

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Aleksandra N. Žerađanin

**Biohemijska karakterizacija bakterija izolovanih iz naftom
zagađenih lokaliteta i njihova primena za bioremedijaciju i
proizvodnju egzopolisaharida**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Aleksandra N. Žerađanin

Biochemical characterization of bacteria isolated from oil-contaminated sites and their application for bioremediation and production of exopolysaccharides

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentori:

dr Vladimir Beškoski, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Jelena Avdalović, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

dr Vladimir Beškoski, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Jelena Avdalović, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Gordana Gojgić-Cvijović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Ljubodrag Vujisić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Branimir Jovančičević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Datum odbrane:

Biohemijska karakterizacija bakterija izolovanih iz naftom zagađenih lokaliteta i njihova primena za bioremedijaciju i proizvodnju egzopolisaharida

SAŽETAK

Nafta i rafinisani proizvodi prerade nafte prilikom eksploatacije, transporta, skladištenja i akcidentalnih izlivanja zagađuju životnu sredinu i ispoljavaju toksične efekte po živi svet u njoj uključujući i čoveka. S druge strane, naftom zagađena životna sredina predstavlja lokalitet u kome žive brojni mikroorganizmi koji imaju sposobnost degradacije različitih zagađujućih supstanci. Cilj ove disertacije je bio ispitivanje primena različitih mikroorganizama izolovanih iz lokaliteta zagađenih naftom, za dva procesa, bioremedijaciju i proizvodnju egzopolisaharida.

Istraživanja vezana za bioremedijaciju su podeljena u dva dela. Prvi deo studije ispituje sposobnost izolovanog konzorcijuma mikroorganizama, degradera ugljovodonika, u procesima bioremedijacije izuzetno kompleksnih lokaliteta, kao što su isplaćne jame. Isplaćne jame predstavljaju zemljane rezervoare u koje se odlaže otpad, nastao tokom eksploatacije nafte i zemnog gasa. Na početku procesa napravljen je bioremedijacioni supstrat dobijen mešanjem zemljišta sa ruba isplaćne jame i rastresitog sedimenta bogatog naftnim ugljovodonicima. U bioremedijacioni supstrat je dodat izolovan konzorcijum mikroorganizama. Pokazano je da nakon 180 dana konzorcijum sa visokom efikasnošću razgrađuje naftne ugljovodonike i smanjuje njihovu koncentraciju za 95,3%. Ovako visok procenat razgradnje ukazuje da je u konzorcijumu koji je korišćen u postupku bioremedijacije prisutna velika količina raznovrsnih mikroorganizama što je metagenomskom analizom i potvrđeno. Naime, analiza je pokazala da su dominantno prisutni rodovi *Gordonia*, *Bacteroides*, *Candidatus Macondimonas*, *Brucella*, *Parvibaculum*, *Mycobacterium*. Navedeni rodovi su u literaturi ranije istaknuti kao degraderi naftnih ugljovodonika. Prednost metagenomske analize se ogleda u tome, što pored mikroorganizama koji se mogu gajiti u laboratoriji, uspešno identifikuje i nekulturable autohtone mikroorganizme prisutne u uzorku.

U drugom delu istraživanja proučavana je efikasnost *ex situ* postupka bioremedijacije kontaminiranog zemljišta, pored praćenja stepena mikrobiološke razgradnje naftnog polutanta, određen je i njegov grupni sastav, kao i promene u količini frakcija tokom studije. Dodatni kvalitet ovog istraživanja je i ispitivanje nastanka huminskih kiselina tokom procesa bioremedijacije. Tokom postupka, količina naftnih ugljovodonika je smanjena u visokom procentu, za 86,6% u odnosu na početnu vrednost. Analizom uzoraka tokom bioremedijacije je utvrđeno da se sa procesom biodegradacije paralelno odvija i humifikacija. Pokazano je da je nakon 150 dana postupka bioremedijacije količina huminskih kiselina porasla za 26,5%, pri čemu su nastale huminske kiseline bile bogatije aromatičnim strukturama i kiseoničnim funkcionalnim grupama. Ovako obogaćeno zemljište, ranije zagađen ekosistem koji je tretiran bioremedijacijom, ponovo omogućava život mikroorganizmima i biljkama, jer huminske kiseline u njemu pozitivno utiču na mikrobnog rast i njihov metabolizam, indukuju sintezu enzima i predstavljaju redoks aktivna jedinjenja.

U disertaciji je izolovan i ispitivan mikroorganizam prisutan u sredini zagađenoj naftnim ugljovodonicima, koji ima sposobnost produkcije egzopolisaharida. Mikroorganizam CH-KOV3, izolovan iz kanala otpadnih voda Pančevo, u preliminarnim laboratorijskim testovima je pokazao potencijal za sintezu egzopolisaharida. Izolovana bakterija je u okviru teze molekularno identifikovana kao vrsta roda *Brachybacterium*, a sekvenca 16s rRNK zavedena u NCBI bazu podataka pod pristupnim brojem KC881303.1. Daljom analizom izolata je utvrđeno da pripada grupi nepokretnih bakterija koje ne proizvode spore, a rastu u prisustvu kiseonika. Ovoj Gram-pozitivnoj bakteriji je

pomoću 2D GCxGC-MS tehnike određen masnokiselinski profil ukupnih lipida, od kojih su dominantno prisutni bili *ai*-C15, *i*-C15, *ai*-C17, *i*-C17, *i*-C16, *n*-C16, *n*-C18 i C18:2 metil estri masnih kiselina. Izolat je okarakterisan i pomoću MALDI-TOF MS tehnike, a rezultat je značajan jer dobijen proteinski profil predstavlja jedinstven "otisak prsta" i do danas je jedini publikovan spektar roda *Brachybacterium*.

Tokom studija produkcije polisaharida upotrebom izolovane bakterije *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 je utvrđeno da ona proizvodi najveću količinu egzopolisaharida pri temperaturi od 28 °C i pH vrednosti 7, na podlozi sa 500 g/L saharoze. Pri ovim uslovima je dobijeno 45,2 g/L egzopolisaharida, što je čak 5 puta veća količina u poređenju sa ranije publikovanim rezultatima za rod *Brachybacterium*. Detaljna strukturna analiza polisaharida pokazala je da je proizvedeni egzopolisaharid fruktanskog tipa, relativno visoke molekulske mase sa $\beta(2,6)$ glikozidnom vezom u osnovnom nizu i grananjem u položaju $\beta(2,1)$, što odgovara egzopolisaharidu levanu.

Ključne reči: bioremedijacija; ugljovodonici; humifikacija; *Brachybacterium*; levan

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Biochemical characterization of bacteria isolated from oil-contaminated sites and their application in bioremediation and exopolysaccharide production

ABSTRACT

During their exploitation, transport, storage and accidental spills, oil and refined oil products pollute the environment and have toxic effects on living organisms including humans. On the other hand, such oil-polluted environments are localities inhabited by numerous microorganisms that have the ability to degrade some of the pollutants. The aim of this dissertation was to investigate the application of various microorganisms isolated from oil-contaminated sites for two processes, bioremediation and exopolysaccharide production.

Research related to bioremediation included two studies. The first study examined the involvement of an isolated consortium of microorganisms, hydrocarbon degraders, in the bioremediation processes in extremely complex localities, such as mud pits. Mud pits are earthen reservoirs in which waste generated during the exploitation of oil and natural gas is disposed of. In the study, at the beginning of the process, a bioremediation substrate was obtained by mixing the soil from the edge of a mud pit with loose sediment rich in petroleum hydrocarbons. A consortium of microorganisms was isolated, cultivated and then added to the bioremediation substrate. After 180 days of bioremediation, the consortium decomposed petroleum hydrocarbons with high efficiency and reduced their concentration by 95.3%. Such a high percentage of hydrocarbon degradation indicates that large numbers of various microorganisms are present in the consortium used in the bioremediation process, which was confirmed by metagenomic analysis. Namely, the analysis showed that the genera *Gordonia*, *Bacteroides*, *Candidatus Macondimonas*, *Brucella*, *Parvibaculum* and *Mycobacterium* predominate in the consortium. These genera have previously been highlighted in the literature as petroleum hydrocarbon degraders. The advantage of metagenomic analysis is reflected in the fact that in addition to microorganisms that can be grown in the laboratory, it successfully identifies uncultured indigenous microorganisms present in the matrix.

In the second study, on the efficiency of *ex situ* bioremediation of contaminated soil, in addition to monitoring the degree of microbiological degradation of petroleum pollutants, the group composition of the petroleum pollutants was determined, as well as changes in the amounts of fractions during the study. An additional quality of this research is the investigation of the formation of humic acids during the bioremediation process. During the bioremediation procedure, the amount of petroleum hydrocarbons in the soil was reduced by a high percentage, i.e. by 86.6% compared to the initial value. Analysis of soil samples taken during bioremediation showed that humification takes place in parallel with the biodegradation process. In fact, after 150 days of the bioremediation process, the amount of humic acids increased by 26.5%, with the resulting humic acids being richer in aromatic structures and oxygen functional groups than at the start. This resulting enriched soil, obtained from a previously polluted ecosystem that was treated by bioremediation, allows microorganisms and plants to thrive, because it contains humic acids that have a positive effect on microbial growth and metabolism, induce enzyme synthesis and act as redox active compounds.

A microorganism from a petroleum hydrocarbon-contaminated environment which could produce exopolysaccharides was isolated and examined. The microorganism CH-KOV3, isolated from the Pančevo wastewater canal, showed potential to synthesize exopolysaccharides in preliminary laboratory tests. The isolated bacterium was molecularly identified as a species belonging to genus *Brachybacterium*, and the 16s rRNA sequence was entered into the NCBI database under accession

number KC881303.1. Further analysis of the isolate determined that it belongs to the group of immobile bacteria that do not produce spores, but grow in the presence of oxygen. This Gram-positive bacterium was studied by the 2D GCxGC-MS technique to determine the fatty acid profile of its total lipids; predominant lipids are *ai*-C15, *i*-C15, *ai*-C17, *i*-C17, *i*-C16, *n*-C16, *n*-C18 and C18:2 fatty acid methyl esters. The isolate was also characterized by the MALDI-TOF MS technique, and the result is significant because the protein profile obtained represents a unique fingerprint and, to date, is the only published spectrum for the genus *Brachybacterium*.

Studies into polysaccharide production using the isolated *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 showed it produces the largest amount of exopolysaccharides at 28 °C and pH 7, on a medium with 500 g/L sucrose. Under these conditions, 45.2 g/L of exopolysaccharide were obtained, which is five times higher than the previously published results for genus *Brachybacterium*. Detailed structural analysis showed the exopolysaccharide produced by *Brachybacterium* CH-KOV3 was a fructan-type polysaccharide of relatively high molecular weight, with $\beta(2,6)$ glycosidic bonds in the main chain and branching in the $\beta(2,1)$ position, which corresponds to the exopolysaccharide levan.

Key words: bioremediation, hydrocarbon; humification; *Brachybacterium*; levan

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Mojim roditeljima Jasmini i Negoslavu, mužu Slobodanu i ćerki Katarini

Ova doktorska disertacija je rađena u laboratorijama Grupe za mikrobiološku hemiju i biotehnologiju Katedre za biohemiju na Hemijskom fakultetu (HF), Univerziteta u Beogradu i Centra za hemiju IHTM-a (Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju), instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, redovnom profesoru, dr Vladimiru Beškoskom sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji je jedan od idejnih tvoraca ove teze kojom je rukovodio prethodnih godina uz nesebično pružanje pomoći pri eksperimentalnom radu i pisanju teze. Posebno bih se zahvalila svojoj mentorki, dr Jeleni Avdalović, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, na strpljivom odnosu punom ohrabrujućih reči i osmeha. Za mene su bile veoma značajne sve njene sugestije prilikom izrade eksperimenata i pri pisanju teze. Zahvalnost dugujem i dr Gordani Gojgić-Cvijović, naučnom savetniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, na podršci koju mi je pružila tokom izrade ove teze, ali i na svim savetima koje mi je dala tokom izrade praktičnog dela rada, pomoći i korisnim sugestijama u tumačenju rezultata i pisanju teze. Dr Gordana Gojgić-Cvijović je neko od koga mi je veliko zadovoljstvo da učim, hvala Vam na tome! Zahvaljujem se dr Branimiru Jovančičeviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, i dr Ljubodragu Vujisiću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta, na korisnim savetima prilikom pisanja ove disertacije. Veliko hvala dr Miroslavu Vrviću, profesoru u penziji Hemijskog fakulteta, za preneseno znanje, poverenje i uspešnu saradnju, radosne terene i dragocene vedre trenutke, kao i za angažovanje na projektu i zapošljenje. Posebno bih se zahvalila i Dragici Jakovljević – "slatkoj" hemičarki, naučnom savetniku IHTM-a u penziji za višegodišnju podršku i saradnju. Čast mi je što vas oboje poznajem! Svim kolegama iz Grupe za mikrobiološku hemiju i biotehnologiju hvala za nesebičnu podršku, razumevanje i brojne konstruktivne savete vezane za ovu tezu. Koleginici Kristini Joksimović sa IHTM-a sam neizmerno zahvalna na dragocenoj podršci tokom izrade doktorske teze, druženju tokom eksperimentalnog i terenskog rada, svim satima koje smo u poslu provodile sa osmehom.

**Želim da se zahvalim vanrednom profesoru dr Hideyuki Inuiju i mlađem vanrednom profesoru dr Haruko Sakurami za metagenomsku analizu i neizmernu pomoć pri interpretaciji rezultata.*

***Veliko hvala profesoru dr Takešiju Nakanu na podršci tokom svih ovih godina.*

****Veoma sam zahvalna vanrednom profesoru Maija Lisi Mattinen i dr Inki Elini Harju za MALDI-TOF MS analizu.*

Zahvaljujem se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja na uključivanju u naučnoistraživačke projekte i višegodišnjem stipendiranju.

Roditeljima Jasmini i Negoslavu veliko hvala na svim lepim godinama i neizmernoj ljubavi. Nadam se da vas nikada neću izneveriti i da ću vas uvek činiti ponosnim! Bratu i njegovoj porodici, Slobodanovoj porodici i svim dragim prijateljima dugujem zahvalnost za podršku tokom školovanja i njihovo razumevanje. Mužu Slobodanu hvala na neizmernoj podršci, ljubavi i strpljenju tokom svih godina studija. Čerki Katarini, koja me svakodnevno ispunjava ljubavlju i radošću hvala što je bila dobra devojčica i omogućila mami da napiše disertaciju do kraja i odbrani je.

Beograd, 2022.

Aleksandra N. Žerađanin

**I would like to thank Associate Prof. Dr. Hideyuki Inui and Junior Associate Prof. Dr. Haruko Sakurama for metagenomic analysis and the immense help for interpretation of results.*

***Many thanks to the Prof. Dr. Takeshi Nakano for the support he has given me all these year.*

****I'm grateful to Adjunct Prof. Maija-Liisa Mattinen and Dr. Inka Elina Harju for MALDI-TOF MS analysis.*

SPISAK SKRAĆENICA I SIMBOLA

ATP – adenzin-trifosfat
BRS - bioremedijacioni supstrat
BTEX - benzen, toluen, etilbenzen, ksilen
c-di-GMP - ciklični guanozin-monofosfat
2D – dvodimenzionalne tehnike
2D GC×GC–MS - sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom
Da – dalton
DSC - diferencijalna skenirajuća kalorimetrija
DTA - diferencijalna termalna analiza
EOMA - elementarna organska mikroanaliza
EPS – egzopolisaharid
FAME – metil estri masnih kiselina
FOS – fruktooligosaharidi
FT-IR - Furierova transformacija-infracrvena spektroskopija
GC-MS - gasna hromatografija spregnuta sa masenim spektrometrom
GDP – guanozin-difosfat
GPC- gel permeaciona hromatografija
GT – glukozil-transferaza
HAB - hemoorganoheterotrofne, aerobne i fakultativno anaerobne, mezofilne bakterije
HK- huminske kiseline
HPAEC- anjonoizmenjivačka hromatografija visokih performansi
ICP-OES – optička emisiona spektroskopija sa induktivno spregnutom plazmom
KOV – kanal otpadnih voda Pančevo
KP- kvasci i plesni
KU0 - kompozitni uzorak na početku bioremedijacije
KU60 - kompozitni uzorak nakon 60 dana bioremedijacije
KU120 - kompozitni uzorak nakon 120 dana bioremedijacije
KU180 - kompozitni uzorak nakon 180 dana bioremedijacije
KUH 0 - kompozitni uzorak halda na početku procesa bioremedijacije
KUH 60 - kompozitni uzorak halda nakon 60 dana
KUH 120 - kompozitni uzorak halda nakon 120 dana
KUH 150- kompozitni uzorak halda nakon 150 dana
LNAPLS - nevodena tečna faza ugljovodonika lakših od vode
LPG - tečni naftni gas
MALDI-TOF MS - laserska desorpcija potpomognuta matriksom - analizator koji razdvaja jone na osnovu vremena preleta sa masenom spektrometrijom
MDa – mega dalton
MDK - maksimalna dozvoljena koncentracija
NAPL - nevodena tečna faza
NDP – nukleozid difosfatni šećeri

NIS - Naftna industrija Srbije
NMR - nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija
NSO - jedinjenja koja sadrže azot, sumpor ili kiseonik
OPX - spoljnomembranski polisaharid eksportni protein
PAD - pulsni amperometrijski detektor
PAH - policiklični aromatični ugljovodonici
PC – planarna hromatografija
PCB - polihlorovani bifenili
PCP - polisaharid ko-polimeraza
PMP - 1-fenil-3-metil-5-pirazolon
PTS - fosfotransferazni sistem
RNU - mikroorganizmi koji razgrađuju naftne ugljovodonike
RVK – retencioni vodni kapacitet
SEC – ekskluziona hromatografija
SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija
s.s. – suva supstanca
TCD – detektor termalne provodljivosti
TDP – timidin-difosfat
TFA - trifluorsirćetna kiselina
TG – termogravimetrijska analiza
TPH - ukupni naftni ugljovodonici
TPR - tetratrikopeptid ponavljajući protein
TSP - trimetilsilil-propionat
UDP – uridin-difosfat
UHPLC-UV-ESI-MS - tečna hromatografija ultra visokih performansi sa ultraljubičastim detektorom, elektron sprej jonizacijom i jonskim masenim spektrometrom
US EPA - Američka agencija za zaštitu životne sredine
UV-VIS - ultravioletna-vidljiva spektrofotometrija
VOC – isparljiva organska jedinjenja
Wzx - Wzx-flipaza
Wzy – Wzy-polimeraza
XRD - difrakcija X zracima

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE.....	4
2.1. Bioremedijacija – mikrobiološka metoda za remedijaciju lokaliteta zagađenih naftom i rafinisanim proizvodima prerade nafte	5
2.1.1. Nafta i rafinerijski proizvodi prerade nafte	5
2.1.2. Nafta i rafinerijski proizvodi prerade nafte kao kontaminanti životne sredine.....	5
2.1.3. Bioremedijacija i faktori koji utiču na proces bioremedijacije	6
2.1.3.1. Kiseonik	6
2.1.3.2. Vlažnost	7
2.1.3.3. Temperatura.....	7
2.1.3.4. pH vrednost	7
2.1.3.5. Hranljive supstance	7
2.1.3.6. Salinitet i osmotski pritisak	8
2.1.3.7. Osobine zemljišta.....	8
2.1.3.8. Biodostupnost	8
2.1.3.9. Kvalitet i sastav konzorcijuma.....	9
2.1.4. Bioremedijacioni procesi	9
2.1.4.1. Prirodno smanjenje	9
2.1.4.2. Tehnologije bioprovetravanja, prodivavanja i biosisavanja	10
2.1.4.3. Površinska obrada zemljišta i halde	11
2.1.4.4. Kompostiranje	13
2.1.4.5. Bioremedijacioni procesi u bioreaktorima.....	13
2.1.4.6. Odabir najadekvatnijeg bioremedijacionog tretmana	13
2.1.5. Mikroorganizmi i putanje razgradnje naftnih ugljovodonika.....	14
2.1.5.1. Putanje razgradnje <i>n</i> -alkana.....	17
2.1.5.2. Putanja razgradnje cikličnih ugljovodonika.....	18
2.1.5.3. Putanja razgradnje alkina	18
2.1.5.4. Putanje razgradnje aromatičnih ugljovodonika.....	19
2.1.6. Prednosti bioremedijacije	20
2.2. Tehnike za karakterizaciju pojedinačnih mikroorganizama, mikrobnih zajednica i određivanje mikrobne aktivnosti	21
2.2.1. Statički pristupi u karakterizaciji pojedinačnih mikroorganizama, mikrobnih zajednica i određivanju mikrobne aktivnosti	21
2.2.1.1. Određivanje broja (vijabilnih) ćelija	21
2.2.1.2. Određivanje broja mikroorganizama direktnim brojanjem.....	21
2.2.1.3. Analiza dela mikrobnih zajednica.....	22
2.2.1.4. Analiza celokupne mikrobne zajednice.....	28
2.2.2. Dinamički pristupi u karakterizaciji pojedinačnih mikroorganizama, mikrobnih zajednica i određivanju mikrobne aktivnosti	31
2.2.2.1. Mikrobno ćelijsko disanje i brzina rasta mikroorganizama	31
2.2.3. Odnosi između tradicionalnih i modernih tehnika za karakterizaciju pojedinačnih mikroorganizama, mikrobnih zajednica i određivanje mikrobne aktivnosti.....	31

2.3. Egzopolisaharidi proizvedeni pomoću mikroorganizama izolovanih iz zagađene životne sredine.....	32
2.3.1. Sinteza egzopolisaharida.....	33
2.3.2. Levan.....	35
2.3.2.1. Biosinteza levana pomoću mikroorganizama	36
2.3.2.2. Primena levana	37
2.3.3. Tehnike za ispitivanje sposobnosti mikroorganizama za produkciju egzopolisaharida.....	37
2.3.4. Tehnike za karakterizaciju čistih egzopolisaharida	39

