

PENGARUH MERKURI ANORGANIK (HGCL₂) TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM OLEH BAKTERI FILAMENTOUS

Kartika Chrysti Suryandari
Program Studi PGSD FKIP UNS

ABSTRAK

Residu merkuri yang berasal dari industri tradisional penambangan emas mempunyai potensi sebagai polutan pada badan air. Merkuri bersifat toksik yang mematikan atau menyebabkan sel bakteri resisten. Hanya beberapa jenis bakteri terutama bakteri filamentous yang resisten terhadap merkuri. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh merkuri anorganik HgCl₂ terhadap pembentukan biofilm dan mendapatkan bakteri filamentous yang resisten terhadap merkuri.

Bakteri filamentous diisolasi dari beberapa sedimen pada Sungai Sangon, melalui teknik kultur diperkaya dengan sistem sekali unduh menggunakan medium modifikasi nutrisi cair yang mengandung 0,5 mg l⁻¹ HgCl₂. Setelah melalui beberapa subkultur bakteri filamentous diisolasi secara taburan. Koloni yang tumbuh terpisah diambil untuk diseleksi berdasarkan kemampuan tumbuh pada medium cair yang mengandung berbagai konsentrasi merkuri HgCl₂. Uji kemampuan tumbuh dan pembentukan film dilakukan dengan melalui percobaan kultivasi tiap interval waktu tertentu diukur secara spektrofotometri (OD 490 nm). Kandungan total merkuri yang terakumulasi pada sel bakteri masing-masing diukur secara spektrofotometri khusus. Aktivitas bakteri terhadap HgCl₂ dideteksi berdasarkan profil protein secara elektroforesis menggunakan gel poliakrilamida (SDS-PAGE). Isolat pembentuk biofilm diidentifikasi menggunakan metode standar.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enam belas bakteri filamentous yang telah berhasil diisolasi dari sedimen Sungai Sangon. Hanya tiga isolat (BF03, BF04 dan BF08) yang mampu tumbuh dengan waktu generasi (g) sekitar 0,64 - 2,7 jam dan kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) 0,44 - 1,07 jam⁻¹ pada medium cair yang mengandung 4 mg l⁻¹ HgCl₂. Merkuri menstimulasi pembentukan film pada sel bakteri. Kadar total merkuri yang terakumulasi pada ketiga kultur bakteri masing-masing sebesar 50, 106 dan 127 ngg⁻¹(berat basah) biomasa. Aktivitas bakteri terhadap HgCl₂ ditunjukkan dengan munculnya pita protein spesifik pada gel poliakrilamid dengan berat molekul sekitar 59,57 - 64,81 kDa. Protein tersebut diduga merkuri reduktase. Hasil identifikasi ketiga bakteri tersebut adalah *Acinetobacter* sp. strain BF03, *Acinetobacter* sp. strain BF04 dan *Bacillus* sp. strain BF08.

Kata kunci : Bakteri filamentous, Pembentukan Biofilm, Resisten, Merkuri anorganik

PENDAHULUAN

Merkuri hasil aktivitas penambangan emas dari Sungai Sangon mempunyai potensi sebagai polutan yang dapat mengganggu kesehatan bagi biota air dan pengguna. Merkuri (Hg^{2+}) dan metil merkuri (CH_3Hg^+) akan masuk kembali dalam lingkungan bersama hujan. Merkuri (Hg^0) mengalami oksidasi oleh H_2O_2 menjadi merkuri (Hg^{2+}) yang terjadi dalam kondisi asam (Gadd, 1992). Merkuri (Hg^{2+}) yang termetilasi menjadi bentuk monometil dan dimetil merkuri cenderung menguap ke atmosfer. Dimetil merkuri bersifat lebih toksik dan tidak stabil. Hasil dari reaksi transformasi merkuri (Hg^{2+}) adalah dapat berupa merkuri (Hg^0) atau metil merkuri (CH_3Hg^+) yang mempunyai kelarutan tinggi dalam air dan bersifat bioakumulatif dalam jaringan mikroba. Aktivitas mikrobial khususnya bakteri mampu mentransformasi residu merkuri hasil amalgamasi yang pada umumnya dalam bentuk Hg^0 bersifat volatile atau menguap dan terdeposisi di udara menjadi merkuri anorganik (Hg^{2+}) atau metil merkuri (CH_3Hg) yang bersifat lebih toksik (Wood, 1984).

