

# Bakterije rezistentne na selen

---

Mihaljević, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:371670>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**BAKTERIJE REZISTENTNE NA SELEN  
BACTERIA RESISTANT TO SELENIUM**

SEMINARSKI RAD

Marina Mihaljević  
Preddiplomski studij biologije  
(Undergraduate Study of Biology)  
Mentor: Prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Zagreb, 2018.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. SELEN I CIKLUS KRUŽENJA SELENA U PRIRODI</b> .....	2
<b>3. BAKTERIJSKA REDUKCIJA SELENOVIH OKSIANIONA</b> .....	5
3.1. BAKTERIJSKA REDUKCIJA SELENATA .....	7
3.2. BAKTERIJSKA REDUKCIJA SELENITA .....	11
<b>4. METILACIJA SELENA I SELENOVIH OKSIANIONA</b> .....	15
<b>5. NANOSFERE SELENA</b> .....	17
<b>6. UPORABA BAKTERIJA REZISTENTNIH NA SELEN</b> .....	19
6.1. INDUSTRIJA I MEDICINA.....	19
6.3. BIOREMEDIJACIJA.....	20
<b>7.LITERATURA</b> .....	21
<b>8. SAŽETAK</b> .....	22
<b>9. SUMMARY</b> .....	23

## 1. UVOD

Selen je otkrio Jöns Jacob Berzelius („otac švedske kemije“) još 1817. god. Biološka toksičnost selena je prvi put prepoznata 1856. godine, kada je otkriveno da je bio uzrok bolesti danas znane kao selenoza, čiji su simptomi abnormalni gubitak kose, slomljeni nokti, ljuštenje noktiju, debeli nokti i lezije na koži. Da nije samo toksičan i da može imati dobar učinak na živa bića je otkriveno tek 1957. godine, kada se pokazalo da selen može spriječiti nekroze jetre u štakora. Danas se zna da je esencijalni element u tragovima koji je neophodan za sintezu aminokiseline selenocisteina, kao i da je važan za biosintezu koenzima Q, glutation peroksidaze, tioredoksin reduktaze, te za mnoge druge fiziološke funkcije. Razlika u koncentracijama u kojima je selen koristan ili toksičan je vrlo mala, stoga male promijene u okolišu mogu uzrokovati veliku štetu živom svijetu tog područja (Nancharaiah i Lens 2015).

Poznato je da razni mikroorganizmi u okolišu imaju sposobnost različitih modifikacija selena, kao što su redukcija, oksidacija, metilacija i demetilacija (Eswayah i sur. 2016). Bakterije koje su sposobne provoditi reakcije oksidacije i redukcije selena su ključne u njegovom ciklusu kruženja u prirodi (Nancharaiah i Lens 2015). Različite vrste bakterija su sposobne podnijeti veće koncentracije toksičnih selenovih spojeva, odnosno selenovih oksianiona, u svojoj okolini (Oremland i sur. 2004, Bajaj i sur. 2012, Nancharaiah i Lens 2015, Eswayah i sur. 2016). Mehanizmi zbog kojih su neke bakterije sposobne podnijeti veće koncentracije toksičnih selenovih spojeva su raznoliki, a mnogi još nisu ni u potpunosti razjašnjeni (Bajaj i sur. 2012, Nancharaiah i Lens 2015, Eswayah i sur. 2016). Veliki dio takvih bakterija u stanju je reducirati u anaerobnim uvjetima selenove oksianione do elementarnog selena kojeg izlučuju u okoliš u obliku nanosfera. Uglavnom su to selen-respirirajuće bakterije, bakterije koje mogu koristiti selenove oksianione kao konačne akceptore elektrona pri anaerobnoj respiraciji i time si omogućiti izvor energije (Nancharaiah i Lens 2015). Mehanizmi koji ne uključuju respiraciju selenovih oksianiona nisu sasvim razjašnjeni, te su uglavnom poznati neki detoksifikacijski mehanizmi koji uključuju reduktaze, poput glutation reduktaze (Oremland i sur. 2004, Nancharaiah i Lens 2015) i tiol reduktaze (Nancharaiah i Lens 2015). Neke su bakterije sposobne metilirati i reducirati selenove oksianione, otpuštajući selen u obliku hlapljivih spojeva (Eswayah i sur. 2016). Nanosfere selena, koje najčešće proizvode bakterije s nekim oblikom rezistencije na selen, imaju specifična fizikalna svojstva (Oremland i sur. 2004), te različite mogućnosti uporabe, poglavito u industriji i tehnologiji (Bajaj i sur. 2012, Nancharaiah i Lens 2015, Eswayah i sur. 2016).

## 2. SELEN I CIKLUS KRUŽENJA SELENA U PRIRODI

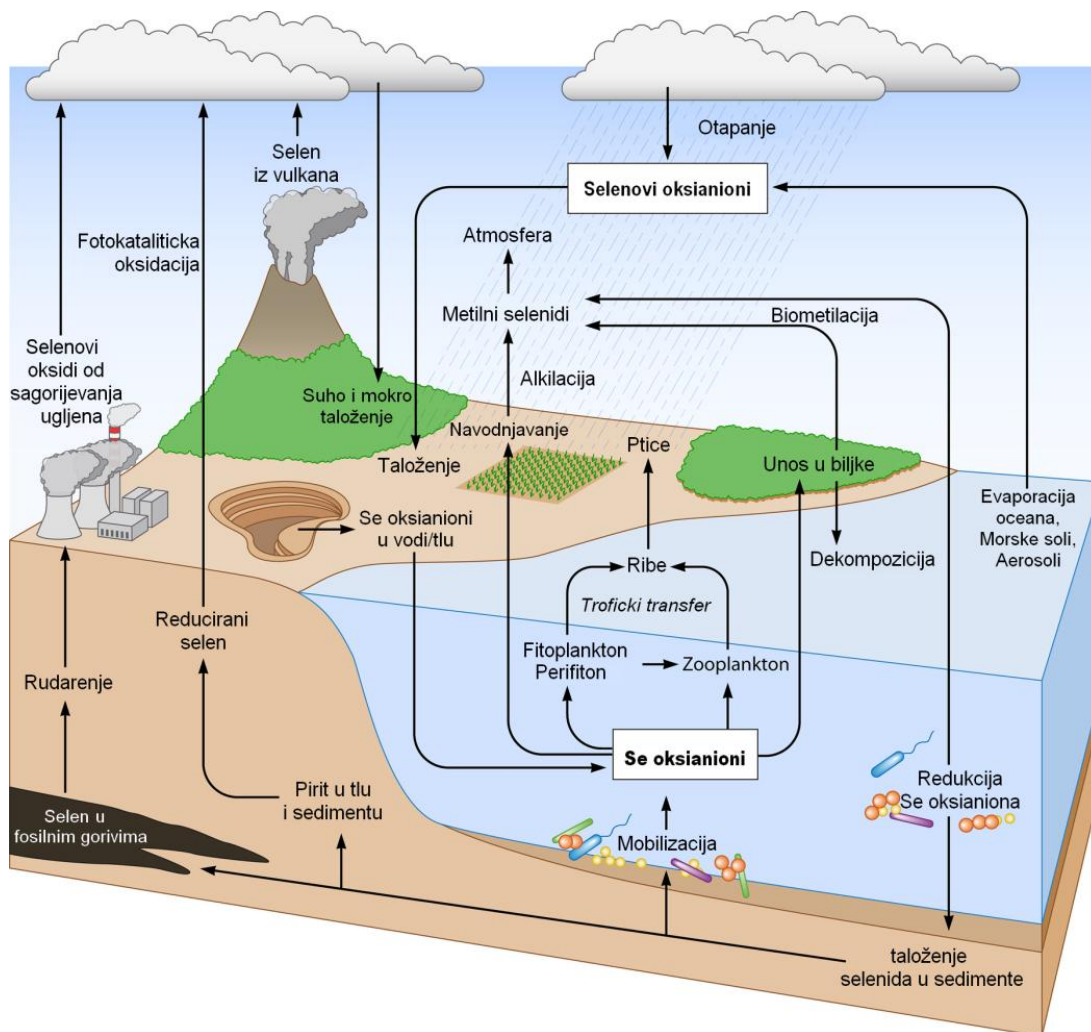
Selen (Selenij, simbol Se) je kemijski element s atomskim brojem 34 i atomskom masom od 78.96 amu (Silberberg i Amateis 2015), te spada u 16. skupinu periodnog sustava elemenata (Eswayah i sur. 2016), odnosno u halkogene elemente (Nancharaiah i Lens 2015). Pojavljuje se u obliku 6 različitih izotopa, od kojih su  $^{80}\text{Se}$  i  $^{78}\text{Se}$  najčešće nađeni na Zemlji (Nancharaiah i Lens 2015). Svrstava se u metaloide, te je kemijski sličan sumporu i teluriju. U prirodi se pojavljuje u +6, +4, 0, -2 oksidacijskim stanjima. U oksidacijskom stanju +6 se pojavljuje u obliku selenata ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), a u oksidacijskom stanju +4 u obliku selenita ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) (Oremland i sur. 2004). Ti selenovi oksianioni su stabilni, dobro topivi u vodi, potencijalno mobilni u oksičnim uvjetima, biološki lako dostupni i toksični. Elementarni selen ( $\text{Se}^0$ ) može postojati u različitim alotropskim modifikacijama (kristalni, metalan, amorfni). Elementarni selen se uglavnom smatra biološki nedostupnim zbog loše topivosti u vodi, ali u koloidalnom obliku može biti mobilan i postati biološki dostupan morskim organizmima. Elementarni selen je rijedak u prirodi. Selen u -2 oksidacijskom stanju, odnosno Se(-II), se pojavljuje u obliku selenida koji se može vezati s metalima u metaloselenide, ili s organskim tvarima u organoselenide (pr. selenoproteini). Selenid može biti i u metiliranoj formi. Metilirani oblici selenida su uglavnom hlapljivi. Postoji i vodikov selenid ( $\text{H}_2\text{Se}$ ) koji je vrlo hlapljiv i vrlo toksičan (strukturni analog  $\text{H}_2\text{S}$ ). Metalni selenidi su ograničene topivosti i oni su stoga manje mobilni u okolišu (Nancharaiah i Lens 2015).