3. MATERIJAL I METODE 41

3.1. Metode korišćene za analizu zemljišta i sedimenta kao supstrata za remedijaciju42

3.1.1. Analitičke metode	42
3.1.1.1. Određivanje procenta higroskopne vlage	42
3.1.1.2. Potenciometrijsko određivanje pH vrednosti.....	42
3.1.1.3. Određivanje sadržaja pepela	42
3.1.1.4. Određivanje sadržaja karbonata.....	42
3.1.1.5. Retencioni vodeni kapacitet.....	42
3.1.1.6. Dostupni kalijum i fosfor	42
3.1.1.7. Određivanje grupnog sastava.....	42
3.1.1.8. Određivanje sadržaja huminskih kiselina	43
3.1.2. Mikrobiološke metode.....	44
3.1.2.1. Podloga za određivanje broja ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija.....	44
3.1.2.2. Podloga za određivanje broja kvasaca i plesni.....	44
3.1.2.3. Podloga za određivanje broja mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2.....	44
3.1.2.4. Pomoćni mikrobiološki rastvori.....	44
3.1.2.5. Određivanje broja mikroorganizama.....	45
3.1.2.6. Izolovanje konzorcijuma zimogenih mikroorganizama i priprema biomase	45
3.1.2.7. Metagenomska analiza	46
3.1.3. Strukturno-instrumentalne tehnike korišćene za karakterizaciju bioremedijacionog supstrata i huminskih kiselina.....	47
3.1.3.1. Elementarna organska mikroanaliza	47
3.1.3.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom.....	47
3.1.3.3. Spektrofotometrijska analiza za određivanje E4/E6 odnosa	47
3.1.3.4. Određivanje sadržaja ukupnih naftnih ugljovodonika gasnom hromatografijom.....	47
3.1.3.5. Određivanje sadržaja mikroelemenata i teških metala	47

3.2. Metode korišćene za karakterizaciju ispitivane bakterije CH-KOV3.....48

3.2.1. Izolovanje ispitivane bakterije CH-KOV3.....	48
3.2.2. Molekularna karakterizacija.....	48
3.2.3. Konstrukcija filogenetskog stabla	48
3.2.4. Bojenje po Gramu, oksidaza i katalaza test.....	48
3.2.4.1. Bojenje po Gramu	48
3.2.4.2. Oksidaza test.....	49
3.2.4.3. Katalaza test	49
3.2.5. Fiziološko-biohemijska karakterizacija	49
3.2.6. Određivanje ukupnih ćelijskih masnih kiselina.....	52

3.2.7. Strukturno-instrumentalne tehnike	52
3.2.7.1. Gasno-masena analiza metil-estara masnih kiselina	52
3.2.7.2. MALDI-TOF MS karakterizacija	53
3.3. Produkcija egzopolisaharida pomoću ispitivane bakterije CH-KOV3 i postupak izolovanja	54
3.4. Optimizacija produkcije egzopolisaharida.....	54
3.5. Metode korišćene za strukturnu karakterizaciju egzopolisaharida.....	54
3.5.1. Analitičke metode	54
3.5.1.1. Hidroliza i papirna hromatografija.....	54
3.5.1.2. Parcijalna kisela hidroliza.....	54
3.5.1.3. Merenje optičke rotacije	55
3.5.1.4. Merenje dinamičke i kinematičke viskoznosti	55
3.5.1.5. Određivanje molekulske mase	55
3.5.1.6. Metilacija i reduktivno cepanje.....	55
3.5.2. Strukturno-instrumentalne tehnike upotrebljene za karakterizaciju egzopolisaharida.....	56
3.5.2.1. Elementarna organska mikroanaliza	56
3.5.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom.....	56
3.5.2.3. Nuklearna magnetno-rezonantna spektroskopija	56
3.5.2.4. Gasno-masena analiza anhidroalditola.....	56
4. REZULTATI I DISKUSIJA	57
4.1. Tretman isplačne jame postupkom bioremedijacije	59
4.1.1. Karakterizacija isplačne jame pre bioremedijacionog tretmana	59
4.1.2. Faze u tretmanu isplačne jame, priprema i karakterizacija bioremedijacionog supstrata.....	60
4.1.3. Karakterizacija kompozitnih uzoraka tokom procesa bioremedijacije	60
4.1.3.1. Mikrobiološke karakteristike kompozitnih uzoraka	62
4.1.3.2. Poređenje kompozitnog uzorka sa kraja bioremedijacije i nekontaminiranog zemljišta	65
4.2. Nastanak huminskih kiselina tokom ex situ bioremedijacije na pilot nivou – dodata vrednost mikrobne aktivnosti	66
4.2.1. Karakterizacija kompozitnih uzoraka	66
4.2.1.1. Sadržaj naftnih ugljovodonika	66
4.2.1.2. Grupni sastav	67
4.2.1.3. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama.....	68
4.2.1.4. Sadržaj i karakterizacija huminskih kiselina.....	69
4.3. Izolovanje i karakterizacija mikroorganizma producenta egzopolisaharida	73
4.3.1. Molekularna karakterizacija.....	74
4.3.2. Ispitivanje morfoloških karakteristika, fiziološko-biohemijskih osobina i masnokiselinskog sastava.....	75
4.3.3. MALDI-TOF MS karakterizacija.....	78
4.4. Produkcija i optimizacija produkcije egzopolisaharida pomoću ispitivane bakterije CH-KOV3	79
4.5. Strukturna karakterizacija egzopolisaharida	82
4.5.1. Određivanje molekulske mase	83
4.5.2. Infracrvena spektroskopija.....	84

4.5.3. NMR spektroskopija.....	85
4.5.4. Gasno-masena analiza metilacionih proizvoda	90
5. ZAKLJUČCI.....	92
6. LITERATURA	97

1. UVOD

Život ljudi i industrija u velikoj meri zavise od nafte i rafinerijskih proizvoda prerade nafte kao glavnih izvora energije. Tokom obrade i pri akcidentalnim izlivanjima nafta i proizvodi njene prerade dospevaju u životnu sredinu i zagađuju je. Zagađujuće supstance kroz zemljište, vodu, biljke i životinje lancem ishrane dospevaju do čoveka pri čemu mogu delovati kancerogeno, teratogeno i mutageno, a njihovo toksično dejstvo je kumulativnog karaktera.

U cilju sprečavanja negativnih posledica po životnu sredinu i živi svet, razvijene su brojne tehnike za dekontaminaciju i remedijaciju. Danas se primenjuje veliki broj fizičkih, hemijskih i termalnih metoda u cilju izdvajanja, transformacije ili razgradnje zagađujućih supstanci. Biološke tehnike i metode su u odnosu na prethodno pomenute isplativije, ne dolazi do generisanja otpada i za njih se kaže da su "prijateljske za okolinu". Bioremedijacija je proces u kome se koriste mikroorganizmi sposobni da opstanu u zagađenoj životnoj sredini, a koji ujedno imaju potencijal za razgradnju zagađujućih supstanci. Ovi mikroorganizmi preživljavaju, rastu i razmnožavaju se koristeći kontaminante kao izvor ugljenika i elektrona. U postupcima bioremedijacije je baš iz tog razloga najbolje primeniti konzorcijum umnoženih autohtonih mikroorganizama koji su izolovani na samom mestu zagađenja. Nastali proizvodi na kraju postupka bioremedijacije (ugljen-dioksid, voda i biomasa mikroorganizama) nemaju toksične efekte na živi svet, a rezultat mikrobiološke aktivnosti je očišćena životne sredine, bez nastalog otpada.

Veliki metabolički potencijal mikroorganizama i njihova interakcija sa zagađujućim supstancama, organskog i neorganskog porekla najviše dolaze do izražaja u konzorcijumu, pri čemu dva ili više mikroorganizma razlažu neku od komponenti ko-metabolički. Svi mikroorganizmi prisutni na zagađenoj lokaciji, kulturabilni i nekulturabilni, mogu se identifikovati metagenomskom analizom, a upotrebom multiomiks i integromiks tehnika moguće je pretpostaviti međusobne odnose mikroorganizama, odnose mikroorganizam-zagađujuća supstanca i predvideti nastale intermedijere i proizvode razgradnje.

Tokom postupka bioremedijacije ne samo da dolazi do čišćenja i izlečenja životne sredine nego se sa njim paralelno odvija i proces humifikacije. Humifikacija je prirodni proces posredovan geomikrobnim mehanizmima u kojima se organska supstanca prevodi u huminske supstance. Značaj humifikacije ogleda se u tome što se sa porastom količine humusa u zemljištu povećava njegova plodnost, tako da je nakon paralelnog odvijanja bioremedijacije i humifikacije kvalitet zemljišta poboljšan.

Mikroorganizmi izolovani iz zagađene životne sredine pored sposobnosti da degraduju polutante mogu proizvoditi različite proizvode kao što su egzopolisaharidi, ramnolipidi, siderofore, enzimi kao i neki sekundarni metaboliti. Egzopolisaharidi mikrobnog porekla doprinose procesima bioremedijacije povećavajući rastvorljivost nepolarnih jedinjenja u vodenoj sredini. Zahvaljući njihovoj velikoj raznolikosti i karakteristikama (prirodni, biokompatibilni, netoksični, biodegradabilni polimeri) egzopolisaharidi se primenjuju u industriji hrane, medicini i kozmetici i kao biomaterijali. Kako bi se procesi proizvodnje egzopolisaharida unapredili, neophodno je istraživanja usmeriti na identifikaciju novih mikrobnih izolata koji sa visokim prinosom proizvode željeni polisaharid.

Prvi cilj ovog rada je bio da se ispita primena mikroorganizama izolovanih iz naftom zagađenih lokaliteta, rečnog sedimenta i zemljišta, za bioremedijaciju, ali i utvrdi sastav mikrobne zajednice na mestu zagađenja metagenomskog analizom i potvrdi teza o istovremenom odvijanju procesa bioremedijacije i humifikacije. Drugi cilj je bio da se izoluje i okarakteriše producent egzopolisaharida, kao i da se optimizuje proizvodnja egzopolisaharida i odredi njegov sastav.

Da bi ciljevi zadati u disertaciji bili ostvareni, formulisani su sledeći zadaci:

- Izolovanje konzorcijuma mikroorganizama koji degraduju naftne ugljovodonike;
- Ispitivanje bioremedijacionog potencijala konzorcijuma mikroorganizama degradera naftnih ugljovodonika na primeru isplaćne jame;

- Ispitivanje bioremedijacionog supstrata fizički, hemijski i mikrobiološki na početku, nakon 60, 90 i 180 dana;
- Metagenomska analiza bioremedijacionog supstrata na početku postupka bioremedijacije;
- Ispitivanje bioremedijacionog potencijala konzorcijuma mikroorganizama degradera naftnih ugljovodonika na primeru zemljišta kontaminiranog naftom i rafinerijskim proizvodima obrade nafte – *ex situ* tretman;
- Ispitivanje sadržaja naftnih ugljovodonika i grupnog sastava kompozitnih uzoraka na početku, nakon 60, 120 i 150 dana i njihova mikrobiološka analiza;
- Određivanje sadržaja huminskih kiselina u kompozitnim uzorcima;
- Strukturna karakterizacija izolovanih huminskih kiselina;
- Fenotipska i genotipska karakterizacija mikroorganizma izolovanog iz zagađene životne sredine naftom i rafinerijskim proizvodima prerade nafte sposobnog da proizvodi egzopolisaharide;
- Izolovanje proizvedenog egzopolisaharida iz fermentacione tečnosti, njegovo prečišćavanje i karakterizacija.

Dobijeni rezultati bi trebalo da odgovore na pitanja o aktivnosti mikrobnih konzorcijuma, o sastavu mikrobnih zajednica, da omoguće razumevanje međusobnog odnosa postupka bioremedijacije i procesa humifikacije, ali i da daju odgovore o optimalnim uslovima produkcije egzopolisaharida pomoću mikroorganizma izolovanog iz zagađene životne sredine.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Bioremedijacija – mikrobiološka metoda za remedijaciju lokaliteta zagađenih naftom i rafinerijskim proizvodima prerade nafte

2.1.1. Nafta i rafinerijski proizvodi prerade nafte

Nafta je prirodna, masna, zapaljiva tečnost prisutna ispod površine zemlje, a potiče iz prirodnih geoloških naslaga nastalih organskim raspadanjem drevnih biljaka i životinja (Chandra et al, 2013). Transformacija organske supstance do nafte u geosferi se odvija u dve faze. U fazi rane dijageneze na površinskim slojevima zemljišta pri niskim temperaturama i pritiscima, lignin, ugljeni hidrati, proteini i lipidi se pod dejstvom mikroorganizama degraduju do oligo- i monosaharida, aminokiselina i masnih kiselina. Ove proizvode razgradnje, mikroorganizmi usvajaju kao hranu, dok deo ostaje nerazgrađen u sedimentu i njegova transformacija počinje formiranjem geomonomera. U fazi kasne dijageneze geomonomeri polimerizuju ili polikondenzuju do fulvo i huminskih kiselina i nerastvornog humina. Iz humina se dominantno gradi kerogen čime se dijageneza završava. Pored kerogena nastaju i male količine rastvornih supstanci, tzv. nasleđeni bitumen koga čine ugljovodonici, lipidi, pigmenti (izoprenoidi i porfirini) i metaboliti kao što su steroidi i terpenoidi. U fazi katageneze taloženjem nastalih slojeva, organska supstanca dolazi na dubine do 1000 m na kojima su temperature od 50 do 150 °C, a pritisci 300-1700 bara. U ovoj fazi, degradacijom kerogena nastaje velika količina gasa i bitumen koji se sastoji iz malih molekula rastvornih u organskim rastvaračima. Nastali bitumen meša se sa nasleđenim bitumenom. Akumulacija bitumena u sedimentnim stenama stvara uslove za njegovu migraciju do rezervoarskih stena gde se akumulira u vidu nafte (Schwarzbauer, Jovančičević 2015).

Nafta se sastoji iz ugljovodonika koji se mogu podeliti u četiri glavne grupe:

alkani (parafini) – alifatični, zasićeni ugljovodonici;

cikloalkani (naftaleni) – u obliku prstena, zasićeni;

alkeni (olefini) – alifatični, nezasićeni ugljovodonici (prisutni u tragovima);

areni (aromatna jedinjenja) – sadrže makar jedan benzenov prsten - benzen, toluen, etilbenzen, ksilen (*benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene, BTEX, eng.*) ili tri ili više prstena – policiklični aromatični ugljovodonici (*polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH, eng.*) (Kuppusamy et al, 2019).

Druga jedinjenja zastupljena u nafti su asfalteni, rezini, voskovi i katran, kao i neugljovodonična frakcija koja se sastoji iz NSO (*nitrogen-, sulfur- and oxygen- containing compounds, NSO, eng.*) jedinjenja - jedinjenja koja sadrže azot, sumpor ili kiseonik (Ossai et al, 2020). Nafta se industrijski obrađuje u cilju dobijanja proizvoda u koje spadaju tečni naftni gas, benzin, kerozin, dizel, lož ulje i asfalt ili bitumen (rafinisani bitumen, smola) (Groysman 2014).

2.1.2. Nafta i rafinerijski proizvodi prerade nafte kao kontaminanti životne sredine

Nafta i rafinerijski proizvodi prerade nafte se široko upotrebljavaju, a usled procesa obrade (rafinacije), transporta i korišćenja može doći do njihovog izlivanja u zemljište/sediment i vode. Nakon dospevanja u zemljište, naftni ugljovodonici se mogu rastvoriti u vodi, deo se adsorbuje na organskoj supstanci u zemljištu, a određena količina prelazi u gas. U vodenim sredinama oni "plivaju" po površini u vidu tankih filmova - naftnih mrlja iz kojih isparavaju, rastvaraju se, disperguju, emulguju, a teže molekulske frakcije ugljovodonika padaju na rečno ili morsko dno.

Kontaminacija životne sredine naftom i rafinerijskim proizvodima njene prerade ima za posledicu negativan uticaj po živi svet usled bioakumulacije ugljovodonika u lancu ishrane i njihovog toksičnog delovanja. Čovek može uneti kontaminant kontaktom sa kontaminiranim zemljištem,

udisanjem isparljivih zagađujućih supstanci i infiltracijom kontaminacije iz zemljišta u akvifere podzemne vode koja se koristi za piće. Toksično i letalno dejstvo naftnih ugljovodonika zavisi od njihovih osobina, kao što su molekulska masa, hemijska struktura i sastav, tačka ključanja, od načina na koji je organizam izložen, vremena izloženosti i doze. Studije pokazuju da se toksična dejstva ovih jedinjenja mogu ispoljiti ukoliko je organizam u kontaktu sa velikom količinom kontaminanta, dok efekti pri izlaganju niskim koncentracijama još uvek nisu poznati. Poznato je da su linearni alkani manje toksični od aromatičnih jedinjenja, a Američka agencija za zaštitu životne sredine (*The United States Environmental Protection Agency, US EPA, eng.*) kategorisala je 16 policikličnih aromatičnih jedinjenja kao visoko toksične. Kontaminacija zemljišta naftom i proizvodima dobijenim rafinerijskom preradom nafte ima za posledicu inhibiciju rasta biljaka usled smanjenog unosa vode i minerala i narušenog metabolizma, dok u morskim sistemima utiče na živi morski svet. Pored toga, zagađenje negativno utiče na ekonomiju i turizam (Imam et al, 2019, Imam et al, 2021, Imron et al, 2020, Khalid et al, 2021, Kumar et al, 2022, Okoh et al, 2020, Ossai et al, 2020, Raju, Scalvenzi 2018, Shakya et al, 2021).

2.1.3. Bioremedijacija i faktori koji utiču na proces bioremedijacije

Usled negativnog uticaja nafte i rafinerijskih proizvoda njene prerade na životnu sredinu neophodno je sprovesti remedijaciju zagađene sredine. Procesi remedijacije imaju za cilj uklanjanje kontaminanta – smanjenje njegove količine, razgradnju i obnavljanje osobina i funkcija zemljišta što je od velikog značaja za sveukupni oporavak ekosistema (Imam et al, 2019, Imron et al, 2020, Kumar et al, 2022, O'Brien et al, 2017, Okoh et al, 2020).

Tehnike remedijacije se po upotrebljenom agensu mogu podeliti na fizičko-hemijske, hemijske, toplotne, elektromagnetne, tehnike koje primenjuju zračenje i biološke.

Primena bioloških agenasa za čišćenje životne sredine predstavlja isplativ biotehnološki pristup koji je sve češće u upotrebi i ima blagu prednost u odnosu na druge remedijacione tehnike. Postoji nekoliko tipova bioremedijacije, zavisno od upotrebljenog agensa, a može biti mikroba remedijacija (upotrebljava mikroorganizme), fitoremedijacija (koristi biljke) i mikoremedijacija (primenjuje gljive). Doktorska disertacija se bazira na primeni mikroorganizama u cilju remedijacije životne sredine, pa će u daljem tekstu biti opisan ovaj vid bioremedijacije. U ovom postupku mikroorganizmi smanjuju nivo zagađujućih supstanci tako što ih degraduju, transformišu i prevode do netoksičnog oblika. Da bi bioremedijacija bila uspešna moraju biti ispunjeni određeni uslovi, jer mikrobni procesi u zemljištu zavise od njegove teksture, propustljivosti, dostupnog kiseonika, vlažnosti, temperature, pH vrednosti, dostupnih hranljivih supstanci, saliniteta i pritiska u njemu. Pored karakteristika zemljišta i uslova u životnoj sredini na uspešnost procesa bioremedijacije utiču i osobine supstrata i njegova biodostupnost i kvalitet i sastav konzorcijuma (Ajona, Vasanthi 2021, Das, Kazy 2014, Imron et al, 2020, Khalid et al, 2021, Madhavi et al, 2021, O'Brien et al, 2017, Okoh et al, 2020, Ossai et al, 2020).

2.1.3.1. Kiseonik

Kiseonik je neophodan elektron akceptor pri razgradnji visoko redukovanih supstrata kao što su ugljovodonici, a kao alternativa mogu poslužiti nitrati, gvožđe, bikarbonati i sulfati. Dostupnost kiseonika mikroorganizmima zavisi od tipa i vlažnosti zemljišta, a efikasnost razgradnje kontaminanta je mnogo veća u njegovom prisustvu zbog čega ga većina bioremedijacionih tehnika uvodi u cilju stimulacije aerobnih procesa. Ukoliko se zemljište dodatno obrađuje u njemu je još bolja cirkulacija

kiseonika što dodatno doprinosi aktivnosti aerobnih mikroorganizama. Postoje različiti procesi za obradu zemljišta u cilju povećanja aeracije kao što su mehaničko mešanje, prevrtanje zemljišta, bioventilacija, uvođenje vazduha i dodatak vodonik-peroksida ili magnezijum-peroksida kao alternativnih izvora kiseonika (Chandra et al, 2013, Imam et al, 2019, Imron et al, 2020).

2.1.3.2. Vlažnost

Na snabdevanje mikroorganizama kiseonikom i procese oksidacije utiče procenat vlažnosti zemljišta. Pored toga, voda omogućava ulazak kontaminanta u mikrobnu ćeliju, ali i izlazak proizvoda razgradnje iz nje. Ako je zemljište previše vlažno usporen je prolazak kiseonika kroz njega, a ukoliko je presušeno dolazi do usporavanja procesa degradacije. Zbog toga je najbolje vlagu održavati u okviru optimalnih vrednosti, a idealna vrednost retencionog vodnog kapaciteta (RVK) za procese razgradnje iznosi 30-90% (Chandra et al, 2013, Okoh et al, 2020).

2.1.3.3. Temperatura

Temperatura direktno utiče na hemijske osobine zagađujućih supstanci, ali i na raznovrsnost, fiziologiju i aktivnost mikrobne flore. Ukoliko je temperatura niža, viskozitet ugljovodoničnih zagađujućih supstanci je veći, a isparljivost manja, a pri višim vrednostima viskozitet se smanjuje, a raste rastvorljivost što pozitivno utiče na biorazgradnju. S druge strane, njen uticaj na mikroorganizme i njihove enzime se ogleda u tome što su pri nižim temperaturama oni manje aktivni, dok se aktivnost enzima povećava kako temperaturne vrednosti u životnoj sredini rastu ka optimalnim. Usled toga, ubrzava se bakterijski metabolizam i razgradnja kontaminanta. Najveća efikasnost biorazgradnje je na 15-20 °C u morskim sistemima, u svežoj vodi na 20-30 °C, a u zemljištu u opsegu 30-40 °C (Chandra et al, 2013, Imam et al, 2019, Imron et al, 2020).

2.1.3.4. pH vrednost

pH vrednost je od izuzetne važnosti za procese degradacije jer utiče na rastvorljivost i dostupnost hranljivih supstanci i metala, kao i na rast mikroorganizama. U zavisnosti od porekla zemljišta ona može varirati od 2,5 u rudničkim zemljištima do 11 u slanim alkalnim pustinjama. Odvijanje reakcije karboksilacije je najefikasnije u opsegu pH vrednosti 6,5 – 8, usled čega je i mikrobna razgradnja ugljovodonika najbolja. Ove vrednosti pogoduju većini heterotrofnih bakterija i gljiva, dok su neke gljive tolerantne i na kiselije uslove. Ukoliko pH zemljišta nije odgovarajuća za procese degradacije može se promeniti dodatkom kreča ili aluminijum-sulfata (Chandra et al, 2013, Imron et al, 2020, Okoh et al, 2020).

