrum działania, warunkujące oporność na organiczną i nieorganiczną postać rtęci oraz operony o wąskim spektrum działania, determinujące oporność jedynie na nieorganiczne formy tego metalu [31].

Najistotniejszą cechą mechanizmu oporności bakterii na toksyczne działanie jonów rtęci jest wytworzenie

wysocze specyficznego systemu transportu jonów tego pierwiastka do wnętrza komórki, gdzie przy udziale reduktazy rtęciowej, Hg^{2+} ulega przekształceniu w mniej toksyczną formę Hg^0 , która jest uwalniana poza komórkę [63]. Typowy region *mer* u bakterii Gram-ujemnych składa się z genu *merR*, głównego promotora $P_{merTPAD}$ oraz genów operonu *merTP(C/F)A/BD(E)*. Produkt genu *merR* – białko MerR jest aktywatorem głównego promotora *mer* w obecności jonów $Hg(II)$, zaś represorem w przypadku braku jonów tego metalu. Zarówno aktywacja jak i hamowanie ekspresji genów operonu *mer* odbywa się poprzez przyłączenie białka regulatorowego w rejonie głównego promotora $P_{merTPAD}$, zlokalizowanym na odcinku pomiędzy sekwencjami -35 i -10, które są rozdzielone 19 nukleotydami [7]. Według modelu regulacji operonu *mer* przez białko MerR, zaproponowanego przez Brown'a i wsp. [7], przy braku jonów rtęci homodimeryczne białko MerR, transkrybowane z promotora *merR*, przyłącza się za pośrednictwem specyficznego domeny helisa-pętla-helisa do regionu operator/promotor głównego operonu *mer*. W wyniku takiego połączenia DNA zostaje wygięte i odwinęte w pobliżu sekwencji operatora, a polimeraza RNA, połączona z promotorem *mer* i tworząca trójskładnikowy kompleks z DNA i MerR, nie może utworzyć otwartego kompleksu transkrypcyjnego, co powoduje zahamowanie ekspresji genów operonu *mer*. Natomiast w obecności Hg^{2+} , jony tego metalu przyłączają się do jednego z dwóch miejsc wiążących białko MerR, w wyniku czego MerR przyjmuje konformację aktywną. Mocne związanie MerR z operatorem operonu *mer* powoduje odkształcenie DNA przy centrum operatora, odwinęcie DNA o około 33° i wyprostowanie podwójnej helisy DNA. Reorientacja sekwencji -35 i -10 pozwala na ich produktywną interakcję z podjednostką σ^{70} polimerazy RNA i utworzenie otwartego kompleksu transkrypcyjnego, a więc inicjację transkrypcji operonu *merTP(C/F)A/BD(E)* [7].

Produkty ekspresji genów: *merT*, *merP* i *merC* są zaangażowane w wiązanie i transport jonów Hg^{2+} do wnętrza komórki. Gen *merP* koduje białko, które w przestrzeni peryplazmatycznej wiąże jony Hg^{2+} i dostarcza je białku MerT, które jest zlokalizowane w wewnętrznej błonie komórkowej i transportuje $Hg(II)$ do cytoplazmy. Produkty genów *merA/merB* uczestniczą w enzymatycznej detoksyfikacji, odpowiednio, nieorganicznych i organicznych związków rtęci w komórkach bakterii. Gen *merA* koduje reduktazę rtęciową, homodimeryczną oksydoreduktazę flawinową wysocze specyficzną dla jonów rtęciowych, która redukuje jony Hg^{2+} do Hg^0 w NAD(P)H zależnej reakcji. Lotny Hg^0 przedostaje się z cytozolu do przestrzeni peryplazmatycznej [28] i jest uwalniany na zewnątrz komórki. Jony Hg^{2+} są przenoszone na N-koniec reduktazy rtęciowej za pośrednictwem białka MerC [16]. Gen *merB*, stanowiący element