Selen je ključan element u tragovima koji se nalazi u sve tri domene živih bića (bakterije, arheje, eukarioti), kao i virusa (Oremland i sur. 2004). Vodik, kisik, ugljik, dušik, fosfor, sumpor i selen neki navode kao dominantne komponente svih živih sustava (Nancharaiah i Lens 2015). Dio je seleno-aminokiselina kao što su selenometionin i selenocistein, koja je 21. genetički kodirana aminokiselina. Selenocistein je dio nekih prokariotskih enzima, kao što su format dehidrogenaze kod *E. coli* i rodova *Salmonella*, *Clostridium* i *Methanococcus*, glicin reduktaza kod nekih klostridija, te nekih hidrogenaza kod roda *Methanococcus*. U slučaju da je dostupno previše selena, stanica ugrađuje selen umjesto sumpora u stanične komponente (Eswayah i sur. 2016). Visoke koncentracije selena su toksične za većinu mikroorganizama, kao i za životinje kod kojih mogu uzrokovati teške poremećaje ili smrt. Toksičnost selena potječe upravo zbog toga što se selen ugrađuje umjesto sumpora u proteine koji imaju tiolne skupine (Stolz i Oremland 1999).

Postojanje ciklusa kruženja selena u prirodi je predložio Shrift 1964. godine. U prirodi selen kruži između oksičnih i anoksičnih staništa, te prelazi u različita oksidacijska stanja.

Distribucija različitih oblika selena (različitih oksidacijskih stanja) ovisi o prevladavajućim redoks uvjetima staništa. U prirodi je selen dostupan u organskim i anorganskim spojevima. Pojavljuje se u krutinama, tekućinama i plinovima (kao dio različitih spojeva). Nalazi se u svim prirodnim okolišima – stijenama, tlu, vodi i atmosferi. Selen ima nejednoliku distribuciju u Zemljinoj kori (Nancharaiah i Lens 2015). Potpuni ciklus selena u prirodi ovisi o geokemijskim i mikrobnim transformacijama selena i njegovih spojeva. Stopa redukcije selena i selenovih spojeva je veća od stope oksidacije selena i selenovih spojeva u prirodi (Bajaj i sur. 2012). Selenat i selenit, u kojima je selen u najoksidiranijem stanju, se prvenstveno nalaze u oksigeniranim okolišima (staništima), kao što su površinske vode. U anoksičnim i anaerobnim uvjetima se očekuje stvaranje elementarnog selena zbog prevladavajućih redukcijskih uvjeta. U vrlo reducirajućim uvjetima elementarni selen može biti još više reduciran u selenid, koji se veže s metalima u metaloselenide, ili s organskim tvarima u organoselenide. U prirodi se selenid uglavnom nalazi u obliku metaloselenida u mineralima, odnosno stijenama i sedimentima. Najčešći organoselenid je selenocistein. Selenid u obliku  $H_2Se$  je u uobičajenim uvjetima u plinovitom stanju i jako je reaktivan, te se u prisutnosti kisika spontano oksidira u elementarni selen. Metilirani selenovi spojevi su hlapljivi (Nancharaiah i Lens 2015). Najveći rezervoari selena na Zemlji su sumporne rude, pirit, ugljeni s velikom količinom sumpora (Nancharaiah i Lens 2015), škriljevci bogati ugljikom i fosforne stijene (Bajaj i sur. 2012). Geološki izvori (poput vulkanskih erupcija) i ljudska djelatnost (rudarenje, izgaranje fosilnih goriva, poljoprivredne djelatnosti) ispuštaju selen u okoliš (atmosferu, tlo i vodu) u obliku selenovih oksianiona –  $SeO_4^{2-}$  i  $SeO_3^{2-}$  (stabilni, topivi u vodi, mobilni u okolišu). Selen se asimilira kao esencijalni element, pretvorbom (uglavnom) iz selenovih oksianiona u organoselenide (selenoproteine) od strane mikroorganizama i biljaka na dnu hranidbene mreže, koji onda biva asimiliran na višim stupnjevima (zooplankton, razne životinje). Raspadanje i dekompozicija živih bića otpušta selen nazad u okoliš (Slika 1). Mikroorganizmi imaju ključnu ulogu u kruženju selena u prirodi. Razne bakterije i arheje metaboliziraju selen i provode različite reakcije na selenu, poput asimilacije, metilacije, detoksifikacije i anaerobne respiracije, odnosno redukcije i oksidacije. Neke bakterije i arheje mogu provoditi disimilatornu redukciju selenovih oksianiona, odnosno koristiti selenat i selenit kao konačan elektron akceptor i na taj ih način reducirati do elementarnog selena u anaerobnim uvjetima. Postoje bakterijski sojevi koji su sposobni reducirati selenove oksianione u elementarni selen u aerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima. Neki mikroorganizmi mogu elementarni selen ili selenove oksianione reducirati do topivih selenida. Selen-oksidirajuće bakterije mogu oksidirati selenid ili elementarni selen u

selenit ili selenat, a stopa oksidacije ovisi o koncentraciji (otopljenog) kisika. Stopa oksidacije je za 3 do 4 reda veličine manja od stope redukcije selena kod mikroorganizama (Nancharaiah i Lens 2015). Čak je poznata vrsta fotosintetske purpurne sumporne bakterije koja koristi oksidaciju elementarnog selena u  $H_2SeO_4$  kao jedini izvor energije (Eswayah i sur. 2016). Neki mikroorganizmi su sposobni koristiti selenove oksianione iz okoliša za stvaranje metiliranih spojeva selena, poput dimetilselenida i dimetildiselenida. Pošto su ti spojevi hlapljivi, ti mikroorganizmi imaju ulogu otpuštanja selena u atmosferu. Čini se da neke vrste bakterija mogu provoditi demetilaciju selenovih spojeva, stoga mogu koristiti dimetilselenid ili dimetildiselenid kao izvor energije. Predloženo je da bi neke metanogene i sulfat-reducirajuće bakterije mogle biti sposobne anaerobno transformirati dimetilselenid u metan, ugljikov dioksid i  $H_2Se$  (Eswayah i sur. 2016). Se-respirirajuće bakterije imaju ključnu ulogu u ciklusu selena u prirodi. Se-reducirajuće bakterije također utječu na ciklus ugljika, dušika i fosfora u prirodi (Nancharaiah i Lens 2015).



**Slika 1.** Ciklus kruženja selena u prirodi. Preuzeto iz Nancharaiah i Lens (2015) i prevedeno.

### 3. BAKTERIJSKA REDUKCIJA SELENOVIH OKSIANIONA

Različite vrste bakterija su sposobne živjeti i umnažati se u područjima zagađenima selenovim spojevima, jer mogu reducirati toksične selenove oksianione – selenat ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) i selenit ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) do elementarnog selena ( $\text{Se}^0$ ), koji onda biva izbačen iz stanice ili se odmah akumulira izvan stanice u obliku selenovih nanosfera. Se reducirajuće bakterije su nađene i u netaknutim i u kontaminiranim vodenim okolišima i tlima na različitim geografskim područjima. Žive i na mjestima gdje koncentracija selenovih oksianiona nije prevelika (Nancharaiah i Lens 2015). Smatra se da je bakterijska redukcija selenovih oksianiona ili u svrhu respiracije u anaerobnim uvjetima (disimilatorna redukcija), ili način detoksifikacije, ili “nusprodukt” enzima koji u tih vrsta obavljaju drugu funkciju (Eswayah i sur. 2016). Bakterijska redukcija selenovih oksianiona se može provoditi i u anaerobnim i u aerobnim uvjetima, ali ju provode različite skupine različitim mehanizmima, s različitom svrhom (Nancharaiah i Lens 2015). Neke bakterijske vrste, poput soja *Shewanella oneidensis* MR-1 i bakterije *Rhodobacter sphaeroides*, su sposobne provoditi redukciju selenovih oksianiona i u anaerobnim i u aerobnim uvjetima (Eswayah i sur. 2016). Postoje bakterijski sojevi koji su sposobni reducirati selenove oksianione u elementarni selen u aerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima postupkom detoksifikacije, ili redoks homeostazom kod fototrofnih bakterija (Nancharaiah i Lens 2015). Mehanizmi aerobne bakterijske redukcije selenovih oksianiona nisu još sasvim razjašnjeni. Do danas je većina istraživanja bila usmjerena na bakterije koje reduciraju selen i stvaraju selenove nanosfere u anaerobnim i anoksičnim uvjetima, stoga je poznavanje vrsta koje su sposobne provoditi te reakcije u aerobnim uvjetima vrlo ograničeno. Poznate takve vrste uglavnom spadaju u rodove *Pseudomonas* i *Bacillus*, kao što su *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *B. megaterium* (Bajaj i sur. 2012). Poznato je da su neke sulfat-reducirajuće bakterije sposobne reducirati značajne količine selenata u anaerobnim uvjetima, pri čemu se ne povećava broj tih bakterija. Neke fototrofne bakterije mogu provoditi redukciju selenata u anaerobnim uvjetima. Poznat je veći broj bakterija koji je sposoban koristiti disimilatornu redukciju selenovih oksianiona u procesu proizvodnje energije, odnosno koje koriste selenove oksianione kao terminalne akceptore elektrona u anaerobnoj respiraciji. Anaerobna respiracija selenovih oksianiona je najvažniji proces nad selenom u okolišu (Nancharaiah i Lens 2015).