Hanya beberapa jenis bakteri yang mampu bertahan hidup pada lingkungan tersebut atau menjadi resisten. Merkuri di lingkungan air dapat terikat pada permukaan sel bakteri, sehingga bagian luar sel bakteri tersebut menebal dalam bentuk matrik ekstraseluler atau film untuk perlindungan diri (Stoodley *et al*, 2001). Polimer ekstraseluler tersebut mempunyai kapasitas besar dalam mengabsorpsi ion logam, selain itu pembentukan film dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan yaitu kandungan nutrisi, pH dan suhu dan memungkinkan bakteri tersebut berasosiasi dengan jasad lain dalam bentuk biofilm (Lawrence *et al*, 1995). Pada umumnya biofilm merupakan komunitas mikrobial yang terdiri dari bakteri, alga, protozoa dan beberapa invertebrata khususnya larva chironomid. Keberadaan chironomid sebagai penyusun biofilm sangat menarik karena merupakan indikator pencemaran lingkungan air oleh logam berat (Klaas, 1991).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh merkuri anorganik HgCl_2 terhadap pembentukan biofilm dan mendapatkan bakteri filamentous yang resisten terhadap merkuri.

Penelitian ini diawali dengan survei lapangan untuk pengambilan sampel sedimen Sungai Sangon yang tercemar residu merkuri di Desa

Kalirejo, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta. Daerah tersebut merupakan tempat kegiatan penambangan emas secara tradisional. Penelitian ini berusaha untuk mendapatkan cara mengatasi keberadaan merkuri di lingkungan dan menurunkan kadar logam tersebut melalui aktivitas bakteri.

CARA PENELITIAN

Isolasi dan seleksi bakteri filamentous. Bakteri filamentous pengguna merkuri (HgCl_2) diisolasi dari sampel sedimen Sungai Sangon dengan melalui teknik kultur diperkaya. Medium yang digunakan untuk teknik tersebut adalah Nutrien Broth (NB) yang dimodifikasi terdiri dari gl^{-1} : 3 ekstrak daging, 5 pepton, 15 agar ditambahkan $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ HgCl}_2$. Setelah 2-3 kali subkultur bakteri filamentous diisolasi melalui pengenceran seri kemudian masing-masing suspensi ditanam secara taburan pada medium Nutrien Agar (NA) yang mengandung $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ HgCl}_2$ diinkubasi pada suhu kamar, sampai terjadi penumbuhan. Koloni yang tumbuh dihitung sebagai populasi bakteri filamentous pada sedimen. Isolat yang diperoleh diseleksi dengan berbagai konsentrasi HgCl_2 (0, 1, 2 dan 4 mg l^{-1}) pada medium cair Luria Bertani dengan komposisi gr.l^{-1} : 5 Yeast ekstrak, 10 Trypton, 1 NaCl, 1 glukosa.

Isolat yang tumbuh cepat dengan waktu generasi pendek (g) dan nilai konstanta kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) tinggi serta membentuk film dipilih untuk percobaan kultivasi. Pengaruh HgCl_2 terhadap pertumbuhan ditentukan berdasarkan μ_{max} masing-masing konsentrasi HgCl_2 dan K_i (Konstanta Inhibition).

Percobaan pertumbuhan dan pembentukan film. Percobaan pertumbuhan dan pembentukan film oleh isolat bakteri terpilih dengan beberapa perlakuan yaitu sebagai kultur murni, kultur campuran, yang ditambahkan atau tanpa larva chironomid pada medium cair Luria Bertani tanpa atau dengan $4 \text{ mg l}^{-1} \text{ HgCl}_2$. Pembentukan film dan kadar merkuri masing-masing diamati dengan pengecatan safranin menggunakan Metode Canstein dan secara absorbansi CVAAS, setiap interval waktu tertentu (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 dan 144 jam) pada suhu kamar. Kultur cair tersebut ditetesi dengan $250 \mu\text{l}$ 0,1% safranin diinkubasi selama 10

