



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Bi6420

## Ekotoxikologie mikroorganismů

<https://is.muni.cz/el/1431/jaro2014/Bi6420/index.qwarp>

Doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

[hofman@recetox.muni.cz](mailto:hofman@recetox.muni.cz)

jaro 2014



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu byla spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Bi6420: Ekotoxikologie mikroorganismů

## Část 2: MO a toxické látky

Biodostupnost toxických látek pro MO v prostředí  
Vstup toxických látek do MO a povrchové bariéry  
Interakce toxikantů s mikrobiálními buňkami, obrana  
MO proti toxikantům, toxicita, biodegradace polutantů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu byla spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

# Působení toxických látek na MO

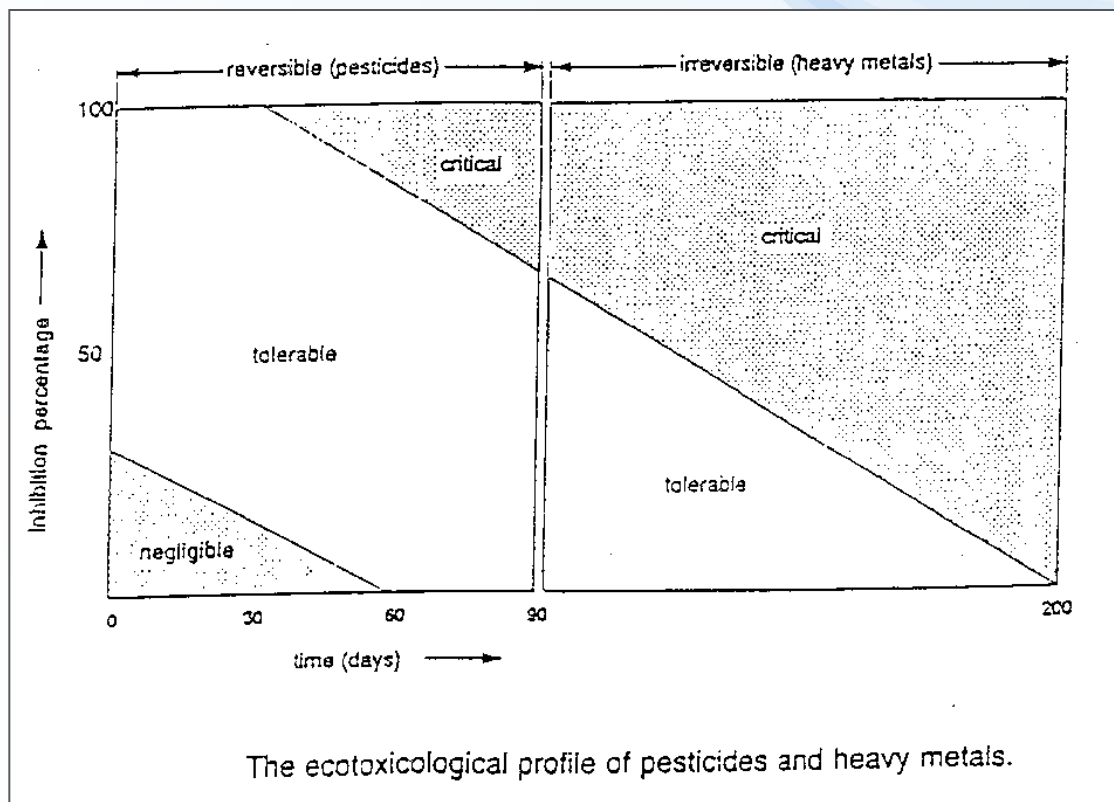
- **funkce koncentrace**
  - DOSE – RESPONSE vztah – vyšší koncentrace – vyšší efekt, ALE např. u esenciálních kovů křivka optima a v některých případech efekt hormese
- **funkce vlastností látky**
  - chemická struktura, Kow, Sw, Koc, pKa, MW, H, pv
  - formy (specie), reaktivita, biodostupnost
- **funkce vlastností MO, např.**
  - jaká je buňka typu (prokaryotická či eukaryotická, G+ či G-)
  - jaká je morfologie, fyziologie, typ metabolismu
  - vliv **stavu buněk** (fáze buněčného cyklu, spóra či ne)
- **funkce vlastností (faktorů) prostředí**
  - pH, CEC, OM, redox, teplota ...
  - např. vliv pH na mobilitu kovů, kosubstráty, TEA ...
  - přítomnost surfaktantů ...



# Působení toxických látek na MO

- **funkce času** - lineární, u chronického působení spíše klesá s dobou působení (důsledek adaptace), případně opakovaná expozice
- u MO není tak jednoznačně oddělitelná akutní a chronická toxicita

**Irreverzibilita působení toxického efektu:**



# Zjednodušené schéma expozice MO v prostředí

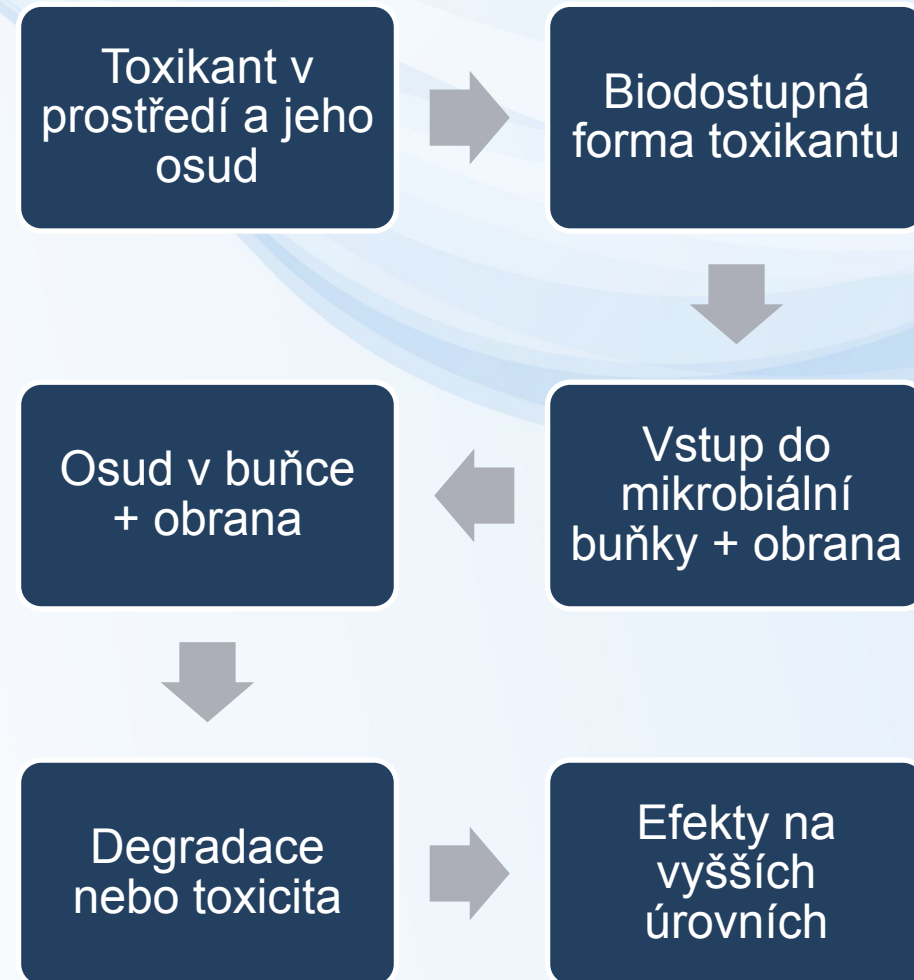
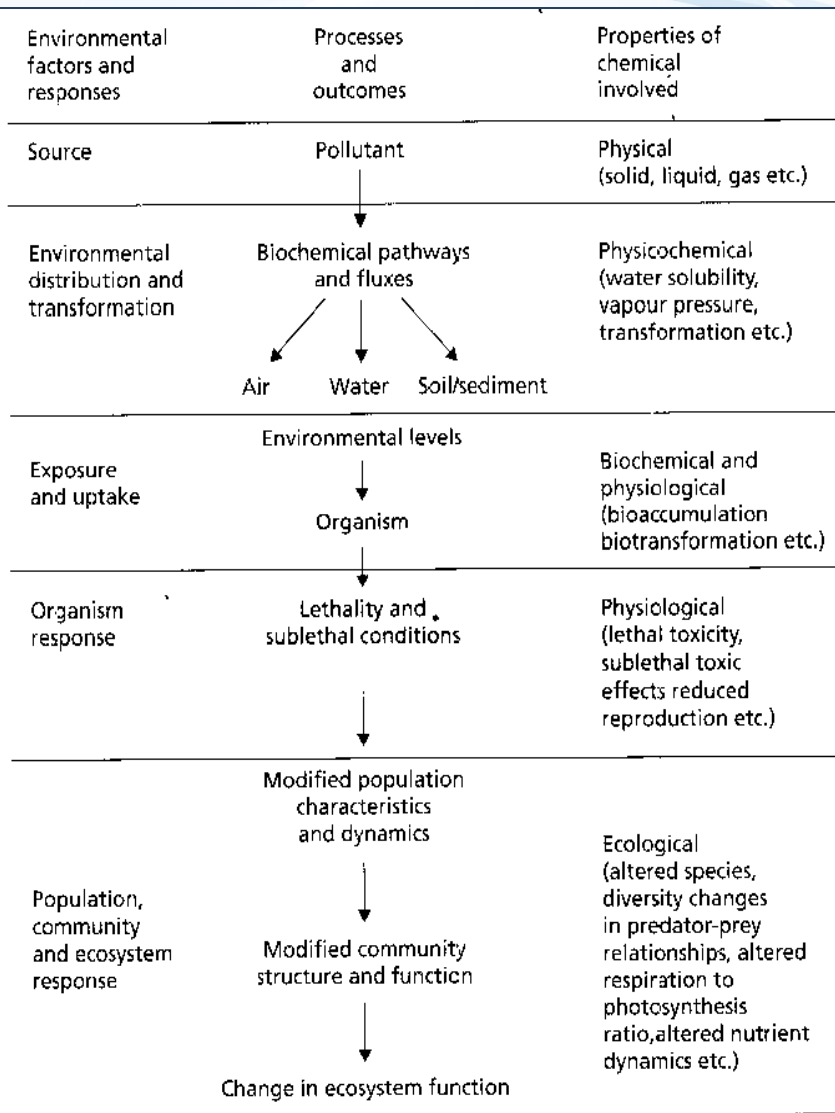


Fig. 2.1 Relationship between the properties of an ecotoxicant and its interaction with ecosystems.

The background of the slide features several overlapping, wavy lines in various shades of light blue, creating a sense of movement and depth. These lines are centered around the text box.

# **Biodostupnost toxických látek pro MO v prostředí**

# Zjednodušené schéma expozice MO v prostředí

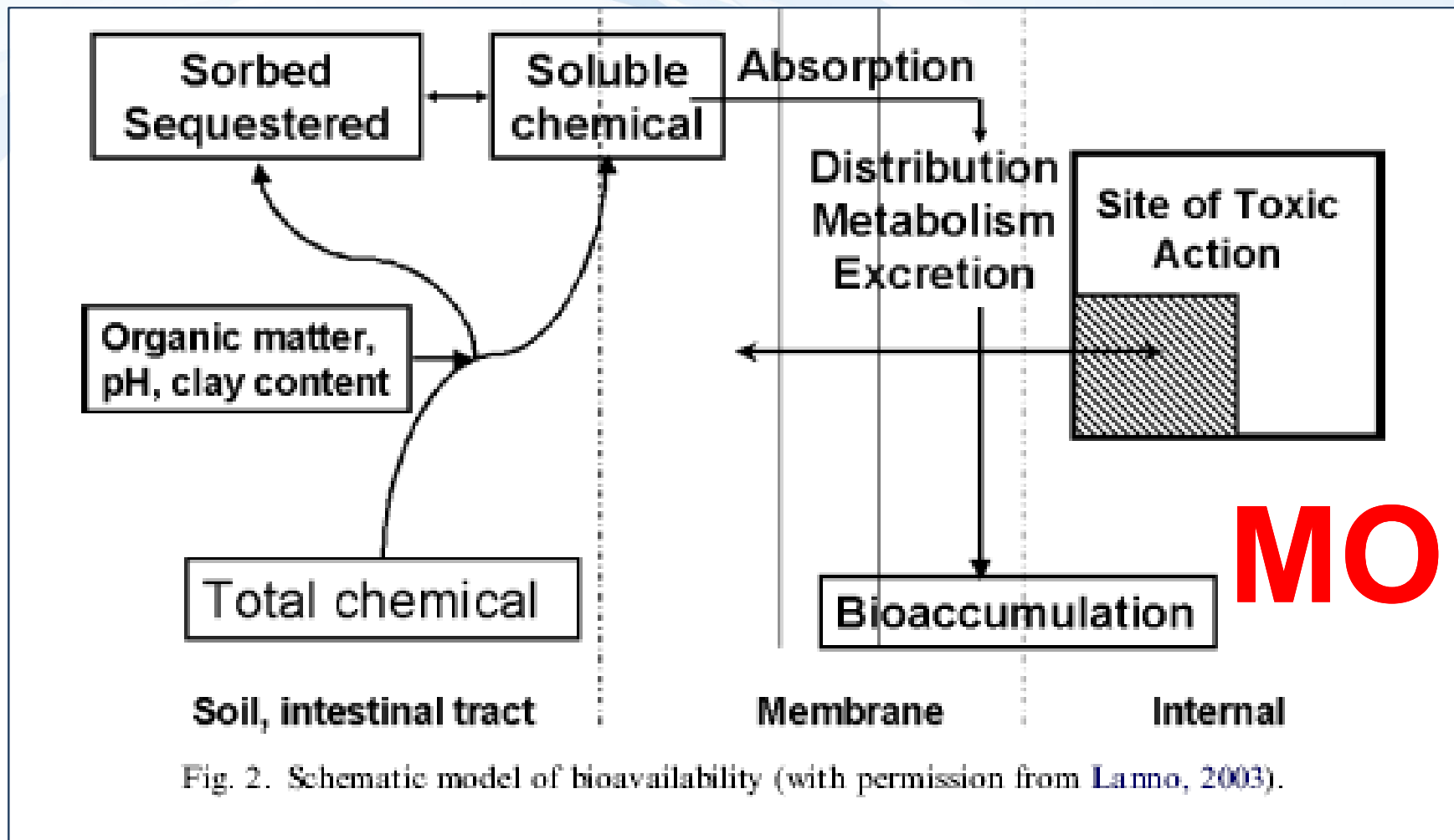
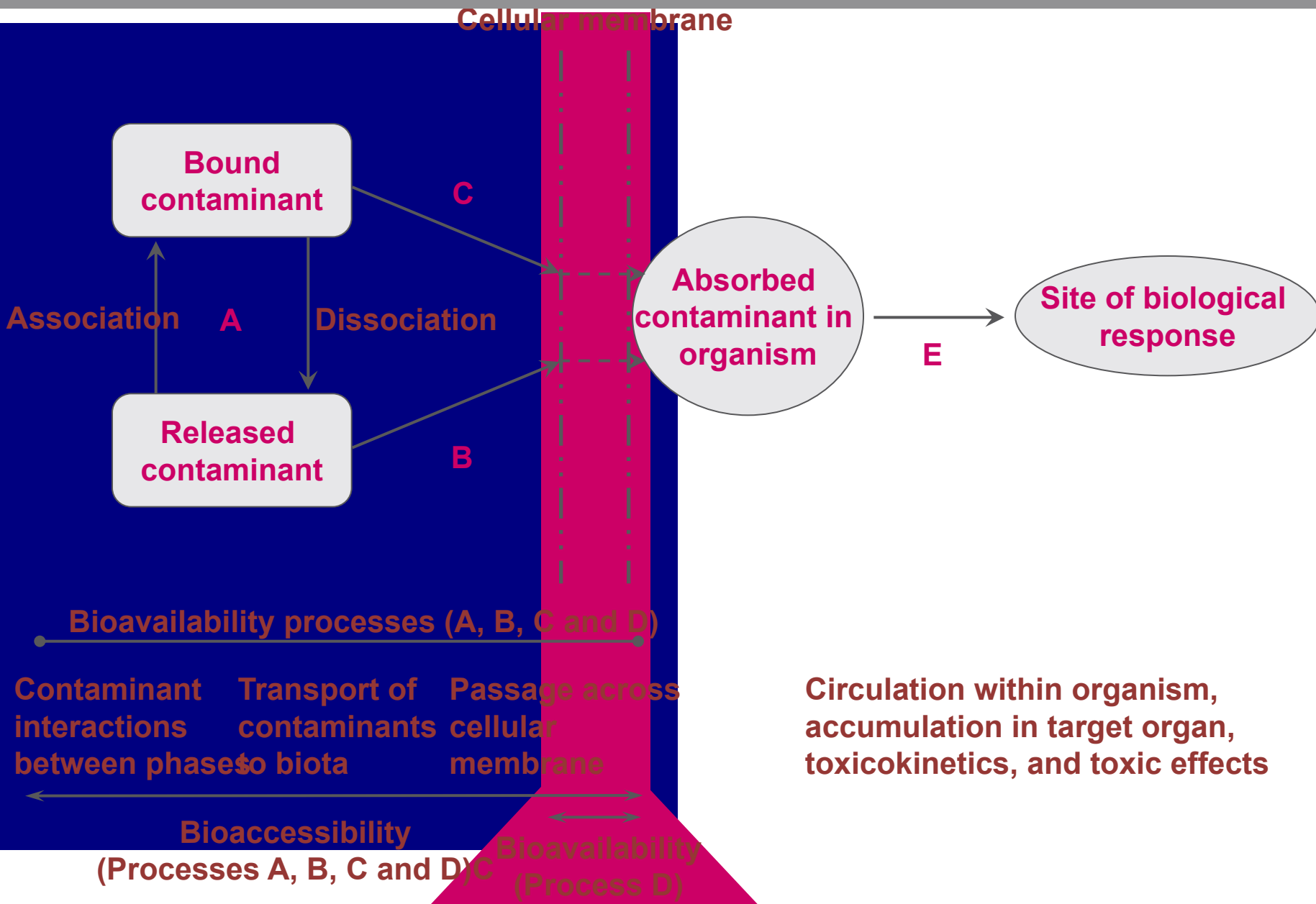


Fig. 2. Schematic model of bioavailability (with permission from Lanno, 2003).

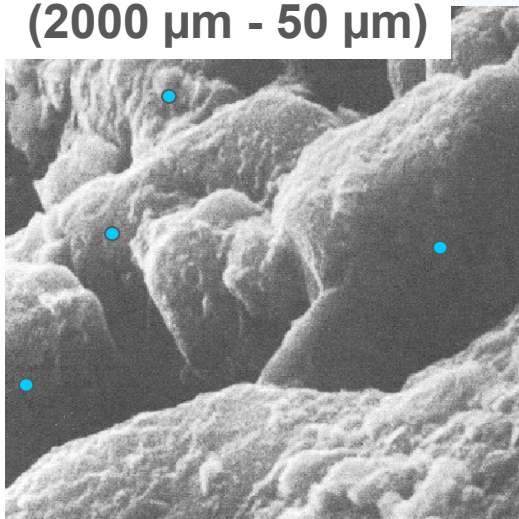
# Schéma biodostupnosti a biodosažitelnosti



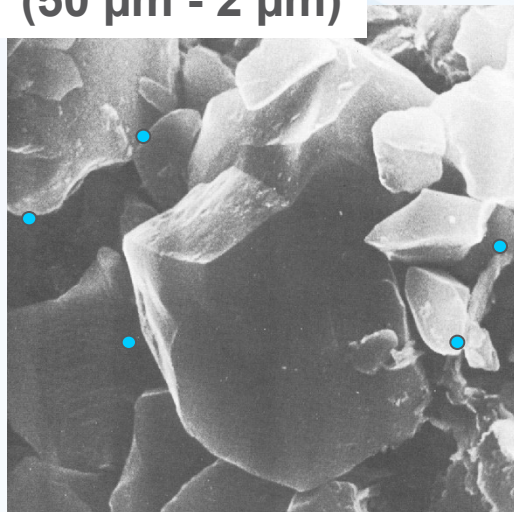


# Situace v pevných maticích (půda, sediment)

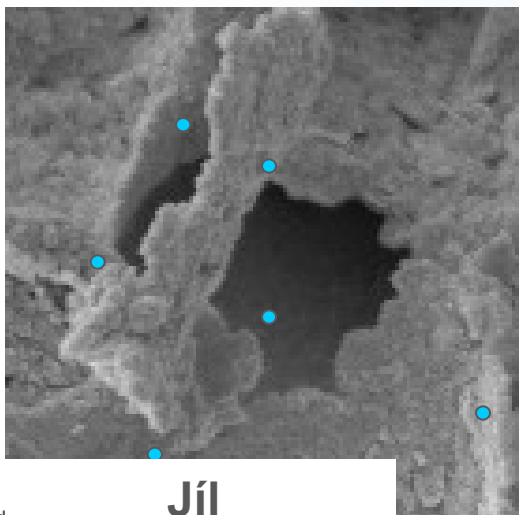
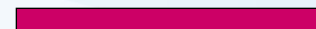
**Písek**  
(2000  $\mu\text{m}$  - 50  $\mu\text{m}$ )



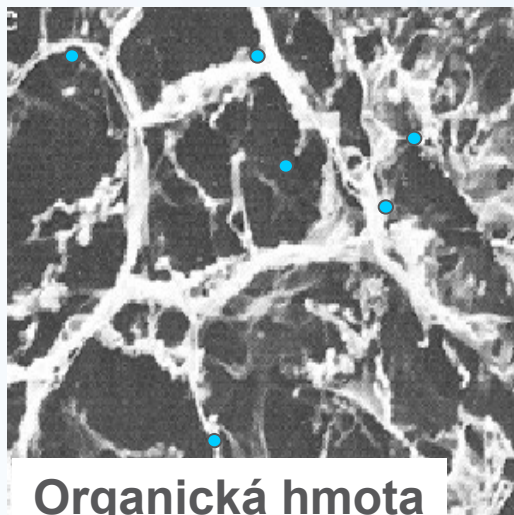
**Prach**  
(50  $\mu\text{m}$  - 2  $\mu\text{m}$ )



10  $\mu\text{m}$



**Jíl**  
(2  $\mu\text{m}$  - 0,2  $\mu\text{m}$ )



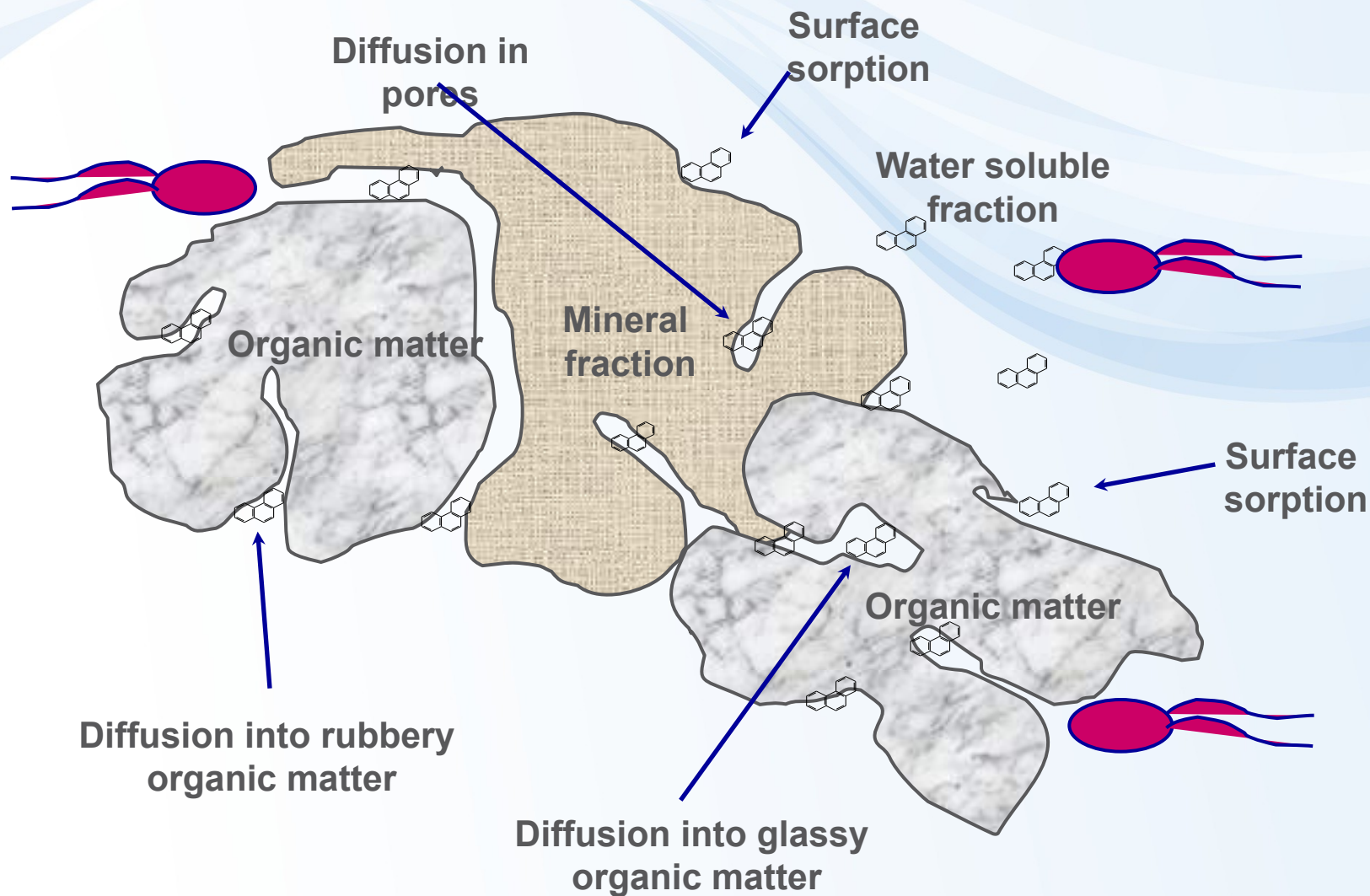
**Organická hmota**  
(N/A)



1-2  $\mu\text{m}$   
bakterie

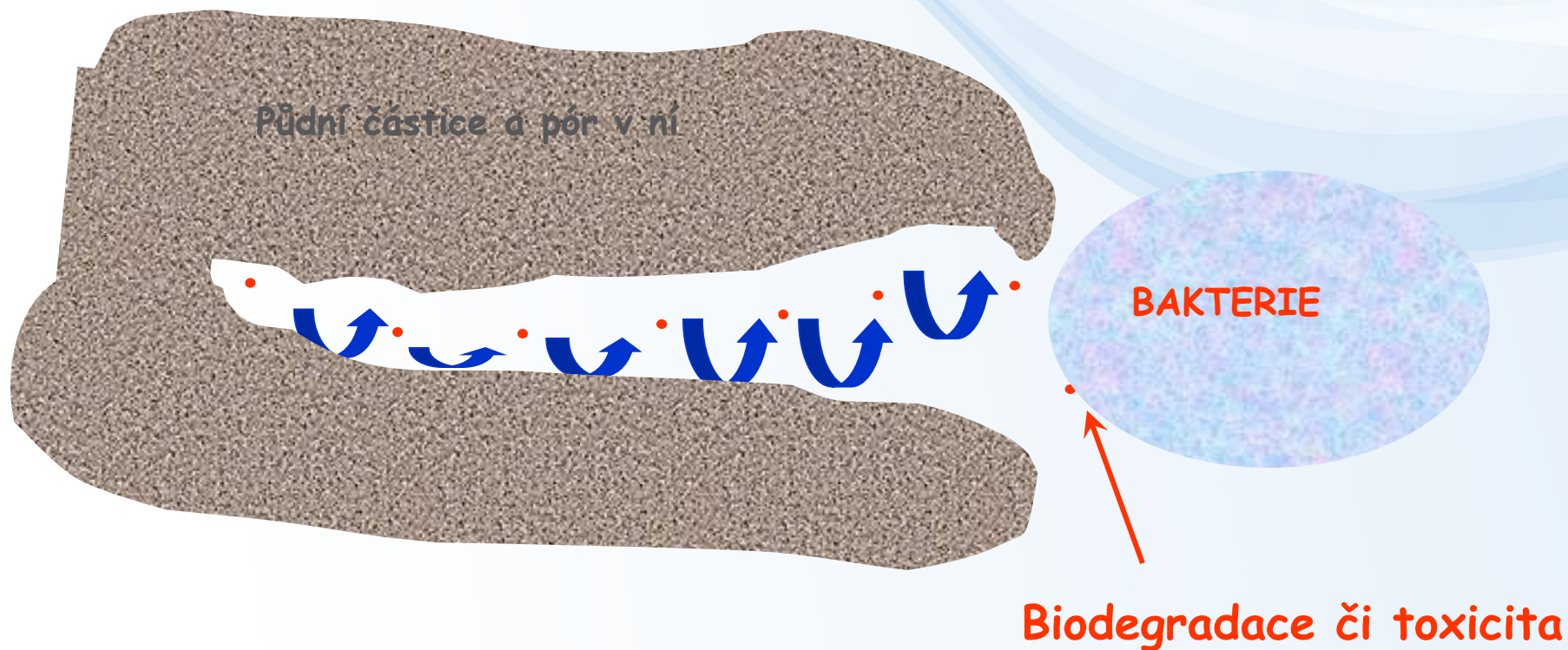
• 1 nm  
kontaminant

# Situace v pevných maticích (půda, sediment)



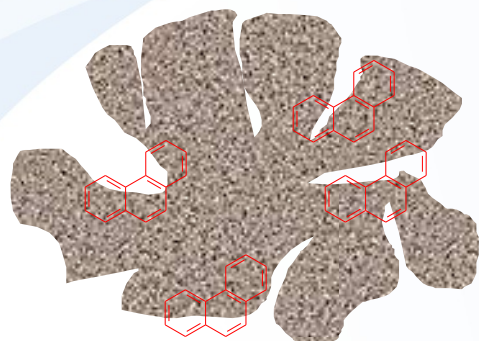
# Příklad fungování „mass transfer“

Jestliže biota nemůže jít ke kontaminantu .....,  
..... tak kontaminant musí jít k biotě !!!!!