2.1.3.5. Hranljive supstance

Dostupne hranljive supstance utiču na rast mikrobnih ćelija i uspešnost biodegradacije. Da bi se metabolizam normalno odvijao mikroorganizmima su potrebni elementi kao izvor energije, a procesi razgradnje zavise od dodatka azota, fosfora i gvožđa. Preporučeni odnosi C:N:P iznose u opsegu od 100:10:1 do 100:1:0,5. Iako azot i fosfor poboljšavaju procese bioremedijacije, dodati u mnogoj većoj

količini u odnosu na optimalnu mogu inhibirati biodegradacionu aktivnost mikroorganizama. Hranljive supstance se često dodaju đubrenjem zemljišta, a može se koristiti đubrivo organskog porekla ili mineralno (Chandra et al, 2013, Imam et al, 2019, Okoh et al, 2020).

2.1.3.6. Salinitet i osmotski pritisak

Salinitet i pritisak predstavljaju ograničavajući faktor za uspešnost bioremedijacije, a iako nisu međusobno povezani na sličan način utiču na procese degradacije. Sa porastom saliniteta ili pritiska opada efikasnost biorazgradnje kao posledica smanjenog metabolizma mikroorganizama. Usled povećanog saliniteta dolazi do porasta osmotskog pritiska u ćeliji i inhibicije sinteze makromolekula u ćeliji, tj. inhibicije sinteze enzima i smanjene efikasnosti procesa biodegradacije. Takođe, visok procenat soli u vodi smanjuje količinu kiseonika dostupnu mikroorganizmima. Pri salinitetu zemljišta od 1 do 3% bakterije mogu razgraditi ugljovodonike sa procentom razgradnje većim od 50%, dok je degradacija kontaminanta manja od 30% ukoliko se procenat soli poveća iznad 3%. Pri izrazito visokom salinitetu (preko 20 %) efikasnost mikroorganizama je veoma loša (Chandra et al, 2013, Imron et al, 2020).

2.1.3.7. Osobine zemljišta

Na bioremedijaciju utiče tekstura zemljišta od koje zavisi njegova vlažnost, gustina i propustljivost. Zemljište izgrađeno od krupnijih čestica ima bolju propustljivost od prašenog. U prašenom matriksu je usled slepljivanja čestica otežan transport hranljivih supstanci i vode i distribucija kiseonika. Ipak, veća efikasnost procesa bioremedijacije u ovakvom zemljištu moguća je dodatkom slame ili piljevine. Na bioremedijaciju pored teksture zemljišta utiče i njegov sastav, procenat organske supstance, gline i peska (Beškoski et al, 2012).

2.1.3.8. Biodostupnost

Biodostupnost je jedan od ključnih faktora za efikasnu biorazgradnju i predstavlja količinu supstrata koja je fizičko-hemijski dostupna mikroorganizmima. Odnos supstrat-mikroorganizam zavisi od tipa supstrata, njegove molekulske strukture, koncentracije, sposobnosti sorpcije u zemljištu i rastvorljivosti. Biodostupnost supstrata se može povećati dodatkom surfaktanata koji smanjuju površinski napon vode i povećavaju rastvorljivost hidrofobnih kontaminanata. Surfaktanti mogu biti hemijskog porekla, a iako pomažu pri degradaciji naftnih ugljovodonika mogu loše uticati na životnu sredinu. Biosurfaktanti, surfaktanti proizvedeni od strane mikroorganizama su manje toksični, više biorazgradivi, selektivniji i specifičniji i oni predstavljaju bolji izbor za primenu u bioremedijaciji nego oni hemijskog porekla. U biosurfaktante spadaju ramnolipidi, trehalolipidi, lipopeptidi, surfaktini, polimeri kao što su emulzan i egzopolisaharidi, a proizvode ih mikroorganizmi rodova *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Gallaecimonas*, *Micrococcus*, *Myroides*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Serratia*, *Shewanella* i *Vibrio* (Beškoski et al, 2012, Chandra et al, 2013, Imam et al, 2019, Imron et al, 2020).

2.1.3.9. Kvalitet i sastav konzorcijuma

Primenjeni konzorcijum je jedan od najbitnijih faktora koji utiče na uspešnost biodegradacije. U većini slučajeva mešana mikrobna kultura ima prednost u poređenju sa primenom samo jednog mikroorganizma. Heterogeni bakterijski konzorcijumi pokazuju odličan degradacioni kapacitet, pri čemu unutar konzorcijuma neke bakterijske vrste proizvode biosurfaktante, neke vrše razgradnju kompleksnijih naftnih ugljovodonika, a neki mikroorganizmi unutar istog konzorcijuma dalje razgrađuju jednostavnije proizvode dobijene razgradnjom kompleksnih ugljovodonika (Imam et al, 2019, Imam et al, 2021, Imron et al, 2020, Khalid et al, 2021, Okoh et al, 2020, Ossai et al, 2020).

2.1.4. Bioremedijacioni procesi

Postoji nekoliko podela bioremedijacionih procesa, a prema mestu izvođenja postoje *in situ* i *ex situ* postupci. Procesi *in situ* bioremedijacije se odvijaju na mestu zagađenja, dok je za *ex situ* postupke neophodno iskopavanje kontaminiranog zemljišta/sedimenta ili izvlačenje podzemnih voda i prenošenje u cilju čišćenja. *In situ* tretman ne zahteva narušavanje strukture kontaminiranog uzorka, ali je potrebno izgraditi infrastrukturu na mestu zagađenja. U procesima ovog tipa teže je kontrolisati parametre kao što su temperatura, vlažnost, aeracija, a vreme trajanja je duže od *ex situ* tretmana. *Ex situ* tretman kontaminiranog uzorka obezbeđuje bolju kontrolu parametara i kraće traje. Ipak, prilikom iskopavanja i prenošenja karakteristike kontaminiranog uzorka se mogu izmeniti (Ajona, Vasanthi 2021, Madhavi et al, 2021, O'Brien et al, 2017, Okoh et al, 2020).

Bioremedijacioni procesi se mogu podeliti na biostimulaciju i bioaugmentaciju. Biostimulacija predstavlja stimulaciju sposobnosti autohtonih mikroorganizama da razgrađuju kontaminant podešavanjem abiotičkih faktora i uvođenjem hranljivih supstanci koje povećavaju brzinu razgradnje. Pored hranljivih supstanci u stimulatoru spadaju i biosurfaktanti, biopolimeri i đubriva. Bioaugmentacija predstavlja upotrebu dodatih mikroorganizama koji sa visokom efikasnošću razgrađuju naftne ugljovodonike (Ajona, Vasanthi 2021, Imam et al, 2021, Madhavi et al, 2021, O'Brien et al, 2017, Okoh et al, 2020, Ossai et al, 2020).

U bioremedijacione procese spada nekoliko tehnologija koje se mogu primeniti i koje su objašnjene u okviru dostupne literature: prirodno smanjenje (*natural attenuation, eng.*), bioprovetravanje (*bioventing, eng.*), produvanje (*biosparging, eng.*), biosisavanje (*bioslurping, eng.*), površinska obrada zemljišta (*landfarming, eng.*), uređene biološke gomile, halde (*biopiles, eng.*), kompostiranje (*composting, eng.*) i bioremedijacija u bioreaktorima (*bioslurry, eng.*) (Ossai et al, 2020, Raju, Scalvenzi 2018).

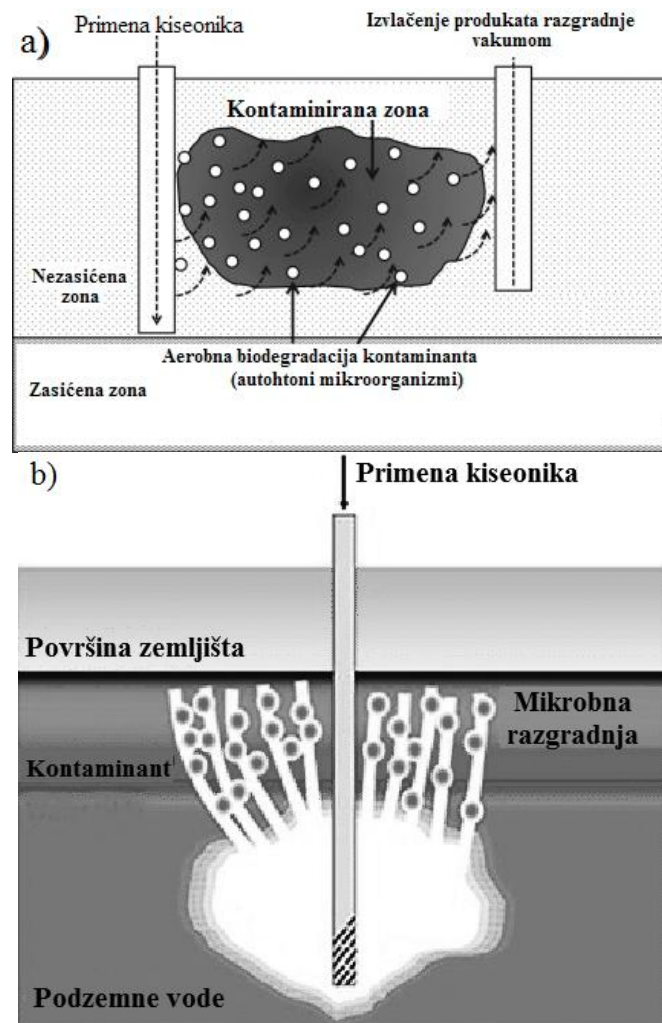
2.1.4.1. Prirodno smanjenje

Prirodno smanjenje predstavlja spontanu bioremedijaciju na mestu zagađenja tj. smanjenje količine zagađujućih supstanci u kontaminiranoj životnoj sredini prirodnim putem. Nekoliko procesa je uključeno u prirodno smanjenje – biološka degradacija, isparavanje i razblaživanje kontaminanta, sorpcija polutanata na organsku supstancu i minerale gline u zemljištu. Ova tehnologija se koristi za čišćenje izdani (akvifera) nakon uklanjanja glavnog izvora zagađenja, a najčešće za uklanjanje BTEX frakcije, hlorovanih ugljovodonika, pesticida i neorganskih jedinjenja. Efikasnost prirodnog smanjenja zavisi od geologije, hidrologije i mikrobiologije, a dužina trajanja procesa predstavlja glavni nedostatak pri odabiru ove tehnologije za bioremedijaciju (Ossai et al, 2020, Raju, Scalvenzi 2018).

2.1.4.2. Tehnologije bioprovetravanja, produvanja i bioisivanja

Bioprovetravanje i produvanje predstavljaju *in situ* remedijacione tehnologije. Kod tehnologije bioprovetravanja (slika 2.1.a) u nezasićenu zonu zemljišta se pored kiseonika dodaju i hranljive supstance, a sve u cilju poboljšanja autohtonih aerobnih procesa biorazgradnje. Ova tehnika se primenjuje za remedijaciju zemljišta kontaminiranog naftnim ugljovodonicima (Ajona, Vasanthi 2021, Macaulay, Rees 2014, Madhavi et al, 2021, Ossai et al, 2020, Raju, Scalvenzi 2018).

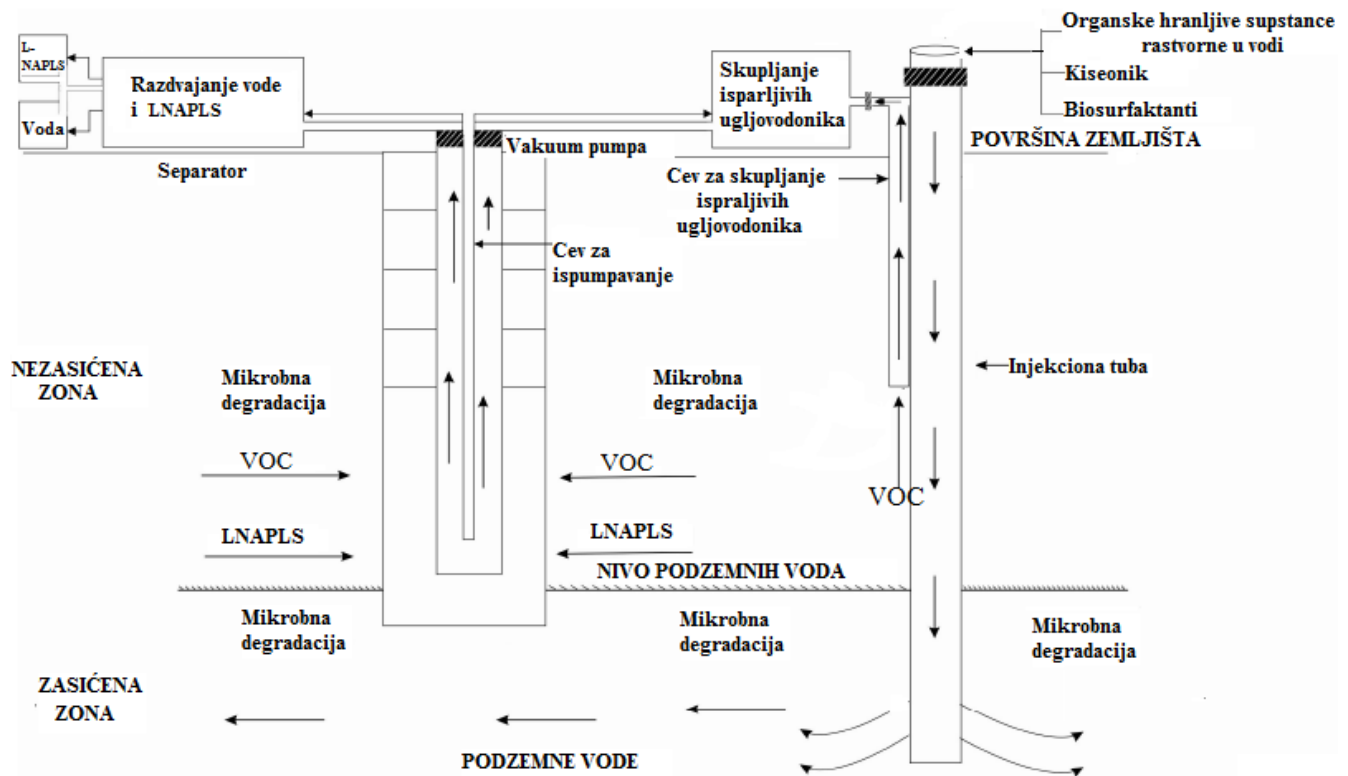
Tehnologija produvanja podrazumeva unošenje kiseonika i hranljivih supstanci pod pritiskom, ali u zasićenu zonu zemljišta (slika 2.1.b). Pod pritiskom kiseonika isparljiva organska jedinjenja prelaze u nezasićenu zonu zemljišta i dolazi do stimulacije autohtonih mikroorganizma na razgradnju kontaminanta. Efikasnost procesa produvanja zavisi od propustljivosti zemljišta i degradabilnosti zagađujućih supstanci. Ova tehnologija se često koristi za remedijaciju izdani kontaminiranih rafinerijskim proizvodima prerade nafte, prvenstveno dizelom i kerozinom i podzemnih voda kontaminiranih BTEX frakcijom (Macaulay, Rees 2014, Madhavi et al, 2021, Ossai et al, 2020, Raju, Scalvenzi 2018).



Slika 2.1. Tehnologija bioprovetravanja (a) i tehnologija produvanja (b)

(prema Brown et al, 2017, Kumar et al, 2018).

Bioisusavanje je relativno nova *in situ* tehnika bioremedijacije koja kombinuje tehnologiju bioprovetravanja i tehnologiju ispumpavanja slobodnih produkata iz podzemnih voda – kapljice ulja i čvrste supstance. Tehnologija ispumpavanja se zasniva na razdvajanju isparljivih ugljovodonika (*volatile organic compounds, VOC, eng.*), nevodene tečne faze ugljovodonika lakših od vode (*light non-aqueous phase liquid saturates, LNAPLS, eng.*) i male količine podzemnih voda i naknadnom ispumpavanju. U novije vreme često se sa procesom ispumpavanja nevodene tečne faze ugljovodonika koristi i tehnologija prodivavanja. Na slici 2.2. je prikazana shema kombinacije tehnologija bioisusavanja i prodivavanja. Kroz injekcionu cev je omogućen unos kiseonika, biosurfaktanata i hranljivih supstanci u podzemne vode. Kroz drugu cev omogućena je ekstrakcija dve faze ugljovodonika, nerastvornih i isparljivih, koji se skupljaju i dalje tretiraju. Tehnologija bioisusavanja je još uvek u razvoju i zahteva analizu troškova i ispitivanja na terenu kako bi se dokazala njena održivost i efikasnost (Macaulay, Rees 2014, Madhavi et al, 2021, Raju, Scalvenzi 2018).



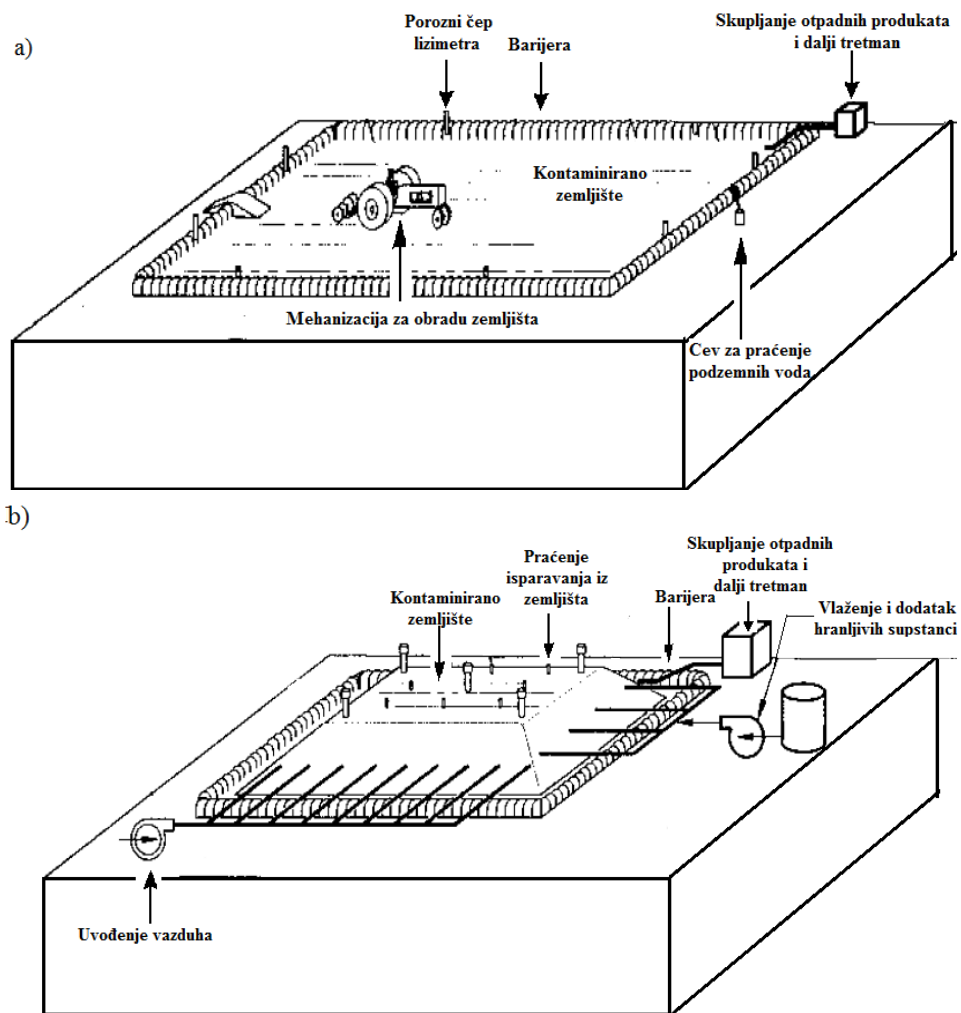
Slika 2.2. Kombinacija tehnologija bioisusavanja i prodivavanja (prema Macaulay, Rees 2014).

2.1.4.3. Površinska obrada zemljišta i halde

Površinska obrada zemljišta predstavlja najjednostavniju tehnologiju bioremedijacije koja nije skupa i ne zahteva mnogo opreme (slika 2.3.a). Ona podrazumeva iskopavanje zagađenog zemljišta i postavljanje na čvrst nosač u vidu tankog rastresitog sloja. Zemljište se tokom tretmana vlaži, obrađuje različitim mehaničkim tehnikama, dodaje mu se azot-fosfor-kalijumovo (N-P-K) đubrivo radi poboljšanja aerobnih autohtonih mikrobnih aktivnosti. Na mestu izvođenja remedijacije izgrađuje se sistem za skupljanje procednih tečnosti i njihov tretman, a zavisno od dubine kontaminacije tretman

može biti *in situ* ili *ex situ*. Ova tehnologija je pogodna za remedijaciju zemljišta kontaminiranog niskomolekulskim naftnim ugljovodicima, isparljivim organskim jedinjenjima i drugim organskim supstancama (Macaulay, Rees 2014, Madhavi et al, 2021, Ossai et al, 2020, Pavel, Gavrilescu 2008, Raju, Scalvenzi 2018).

Halde su projektovane gomile iskopanog kontaminiranog materijala koji se aeriše, vlaži, u njega se dodaju hranljive supstance (slika 2.3.b). One predstavljaju *ex situ* remedijacionu tehnologiju. Razlika između površinske obrade zemljišta i halde je u principu stimulacije aerobnih procesa. Dok se kod tretmana površinskom obradom zemljište mehanički obrađuje, halde zahtevaju sistem cevi kroz koji se propušta vazduh (slika 2.3.). Pored toga, na halde se dodaje i slama u cilju poboljšanja aeracije i stimulacije mikrobnih procesa. One su često pokrивene plastičnim materijalom da bi se sprečilo isparavanje, ali se i pored toga koristi uređaj za praćenje isparavanja iz zemljišta (lizimetar). Ova tehnologija se danas često koristi jer se na lak način mogu kontrolisati svi parametri (Madhavi et al, 2021, Ossai et al, 2020, Pavel, Gavrilescu 2008, Raju, Scalvenzi 2018).



Slika 2.3. Tretman površinskom obradom zemljišta (a) i projektovane gomile, halde (b) (prema Pavel, Gavrilescu 2008).