menit pada suhu kamar. Koloni bakteri yang berupa gumpalan pada permukaan medium yang mengikat safranin dipisahkan kemudian disuspensikan dalam akades steril. Suspensi gumpalan sel yang membentuk film disuspensikan kembali dalam 5 ml etanol absolute. Suspensi matrik ekstraseluler yang larut dideteksi dengan spektrofotometri (OD 490nm). Kadar merkuri diukur dari masing-masing perlakuan yang diawali dengan mengunduh sel secara sentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit. Gumpalan sel atau pelet termasuk larva *chironomid* diambil 1 gram masing-masing didestruksi dengan penambahan 5 ml H₂SO₄ pekat dan 5 ml HNO₃ pekat dipanaskan selama 20 menit sampai cairan menjadi jernih. Cairan tersebut diencerkan sampai volume 50 ml dengan akuades steril.

Kadar merkuri dari masing-masing cairan diukur dengan spektrofotometri (CVAAS; *Cold Vapour Atomic Absorption Spectrofotometri* OD 353 nm) dan medium cair digunakan sebagai blanko.

Pengukuran aktivitas bakteri terhadap HgCl₂ hasil sentrifugasi diekstrak mekanik secara sonifikasi selama 30 detik diulang 5 kali pada suhu 4°C. Ekstrak bebas sel (CFE) disiapkan dengan mensentrifugasi cairan pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit sebagai sumber protein. Selanjutnya protein standar (marker) yang telah diketahui berat molekulnya masing-masing band sebanyak 5 µl dimasukkan kedalam sumuran. Sampel yang berupa CFE, pellet dan ekstrak larva *chironomid* sebagai sumber protein kasar yang diambil 30 µl ditambah 15 µl buffer sampel. masing-masing dimasukan 25 µl ke dalam sumuran yang lain. Arus listrik dihubungkan dengan *Power supply* ke panel yang tersedia dalam bak elektroforesis. Tegangan listrik diatur konstan pada 100 volt. Proses elektroforesis dihentikan apabila pewarna sampel telah mencapai batas gel sekitar selama 90 menit. Gel diambil dari plat kaca elektroforesis kemudian diwarnai dengan *Comamssie blue* 0,2 % dishaker selama 24 jam. Zat pewarna gel dihilangkan dengan methanol 50 %, asam asetat 10 % dan akuabides 40% dishaker selama kurang lebih 60 menit. Panjang gel *acrylamide* sebelum dan sesudah distaining diukur sehingga pergerakan relative (RF) masing-masing protein dapat dihitung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri filamentous telah berhasil diisolasi dari sedimen Sungai Sangon yang tercemar merkuri melalui teknik kultur diperkaya. Bakteri tersebut mendominasi sedimen dengan populasi 290×10^6 CFU gr⁻¹ dan terdiri dari enam belas isolat. Hasil seleksi berdasarkan kemampuan tumbuh pada medium yang mengandung berbagai konsentrasi merkuri hanya terdapat sembilan isolat dipilih sebagai pengguna HgCl₂. Bakteri tersebut menunjukkan kinetika pertumbuhan yang dibuktikan dengan nilai waktu generasi (g) dan kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) yang bervariasi (Tabel 1).

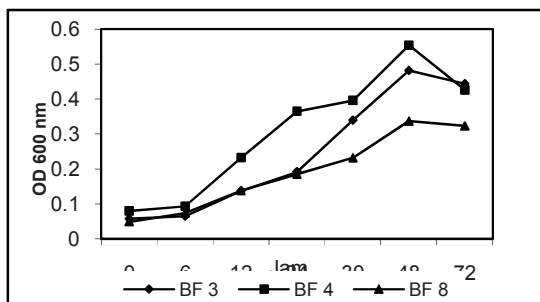
Tabel 1. Pengaruh Konsentrasi HgCl₂ terhadap Pertumbuhan bakteri pembentuk film pada medium cair Luria Bertani setelah 48 jam inkubasi