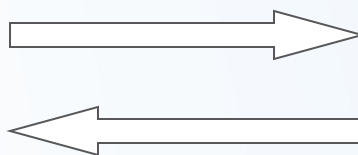


# Princip „mass transfer“ (přesunu polutantu) ?

**A**



**Rovnováha**



**Půdní roztok**



**Žádná interakce mikroorganismů**

**B**



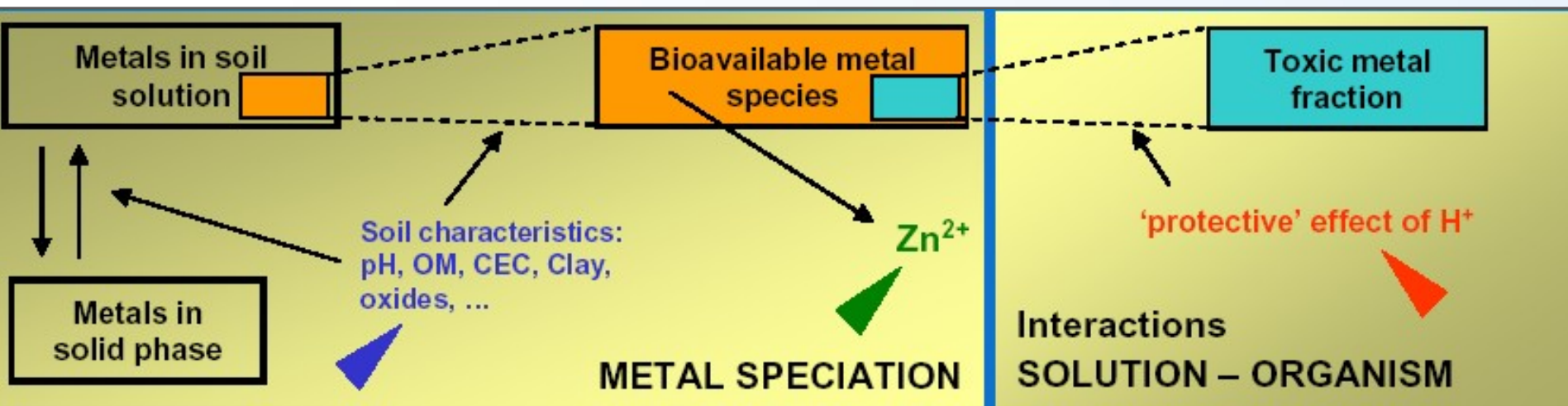
**Vliv mikroorganismů**

**Reakce nachýlená ve prospěch desorpce**



# Kovy v prostředí a biodostupnost pro MO

- na rozdíl od organických polutantů a dalších toxikantů, kovy nemohou nikdy být degradovány, pouze změna jejich formy, specíe → mobility, biodostupnosti
- celková koncentrace kovu v prostředí tedy není relevantní z pohledu jeho toxicity, mnohem více je důležitá **dostupná frakce**: kovy ve formě tzv. **volného iontu – free ion**
- **nedostupné** jsou většinou kovy vázané na koloidy či povrchy pevné frakce **-(kat)iontová výměna**, kovy vysrážené či v komplexech (např. reagují s přítomnými **fosfáty a sulfáty, hydroxy- a thio- skupinami na OM**)



# Kovy v prostředí a biodostupnost pro MO

- výskyt biodostupných forem kovů závisí silně na **faktorech prostředí** – CEC, pH, redox a OM, jílové minerály, rozpuštěné sulfidy, komplexační činidla (HA), aktivity MO

Faktor	Proces, který se odehrává	Vliv na mob/biodost
Low pH	Decreasing sorption of cations onto oxides of Fe and Mn	Increase
	Increasing sorption of anions onto oxides of Fe and Mn	Decrease
High pH	Increasing precipitation of cations as carbonates and hydroxides	Decrease
	Increasing sorption of cations onto oxides of Fe and Mn	Decrease
	Increasing complexation of certain cations by dissolved ligands	Increase
	Increasing sorption of cations onto (solid) humus material	Decrease
	Decreasing sorption of anions	Increase
High clay content	Increasing ion exchange for trace cations (at all pH)	Decrease
High OM (solid)	Increasing sorption of cations onto humus material	Decrease
High (soluble) humus content	Increasing complexation for most trace cations	Decrease/increase?
Competing ions	Increasing competition for sorption sites	Increase
Dissolved inorganic ligands	Increasing trace metal solubility	Increase
Dissolved organic ligands	Increasing trace metal solubility	Increase
Fe and Mn oxides	Increasing sorption of trace cations with increasing pH	Decrease
	Increasing sorption of trace anions with decreasing pH	Decrease
Low redox	Decreasing solubility at low redox potential as metal sulfides	Decrease
	Decreasing solution complexation with lower redox potential	Increase/decrease?

# Kovy v prostředí a biodostupnost pro MO

- závisí samozřejmě také na vlastnostech kovů: metaloidy (Ge, As, Sb, Se) – tvoří **aniontové specie** (např.  $\text{AsO}_4^{3-}$ ) na rozdíl od kovů, které jsou v prostředí většinou jako **kationtové specie**

Ag(I)	$\text{Ag}^+$ , $\text{AgCl}^0$	$\text{Ag}^+$
As(III)	$\text{As}(\text{OH})_3$	$\text{AsO}_3^{3-}$
As(V)	$\text{H}_2\text{As}_4^-$	$\text{HAsO}_4^{2-}$
B(III)	$\text{B}(\text{OH})_3$	$\text{B}(\text{OH})_4^-$
Be(II)	$\text{Be}^{2+}$	$\text{Be}(\text{OH})_3^-$ , $\text{Be}(\text{OH})_4^{2-}$
Cd(II)	$\text{Cd}^{2+}$ , $\text{CdSO}_4^0$ , $\text{CdCl}^-$	$\text{Cd}^{2+}$ , $\text{CdCl}^-$ , $\text{CdSO}_4^0$ , $\text{CdHCO}_3^+$
Co(II)	$\text{Co}^{2+}$ , $\text{CoSO}_4^0$	$\text{Co}(\text{OH})_2^0$
Cr(III)	$\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$	$\text{Cr}(\text{OH})_4^-$
Cr(VI)	$\text{CrO}_4^{2-}$	$\text{CrO}_4^{2-}$
Cu(II)	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{CuCl}^-$	$\text{CuCO}_3^0$ , $\text{CuHCO}_3^+$
Hg(II)	$\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Hg}(\text{Cl})_2^0$ , $\text{CH}_3\text{Hg}^+$	$\text{Hg}(\text{OH})_2^0$
Mn(II)	$\text{Mn}^{2+}$ , $\text{MnSO}_4^0$	$\text{Mn}^{2+}$ , $\text{MnSO}_4^0$ , $\text{MnCO}_3^0$ , $\text{MnHCO}_3^+$
Mo(V)	$\text{H}_2\text{MoO}_4^0$ , $\text{HMoO}_4$	$\text{HMoO}_4^-$ , $\text{MoO}_4^{2-}$
Ni(II)	$\text{Ni}^{2+}$ , $\text{NiSO}_4^0$ , $\text{NiHCO}_3^+$	$\text{NiCO}_3^0$ , $\text{NiHCO}_3^+$ , $\text{Ni}^{2+}$
Pb(II)	$\text{Pb}^{2+}$ , $\text{PbSO}_4^0$ , $\text{PbHCO}_3^+$	$\text{PbCO}_3^0$ , $\text{PbHCO}_3^+$ , $\text{Pb}(\text{CO}_3)_2^{2-}$ , $\text{PbOH}^+$
Sb(III)	$\text{Sb}(\text{OH})_2^+$ , $\text{Sb}(\text{OH})_3$	$\text{Sb}(\text{OH})_4^-$
Se(IV)	$\text{HSeO}_3^-$	$\text{SeO}_3^{2-}$
Se(VI)	$\text{SeO}_4^{2-}$	$\text{SeO}_4^{2-}$
Tl(I)	$\text{Tl}^+$	$\text{Tl}^+$
Tl(III)	$\text{Tl}(\text{OH})_3^0$	$\text{Tl}(\text{OH})_4^-$
V(IV)	$\text{VO}^{2+}$	oxidized to V(V) species
V(V)	$\text{VO}_2^+$ , polyvanadates	$\text{VO}_2(\text{OH})_2^-$ , $\text{VO}_3(\text{OH})^{2-}$
Zn(II)	$\text{Zn}^{2+}$ , $\text{ZnSO}_4^0$	$\text{ZnHCO}_3^+$ , $\text{ZnCO}_3^0$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{ZnSO}_4^0$

# Kovy v prostředí a biodostupnost pro MO

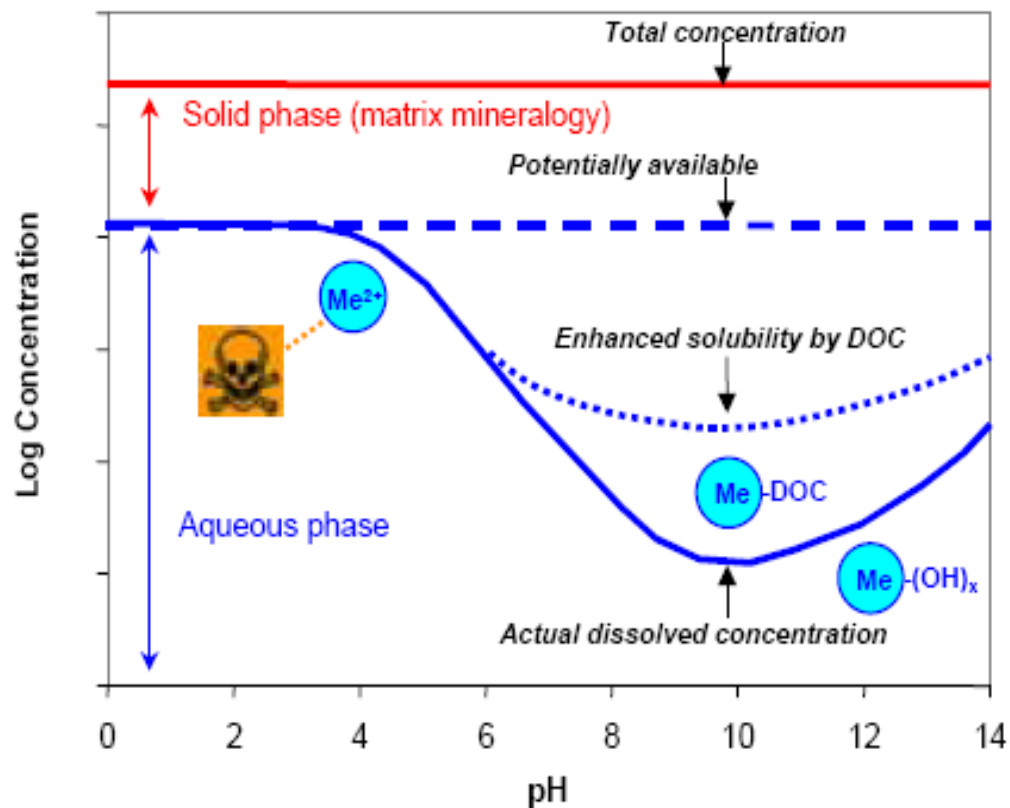
## Redox

- při aerobních podmínkách (0-800 mV) jsou kovy ve formě volného kationtu
- při anaerobních podmínkách (-400-0 mV) jsou vysrážené, např. v sulfidech, uhličitanech

## pH

- vyšší pH – kovy jsou ve formě nerozpustných fosfátů a uhličitánů, také se snižuje kapacita pH-dependentní CEC
- nižší pH – volné kationty nebo rozpustné organokovy, stoupá rozpustnost, naopak vyšší sorpce aniontových specií

Převzato z ISO 17402: Soil quality - Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability in soil and soil materials





# Kovy v prostředí a biodostupnost pro MO

## Kationtová výměna (KVK, CEC)

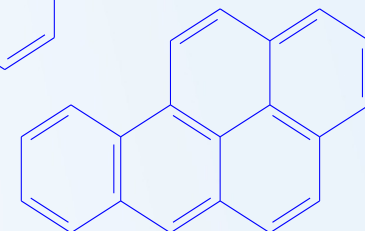
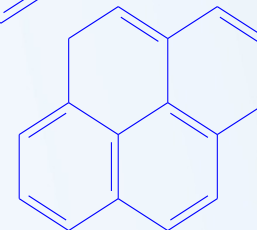
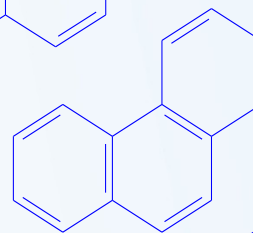
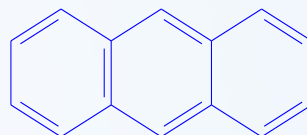
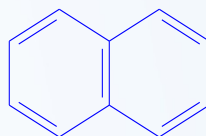
- kationty kovů se váží na negativně nabitě jílové částice v půdě a sedimentech
- půdy a sedimenty s vysokou CEC (organické a jílovité půdy) mají nízkou toxicitu, i když jsou celkové koncentrace kovů v nich vysoké
- **stejně tak ale jsou afinitní k negativně nabitým skupinám na povrchu MO**
- síla vazby (na abio. i MO) je různá:  $\text{Al}^{3+} > \text{Ca}^{2+} = \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$
- například  $\text{Al}^{3+}$  má tak vysokou afinitu k aniontům, že se většinou vyskytuje jako  $\text{Al}(\text{OH})_3$  a je nedostupný (při poklesu pH se pak uvolní)
- toxické kovy tvoří často veliké, dvojmocné kationty, které mají vysokou afinitu k adsorpci → nahradí „živinové“ kovy  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$   $\text{K}^+$   $\text{Na}^+$  na površích a zůstanou pevně navázány



# Biodostupnost organických polutantů

- Většinou jsou persistentní polutanty s nižší polaritou, rozpustností ve vodě a tlakem par, s vyšší hydrofobicitou a lipofilicitou a odolnou chemickou strukturou

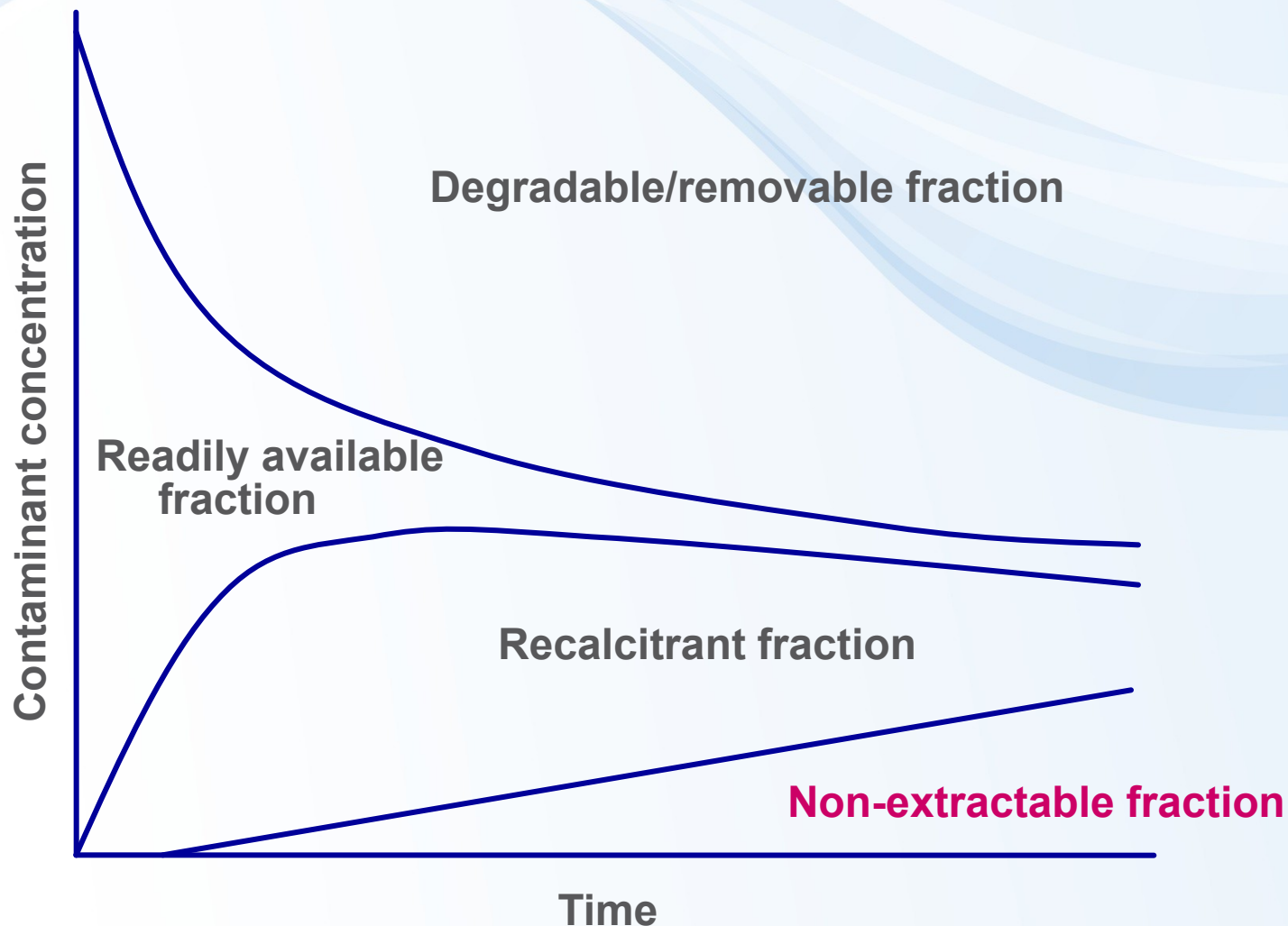
Rychle degradovatelné



Pomalou degradovatelné

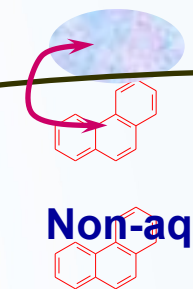
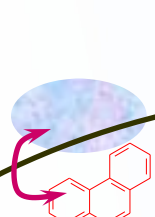


# Biodostupnost organických polutantů



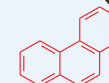
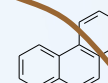
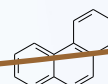
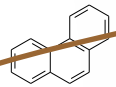
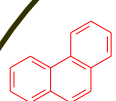
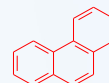
# Interakce organického kontaminantu a NAPL

Půdní roztok



NAPL

Non-aqueous Phase Liquid

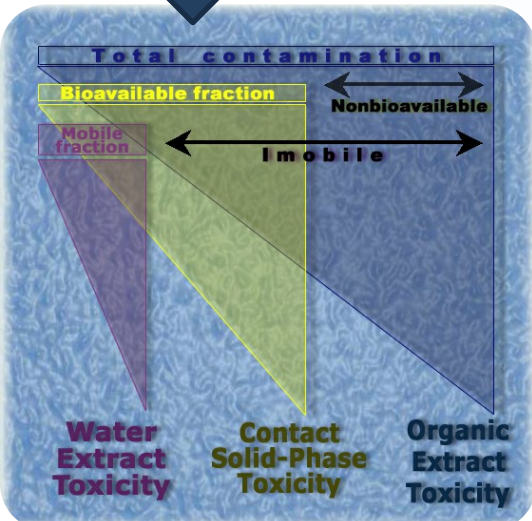


Půdní částice

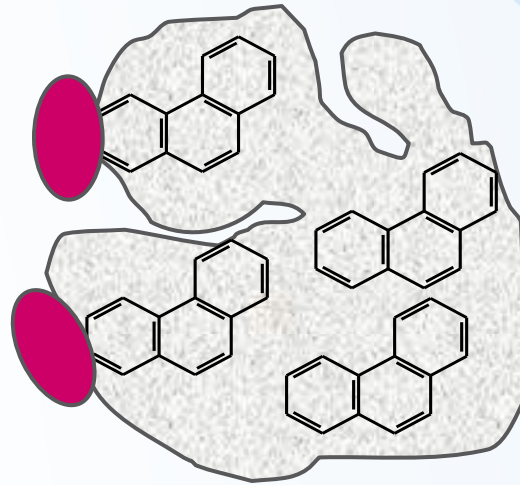


# Způsoby degradace

To stejné platí pro toxicitu, takže ...

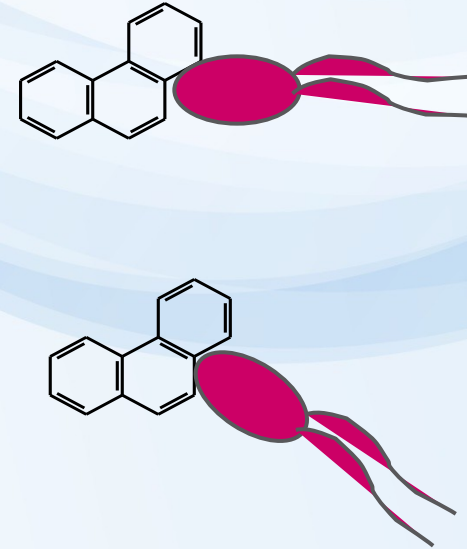


Soil-associated HOC



Degradation by direct contact

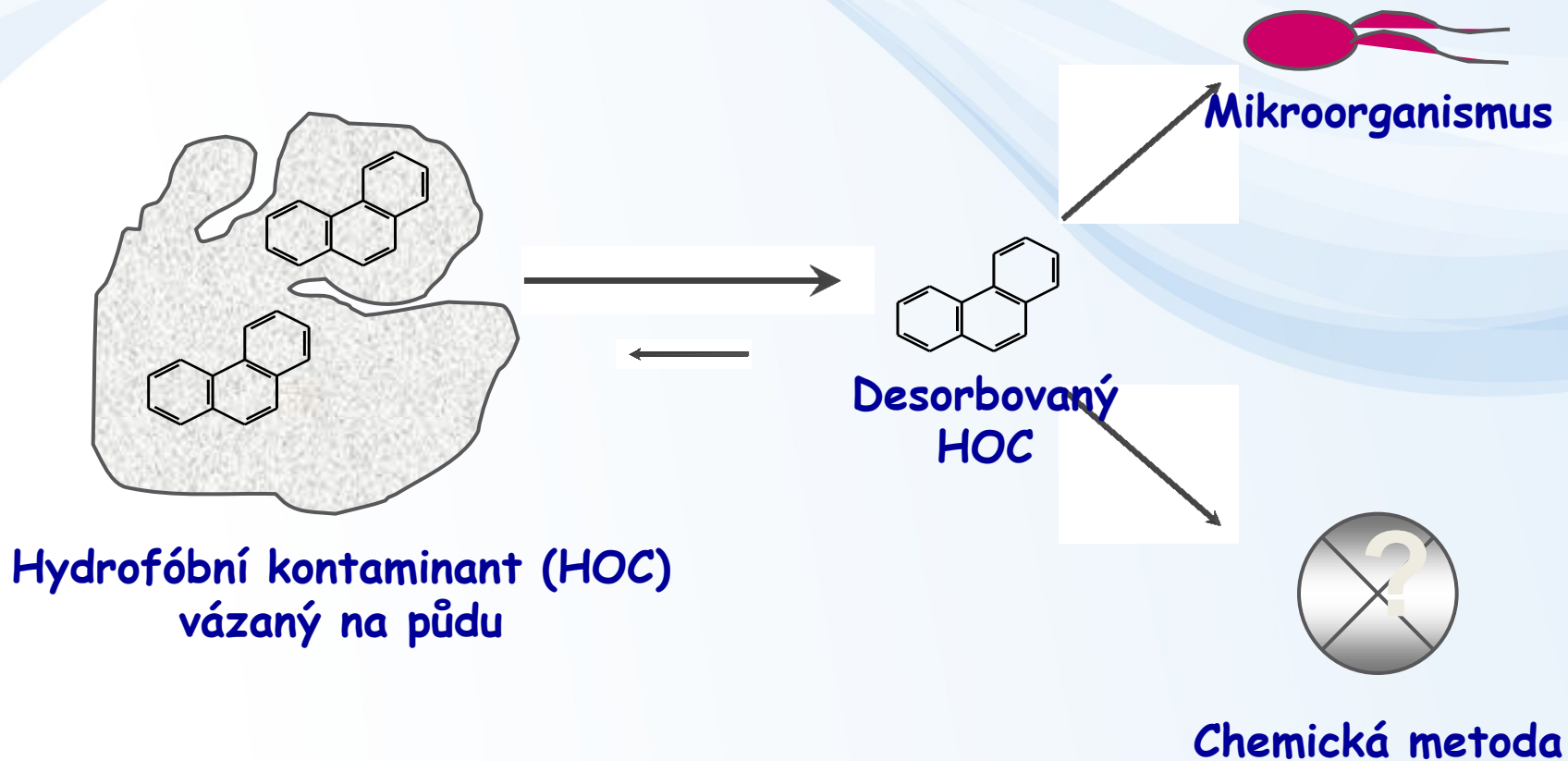
Dissolved HOC



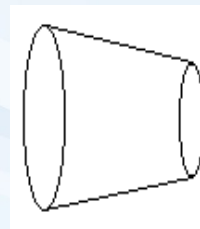
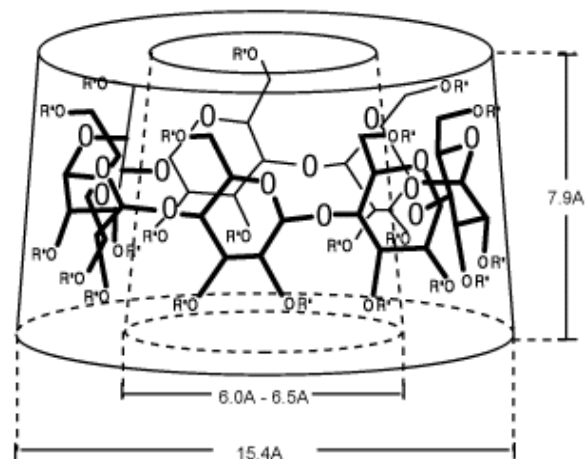
Degradation in the aqueous phase

Autor schématu K.T. Semple

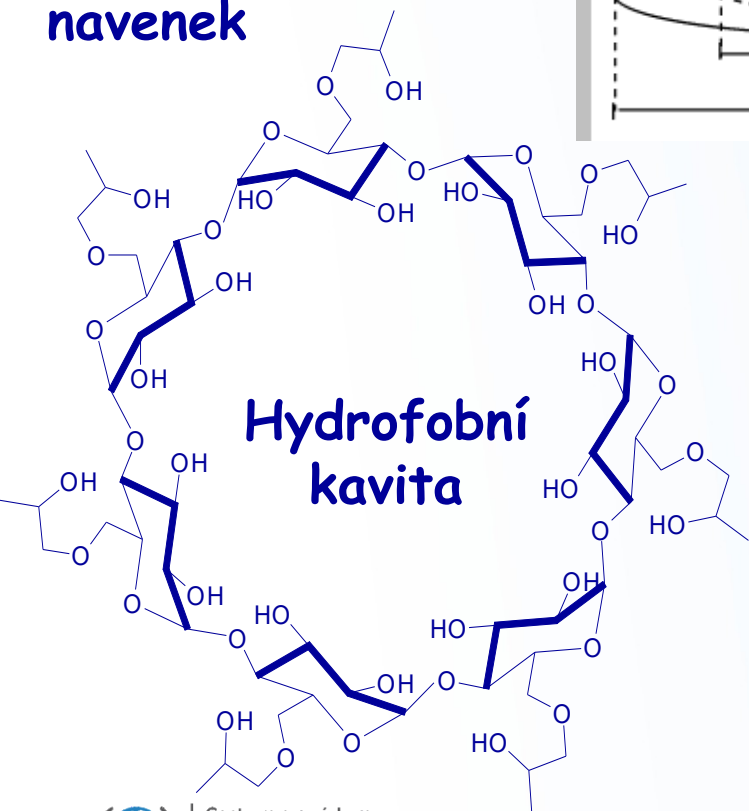
# Napodobení biodostupnosti HOC pro MO



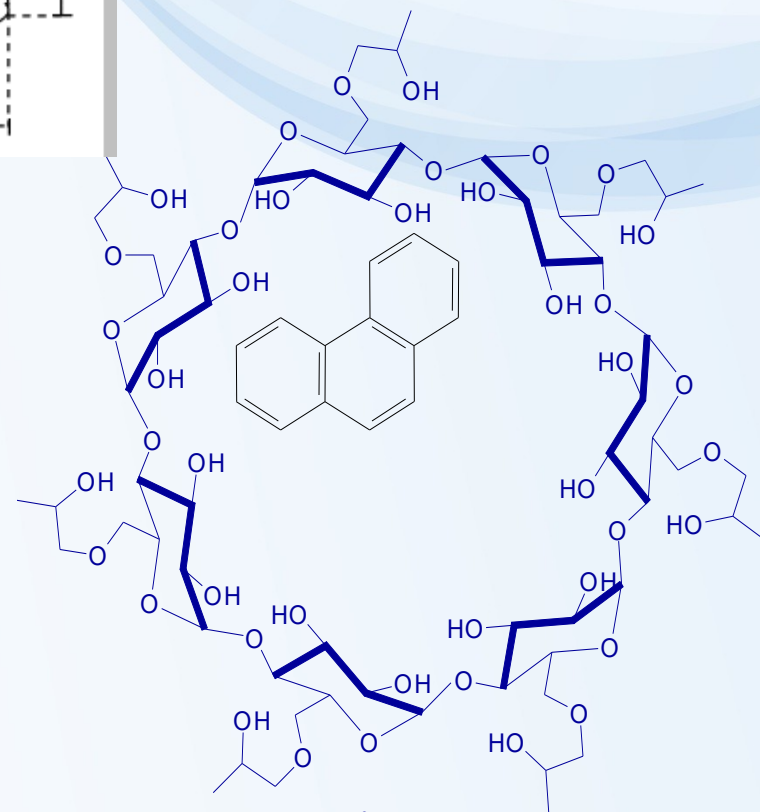
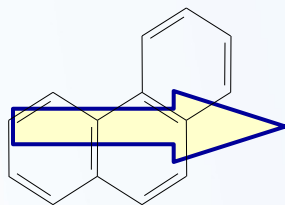
# Napodobení biodostupnosti HOC pro MO