2.1.4.4. Kompostiranje

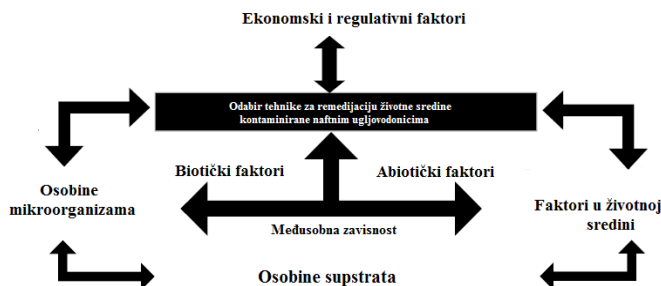
Kompostiranje podrazumeva dodavanje hranljivih supstanci, aeraciju, prisustvo konzorcijuma mikroorganizama, ali i organski otpad koji podleže aerobnoj mikrobnoj razgradnji i poboljšava remedijaciju. Otpad je najčešće stajskog tipa, ali može biti i dvorišni i otpad nastao u procesu obrade hrane. Proces kompostiranja se odvija pri termofilnim uslovima (na temperaturama od 50 do 65 °C). Tip kompostiranja je i vermikompostiranje u kome se koriste kišne gliste (*Lumbricus rubellus* i *Lumbricus terrestris*) koje vrše oksidacione procese, potpomažu aeraciju u zemljištu i poboljšavaju kontakt mikroorganizama sa kontaminantom (Macaulay, Rees 2014, Ossai et al, 2020, Pavel, Gavrilesco 2008, Raju, Scalvenzi 2018).

2.1.4.5. Bioremedijacioni procesi u bioreaktorima

Za *ex situ* tretman kontaminiranog zemljišta moguće je upotrebiti remedijacionu tehnologiju koja podrazumeva primenu mikroorganizama u bioreaktorima. U bioreaktorima je moguće pratiti i kontrolisati temperaturu, dodavati hranljive supstance u tačnim količinama i mešati određenom brzinom u cilju povećanja efikasnosti mikrobnih procesa. Usled podešenih uslova kinetika reakcije je brža, a sistem omogućava kontrolu emisije i ne zauzima mnogo prostora. Pri odabiru ove tehnologije pored pomenutih prednosti moraju se razmotriti i nedostaci procesa - kao što su iskopavanje i transport kontaminiranog materijala, a nekada je neophodan i predtretman istog (Macaulay, Rees 2014, Ossai et al, 2020, Pavel, Gavrilesco 2008, Raju, Scalvenzi 2018).

2.1.4.6. Odabir najadekvatnijeg bioremedijacionog tretmana

Za izbor najboljeg bioremedijacionog tretmana neophodno je pažljivo razmotriti odnose biotičkih i abiotičkih faktora, ekonomske aspekte i regulative koje se odnose na primenu odabranog procesa (slika 2.4.). Biotički i abiotički faktori su međusobno zavisni. Mikrobna aktivnost zavisi od osobina kontaminanta, a osobine kontaminanta zavise od uslova u životnoj sredini. Pri odabiru tehnike razmatraju se priroda i poreklo, sastav i osobine kontaminanta, priroda zagađene životne sredine i distribucija kontaminanta u njoj, ekološki faktori, kao i odnos kontaminanta sa živim sistemima. Prvi korak pri izboru tehnologije za bioremedijaciju podrazumeva analizu lokacije i primenljivost tehnologije u odnosu na uslove lokacije. U drugoj fazi analiziraju se regulative i izvodljivost u odnosu na regulative. Treća faza obuhvata analizu ostalih uslova – efikasnost primenjene tehnologije, njenu cenu i vremenski interval izvođenja (Kuppusamy et al, 2019, Ossai et al, 2020).

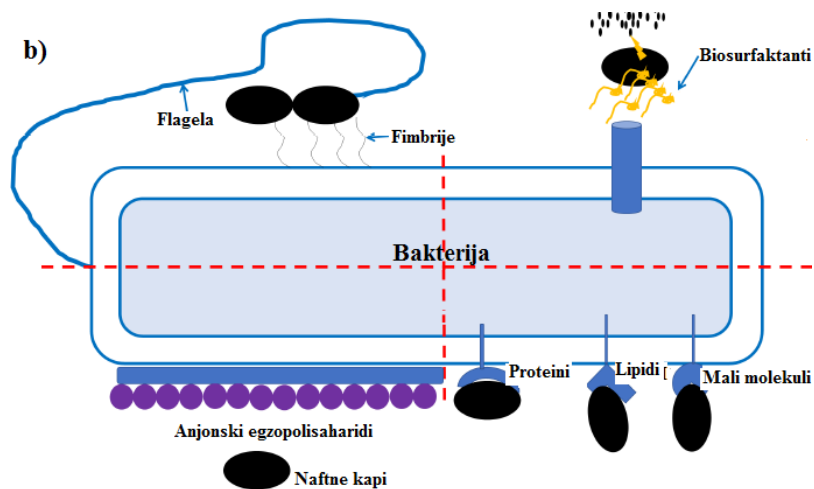
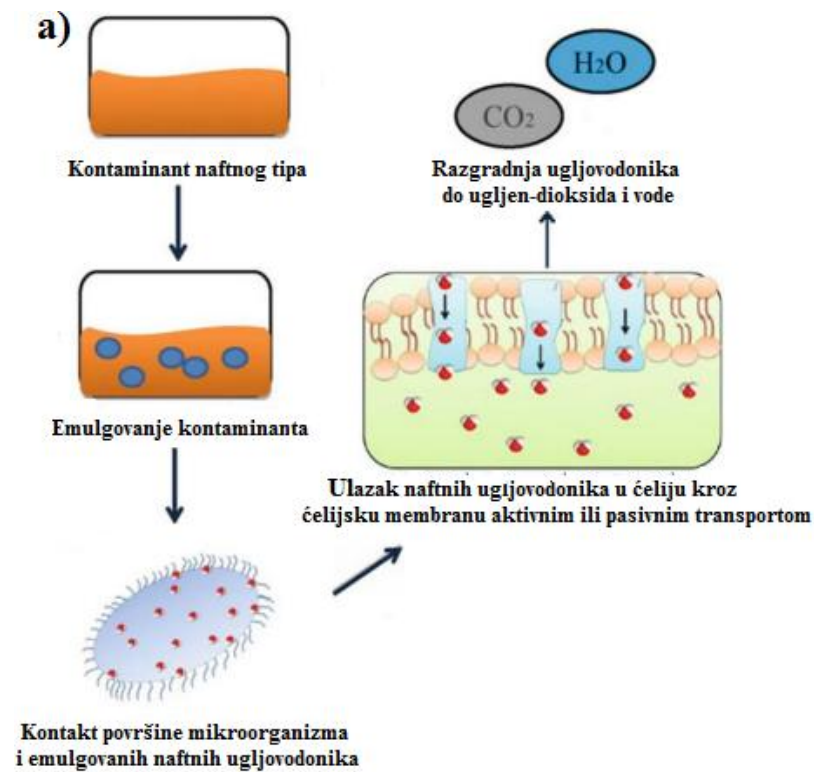


Slika 2.4. Šema međusobne zavisnosti faktora koji utiču na odabir tehnike bioremedijacije (prema Ossai et al, 2020).

2.1.5. Mikroorganizmi i putanje razgradnje naftnih ugljovodonika

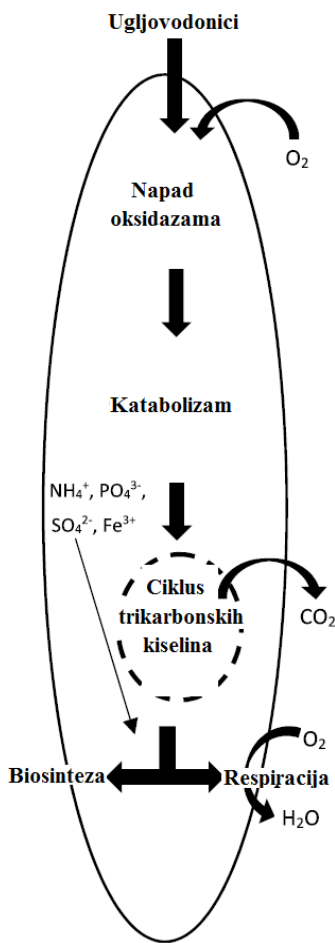
Mikroorganizmi koji koriste naftne ugljovodonike kao izvor energije su veoma raznovrsni i nalaze se u velikom broju u životnoj sredini (Imam et al, 2019, Kumar et al, 2022). Ovu sposobnost imaju Gram-pozitivne bakterije iz rodova *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, Gram-negativne bakterije iz rodova *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas*, ali i gljive iz rodova *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* i *Trichoderma* (Chandra et al, 2013, Imron et al, 2020, Kumar et al, 2022). Upotreba mikroorganizama kao agenasa za biodegradaciju ugljovodonika je u stalnom porastu (Al-Sayegh et al, 2015, Beškoski et al, 2011, Lješević et al, 2019).

Degradacija naftnih ugljovodonika se sa većom efikasnošću odvija aerobno usled prisustva kiseonika kao elektron akceptora, ali su poznati i anaerobni procesi. Takođe, upotreba mikrobnih konzorcijuma je favorizovanija od delovanja pojedinačnih mikroorganizma jer za razliku od njih konzorcijumi poseduju izuzetne enzimske kapacitete i mogućnost razgradnje širokog spektra ugljovodoničnih supstrata. Mikroorganizmi poseduju različite mehanizme za adaptaciju na hidrofobne supstrate, a tokom evolucije i adaptacije karakteristike površine bakterija su se menjale. Prvi korak (slika 2.5.a) u degradaciji naftnih ugljovodonika je njihovo emulgovanje surfaktantima proizvedenim pomoću mikroorganizama. Da bi mikrobna ćelija razgradila naftne ugljovodonike neophodno je da dođe do međusobnog fizičkog kontakta koji je moguć zahvaljujući hidrofobnim fimbrijama i fibrilama, spoljno-membranskim proteinima i lipidima i malim molekulima (gramicidin S i prodigiozin) (slika 2.5.b). Ipak, ukoliko mikroorganizam poseduje negativno naelektrisane egzopolisaharide i kapsulu kontakt može biti inhibiran. Neke bakterije imaju sposobnost modifikacije lipopolisaharida i porina na spoljnoj ćelijskoj membrani. Nakon kontakta ugljovodonici aktivnim ili pasivnim transportom, endocitozom prolaze kroz ćelijsku membranu mikroorganizma i unutar ćelije podležu enzimskoj razgradnji. Enzimi koji učestvuju u degradaciji su oksigenaze, monooksigenaze, dioksidogene i hidrolaze (Chandra et al, 2013, Imam et al, 2019, Imam et al, 2021, Khalid et al, 2021, Raju, Scalvenzi 2018, Shakya et al, 2021, Xu et al, 2018).



Slika 2.5. 4 koraka u razgradnji naftnih ugljovodonika pomoću mikroorganizama (a) (prema Shakya et al, 2021) i fizički kontakt između mikrobne ćelije i naftnih ugljovodonika (b) (prema Xu et al, 2018).

Degradacija naftnih ugljovodonika počinje napadom enzima i kataboličkim procesima (slika 2.6.). Ukoliko bi biorazgradnja bila potpuna, nastali bi ugljen-dioksid, voda i biomasa (Chandra et al, 2013, Imam et al, 2019, Imron et al, 2020). Poznato je da efikasnost razgradnje naftnih ugljovodonika opada od alkana do aromatičnih jedinjenja sledećim redosledom: alkani ravnog niza > razgranati alkani > niskomolekulska aromatična jedinjenja > visokomolekulska aromatična jedinjenja (Imam et al, 2019, Xu et al, 2018).

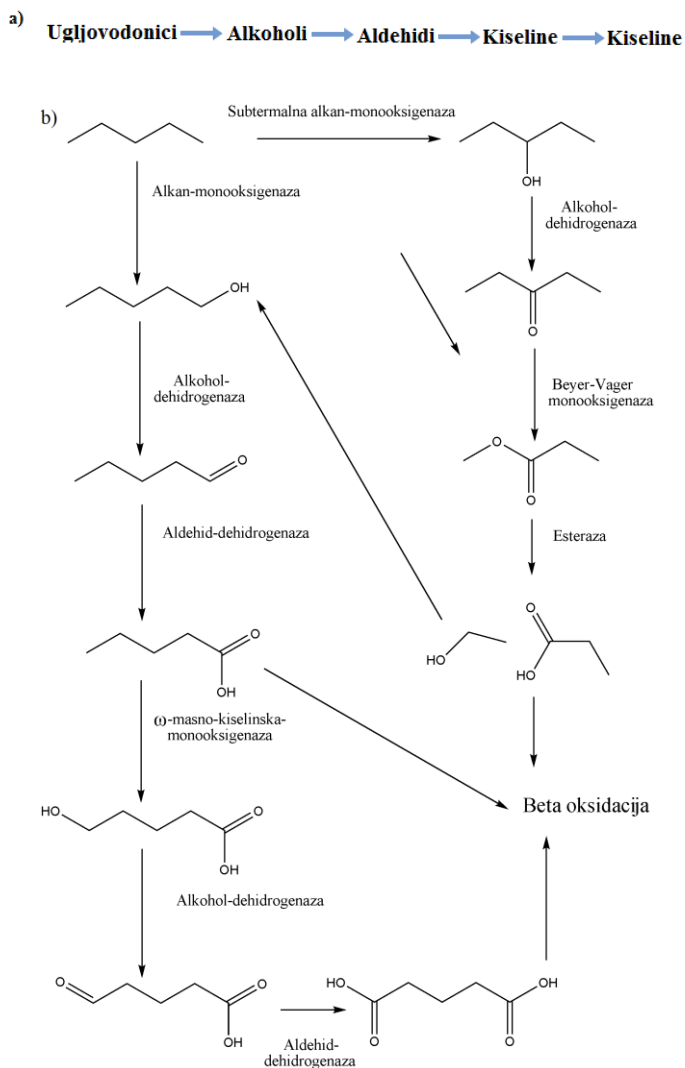


Slika 2.6. Šema degradacije naftnih ugljovodonika (prema Ossai et al, 2020).

Alkani ravnog kratkog niza, do 9 ugljenikovih atoma, su visoko isparljivi, pa i pre nego što podlegnu biodegradaciji veliki deo ispari u atmosferu. Mikroorganizmi *n*-alkane srednje dužine sa 10-24 ugljenikovih atoma najbrže biodegradiju (Chandra et al, 2013). Najotporniji na biodegradaciju su monoaromatični steroidi, diasterani, C₂₁-C₂₂ sterani, diahopani, 25-norhopani, triciklični terpeni, oleanani i gamacerani. Veoma bliski po rezistenciji na biodegradaciju su i C₂₇-C₃₅ hopani i C₂₇-C₂₉ regularni sterani (Head et al, 2003).

2.1.5.1. Putanje razgradnje *n*-alkana

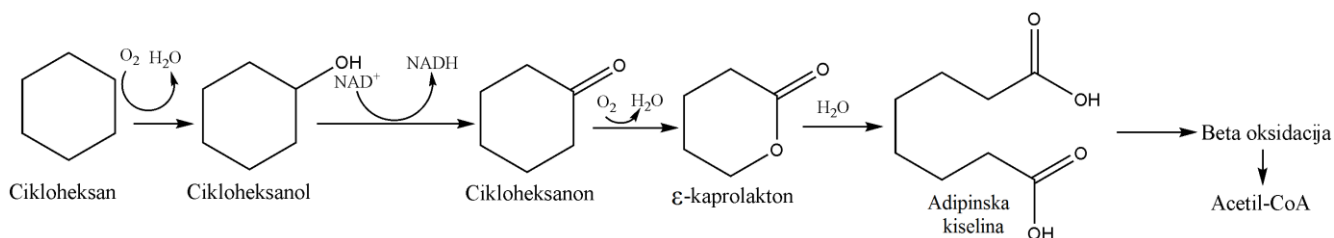
n-Alkani se oksiduju do primarnih alkohola, a zatim dolazi do uklanjanja vodonika iz alkoholne grupe pri čemu nastaju aldehidi i kiseline uzastopnim procesima dehidrogenacije (slika 2.7.a). Nastale kiseline ulaze u proces β -oksidacije i ciklus trikarbonskih kiselina (Krebsov ciklus). Oksidacija *n*-alkana do alkohola se odvija dejstvom enzima monooksigenaza (alkan-hidroksilaze), koje mogu delovati na kraju lanca *n*-alkana ili subterminalno (slika 2.7.b). Ukoliko monooksigenaze dejstvuju na kraju lanca proizvodi sekvencijalno podležu dejstvu alkohol-dehidrogenaze i aldehyd-dehidrogenaze, ω -masno-kiselinske-dehidrogenaze i ponovno alkohol- i aldehyd-dehidrogenaze. Subterminalna putanja podrazumeva sekvencijalno delovanje alkohol-dehidrogenaze, Beyer-Vager-monooksigenaze i esteraze (Chandra et al, 2013, Imam et al, 2019, Imron et al, 2020, Khalid et al, 2021).



Slika 2.7. Šema degradacije *n*-alkana (a) (prema Madigan et al, 2019) i prikaz dejstva enzima na *n*-alkane sa akcentom na monooksigenazama koje mogu delovati na kraju lanca *n*-alkana ili subterminalno. Kao model uzet *n*-pentan (b) (Imron et al, 2020).

2.1.5.2. Putanja razgradnje cikličnih ugljovodonika

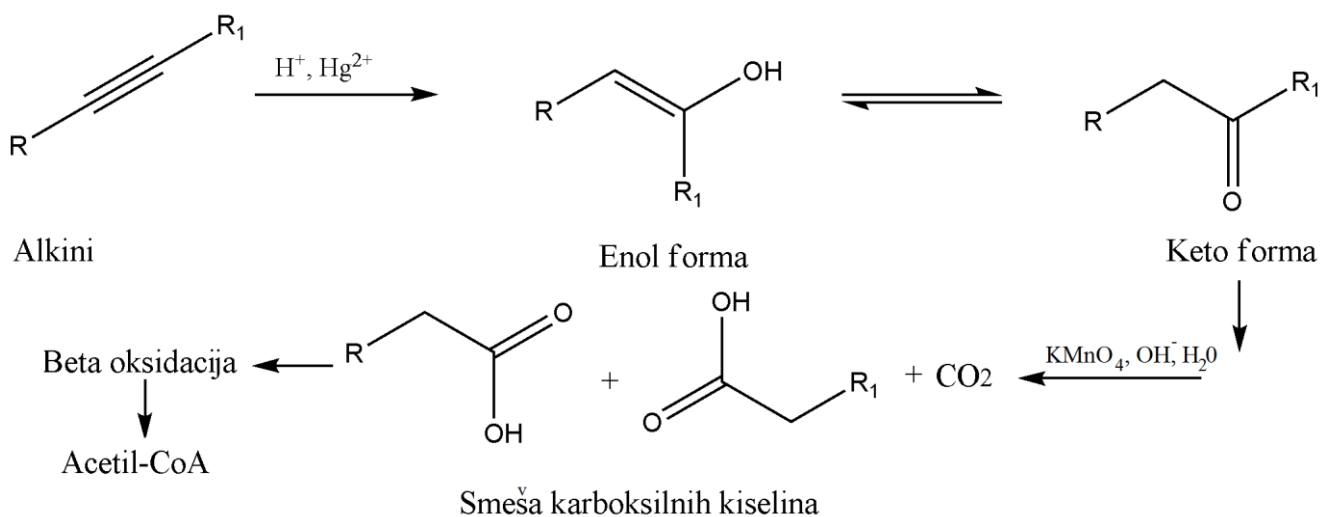
Mikroorganizmi najčešće razgrađuju ciklične ugljovodonike ko-metabolički. Degradaciju otpočinje cikloheksan-monooksigenaza (slika 2.8.) koja uvodi hidroksilnu grupu u cikloheksan i prevodi ga do cikloheksanola koji dejstvom cikloheksanol-dehidrogenaze prelazi u cikloheksanon. Daljom oksidacijom nastaje kaprolakton i adipinska kiselina. Adipinska kiselina ulazi u proces β -oksidacije i ciklus trikarbonskih kiselina. Za reakcije katalizovane cikloheksan-monooksigenazom i cikloheksanon-monooksigenazom neophodan je kiseonik (Imron et al, 2020, Khalid et al, 2021).



Slika 2.8. Šema degradacije cikloalkana na primeru cikloheksana (prema Imron et al, 2020).

2.1.5.3. Putanja razgradnje alkina

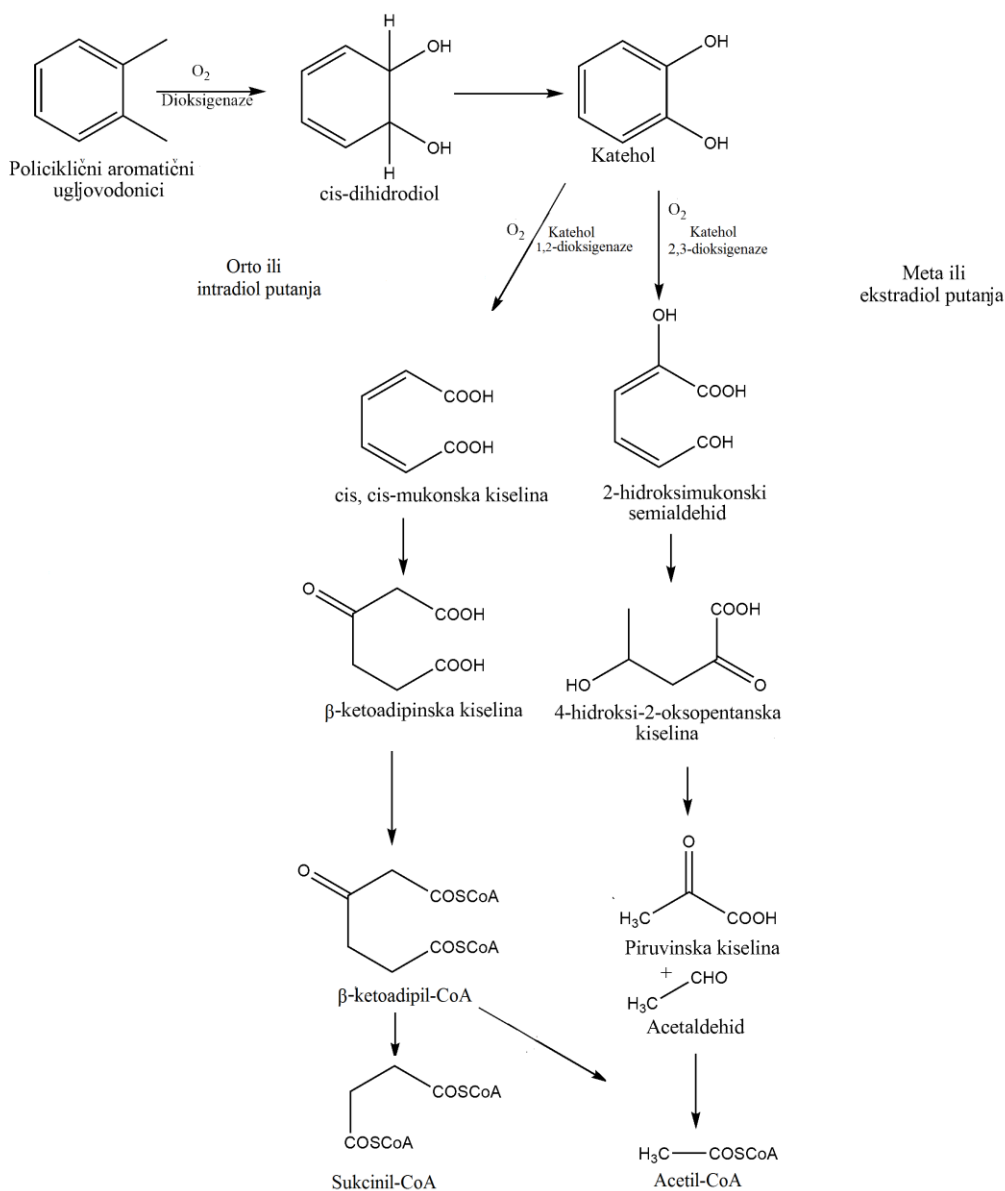
Degradaciju alkina (slika 2.9.) iniciraju voda, H^+ i Hg^{2+} joni, a počinje je alkin-hidrataza formirajući enol koji odmah prelazi u svoju keto formu. Karboksilaza oksiduje keto jedinjenje pri čemu nastaje smeša karboksilnih kiselina koje ulaze u proces β -oksidacije (Imron et al, 2020).