Isolat	0 mg l ⁻¹		1 mg l ⁻¹		2 mg l ⁻¹		4 mg l ⁻¹		Ki	μ (max) jam ⁻¹
	g(jam)	μ jam ⁻¹	g(jam)	μ jam ⁻¹	g(jam)	μ jam ⁻¹	G(jam)	μ jam ⁻¹		
BF02	1,23	0,56	1,29	0,53	1,85	0,37	3,7	0,15	3,69	0,13
BF03	0,62	1,1	0,69	0,99	1,17	0,59	2,7	0,18	3,23	0,17
BF04	0,66	1,05	0,74	0,93	0,91	0,76	1,04	0,31	0,29	0,29
BF05	0,42	1,62	0,56	1,23	1,42	0,48	2,22	0,17	1,1	0,14
BF06	0,35	1,97	0,87	0,79	1,69	0,41	1,85	0,2	1,74	0,21
BF07	0,42	1,61	0,82	0,84	1,21	0,57	1,96	0,19	1,48	0,18
BF08	0,64	1,07	1	0,69	1,88	0,37	5,5	0,11	5,23	0,12
BF11	1,21	0,57	1,37	0,5	1,56	0,44	1,66	0,21	0,87	0,19
BF15	0,66	1,04	1,03	0,67	1,16	0,6	1,33	0,25	1,29	0,2

Dari sembilan isolate hanya tiga isolat terpilih yaitu (BF03, BF04 dan BF08) yang mempunyai kemampuan bertahan hidup dengan baik sampai konsentrasi 4 mg l⁻¹ HgCl₂ meskipun dengan waktu generasi yang cukup panjang. Isolat BF04 mempunyai kemampuan tumbuh terbaik daripada kedua isolat BF03 dan BF08 (Gambar 1).

Pertumbuhan ketiga isolat terpilih menunjukkan fase lag yang lama yaitu 0 sampai 6 jam. Pada fase tersebut merupakan fase adaptasi bakteri terhadap kondisi lingkungan yang stress (Gadd, 1992). Semakin tinggi

konsentrasi HgCl_2 dalam medium cair maka waktu generasinya semakin tinggi dan kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) semakin rendah.



Gambar 1. Pertumbuhan bakteri filamentous pada medium cair yang mengandung merkuri HgCl_2

Aktivitas penghambatan Hg^{2+} dalam senyawa HgCl_2 ditentukan dengan nilai Konstanta Inhibition (Ki). Nilai Ki pada masing-masing isolat berbeda, hal ini membuktikan bahwa HgCl_2 bersifat menghambat pertumbuhan bakteri bahkan mematikan (Tabel 1). Isolat yang mampu bertahan hidup pada medium cair yang mengandung konsentrasi HgCl_2 tinggi menunjukkan bahwa isolat tersebut menggunakan merkuri sebagai sumber tenaga (Wagner et al, 2000). Bakteri pembentuk film untuk bertahan hidup memerlukan protein khusus yaitu metallothionein untuk proses dotoksifikasi, yang merupakan proses adaptasi di lingkungan yang mengandung logam berat (Ferris, 1989).

Untuk mengetahui bagaimana kemampuan tumbuh ketiga isolat dan kultur campuran tersebut dalam membentuk film maka dilakukan perlakuan dalam suatu medium cair dengan penambahan merkuri dan tanpa merkuri serta dengan penambahan larva chironomid sebagai pembanding (Tabel 2). Film yang terbentuk pada dasarnya terdiri dari matriks ekstraseluler yang diduga sebagai sumber makanan larva chironomid. Dengan demikian merkuri menstimulasi pembentukan biofilm yang memungkinkan larva chironomid hidup pada lingkungan tercemar merkuri HgCl_2 (Canstein, 2002).

Medium pertumbuhan bakteri mengalami perubahan nilai pH menjadi lebih basa. Dari ke-16 perlakuan terjadi perubahan nilai pH menjadi lebih besar dari nilai semula (pH 7,10) menjadi lebih basa (pH 8)

(Tabel 2). Pada kondisi pH yang basa maka gugus karboksil dapat mengikat ion logam, sehingga terjadi pengikatan logam berat yang lebih besar, tetapi pada kondisi pH asam kutub negatif dari gugus karboksil tereduksi sehingga pengikatan logam lebih kecil (Ferris, 1989).