Redukcijski potencijal za redukciju  $\text{SeO}_4^{2-}$  u  $\text{SeO}_3^{2-}$  ( $\text{SeO}_4^{2-} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{SeO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ ) je +0.48 V, što je manje od redukcijskog potencijala za konverziju  $\text{NO}_3^-$  u  $\text{N}_2$  (+0.75) i redukcijskog potencijala za konverziju  $\text{MnO}_2$  u  $\text{Mn}^{2+}$  (+0.53), ali je veći od redukcijskog



potencijala za konverziju  $\text{NO}_3$  u  $\text{NH}_4$  (+0.36). Redukcijski potencijal za redukciju  $\text{SeO}_3^{2-}$  u  $\text{Se}^0$  ( $\text{SeO}_3^{2-} + 4e^- + 6\text{H}^+ \rightarrow \text{Se}^0 + 3\text{H}_2\text{O}$ ) je manji od svijih prije navedenih (+0.21), ali je veći od redukcijskih potencijala za konverziju  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  (+0.10),  $\text{SO}_4^{2-}$  u  $\text{SO}_3^{2-}$  (-0.516), i  $\text{Se}^0$  u  $\text{HSe}^-$  (-0.73). Izračuni slobodnih Gibbsovih energija s  $\text{H}_2$  kao elektron donorom pokazuju da su redukcije selenovih oksianiona energetski povoljni procesi i mogu biti važan mehanizam za održavanje energije u prirodnim okruženjima za neke mikroorganizme (Nancharaiah i Lens 2015).

Različiti mikroorganizmi koji disimilatorno reduciraju selen kao donore elektrona mogu koristiti razne organske spojeve poput alkohola, šećera, organskih kiselina, ali i vodik (Eswayah i sur. 2016). Treba napomenuti da bakterije koje spajaju oksidaciju organskih spojeva (alifatskih i aromatskih) s redukcijom selenovih oksianiona imaju ulogu u ciklusu ugljika u prirodi. Se-reducirajuće bakterije oksidiraju u nekim prirodnim anaerobnim okolišima produkte fermentacije i neke druge organske spojeve do  $\text{CO}_2$  i pritom reduciraju selenove oksianione. Nisu poznate Se-respirirajuće bakterije koje oksidiraju duge lance ugljika. Mnoge bakterije koje respiriraju selenove oksianione su sposobne koristiti i druge spojeve kao elektron akceptore poput nitrata, nitrita, arsenata, ali i organskih tvari poput fumarata (Nancharaiah i Lens 2015).

Postoje i bakterije koje mogu reducirati selenove oksianione do Se(-II), ali je poznato samo nekoliko vrsta bakterija koje su za to sposobne, kao što su *Salmonella enterica*, *Micrococcus lactilyticus*, *Clostridium pasteurianum*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Thaurea selenatis* AX i *Veillonella atypica* (Nancharaiah i Lens 2015).

### 3.1. BAKTERIJSKA REDUKCIJA SELENATA

Različiti mikroorganizmi su razvili sposobnost korištenja  $\text{SeO}_4^{2-}$  kao konačnog elektron akceptora u anaerobnoj respiraciji. Pri respiraciji selenata u anaerobnim uvjetima  $\text{SeO}_4^{2-}$  se transformira u  $\text{SeO}_3^{2-}$ , pa onda u  $\text{Se}^0$ . Pojava  $\text{Se}^0$  se može primijetiti (u pokusima) kao pojava žarko crvene boje u otopini (Nancharaiah i Lens 2015). Jednadžbe koje prikazuju redukciju selenata kod mikroorganizama su:



Slike postignute transmisijskim elektronskim mikroskopom selenat respirirajućih bakterija su pokazale da se pri respiraciji selenata stvaraju nanosfere elementarnog selena unutar bakterijskih stanica i izvan njih u izvanstaničnom mediju. Selen mora moći ulaziti u stanicu pošto je esencijalni element, ali velike koncentracije selenovih oksianiona su toksične, pa ako ih bakterija reducira u elementarni selen on se u višku mora precipitirati unutar stanice bakterije što najvjerojatnije predstavlja problem za samu stanicu. Anaerobna respiracija selenata sveukupno obuhvaća postupak redukcije selenata (selenat u selenit te on u elementarni selen) te formiranja nanosfera elementarnog selena. Postupak formiranja selenovih nanosfera i način njihove sekrecije su slabo proučeni. Mehanizam redukcije selenata je primarno proučavan kod vrsta *Thauera selenatis* i *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 koje su Gram-negativne bakterije, te kod Gram-pozitivne bakterije *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 (Nancharaiah i Lens 2015).

*Thauera selenatis* spada u betaproterobakterije, sposobna je reducirati selenat u elementarni selen i izolirana je iz voda koje sadrže selen u višim koncentracijama iz područja Joaquin Valley, Kalifornija. Redukcijom stvara unutarstanične i izvanstanične nanosfere crvenog elementarnog selena. Istraživanja su pokazala da se enzim selenat reduktaza (kratica Ser) ove vrste nalazi u periplazmatskom prostoru. Taj enzim katalizira redukciju selenata u selenit, trimerni je molibdoenzim zvan SerABC selenat reduktaza. Reakcija redukcije se odvija u periplazmatskom prostoru bakterije. SerABC se sastoji od: katalitičke podjedinice SerA (96kDa), željezo-sumpor proteina SerB (40 kDa), hem b proteina SerC (23 kDa) i molibden-kofaktora. SerA i SerB imaju cistein bogat motiv. SerB sadrži jedan [3Fe-4S] klaster i tri [4Fe-4S] klastera. Citokrom  $c_4$  (cytc4) unutar periplazmatskog prostora prenosi elektrone do SerC. Smatra se da elektrone citokromu  $c_4$  predaje kinol citokrom c oksidoreduktaza (kratica QCR) koja nabavlja elektrone za redukciju  $\text{SeO}_4^{2-}$ , ali da istu ulogu može imati/ima i kinol dehidrogenaza (kratica QDH). To je testirano inhibitorima tako što je umnažanje *T. selenatis* djelomično zaustavljeno inhibitorom za QCR, a redukcija selenata je

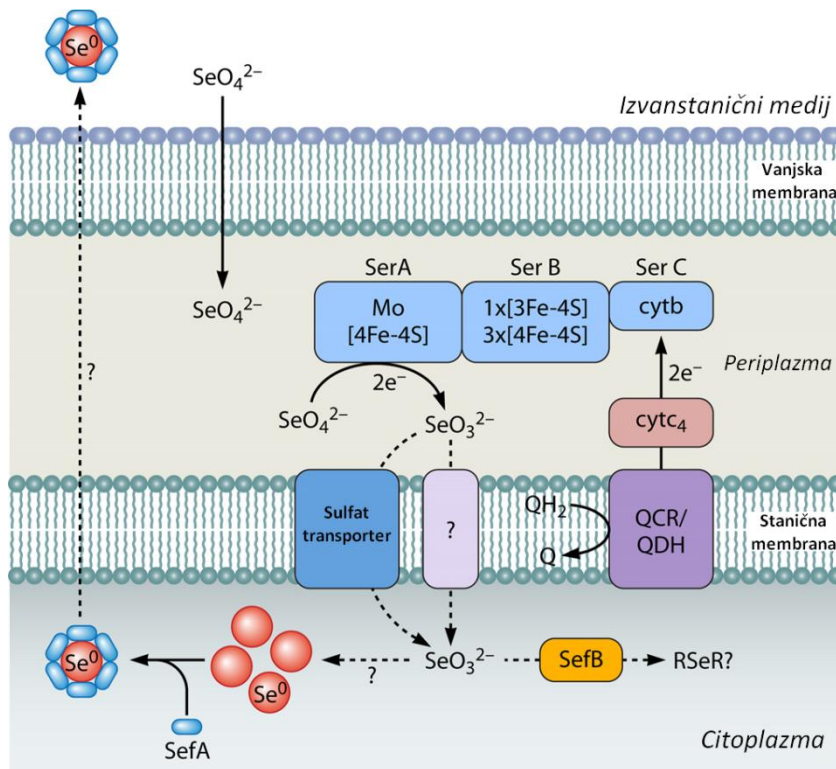
potpuno inhibirana tek kad je *T. selenatis* izložena i inhibitoru za QCR i inhibitoru za QDH. QCR i QDH se oba nalaze unutar unutarnje stanične membrane. Još je pronađen i citoplazmatski SerD protein koji bi mogao imati ulogu šaperona koji umeće molibden kofaktor u SerA. Ovaj model prijenosa elektrona objašnjava redukciju  $\text{SeO}_4^{2-}$  u  $\text{SeO}_3^{2-}$ , ali ne i daljnju redukciju selenata u elementarni selen. Neki smatraju da se nastali  $\text{SeO}_3^{2-}$  prenosi u citoplazmu uz pomoć sulfat transportera i tamo reducira u  $\text{Se}^0$  tiol-posredovanom detoksifikacijom. Druga ideja za redukciju selenita je detoksifikacija u metilirani oblik selenida R-Se-R (Nancharaiah i Lens 2015). Prikaz ovog procesa je na slici 2. Eswayah i sur. (2016) navode (izvor im je istraživanje iz 1993.) da se većina  $\text{SeO}_3^{2-}$  proizvedena redukcijom  $\text{SeO}_4^{2-}$  kod *T. selenatis* ne reducira u elementarni selen ako je  $\text{SeO}_4^{2-}$  jedini dostupni elektron akceptor, ali da se sav  $\text{SeO}_3^{2-}$  reducira u  $\text{Se}^0$  ako je kao elektron akceptor dostupan i  $\text{NO}_3^-$ . Također navode da mutanti *T. selenatis* koji nemaju nitrat reduktazu ne mogu reducirati  $\text{SeO}_3^{2-}$  (niti  $\text{NO}_3^-$ ), a mutanti s pojačanom aktivnošću nitrat reduktaze pokazuju ubranu redukciju  $\text{SeO}_3^{2-}$  (i  $\text{NO}_3^-$ ), što implicira da je za redukciju  $\text{SeO}_3^{2-}$  kod *T. selenatis* potrebna nitrat reduktaza (Eswayah i sur. 2016). Otkriven je i protein zvan selen faktor A (SefA) koji ima ulogu u stabilizaciji selenovih nanosfera tako da sprječava njihovu agregaciju, a možda pomaže i u njihovoj sekreciji (Nancharaiah i Lens 2015).