Slika 2.9. Šema biodegradacije alkina (prema Imron et al, 2020).

2.1.5.4. Putanje razgradnje aromatičnih ugljovodonika

Aromatični ugljovodonici su rezistentniji na mikrobnu razgradnju. Prvi korak u degradaciji je nastanak diola pomoću citohrom P450 oksidaznog sistema (slika 2.10.) i katehola nakon čega sledi orto ili meta otvaranje prstena. Pri orto "cepanju" katehola (intradiol putanja) formira se cis,cis-mukonska kiselina od koje nastaje β -ketoadipinska kiselina i β -ketoadipil-CoA koji se razlaže na sukcinil-CoA i acetil-CoA. Pri ekstradiol putanji (meta "cepanje" prstena) formira se 2-hidroksimukonski semialdehid i 4-hidroksi-2-oksopentanska kiselina koja se razlaže na pirogrožđanu kiselinu i acetaldehid iz kog nastaje acetil-CoA. Proizvedeni koenzim A završava u Krebsovom ciklusu (Imron et al, 2020, Khalid et al, 2021, Madigan et al, 2019).



Slika 2.10. Šema biodegradacije aromatičnih ugljovodonika (prema Imron et al, 2020).

2.1.6. Prednosti bioremedijacije

Bioremedijacija je veoma popularna i perspektivna tehnologija za remedijaciju životne sredine. Ona spada u tehnike "prijateljske za okolinu" tj. ne utiče negativno na životnu sredinu, visoko je efikasna u uklanjanjanju kontaminanata, primenljiva u brojnim i površinski velikim kontaminiranim područjima, a spada u tehnike sa niskom cenom izvođenja. Fizičke i hemijske tehnike koje se koriste za remedijaciju daleko zaostaju za bioremedijacijom u pogledu efikasnosti i cene (Chandra et al 2013, Imron et al, 2019, Okoh et al, 2020, Shakya et al, 2021). Još jedna prednost ove tehnike je da se prilikom njene primene na zagađenom zemljištu paralelno odvija i proces humifikacije (Cassidy, Irvine 1998). Humifikacija predstavlja prirodni proces prevođenja organske materije u huminske supstance geo-mikrobnim mehanizmima (Jakovljević, Pantović 1991). Nastanak huminskih kiselina (HK) ima pozitivan uticaj na kvalitet zemljišta i na mikroorganizme u njemu. One pozitivno utiču na mikrobni rast i njihov metabolizam, indukuju sintezu enzima, predstavljaju redoks aktivna jedinjenja koja mogu delovati kao akceptori/donori elektrona (Lipczynska-Kochany, 2018).

2.2. Tehnike za karakterizaciju pojedinačnih mikroorganizama, mikrobnih zajednica i određivanje mikrobne aktivnosti

Za karakterizaciju mikroorganizama i određivanje njihove aktivnosti u životnoj sredini se primenjuju dva osnovna pristupa statički i dinamički. Statički pristupi koji omogućavaju detekciju mikroorganizama bez kontinualnog praćenja njihove aktivnosti su: brojanje kolonija, direktno mikroskopiranje kombinovano sa različitim tehnikama bojenja, određivanje DNK i RNK sastava: fluorescentna *in situ* hibridizacija, lančana reakcija polimeraze i reakcije zasnovane na njoj, analize na čipovima, stabilne izotopske probe i izotopski čipovi, omiks tehnike; enzimska aktivnost, određivanje adenzin-trifosfata, fosfolipidnih masnih kiselina i analiza proteina. Dinamički pristupi koji omogućavaju kontinualno praćenje parametara tokom rasta mikroorganizama zasnovani su na respiraciji i korišćenju supstrata od strane mikroorganizama. Na osnovu dinamičkih tehnika moguće je odrediti aktivnost i brzine procesa, a samo ukoliko su mikroorganizmi aktivni mogu učestvovati u biogeohemijskim ciklusima.

Razlikovanje neaktivnih - "uspavanih", potencijalno aktivnih i aktivnih mikroorganizama moguće je kombinovanjem statističkih i dinamičkih tehnika (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013).

2.2.1. Statički pristupi u karakterizaciji pojedinačnih mikroorganizama, mikrobnih zajednica i određivanju mikrobne aktivnosti

2.2.1.1. Određivanje broja (vijabilnih) ćelija

Broj vijabilnih mikrobnih ćelija se određuje metodom serijskog razblaženja i zasejavanjem na hranljive podloge, a rezultat se prikazuje kao CFU/mL ili CFU/g u odnosu na agregatno stanje analiziranog uzorka (Gojgic-Cvijovic et al, 2012, Madigan et al, 2019). Zavisno od toga u kojoj fazi ciklusa se ćelije nalaze moguće je da broj mikroorganizama na hranljivim podlogama varira. Jednu mikrobnu zajednicu najčešće čini visok procenat nekulturable mikroorganizama, jer se mikroorganizmi manji od $0,065 \mu\text{m}^3$ ne mogu uzgajati u laboratoriji, ali doprinose aktivnosti samog konzorcijuma. Iako je samo 1% mikroorganizama iz životne sredine kulturable u laboratoriji, rezultat dobijen brojanjem ćelija na Petri šoljama odlično koreliše sa enzimskom i respiratornom aktivnošću mikroorganizama (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013, Madigan et al, 2019). Tehnika rasta na hranljivim podlogama služi za rutinsko praćenje broja mikroorganizama i nekih njihovih osobina, kao što su proizvodnja enzima i razgradnja supstrata koji se nalaze u podlogama (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013, Madigan et al, 2019, Paul et al, 2018).

2.2.1.2. Određivanje broja mikroorganizama direktnim brojanjem

Fluorescentna mikroskopija pomoću visoko osetljivih boja omogućava određivanje statusa mikrobnih ćelija odnosno da li su one aktivne, "uspavane" ili mrtve u odnosu na ukupan broj ćelija. Prva grupa boja prolazi kroz neoštećenu ćelijsku membranu i vezuje se za komponente na ćelijskom zidu (polisaharide), membranu i u samoj ćeliji (za DNK i proteine). Najpoznatije boje su: dihlortriazinil-aminofluorescein (koja se vezuje za polisaharide), fluorescein-izotiocijanat (koja se vezuje za proteine), SYBR GREEN i 4,6-diamidino-2-fenilindol (koje se vezuju za nukleinske kiseline). DAPI ima apsorpcioni maksimum na 400 nm i kada se veže ćelija fluorescira plavo, a vezivanjem SYBR GREEN-a čiji je apsorpcioni maksimum na 497 nm ćelija fluorescira zeleno. Ove

boje se nespecifično vezuju za sve mikrobne ćelije u uzorku (i žive i mrtve). Boje koje ne prolaze kroz neoštećenu ćelijsku membranu zahtevaju fiksaciju i omogućavaju bojenje mrtvih ćelija, a primeri ovih boja su etidijum-bromid i propidijum-jodid. Dve boje koje se kombinuju omogućavaju razlikovanje živih i mrtvih ćelija. Direktnim bojenjem živih ćelija pomoću 5-cijano-2,3-ditolil-tetrazolijum-hlorida, fluorescein-diacetata ili 2-(p-jodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil-tetrazolijum-hlorida moguće je odrediti metaboličku aktivnost datih ćelija koja odgovara količini dobijene fluorescencije. Primenom odgovarajućih fluorescentnih tehnika bojenja i adekvatnim izračunavanjima moguće je doći do realnog odnosa između živih i mrtvih, metabolički aktivnih ćelija u ukupnom broju mikroorganizama (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013, Madigan et al, 2019).

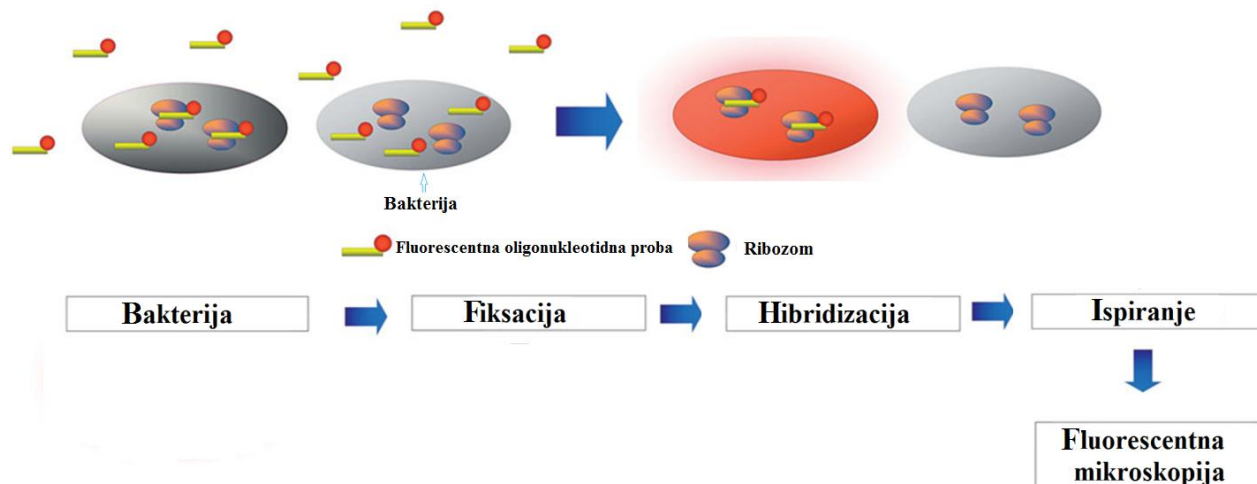
2.2.1.3. Analiza dela mikrobnih zajednica

Molekularne tehnike. Molekularna karakterizacija je esencijalna kako za identifikaciju mikroorganizama, tako i za određivanje metaboličkih putanja i kataboličkih gena odgovornih za razgradnju različitih zagađujućih supstanci. Praćenje količine DNK tokom ćelijskog rasta, količine RNK tokom sinteze proteina, odnosa DNK/RNK ukazuje na mikrobnu aktivnost. Danas se primenjuju tehnike kojima direktno bez ekstrakcije nukleinskih kiselina možemo utvrditi koji su mikroorganizmi aktivni unutar mikrobnih zajednica u životnoj sredini (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013).

Fluorescentna in situ hibridizacija (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH, eng.). FISH (slika 2.11.) predstavlja tehniku sparivanja dve jednolančane oligonukleotidne sekvence iz različitih izvora pri čemu je jedan deo rRNK, a drugi fluorescentno obeležena proba - tačno definisana sekvenca ili hemijski sintetisan molekul. Komplementarnost baza omogućava međusobno povezivanje, a uzorak se posmatra pod fluorescentnim mikroskopom (Frickmann et al, 2017, Paul et al, 2018). Ćelije u mirovanju i njihova rRNK, kao i organske komponente zemljišta se vezuju za oligonukleotidne probe i doprinose da je količina fluorescencije veća nego što bi trebalo da bude za aktivne ćelije.

Kombinacijom FISH tehnike sa mikroautoradiografijom, Ramanskom spektroskopijom, masenom spektrometrijom sekundarnog jona moguće je detektovati metaboličku aktivnost samo jedne ćelije. Ova obećavajuća tehnika se upotrebljava za *in situ* istraživanja mikrobnog rasta, međusobne kompeticije i odnosa mikroorganizam-biljka (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013, Frickmann et al, 2017).

FISH PROCEDURA



Slika 2.11. Procedura fluorescentne *in situ* hibridizacije. Prvi korak čini fiksacija bakterija etanolom ili paraformaldehidom, zatim dolazi do sparivanja fluorescentno obeležene probe i rRNK, nakon čega je uzorak potrebno isprati.

Crvena elipsa predstavlja detektovani mikroorganizam usled uspešnog vezivanja fluorescentno obeležene probe sa rRNK ciljane bakterije (prema Frickmann et al, 2017).

Metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze. Metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze se zasnivaju na izolovanju nukleinskih kiselina iz uzorka, reverznoj transkripciji RNK do cirkularne DNK, njenom umnožavanju, a zatim odvajanju na denaturišućoj gradijent gel elektroforezi (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE, eng.*) ili T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, eng.*) analizi u cilju profilisanja i karakterizacije analizirane mikrobne zajednice.

PCR u realnom vremenu (Real Time PCR, RT-PCR, eng.). Drugi naziv za ovu tehniku je kvantitativni PCR, jer se korišćenjem fluorescentno obeleženih proba posle svakog ciklusa kvantifikuju nastali PCR proizvodi u realnom vremenu. Jedna od prvih korišćenih boja je SYBR GREEN, niske specifičnosti za sekvencu pošto se vezuje za dvolančanu DNK. Ovu boju zamenile su sekvence komplementarne sekvenci koja se umnožava PCR tehnikom, tzv. Taqman-ove probe, sintetisane oligonukleotidne sekvence koje na svom 5' kraju poseduju reporter (prva fluorescentna boja), a na 3' kraju quncher (druga fluorescentna boja). Pre vezivanja za sekvencu DNK koja se umnožava PCR tehnikom, boje su međusobno inhibirane zbog transfera fluorescentne rezonantne energije. Nakon denaturacije ciljane DNK ona se sparuje sa Taqmanovom probom, nakon čega se dejstvom Taq polimeraze proba hidrolizuje i fluorescentne boje više nisu na inhibitornom rastojanju pa dolazi do pojave fluorescencije. Ove probe drugačije se nazivaju hidrolizne probe. Moguće je primeniti i jednolančane sekvence koje formiraju oblik petlje, a na svojim krajevima imaju komplementarne sekvence u dužini od nekoliko baznih parova i dve boje slično kao kod Taqman proba. Isti je princip pojave fluorescencije kao kod Taqman proba. Ova tehnika i korišćenje prajmera za 5,8S rRNK, 16S rRNK, 18S rRNK i funkcionalne gene specifične za oksidaciju amonijaka, metana i sulfata kvantifikuju ukupnu mikrobnu zajednicu (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013, Lagos et al, 2015, Madigan et al, 2019, Paul et al, 2018).

Tehnike otiska prsta. U tehnike otiska prsta (*fingerprinting techniques, eng.*) spadaju: ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, eng.*), T-RFLP, DGGE i SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism, eng.*). Ove tehnike se koriste u istraživanju sastava mikrobnih zajednica, pri čemu se otkrivaju dominantni rodovi unutar zajednice bili oni aktivni ili ne.

ARDRA tehnika se sastoji iz umnožavanja konzerviranih regiona 16S rRNK gena korišćenjem prajmera (PCR), enzimske digestije dobijenih PCR proizvoda, gel elektroforeze dobijenih isečenih fragmenata i analize dobijenih traka.

T-RFPL tehnika podrazumeva fluorescentno obeležavanje kraja PCR proizvoda odnosno pri umnožavanju u PCR reakciji dodaje se jedan ili oba prajmera koji na svom 5' kraju sadrže fluorescentnu boju. Nakon umnožavanja primenjuje se restrikciona digestija PCR proizvoda različitih varijanti jednog gena, a zatim se u DNK sekvenatoru proizvodi digestije razdvajaju na koloni ili gelu i koristi se fluorescentni detektor kako bi se odredila veličina različitih terminalnih fragmenata. Na ovaj način određuju se samo fluorescentno obeleženi terminalni fragmenti, a ne svi proizvodi kao u ARDRA i RFLP analizi. Rezultati koji su predstavljali trake na elektroforezi u finalnoj obradi prikazuju se kao pikovi na elektroforegramu gde je na y osi intenzitet fluorescencije, a na x osi veličina fragmenata. Svaka genetička varijanta predstavlja jedan pik, a visina i površina pika predstavljaju njenu zastupljenost u određenoj zajednici.

DGGE se zasniva na prolasku PCR proizvoda kroz gradijent hemijskog denaturanta u poliakrilamidnom gelu. Za kretanje PCR proizvoda bitni su granična koncentracija i tačka topljenja. Proizvodi koji međusobno imaju različite sekvence različito putuju i zaustavljaju se u obliku traka na gelu. Detaljnija analiza traka zahteva njihovo isecanje, ponovno umnožavanje i sekvenciranje. U DGGE tehnici upotrebljavaju se GC bogati vodeći (*forward, eng.*) prajmeri koji dovode do toga da se dupli lanci PCR proizvoda razdvoje u jednolančane i u tom obliku putuju tokom elektroforeze.

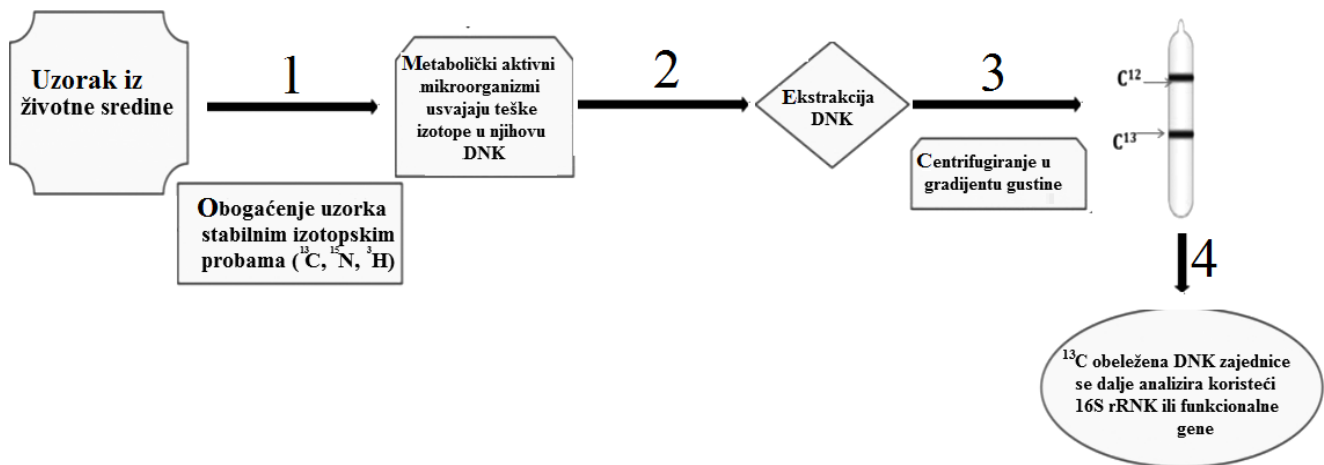
Razlike nastale mutacijama ili kao posledica polimorfizma na nivou jednog nukleotida moguće je detektovati pomoću **SSCP** tehnike. Ove minimalne razlike u sekvenci omogućavaju da fragmenti zauzimaju različite konformacije pa se mogu razdvojiti na gel elektroforezi. Princip tehnike se zasniva na PCR umnožavanju, denaturaciji PCR proizvoda na jednolančane, razdvajanju jednolančanih DNK na gel elektroforezi u nednaturišućim uslovima pri kojima i minimalno različite sekvence zauzimaju različite konformacije i pojavljuju se kao različite trake na gelu.

Sumarno gledano, sve pomenute tehnike otiska prsta zahtevaju PCR umnožavanje 16S rRNK gena, a ARDRA i T-RFPL tehnika zahtevaju i upotrebu restrikcioni enzima. ARDRA tehnika ukazuje na sličnosti unutar vrste i otkriva promene u sastavu mikrobnih zajednica u različitim životnim sredinama, ali spada u vremenski dugotrajne tehnike za rad. T-RFLP je brža od ARDRA tehnike i u isto vreme moguća je analiza više uzoraka. Nedostaci T-RFLP tehnike su lažni pikovi i preklapanje na elektroforegramu dve ili više sekvenci koje dele isto terminalno restrikciono mesto. DGGE je tehnika vremenski kraća od ARDRA tehnike i veoma je dobra za poređenje mikrobioloških profila, ali rezolutivno lošija i nema mogućnost klasifikacije organizama na nižim taksonomskim nivoima. SSCP je jednostavnija i direktnija tehnika od DGGE, ali zahteva više podataka o sekvenciranju i definisanije uslove elektroforeze (Paul et al, 2018).