Tabel 2. Pengaruh $HgCl_2$ terhadap Pertumbuhan bakteri filamentous dan pH medium setelah diinkubasi 144 jam

No	Isolat	Perlakuan	Pertumbuhan		pH akhir medium	Kadar merkuri total ngg^{-1}
			g(jam)	μjam^{-1}		
1.	BF03	TM	1,56	0,15	8,5	0
		M	2,32	0,19	8,5	50,428
		CH	2,63	0,16	8,5	0
		M+CH	3,57	0,12	8,4	165,394
2.	BF04	TM	0,64	1,07	8,6	0
		M	2	0,18	8,6	105,922
		CH	2,27	0,17	8,5	0
		M+CH	2,38	0,19	8,6	144,891
3.	BF08	TM	2	0,18	8,6	0
		M	2,27	0,17	8,1	126,981
		CH	3,7	0,11	8,6	0
		M+CH	3,85	0,10	8,1	174,952
4.	BF C	TM	1,88	0,19	8,6	0
		M	2,1	0,18	8,2	17,964
		CH	1,92	0,16	8,7	0
		M+CH	2,5	0,15	8,3	252,904

Keterangan: TM: Tanpa Merkuri, M : Merkuri, CH : chironomid, pH medium awal 7,0

Kadar merkuri total pada ketiga isolat BF03, BF04 BF08 dan kultur campuran menunjukkan bahwa merkuri $HgCl_2$ terikat pada sel bakteri. Kadar merkuri pada isolat BF08 lebih tinggi daripada isolat BF03 dan BF04 (Tabel 02). Isolat BF08 merupakan bakteri gram positif yang dapat membentuk kapsula, hal tersebut mempengaruhi kemampuan isolat dalam mengikat logam pada permukaan sel bakteri. Selama waktu inkubasi 144 jam masih terdeteksi adanya kadar merkuri $HgCl_2$ pada sel bakteri dan larva chironomid. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat BF03, BF04, BF08 dan kultur campuran mempunyai batas kemampuan

untuk mengakumulasi HgCl_2 . Hg^{2+} tidak seluruhnya terakumulasi dan direduksi menjadi Hg^0 . Sel bakteri mengakumulasi dan mereduksi Hg^{2+} dengan cara detoksifikasi Hg^{2+} menjadi Hg^0 .

Tingkat resistensi dan toleransi bakteri, tingkat metabolisme sel dan konsentrasi sumber energi yang digunakan, mempengaruhi kemampuan untuk mengakumulasi Hg^{2+} . Aktivitas ini dapat berlangsung terus walaupun pertumbuhan bakteri telah mencapai fase stasioner. Hal ini diduga bahwa isolat tersebut mampu mensintesis enzim spesifik yaitu merkuri reduktase (Canstein, 2000; Wood, 1984).

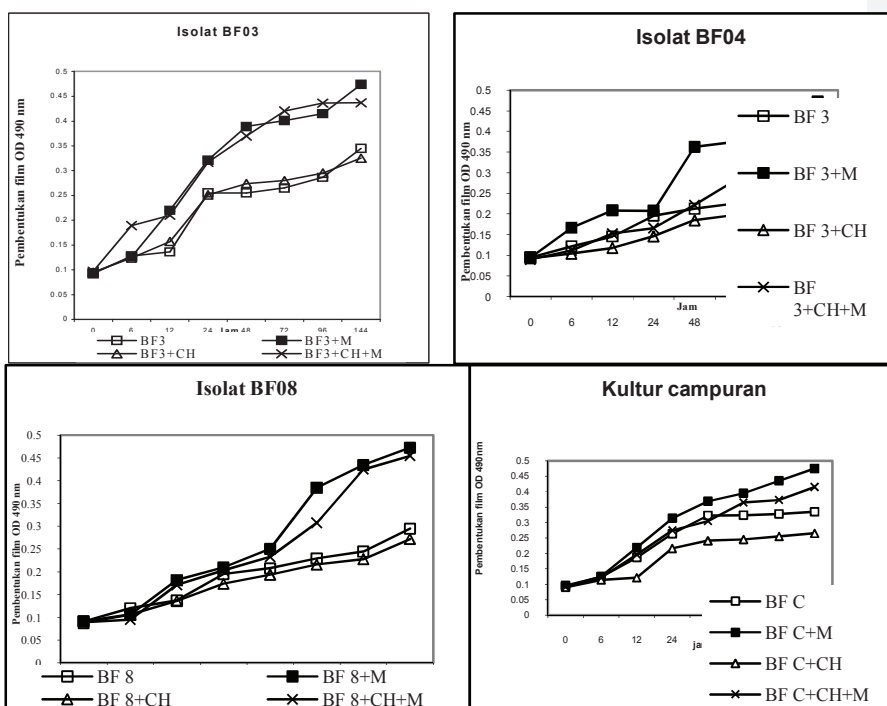
Ketiga isolat BF03, BF04, BF08 dan kultur campuran mampu mensintesis polimer ekstraseluler yang berupa film. Pembentukan film tersebut diawali dari sel bakteri yang mensintesis polimer ekstraseluler dan diikuti oleh penempelan sel lainnya sehingga membentuk sel kluster yang semakin menebal dan menutup permukaan medium cair (Gambar 2). Polimer ekstraseluler (EPS) yang dihasilkan oleh bakteri berperan untuk pertahanan diri dari lingkungan yang tidak menguntungkan (Langley and Beveridge, 1999).