**Hydrofilní navenek**



**Hydrofobní kavita**

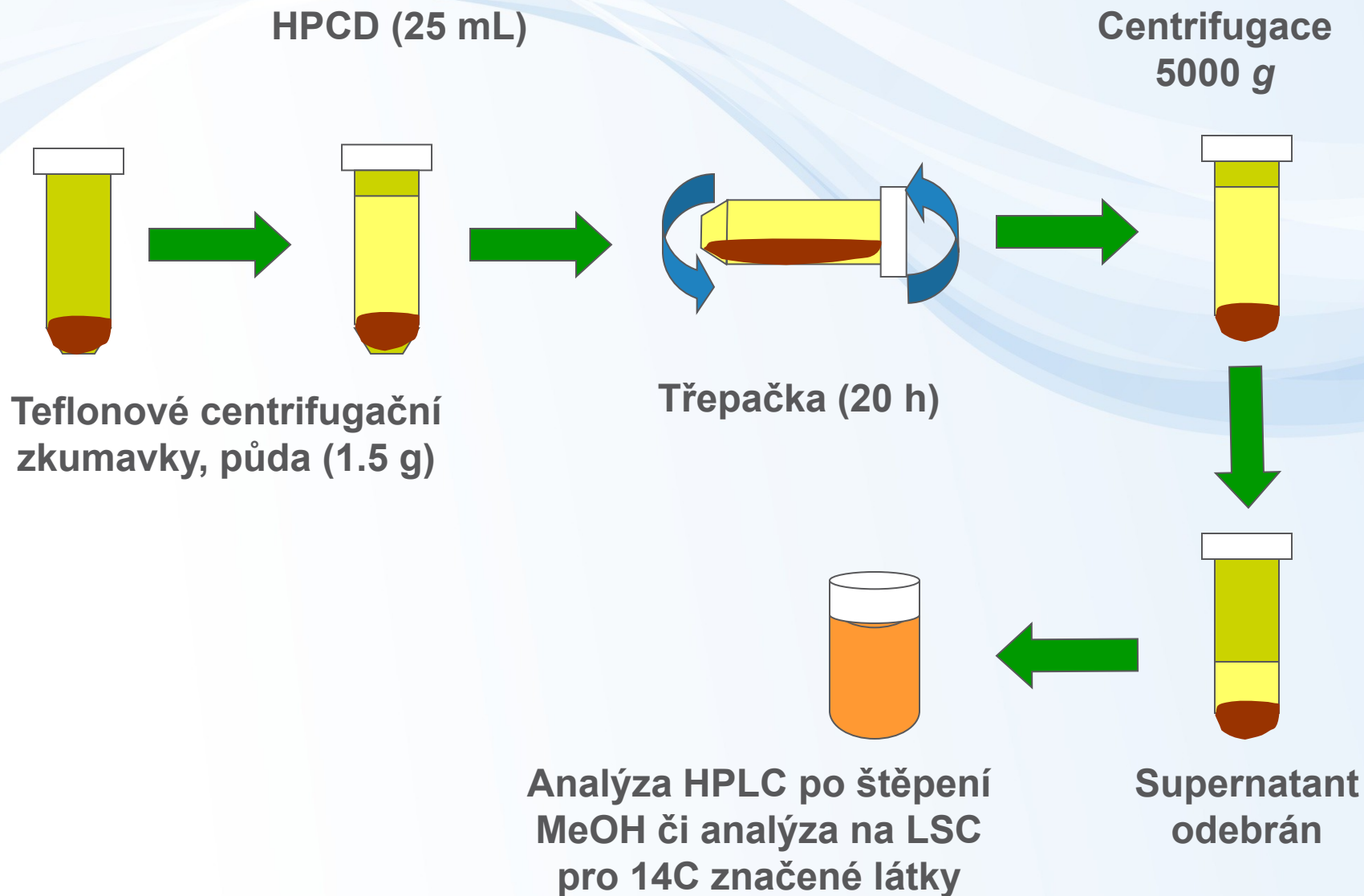


**Komplex**

**Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin**

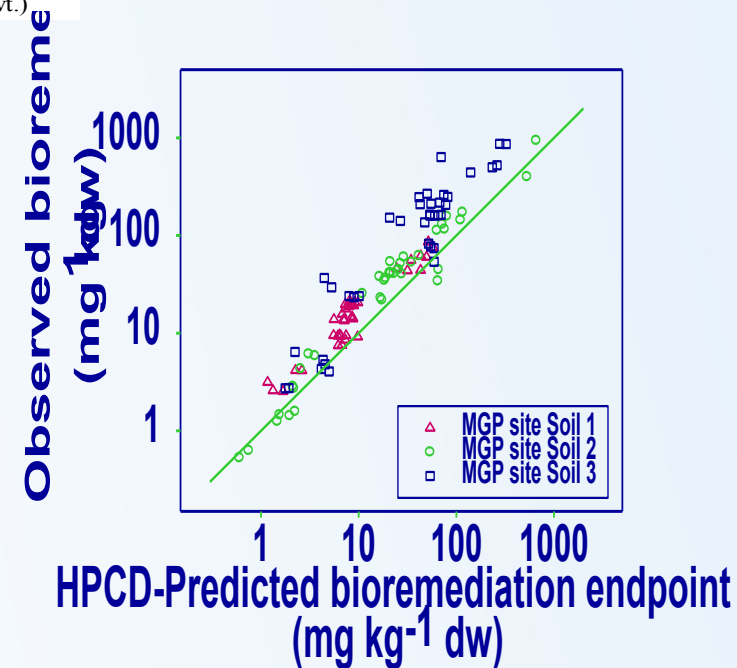
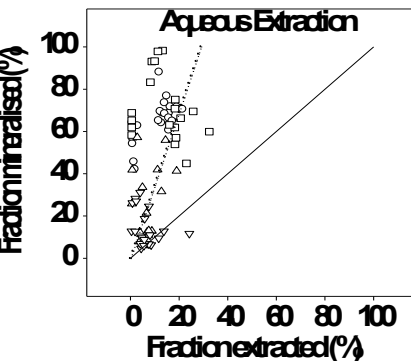
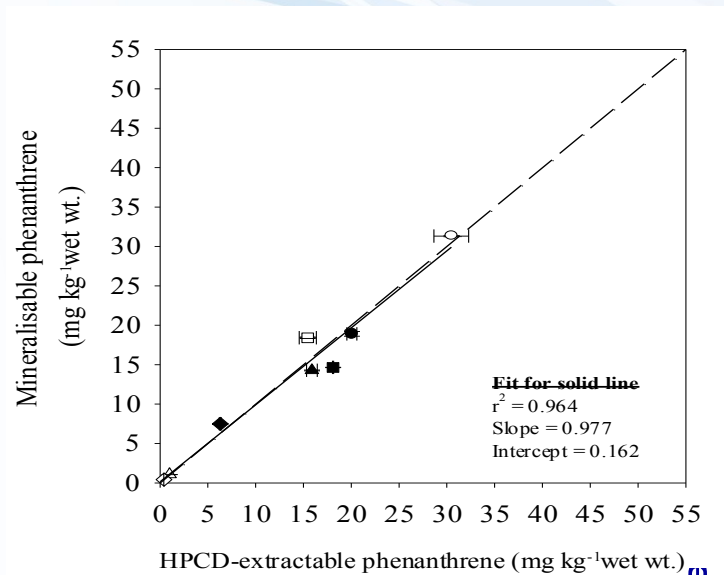
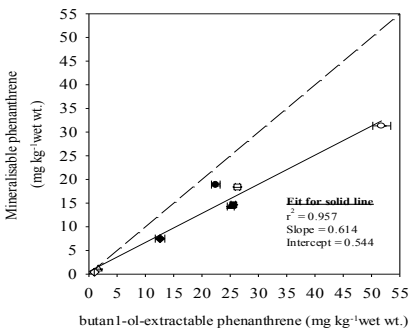
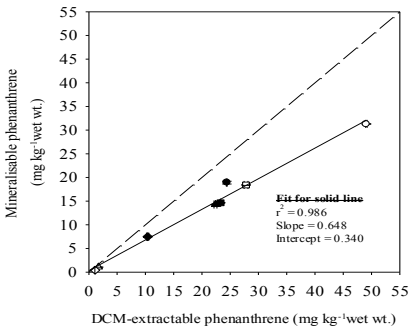
**Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-kontaminant**

# Napodobení biodostupnosti HOC pro MO



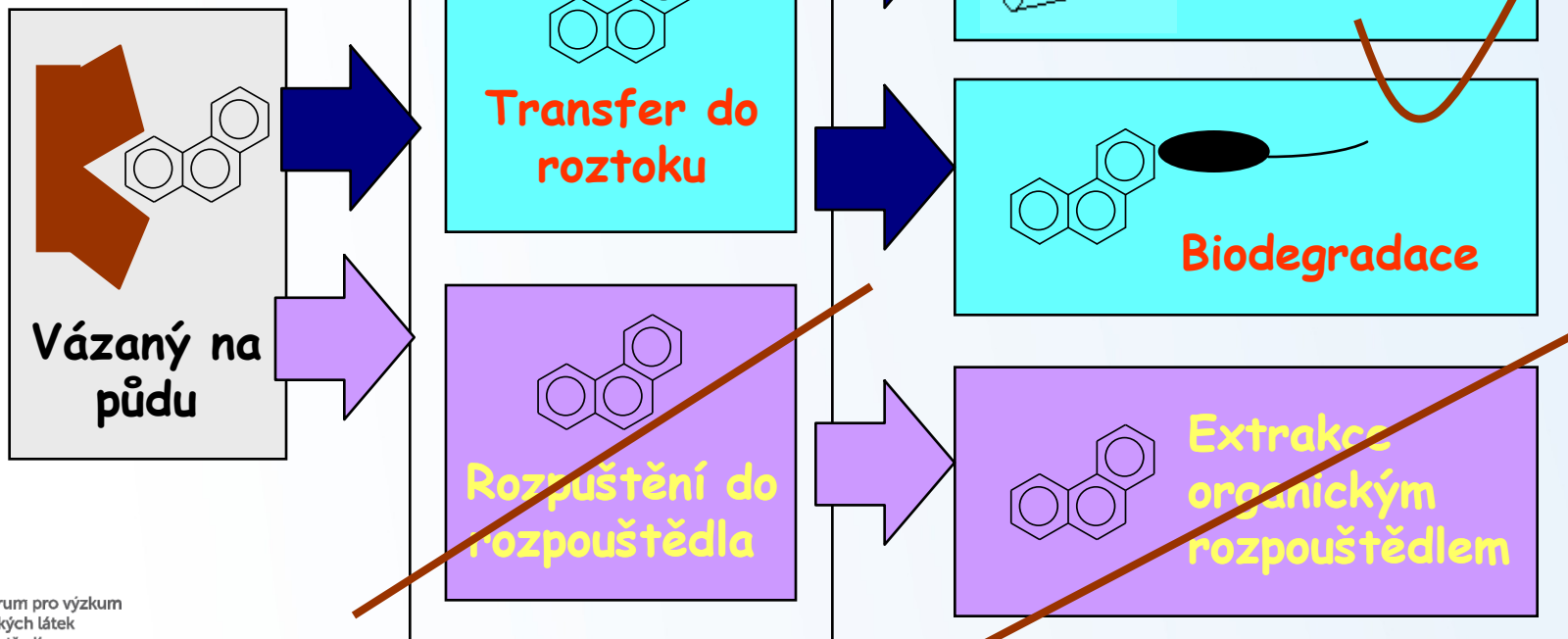
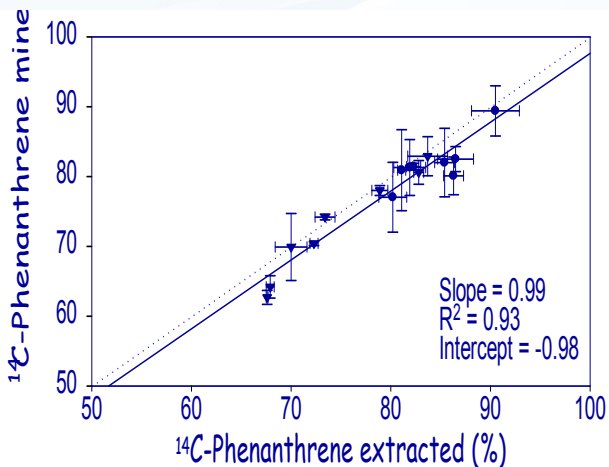


# Napodobení biodostupnosti HOC pro MO



# Napodobení biodostupnosti HOC pro MO

- Extrakce cyklodextrinem dokáže mimikovat biodostupnost pro bakterie



The background of the slide features several overlapping, wavy lines in various shades of light blue, creating a sense of movement and depth. These lines are centered around the text box.

# **Vstup toxických látek do MO a povrchové bariéry**

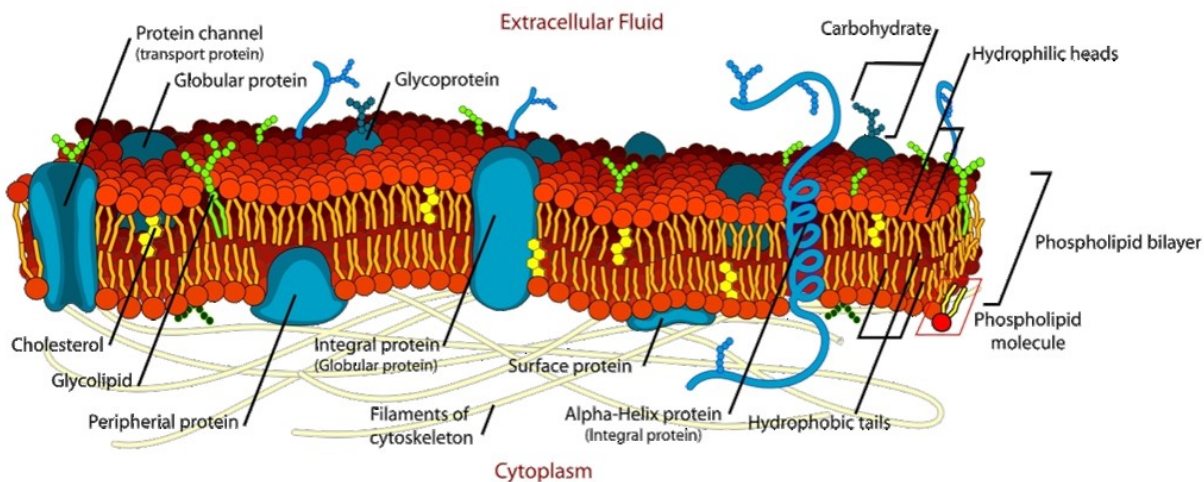
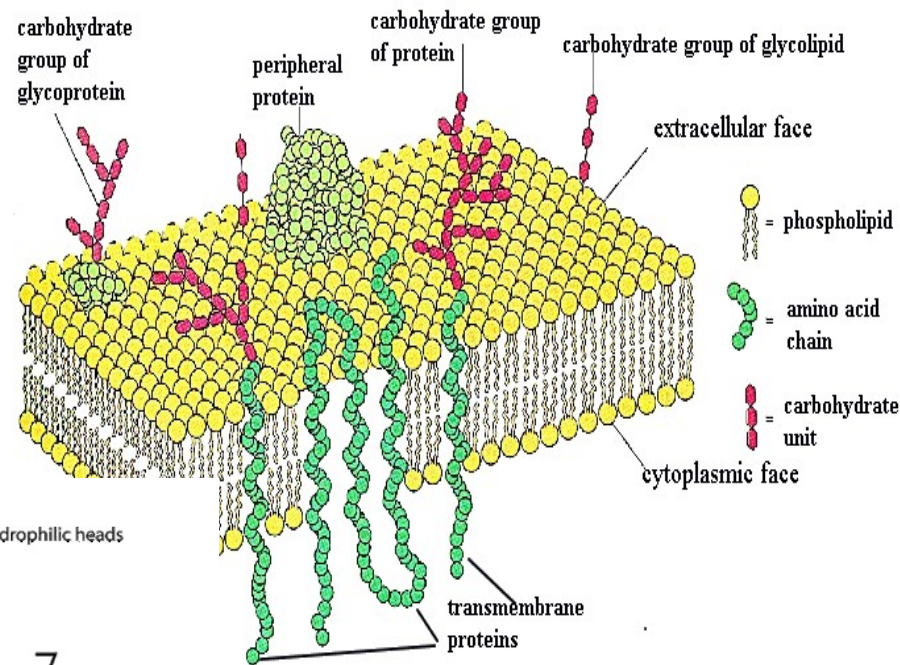
# Povrchové bariéry mikroorganismů

- důležité proto, že mikrobiální ekotoxikologie **MUSÍ** uvažovat **přímé interakce buněk s vnějším prostředím**
- povrchové bariéry zabezpečují přísun živin a zároveň chrání obsah buněk
- **buněčná stěna** (ne u všech MO)
- **cytoplazmatická membrána**
- definují také antigenní vlastnosti buněk
- **pozor:** zatímco u prokaryot (není kompartmentace buňky) toxické látky stačí pouze proniknout přes membránu / stěnu, u eukaryot jsou ještě další bariéry



# Cytoplazmatická membrána

- **biomembrána** - biofilm z fosfolipidů s vnořenými proteiny, obsahuje i membránové receptory a enzymy - **model mozaiky**,
- **není jen bariérou, má i své funkce zejména u prokaryot nahrazuje celou řadu organel eukaryot:**
  - respirační řetězce a četné enz. systémy
  - aparát fotosyntézy, ATP-áza
  - transportní proteiny
  - zakotven bičík
  - syntéza a hydrolýza fosfolipidů
  - poslední krok syntézy buněčné stěny



# Procesy transportu přes membránu

## pasivní transport – difúze

- i skrze buněčnou stěnu
- pohyb molekul dle koncentračního gradientu
- závisí na ploše a tloušťce membrány / buněčné stěny, lipofilicitě a ionizaci toxikantu (lipofilní látky – dobře, kationty – zůstávají často navázány na negativně nabitě fosfolipidy), na molekulové hmotnosti (malé molekuly  $< 0,4$  nm dobře)

## usnadněný transport

- transmembránové proteiny vyvazují extracelulární látky a usnadňují přenos přes membránu

## aktivní transport

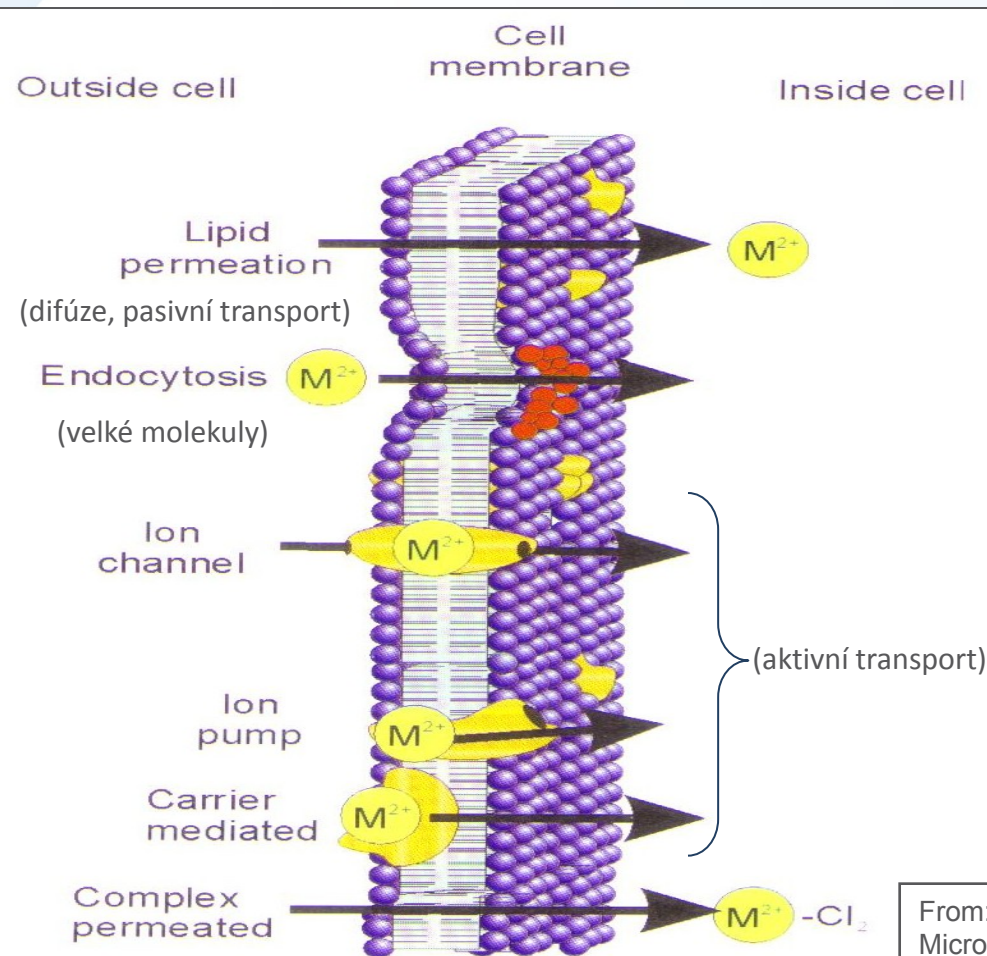
- „pumpy“ po/proti koncentračnímu gradientu (i cíleně VEN z buňky – obrana buňky proti toxickým látkám)
- navázání látky na receptor / přenos přes membránu za spotřeby ATP

## endocytoza

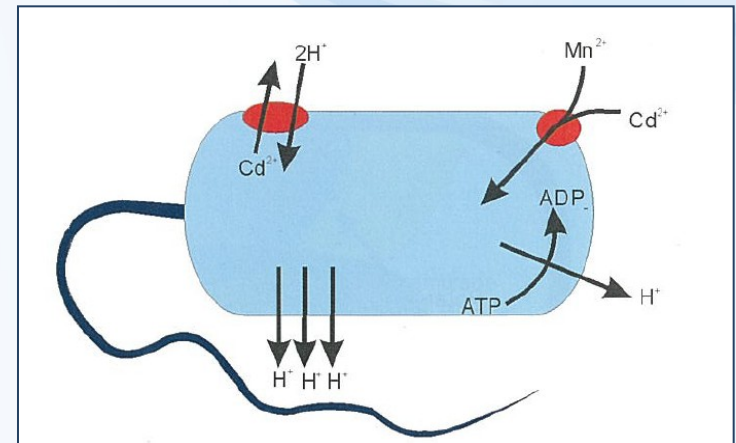
- transport větších molekul pinocytozou

# Vstup kovů do MO

- JE řada mechanismů. Jak mohou kovy vstoupit do MO
- MO mají vyvinuty speciální transportní systémy pro esenciální kovy přes membránu, těmi ale vstupují i toxické kovy



- (např.  $Cd^{2+}$  vstupuje transportním systémem pro  $Mn^{2+}$ , který je založen na membránovém potenciálu – 2-mocný kov za 2  $H^+$ )



From: Maier et al. (2000): Environmental Microbiology, Academic Press

# Organické polutanty a membrána

- Pokud jsou lipofilní, rozpouští se v lipidické dvojvrstvě a prochází velmi dobře
- Ionizovatelné a velké molekuly hůře
- Buněčná membrána je považována za hlavní místo **akumulace organických kontaminantů** u mikroorganismů
- Toxicita organických kontaminantů bez náboje jako jsou ropné uhlovodíky nebo organická rozpouštědla je z velké části způsobena nespecifickým **narkotickým typem účinku**
- Nespecifická toxicita narkotického typu je založena na rozdělení rozpuštěného kontaminantu v lipofilní vrstvě buněčné membrány, což způsobí **narušení integrity (celistvosti) membrány**
- Jedním z následků vystavení membrány kontaminantu je zvýšení její propustnosti (a tím i usnadnění přenosu dalších kontaminantů)

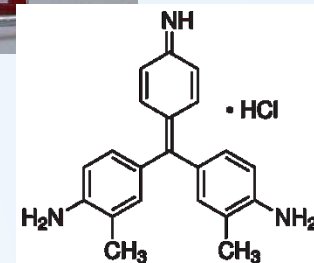
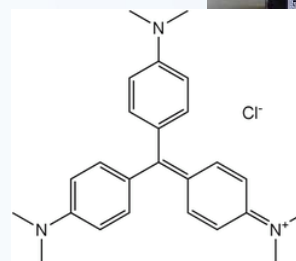
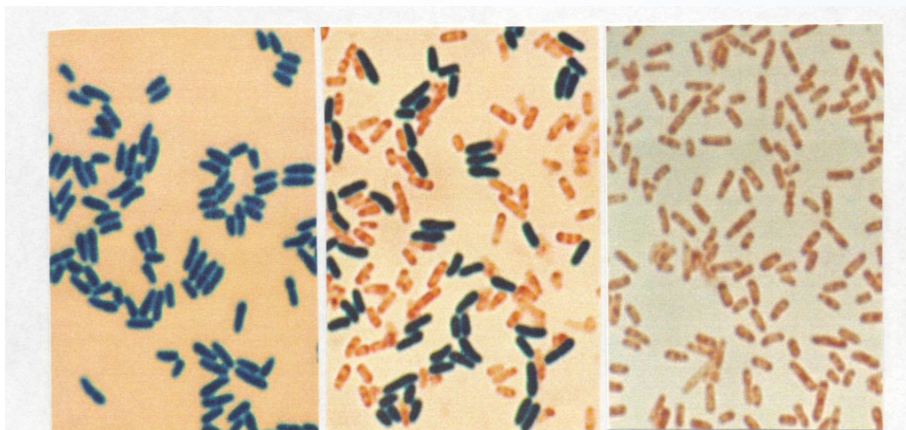




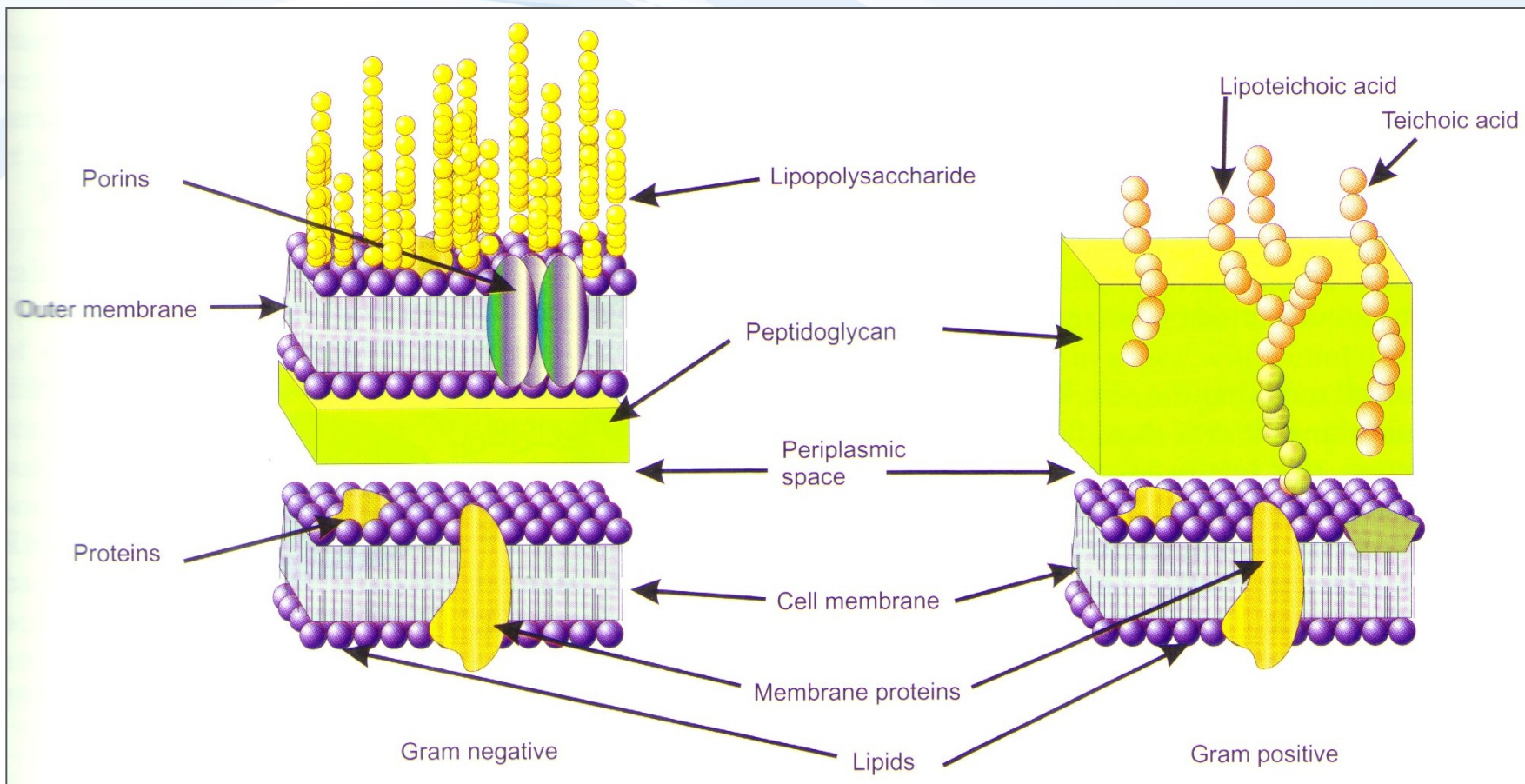
# Buněčná stěna

- není propustná pro makromolekuly
- mezi membránou a stěnou je tzv. periplazmový prostor, kde probíhají některé enzymatické aktivity
- z pohledu přestupu kontaminantů je důležitá zejména u prokaryot
- rozdělení na gram-pozitivní a gram-negativní
- G<sup>+</sup> - barvivo setrvává v tlusté vrstvě peptidoglykanů