*Enterobacter cloacae* SLD1a-1 je  $\text{SeO}_4^{2-}$ -respirirajuća bakterija izolirana iz voda bogatih selenom iz odvoda San Luis u Kaliforniji. Predpostavlja se da je njena  $\text{SeO}_4^{2-}$  reduktaza trimerni kompleks s katalitičkom jedinicom od 100 kDa, te da je molibdoenzim (nađen je molibden u pročišćenom enzimu, te je reduktazna aktivnost *E. cloacae* SLD1a-1 inhibirana tungstenatom, a aktivirana molibdatom). Ta reduktaza se nalazi u unutarnjoj staničnoj membrani s aktivnim mjestom enzima okrenutim prema periplazmatskom prostoru (Nancharaiah i Lens 2015). Sadrži molibden, hem i ne-hem željezo u svojim prostetičkim grupama (Eswayah i sur. 2016). Redukcija selenata u elementarni selen se događa unutar periplazmatskog prostora i nanosfere elementarnog selena se izlučuju u izvanstanični prostor. Kod *E. cloacae* SLD1a-1 nije primijećeno stvaranje intracelularnih nanosfera selena prilikom respiracije selenata (Nancharaiah i Lens 2015). Mogući način prijenosa elektrona kod *E. cloacae* SLD1a-1 prikazana je na Slici 3. *E. cloacae* SLD1a-1 je fakultativni anaerob i može provoditi redukciju selenata i u aerobnim uvjetima. Selenat reduktaza ovog soja, osim na selenatu, pokazuje aktivnost i na kloratu i bromatu, ali ne i na nitratu. Selenat reduktaza ovog soja je kontrolirana na razini gena globalnim anaerobnim fumarat nitrat redukcija (FNR) regulatorom i inducira se pri uvjetima niskih koncentracija kisika (Eswayah i sur. 2016).

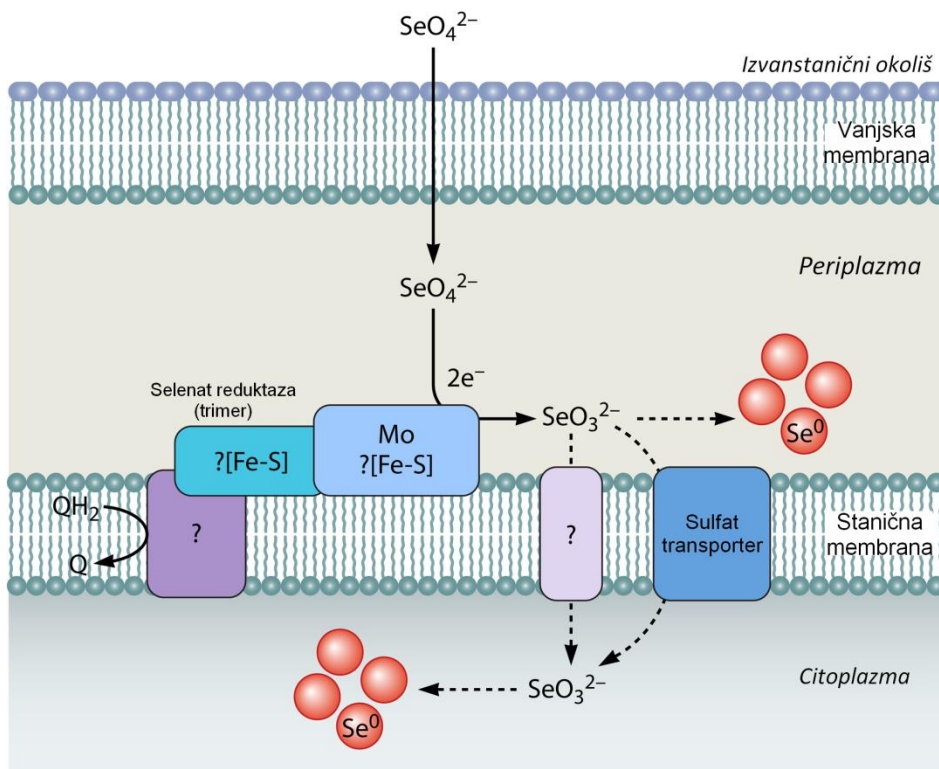
Selenat reduktaze vrsta *T. selenatis* i *E. cloacae* SLD1a-1 su slične: obje imaju aktivno mjesto u periplazmatskom prostoru, oboje su molibdoenzimi i imaju katalitičke podjedinice sličnih veličina, te obje imaju kao dio citokrome b-tipa (Eswayah i sur. 2016).

*Bacillus selenatarsenatis* SF-1 je Gram-pozitivna bakterija koja je izolirana iz sedimenta otpadnih voda tvornice stakla.  $\text{SeO}_4^{2-}$ -reduktaza ovog soja je trimerni molibdoenzim vezan na staničnu membranu. Elektroni iz kinol bazena ( $\text{QH}_2$ ) se prenose na podjedinicu SrdC, s nje na željezo-sumpor protein SrdB (4[4Fe-4S] klastera), a s njega na katalitičku podjedinicu SrdA. Elektroni se prenose na  $\text{SeO}_4^{2-}$  sa SrdA preko molibden-kofaktora. Aktivni dio enzima je na strani prema izvanstaničnom prostoru. Konačni produkt redukcije selenata je elementarni selen koji se u obliku nanosfera ispušta u izvanstanični medij (Nancharaiah i Lens 2015). Slika 4 prikazuje opisani mogući tok elektrona.

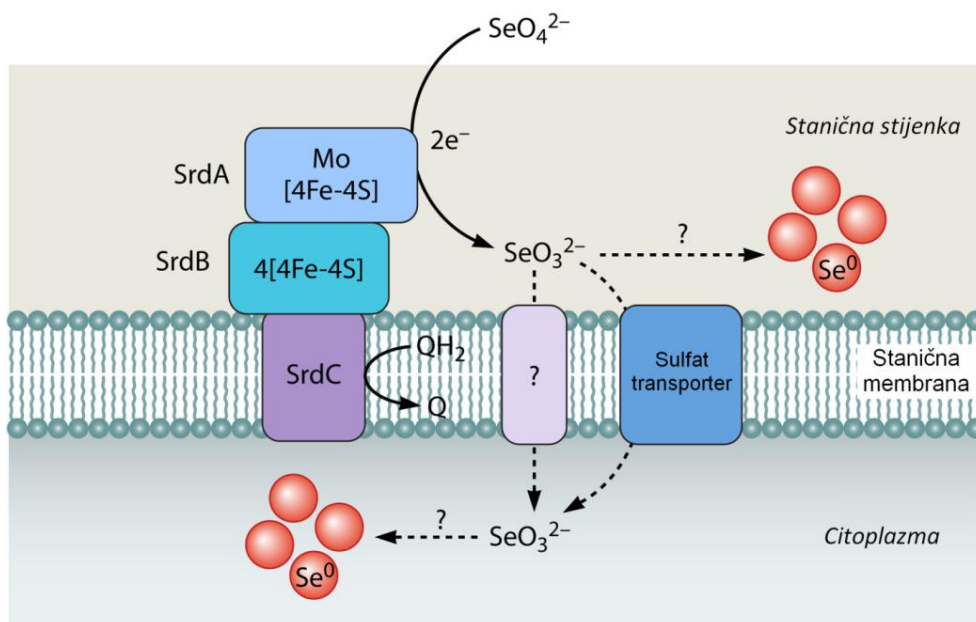
Postoje indicacije da kod vrste *Sulfurospirillum barnesii*, koja je Se-respirirajuća bakterija sposobna reducirati selenat, u putu transporta elektrona sudjeluju hidrogenaza ovisna o niklu i aldehyd feredoksin oksidoreduktaza. Uloga feredoksina kao elektron transportera pri redukciji selenata je dokazana kod roda *Synechocystis* (Lenz i sur. 2011).