operonów *mer* o szerokim spektrum działania, koduje enzym – liazę organicznych pochodnych rtęci, która katalizuje uwalnianie Hg^{2+} z jej kompleksów organicznych. Hg^{2+} jest następnie transportowany do cytoplazmy, zredukowany do Hg^0 i w tej formie uwalniany na zewnątrz komórki drogą wolatylizacji (wyparowania). Liaza organicznych pochodnych rtęci jest enzymem monomerycznym, rozszczepiającym wiązania kowalencyjne $Hg-C$ i uwalniającym rtęć [53]. Jej aktywność jest uwarunkowana obecnością konserwatywnych cystein w pozycji Cys96 i Cys 159 enzymu [41]. Produkt białkowy genu *merF*, który zmapowano na elemencie transpozycyjnym Tn5053 u *Pseudomonas putida*, jest dodatkowym białkiem transportującym jony rtęci. Podobną funkcję pełni prawdopodobnie produkt genu *merE* [7]. Białko MerD, podobnie jak MerR, pełni funkcję regulatorową, łącząc się z tym samym rejonem promotorowym, z tym że białko MerD wykazuje mniejsze powinowactwo, a także jest syntetyzowane w mniejszych ilościach w porównaniu do białka MerR.

Organizacja operonów *mer* u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych różni się nieznacznie, np. jeden z elementów strukturalnych operonu, gen *merB* występuje częściej w operonach *mer* bakterii Gram-ujemnych niż u Gram-dodatnich [3]. U bakterii Gram-ujemnych gen regulatorowy *merR* stanowi odrębny operon i jest transkrybowany w przeciwnym kierunku wobec genów strukturalnych głównego operonu *merTP(C/F)A/BD(E)*, co umożliwia precyzyjne hamowanie ekspresji genów operonu przy braku jonów rtęci. Natomiast u bakterii Gram-dodatnich, gen *merR* jest elementem składowym operonu *mer* i ulega transkrypcji w tym samym kierunku jak pozostałe geny w wyniku czego, operon *mer* funkcjonuje w tej grupie mikroorganizmów stale, nawet przy braku jonów rtęci [43].

2.4. Pozakomórkowe wiązanie jonów metali przez metabolity bakterii

Innym sposobem ochrony komórki bakteryjnej przed toksycznym działaniem metali ciężkich jest chelatowanie metali przez metabolity drobnoustrojów, np. siderofory oraz powierzchniowe egzo- (EPS) i lipopolisacharydy (LPS) [38, 42]. Siderofory są niskocząsteczkowymi chelatorami żelaza [30], a także innych metali, tj. Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb, Zn oraz radionuklidów, np.: U i Np [34]. Egzopolisacharyd jest wielkocząsteczkowym polimerem wydzielanym do środowiska bakterii. W warunkach naturalnych EPS odgrywa kluczową rolę w adhezji komórek, powstawaniu agregatów mikrobiologicznych, takich jak biofilmy czy biogranule [59]. W obrębie EPS wyodrębniono neutralne chemicznie homopolisacharydy oraz polianionowe heteropolisacharydy bogate w kwasy uronowe, np. kwas glukuronowy, galakturonowy czy mannuronowy oraz pirogronian

[65]. Przyłączanie metali ciężkich do bakteryjnych biopolimerów najczęściej przebiega na drodze elektrostatycznej interakcji na przykład z ujemnie naładowanymi grupami funkcyjnymi kwasów uronowych [48]. Nieorganiczne fosforany, czy rzadziej siarczany mogą zwiększać status polianionowy EPS [59], co może znacząco zwiększyć potencjał EPS do przyłączania jonów metali.