## Gramovo barvení ...



# Buněčná stěna



- G- stěna je tenčí a méně hmotná
- lipopolysacharidy určují antigenní specifitu

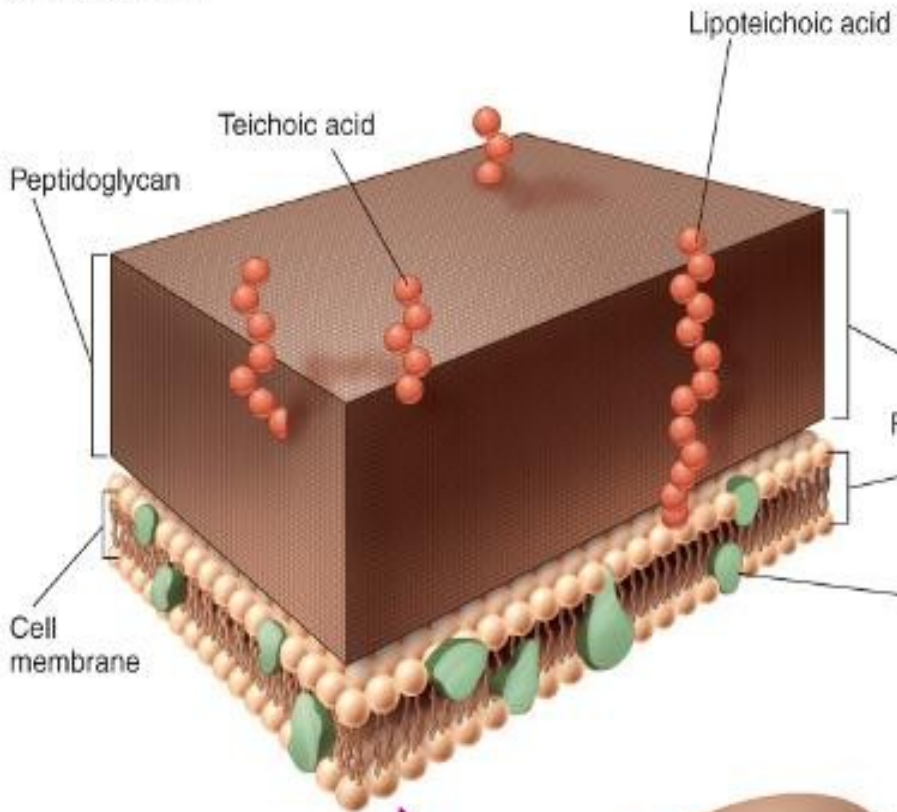
- síťovina polymerů je pevnější než u G-
- mnoho vrstev zesíťovaného peptidoglykanu
- teichoové kyseliny váží dvojmocné kationty
- buněčná stěna neobsahuje lipidy



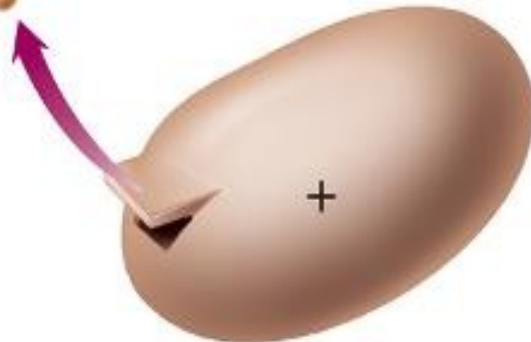
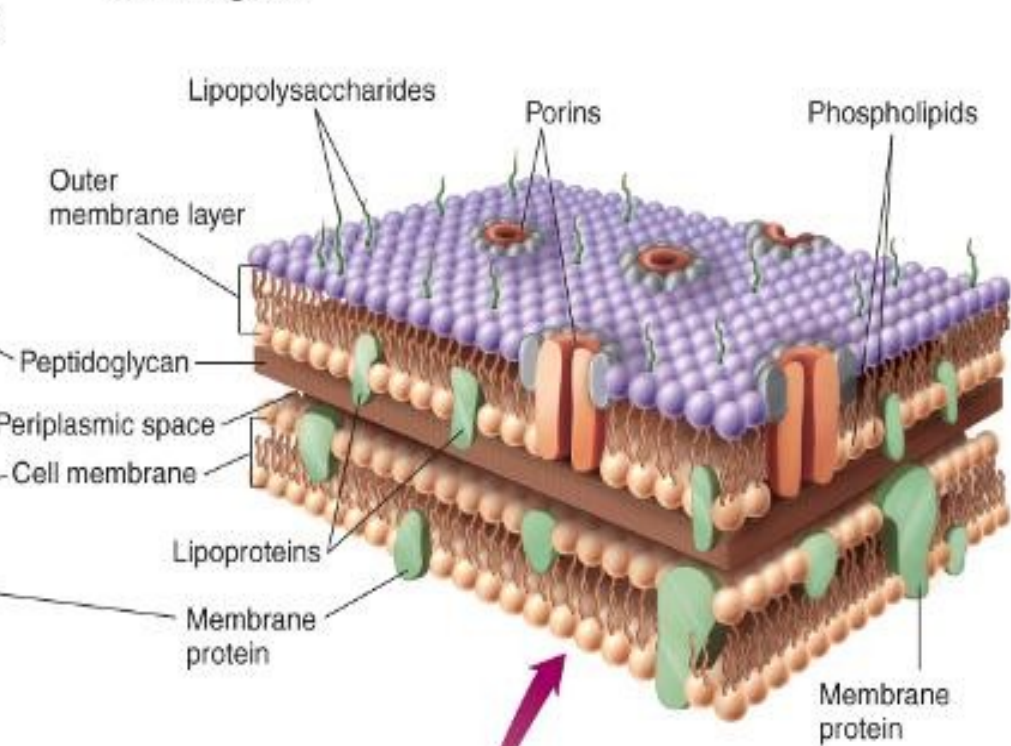
# Buněčná stěna

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Gram-Positive



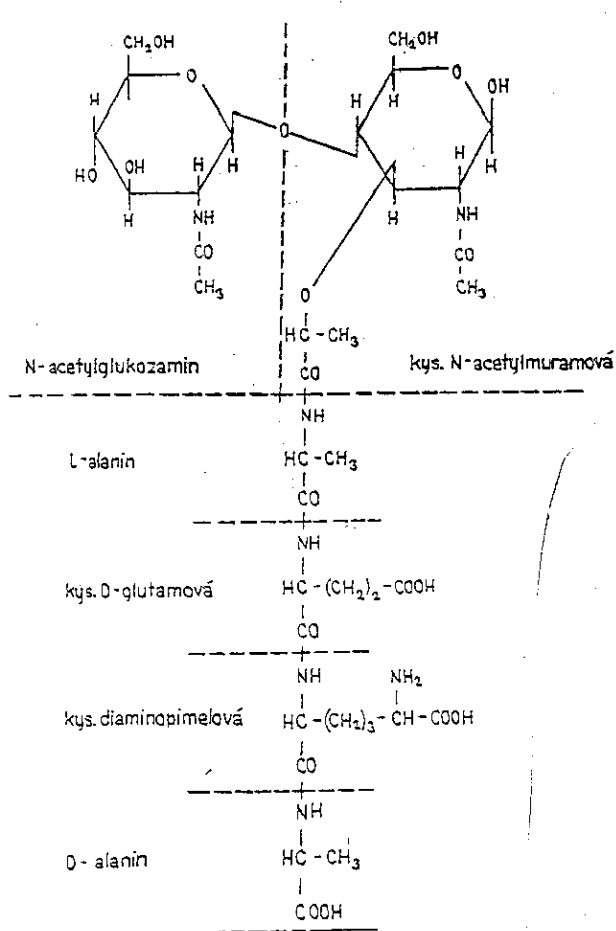
Gram-Negative



# Peptidoglykan

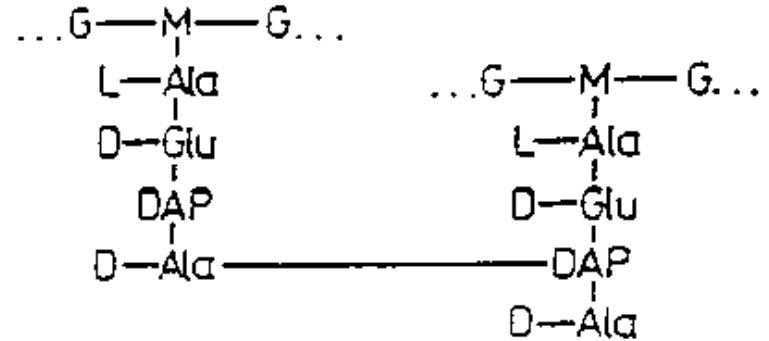
Peptidoglykan (mukopeptid, murein)

- látka specifická pro *Prokaryota*
- lineární polymer střídající A-acetylglukozamin a jeho 3-O-laktylderivát N-acetylmuramovou kyselinu (vzájemně spojeny  $\beta$ -1,4 vazbami)
- dále obsahuje navázaný 4 aminokyseliny, z nichž D-alanin a L,L - diaminopimelová kyselina (DAP) jsou velmi specifické pro tuto sloučeninu

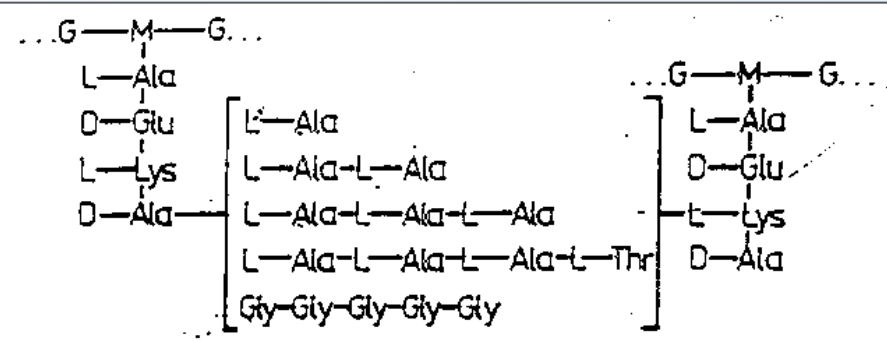


Základní složka peptidoglykanu.

## Zesíťování G-



## Zesíťování G+



# Gram negativní BCT

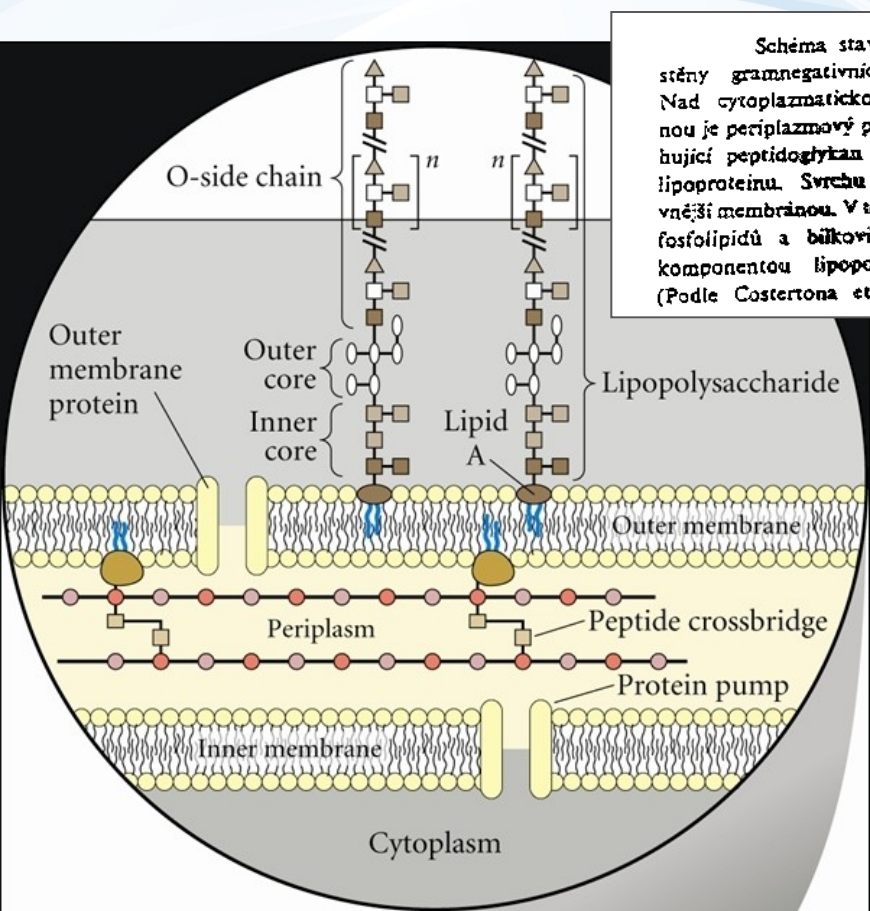
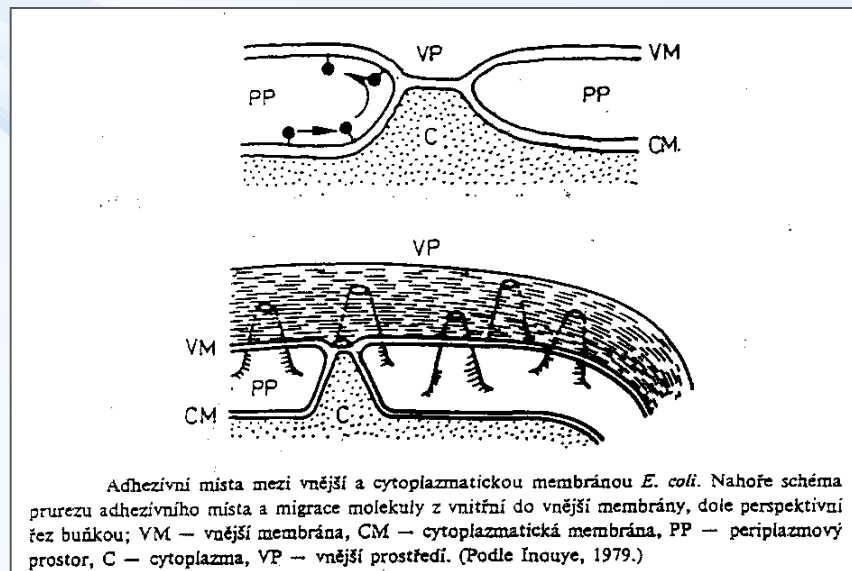


Schéma stavby buněčné stěny gramnegativních bakterií. Nad cytoplazmatickou membránou je periplazmový prostor obsahující peptidoglykan a molekuly lipoproteinu. Svrchu je uzavřena vnější membránou. V té jsou kromě fosfolipidů a bílkovin výraznou složkou lipopolysacharidy. (Podle Costerton et al., 1974.)



Adhezivní místa mezi vnější a cytoplazmatickou membránou *E. coli*. Nahoře schéma průřezu adhezivního místa a migrace molekuly z vnitřní do vnější membrány, dole perspektivní řez buňkou; VM – vnější membrána, CM – cytoplazmatická membrána, PP – periplazmový prostor, C – cytoplazma, VP – vnější prostředí. (Podle Inouye, 1979.)

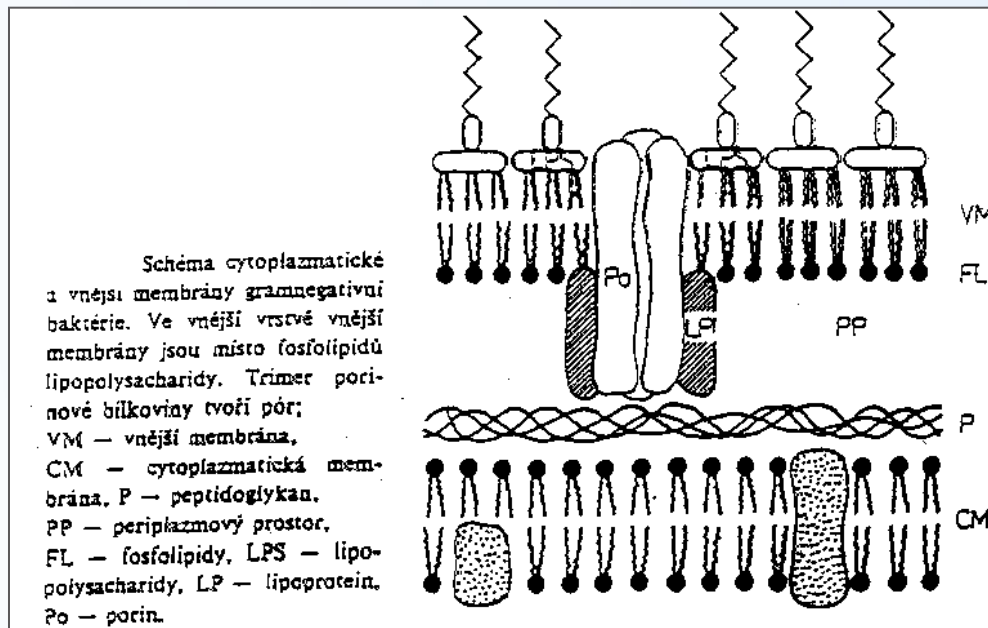
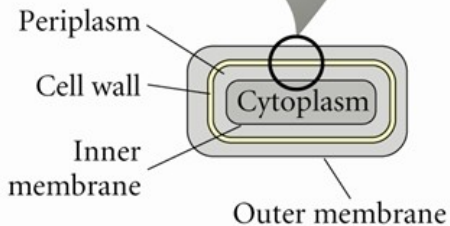
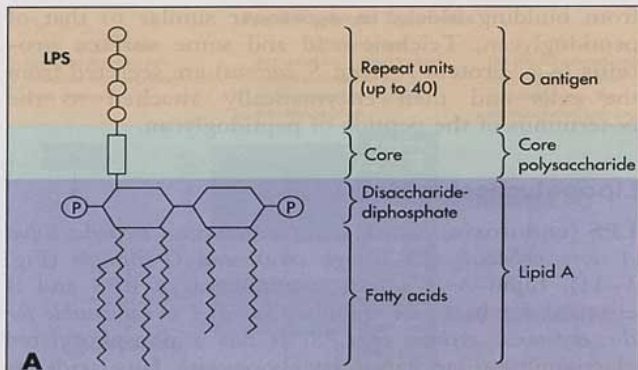


Schéma cytoplazmatické a vnější membrány gramnegativní bakterie. Ve vnější vrstvě vnější membrány jsou místo fosfolipidů lipopolysacharidy. Trimer porinové bílkoviny tvoří pór; VM – vnější membrána, CM – cytoplazmatická membrána, P – peptidoglykan, PP – periplazmový prostor, FL – fosfolipidy, LPS – lipopolysacharidy, LP – lipoprotein, Po – porin.



- N-Acetylmuramic acid
- N-Acetylglucosamine
- Lipoprotein

# Lipopolysaccharide (LPS)



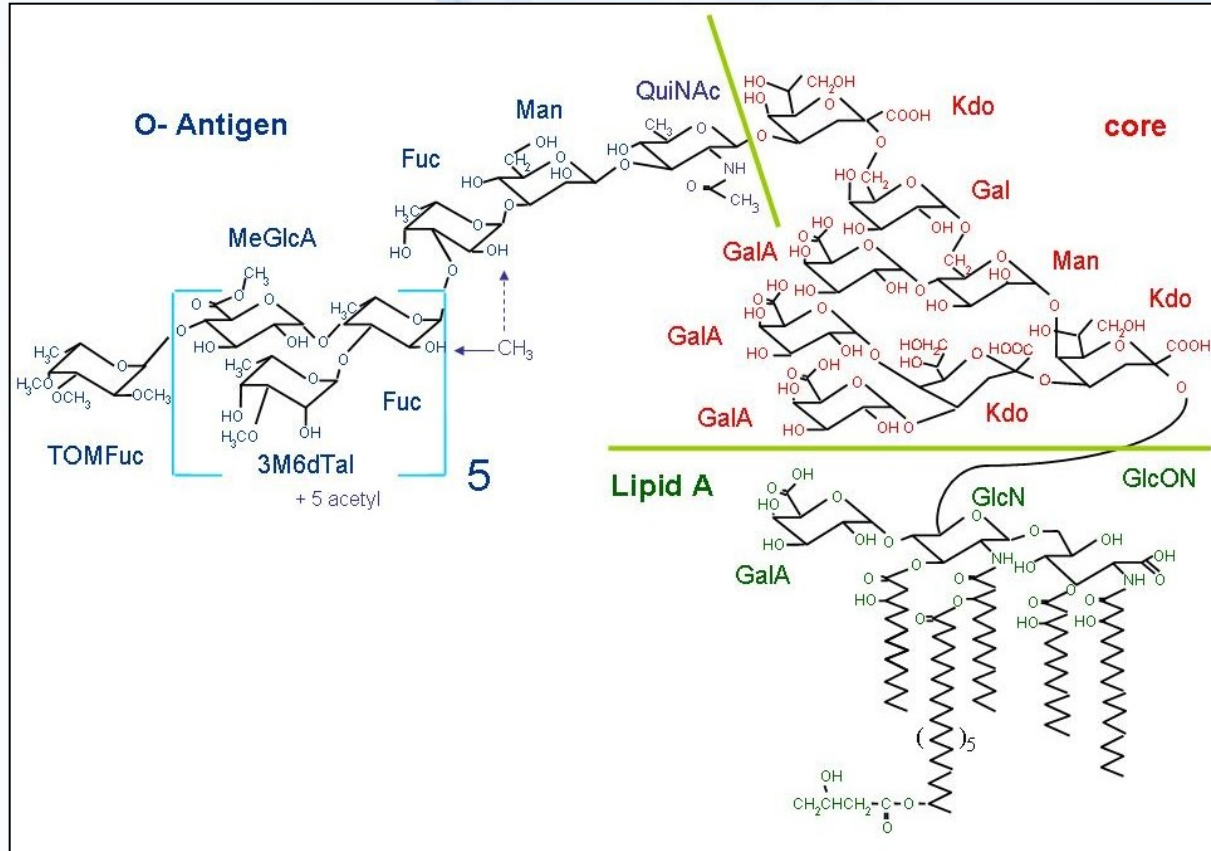
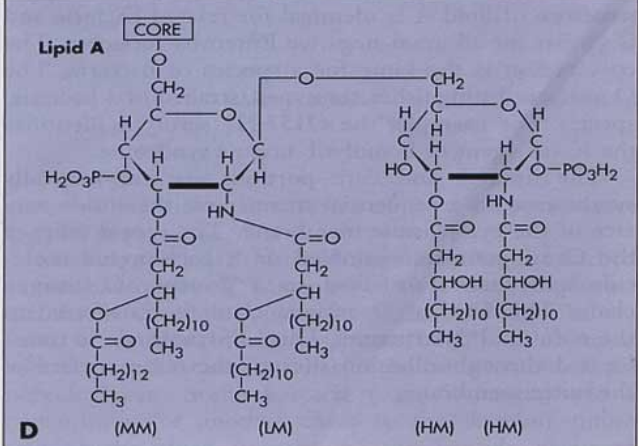
**B**

Repeat unit: O antigen  
Example: (repeated up to 40 times)

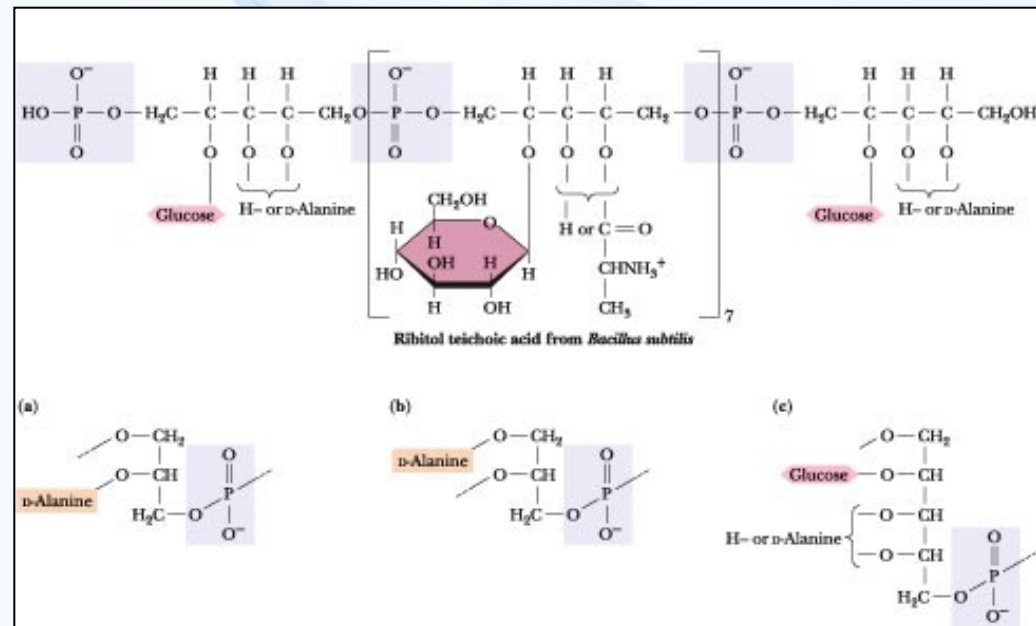
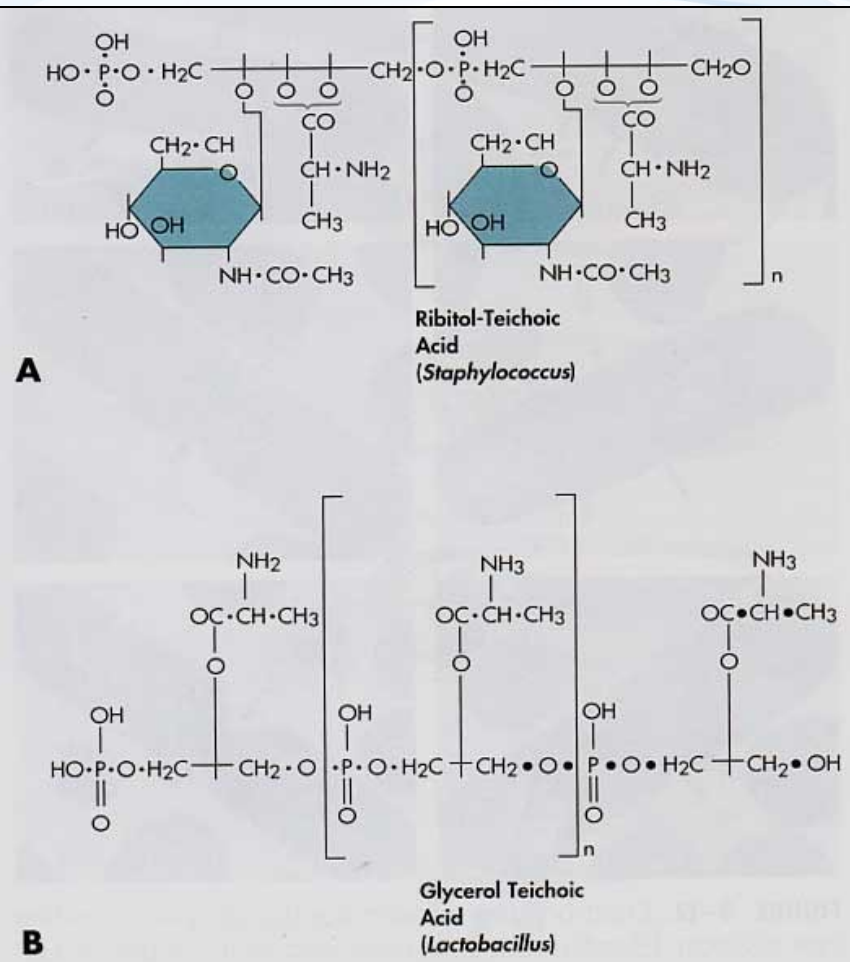
Mannose-Abequose  
Rhamnose  
Galactose