Analize na čipovima. Mikročipovi predstavljaju genomsku tehnologiju koja se koristi za analizu ekspresije gena i praćenje procesa u životnoj sredini. Funkcionalni genski čipovi (*Functional Gene Arrays, FGA, eng.*) sadrže probe sa genima odgovornim za ključne biogehemijske cikluse u kojima mikroorganizmi učestvuju. Ovim čipovima moguće je povezati mikrobnu raznovrsnost i procese i funkcije u ekosistemima. Najveći izazov u FGA analizi je konstrukcija proba i njihova raznovrsnost. Danas su dizajnirani mikročipovi druge generacije nazvani GeoChip 2.0 koji sadrže preko 24 000

proba za najrazličitije gene čime prevazilaze nedostatke prve generacije. Prednosti upotrebe čipova ogledaju se u kratkom vremenu izvođenja analize, relativno niskoj ceni i raznovrsnosti. He i saradnici su uspešno testirali čipove u procesima bioremedijacije u *in situ* uslovima (He et al, 2007). Pored GeoChip čipova upotrebljavaju se i PhyloChip čipovi. Ovi čipovi druge generacije (G2) se najčešće koriste za analizu urbanog vazduha, čistih prostorija, različitih kliničkih uzoraka, dok su čipovi treće generacije usmereni ka mikrobiologiji životne sredine. Princip rada jedne varijante čipa: nakon sinteze oligonukleotidne sekvence komplementarne genima koje želimo da detektujemo dizajnirani DNK segmenti se fiksiraju na čvrstoj podlozi. Sledeći korak podrazumeva hibridizaciju sa fluorescentno obeleženom mRNK koja se dobija iz ćelija koje su rasle pod tačno definisanim uslovima. Genska ekspresija se meri skeniranjem čipa laserom i očitavanjem fluorescentnog signala koji se dalje kompjuterski obrađuje (Madigan et al, 2019, Paul et al, 2018, Probst et al, 2014).

Stabilne izotopske probe i specifična izotopska analiza. Stabilne izotopske probe i specifična izotopska analiza čiji je princip dat na slici 2.12 daju doprinos u određivanju mikrobne aktivnosti i iskoristivosti supstrata. Ukoliko se unutar mikroorganizama u biomarkerima - nukleinskim kiselinama, proteinima, fosfolipidnim masnim kiselinama (*phospholipid fatty acids, PLFA, eng.*) nađu radioaktivno obeleženi ugljenik, vodonik, azot i kiseonik poreklom iz izotopski obeleženih supstrata za taj mikroorganizam kažemo da je aktivan i da ima kapacitet da metaboliše pomenute elemente. Ipak, ovu analizu treba uraditi za kratko vreme kako bi se izbegao unakrsni metabolizam i kaskadna upotreba obeleženog metabolita (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013, Paul et al, 2018).



Slika 2.12. Princip izotopske analize: izolovanje metagenomske DNK bogate ^{13}C izotopom koja predstavlja funkcionalno aktivne mikroorganizme koji se iz ukupne zajednice odvajaju centrifugiranjem u gradijentu gustine cezijum-hlorida i dalje analiziraju DNK tehnikama (prema Paul et al, 2018).

Izotopski čipovi. Izotopski čipovi (*Isotope Arrays, eng.*) služe za detekciju članova mikrobnih zajednica koji su koristeći radio obeleženi supstrat ugradili u svoju RNK ^{14}C izotop. Tehnika se zasniva na inkubaciji mikroorganizma sa ^{14}C supstratom, ekstrakciji RNK, obeležavanju RNK fluoroforom, hibridizaciji sa oligonukleotidnim sekvencama na čipu koje targetuju 16S rRNK gene bakterija od interesa i skeniranju fluorescencije i ugrađenih ^{14}C izotopa. Uzorci se mogu testirati i kombinacijom FISH-mikroautoradiografijom (Paul et al, 2018).

Fiziološko-biohemijska karakterizacija

Enzimski aktivnost. Enzimski aktivnost se koristi kao indikator fiziološkog stanja mikroorganizama. Dva ključna enzima čija je aktivnost specifična za određeni rod bakterija i koji se tradicionalno prate su oksidaza i katalaza. Aerobne bakterije dobijaju energiju respiratornim katabolizmom tj. u procesu transporta elektrona kroz respiratorni lanac koga čine brojni citohromi. Oksidaza test se koristi za utvrđivanje prisustva citohroma c u respiratornom lancu. U aerobnom disanju, prilikom transporta elektrona sa terminalnog citohroma na kiseonik, pored molekula vode, nastaje i mala količina toksičnih molekula. Za nastajanje toksičnih nusproizvoda odgovorni su flavoproteini, pogotovo NADH dehidrogenaza. Mikroorganizmi su razvili enzimske sisteme odbrane protiv ovih molekula – superoksid-dismutazu koja prevodi toksični superoksid u vodonik-peroksid i katalazu koja ga dalje razgrađuje. Skrining test na katalazu se zasniva na razlaganju 3% vodonik-peroksida pri čemu nastaju voda i kiseonik koji se lako detektuje u vidu oslobođenih mehurića u kontaktu sa kolonijama mikroorganizma. Smanjenje količine vodonik-peroksida se može pratiti i spektrofotometrijski na 240 nm.

Detekcija većeg broja enzima koje poseduje jedna mikrobna ćelija se vrši API (*Analytical Profil Index, eng.*) testovima koji predstavljaju sistem za brzu identifikaciju mikroorganizama i zasnovani su na setu supstrata koje mikroorganizmi mogu da iskoriste ukoliko poseduju specifične enzime.

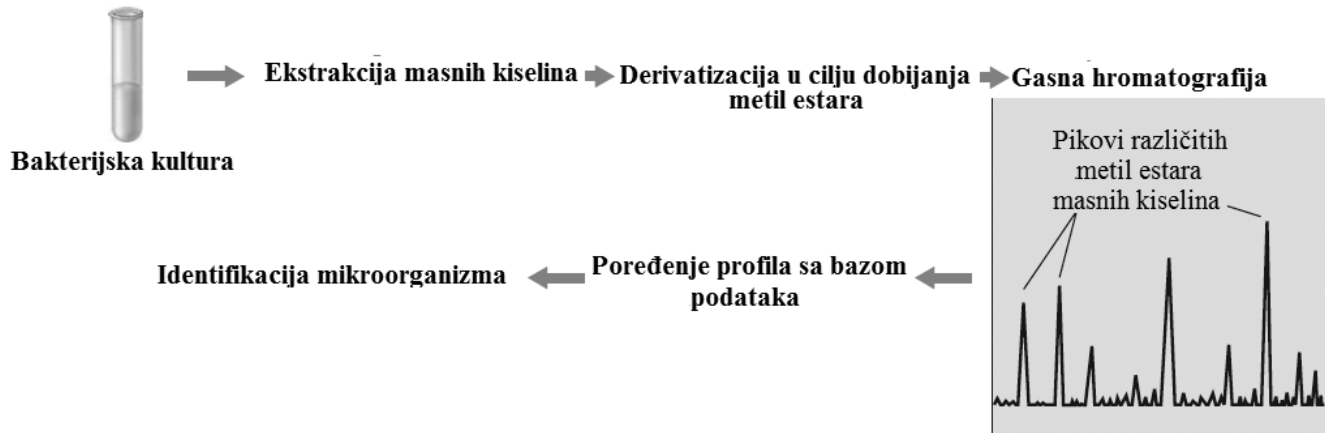
Određivanje enzimske aktivnosti i omiks tehnike su usko povezani. Genomske studije i dalje ispituju uticaj ekspresije gena na metaboličku raznolikost i produkciju enzima. Proteomska istraživanja karakterišu sintetisane proteine tokom genske ekspresije, a metabolomika analizira dobijene proizvode razgradnje i kinetiku – maksimalne brzine reakcije i konstante brzine (Andrew, Jayaraman 2020, Blagodatskaya, Kuzyakov 2013, Madigan et al, 2019).

ATP. Količina ATP-a u mikrobnoj ćeliji zavisi od više faktora (vrste kojoj pripada, veličine ćelije, faze rasta i aktivnosti) i ukazuje u kom se stanju ćelije unutar zajednice nalaze. Uočeno je da dodatkom glukoze u zemljište mikrobne ćelije prelaze iz stanja mirovanja u fazu rasta, pri čemu dolazi do drastičnih promena u njihovoj fiziologiji, a količina ATP-a se povećava 8,4 puta. Promene u sadržaju biomase su primetno manje, povećava se 1,6 puta. Međutim, ukoliko ćelija pređe iz aktivnog u uspavano stanje dolazi do većeg pada mikrobne biomase u odnosu na ATP. Kvantifikaciju ATP-a mogu ometati enzimi koji imaju sposobnost njegove razgradnje, a pri njegovoj analizi mora se izvršiti i kompletna liza ćelija i sprečiti adsorpcija oslobođenog ATP-a na površinu reaktivnih čestica dodatkom neorganskog fosfata. Mnogo bolji odraz energetskeg statusa i aktivnosti mikroorganizama unutar mikrobne zajednice pruža određivanje adenilatnog energetskeg naboja koji predstavlja koncentraciju adenilnih nukleotida AMP, ADP i ATP u mikrobnoj ćeliji. Ipak, postoje značajne razlike pri određivanju u čistoj kulturi i u zemljištu (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013).

Fenotipska karakterizacija mikroorganizama

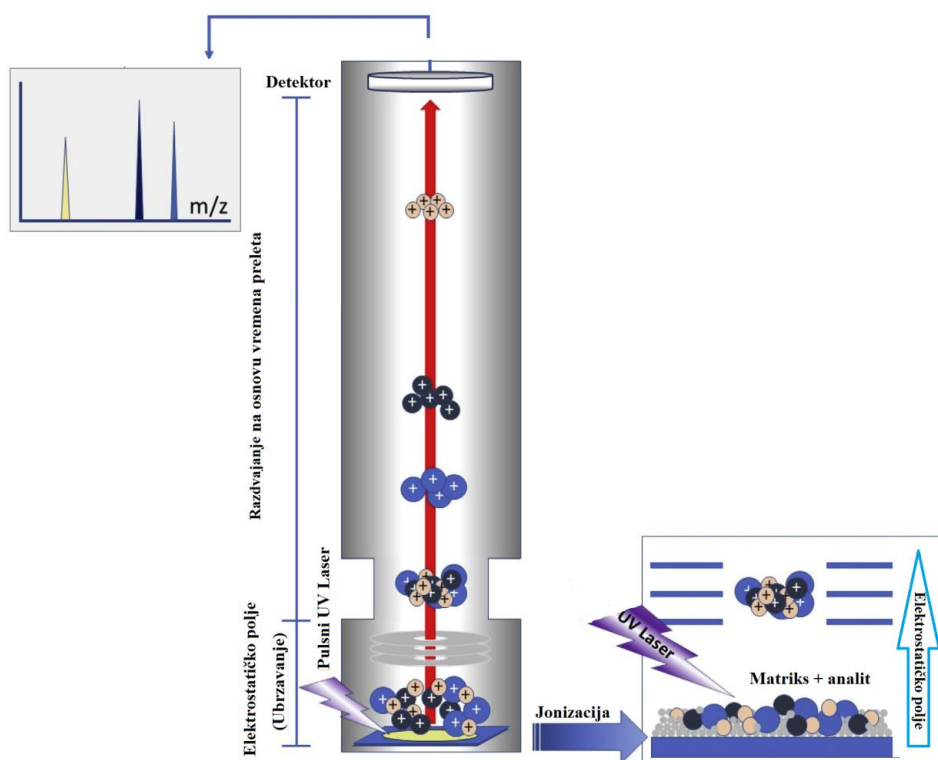
Analiza masnih kiselina – određivanje metil-estara masnih kiselina (fatty acid methyl esters, FAME, eng.). S obzirom na brzu razgradnju fosfolipida posle smrti ćelije, analiza masnih kiselina fosfolipida je odraz ekofiziološke grupe mikroorganizama unutar mikrobne zajednice, ali ne i njihove aktivnosti. Bakterije poseduju brojne masne kiseline, zasićene, nezasićene, razgranate, ciklične i hidroksi masne kiseline. Vrsta, količine i zastupljenost pojedinih masnih kiselina prisutnih u lipidima citoplazmatske membrane i spoljne membrane Gram-negativnih bakterija su glavne fenotipske osobine koje se prate pri karakterizaciji mikroorganizama. Za analizu je potrebno izolovati masne kiseline i hemijski ih derivatizovati do isparljivih metil-estara masnih kiselina koji se dalje analiziraju gasnom

hromatografijom ili gasnom hromatografijom kuplovanom sa masenom spektrometrijom, a dobijeni rezultati se porede sa bazama podataka (slika 2.13.). Analiza masnih kiselina se primenjuje u analizi voda kada je neophodno rutinski potvrditi prisustvo patogena, ali i u karakterizaciji novih sojeva. Prilikom obrade rezultata bitne su razlike u građi Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, razlike između čiste kulture i kulture u zemljištu koja je izmenjena zbog uslova u životnoj sredini - temperature, pH, pritiska, dostupnosti različitih supstrata. Analiza u različitim fazama mikrobnog rasta dovodi do razlike u dobijenom masno-kiselinskom sastavu. Zato je neophodno standardizovati uslove pripreme za analizu i uslove analize (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013, Madigan et al, 2019).



Slika 2.13. Izvođenje analize metil-estara masnih kiselina (prema Madigan et al, 2019).

MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight, eng.) masena spektrometrija. Laserska desorpcija potpomognuta matriksom je blaga jonizaciona metoda u kojoj se uzorak jonizuje i pretvara u isparljivo stanje laserom. Generisani joni se ubrzavaju duž kolone do detektora pomoću električnog polja. U kombinaciji sa MALDI tehnikom se koristi analizator koji razdvaja jone na osnovu vremena preleta (slika 2.14.), a vreme preleta jona zavisi od odnosa mase i naelektrisanja (m/z). Što je odnos m/z manji joni brže putuju do detektora pri čemu se kompjuterski preračunavaju molekulske mase i molekulske formule (Hou et al, 2019, Madigan et al, 2019). MALDI-TOF spada u efikasne i jeftine tehnike, može analizirati čitave, neoštećene ćelije i njihove proteinske profile. Dominantna je analiza polarnih, rastvornih proteina koji se nalaze u citoplazmi. Neki mikroorganizmi formiraju glikokaliks ili kapsulu, pa je analiza citoplazmatskih proteina onemogućena. U tom slučaju se za ekstrakciju koristi etanol-mravlja kiselina. Rezultati identifikacije mikroorganizama dostupni su za 24-48 h (Dridi, Drancourt 2011, Hou et al, 2019). Iako se ova metoda najčešće koristi u kliničkoj mikrobiologiji postoje i studije u kojima je primenjena za identifikaciju bakterija izolovanih iz životne sredine (Avdalović et al, 2015, Djurić et al, 2017, Uhlik et al, 2011).



Slika 2.14. MALDI-TOF maseni spektrometar (prema Hou et al, 2019).

2.2.1.4. Analiza celokupne mikrobne zajednice

Sveobuhvatna analiza mikrobne zajednice moguća je primenom različitih omiks tehnika, ali i sekvenciranjem celog genoma mikroorganizama i metodama za sekvenciranje nove generacije (Biswas, Sarkar 2018).

Omiks tehnike. Pod omiks tehnikama podrazumevaju se kvantifikacija ili karakterizacija seta prirodnih molekula u cilju određivanja strukture i funkcije, molekularnih i fizioloških mehanizama. Ove tehnike predstavljaju snažno oruđe u analizi mikrobnih zajednica, mikrobne genetike i funkcionalne raznovrsnosti, pošto omogućavaju razumevanje brojnih metaboličkih puteva i načine nastajanja novih proizvoda, daju uvid u strukturu i odnose u zajednici. U omiks nauke spadaju genomika, metagenomika, transkriptomika, proteomika i metabolomika (Biswas, Sarkar 2018, Malla et al, 2018).

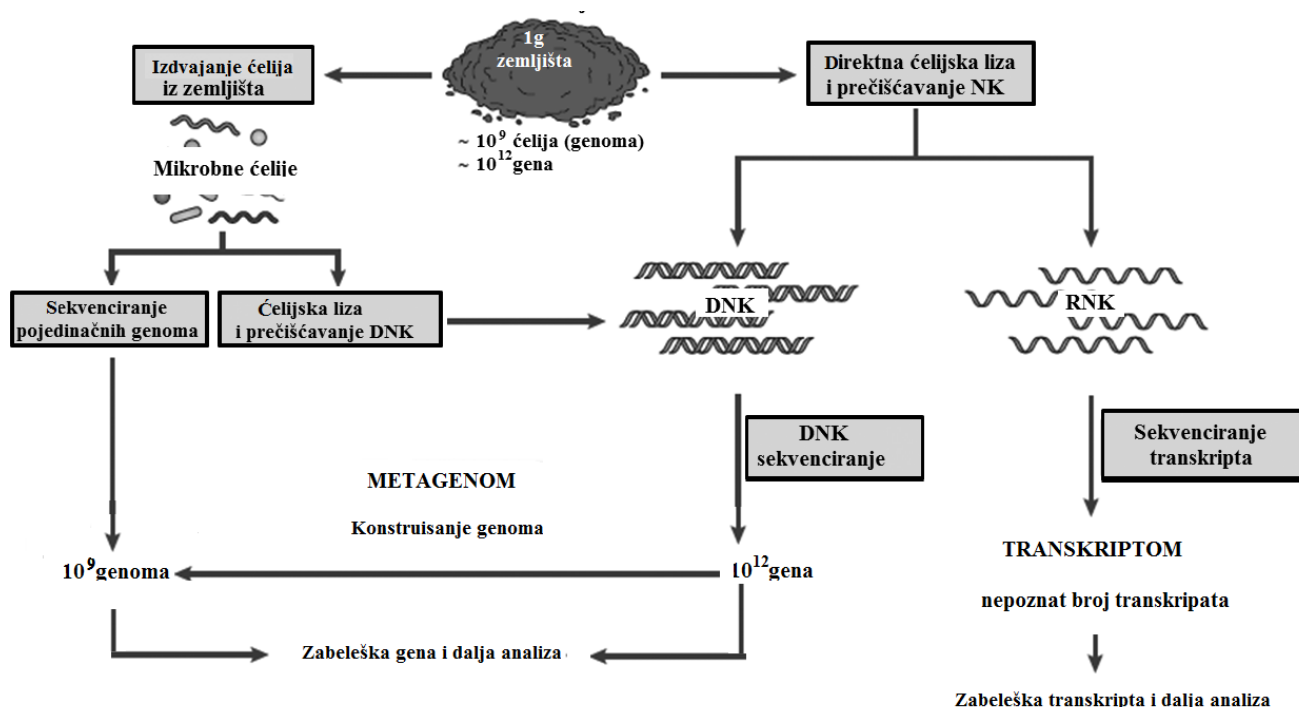
Metagenomika. Metagenomika omogućava uvid u kolekciju kompletnih genoma mikrobne zajednice poreklom iz uzoraka iz životne sredine pa se često označava kao genomika mikrobne zajednice ili genomika životne sredine. Faze u formiranju metagenomske biblioteke su izolovanje DNK iz uzorka iz životne sredine, *shotgun* (eng.) kloniranje korišćenjem vektora za nasumično kloniranje DNK fragmenata, transformacija klonova u bakterijskog domaćina i odabir pozitivnih klonova. Današnji tipovi *shotgun* sekvenciranja omogućavaju direktno sekvenciranje DNK i ne zahtevaju formiranje biblioteka (Biswas, Sarkar 2018).

Postoje dva pravca metagenomike, analiza zasnovana na sekvenci i analiza zasnovana na funkciji. Analiza zasnovana na sekvenci koristi se za identifikaciju gena i konstruisanje genomske sekvence, a pri analizi zasnovanoj na funkciji neophodno je klonirati i eksprimirati DNK fragment u domaćinu i uraditi skrining enzimske aktivnosti u cilju detekcije njihove funkcije (Malla et al, 2018).

Metagenomika prati odnose mikrobne zajednice i faktora u životnoj sredini, različite mikrobne proizvode, a mogu se identifikovati nekulturable mikroorganizmi. Nedostatak ove tehnike je ekspresija aktivnih gena koji su često eksprimirani na niskom nivou (Biswas, Sarkar 2018, Malla et al, 2018).

Transkriptomika. Transkriptomika životne sredine ili metatranskriptomika podrazumeva praćenje promena u profilima genske ekspresije mikroorganizama i njihovoj regulaciji u prirodnim staništima sekvenciranjem mRNK transkripata izolovanih nasumično iz mikrobne zajednice. Nedostatak ove omiks tehnike je otežano dobijanje cDNK usled nedostatka poli A-repova kod prokariota na mRNK transkriptu, ali je u nedavnim istraživanjima ovo ograničenje prevaziđeno metodom dvostruke RNK. U tom slučaju koriste se i mRNK i rRNK za analizu mikrobnih zajednica (Biswas, Sarkar 2018).

Na slici 2.15. su prikazane sheme metagenomske i metatranskriptomске analize mikroorganizama iz zemljišta.



Slika 2.15. Metagenomska analiza zasnovana na sekvenci i metatranskriptomска analiza zemljišta. Na ovaj način formiraju se metagenomske i metatranskriptomске biblioteke (prema Prosser 2015).

Proteomika. Proteomika životne sredine ili metaproteomiks predstavlja istraživanje proteina eksprimiranih u tačno određeno vreme, a zavisno od toga koji su proteini eksprimirani poznato je i stanje mikrobnih zajednica. Faze u proteomskoj analizi u cilju dobijanja profila eksprimiranih proteina

unutar zajednica su odvajanje ćelija ultracentrifugiranjem, njihova liza i jednodimenzionalna ili dvodimenzionalna elektroforeza i analiza dobijenih tačaka na gelu. Dobijeni proteini se analiziraju tečnom hromatografijom ili masenom spektrometrijom. Iako je proteomiks obećavajuća tehnika za analizu procesa u životnoj sredini ima i nekoliko ograničavajućih faktora. Ekstrakcija proteina iz zemljišta može biti nepotpuna zbog prisustva huminskih kiselina i drugih fenolnih jedinjenja, lipida, složenih ugljenih hidrata i minerala gline. Osim toga, kvalitet, kapacitet i dizajn baza podataka mogu uticati na identifikaciju proteina. U daljim studijama metaproteomike naučnici streme ka otkrivanju što efikasnijih metoda ekstrakcije, formiranju homogenijih i pouzdanih baza podataka i kombinovanju tehnika u cilju dobijanja što veće količine podataka o mikrobnim zajednicama. Kombinacijom metaproteomiksa i metagenomiksa nastao je proteogenomiks (Biswas, Sarkar 2018, Malla et al, 2018).

Metabolomika. Metabolomika predstavlja nauku koja se bavi ispitivanjima metaboloma, tj. skupa metabolita - niskomolekulskih biomolekula koji nastaju kao odgovor mikrobne ćelije na uslove iz životne sredine. Ovom metodom moguće je otkriti različite metaboličke profile i putanje prilikom degradacije polutanata i utvrditi kako toksične supstance iz životne sredine deluju na mikroorganizme (Biswas, Sarkar 2018, Malla et al, 2018).