2.5. Wewnątrzkomórkowe wiązanie jonów metali

Obniżenie toksyczności metali ciężkich, które mimo obecności barier ochronnych komórki bakteryjnej wnikają do cytoplazmy, może nastąpić na drodze chelatowania metali na terenie cytoplazmy przez niskocząsteczkowe peptydy, np. metalotioneiny [27]. W wyniku związania toksycznych jonów metali przez ligand zmniejsza się ich reaktywność i są one odseparowywane od kluczowych organelli komórkowych i makrocząstek. Metalotioneiny (MT) są wewnątrzkomórkowymi białkami o niskiej masie cząsteczkowej (6–7 kDa), bogatymi w cysteinę (30%), które występują u niektórych prokariotów, zwierząt, roślin wyższych oraz eukariotycznych mikroorganizmów [37]. Wszystkie cysteiny wchodzące w skład jednej cząsteczki MT uczestniczą w koordynacyjnym wiązaniu siedmiu atomów dwuwartościowych jonów metali [19]. Oporność na toksyczne działanie metali ciężkich za pośrednictwem metalotioneiny należy do rzadkości w świecie bakterii i dotychczas została zidentyfikowana jedynie u cyjanobakterii z rodzaju *Synechococcus* sp., u których warunkuje oporność na Cd(II), Zn(II) i Cu(II). Metalotioneina ta posiada mniej reszt cysteinowych w porównaniu do metalotionein zwierzęcych (9:20) [17] i jest kodowana przez gen *smtA*. Gen *smtA* jest indukowany na poziomie transkrypcji przez metale, a hamowany przez produkt genu *smtB*. Białko SmtB funkcjonuje jako trans-działający represor transkrypcyjny wyłączający ekspresję genu *smtA*. SmtB jest białkiem dimerycznym, zawierającym motyw helisa-pętla-helisa, podobnym do innych białek wiążących DNA [10]. U niektórych bakterii, np. *Pseudomonas putida*, wyodrębniono inne niskocząsteczkowe i bogate w cysteinę białka, zdolne do wiązania jonów metali ciężkich, które prawdopodobnie są spokrewnione z metalotioneinami [8].

3. Podsumowanie

Bakterie, odkąd powstały, są stale narażone na działanie metali ciężkich, które stanowią naturalny komponent środowiska. O długim ewolucyjnie kontakcie żywych komórek bakteryjnych z jonami metali ciężkich może świadczyć włączenie wielu metali w struktury makrocząstek, które są kluczowe dla przebiegu procesów metabolicznych, np. kobaltu jako atomu cen-

tralnego witaminy B₁₂, czy niklu w centrum aktywnym ureazy. Dodatkowo, intensywna działalność człowieka związana z przemysłem, rolnictwem i nieprawidłowym gospodarowaniem odpadami istotnie przyczyniła się do uruchomienia zdeponowanych w skałach metali ciężkich i w konsekwencji zanieczyszczenia na szeroką skalę wszystkich składowych środowiska, tj. gleby, wody i powietrza. Pod wpływem czynnika selekcyjnego w postaci jonów metali ciężkich, u bakterii wyewoluowały różnorodne systemy determinujące tolerancję wobec toksycznych metali ciężkich [8, 46]. Oporność na metale ciężkie może być realizowana dwoma sposobami: (i) poprzez blokowanie wnikania toksycznych jonów metali do cytoplazmy oraz (ii) uruchamianie mechanizmów detoksyfikacji jonów na terenie cytoplazmy. Oporność na jony metali ciężkich może mieć związek z modyfikacją przepuszczalności osłon komórkowych oraz wiązaniem jonów metali przez metabolity bakterii. Jeżeli jony metali wnikną do cytoplazmy bakterii, uruchamiane są mechanizmy ich detoksyfikacji. Jony metali mogą być usunięte poza komórkę za pomocą różnorodnych transporterów, wykorzystujących energię pochodzącą z hydrolizy ATP lub za pośrednictwem przenośników niewymagających nakładu energii, działających na zasadzie chemiosmotycznego gradientu stężeń. Ponadto, u niektórych bakterii toksyczne jony metali mogą być chelatowane przez niskocząsteczkowe białka na terenie cytoplazmy [24]. Wykształcenie przez bakterie mechanizmów oporności na metale ciężkie pozwala nie tylko na egzystowanie tych jednokomórkowych organizmów w zanieczyszczonym środowisku, ale również umożliwia ich wykorzystanie do oczyszczania skażonych terenów (bioremediacja) oraz pozyskiwania metali (biogórnictwo) [5, 55].