**C**

Core	<ul style="list-style-type: none"> <li>Glu-GlcNAc</li> <li>Gal</li> <li>Glu-Gal</li> <li>Hep</li> <li>Hep-P-P-Eth-N</li> <li>KDO</li> <li>KDO-KDO-P-Eth-N</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>KDO = Keto-deoxy-octanoate</li> <li>Hep = L-Glycero-D-mannoheptose</li> <li>HM = Beta-Hydroxymyristic acid (C<sub>14</sub>)</li> <li>LM = Lauroxymyristic acid</li> <li>MM = Myristoxymyristic acid</li> <li>Eth-N = Ethanolamine</li> <li>Glu = Glucose</li> <li>GlcNAc = N-Acetylglucosamine</li> <li>Gal = Galactose</li> <li>P = Phosphate</li> </ul>
------	--	--

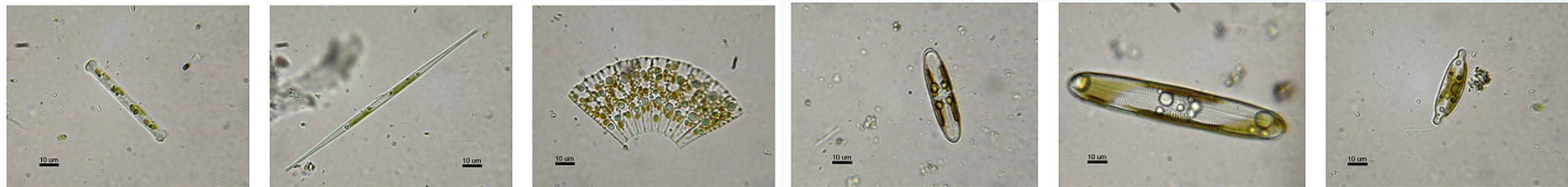
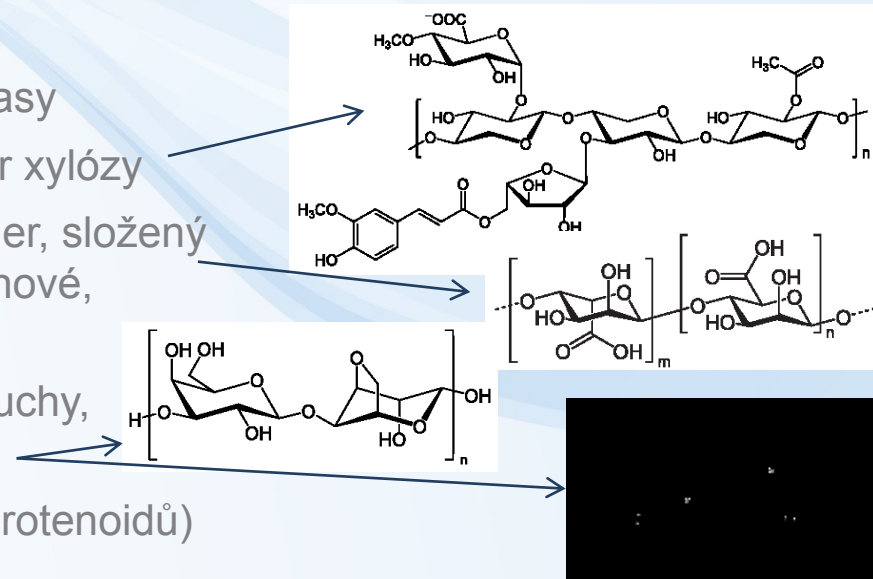


# Teichoové kyseliny



# Buněčná stěna řas

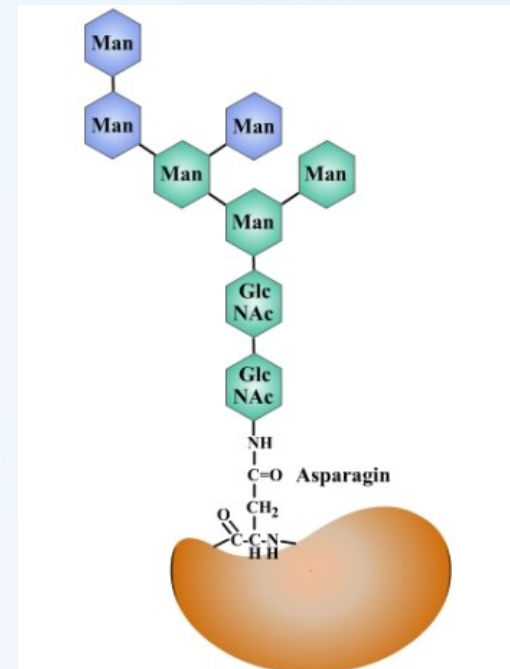
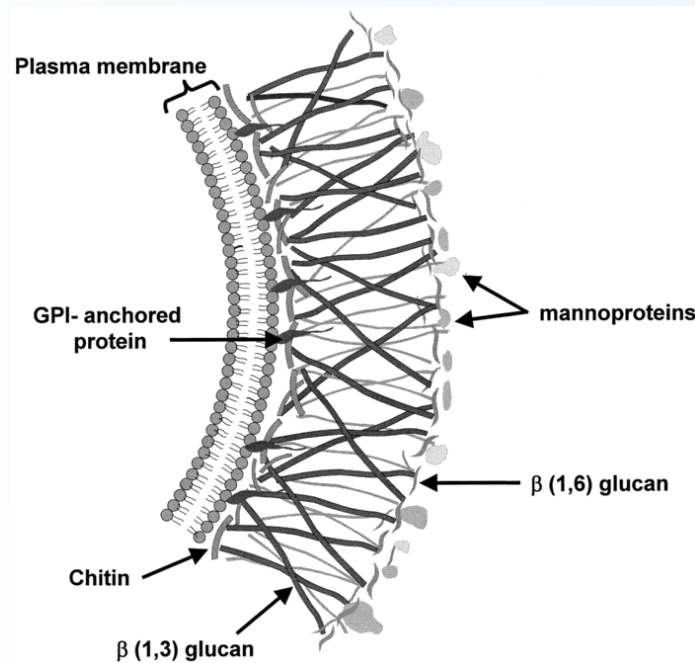
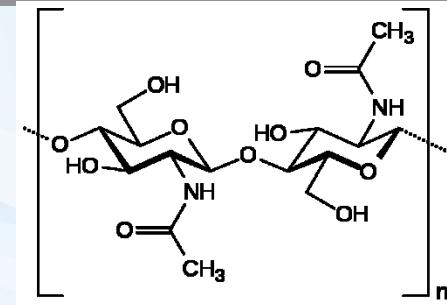
- Skládá se z polysacharidů (např. celulóza) a/nebo řady glykoproteinů:
  - celulóza
  - manany (polymer monózy) – mořské zelené řasy
  - xylany – zelené řasy, vysoce síťovaný polymer xylózy
  - alginová kyselina – hnědé řasy, lineární polymer, složený z jednotek kyseliny D-manuronové a L-gulonové, vázaných převážně glykosidickou vazbou
  - sulfonované polysacharidy – velice časté, ruduchy, např. agaróza, carrageenan, porphyran ...
  - sporopollenin (složitý polymer z FA, fenolů, karotenoidů)
  - ionty Ca
- Rozsivky syntéza b. stěny z  $H_4SiO_4$ , uvnitř buňky polymerizace a transport na povrch (menší spotřeba E než org. polymery, vysoké růstové rychlosti rozsivek)





# Buněčná stěna hub

- **Chitin** + další polysacharidy (nemají celulózu)
- Nad plasmatickou membránou jsou tři vrstvy:
  - Chitin – polymer N-acetyl-D-glucosaminu
  - $\beta$ -1,3-glucan (zymosan) – polymer D-glukózy
  - glykoproteiny obsahující manózu, které jsou směrem ven z buňky spojeny s velkým množstvím polysacharidových řetězků



**Interakce toxikantů s  
mikrobiálními buňkami, obrana  
MO proti toxikantům, toxicita,  
biodegradace polutantů**

# Jsou velké rozdíly dle typu toxikantu

## Jedy nespecifické:

- nespecificky narušují struktury buňky
- např. kyseliny a zásady, soli těžkých kovů (sráží bílkoviny cytoplazmy), halogeny, alkoholy, aldehydy
- nepolární narkotická toxicita – interakce nepolárních látek s plamatickou membránou – snížení její fluidity (bazální toxicita)

## Jedy specifické:

- enzymové jedy – inhibice enzymů
- interakce se specifickými receptory
- interakce s DNA/RNA
- narušení redox potenciálu či gradientů na membránách
- kompetice se substráty či přirozenými ligandy
- mitotické jedy - u eukaryot blokují průběh mitózy
- cytostatika - zastavují buněčné dělení
- mutageny – u MO spíše zlepšují vývoj resistance
- kancerogeny - nemá smysl je takto brát u mikroorganismů!
- antibiotika - blokují některé syntézy



# Interakce polutantů s MO

1. **nepolární narkóza** (bazální toxicita, membránová toxicita) – projeví se až spíše ve vyšších koncentracích a koreluje s  $K_{ow}$
2. **polární narkóza** - pokud je organický polutant polárnější (= tedy i reaktivnější) může působit na membránové proteiny, efekty při nižších koncentracích než by odpovídalo  $K_{ow}$

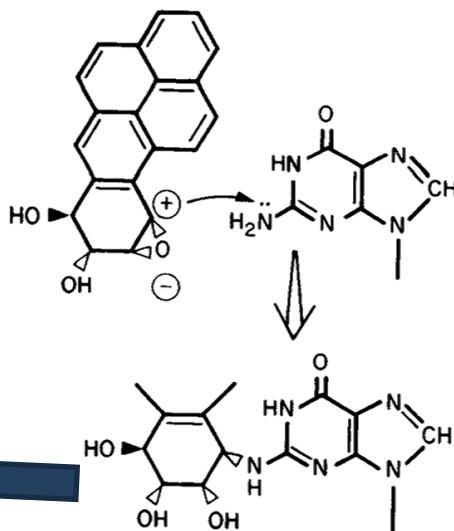
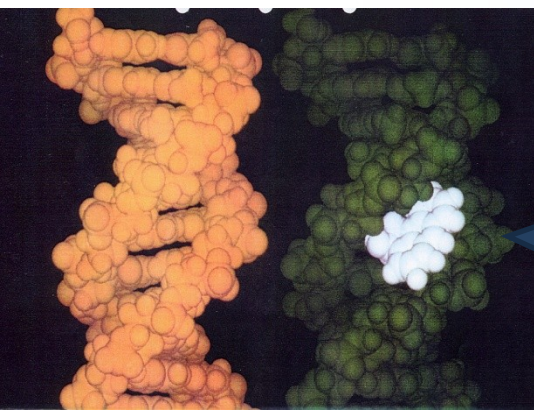
**POZN.:** u prokaryot je v membráně situována celá řada klíčových funkcí (respirační řetězce, aparát fotosyntézy, tvorba ATP, transportní proteiny, biosyntézy ...) → dopad polutantů na membránu ovlivňuje i tyto funkce



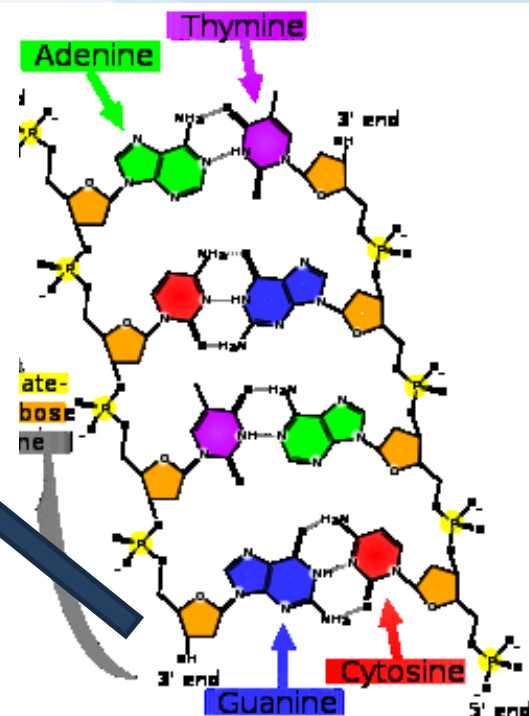
# Interakce polutantů s MO

## 3. napadání makromolekul

- reaktivní toxicita: nižší koncentrace než pro narkózu
- toxicita elektrofilních skupin (org. kontaminanty po oxidaci/metabolizaci – epoxidy, chinony apod. či heterocyklické – PANHs, nitroPAHs atd.) - útočí na e- bohatá místa makromolekul (nukleotidy, SH-, NH<sub>2</sub>- v proteinech, fosfolipidech a NA)
- nebo začlenění hydrofóbní interakcí do biomolekuly (planární molekuly)



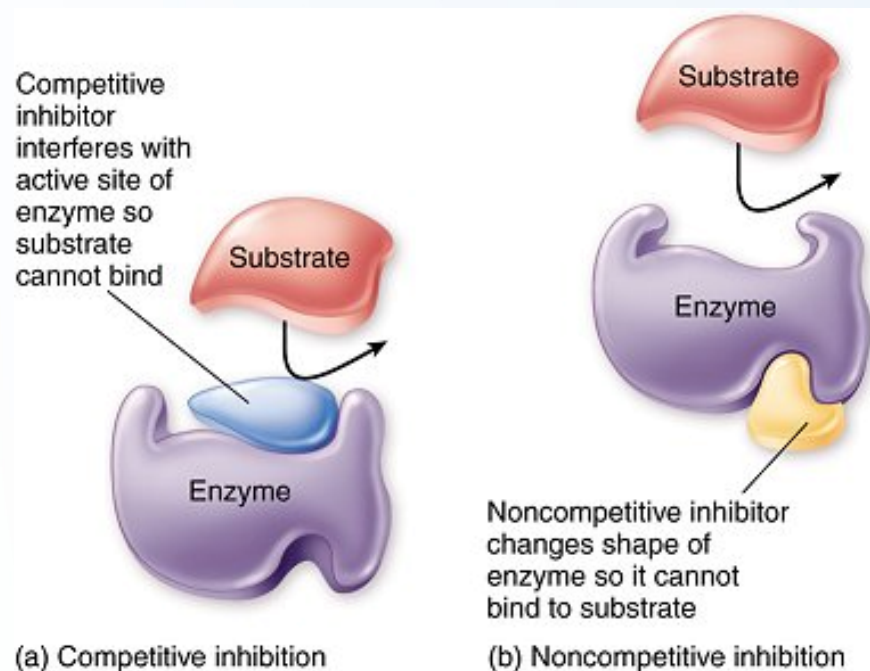
Scheme 5.5. Interaction of 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide of benzo[a]pyrene with the amino group of guanine.



# Interakce polutantů s MO

## 4. specifické typy toxicity

- inhibice konkrétních enzymů
- kompetitivní či nekompetitivní typ interakce vedoucí k narušení vazby substrátu a funkce enzymu
- např. inhibice enzymů respiračního řetězce
- reakce s membránovými či nukleárními receptory



# Základní skupiny polutantů potenciálně toxických pro MO

Chlorované uhlovodíky, organochlorové látky	DDT, PCB, PCDD/Fs
Polychlorované bifenyly (PCB)	PCB153
Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	Benzo[a]pyren
Polychlorované dibenzo-p-dioxiny („dioxiny“) a –furany	2,3,7,8-TCDD
Těžké kovy, toxické kovy	Hg, Pb, Cd (+ další)
Organokovové látky	Alkyl-cíny
Organofosfáty	Látky (insekticidy) – např. parathion

Pesticidy	Toxické pro nežádoucí organismy („pests“)	DDT, parathion, glyfosát (round-up), atrazin
Insekticidy	Toxické pro hmyz/členovce	DDT, parathion
Herbicidy	Toxické pro rostliny	2,4-D, glyfosát, atrazin
Fungicidy	Toxické pro houby/plísně	Pesticidy s toxickými kovy (Hg, Cu)

Lipofilní (hydrofobní)	Rozpustné v tucích / málo rozpustné ve vodě	DDT
Hydrofilní	Rozpustné ve vodě	Fenol, moderní insekticidy
Neutrální organické látky	Látky bez náboje (neionizují se)	DDT, PCB
Surfaktanty, detergenty	Látky snižující povrchové napětí na rozhraní dvou fází	Nonylfenol, alkylbenzen sulfonáty
Persistentní látky	Velmi dlouhý život v prostředí (nedegradují se)	DDT, PCB



# Jsou velké rozdíly dle typu toxikantu

- **Kovy** – nemohou být degradovány biologicky ani chemicky, pouze změněna jejich mobilita, forma či mohou být odstraněny (ve smyslu přemístěny) do jiného prostředí, z toho vyplývá několik závěrů:
  - Nejvíce riziková je většinou forma tzv. volného iontu
  - Celková koncentrace je irelevantní z pohledu rizika
  - Závislost na redox, pH, obsah dalších látek apod.
  - MO dokáží sorbovat kovy a měnit jejich formu – využití při remediacích
- **Organické kontaminanty** – mikroorganismy řadu z nich dokáží transformovat, toho se využívá při biodegradacích

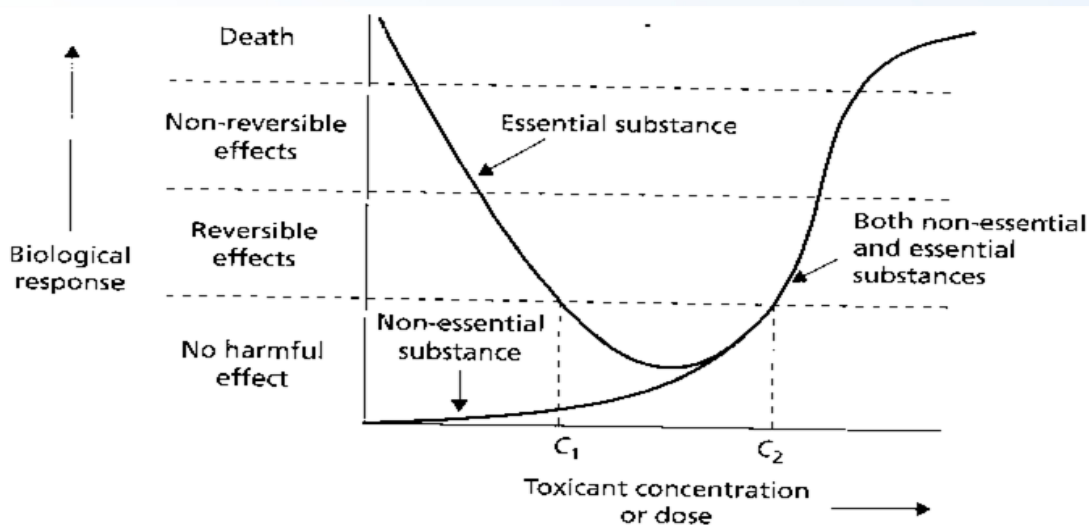




# Kovy a MO

# Interakce kovů a MO buněk

- definice: kovy vs těžké kovy vs toxické kovy vs metaloidy
- znáte hlavní zdroje kovů v prostředí?
- nejčastěji v hledáčku jsou: As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb a Zn
- **Na, K, Mg, Ca, (Cr), V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo a W** – mají v mikrobiálních buňkách nějakou roli
- ve stopových množstvích jsou **nezbytné (= esenciální)** pro mikrobiální růst a metabolismus, ale ve vyšších koncentracích mohou mít na mikroorganismy inhibiční účinek a ve vysokých koncentracích se mohou stát **toxickými**
- **toxické kovy ( $\neq$  ne-esenciální)** = nemají žádnou známou biologickou funkci - Ag, Cd, Sn, Au, Hg, Tl, Pb, Al, Be, Li a polokovy Ge, As, Sb, Se



# Esenciální kovy v MO

**Table 7.2**

Overview of the approximate elemental composition of microbial cells and the physiological function of each element (from MADIGAN, M. and J. MARTINKO. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edn, table 5.2, p. 105. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. Reprinted by permission of Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ. With contributions from Stanier et al., 1986; Hughes and Pool, 1989; Neidhardt et al., 1990; Wackett et al., 2004; Schaechter et al., 2006)

Element	% dry weight	Examples of cellular function
<b>Macronutrients</b>		
Carbon (C)	50	Building blocks of all macromolecules, carbohydrates, organic acids, proteins, lipids, cell walls, cell membranes, etc.
Hydrogen (H)	8	
Oxygen (O)	20	
Nitrogen (N)	14	Proteins, nucleic acids
Phosphorus (P)	3	Nucleic acids, phospholipids, ATP
Sulfur (S)	1	Amino acids (cysteine, methionine), vitamins, coenzyme A
Potassium (K)	1	Osmotic control, enzyme cofactor, ion balance
Magnesium (Mg)	0.5	Stabilization of macromolecular structure (ribosomes, membranes, nucleic acids), enzyme cofactor
Calcium (Ca)	0.75	Cell wall stability, enzyme cofactor
Sodium (Na)	1	Osmotic control, nutrient transport
<b>Micronutrients*</b>		
Iron (Fe)	0.2	Cytochromes, catalases, peroxidases, iron-sulfur proteins, oxygenases, all nitrogenases
Boron (B)	<0.01	Present in autoinducers for quorum sensing in bacteria; also found in some polyketide antibiotics
Chromium (Cr)	<0.01	Required by mammals for glucose metabolism; no known microbial requirement
Cobalt (Co)	<0.01	Vitamin B <sub>12</sub> transcarboxylase (propionic acid bacteria)
Copper (Cu)	<0.01	Respiration, cytochrome <i>c</i> oxidase; photosynthesis, plastocyanin, some superoxide dismutases
Manganese (Mn)	<0.01	Activator of many enzymes; present in certain superoxide dismutases and in the water-splitting enzyme in oxygenic phototrophs (photosystem II)
Molybdenum (Mo)	<0.01	Certain flavin-containing enzymes, some nitrogenases, nitrate reductases, sulfite oxidases, DMSO-TMAO reductases, some formate dehydrogenases
Nickel (Ni)	<0.01	Most hydrogenases, coenzyme F <sub>430</sub> of methanogens, carbon monoxide dehydrogenases, urease
Selenium (Se)	<0.01	Formate dehydrogenase, some hydrogenases, amino acid selenocysteine
Tungsten (W)	<0.01	Some formate dehydrogenases, oxotransferases of hyperthermophiles
Vanadium (V)	<0.01	Vanadium nitrogenase, bromoperoxidase
Zinc (Zn)	<0.01	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, RNA and DNA polymerases, many DNA-binding proteins

DMSO, dimethylsulfoxide; TMAO, trimethylamine oxide.

\* Not every micronutrient listed is required by all cells; some metals listed are found in enzymes present in only specific microorganisms.



# Interakce kovů a MO buněk

- toxicita kovů pro MO využívána od pradávna:

## Ag

- aplikace jako  $\text{AgNO}_3$  ve formě organických nebo anorganických solí
- 1884 – prevence oftalmie u novorozenců ( $\text{AgNO}_3$ )
- Ag ionty velmi reaktivní s bílkoviny a chloridy → omezení jejich použití jako povrchového antiseptika
- koloidně rozpustné sloučeniny stříbra
- dezinfekce vodypůsobí i v případech rezistence k ATB

## Cu

- protihnilobný účinek mědi znám již starým Peršanům (uchovávání pitné vody v měděných nádobách)
- bakteriostatický, bakteriocidní a silný fungicidní účinek
- aplikace jako anorganické nebo organické sloučeniny
- konzervace textilií a celulózových vláken – měďnaté soli kyseliny stearové nebo naftenové, bis(8-hydroxychinolinato)měďnatý komplex
- ochrana rostlin –chloridtrihydroxyd diměďnatý
- ochrana dřeva



# Interakce kovů a MO buněk

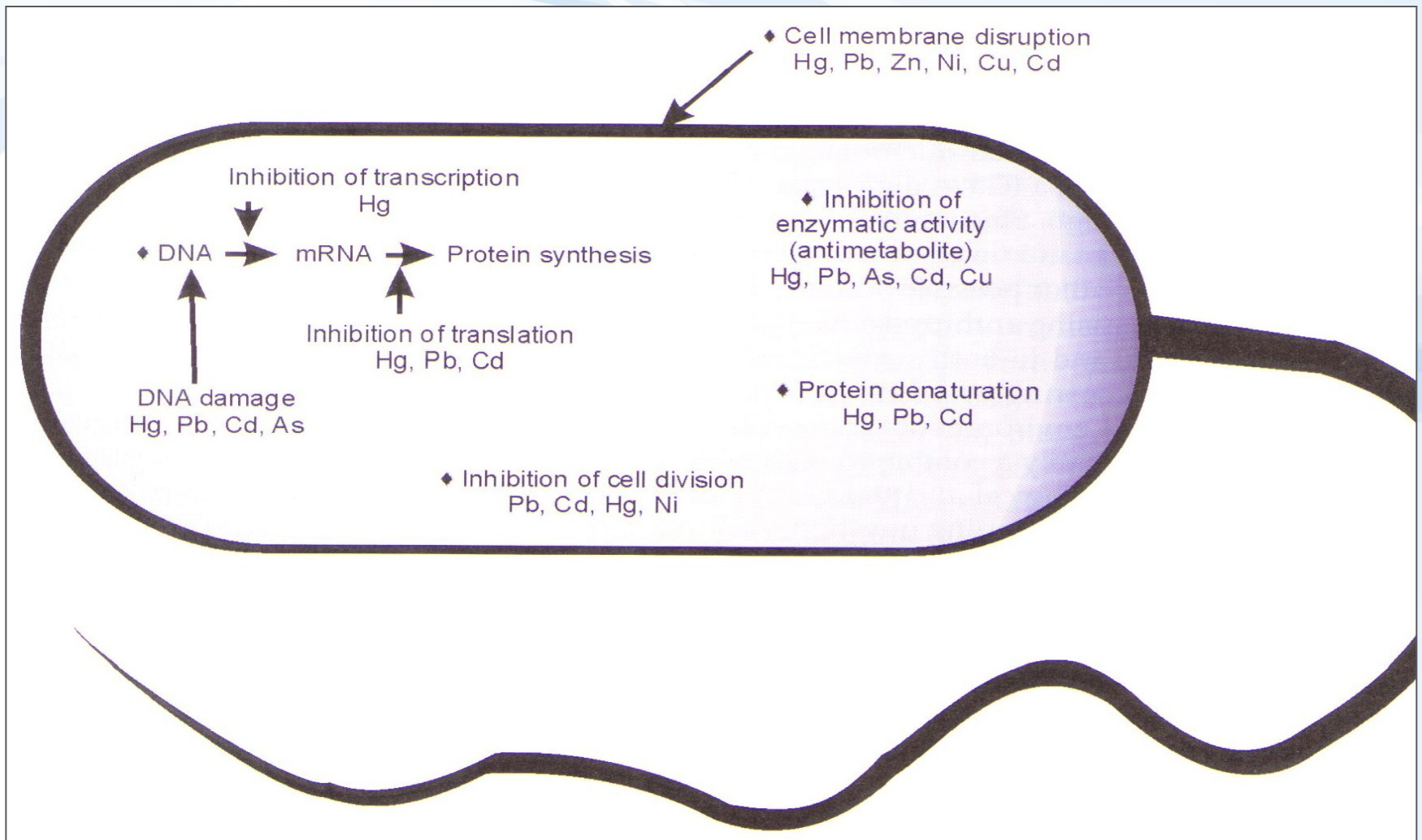
- **Působí několika způsoby:**

- nahrazení esenciálních kovů z jejich normálních vazebných míst v biologických molekulách (např. As → P, Cd → Zn)
- narušení proteinů vazbou na SH skupiny
- inhibice enzymatických funkcí
- narušení nukleových kyselin vazbou na fosfátové nebo hydroxylové skupiny (např. Cd nahradí Zn → jednořetězcové zlomy)
- narušení struktury nukleových kyselin
- důsledek předchozích je změna konformace proteinů a DNA → narušení jejich funkce
- interakce s biomolekulami Fentonovým mechanismem (ox. stres)
- interakce s oxidativní fosforylací
- propustnost membrány (vanadičnan, rtuť) ....