**Slika 2.** Selenat redukcija kod vrste *Thauera selenatis* – mogući put transporta elektrona. QCR – kinol citokrom c oksidoreduktaza; QDH – kinol dehidrogenaza; SerA, SerB, SerC – podjedinice selenat reduktaze; cyt c4 – citokrom c4; SefA/B – selen faktor A/B. Isprekidane crte i upitnici predstavljaju nerazjašnjene procese. Slika preuzeta iz Nancharaiah i Lens (2015.) i prilagođena.



**Slika 3.** Redukcija selenata kod soja *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 – Mogući model puta transporta elektrona. Isprekidane crte i upitnici označavaju nerazjašnjene procese. Slika preuzeta iz Nancharaiah i Lens (2015.) i prilagođena.



**Slika 4.** Redukcija selenata kod soja *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 – Mogući put transporta elektrona. SrdA, SrdB i SrdC – podjedinice selenat reduktaze. Isprekidane crte i upitnici označavaju nerazjašnjene procese. Slika preuzeta iz Nancharaiah i Lens (2015.) i prilagođena.

### 3.2. BAKTERIJSKA REDUKCIJA SELENITA

Redukciju  $\text{SeO}_3^{2-}$  mogu provoditi različite bakterije. Nancharaiah i Lens (2015.) navode da bi se redukcija selenita kod bakterija mogla podijeliti na detoksifikaciju i anaerobnu respiraciju. Detoksifikacija  $\text{SeO}_3^{2-}$  u  $\text{Se}^0$  može biti postignuta na različite načine, odnosno različitim mehanizmima. Neke vrste koje mogu reducirati selenat mogu koristiti i selenit kao konačan akceptor elektrona. Redukcija  $\text{SeO}_3^{2-}$  u  $\text{Se}^0$  je energetski povoljna reakcija. Stopa redukcije selenita, kao i svojstva bioreduciranog selena (odnosno nanočestica selena) ovise o redukcijskom mehanizmu, kao i o vrsti bakterije koja provodi redukciju. Modelni organizmi za fiziologiju i biokemiju selenit respirirajućih bakterija su *Shewanella oneidensis* MR-1 i *Veillonella atypica* (Nancharaiah i Lens 2015).

Predloženo je nekoliko mehanizama redukcije selenita do elementarnog selena, a to su: reakcije Painter-tipa s tiolinim grupama glutaciona, sustav tioredoksina i tioredoksin reduktaze, reakcija posredovana sideroforima, sulfid-posredovana reakcija, disimilatorna redukcija, rad različitih respiratornih reduktaza (Nancharaiah i Lens 2015).

Painter tip reakcije. Nancharaiah i Lens (2015.) navode da je Painter je primijetio veliku reaktivnost između  $\text{SeO}_3^{2-}$  i tiola koji zajedno stvaraju selenotrisulfid, odnosno spoj oblika RS-Se-SR. Predložena jednadžba je:  $4\text{RSH} + \text{SeO}_3^{2-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{RS-Se-SR} + \text{RSSR} + 3\text{H}_2\text{O}$ . Nakon toga je predložena analogna reakcija između reduciranog glutaciona (GSH) i  $\text{SeO}_3^{2-}$ , i dokazano je nastajanje selenotrisulfida glutaciona, odnosno GS-Se-SG, koji je kasnije preimenovan u selenodiglutation. Selenodiglutation se konvertira u selenopersulfid anion ( $\text{GS-Se}^-$ ) uz pomoć NADPH-glutation reduktaze. Selenopersulfid anion je nestabilan intermedijer koji biva hidroliziran u elementarni selen i GSH. Kasnije je primijećeno nastajanje superoksida za vrijeme redukcije selenita mehanizmom glutaciona kod vrste *Escherichia coli* uzgajane u prisustvu  $\text{SeO}_3^{2-}$ , pa je jednadžba modificirana u:  $6\text{GSH} + 3\text{SeO}_3^{2-} \rightarrow 3\text{GS-Se-SG} + 3\text{O}_2^- + 3\text{H}_2\text{O}$ . Zatim nastaje selenopersulfid anion:  $\text{GS-Se-SG} + \text{NADPH} \rightarrow \text{GSH} + \text{GS-Se}^- + \text{NADP}^+$ , te na kraju nastanak elementarnog selena:  $\text{GS-Se}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{GSH} + \text{Se}^0$  (Nancharaiah i Lens 2015).

Tioredoksin i tioredoksin reduktaza sustav. Reducirani tioredoksin reagira sa selenodiglutationom (nastanak prije opisan) i nastaju oksidirani tioredoksin, reducirani glutacion i selenopersulfid anion. Selenopersulfid anion se hidrolizira u elementarni selen i GSH (kao i prije opisano). Oksidirani tioredoksin se nazad reducira uz pomoć NADPH koji se oksidira u  $\text{NADP}^+$  (Nancharaiah i Lens 2015).

Sulfid-posredovana reakcija. Selenit može reagirati s reaktivnim biogenim sulfidima i abiotički proizvesti elementarni selen i elementarni sumpor, što je prikazano reakcijom:

$\text{SeO}_3^{2-} + 2\text{HS}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow \text{Se}^0 + 2\text{S}^0 + 3\text{H}_2\text{O}$  (Nancharaiah i Lens 2015).

Siderofor-posredovana reakcija. Željezov siderofor zvan piridin-2,6-bis(tiokarboksilna kiselina), ili skraćeno PDTC, kojeg proizvodi *Pseudomonas strutzeri* KC, se smatra mogućim mehanizmom detoksifikacije selenita. PDTC se hidrolizira na dipikolinsku kiselinu i  $\text{H}_2\text{S}$ , a onda  $\text{H}_2\text{S}$  reducira  $\text{SeO}_3^{2-}$  u  $\text{Se}^0$  (Nancharaiah i Lens 2015).

Respiratorne reduktaze. Razne respiratorne reduktaze, poput nitrit reduktaze, sulfid reduktaze, hidrogenaze 1, mogu kod nekih vrsta podpomoći redukciju  $\text{SeO}_3^{2-}$ . To je primijećeno i kod *T. selenatis* AX (Nancharaiah i Lens 2015).

Disimilatorna redukcija. Nancharaiah i Lens (2015.) navode da (do tada) postoji samo jedno istraživanje koje detaljno proučava redukciju  $\text{SeO}_3^{2-}$  preko respiratornog lanca elektrona, a ono je provedeno na bakteriji zvanoj *Shewanella oneidensis* MR-1. Kod soja *Shewanella oneidensis* MR-1 je predloženo da postoji veza između redukcije selenita i anaerobne respiracije, jer mutanti koji nemaju sposobnost redukcije selenita se nisu mogli umnažati u anaerobnim uvjetima koristeći  $\text{Fe(III)}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mn(IV)}$  ili fumarat kao jedine elektron-akceptore pri respiraciji. Pokazano je da redukcija selenata kod *S. oneidensis* MR-1 nije u vezi s nitrit i nitrat reduktazom, ali dosta ovisi o fumarat reduktazi. Smatra se da oksidacijom laktata elektroni prelaze na NADH koji preko NADH dehidrogenaze predaje elektrone u kinolni bazen (engl. quinol pool) i onda na CymA (Nancharaiah i Lens 2015). CymA je citokrom c-tipa usidren u membranu (Eswayah i sur. 2016). CymA predaje elektrone fumarat reduktazi koja reducira  $\text{SeO}_3^{2-}$  u  $\text{Se}^0$  (Slika 5). CymA inače sudjeluje u prijenosu elektrona i na druge respiratorne reduktaze kod ove bakterije. Redukcija  $\text{SeO}_3^{2-}$  u elementarni selen se događa unutar periplazmatskog prostora. Kod *S. oneidensis* MR-1 se ne zna da li redukcija selenata omogućava respiraciju bakterije ili ona respirira uz pomoć drugih elektron akceptora, a da je redukcija selenata proces nastao uz pomoć postojećih reduktaza i pomaže detoksifikaciji bakterije jer ne dopušta ulazak selenita u citoplazmu (Nancharaiah i Lens 2015).