Pembentukan film pada isolat BF03, BF04, BF08 dan BFC (kultur campuran ketiga isolat) pada medium dengan penambahan merkuri cenderung lebih tinggi dari kontrol tanpa merkuri setelah inkubasi 144 jam. Pada saat pertumbuhan mencapai jam ke-0 sampai jam ke-6 pembentukan filmnya relatif lambat. Sintesis polimer ekstraseluler meningkat lebih tajam setelah inkubasi 24 jam (Gambar 3).

Pencampuran ketiga isolat BF03, BF04 dan BF08 ini bertujuan agar seperti kondisi di alam, bahwa untuk pembentukan film tidak hanya satu jenis bakteri yang berperan. Pembentukan film pada kultur campuran ketiga isolat ini mulai terbentuk dan meningkat dengan cepat antara 48 – 72 jam. Pembentukan film pada kultur campuran ini lebih besar dibandingkan dengan monokultur. Hal ini disebabkan pada kultur campuran terjadi sinergisme yang saling mendukung dalam pembentukan film (Canstein *et al*, 1999).

Pembentukan film pada medium cair yang mengandung merkuri lebih cepat terbentuk meskipun dengan perlakuan larva chironomid pada medium. Namun dalam penelitian ini keberadaan larva chironomid dalam medium cair hanya mampu bertahan hidup kurang dari 24 jam.

Hal ini disebabkan karena beberapa faktor antara lain persediaan oksigen, kompetisi ruang, suhu dan substrat pada medium yang tidak memungkinkan larva tersebut untuk bertahan hidup, tetapi pembentukan film masih terus berlangsung sampai inkubasi 144 jam. Larva chironomid mampu mengakumulasi logam berat pada bagian eksoskeleton, namun belum ada penelitian yang menyebutkan bahwa larva tersebut dapat mereduksi merkuri Hg^{2+} menjadi Hg^0 (Johnson *et al*, 1989).

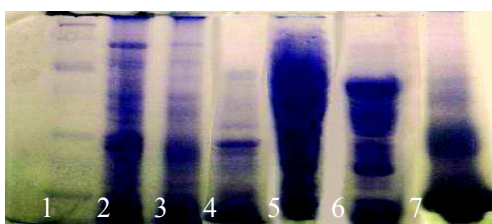


Gambar 3. Pembentukan film pada isolat BF03, BF04, BF08 dan kultur campuran pada medium cair yang mengandung $HgCl_2$ $4mg\ l^{-1}$

Aktivitas enzim pada sel bakteri pembentuk film yang terlibat aktif dalam transformasi merkuri dibuktikan dengan visualisasi profil protein. Protein yang terdapat pada debris sel dan CFE pada ketiga isolat BF03, BF04 dan BF08 diperkirakan memiliki berat molekul 59,57 – 64,81 kDa. Demikian juga pada larva chironomid terdapat protein spesifik dengan berat molekul 64,49 Kda (Gambar 4). Protein tersebut

diduga protein spesifik yang berperan dalam detoksifikasi merkuri Hg^{2+} menjadi Hg^0 .

Bakteri resisten yang hidup pada lingkungan tercemar logam berat khususnya merkuri akan menghasilkan protein spesifik yaitu merkuri reduktase (EC.1.16.1.1) dan organamerkuriliase (EC.4.99.1.2). Berat molekul enzim merkuri reduktase diperkirakan 59,57 kDa – 64,05 kDa sedangkan organamerkuriliase dengan berat molekul 23 kDa (Gadd, 1992).