- **Tyto reakce vedou obecně k inhibici dělení a růstu, morfologickým změnám, inhibici biochemických procesů a metabolismu jednotlivých buněk**

- **Efekty na úrovni jednotlivých buněk se následně projevují na úrovni populace a společenstva**

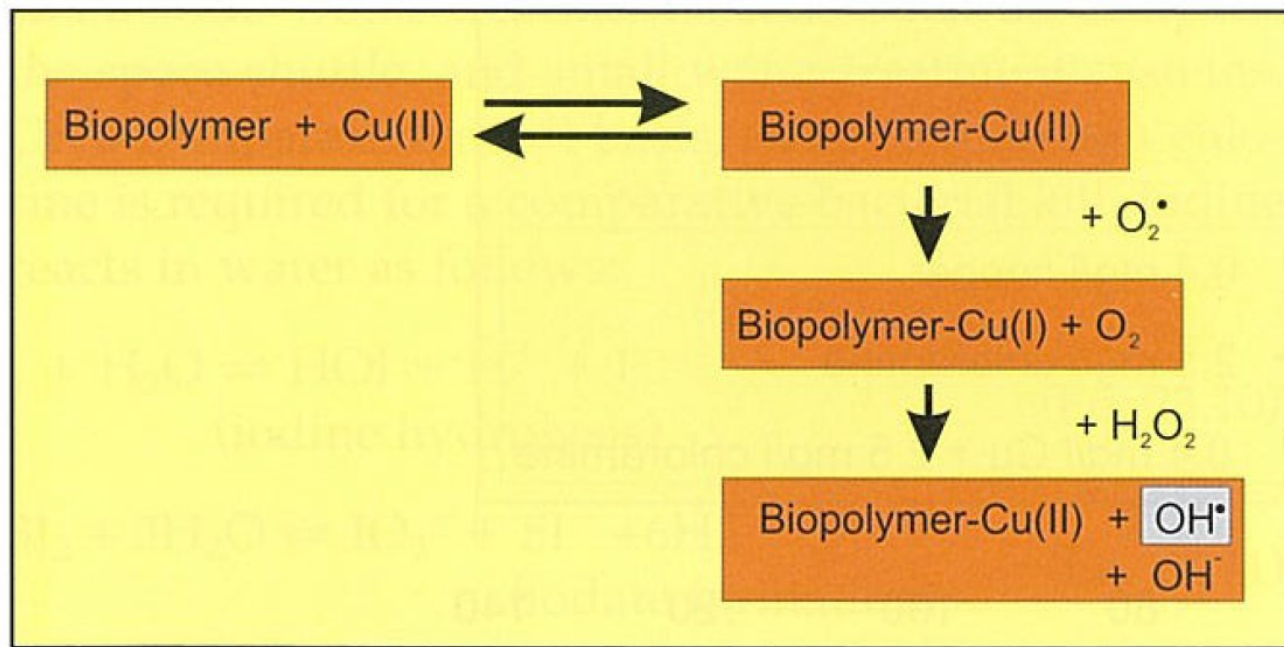
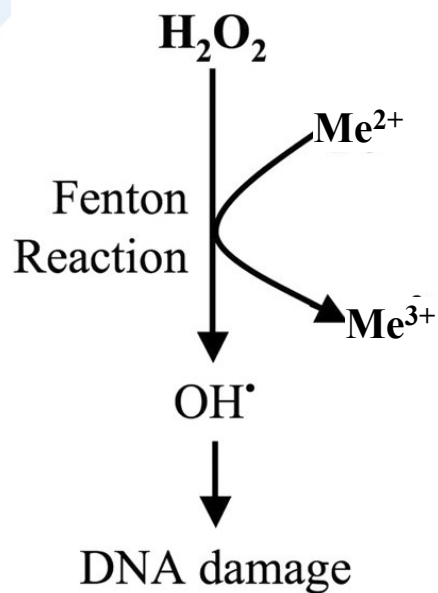
# Interakce kovů a MO buněk



From: Maier et al. (2000): Environmental Microbiology, Academic Press

# Interakce kovů a MO buněk

- interakce s biomolekulami Fentonovým mechanismem (ox. stres)



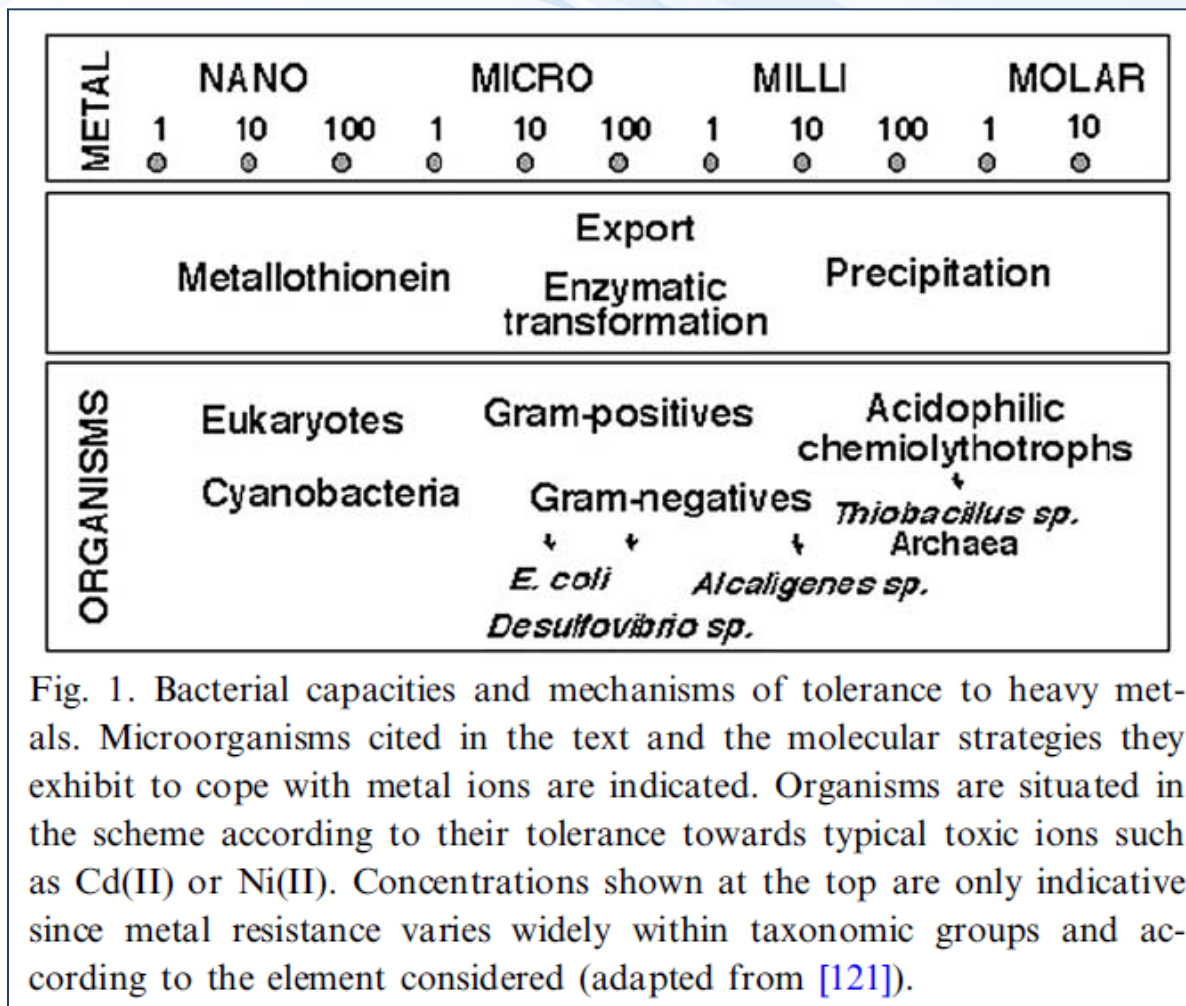
**FIGURE 23.9** Modified site-specific Fenton mechanism. (From Thurman and Gerba, 1989.)

# Obrana a resistance MO proti kovům

- kovy byly v prostředí odjakživa → MO si vyvinuly způsoby, jak naložit s nechtěnými kovy → **resistance a tolerance MO vůči kovům a jejich detoxifikace**
- jiné způsoby tolerance se vyvinuly zcela nedávno v člověkem kontaminovaném prostředí (díky rychlým mutacím MO – až 1 mutace na každých 100 000 bp)
- od sekvestrace a imobilizace kovů po zvýšení rozpustnosti kovů ve extracelulárním prostoru
- některých těchto schopností se využívá při biotechnologiích (těžba rud, **bioremediace ...**)
- někdy lze pozorovat zajímavý efekt, že se toxický efekt s narůstající koncentrací kovu přestane zvyšovat – nastoupí agresivní mechanismy resistance



# Obrana a resistance MO proti kovům



*M. Valls, V. de Lorenzo / FEMS Microbiology Reviews 26 (2002) 327–338*



# Obrana a resistance MO proti kovům

## mechanismy resistance lze rozdělit:

### 1. obecné mechanismy resistance vůči kovům

- a) nepotřebující stress z kontaminace kovy
- b) vznikající ve stresu z kontaminace kovy
  - fungují pro řadu kovů, původně slouží i pro jiné funkce
  - např. vazby na povrchy – biosorpce, produkce hlenu, změny biodostupnosti kovu či redukce kovů mimo buňku

### 2. mechanismy přímo určené pro obranu před toxickými kovy

- aktivace kovem, který se objevil ve vyšší koncentraci
- např. iontové pumpy, produkce methallothioneinů (MT), biometylace
- některé jsou kódovány na plasmidech (R plasmidy) – specifické pro konkrétní kov, aktivace specifickým kovem



# Obrana a resistance MO proti kovům

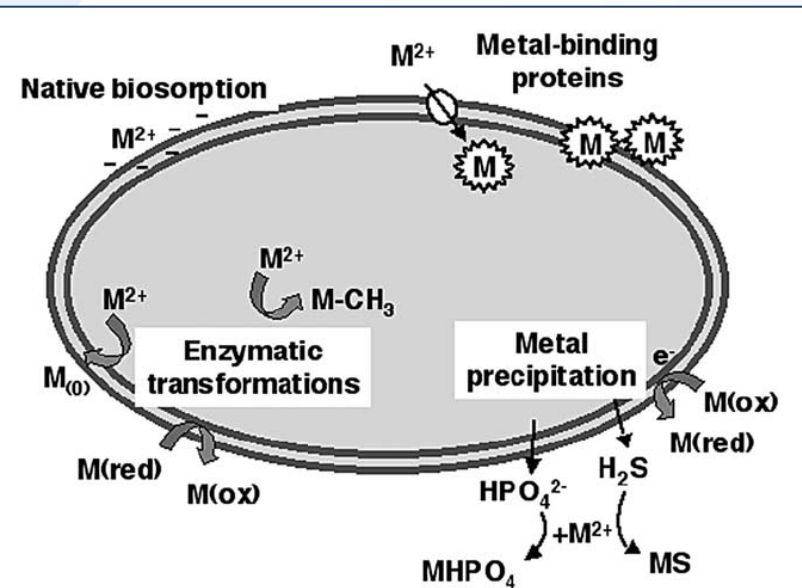


Fig. 2. How bacteria cope with toxic concentrations of heavy ions. The scheme summarises the various means by which bacteria react to the presence of metals ( $M^{2+}$ ) in the medium, with reference to the cellular compartment that harbours the response. These mechanisms include the intra- or extracellular binding (and thus immobilisation) of the metal with a cognate protein (frequently a metallothionein) or a matching anion, the biotransformation of the toxic ion into a less noxious or more volatile form, and the dissimilatory reduction of the metal.

M. Valls, V. de Lorenzo / FEMS Microbiology Reviews 26 (2002) 327–338

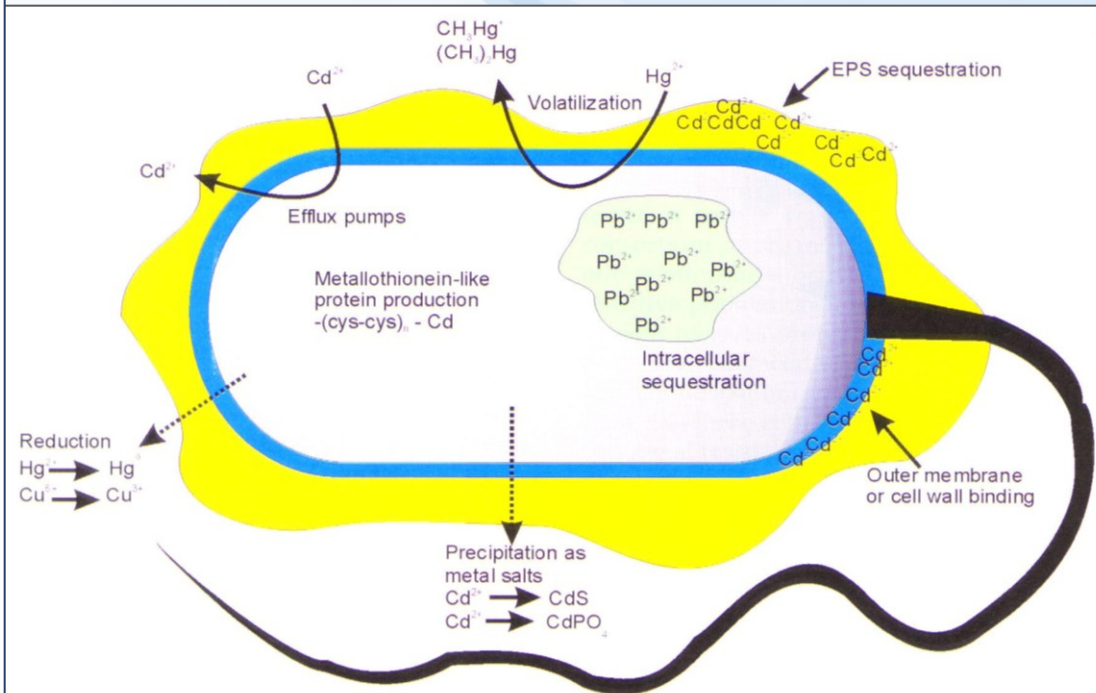


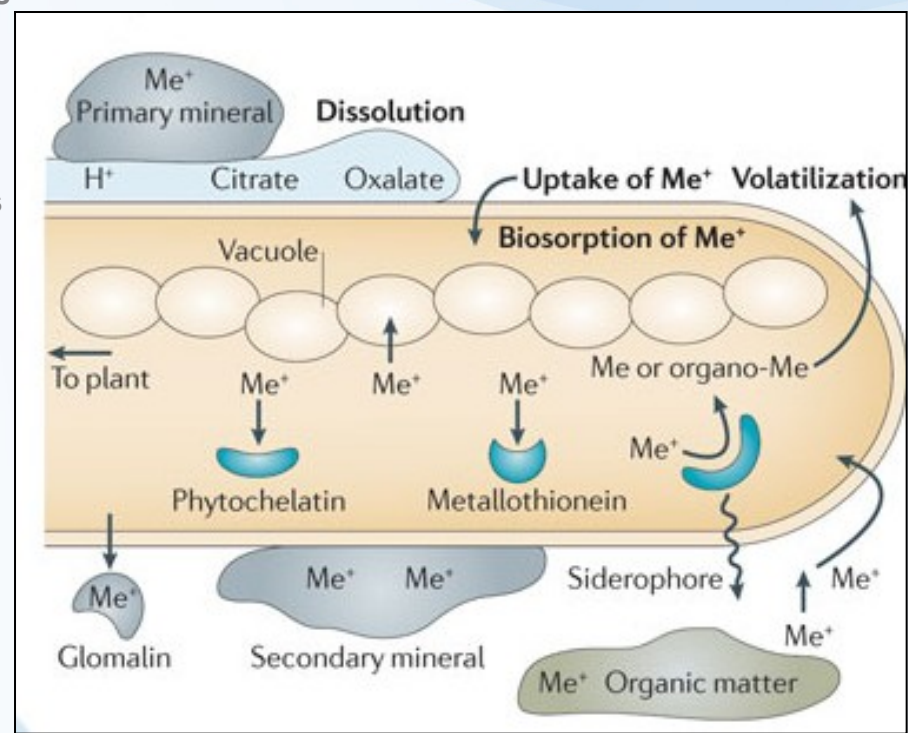
FIGURE 17.5 In response to metal toxicity, many microorganisms have developed unique mechanisms to resist and detoxify harmful metals. These mechanisms of resistance may be intracellular or extracellular and may be specific to a particular metal, or a general mechanism able to interact with a variety of metals.

From: Maier et al. (2000): Environmental Microbiology, Academic Press

# Obrana a resistance MO proti kovům

## Typical interactions of fungi with metals (Me)

- **Metal mobilization** results from the production and **excretion of organic acids** (for example, citrate and oxalate), which **increase metal solubility** through acidification of the mycosphere and provision of metal-complexing structures. This frequently occurs as a side effect of the dissolution of primary minerals containing phosphate, carried out by mycorrhizal fungi.
- **Siderophores** are chelators excreted for the acquisition of iron, and they may cross-react with other metals.
- **Extra-hyphal immobilization** occurs through the formation of secondary minerals, **biosorption to cell wall constituents** such as chitin and chitosan, complexation by **glomalin** (that is, metal-sorbing glycoproteins excreted by arbuscular mycorrhizal fungi) and effects of fungal mycelia and glomalin on soil aggregate stability against wind and water erosion.
- Metal uptake occurs, for example, through specific transporters for the acquisition of essential metals, and these transporters may cross-react with other metals.
- **Intracellular metal immobilization** involves **storage in vacuoles** and **complexation by cytoplasmic metallothioneins** and **phytochelatins** (that is, proteins and peptides, respectively, that are rich in SH groups).
- Metal transformations such as reactions involving **organometals** (for example, **methylations**) and **redox reactions** frequently result in **metal volatilization**.
- Streams of **cytoplasmic vesicles and vacuoles** along fungal hyphae **may translocate metals** to other parts of the mycelium and to the plant symbionts of the fungi.
- MnP, manganese peroxidase.



# Obrana a resistance MO proti kovům

**Table 7.3**

Nine classes of inorganic compounds that are toxic to microorganisms and their corresponding genetic and physiological detoxification mechanisms (from Silver, S. 1998. Genes for all metals – a bacterial view of the periodic table. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **20**:1–12, fig. 2. With kind permission of Springer Science and Business Media)

Class	Element/compound	Mechanism of detoxification or resistance*
1	Hg <sup>2+</sup>	<i>mer.</i> Hg <sup>2+</sup> and organomercurials are enzymatically detoxified via cleavage redox reactions that mobilize the compounds away from the cell (see Table 7.4)
2	AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , SbO <sup>+</sup>	<i>ars.</i> Arsenate is enzymatically reduced to arsenite by ArsC. Arsenate and antimony are “pumped” out by the membrane protein ArsB that functions chemiosmotically alone or with the additional ArsA protein as an ATPase
3	Cd <sup>2+</sup>	<i>cadA.</i> Cd <sup>2+</sup> (and Zn <sup>2+</sup> ) are pumped from Gram-positive bacteria by a P-type ATPase with a phosphoaspartate intermediate
4	Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , and Ni <sup>2+</sup>	<i>czc.</i> Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , and Ni <sup>2+</sup> are pumped from Gram-negative bacteria by a three-polypeptide membrane complex that functions as a divalent cation/2H <sup>+</sup> antiporter. The complex consists of an inner membrane protein (CzcA), an outer membrane protein (CzcC), and a protein associated with both membranes (CzcB)
5	Ag <sup>+</sup>	<i>sil.</i> Ag <sup>+</sup> resistance results from pumping from bacteria by three-polypeptide chemiosmotic exchangers plus a P-type ATPase
6	Cu <sup>2+</sup>	<i>cop.</i> Plasmid Cu <sup>2+</sup> resistance results from a four-polypeptide complex, consisting of an inner membrane protein, an outer membrane protein, and two periplasmic copper-binding proteins. In <i>Pseudomonas</i> , Cop results in periplasmic sequestration of Cu <sup>2+</sup> . In addition, chromosomally encoded P-type ATPases provide partial resistance by effluxing Cu <sup>2+</sup> or Cu <sup>+</sup>
7	CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	<i>chr.</i> Chromate resistance results from a single membrane polypeptide that causes reduced net cellular uptake, but efflux has not been demonstrated
8	TeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	<i>tel.</i> Tellurite resistance results from any of several genetically unrelated plasmid systems. Although reduction to metallic Te <sup>0</sup> frequently occurs, this does not seem to be the primary resistance mechanism
9	Pb <sup>2+</sup>	<i>pum.</i> Lead resistance appears to be due to an efflux ATPase in Gram-negative bacteria and the accumulation of intracellular Pb <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> in Gram-positive bacteria

\* The involved genetic system is italicized (e.g., *mer* are mercury-resistance genes, and *ars* are arsenic-resistance genes). Enzymes encoded by particular genes are shown in nonitalicized letters: for example ArsC is the structural enzyme, arsenate reductase, encoded by the *arsC* gene. Resistance systems await understanding for bismuth (Bi), boron (B), thallium (Tl), and tin (Sn).



# Obrana a resistance MO proti kovům

**Table 1. Specific Metal Resistance Mechanisms Initiating at the Genetic Level and Occurring as a Consequence of Microbial Metabolism**

Toxic Heavy Metals	Mechanism
Hg <sup>2+</sup> /organomercurials	Enzymatic detoxification + transport out of the cell (30)
AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Arsenate is reduced to arsenite, which is pumped out of the cell by an ATPase (31)
Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Zn	Pumped out of cells by an H <sup>+</sup> -antiporter/metal-specific efflux (32–36)
Cd, Hg, Pb, Sn, Se, As	Formation of volatile metal forms (37–44)
Cd, Cu, Ni, Zn, Cu, Mn	Protein-metal chelation (45–50) Carbohydrate-metal chelation (51,52)



# Obrana a resistance MO proti kovům

## Biosorpce

- sorpce kovů zejména na vnější struktury (b. stěnu) MO → zabrání vstupu kovu do buňky a poškození vnitřních struktur ← fyzikálně-chemický mechanismus
- většinou elektrostatické či van der Waalsovy síly:
  - zejména karboxylové skupiny, dále fosforylové skupiny a fosfolipidy v LPS v b. stěně – silná sorpce např.  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$
  - podíl mají i aminové, hydroxylové, thio- skupiny b. stěny
- dále fyzikální adsorpce, iontová výměna a komplexace:
  - iontová výměna za  $\text{H}^+$ , zásadité skupiny, či alkalické kovy přítomné v b. stěně
  - komplexování s 2-mocnými kovy díky  $-\text{COOH}$  skupinám v b. stěně
- biosorpce je velice závislá na environmentálních faktorech:
  - zejména pH (mění se způsob vazby na b. stěnu)
  - speciaci kovů (komplikovaná biosorpce kovů po hydrolýze, snížení biosorpce v přítomnosti aniontů v prostředí či komplexaci s ligandy)
- **ekologický význam** – distribuce kovů v prostředí – zejména v akv. ekosystému
- **praktický význam** - je využívána při remediacích



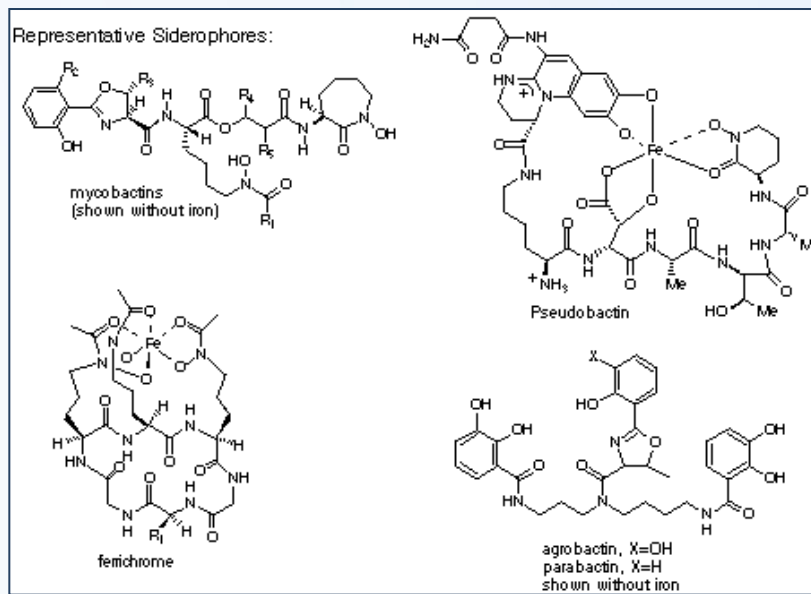
# Obrana a resistance MO proti kovům

## extracelulární sorpce

- do hlenu, do exopolymerů sacharidů, polysacharidů, NA či FA – extracellular polymeric substances – **EPS**
- zejména Pb, Cd, U; většinou mají EPS negativní náboje – váží kationty a závisí na pH
- výsledkem je imobilizace kovu a snížený vstup do MO

## extracelulární komplexace pomocí siderophorů

- Fe-komplexující, nízkomolekulární organická sloučenina
- původní úloha – získání Fe z prostředí
- interakce s Al, Ga, Cr, Cu
- snížení jejich dostupnosti a toxicity



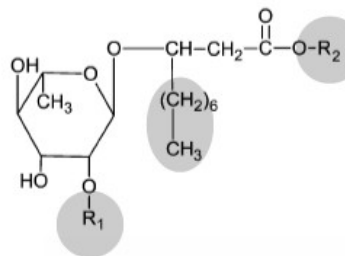


# Obrana a resistance MO proti kovům

## extracelulární změna mobility díky biosurfaktantům

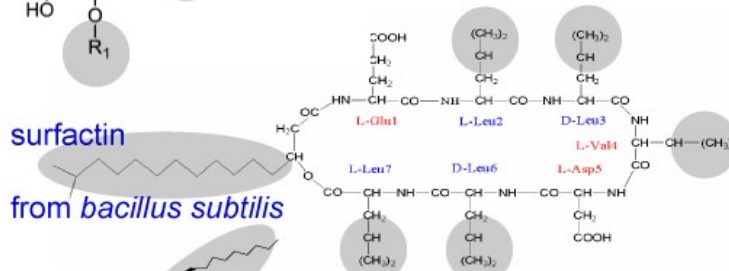
- např. rhamnolipid
- původní funkce zřejmě zvýšení mobility a biodostupnosti látek, které organismy využívají jako substrát, např. ropných látek
- zajímavé je, že MO produkující biosurfaktanty jsou více četné na lokalitách kontaminovaných kovy
- komplexace s Cd, Pb, Zn → zvýšení jejich mobility, ale takový komplex již není toxický pro MO

**Glycolipids**  
rhamnolipids,  
sophorolipids,  
trehalolipids



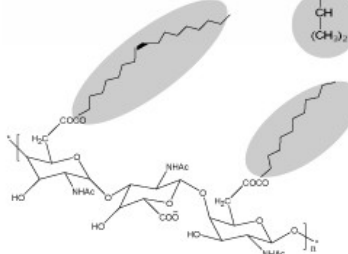
rhamnolipid  
from *Pseudomonas* sp.

**Lipopeptides**  
surfactin,  
iturin,  
fengycin

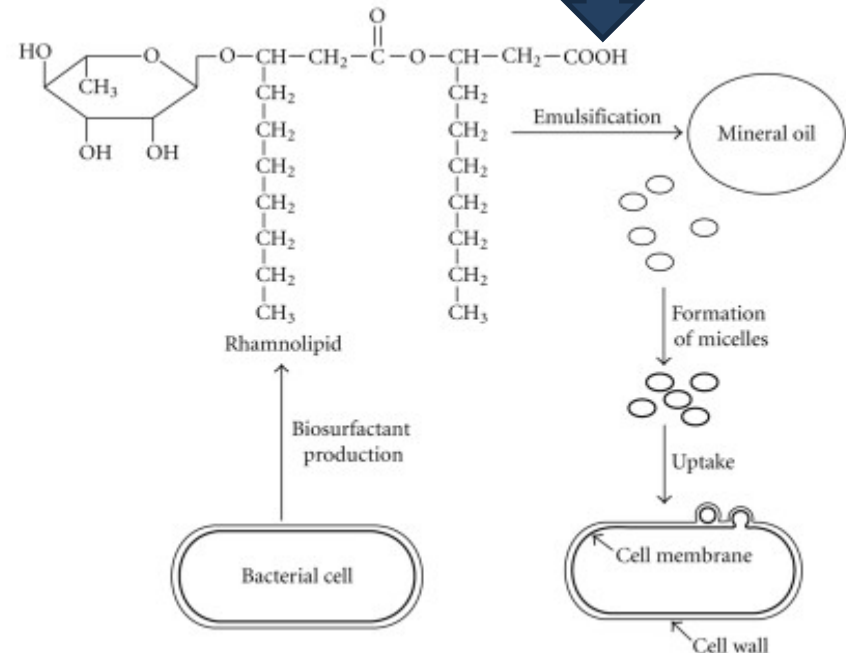


surfactin  
from *Bacillus subtilis*

**Polymeric surfactants**



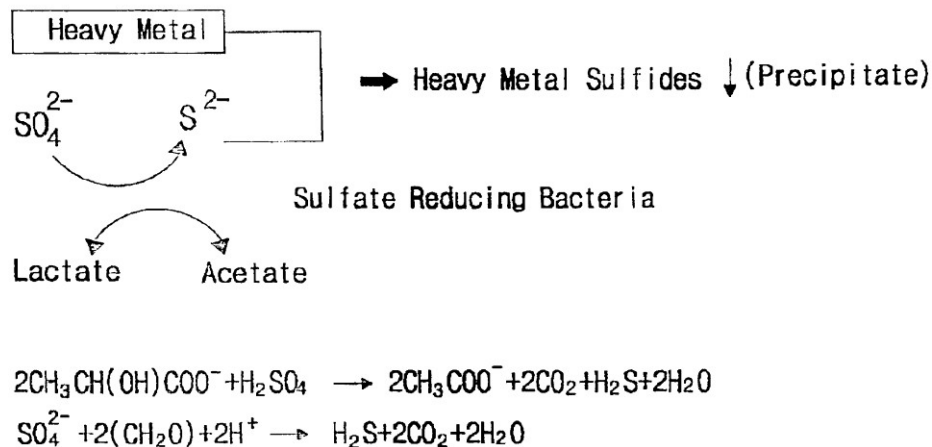
bioemulsan  
from *Acinobacter* sp.