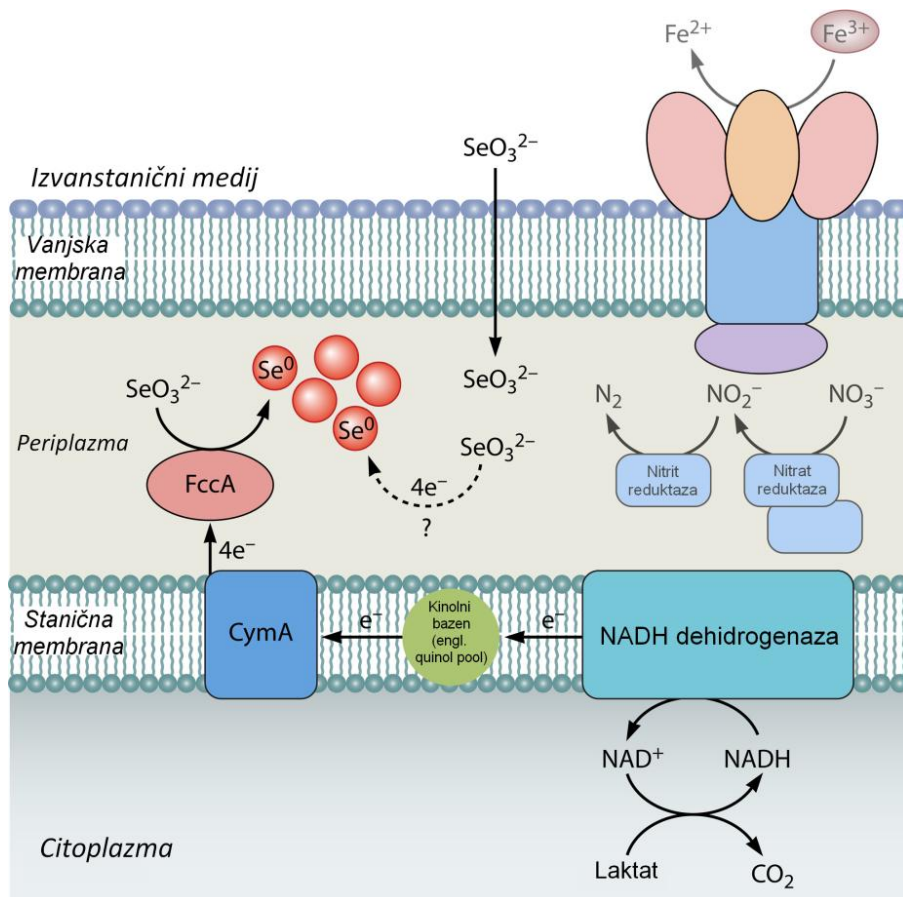
Primjeri bakterija koje reduciraju selenit. *Pseudomonas seleniipraecipitans* soj CA-5 je bakterija sposobna reducirati i selenat i selenit u elementarni selen. Taj soj je rezistentan na velike koncentracije selenita (>150 mM). Kod tog soja su nađene dvije reduktaze koje su sposobne reducirati  $\text{SeO}_3^{2-}$  u  $\text{Se}^0$  u prisutnosti NADPH, te se smatra da su to najvjerojatnije glutathion reduktaza i tioredoksin reduktaza. Princip njihovog sudjelovanja u redukciji selenita je najvjerojatnije na način Painter-tipa reakcije (Eswayah i sur. 2016). Kod vrste *Rhizobium selenitireducens* se smatra da protein koji spada u flavoproteine ima sposobnost redukcije  $\text{SeO}_3^{2-}$  u  $\text{Se}^0$  koristeći NADH kao elektron-donor (Eswayah i sur. 2016). *Veillonella atypica*

može reducirati  $\text{SeO}_3^{2-}$  kada ima  $\text{H}_2$  kao elektron donor, i to s velikom stopom redukcije (ako je laktat elektron donor onda je malo selenita reducirano, a ako su kao donori stavljeni acetat ili format nije došlo do redukcije u pokusima). *V. atypica* u pokusima može reducirati selenit u crveni elementarni selen, a zatim u bezbojni selenid. Nancharaiah i Lens (2015.) navode kako su Pearce i sur. (2009.) uspoređivali redukciju  $\text{SeO}_3^{2-}$  kod vrsta *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis* i *V. atypica*, gdje su zaključili da *V. atypica* najučinkovitije provodi redukciju  $\text{SeO}_3^{2-}$  u  $\text{Se}^0$ , te da su pretpostavili da kod *G. sulfurreducens* i *S. oneidensis* postoji kristalni intermedijer kojeg kod vrste *V. atypica* nema u procesu redukcije (Nancharaiah i Lens 2015).

Bajaj i sur. (2012.) su otkrili dva soja roda *Duganella* i dva soja roda *Agrobacterium* izoliranih iz selenom zagađenih tala iz područja Punjaba u Indiji, koji su bili sposobni reducirati selenit i stvarati nanosfere selenata u aerobnim uvjetima (kad su imali dostupnu glukozu). Bakterije oba soja roda *Duganella* su se bile sposobne umnažati i u određenim koncentracijama selenata (40 mg/L), ali su selenat reducirali u jako malom postotku. Sojevi roda *Duganella* su se pokazali učinkovitijima u reduciranju selenita od sojeva roda *Agrobacterium*. Oba soja iz oba roda su proizvodili izvanstanične savršeno okrugle nanočestice čistog selenata, dok unutarstanične nanočestice nisu uočene (Bajaj i sur. 2012).

Dhanjal i Cameotra (2010.) su izolirali bakteriju vrste *Bacillus cereus* iz tla rudnika ugljena koji se nalazi u gradu Asansol u Indiji, koja je imala sposobnost reducirati selenit i stvarati unutarstanične i izvanstanične nanosfere selenata u aerobnim uvjetima. Predpostavljaju da redukciju selenita provodi reduktaza ili različite reduktaze vezane za membranu, te da su izvor elektrona za redukciju molekule NADPH ili NADH. Mehanizam redukcije selenita u aerobnim uvjetima nije još potpuno razjašnjen (Dhanjal i Cameotra 2010).





**Slika 5.** Predloženi put prijenosa elektrona pri anaerobnoj redukciji selenita kod bakterije *Shewanella oneidensis* MR-1.

FccA – fumarat reduktaza; CymA – citokrom c tipa. Isprekidane crte i upitnici označavaju nerazjašnjene procese.

Slika preuzeta iz Nancharaiah i Lens (2015.) i prilagođena.

#### 4. METILACIJA SELENA I SELENOVIH OKSIANIONA

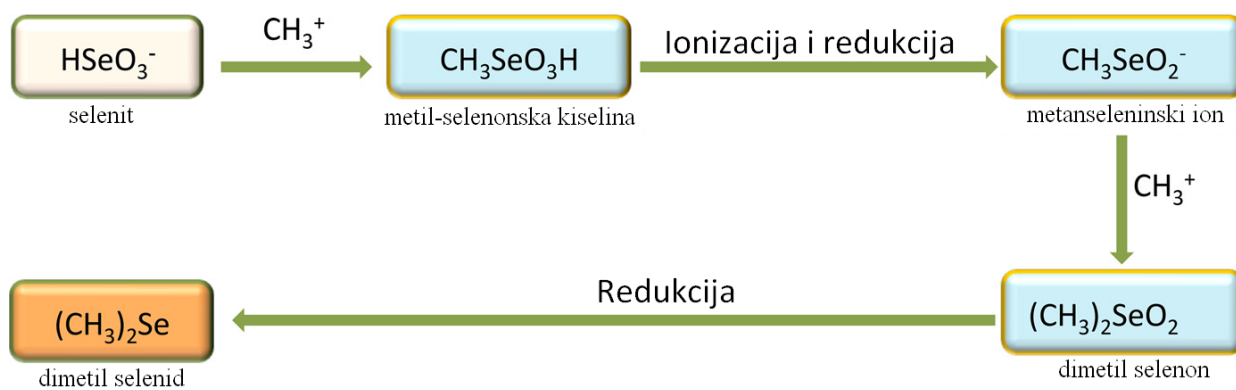
Neki mikroorganizmi su sposobni koristiti  $\text{SeO}_3^{2-}$  i  $\text{SeO}_4^{2-}$  iz okoliša i stvarati metilirane spojeve selena, poput dimetilselenida i dimetildiselenida. Ti spojevi su hlapljivi te bakterije koje to provode imaju ulogu u ciklusu selena u prirodi tako što otpuštaju selen u atmosferu. Takvi mikroorganizmi su nađeni na mjestima poput tla, kanalizacijskog mulja i vode. Kao izvor selena osim  $\text{SeO}_3^{2-}$  i  $\text{SeO}_4^{2-}$ , neki mikroorganizmi mogu koristiti i selenocistein i selenometionin. Metilirani spojevi selena koje razni mikroorganizmi proizvode, osim dimetilselenida ( $\text{CH}_3\text{SeCH}_3$ ) i dimetildiselenida ( $\text{CH}_3\text{SeSeCH}_3$ ), su dimetil selenon ( $(\text{CH}_3)_2\text{SeO}_2$ ), dimetil-triselenid ( $\text{CH}_3\text{SeSeSeCH}_3$ ), dimetil-selenil-sulfid ( $\text{CH}_3\text{SeSCH}_3$ ), dimetil-selenil-disulfid ( $\text{CH}_3\text{SeSSCH}_3$ ) i dimetil-diselenil-sulfid ( $\text{CH}_3\text{SeSeSCH}_3$ ) (Eswayah i sur. 2016).

Ako je izvor selena neki od selenovih oksianiona ili elementarni selen, onda mora doći i do redukcije selena i do metilacije. Danas postoji više predloženih puteva biometilacije. Identificirane su različite metiltransferaze koje su sposobne metilirati selenove spojeve (Eswayah i sur. 2016).

Istraživanje provedeno na Se-rezistentnoj bakteriji *Pseudomonas fluorescens* K27 je pokazalo da je otpuštena veća količina dimetilselenida i dimetildiselenida kada je kulturi dodan dimetil selenon, nego kada je izvor selena  $\text{SeO}_4^{2-}$ . To implicira da je dimetil selenon možda intermedijer u procesu redukcije i metilacije selenovih oksianiona. Eswayah i sur. (2016) navode da se to slaže s putem metilacije kojeg je predložio Challenger (put metilacije kojeg provode gljive) koji se sastoji od 4 koraka (Slika 6). Postoji i preinaka Challengerovog puta za mikrobnu metilaciju selenovih spojeva, gdje se  $\text{CH}_3\text{SeO}_2^-$  može, osim u dimetil selenon, prevesti u  $\text{CH}_3\text{SeH}$  ili  $\text{CH}_3\text{SeOH}$  te iz jednog od njih u dimetildiselenid (Eswayah i sur. 2016).

Eswayah i sur. (2016) navode put koji je predložio Doran za metilaciju inorganskog selena od strane *Corynebacterium* gdje predlaže da se selenit prvo reducira u  $\text{Se}^0$ , a onda tek metilira do dimetilselenida. Smatra se da bi selenovodik i  $\text{CH}_3\text{SeH}$  mogli biti intermedijeri u tom procesu (Eswayah i sur. 2016).