Integralni omiks pristupi. Rezultate omiks tehnika karakteriše velika količina podataka pa se u cilju smanjenja potrebne memorije na uređajima, cene i vremena analize teži ka integraciji više omiks tehnika u jednu. Prednost integralnih omiks pristupa se ogleda u lakšem razumevanju ćelijskih sistema i njihovog načina funkcionisanja. Trenutno su u literaturi dostupni integralni omiks pristupi - integromiksi dobijeni kombinacijom tek nekoliko omiks tehnika. Yugi i saradnici su u svom revijskom radu istakli par ranije publikovanih radova koji kombinuju omiks tehnike, ali i zaključili da je kombinacija manjeg broja omiks pristupa nedovoljna za dobijanje kompletne informacije o stanju unutar ćelije (Yugi et al, 2016). U budućnosti, sa razvojem tehnike i bioinformatičkih alata i metoda očekuje se i povećan broj studija koje integrišu veći broj omiks tehnika.

Upotreba omiks tehnika. Omiks nauke i tehnike i znanja stečena pomoću njih imaju različite primene. Multi-omiks tehnikama dobijaju se ključni podaci o fiziologiji, biohemiji, ekologiji i filogeniji mikrobnih zajednica, a one olakšavaju i razumevanje različitih procesa kao što je bioremedijacija. Kombinovanjem bioremedijacionih i omiks tehnika može se dobiti veća efikasnost, smanjiti vreme i cena postupka. Pri izboru bioremedijacione tehnike bitan je i interdisciplinarni pristup, pri čemu se istraživanja ne oslanjaju samo na znanja iz biologije, već i na druge nauke kao što su hemija, informatika, inženjerstvo.

Omiks tehnike omogućavaju optimizaciju i drugih industrijskih procesa od ekonomskog i ekološkog značaja, pomažu pri skriningu sekundarnih mikrobnih metabolita za upotrebu u biotehnološkoj i farmaceutskoj industriji. One se mogu primeniti u upravljanju rizicima u sigurnosti i kvalitetu hrane, u analizi humanog mikrobioma, za shvatanje mehanizama različitih oboljenja i u arheologiji (Imam et al, 2019, Malla et al, 2018, Marco, Abram 2019, O'Brien et al, 2017, Raju, Scalvenzi 2018).

U poslednjih 10 godina pojavili su se novi projekti i alati koji pokušavaju da objedine i organizuju rezultate dobijene primenom omiks tehnika kao što su "The enviPath tool", "BioCyc" i "MetaCyc" (Malla et al, 2018).

2.2.2. Dinamički pristupi u karakterizaciji pojedinačnih mikroorganizama, mikrobnih zajednica i određivanju mikrobne aktivnosti

2.2.2.1. Mikrobno ćelijsko disanje i brzina rasta mikroorganizama

Ćelijsko disanje mikroorganizama se koristi kao mera njihove metaboličke aktivnosti. Treba razlikovati bazalnu respiraciju prisutnu pri bazalnom metabolizmu i supstrat indukovanu respiraciju koja je odraz metaboličke aktivnosti aktivnih i potencijalno aktivnih mikroorganizama. Odnos ove dve respiracije je uvek između 0 i 1, a idealna vrednost je od 0,1-0,2. Vrednost odnosa bliska nuli ukazuje da su mikroorganizmi dugo bez dostupnog supstrata pri čemu upadaju u stanje stresa i smanjuju respiraciju, a vrednosti bliske jedinici su svojstvene za prisustvo velike količine supstrata. U životnoj sredini vrednosti bliske nuli moguće su usled dugih suša i promrzavanja zemljišta, dok se vrednosti bliske jedinici javljaju usled dodatka stajskog đubriva.

Brzina rasta mikroorganizama je bitan parametar pri njihovoj karakterizaciji, a određuje se dodatkom obeleženih biomolekula u tragovima i praćenjem njihove direktne ugradnje u ćelijske komponente ili dodatkom velike količine supstrata koji indukuje neograničeni eksponencijalni rast mikrobnih ćelija (Blagodatskaya, Kuzyakov 2013).

2.2.3. Odnosi između tradicionalnih i modernih tehnika za karakterizaciju pojedinačnih mikroorganizama, mikrobnih zajednica i određivanje mikrobne aktivnosti

Tradicionalne tehnike za karakterizaciju mikroorganizama su manje osetljive, manje specifične, daju nedovoljno informacija, dugotrajne su, zasnivaju se na kulturabilnim mikroorganizama, pri čemu se detektuju samo oni dominantni rodovi. Savremene tehnike za karakterizaciju mikroorganizama su osetljivije, specifičnije i informativnije, efikasnije su vremenski i određuju funkcionalni diverzitet. Da bi se sagledali svi odnosi unutar mikrobnih zajednica najbolje je kombinovati klasične tehnike sa tehnikama za metagenomsku analizu i gensku ekspresiju (Biswas, Sarkar 2018, Nannipieri et al, 2020).

2.3. Egzopolisaharidi proizvedeni pomoću mikroorganizama izolovanih iz zagađene životne sredine

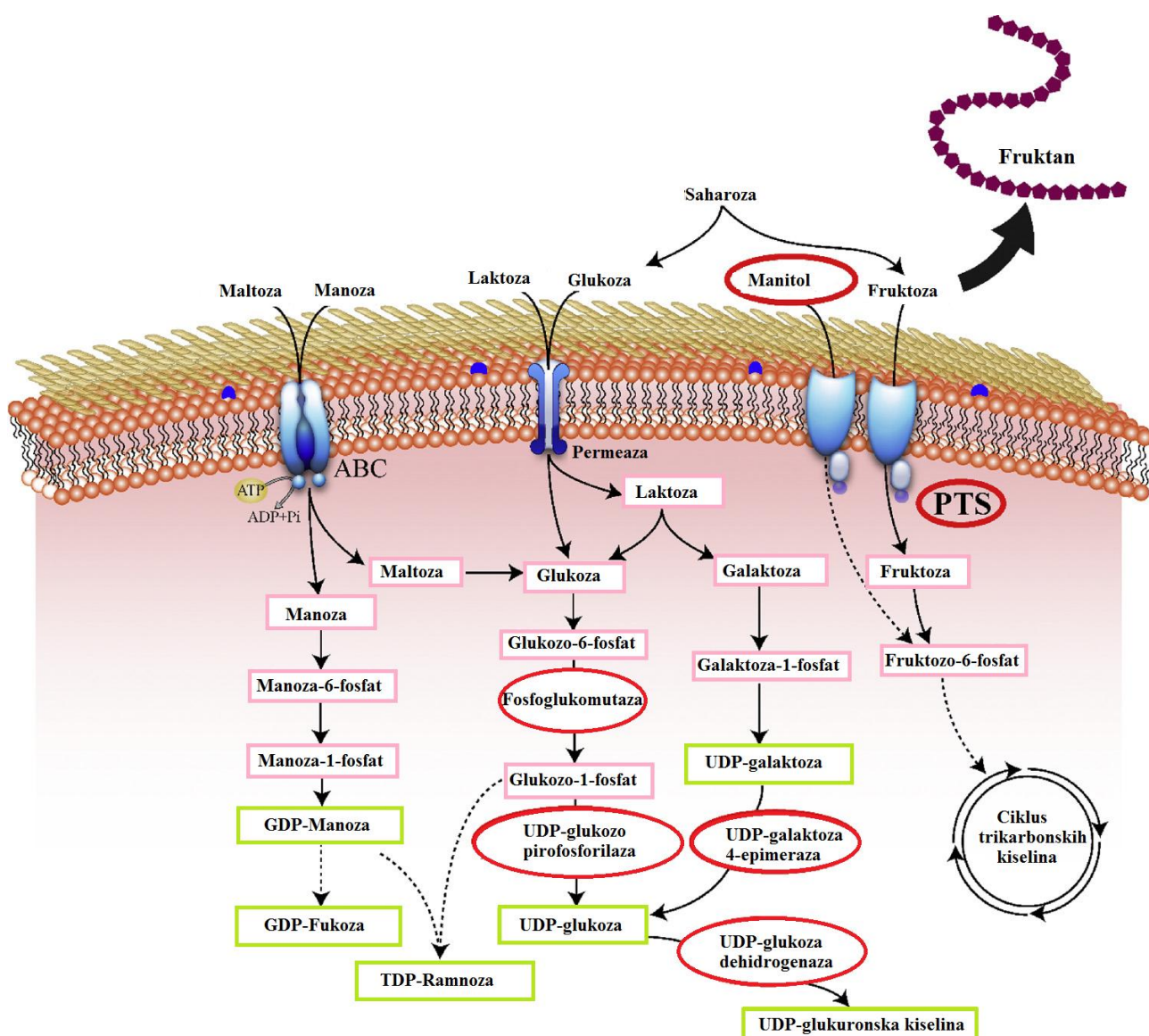
Mikroorganizmi izolovani iz zagađene životne sredine sintetišu razne proizvode poput biosurfaktanata, enzima, emulgatora koji povećavaju iskorišćenje nepolarnih supstrata kao što su naftni polutanti i ubrzavaju degradaciju (Joshi, Desai 2010, Shibulal et al, 2014). U mikrobne produkte spadaju i egzopolisaharidi koji pomažu mikroorganizmima da razgrade polutante i štite ih od nepovoljnih uslova u životnoj sredini – UV zračenja, temperature, pH, isušivanja i teških metala. Iako je zagađena životna sredina jedno od glavnih staništa mikroorganizama proizvođača egzopolisaharida, moguće je izolovati ih i iz drugih ekstremnih sredina - termofilnih, psihrofilnih, halofilnih, acidofilnih i alkalofilnih (Abdala et al, 2021, Nicolaus et al, 2010, Wang et al, 2019).

Egzopolisaharidi predstavljaju prirodne, netoksične, biodegradabilne i biokompatibilne polimere i mogu biti ravnog niza ili račvasti. Ovi polimeri se dele u dve grupe: homopolisaharide, gde su sve monosaharidne jedinice koje ih izgrađuju identične (dekstran, kurdlan, levan, pululan, skleroglukan i šizofilan) i heteropolisaharide koji predstavljaju kombinaciju više monosaharida (alginat, fukopol, fukogel, galaktopol, gelan, hijaluronska kiselina i ksantan). Egzopolisaharide najčešće proizvode određene vrste rodova: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Streptococcus* (α -glukane), *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Salmonella* i *Sarcina* (β -glukane), *Aerobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Streptococcus*, i *Zymomonas* (levan), *Azotobacter*, *Pseudomonas* (alginat), *Sphingomonas* (gelan), *Pseudomonas* (hijaluronan), *Xanthomonas* (ksantan) (Andrew, Jayaraman 2020, Ates 2015, Freitas et al, 2011, Rana, Upadhyay 2020, Schmid et al, 2015).

Fiziološka, funkcionalna i biološka aktivnost polisaharida zavise od molekulske mase i strukture. Ovi polimeri se danas koriste kao nosači lekova, za pripremu vakcina, u preparatima namenjenim za zaceljivanje rana, kao antiproliferativni, antiviralni, antitumorski, imunomodulatorni agensi i antioksidansi (Abarquero et al, 2022, Andrew, Jayaraman 2020, Hamidi et al, 2022, Nadzir et al, 2021, Wang et al, 2019, Young et al, 2021). Neki od njih se mogu iskoristiti i za tkivni inženjering (Hamidi et al, 2022, Tchobanian et al, 2019). Pored medicine, farmacije i industrije hrane egzopolisaharidi se mogu primeniti i u industriji tekstila, kao detergentski, adhezivi, u tretmanu otpadnih voda (Ates 2015, Rana, Upadhyay 2020).

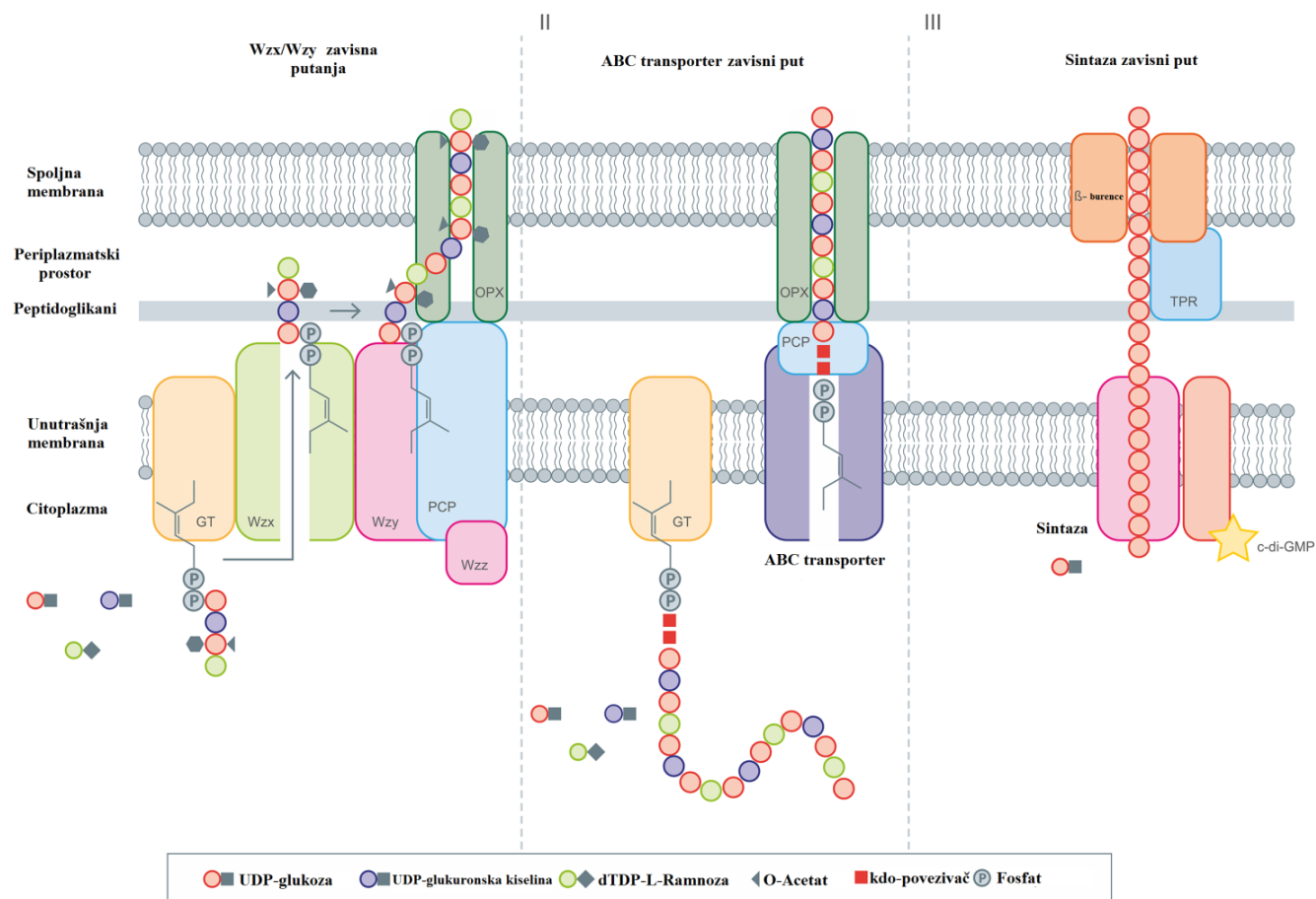
2.3.1. Sinteza egzopolisaharida

Biosinteza egzopolisaharida u mikrobnim ćelijama započinje intracelularno, nakon čega dolazi do ekskrecije van ćelije, a izuzetak su levan i dekstran koji se sintetišu ekstracelularno. Prvi korak u biosintezi je nastajanje aktiviranih prekursora difosfatnih šećera (NDP) (slika 2.16). Monosaharidne jedinice se sa NDP saharidnog donora transportuju na aktivni lipidni nosač i ponavljajuće jedinice se povezuju glikozil-transferazom. Ovaj deo sinteze se odvija u citoplazmi, a nakon toga se sintetisani egzopolisaharid ekskretuje pomoću transportnih proteina kroz ćelijsku membranu (Ates 2015, Schmid et al, 2015, Wang et al, 2019).



Slika 2.16. Šema nastanka aktiviranih šećera. ABC – ATP transporter (*ATP binding cassette transporter, eng.*), PTS - fosfotransferazni sistem (*phosphotransferase system, eng.*) (Wang et al, 2019).

Polimerizacija i transport polisaharida se uspostavljaju na više načina (slika 2.17): Wzx/Wzy-zavisnom putanjom (*O*-antigen flippase, *Wzx*, eng., *polymerase*, *Wzy*, eng.), ATP-vezujućom transportnom putanjom, sintaza-zavisnom putanjom (*synthase complex*, eng.) i saharozom posredovanom putanjom (Ates 2015, Nadzir et al, 2021, Rana, Upadhyay 2020, Wang et al, 2019).



Slika 2.17. Putanje polimerizacije i transporta egzopolisaharida. GT – glukozil-transferaza, Wzx – Wzx-flipaza, Wzy – Wzy-polimeraza, PCP - polisaharid ko-polimeraza (*polysaccharide co-polymerases*, eng.), OPX - spoljnomembranski polisaharid eksportni protein (*outer membrane polysaccharide export protein*, eng.), TPR - tetratrikopeptid ponavljajući protein (*tetratricopeptide repeat protein*, eng.), c-di-GMP - ciklični guanozin-monofosfat (*cyclic diguanylic acid*, eng.) (Schmid et al, 2015).

Wzx/Wzy-zavisna putanja obuhvata translokaciju kroz unutrašnju membranu asembliranog egzopolisaharida Wzx-flipazom, polimerizaciju Wzy-polimerazom u periplazmatskom prostoru i transport u vanćelijski prostor koji se završava pomoću dva membranska proteina: polisaharid ko-polimerazom i spoljnomembranskim polisaharid eksportnim proteinom. Ukoliko su PCP i OPX visoko ekspimirani u odnosu na Wzy-polimerazu, mogu pomeriti sintezu ka visokomolekulskim polisaharidima. Ova putanja je specifična za Gram-negativne bakterije i favorizovana za sintezu heteropolisaharida.

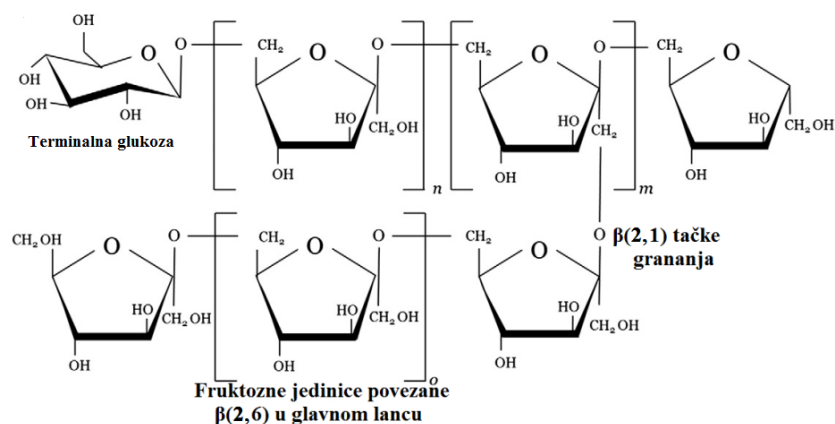
U ABC transporter-zavisnoj putanji polimerizacija do polisaharida se odvija na citoplazmatskoj strani unutrašnje membrane. ABC transporter, PCP i OPX proteini transportuju egzopolisaharid kroz membranu u vanćelijski prostor. Kod Gram-pozitivnih termofilnih bakterija umesto PCP proteina

postoji tetratrikopeptid ponavljajući protein. Ova putanja je najčešća u sintezi polisaharida kapsule, a ABC transporter diktira veličinu lanca egzopolisaharida.

Sintaza-zavisna putanja podrazumeva polimerizaciju ponavljajućih jedinica egzopolisaharida i njihovu translokaciju sintazom, a česta je pri sintezi homopolisaharida ili jednostavnijih heteropolisaharida. Povećana ekspresija gena za sintazu, dovodi do sinteze egzopolisaharida veće molekulske mase, a aktivnost sintaze može pojačati ciklični guanozin-monofosfat. Vanćelijska sinteza ili saharozom-posredovana putanja se zasniva na inicijalnom konvertovanju disaharidnog molekula do monosaharida nakon čega se oni vezuju za rastući homopolisaharidni lanac u vanćelijskoj sredini. Energija dobijena hidrolizom šećera se koristi za katalitički transfer monosaharida na akceptorski molekul pomoću glikan-saharaze. Ovaj tip putanje je nezavistan od centralnog ćelijskog metabolizma ugljenika (Nadzir et al, 2021, Rana, Upadhyay 2020, Wang et al, 2019).

2.3.2. Levan

Inulin i levan predstavljaju neredukujuće fruktane. U inulinu su fruktozne jedinice povezane $\beta(2,1)$, a u levanu $\beta(2,6)$ vezama sa $\beta(2,1)$ grananjem. Levan mogu sintetisati biljke i mikroorganizmi, a na slici 2.18. je prikazana njegova struktura (Nadzir et al, 2021, Öner et al, 2016, Ortiz-Soto et al, 2019, Veerapandian et al, 2020, Young et al, 2021).



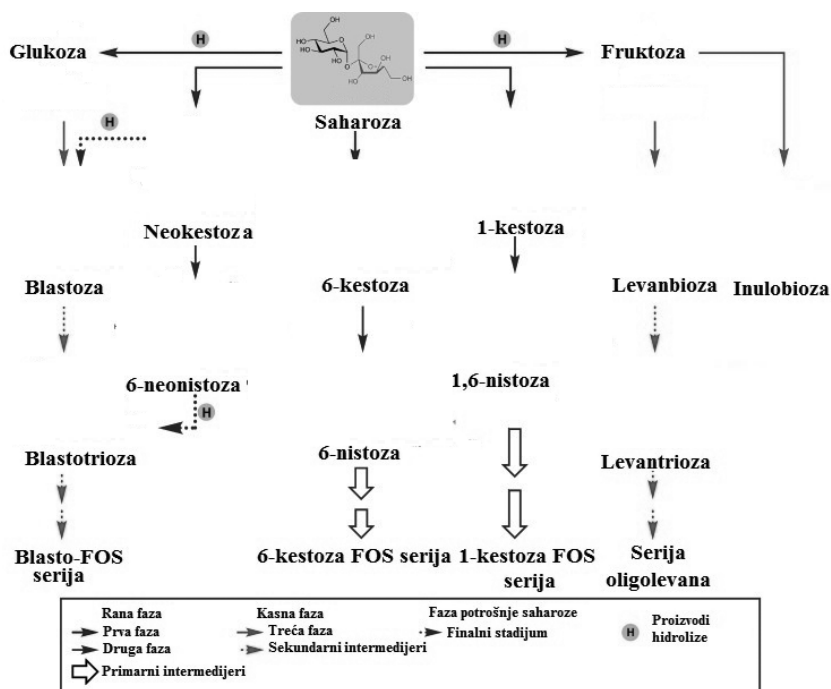
Slika 2.18. Struktura levana sa $\beta(2,1)$ grananjem (Öner et al, 2016).