# Obrana a resistance MO proti kovům

## nepřímá imobilizace kovů v prostředí

- sulfan produkovaný desulfurikačními bakteriemi vytváří nerozpustné sulfidy kovů (Ag, Cd, Hg, Ni, Pb, Se, Zn, As ...)
- enzymatická produkce fosfátů, které sráží např. Pb, Cu, Ni, U



### ORIGINAL PAPER

G. Basnakova · E. R. Stephens · M. C. Thaller  
G. M. Rossolini · L. E. Macaskie

## The use of *Escherichia coli* bearing a *phoN* gene for the removal of uranium and nickel from aqueous flows

Received: 30 December 1997 / Received revision: 25 March 1998 / Accepted: 26 March 1998

**Abstract** A *Citrobacter* sp. originally isolated from metal-polluted soil accumulates heavy metals via metal-phosphate deposition utilizing inorganic phosphate liberated via PhoN phosphatase activity. Further strain development was limited by the non-transformability of this environmental isolate. Recombinant *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  bearing cloned *phoN* or the related *phoC* acquired metal-accumulating ability, which was compared with that of the *Citrobacter* sp. with respect to removal of uranyl ion ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) from dilute aqueous flows and its deposition in the form of polycrystalline hydrogen uranyl phosphate ( $\text{HUO}_2\text{PO}_4$ ). Subsequently,  $\text{HUO}_2\text{PO}_4$ -laden cells removed  $\text{Ni}^{2+}$  from dilute aqueous flows via intercalation of  $\text{Ni}^{2+}$  into the  $\text{HUO}_2\text{PO}_4$  lattice. Despite comparable acid phosphatase activity in all three strains, the *E. coli* DH5 $\alpha$  (*phoN*) construct was superior to *Citrobacter* N14 in both uranyl and nickel accumulation, while the *E. coli* DH5 $\alpha$  (*phoC*) construct was greatly inferior in both respects. Expression of phosphatase activity alone is not the only factor that permits efficient and prolonged metal phosphate accumulation, and the data highlight possible differences in the PhoN and PhoC phosphatases, which are otherwise considered to be related in many respects.

### Introduction

Removal of heavy metals from aqueous wastes via microbially generated precipitant ligands (“biomineralization”) is becoming a viable alternative to classical and biosorptive methods of waste-water treatment (Barnes et al. 1991; Diels et al. 1995; Macaskie et al. 1994a, 1996, 1997). An effective, phosphate-mediated biomineralization of various heavy metals (Macaskie 1990) and actinides, including Pu, Am (Macaskie et al. 1994a, 1996; Yong and Macaskie 1998) and uranyl ion,  $\text{UO}_2^{2+}$  (Macaskie et al. 1992, 1994a, 1996; Yong and Macaskie 1995), as their insoluble phosphates, was observed in a *Citrobacter* sp. The product of uranyl biocrystallization, cell-bound hydrogen uranyl phosphate ( $\text{HUO}_2\text{PO}_4$ ) (Macaskie et al. 1992; Yong and Macaskie 1995) is a polycrystalline, lamellar material with intercalative cation-exchange ability, i.e. cations of other metals can displace protons from within the interlamellar space (Clearfield 1988).

In contrast to other heavy metals,  $\text{Ni}^{2+}$  is not removed by the metal phosphate deposition reaction but the intercalative ion-exchange property of  $\text{HUO}_2\text{PO}_4$  was successfully exploited in the removal of  $\text{Ni}^{2+}$  from dilute aqueous solutions; nickel was reversibly incorporated into cell-bound  $\text{HUO}_2\text{PO}_4$  to form nickel uranyl phosphate [ $\text{Ni}(\text{UO}_2\text{PO}_4)_2$ ]. This was designated as microbially enhanced chemisorption of heavy metals (MECHM) (Bonthonre et al. 1996; Basnakova and Macaskie 1997).

The successful application of phosphate-mediated biomineralization to heavy-metal removal, and hence the potential for MECHM, was achieved with *Citrobacter* N14 only; related enterobacteria were ineffective (Macaskie et al. 1994b; Montgomery et al. 1995). This strain expresses a high level of acid phosphatase activity and liberates phosphate precipitant at the cell surface, corresponding to the periplasmic localization of the enzyme (Jeong et al. 1997).

G. Basnakova · E. R. Stephens · L. E. Macaskie (✉)  
School of Biological Sciences, The University of Birmingham  
Edgbaston, Birmingham B15 2TT, UK  
e-mail: L.E.Macaskie@bham.ac.uk  
Tel.: +44-121-414-5889  
Fax: +44-121-414-6557

M. C. Thaller  
Dipartimento di Biologia, Cattedra di Microbiologia Applicata,  
Universita di Roma “Tor Vergata”, Rome, Italy

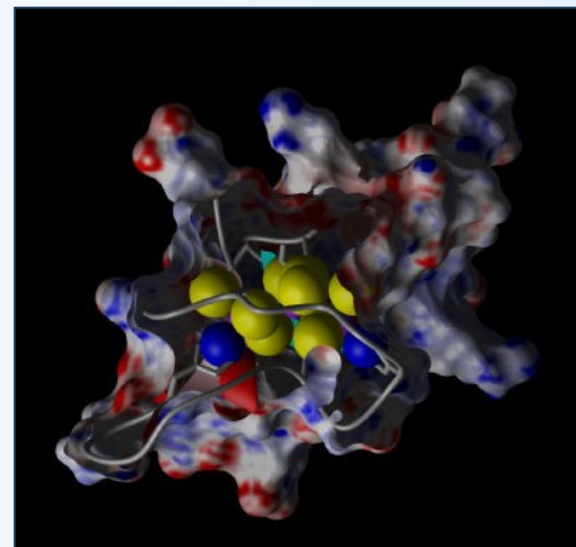
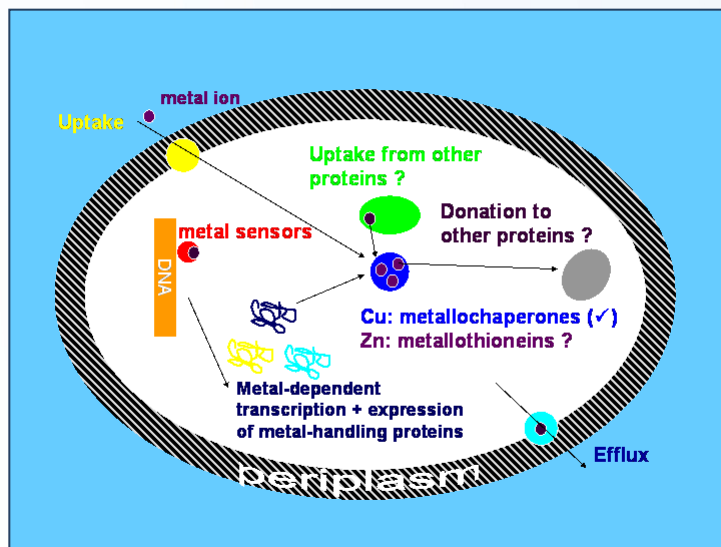
G. M. Rossolini  
Dipartimento di Biologia Molecolare, Sezione di Microbiologia,  
Universita di Siena, Via Laterana, 8-53100, Siena, Italy



# Obrana a resistance MO proti kovům

## sekvestrace metalothioneiny a podobnými proteiny

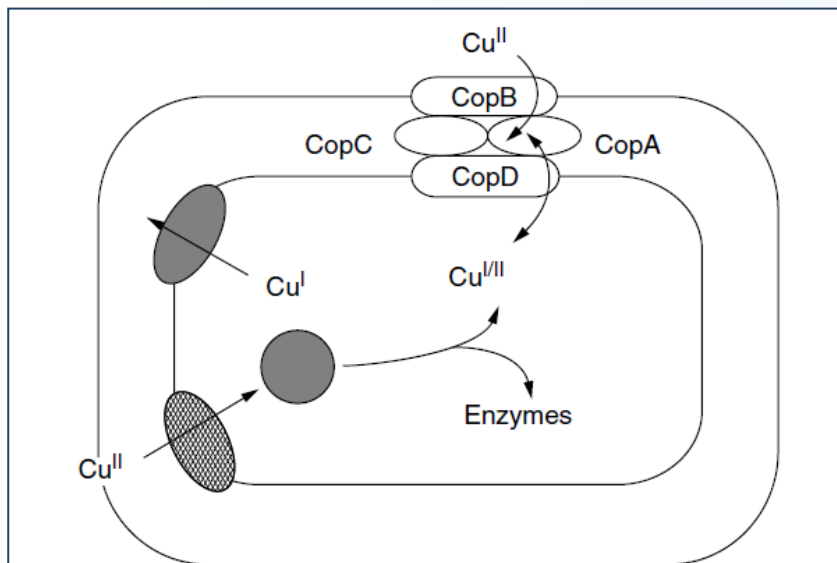
- intra-buněčný mechanismus resistance u prvoků, řas, kvasinek a některých hub
- MT = LMW látky bohaté na Cys s vysokou afinitou k Cd, Zn, Cu, Ag, Hg
- jejich produkci spouští přítomnost kovu
- podobné proteiny izolovány i ze sinic a bakterií



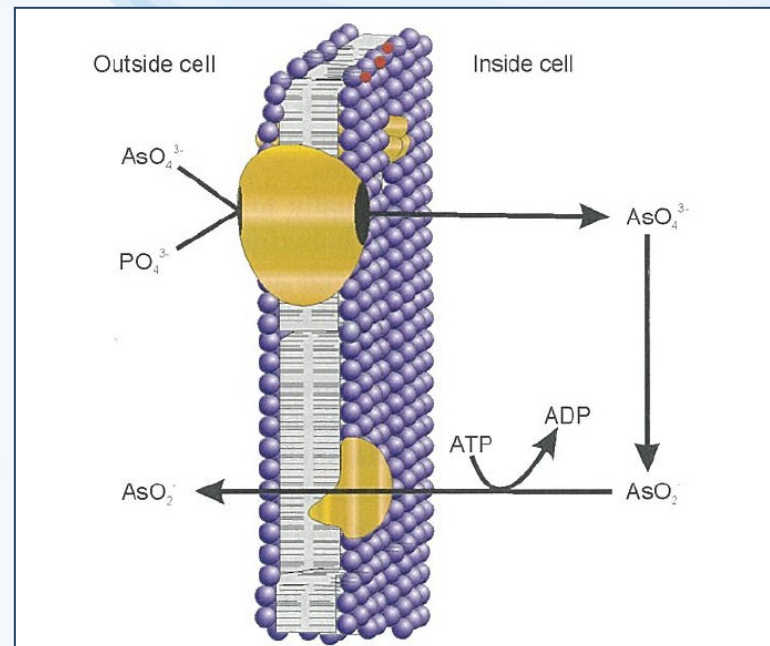
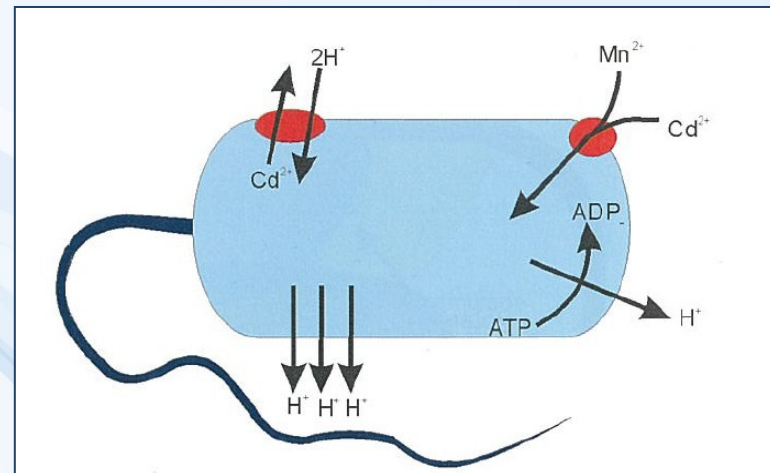
# Obrana a resistance MO proti kovům

## odstranění z buňky aktivním transportem

- plasmidově kódován, energeticky náročný
- chemiosmotické pumpy výměny  $M^{x+} / XH^+$
- ATPázové pumpy
- nejčastěji pro As, Cr, Cd

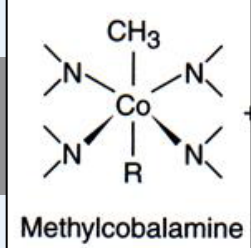


**Figure 2.** Copper transport and resistance in *Pseudomonas*. Hypothesized chromosomal uptake and efflux membrane transporters are shown, as well as intracellular copper-binding protein and plasmid-encoded CopABCD, the products of the copper resistance system of *P. syringae*. Adapted from Silver and Phung [123].



**FIGURE 17.7** Schematic of arsenic resistance demonstrating both the influx and efflux systems for arsenic. Arsenate enters the cell via a phosphate specific transport pathway. Once in the cell, arsenate is reduced to arsenite and an efflux mechanism then pumps arsenite out of the cell via an anion pump and an  $F_1F_0$ -ATPase. Arsenite efflux is fueled by ATP. Notice that arsenic is not detoxified by this mechanism because arsenite can still be toxic.

# Obrana a resistance MO proti kovům



## biometylace

- přesunutí metylové skupiny z metylcobalaminu ( $\text{CH}_3\text{CoB}_{12}$ ) na kov jako např. Sn, Pb, Pt, As, Se; metylace Hg zvýšení mobility a/nebo toxicity (As naopak)
- otravy metylAs z vlhkých tapet – metylace plísněmi
- **Minamata:** elementární rtuť vypouštěná v letech 1932-1970 do zálivu Minamata byla mikrobiální aktivitou v sedimentu metylována na metylrtuť, která se jako rozpustná a biodostupná forma akumulovala ve škeblích a rybách a dostala se tak do potravního řetězce – otravy lidí (46 úmrtí + vrozené defekty)
- před metylací ještě muselo dojít působením  $\text{H}_2\text{S}$  k přeměně na  $\text{Hg}^{2+}$

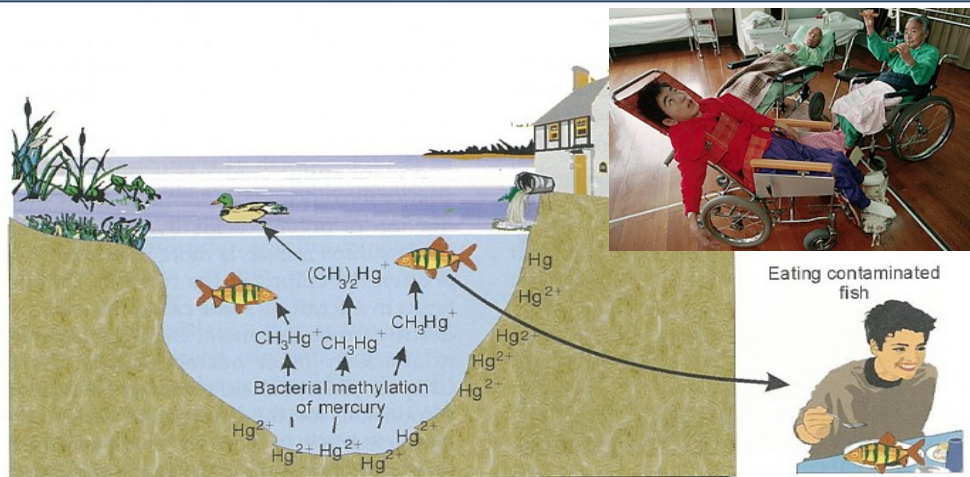


FIGURE 17.12 Schematic demonstrating the potential for the bioaccumulation of mercury as a result of mercury methylation. Once in the food chain, methylmercury poses serious health risks to the human population.

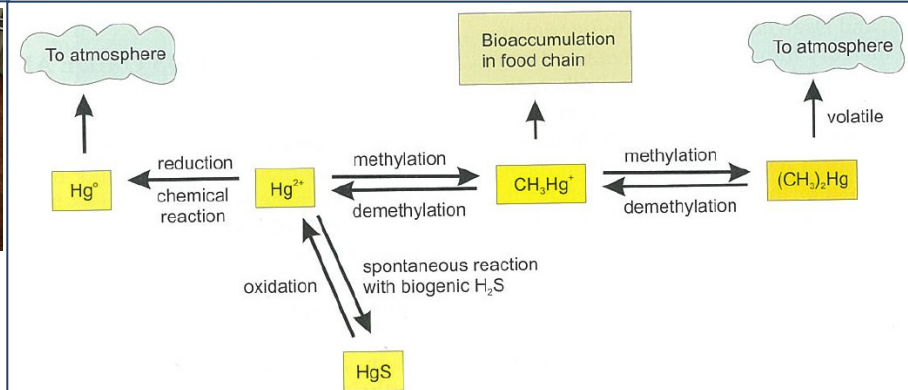


FIGURE 15.5 Microbially-mediated reactions with  $\text{Hg}^{2+}$  in the environment.  $\text{Hg}^{2+}$  can be reduced to elemental  $\text{Hg}^0$  by chemical reaction with humic acids or by microbially-mediated reactions which are believed to be a detoxification mechanism.  $\text{Hg}^{2+}$  can be precipitated by reaction with  $\text{H}_2\text{S}$  produced under sulfate-reducing conditions but can also be released by microbial oxidation of  $\text{HgS}$ . Methylation of  $\text{Hg}^{2+}$  produces organometals, which can accumulate in the tissue of living organisms. The production of organometals may to some extent be balanced by demethylation reactions occurring in both aerobic and anaerobic environments. (Based on Gadd, 1993, and Ehrlich, 1996.)

# Obrana a resistance MO proti kovům

- biometylace

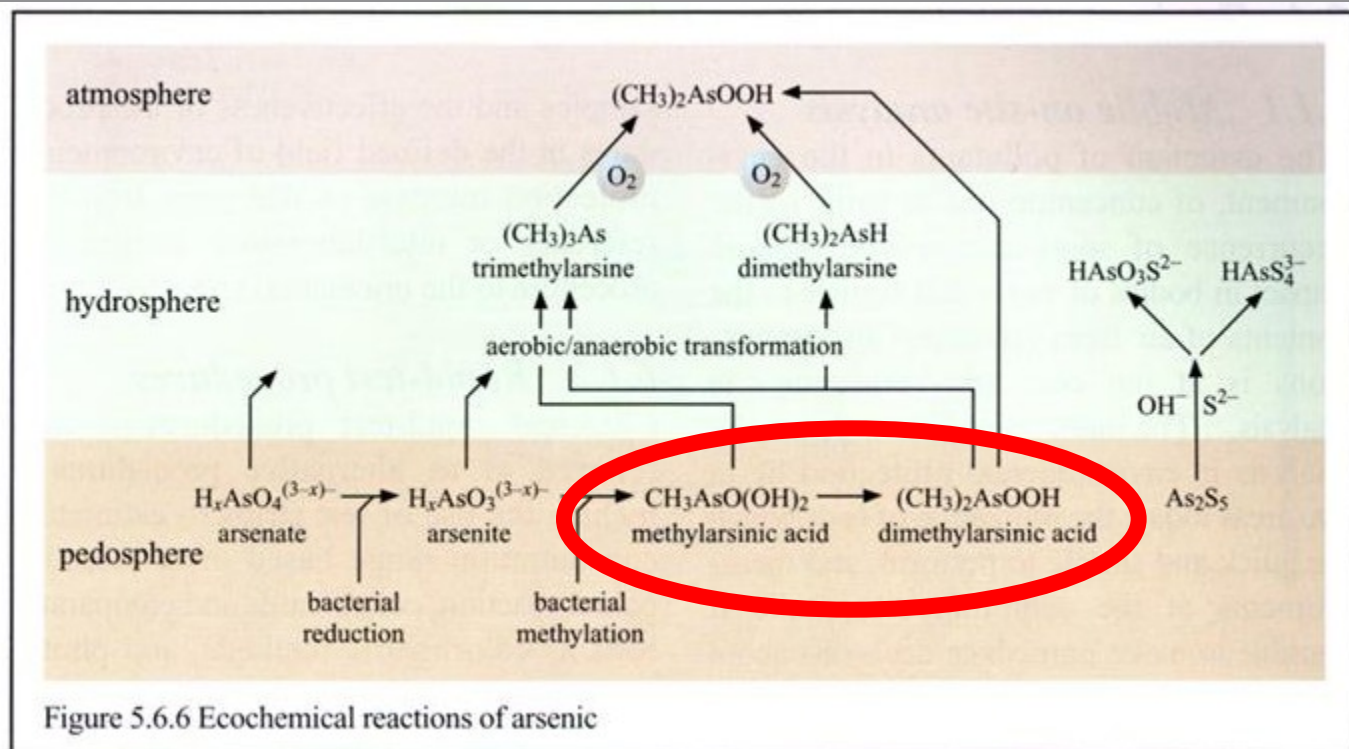


Figure 5.6.6 Ecochemical reactions of arsenic

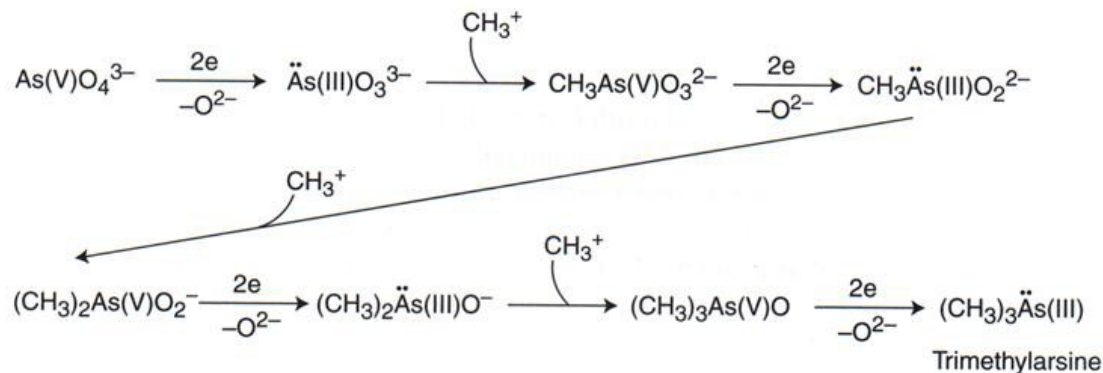


FIGURE 8.6 Methylation of arsenate. After EHC 18.



# Obrana a resistance MO proti kovům

## Zajímavé moderní otázky :

- Jak spolu interagují mikrobiální populace v přítomnosti kovu?
- Je možné, že resistantní populace „přenáší“ resitenci na celé společenstvo?
- Jsou například možné nějaké symbiotické interakce mezi resistantními a citlivými populacemi MO: resistantní poskytují „ochranu“ citlivým, které je zásobí živinami či zdrojem uhlíku?



## Další interakce kovů s MO

- biochemické interakce vždy zahrnují specifické enzymy pro oxidaci, redukci, metylaci, dealkylaci a precipitaci
- svými aktivitami MO způsobují srážení, volatilizaci, sorpci a rozpouštění kovů v prostředí
- přímá interakce – oxidace / redukce kovů (zisk energie, TEA, změna mobility kovů ...)
- nepřímá interakce – MO produkuje enzymaticky sulfidy či fosfáty, které interagují s kovy – ox/red, srážení
- kombinace – např. redukce  $As^{5+}$  na  $As^{3+}$  v anaerobním sedimentu spojená se srážením do  $As_2S_3$  díky SRB (sulfát redukující bakterie)
- **kromě negativních důsledků se toho cíleně dá využít při remediacích → přednáška na konci semestru o biodegradaci a bioremediaci**





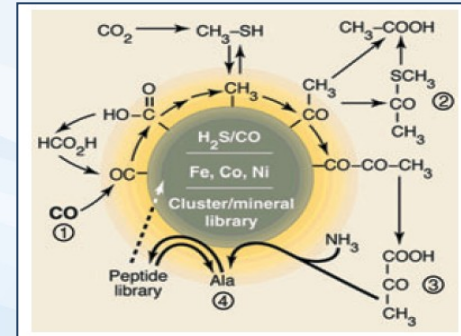
# Další interakce kovů s MO

## • redukce kovů

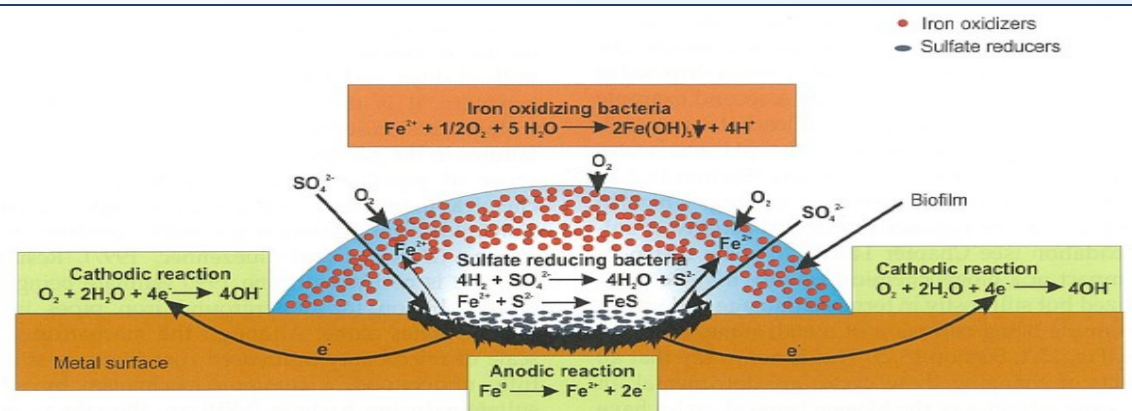
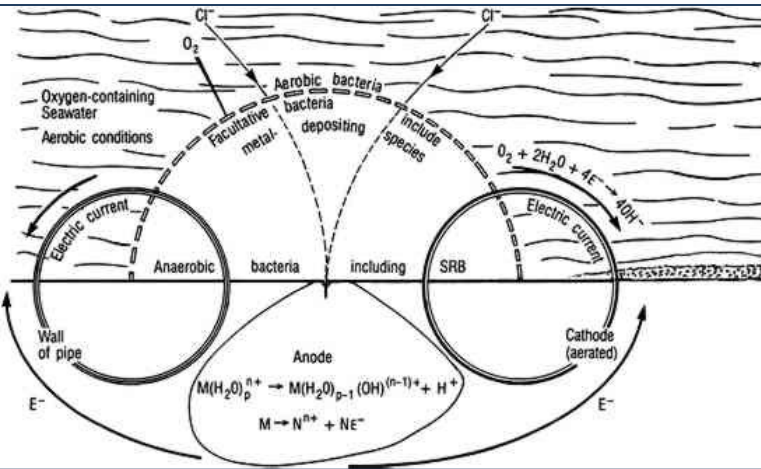
- $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$ ,  $\text{U}^{6+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Mo}^{6+}$ ,  $\text{V}^{5+}$  jsou redukovány na nižší valence; může vést ke snížení toxicity: (např.  $\text{Cr}^{6+} \rightarrow \text{Cr}^{3+}$ )

## • oxidace kovů

- např.:  $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ; zisk energie, nebo změna mobility ( $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ )
- ne vždy pozitivní důsledky:
  - **kyselé důlní vody** – redukované formy kovů v rudách (např.  $\text{Fe}_2\text{S}$ ) jsou MO oxidovány včetně aniontu (např.  $\text{S} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$ ), vyluhují kovy – toxicita, reaktivita
  - **mikrobiální koroze**
    - produkce kyselin bct. či houbami nebo desulfurikační bct.



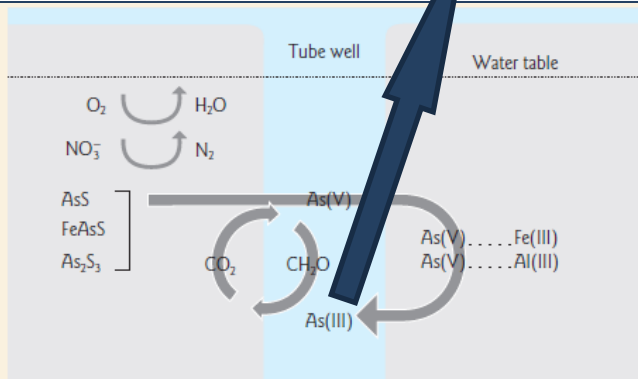
**Figure 2.5** Reactions in the iron/sulfur world. Shown are the proposed reaction schemes for primordial molecules at catalytic surfaces in the iron/sulfur world. Reaction steps lead to the conversion of carbon monoxide (1) to a variety of key biomolecules, including: methyl thioacetate (2), pyruvate (3), and alanine (4). (From Wachtershauser, G. 2000. Origin of life: Life as we don't know it. *Science* 289:1307–1308. Reprinted with permission of AAAS.)



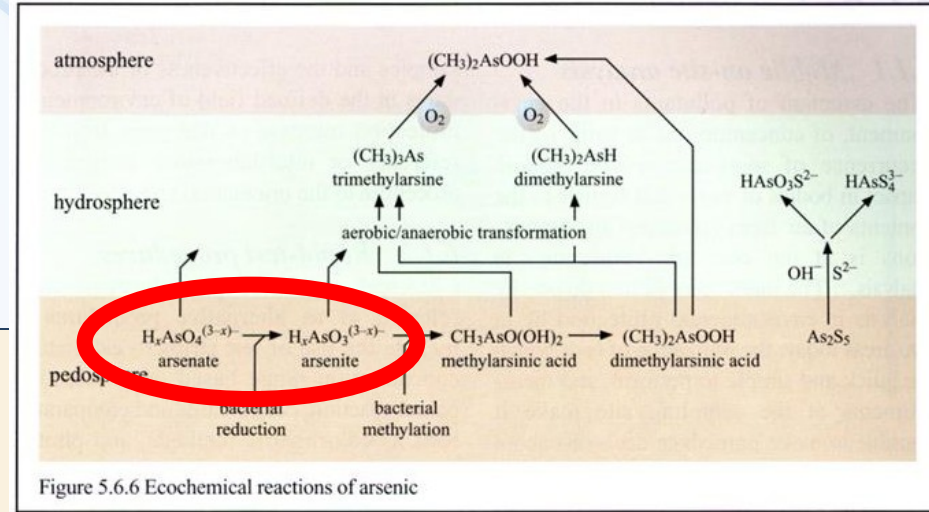
**FIGURE 15.2** General representation of microbially influenced corrosion of a metal surface. (Adapted from Hamilton, 1995.)