Bakterijska tiopurin metiltransferaza iz vrste *Pseudomonas syringae*, koja katalizira reakcije transfera metilne skupine koristeći S-adenozilmetionin kao donor metilne skupine, je dodana vrsti *Escherichia coli* koja je time dobila sposobnost proizvoditi dimetilselenid iz selenita. Poznata je i metiltransferaza iz vrste roda *Hydrogenophaga* koja također daje *E. coli* sposobnost stvaranja metiliranih selenovih spojeva (Eswayah i sur. 2016).



**Slika 6.** Challengerov put metilacije selena kod mikroorganizama. Pruzeto iz Eswayah i sur. (2016) i prevedeno.

## 5. NANOSFERE SELENA

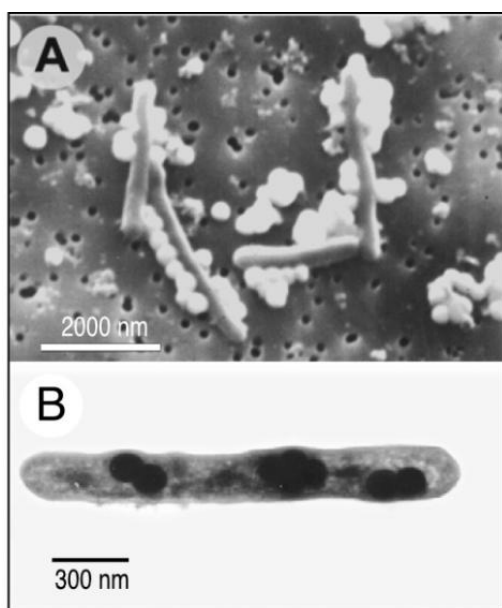
Kao što je već rečeno, neke anaerobne bakterije mogu respirirati toksične selenove oksianione i pri tom stvarati izvanstanične, ali i unutarstanične akumulacije elementarnog selena u obliku selenovih nanosfera (Oremland i sur. 2004). Neke od njih su *Thauera selenatis*, *Enterobacter cloacae* SLD1a-1, *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 (Nancharaiah i Lens 2015), *Sulfurospirillum barnesii*, *Bacillus selenitireducens*, *Selenihalanaerobacter shriftii* (Oremland i sur. 2004). Osim anaerobnih Se-reducirajućih bakterija, i neke aerobne bakterije (poput *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Bacillus megaterium*) su sposobne stvarati nanočestice selena (Bajaj i sur. 2012).

Oremland i sur. (2004) su provodili pokus gdje su bakterije vrsta *Sulfurospirillum barnesii*, *Bacillus selenitireducens*, *Selenihalanaerobacter shriftii* izložili višim koncentracijama selenovih oksianiona kako bi proučavali svojstva proizvedenih nanosfera i usporedili ih međusobno, kao i sa svojstvima čestica elementarnog selena sintetiziranog kemijskom oksidacijom  $H_2Se$  i svojstvima čestica crnog, staklastog elementarnog selena kemijski stvorenog redukcijom selenita s askorbatom. Bakterije su proizvele izvanstanične granule sastavljene od stabilnih, uniformnih nanosfera elementarnog selena s monoklinskom kristalnom strukturom. Uočene su i unutarstanične čestice selena (Slika 7). Bakterijski proizvedene nanosfere selena su bile veličine od 200 do 400 nm, što je jako različito od amornog  $Se^0$  stvorenog kemijskom oksidacijom  $H_2Se$  koji je bio u obliku nepravilnih amornih agregata veličine 200-800 nm, i od staklastog  $Se^0$  stvorenog redukcijom selenita s askorbatom čime su nastali nestrukturirani agregati različitih dimenzija i oblika (Slika 8). Uočene su velike razlike u optičkim svojstvima (apsorbcija UV-vidljivog spektra i Ramanov spektar) pročišćenih izvanstaničnih nanosfera napravljenih anaerobnom bakterijskom respiracijom selena između različitih vrsta. Spektralna svojstva tih (različitih) bakterijski proizvedenih nanosfera su bila vrlo različita i od svojstava amornog  $Se^0$  stvorenog kemijskom oksidacijom  $H_2Se$  i od crnog, staklastog  $Se^0$  kemijski stvorenog redukcijom selenita s askorbatom. Autori smatraju da su razlike u nanosferama proizvedenih od strane različitih vrsta bakterija odraz različitosti enzima koji sudjeluju u procesu stvaranja nanosfera kod različitih vrsta. Autori navode kako se aktualnim kemijskim procesima ne mogu dobiti čestice selena sa svojstvima kakve imaju nanosfere selena proizvedene bakterijama. Što se tiče razmještaja atoma,  $Se^0$  može imati atome raspoređene u tročlane prstenove, šesteročlane prstenove, osmeročlane prstenove i beskonačne lance u obliku  $\alpha$ -zavojnice. Oremland i sur.

(2004) predlažu da su nanosfere građene od trodimenzionalnih međusobno povezanih mreža atoma selenia u kojima se nalaze i prstenovi i lanci selenia (Oremland i sur. 2004).

Poznato je da nanočestice selenia koje proizvode bakterije mogu imati na sebe vezane proteine koji imaju ulogu u njihovom stvaranju, rastu i kontroli veličine. Čini se da se na (nekim) bakterijski proizvedenim nanočesticama nalaze polimerne substance kao što su proteini i ugljikohidrati koji određuju naboj na površini selenovih nanočestica, te određuju njihova koloidalna svojstva (Eswayah i sur. 2016). Svojstva i podrijetlo organskih komponenti koje oblažu selenove nanosfere bi mogli biti u vezi s lokacijom u stanici bakterije gdje se nanočestice stvaraju (Nancharaiah i Lens 2015).

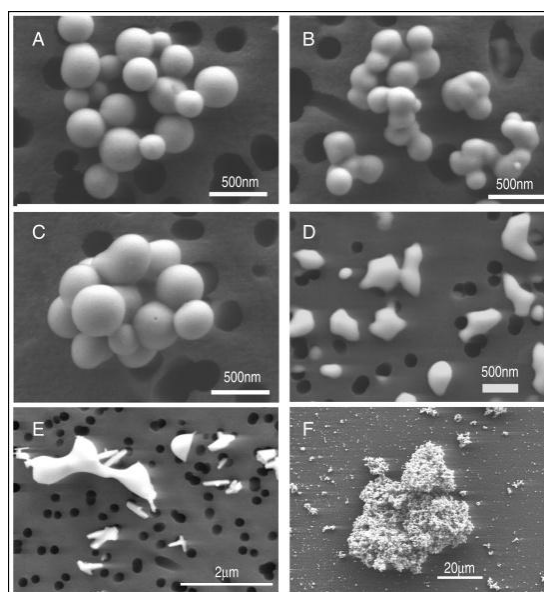
Još uvijek se dosta ne zna o načinu stvaranja unutarstaničnih i izvanstaničnih nanosfera selenia. Nije poznat ni način sekrecije unutarstaničnih nanosfera. Predloženo je da vrsta *Rhodospirillum rubrum* izlučuje selenove čestice u izvanstanični medij nakon redukcije selenita sistemom vezikularne sekrecije. Kod vrste *Desulfovibrio desulfuricans* postoji mogućnost ispuštanja nanočestica selenia lizom bakterijskih stanica (što je naravno pogubno za bakteriju) (Nancharaiah i Lens 2015).



**Slika 7.** *Bacillus selenitireducens* i nanosfere  $\text{Se}^0$  koje je ta bakterija proizvela:

- A) SEM bakterija koje su uzgajane na selenitu s vidljivim izvanstaničnim nanosferama  $\text{Se}^0$
- B) TEM bakterije koja je uzgajana na selenitu i vidljive unutarstanične nanočestice  $\text{Se}^0$ .

Preuzeto iz Oremland i sur. (2004).



**Slika 8.** SEM nanočestica  $\text{Se}^0$  koje je proizvela vrsta:

- A) *B. selenitireducens*
- B) *S. barnesii*
- C) *S. shrifitii*
- D)  $\text{Se}^0$  stvoren kemijskom oksidacijom  $\text{H}_2\text{Se}$
- E) i F) Crni  $\text{Se}^0$  stvoren redukcijom selenita s askorbatom, veće (E) i manje (F) uvećanje

Preuzeto iz Oremland i sur. (2004).

## 6. UPORABA BAKERIJA REZISTENTNIH NA SELEN

Bakterije koje respiriraju selenove oksianione, kao i nanosfere koje proizvode, imaju ili mogu imati primijenu u mnogim aspektima ljudskog života, kao što su industrija i tehnologija (Bajaj i sur. 2012, Nancharaiah i Lens 2015, Eswayah i sur. 2016), medicina (Bajaj i sur. 2012, Cruz i sur. 2018), te bioremedijacija područja zagađenim selenovim spojevima (Bajaj i sur. 2012, Nancharaiah i Lens 2015, Eswayah i sur. 2016).