Gambar 4. Profil protein isolate BF03, BF04 dan BF08 pada medium yang mengandung HgCl_2 . 1: Marker, 2: CFE isolat BF03, 3: CFE isolate BF04, 4: kontrol CFE kultur yang tumbuh tanpa HgCl_2 , 5: CFE isolate BF08, 6 : Debris isolat BF04, 7: debris sel *chironomid*

Bakteri tersebut kemudian dilakukan identifikasi berdasarkan morfologi koloni, morfologi sel dan sifat biokimia dengan buku Determinasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Isolat BF03 dan BF04 diduga *Acinetobacter* sp. Strain BF03 dan *Acinetobacter* sp. Strain BF04 karena diduga isolate tersebut termasuk kelompok gram negative dan mempunyai sifat fisiologi yang hamper sama. Sedangkan isolate BF08 diduga *Bacillus* sp. Strain BF08 termasuk gram positif.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian diperoleh kesimpulan:

1. Merkuri HgCl_2 menstimulasi pembentukan film pada bakteri filamentous sehingga terjadi akumulasi merkuri mencapai 127 ngg^{-1} (berat basah) biomassa. Bakteri tersebut mendominasi sungai Sangon yang tercemar merkuri.
2. Bakteri filamentous yang resisten terhadap merkuri diidentifikasi sebagai *Acinetobacter* sp. Strain BF03, *Acinetobacter* sp. Strain

BF04 dan *Bacillus* sp. Strain BF08 yang menghasilkan protein khusus dengan berat molekul 59,57 – 64,81 kDa dan diduga merkuri reduktase

DAFTAR PUSTAKA

- Canstein, H.V. 2002. Species Diversity Improves the Efficiency of Mercury-Reducing, Biofilm under Changing Environmental Condition. **J. Applied and Environmental Microbiology**. June p. 2829 – 2837, vol 68
- Canstein, H.V., Y.Li.K.N. Timmis and I.W.Dobler. 1999. Removal of Mercury From Chloralkali Electrolysis Wastewater by a Mercury-Resistant *Pseudomonas putida* Strain. **J. Applied and Environmental Microbiology** 65(12): 5279 – 5284
- Ferris, FG. 1989. Metal interaction with Microbial Biofilm in Acidic and Neutral pH Environments. **J. Applied and Environmental Microbiology** 55: 1249 – 1255
- Gadd, G.M. 1992. Heavy Metal Pollutans : Environmental and Biotechnological Aspects. **Encyclopedia of Microbiology**. Vol 2, pp 351 - 368
- Johnson, R.K., B. Bostrom and W. Bund. 1989. Interaction Between *Chironomus plumosus* (L) and the Microbial Community in Surficial Sediment of a Shallow, eutrophic Lake. **J. Limnol Oceanogr** 32 (2): 97-101 Upsala, Sweden
- Klass, R.T. 1991. **Trace Metal Exotoxicokinetics of Chinomomids**. University of Amsterdam, Netherlands.
- Langley, S and T.J. Beveridge. 1999. Metal Binding by *Pseudomonas aeruginosa*. PA01 is influenced by Growth of the cells as a Biofilm. **J. Microbiol** 19 (7): 1456 – 1461.
- Lawrence, J.R., D.R. Korber., G.M., Wolfaardt and D.E. Caldwell. 1995. Behavioral Strategic of Surface Colonizing. **J. Microbial Ecology** 14: 1 - 75
- Stoodley, P., S.Wilson., L.H. Stoodley., J.D. Boyle., H.M. Lappin-Scott., and J.W. Costerton. 2001. Growth and Detachment of Cell Clusters From Mature Mixed-Species Biofilm. **J. Applied and Environmental Microbiology** 67(12): 5608 – 5613
- Wagner, D., L.H. Lunsdorf., T. Lubbehusen., H.F. Canstein., Y.Li.K.N. Timmis and W.D. Deckwer. 2000. Removal of Mercury From Chemical Wastewater by Microorganism in Technical Scale. **Environ Sci. Technol.** 34: 4628 – 4634
- Wood, A., 1984. Biological Cycles For Tonic Elements in The Environment **J. Science**. 18 (12): 1049 – 1052.