# Další interakce kovů s MO

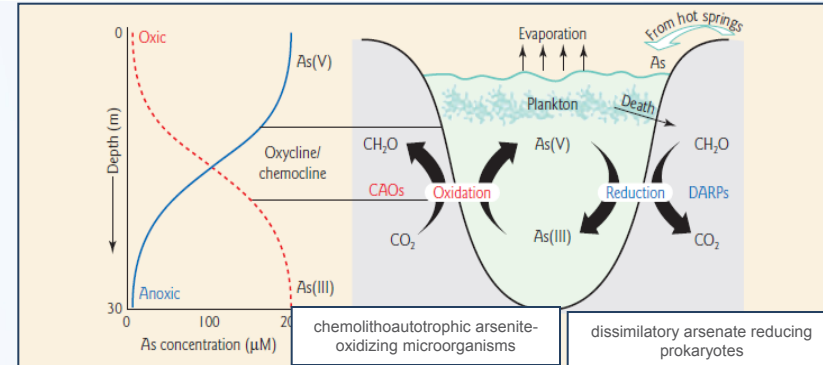
- ne vždy pozitivní důsledky – oxidace a redukce As – mobilizace, zvýšení toxicity
- hromadné otravy milionů lidí  
- Bangladéš a Bengálsko



**Figure 3** A conceptual model of how arsenic-metabolizing prokaryotes may contribute to the mobilization of arsenic from the solid phase into the aqueous phase in a subsurface drinking water aquifer. Arsenic is originally present primarily in the form of chemically reduced minerals, like realgar ( $AsS$ ), orpiment ( $As_2S_3$ ), and arsenopyrite ( $FeAsS$ ). These minerals are attacked by chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing microorganisms, which results in the oxidation of  $As(III)$ , as well as iron and sulfide, with the concurrent fixation of  $CO_2$  into organic matter. Construction of wells by human activity accelerates this process by providing the necessary oxidants like molecular oxygen or, in the case of agricultural regions, nitrate. The  $As(V)$  can subsequently be adsorbed onto oxidized mineral surfaces like ferrihydrite or alumina. The influx of substrate organic materials derived either from buried peat deposits, recharge of surface waters, or the microbial mats themselves promotes microbial respiration and the onset of anoxia, hence the conversion of  $As(V)$  to mobile  $As(III)$ . DARPs then respire adsorbed  $As(V)$ , resulting in the release of  $As(III)$  into the aqueous phase. (From Oremland R.S. and J.F. Stolz. 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300:939–944. Reprinted with permission from AAAS.)

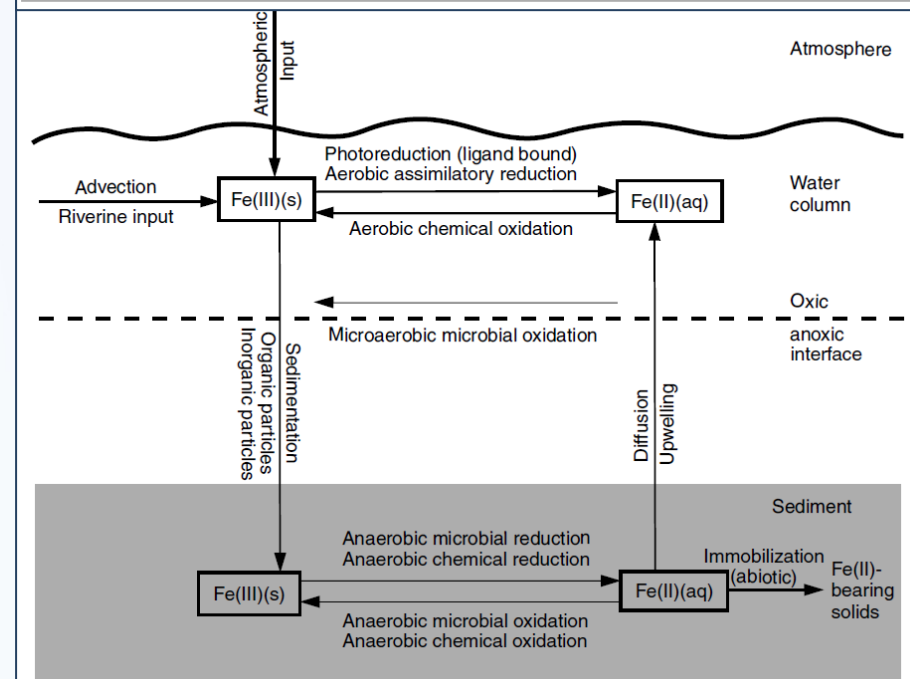
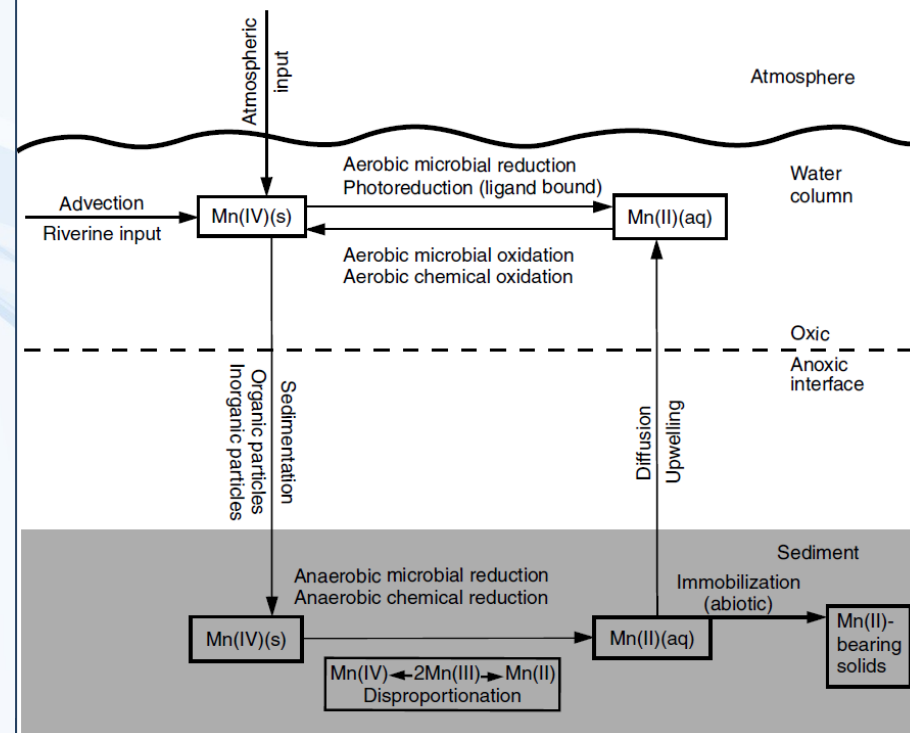
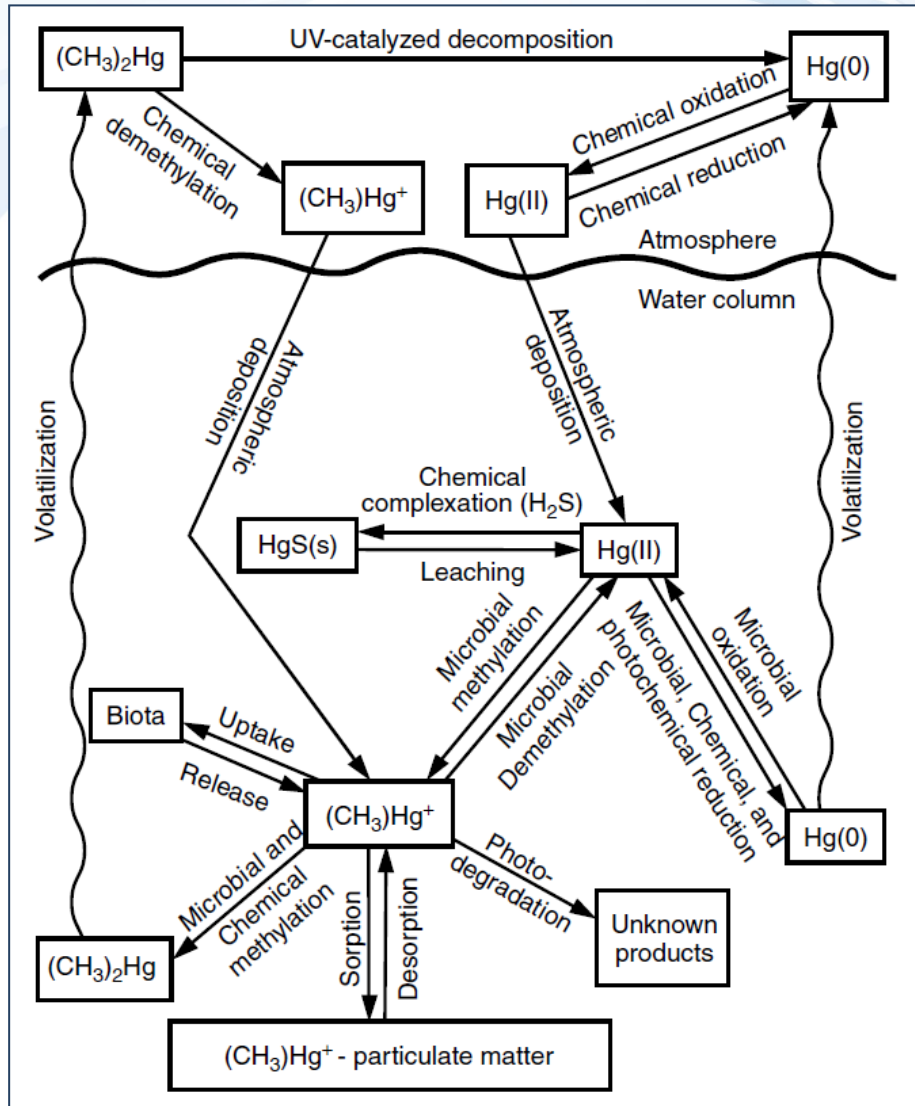


**Figure 5.6.6** Ecochemical reactions of arsenic

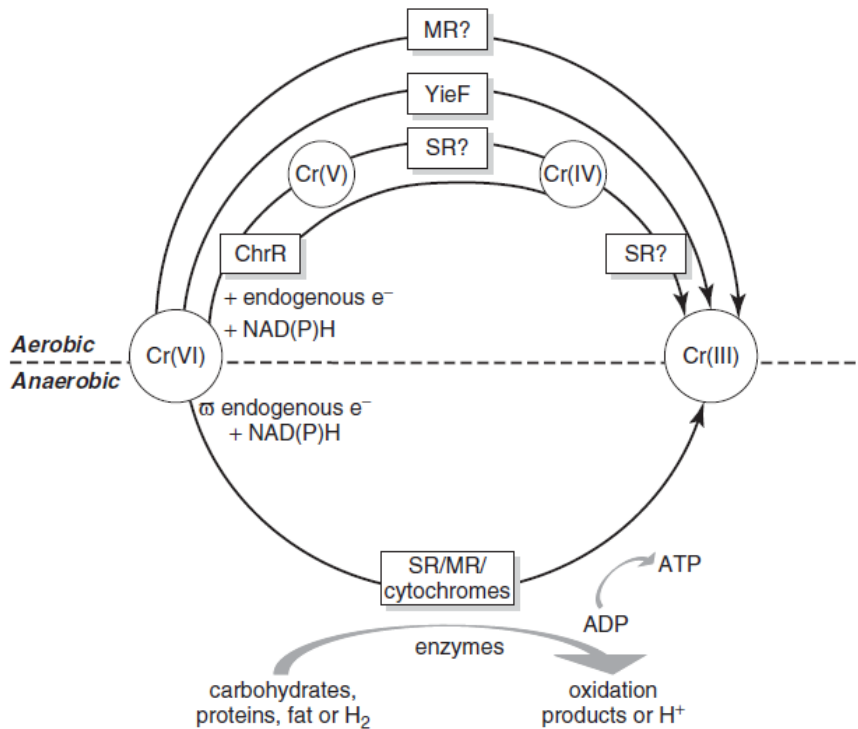


**Figure 2** The chemical speciation of arsenic in the stratified water column of Mono Lake, California (left) as explained by the metabolism of arsenic by microbial populations present in the water column (right). Arsenic cycling occurs in the region of the chemocline. Arsenate reduction is mediated by DARPs that use released organic matter from dying plankton to fuel their respiration. Arsenite oxidation (aerobic and anaerobic) is mediated by CAOs that also contribute to secondary production by "fixing"  $CO_2$  into organic matter. Arsenic first enters this alkaline ( $pH = 9.8$ ), saline (290 g/L) lake as a dissolved component contained in the discharge from hydrothermal springs. Arsenic, as well as other dissolved constituents, reaches high concentrations because of the predominance of evaporation over precipitation in this arid region. (From Oremland R.S. and J.F. Stolz. 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300:939–944. Reprinted with permission from AAAS.)

# Další interakce kovů s MO



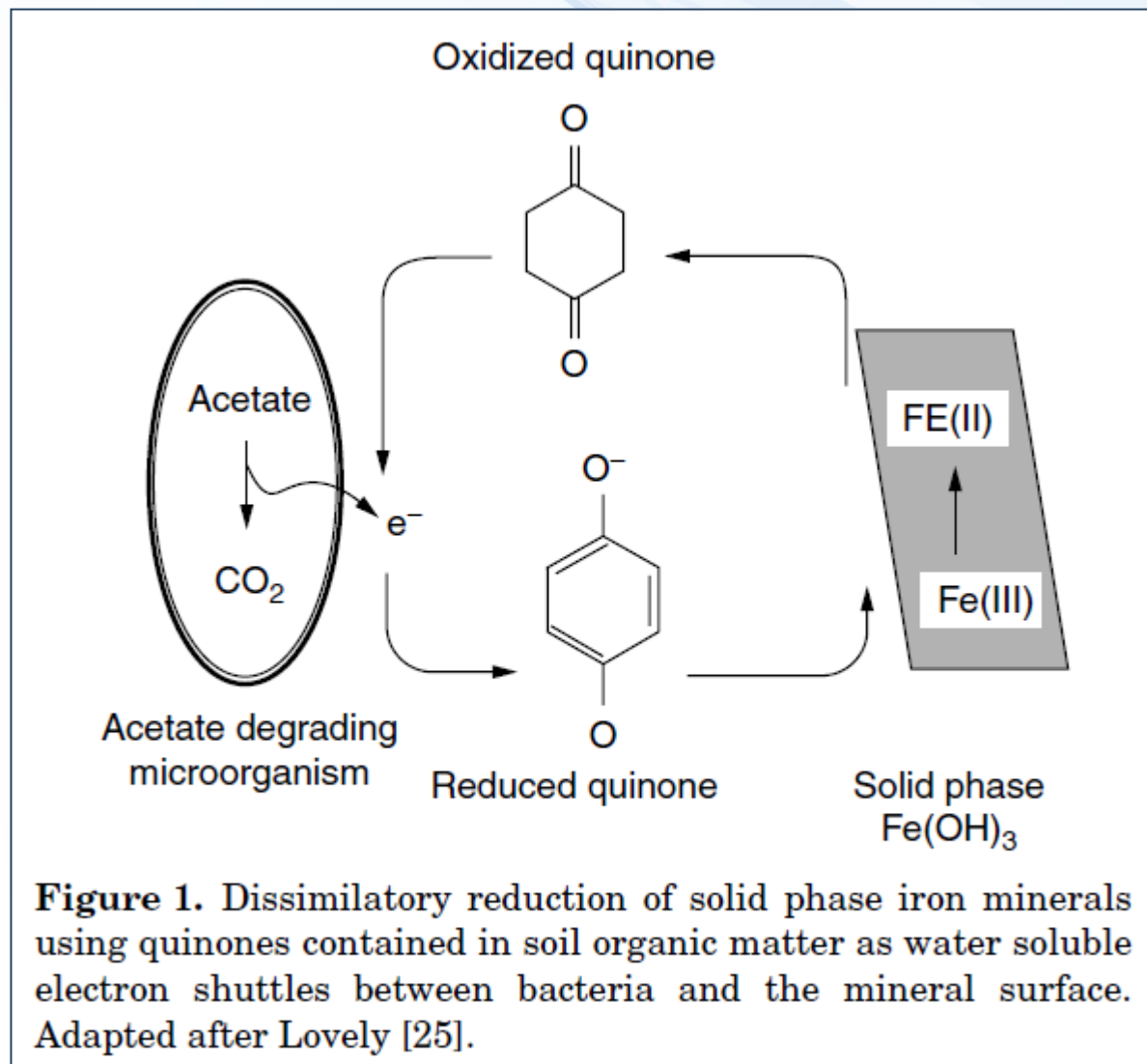
# Další interakce kovů s MO



**Figure 7.1** Plausible mechanisms of enzymatic Cr(VI) reduction under aerobic (upper) and anaerobic (lower) conditions. Under aerobic conditions, ChrR of *P. putida* MK1 catalyzes a combination of one- and two-electron transfers to Cr(VI) with the transient formation of Cr(V); YieF of *E. coli* mediates a four-electron shuttle for the direct reduction of Cr(VI) to Cr(III) with the remaining electron transferred to oxygen. An uncharacterized membrane-associated Cr(VI) reductase has been isolated from *B. megaterium* TKW3. Under anaerobic conditions, both soluble and membrane-associated Cr(VI)-reducing enzymes, including cytochromes, associated with the electron transfer system have been reported. Enzymes involved in the reduction of Cr(VI) are shown in boxes. SR and MR represent soluble and membrane-associated reductase, respectively.

# Další interakce kovů s MO

## V interakce s OM – electron shuttles



# Další interakce kovů s MO

**Table 7.1 Microbial Transformation of Multivalence Metals**

Metals	Possible Reactions	Microorganisms Involved	References
As	Reduction of As(V) to As(III)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shewanella</i> sp. strain ANA-3, etc.	Stolz et al. (2006)
	Oxidation of As(III) to As(V)	<i>Hydrogenophaga</i> sp. NT-14, <i>Rhizobium</i> sp. NT-26, etc.	Stolz et al. (2006)
	Methylation of As(V) or As(III) to methylated As compounds	<i>Desulfovibrio gigas</i> , <i>Methanobacterium formicicum</i> , etc.	Stolz et al. (2006)
Cr	Reduction of Cr(VI) to Cr(III)	<i>Pseudomonas maltophilia</i> O-2, <i>Shewanella putrefaciens</i> MR-1, etc.	Cheung and Gu (2003)
Fe	Reduction of Fe(III) to Fe(II)	<i>Geobacter merallireducens</i> , <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , etc.	Nealson and Saffarini (1994)
Hg	Oxidation of Fe(II) to Fe(III)	<i>Leptothrix ochracea</i> , <i>Gallionella ferruginea</i> , etc.	Emerson (2000)
	Methylation of Hg(II) to methylated Hg compounds	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> LS	Barkay et al. (2003)
	Reductive or oxidative demethylation of CH <sub>3</sub> Hg(I) to Hg(0) or unidentified Hg compounds	<i>Desulfovibrio gigas</i> , <i>Escherichia coli</i> , etc.	Barkay et al. (2003)
	Reduction of Hg(II) to Hg(0)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PU21	Barkay et al. (2003)
Mn	Oxidation of Hg(0) to Hg(II)	<i>Escherichia coli</i>	Barkay et al. (2003)
	Reduction of Mn(IV) to Mn(II)	<i>Geobacter merallireducens</i> , <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , etc.	Nealson and Saffarini (1994)
	Oxidation of Mn(II) to Mn(IV), or oxidation of Mn(II) to Mn(III) and then Mn(IV)	<i>Leptothrix discophora</i> strain SS-1, <i>Bacillus</i> sp. SG-1, etc.	Tebo et al. (2005)
Se	Reduction of Se(VI) to Se(IV), Se(0), or even Se(-II)	<i>Thauera selenatis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> SLD1a-1, <i>Desulfomicrobium</i> sp., etc.	Schröder et al. (1997); Hockin and Gadd (2006)
	Reduction of Se(IV) to Se(0)	<i>Thauera selenatis</i>	Schröder et al. (1997)
	Oxidation of Se(0) to Se(VI) or Se(VI)	<i>Bacillus megaterium</i>	Sarathchandra and Watkinson (1981)
	Methylation of Se(VI) or Se(VI) to methylated Se(-II) compounds	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas</i> strain Hsa.28, etc.	Ranjard et al. (2003)
U	Reduction of U(VI) to U(IV)	<i>Geobacter</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Desulfovibrio</i> , etc.	Wall and Krumholz (2006)
	Oxidation of U(IV) to U(VI)	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Thiobacillus denitrificans</i>	DiSpirito and Tuovinen (1982); Beller (2005)

# Další interakce kovů s MO

**Table 1. Biologically Driven Redox Transformations of Metal Ions**

Metal	Reaction	Reductant	Microorganisms	Notes
As	$\text{As}^{5+} \rightarrow \text{As}^{3+}$		Gram positive	Reduced intracellularly before efflux by As resistance system (42)
Ag	$\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$			
Au	$\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$		Fe(III)-reducing microorganisms	
Cr	$\text{Cr}^{6+} \rightarrow \text{Cr}^{3+}$	Glucose, acetate, amino acids	<i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i> <i>Streptomyces</i> <i>Enterobacter</i>	Cr(VI) not used for respiration.
Cu	$\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$	$\text{S}^0$	<i>Thiobacillus</i>	Ferric ion oxidoreductase
Fe	$\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$	$\text{H}_2$ , $\text{S}^0$ organic acids alcohols	<i>Geobacter</i> <i>Shewanella</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Thiobacillus</i>	Fe(III) not used for respiration
Hg	$\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$		Diverse bacteria	Detoxification mechanism plasmid-borne genes
Mn	$\text{Mn}^{6+} \rightarrow \text{Mn}^{4+}$ $\text{Mn}^{4+} \rightarrow \text{Mn}^{2+}$		Diverse bacteria	Mn reduction may be chemically coupled to oxidation of Fe(II)
Se	$\text{Se}^{6+} \rightarrow \text{Se}^0$ $\text{Se}^{6+} \rightarrow \text{Se}^{4+}$ $\text{Se}^{4+} \rightarrow \text{Se}^0$			Reduction of Se(VI) to Se(IV) can be used for respiration in some bacteria
Tc	$\text{Tc}^{7+} \rightarrow \text{Tc}^{4+}$		Sulfate-reducing bacteria	Fortuitous enzymatic
U	$\text{U}^{6+} \rightarrow \text{U}^{4+}$	Acetate, lactate, $\text{H}_2$	<i>Geobacter</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Micrococcus</i> ,	Oxidizes c-type cytochromes, may be used for respiration by some bacteria
V	$\text{V}^{5+} \rightarrow \text{V}^{3+}, \text{V}^{2+}$			



# Závěrečný přehled kovů a jejich interakcí s MO

Chemical class	Mechanisms of microbe–contaminant interactions	Type(s) of contaminant alteration	Susceptibility to microbiological transformation*	
			Aerobic	Anaerobic
<b>Metals</b>				
Copper, nickel, zinc	Sorbs to extracellular polymers and biomass	Immobilized by sorption	2	2
Cadmium, lead	Sorbs to extracellular polymers and biomass	Immobilized by sorption; methylation possible	2	2
Iron, manganese	Electron acceptor under anaerobic conditions; oxidized to form insoluble hydroxides; sorbs to extracellular polymers and biomass	Mobility (solubilization) increased by reduction; immobilized by precipitation and sorption	1	1
Chromium	Enzymatically oxidized or reduced to promote detoxification; cometabolized; sorbs to extracellular polymers and biomass	Immobilized by precipitation	2	2
Mercury	Enzymatically oxidized or reduced or methylated to promote detoxification; sorbs to extracellular polymers and biomass	Volatilized or immobilized by sorption, methylation, and precipitation	2	2
<b>Nonmetals</b>				
Arsenic	Enzymatically oxidized or reduced or methylated; electron acceptor under anaerobic conditions; oxidation of reduced forms linked to microbial growth; sorbs to extracellular polymers and biomass	Volatilized or immobilized by precipitation and sorption	2	2
Selenium	Enzymatically oxidized or reduced and methylated; electron acceptor under anaerobic conditions; cometabolized; sorbs to extracellular polymers and biomass	Volatilized or immobilized by precipitation of elemental Se or sorption	1	2
<b>Oxyanions</b>				
Nitrate	Electron acceptor under anaerobic conditions	Reduced to nontoxic nitrogen	4	1
Perchlorate	Electron acceptor under anaerobic conditions	Reduced to nontoxic chloride ion	4	2, 5
<b>Radionuclides</b>				
Uranium	Electron acceptor under anaerobic conditions; sorbs to extracellular polymers and biomass	Immobilized by precipitation	4	2
Plutonium	Cometabolized; sorbs to extracellular polymers and biomass	Mobility increased by reduction to soluble Pu(III); immobilized by precipitation and sorption	4	2
Technetium	Enzymatically oxidized or reduced; cometabolized; sorbs to extracellular polymers and biomass	Immobilized by precipitation	4	2






# Použitá literatura – MO a kovy

- Maier R. M., Pepper I. L., Gerba C. P. (2000): Environmental microbiology. **Chapter 17: Microorganisms and metal pollutants** (Roane T. M. and Pepper, I. L.). Academic Press. ISBN 0124975704. p. 403-423.
- Maier R. M., Pepper I. L., Gerba C. P. (2000): Environmental microbiology. **Chapter 15: Consequences of biogeochemical cycles gone wild** (Herman D. C. and Maier R. M.). Academic Press. ISBN 0124975704. p. 347-354.
- Madsen E. L. (2008): Environmental microbiology: from genomes to biogeochemistry. **Chapter 7: Microbial Biogeochemistry: a Grand Synthesis**. John Wiley & Sons. ISBN 1405136472. p. 281-345.
- Madsen E. L. (2008): Environmental microbiology: from genomes to biogeochemistry. **Chapter 8.3: Biodegradation and bioremediation**. John Wiley & Sons. ISBN 1405136472. p. 373-399.
- Horáková D. (2007): Bioremediace. Masarykova univerzita. ISSN 1802-128X.  
<http://is.muni.cz/elportal/?id=710435>
- Mitchell R. (2010): Environmental microbiology. **Chapter 7: Sorption and Transformation of Toxic Metals by Microorganisms** (Han X. and Gu J. D.). John Wiley and Sons. ISBN 047017790X. p. 153-176.
- Atlas R. M., Bartha R. (2009): Microbial ecology: fundamentals and applications. **Chapter 13: Microbial interactions with xenobiotic and inorganic pollutants**. Benjamin/Cummings. ISBN 0805306552. p. 511-555.
- Bitton G. (2002): Encyclopedia of Environmental Microbiology – 6 volumes. John Wiley & Sons Ltd.

# Nepřeberné množství článků z problematiky

Ecotoxicology and Environmental Safety 45, 198–207 (2000)

Environmental Research, Section B

doi:10.1006/eesa.1999.1860, available online at <http://www.idealibrary.com> on 

## REVIEW

### Microbial Resistance to Metals in the Environment

Mark R. Bruins, Sanjay Kapil, and Frederick W. Oehme<sup>1</sup>

Department of Diagnostic Medicine/Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, Kansas 66506

Received May 27, 1999



FEMS Microbiology Reviews 26 (2002) 327–338

## Review

### Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution

Marc Valls, Victor de Lorenzo \*

Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 14 March 2002; received in revised form 15 May 2002; accepted 25 May 2002

First published online 21 August 2002



Pergamon

Soil Biol. Biochem. Vol. 30, No. 10/11, pp. 1389–1414, 1998

© 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

Printed in Great Britain

0038-0717/98 \$19.00 + 0.00

PII: S0038-0717(97)00270-8

### TOXICITY OF HEAVY METALS TO MICROORGANISMS AND MICROBIAL PROCESSES IN AGRICULTURAL SOILS: A REVIEW

KEN E. GILLER,<sup>1\*</sup> ERNST WITTER<sup>2</sup> and STEVE P. MCGRATH<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Wye College, University of London, Wye, Ashford, Kent TN25 5AH, U.K., <sup>2</sup>Department of Soil Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7014, 75007 Uppsala, Sweden and <sup>3</sup>Soil Science Department, IACR-Rothamsted, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, U.K.

## Review

Received: 18 April 2008

Revised: 19 May 2008

Accepted: 19 May 2008

Published online in Wiley InterScience: 29 July 2008

(www.interscience.com) DOI 10.1002/jctb.1999



### Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment

Geoffrey Michael Gadd\*

Soil Biology & Biochemistry 41 (2009) 2031–2037

Contents lists available at ScienceDirect

Soil Biology & Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/soilbio](http://www.elsevier.com/locate/soilbio)



ELSEVIER



Citation classics

Heavy metals and soil microbes

Ken E. Giller<sup>a,\*</sup>, Ernst Witter<sup>b</sup>, Steve P. McGrath<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Plant Production Systems, Department of Plant Sciences, Wageningen University, P.O. Box 430, 6700 AK Wageningen, The Netherlands

<sup>b</sup>Department of Soil and Environment, SLU, P.O. Box 7014, 75007 Uppsala, Sweden

<sup>c</sup>Rothamsted Research, Harpenden, Herts AL5 2JQ, UK



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Organické kontaminanty a MO

# Další polutanty a MO