Piśmiennictwo

1. Aoyama M., Nagumo T.: Comparison of the effects of Cu, Pb, and As on plant residue decomposition, microbial biomass, and soil respiration. *Soil Sci. Plant Nutr.* **43**, 613–622 (1997)
2. Baker-Austin C., Wright M.S., Stepanauskas R., McArthur J.V.: Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**, 176–182 (2006)
3. Barkay T., Miller S.M., Summers A.O.: Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 355–384 (2003)
4. Bååth E.: Thymidine incorporation into macromolecules of bacteria extracted from soil by homogenization-centrifugation. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 1157–1165 (1992)
5. Błaszczak M.K.: Mikroorganizmy w ochronie środowiska. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2007, s. 110–175
6. Bridges Ch.C., Zalups R.K.: Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**, 274–308 (2005)
7. Brown N.L., Stoyanov J.V., Kidd S.P., Hobman J.L.: The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 145–163 (2003)

8. Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W.: Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 198–207 (2000)
9. Busenlehner L.S., Pennella M.A., Giedroc D.P.: The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 131–143 (2003)
10. Cook W.J., Kar S.R., Taylor K.B., Hall L.M.: Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins. *J. Mol. Biol.* **275**, 337–346 (1998)
11. Crupper S.S., Worrell V., Stewart G.C., Iandolo J.J.: Cloning and expression of Cadd, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181**, 4071–4075 (1999)
12. Diels L., Dong Q., van der Lelie D., Baeyens W., Mergeay M.: The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 142–153 (1995)
13. Drewniak Ł., Skłodowska A.: Rola bakterii w biogeochemicznym cyklu arsenu. *Post. Mikrobiol.* **46**, 275–285 (2007)
14. Giller K.E., Witter E., McGrath S.P.: Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 1389–1414 (1998)
15. Inoue C., Sugawara K., Kusano T.: *merR* regulatory gene in *Thiobacillus ferrooxidans* is spaced apart from the *mer* structural genes. *Mol. Microbiol.* **5**, 2707–2718 (1991)
16. Jan A.T., Ali A., Mohd Q., Haq R.: Mercury pollution: an emerging problem and potential bacterial remediation strategies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1529–1537 (2009)
17. Ji G., Silver S.: Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 61–75 (1995)
18. Kabata-Pendias A., Pendias H.: Biogeochemia pierwiastków śladowych. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1993, s. 13–88
19. Klaassen C.D., Liu J., Choudhuri S.: Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 267–294 (1999)
20. Kobayashi M., Shimizu S.: Cobalt proteins. *Eur. J. Biochem.* **261**, 1–9 (1999)
21. Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Małkowski E.: Wybrane metody remediacji gleb a zawartość metali ciężkich w glebach i roślinach (w) Metale ciężkie w środowisku. Prace Instytutu Ekologii Terenów Uprzemysłowych, red. S. Hławiczko, Wyd. Ekonomia i Środowisko, Białystok, 2008, s. 122–150
22. Łakzian A., Murphy P., Turner A., Beynon J.L., Giller K.E.: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 519–529 (2002)
23. Lebrun M., Audurier A., Cossart P.: Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *J. Bacteriol.* **176**, 3040–3048 (1994)
24. Ledin M.: Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soil systems. *Earth-Sci. Rev.* **51**, 1–31 (2000)
25. Legatzki A., Franke S., Lucke S., Hoffmann T., Anton A., Neumann D., Nies D.H.: First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal resistance in *Ralstonia metallidurans*. *Biodegradation*, **14**, 153–168 (2003)
26. Lloyd J.R., Lovley D.R.: Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 248–253 (2001)
27. Majáre M., Bülow L.: Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.* **19**, 67–73 (2001)
28. Mathema V.B., Thakuri B.Ch., Sillanpää M.: Bacterial *mer* operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch. Microbiol.* **193**, 837–844 (2011)
29. Mergeay M.: Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends Biotechnol.* **9**, 17–24 (1991)
30. Miethke M., Marahiel M.A.: Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 413–451 (2007)
31. Misra T.K.: Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid*, **27**, 4–16 (1992)
32. Muller D., Lievreumont D., Simeonova D.D., Hubert J.C., Lett M.C.: Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant beta-proteobacterium. *J. Bacteriol.* **185**, 135–141 (2003)
33. Mulrooney S.B., Hausinger R.P. Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 239–261 (2003)
34. Neubauer U., Furrer G., Kayser A., Schulin R.: Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation*, **2**, 353–368 (2000)
35. Nies D.H.: Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 313–339 (2003)
36. Nies D.H., Silver S.: Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 189–199 (1995)
37. Nordberg M.: Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, **46**, 243–254 (1998)
38. Pal A., Paul A.K.: Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Ind. J. Microbiol.* **48**, 49–64 (2008)
39. Pao S., Paulsen I.T., Saier M.H.Jr.: Major Facilitator Superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1–34 (1998)
40. Parkhill J., B.G. Barel i wsp.: Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, **413**, 848–852 (2001)
41. Pitts K.E., Summers A.O.: Role of thiols in the bacterial organomercurial lyase. *Biochemistry*, **41**, 10287–10296 (2002)
42. Rajkumar M., Ae N., Prasad M.N.V., Freitas H.: Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* **28**, 142–149 (2010)
43. Rasmussen L.D., Sørensen S.J.: Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**, 1–9 (2001)
44. Rensing Ch., Grass G.: *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 197–213 (2003)
45. Rensing Ch., Ghosh M., Rosen B.P.: Families of soft-metal-ion-transporting ATP-ases. *J. Bacteriol.* **181**, 5891–5897 (1999)
46. Rosen B.P.: Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. *JBIC*, **1**, 273–277 (1996)
47. Rosen B.P.: Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eucaryotic and prokaryotic microbes. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **133**, 689–693 (2002)
48. Santamaria M., Diaz-Marreto A.R., Hernandez J., Uutierrez-Navarro A.M., Corzo J.: Effect of thorium on the growth and capsule morphology of *Bradyrhizobium*. *Environ. Microbiol.* **5**, 916–924 (2003)
49. Satarug S., Baker J.R., Urbenjapol S., Haswell-Elkins M., Reilly P.E.B., Williams D.J., Moore M.R.: A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol. Lett.* **137**, 65–83 (2003)
50. Schlüter A., Heuer H., Szczepanowski R., Forney L.J., Thomas C.M., Pühler A., Top E.M.: The 64 508 bp IncP-1 b antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 b group. *Microbiology*, **149**, 3139–3153 (2003)
51. Shi W., Bischoff M., Turco R., Konopka A.: Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.* **21**, 169–177 (2002)