### 6.1. INDUSTRIJA I MEDICINA

Zbog svojih jedinstvenih optičkih svojstava i svojstava provođenja struje, bakterijski proizvedene nanosfere se razmatraju kao dobar materijal u industriji fotonaponskih ćelija i industriji poluvodiča (Bajaj i sur. 2012). Mnoge Se-respirirajuće bakterije su proučavane za korištenje u proizvodnji nanomaterijala. Neka istraživanja su pokazala da bi se Se-respirirajuće bakterije mogle koristiti u proizvodnji poluvodiča nanovelikine, odnosno kvantnih točaka, tako što Se-respirirajuće bakterije reduciraju selenove oksianione u selenide, koji se onda spajaju s metalnim kationima i stvaraju metal-selenid (CdSe, ZnSe) kvantne točke. Za takvu vrstu industrije je važno dobiti više saznanja o načinu stvaranja nanosfera selena i načinu kontrole njihove veličine (Nancharaiah i Lens 2015). Uz pomoć bioremedijacije produkcija selenovih nanosfera bi mogla biti dovoljno jeftina za potrebe tehnološke industrije (Eswayah i sur. 2016). Se-reducirajuće bakterije se mogu koristiti i u prehrambenoj industriji. Bakterije koje reduciraju selenat su korištene kod uzgajanja škampa koji su postali obogaćeni selenom, što je postignuto kroz prehrambenu mrežu. Pošto je selen esencijalan mikronutrijent, ti su škampi bili dobri za prehranu (Eswayah i sur. 2016).

Nanosfere selena su, zbog svoje velike aktivnosti i male toksičnosti u biološkim tkivima, sve više razmatrane za primjenu u medicini. Se-nanosfere pokazuju *in vitro* i *in vivo* aktivnost poput antioksidansa tako što aktiviraju selenoenzime, te kao kemo-preventivna i terapijska sredstva. Također Se-nanočestice inhibiraju umnažanje bakterije *Staphylococcus aureus*, stoga su predložene za lijek protiv infekcije tom bakterijom (Bajaj i sur. 2012). Cruz i sur. (2018.) su izložili bakterijske vrste *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* rezistentan na meticilin (MRSA), *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* otopini Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> koncentracije 2 mM, koje su posljedično proizvodile Se-nanočestice. Testirali su toksičnost proizvedenih Se-nanočestica na vrstama *E. coli* i *S. aureus*. Proizvedene Se-nanočestice svih bakterijskih vrsta su smanjile brzinu umnažanja bakterija vrste *S. aureus*, a najviše one Se-nanočestice koje je proizvela sama vrsta *S. aureus*. Autori predpostavljaju da bi uzrok tome

mogao biti moguća sposobnost bakterije *S. aureus* (a možda i drugih bakterija) da bolje prepoznaje organski sloj koji oblaže te nanočestice ako ga je proizvela ista vrsta. Se-nanočestice svih bakterijskih vrsta su inhibirale umnažanje bakterija vrste *E. coli* u različitim stupnjevima. Testirali su i toksičnost tih Se-nanočestica na kulturi fibroblasta, pri čemu nije zapažena značajna citotoksičnost (Cruz i sur. 2018).

## 6.2. BIOREMEDIJACIJA

U većini tala koncentracija selena je niska – od 0.01 do 2 mg/kg. Kod selenifernih tala koncentracija selena može biti puno veća, te je zabilježena koncentracija i od 1200 mg/kg. U prirodnim se vodama koncentracija selena kreće od <0.1 do 100 µg/L. Kod selenifernih voda je zabilježena koncentracija i do 1000 µg/L, te čak do 2000 µg/L u slanim jezerima (Nancharaiah i Lens 2015). Faktori koji utječu na koncentraciju selena u tlu (i na povišene koncentracije) su geologija stijene od kojeg je tlo nastalo, ostatci lave i pepela iz vulkanskih erupcija, topografija mjesta, klima, odlaganje otpadnog materijala iz rudnika, izgaranje fosilnih goriva, navodnjavanje vodom s visokom koncentracijom selena, gnojenje tla fosfatnim gnojivima s višom koncentracijom selena (Bajaj i sur. 2012). Prirodno zagađenje selenom može nastati trošenjem selenifernih stijena i tala. Ljudi zagađuju rudarenjem, rafiniranjem metala, ispušnim plinovima i raznim industrijskim aktivnostima (Nancharaiah i Lens 2015). Kako se sve više povećava korištenje selena u industriji i poljoprivredi, sve se više otrovnih selenovih spojeva, pogotovo selenata i selenita, ispušta u okoliš. Eswayah i sur. (2016) izvještavaju da se proizvodi oko 2700 tona selena godišnje, od čega se samo 15% reciklira (Eswayah i sur. 2016). Selen se koristi u raznim industrijskim procesima i proizvodima, kao što su elektronika, proizvodnja stakla, proizvodnja pigmenata, nehrđajućeg čelika, fotoelektričnih ćelija i pesticida (Nancharaiah i Lens 2015). Se-reducirajuće bakterije se mogu koristiti za uklanjanje toksičnih selenovih oksianiona tako što ih konvertiraju u netoksičan elementarni selen koji se može lakše ukloniti (Nancharaiah i Lens 2015). Vrsta *Thauera selenatis* je već bila testirana za bioremedijaciju otpadnih voda, gdje je s velikom uspješnošću reducirala toksične selenove oksianione u elementarni selen (Eswayah i sur. 2016). Bakterije koje mogu metilirati toksične selenove oksianione u hlapljive metilselenide bi se možda mogle koristiti u bioremedijaciji voda i tala zagađenih selenom. Prednosti uporabe takvih bakterija su mogućnost potpunog uklanjanja selena zbog toga što su proizvedeni metilselenidi u plinovitoj fazi, kao i činjenica da bi se taj selen mogao nazad povratiti uz pomoć demetilirajućih mikroorganizama. Nedostatak uporabe takvih bakterija u bioremedijaciji je (za sad) mala stopa metilacije selenovih spojeva (Eswayah i sur. 2016).

## 7. LITERATURA

- Bajaj M., Schmidt S., Winter J., 2012. Formation of Se (0) nanoparticles by *Duganella* sp. and *Agrobacterium* sp. isolated from Se-laden soil of North-East Punjab, India. *Microbial Cell Factories*, 11(64): 1-14.
- Cruz D. M., Mi G., Webster T. J., 2018. Synthesis and characterization of biogenic selenium nanoparticles with antimicrobial properties made by *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106: 1400-1412.
- Dhanjal S., Cameotra S. S., 2010. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microbial Cell Factories*, 9(52): 1-11.
- Eswayah A. S., Smith T. J., Gardiner P. H. E., 2016. Microbial transformations of selenium species of relevance to bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 82: 4848-4859.
- Lenz M., Kolvenbach B., Gygax B., Moes S., Corvini P. F. X., 2011. Shedding light on selenium biomineralization: Proteins associated with bionanominerals. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 4676–4680.
- Nancharaiah Y. V., Lens P. N. L., 2015. Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79: 61-80.
- Oremland R. S., Herbel M. J., Switzer Blum J., Langley S., Beveridge T. J., Ajayan P. M., Sutto T., Ellis A. V., Curran S., 2004. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 52-60.
- Silberberg M. S., Amateis P., 2015. *Chemistry: The molecular nature of matter and change*, Seventh edition. McGraw-Hill Education, New York, p. 58.
- Stolz J. F., Oremland R. S., 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 615-627.



## 8. SAŽETAK

Selen je esencijalni element u tragovima za sve tri domene živih bića (bakterije, arheje, eukarioti), ali je u visokim koncentracijama toksičan. Selenovi oksianioni (selenat i selenit) su dobro topivi u vodi i vrlo toksični, te u okoliš dospijevaju prirodnim procesima ili ljudskom djelatnošću (industrija, poljoprivreda). Neke bakterije su sposobne podnijeti veće koncentracije toksičnih selenovih spojeva, odnosno selenovih oksianiona u svojoj okolini, a to im je omogućeno različitim mehanizmima poput redukcije selenovih oksianiona u procesu anaerobne respiracije ili rjeđe uočene redukcije u aerobnim uvjetima procesima detoksifikacije. Bakterije koje reduciraju selenove oksianione proizvode nanosfere elementarnog selena sa specifičnim fizikalnim svojstvima, ili ih rjeđe metiliraju i reduciraju do selenida stvarajući tako plinovite metilirane selenove spojeve.

Cilj ovog rada je sakupiti sadašnja saznanja o bakterijama koje imaju neku vrstu rezistencije na selen, odnosno na njegove toksične spojeve, kao i o mehanizmima kojima to postižu. Mehanizmi koji bakterijama omogućavaju rezistenciju na selen nisu još sasvim razjašnjeni, pogotovo oni koji se događaju u aerobnim uvjetima, te su otvorena mnoga pitanja poput načina izlučivanja samih nanosfera selena iz stanica bakterija.

## 9. SUMMARY

Selenium is an essential trace element for living creatures from all three domains of life (*Bacteria*, *Archaea*, *Eukaryota*), but it is toxic in high concentrations. Selenium oxyanions (selenate and selenite) are water soluble and highly toxic, and get released in the environment through natural processes or through human activity (industry, agriculture). Some bacteria are capable of coping with higher concentrations of toxic selenic forms, i. e. selenium oxyanions in its environment, and that is possible due to different mechanisms possessed by those bacteria like reduction of selenium oxyanions in a process of anaerobic respiration or, not as often, aerobic reduction through processes of detoxification. Bacteria that reduce selenium oxyanions produce nanospheres of elemental selenium that have specific physical properties, or rarely methylate them and reduce them to selenide, producing gaseous methylated selenium compounds.

The main objective of this paper is to collect the current knowledge of bacteria that exhibit some kind of resistance to selenium – to its toxic forms, as well as the mechanisms whit which it is obtained. The mechanisms that provide resistance to selenium are not jet well explained, especially the ones that occure in aerobic conditions, and many questions remain unanswered like the ones regarding the expulsion of the selenium nanospheres out of the bacteria cells.