52. Silver S., Phung L.T.: Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 753–789 (1996)
53. Silver S., Phung L.T.: A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 587–605 (2005)
54. Singh S.K., Grass G., Rensing C., Montfort W.R.: Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 7815–7817 (2004)
55. Słaba M., Długoński J.: Mikrobiologiczne usuwanie i odzyskiwanie metali ciężkich. *Post. Mikrobiol.* **41**, 167–183 (2002)
56. Słaba M., Paraszkiwicz K.: Mikroorganizmy w ochronie środowiska. Metale ciężkie (w) Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności, red. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2008, s. 518–529
57. Solioz M., Stoyanov J.V.: Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 183–195 (2003)
58. Sutcliffe I.C.: A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol.* **18**, 464–470 (2010)
59. Sutherland I.W.: Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**, 3–9 (2001)
60. Szczepanowski R., Braun S., Riedel V., Schneiker S., Krahn I., Pühler A., Schlüter A.: The 120 592 bp lncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology*, **151**, 1095–1111 (2005)
61. Tauch A., Schlüter A., Bischoff N., Goesmann A., Meyer F., Pühler A.: The 79 370 bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 backbone loaded with a chromate resistance transposon, the strA-strB streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene bla (NPS-1), and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family. *Mol. Genet. Genomics*, **268**, 570–584 (2003)
62. Tennstedt, T., Szczepanowski R., Krahn I., Pühler A., Schlüter A.: Sequence of the 68 869 bp IncP-1 plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid*, **53**, 218–238 (2005)
63. Valls M., de Lorenzo V.: Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 327–338 (2002)
64. Wang Y., Moore M., Levinson H.S., Silver S., Walsh C.T., Mahler I.: Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistant determinant from a *Bacillus* sp. with broad spectrum mercury resistance. *J. Bacteriol.* **171**, 83–92 (1989)
65. Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. What are bacterial extracellular polymeric substances? (w) *Microbial Extracellular Polymeric Substances* red. J. Wingender, T.R. Neu, H.C. Flemming, Springer, Berlin, 1999, s. 1–20