Raznolikosti u strukturi levana kao što su molekulska masa, stepen grananja, viskozitet, stabilnost i funkcionalnost posledica su različitih uslova produkcije. Levan štiti ćelije od oštećenja, omogućava njihovo preživljavanje, a slično drugim egzopolisaharidima predstavlja deo biofilma čime sprečava isušivanje i čuva mikrobnu zajednicu od predatora. U biofilmovima ovaj polisaharid omogućava mikroaerobnu sredinu i pomaže azotofiksaciju tako što predstavlja barijeru za kiseonik, a može poslužiti i kao hrana za neke od mikroorganizama u zajednici unutar biofilma (Nadzir et al, 2021, Öner et al, 2016, Ortiz-Soto et al, 2019, Young et al, 2021).

2.3.2.1. Biosinteza levana pomoću mikroorganizama

Levan je jedan od retkih egzopolisaharida koji se sintetise ekstracelularno. Levan-saharaza, bakterijska fruktozil-transferaza sintetise levan iz saharoze. Ovaj enzim je odgovoran i za grananje u 2,1 položaju, a najčešće se nalazi na površini ćelije ili u tečnoj podlozi (Ates 2015, Öner et al, 2016, Ortiz-Soto et al, 2019, Schmid et al, 2015, Young et al, 2021).

Saharoza je donor fruktozne jedinice, koja se veže na drugu saharozu pri čemu nastaje trisaharid 6-kestoza. Daljom elongacijom i dodavanjem fruktozil jedinica nastaju fruktooligosaharidi (*fructooligosaccharides*, *FOS*, *eng.*) i polimer levan. Klasičnom, neprocesivnom putanjom sinteze (Slika 2.19) dolazi do sinteze, oslobađanja, akumulacije i dalje fruktozilacije fruktooligosaharida. U početnoj fazi sinteze od saharoze nastaju proizvodi primarne faze 1- i 6- kestoza i neokestoza koje dalje primaju fruktozil jedinice u cilju nastanka sekundarnih proizvoda – fruktooligosaharida. Glukoza i fruktoza takođe nastale od saharoze, hidrolizom u ranoj fazi prihvataju fruktozil jedinice od kojih nastaju tercijarni proizvodi, niskomolekulski levani (Ortiz-Soto et al, 2019).



Slika 2.19. Šema klasične, neprocesivne putanje sinteze fruktooligosaharida i niskomolekulskih levana (prema Ortiz-Soto et al, 2019).

Visokomolekulski levani nastaju procesivnom putanjom sinteze koja podrazumeva da prilikom sinteze levana ne dolazi do nagomilavanja fruktooligosaharida u podlozi, već da je polimer sve vreme vezan za enzim dok ne postigne željenu veličinu, nakon čega dolazi do njegovog otpuštanja. Prelazak enzima iz neprocesivne sinteze niskomolekulskih levana u procesivnu proizvodnju visokomolekulskih levana još uvek nije najjasniji (Ortiz-Soto et al, 2019).

Levan-saharazu poseduju brojne Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. U bakterijama rodova *Bacillus*, *Geobacillus* i *Paenibacillus* saharoza pokreće transkripciju enzima, dok je kod *Actinomyces naeslundii*, *Erwinia amylovora*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* i *Zymomonas mobilis*

ona stalno eksprimirana usled boravka mikroorganizama u staništima koja sadrže saharozu. Levan-saharaza je nađena i u rodovima *Aerobacter*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Halomonas*, *Lactobacillus*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Streptococcus* i *Streptomyces*. Supstrati za ovaj enzim mogu biti i jeftine zamene za saharozu, melasa i saharozni sirup (Nadzir et al, 2021, Ates 2015, Öner et al, 2016, Ortiz-Soto et al, 2019, Veerapandian et al, 2020, Young et al, 2021).

Levan se industrijski proizvodi u USA (Natural Polymers Inc.) koristeći *Bacillus subtilis*, Koreji (Real Biotech Co., Ltd.) upotrebom *Zymomonas mobilis* i Japanu (Advance Co., Ltd.,) kao proizvod bakterije *Streptococcus salivarius* (Öner et al, 2016).

2.3.2.2. Primena levana

Zbog svoje "zelene" prirode, biodegradabilnosti i biokompatibilnosti levan se može primeniti u različitim poljima industrije. Istraživanja pokazuju da ovaj polisaharid nije citotoksičan, poseduje antizapaljensku i antioksidativnu aktivnost zbog čega se upotrebljava u preparatima za negu kose i kože. U medicini se levan koristi u obliku tankih biofilmova koji aktiviraju metaloproteinaze ključne u zaceljivanju rana i opekotina, za isporuku lekova, u regeneraciji tkiva, za smanjenje nivoa holesterola, gojaznosti, hiperlipidemije i telesne mase, a može se konzumirati kao dodatak ishrani – prebiotik. Ovaj polisaharid se može koristiti u vidu tankih biofilmova u cilju bezbednijeg i zdravijeg pakovanja hrane i zaštiti od njenog kvarenja (Ates 2015, Öner et al, 2016, Ortiz-Soto et al, 2019, Young et al, 2021).

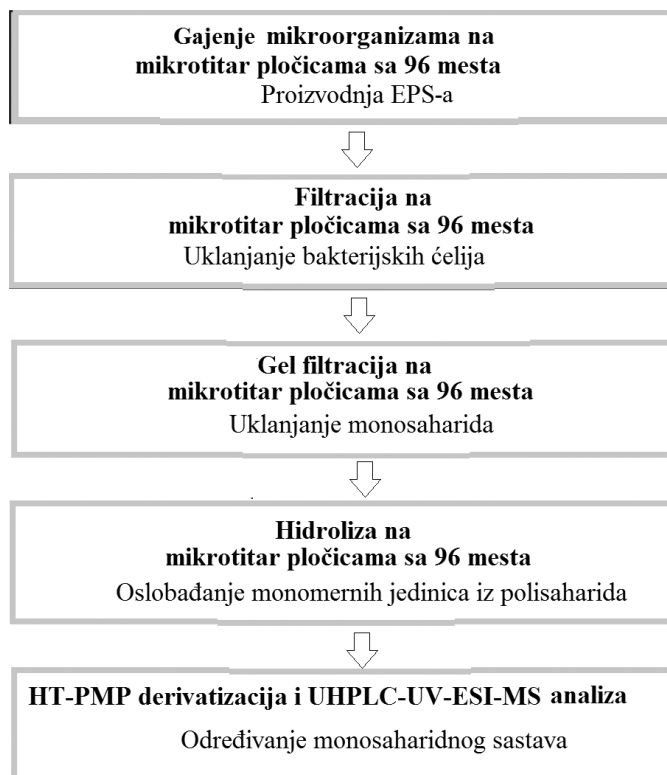
2.3.3. Tehnike za ispitivanje sposobnosti mikroorganizama za produkciju egzopolisaharida

Mikrobni polisaharidi se zbog svojih karakteristika svrstavaju u biomaterijale budućnosti. Ispitivanje sposobnosti mikroorganizama za produkciju egzopolisaharida je neophodno uraditi brzim i pouzdanim tehnikama, a postoji nekoliko tehnika koje su u upotrebi. Prve tehnike koje se primenjuju u ovu svrhu se odnose na ispitivanje fenotipskih osobina mikroorganizama na čvrstim i tečnim podlogama, a vezuju se za karakteristike koje se vizuelno mogu opaziti i termine ljigav (*ropy, eng.*), sluzav (*mucoïd, eng.*), onaj koji se rasteže (*slimy, eng.*). Ukoliko je podloga na kojoj je mikroorganizam gajen tečna može se odrediti njen viskozitet upotrebom viskozimetra. Na agarizovanim podlogama moguće je upotrebiti hromogene boje koje interaguju sa polisaharidima. Sinofluor se vezuje za $\beta(1,3)$ glukane, a Congo Red za $\beta(1,3)$ i $\beta(1,4)$ glukane pri čemu intenzivno fluoresciraju. Pored glukana Calcofluor White se veže i za sukcinoglikan pri čemu pod UV svetlošću fluorescira plavo-zeleno. Ova tehnika je brza i jednostavna.

Najčešća tehnika za potvrdu produkcije egzopolisaharida je njegovo taloženje hladnim 96% alkoholom iz supernatanta fermentacione tečnosti po odvajanju biomase centrifugiranjem podloge u kojoj je mikroorganizam gajen.

U novije vreme se upotrebljavaju platforme za detekciju produkcije EPS-a (*the high throughput exopolysaccharide screening platform, eng.*) koje kombinuju vizuelno određivanje viskoziteta i precipitaciju sa detaljnom monosaharidnom analizom pomoću tečne hromatografije ultra visokih performansi sa ultraljubičastim detektorom, elektron sprej jonizacijom i jonskim masenim spektrometrom (*Ultra High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet - Electron Spray Ionization - Mass Spectrometer, UHPLC-UV-ESI-MS, eng.*). Svi koraci (slika 2.20) se izvode u mikrotitar pločicama sa 96 mesta. Tehnika podrazumeva gajenje mikroorganizama, uklanjanje ćelija centrifugiranjem i filtracijom, uklanjanje malih molekula gel filtracijom u cilju dobijanja što čistijeg polisaharida i realnijeg rezultata nakon hidrolize polisaharida. Deo polisaharida podleže hidrolizi,

derivatizaciji i analizi pomoću HT-PMP (*high throughput 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, eng.*) tehnike, a dvostruka detekcija UV- i ESI-MS detektorima čini kvantifikaciju pouzdanom. U toku 24 h može se analizirati 96 uzoraka (Rühmann et al, 2014, Rühmann et al, 2015a, Rühmann et al, 2015b).



Slika 2.20. Shema određivanja sastava egzopolisaharida na EPS "skrining" platformi. PMP - 1-fenil-3-metil-5-pirazolon, UHPLC-UV-ESI-MS - tačna hromatografija ultra visokih performansi sa ultraljubičastim detektorom, elektron sprej jonizacijom i jonskim masenim spektrometrom (prema Rühmann et al, 2015b).

Platforme za detekciju produkcije EPS-a u mikrotitar pločicama se mogu prilagoditi različitim kolorimetrijskim testovima i upotrebi različitih reagenasa kao što su fenol-sumporna kiselina, fenol-sumporna kiselina u kombinaciji sa glukoznim testom, antron-sumporna kiselina, karbazol i *m*-hidroksidifenil.

Tehnike zasnovane na morfologiji kolonija, primeni boja na agar pločama, precipitaciji polisaharida i viskozitetu mikrobne kulture imaju određene prednosti, jednostavne su i jeftine, a neke od njih određuju detaljan monosaharidni sastav polisaharida. Međutim za detaljniju, a brzu analizu velikog broja uzoraka uvek su metode izbora EPS "skrining" platforme. Pri razvijanju ovih platformi Rühmann i saradnici su uspešno rešili neke od kritičnih koraka u analizi polisaharida. PMP derivatizacija se odvija na pH višoj od 7 usled njene inhibicije nižim vrednostima, a dodat je i korak filtracije zbog viskoznosti većine egzopolisaharida. Neiskorišćena glukoza (>1 g/L) iz podloge u kojoj je mikroorganizam gajen ometa PMP derivatizaciju i HPLC-UV-ESI-MS analizu, a utiče i na analizu sastava polisaharida (lažno prisutna u strukturi) zbog čega je neophodna gel filtracija. Još uvek nerešen nedostatak platformi za detekciju EPS-a je određivanje uronskih kiselina u strukturi polisaharida. Pri ispitivanju ovih platformi u analizi ksantanske gume određena je niža količina uronskih kiselina i manoze u odnosu na literaturne vrednosti, što je posledica visoke stope degradacije uronskih

monosaharida, a sa druge strane nastajanja dimera u kojima su uronske kiseline i heksoze vezane čvrstim glikozidnim vezama koje nije lako raskinuti pri standardnim uslovima hidrolize. Autori su pokušali da reše i ovaj nedostatak, tako što bi masenom spektrometrijom određivali dimere uronskih kiselina i heksoza (aldobiouronske kiseline), ali je ovo rešenje ubrzo odbačeno zbog ograničene serije standarda aldobiouronskih kiselina, nemogućnosti kalibracije, a samim tim i njihove kvantifikacije (Rühmann et al, 2015a, Rühmann et al, 2015b).

2.3.4. Tehnike za karakterizaciju čistih egzopolisaharida

Tehnikama za karakterizaciju polisaharida dobijamo podatke o njihovom sastavu i strukturi, veličini, različitim osobinama kao što su optička i emulzifikaciona aktivnost i viskozitet, kao i o njihovim mikrostrukturnim svojstvima. Kisela hidroliza predstavlja prvi korak u analizi sastava polisaharida, a najčešće se upotrebljavaju sumporna, hlorovodonična i trihlorsirćetna kiselina. Proizvodi hidrolize nastali usled raskidanja glikozidnih veza su monosaharidne jedinice koje se mogu derivatizovati u cilju dalje analize gasno-masenom spektroskopijom (*Gas Chromatography–Mass Spectrometry, GC-MS, eng.*). Kritičan korak u ovoj analizi je jednostepena derivatizacija aldoheksoza pri čemu može nastati do 5 tautomera, a višestepena derivatizacija podrazumeva upotrebu nekoliko hemijskih tretmana pa nije primenljiva za visoko-rezolutivna (*high throughput, eng.*) merenja. Struktura i veze u egzopolisaharidima se pored GC-MS tehnike mogu analizirati anjonoizmenjivačkom hromatografijom visokih performansi (*High Performance Anion Exchange Chromatography, HPAEC, eng.*) sa pulsni amperometrijskim detektorom (*Pulsed Amperometric Detection, PAD, eng.*). Zahvaljujući slabo kiseloj prirodi ugljenih hidrata HPAEC uz veliku selektivnost omogućava njihovo odvajanje koristeći anjonoizmenjivačku fazu kuplovanu sa PAD detektorom. Kombinacija HPAEC i PAD-a, za razliku od GC-MS tehnike, ne zahteva derivatizaciju ugljenih hidrata. Ipak, visoka pH vrednost može dovesti do epimerizacije i degradacije ugljenih hidrata što predstavlja nedostatak ove tehnike. Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR, eng.*) se upotrebljava u analizi tipa glikozidnih veza, konfiguracije prstena i anomerne konfiguracije monosaharida. U upotrebi su 1D i 2D NMR tehnike, ^1H i ^{13}C odnosno NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, eng.*), TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy, eng.*) i COSY (*Correlation Spectroscopy, eng.*) spektroskopije. Tipovi funkcionalnih grupa i veza prisutnih u strukturi polisaharida mogu se odrediti infracrvenom spektroskopijom (*Fourier Transform-Infrared Spectroscopy, FT-IR, eng.*). Ova analitičko instrumentalna tehnika se zasniva na vibraciji veza na karakterističnim frekvencijama (Rana, Upadhyay 2020, Rühmann et al, 2014). Elementarni sastav egzopolisaharida se može odrediti elementarnom organskom mikroanalizom (*Elementary Organic Microanalysis, EOMA, eng.*).

Pored analize sastava polisaharida neophodno je odrediti i molekulsku masu, a u tu svrhu se koriste gel permeaciona hromatografija (*Gel Permeation Chromatography, GPC, eng.*) na Sepharose CL-4B (Stefanović et al, 2013), Ultrahydrogel 1000 gel GPC (Veerapandian et al, 2020) i ekskluziona hromatografija visokih performansi (*Size Exclusion Chromatography, SEC, eng.*) (Circic et al, 2012, Morales-Martínez et al, 2018, Restaino et al, 2017).

Za određivanje osobina egzopolisaharida mogu se upotrebiti neke od tehnika kao što su difrakcija X zracima (*X-ray diffraction, XRD, eng.*), diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (*Differential Scanning Calorimetry, DSC, eng.*) i termogravimetrijska analiza (*Thermal Gravimetric Analysis, TGA, eng.*) (Rana, Upadhyay 2020). Važna karakteristika rastvora egzopolisaharida je i optička rotacija, a njene pozitivne vrednosti ukazuju na prisustvo α glikozidnih veza, odnosno negativne ili vrednosti bliske nuli na β povezivanje među monomernim jedinicama (Klyne 1955).

Pored optičke aktivnosti, pri ispitivanju osobina polisaharida određuje se njegov viskozitet u rastvoru upotrebom viskozimetra i emulgujuća aktivnost. Emulgujuća aktivnost egzopolisaharida se određuje iz supernatanta nakon uklanjanja biomase mikroorganizama centrifugiranjem i mešanja sa *n*-heksanom (1:1). 24 h kasnije određuje se odnos visina sloja emulzije i ukupne smeše (Cooper, Goldenberg 1987). Emulgujuća svojstva egzopolisaharida se određuju i turbidimetrijski po metodi koju su dali Pearce i Kinsella, 1978 (Pearce, Kinsella 1978).

Skenirajuća elektronska mikroskopska analiza (*Scanning Electronic Microscope, SEM, eng.*) omogućava uvid u mikrostrukturna svojstva polisaharida i razumevanje veze između fizičkih svojstava i mikrostrukture. Neki od instrumenata na kojima se može odrediti topografija i morfologija prečišćenog polisaharida su MIRA II LMU (Grinev et al, 2020) i Jeol JSM 6390 LV (Kekez et al, 2016).

Potencijalna upotreba egzopolisaharida u različitim poljima industrije zahteva upoznavanje sa njihovim sastavom, strukturom i osobinama, a radi dobijanja što preciznijih informacija neophodno je kombinovati što veći broj tehnika za njihovu karakterizaciju.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Metode korišćene za analizu zemljišta i sedimenta kao supstrata za remedijaciju

3.1.1. Analitičke metode

3.1.1.1. Određivanje procenta higroskopne vlage

Sadržaj vlage u uzorcima je određivan prema standardnoj metodi ISO 11465 (ISO 11465:1993).

3.1.1.2. Potenciometrijsko određivanje pH vrednosti

pH vrednost je merena u suspenziji homogenizovanog uzorka i prokuvane demineralizovane vode u odnosu 1:2,5 (g/V), prethodno mešanoj na magnetnoj mešalici 30 min prema standardnoj metodi ISO DIS 10390 (ISO DIS 10390:2002). Za merenje pH vrednosti korišćen je pH-metar, tip PHM 26, Radiometer, Danska, sa kombinovanom elektrodom.

3.1.1.3. Određivanje sadržaja pepela

Sadržaj pepela je određivan u tiglovima od porcelana spaljivanjem uzorka na plameniku do prestanka izdvajanja belih para, a zatim spaljivanjem uzorka u peći na 800 °C, do konstantne mase.

3.1.1.4. Određivanje sadržaja karbonata

Sadržaj karbonata u uzorku je analiziran standardnom metodom volumetrijskog tipa ISO 10693 (ISO 10693:1995). Vrednosti atmosferskog pritiska i temperature su očitane u momentu izvođenja analize.

3.1.1.5. Retencioni vodeni kapacitet

Retencioni vodni kapacitet uzorka je određivan standardnom metodom ISO 11274 (ISO 11274:1998).

3.1.1.6. Dostupni kalijum i fosfor

Dostupni fosfor i kalijum u uzorku su analizirani prema standardnim metodama koje su predložili Pansu i Gautheyrou i Wilke (Pansu, Gautheyrou 2006, Wilke 2005).

3.1.1.7. Određivanje grupnog sastava

Ekstrakcija organskih jedinjenja iz uzorka rađena je u sistemu za ekstrakciju po Soksletu, Omnilab FoodALYT RS 60. Za ekstrakciju organskih jedinjenja je korišćena smeša rastvarača aceton:*n*-heksan 1:1, 130 mL, 24 h. Nakon ekstrakcije uzorci su upareni do suva i podvrgnuti frakcionom razdvajanju organskih supstanci po metodi koja je ranije opisana (Ilić 2011, Jovančičević et al, 2005).

Propis za 5 mg uzorka: pre hromatografskog razdvajanja na koloni, urađena je saponifikacija i neutralizacija uzorka. 500 μL 5% rastvora kalijum-hidroksida u metanolu (sa 1% dH_2O) dodato je u uzorak, koji je zatim prekriven i ostavljen preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon saponifikacije u uzorak je dodata 10% hlorovodonična kiselina (130 μL). Pomoću metilen-hlorid:metanol smeše (1:1, 20 mL) uzorak je prenesen u vialu, pa uparen do suva, a nakon toga mu je dodat metilen-hlorid sa 1% metanolom (500 μL) i heksan (20 mL). Natrijum-sulfat je korišćen za sušenje, a zatim je uzorak nanet na kolonu.

Na dno kolone nanet je filter, aluminijum-oksidi i silicijum-dioksid postupkom "na mokro" (dijametar kolone je bio 1 cm, a visina 15 cm). Za 5 mg kompozitnog uzorka masa adsorbenta je bila 3 g Al_2O_3 i 2 g SiO_2 (SiO_2 je aktiviran na 250 $^\circ\text{C}$). U odnosu na izmerenu masu Al_2O_3 dodata je destilovana voda (4%) tj. 10% destilovane vode za SiO_2 . Na vrh je dodato 2 g Flurisol-a.

Za eluiranje frakcija sa kolone korišćeni su:

prva frakcija - *n*-heksan (10 mL) – za eluiranje zasićenih ugljovodonika,

druga frakcija – metilen-hlorid (10 mL) – za eluiranje aromatičnih jedinjenja,

treća frakcija – metilen-hlorid:metanol (1:1, 10 mL) – za eluiranje polarne alkoholne i keto frakcije,

četvrta frakcija – 5% rastvor sumporne kiseline u metanolu (4 x 2 mL) - za metilaciju na koloni i eluiranje masno-kiselinske frakcije. Masno-kiselinska frakcija je dodatno tretirana 20% vodenim rastvorom natrijum-hlorida (30 mL) i *n*-heksanom (2 mL). Organski deo je odvojen nakon mućkanja, *n*-heksan je dodavan nekoliko puta, a na kraju je uklonjen u struji azota.

Posle frakcionog razdvajanja uzorci su upareni na vakuum uparivaču do 1 mL i kvantitativno prebačeni u vialu čija je masa prethodno izmerena na analitičkoj vagi i upareni do suva u struji azota. Iz razlike masa pune i prazne vialu gravimetrijski je određivana masa svake frakcije. Vrednosti su izražene u g/kg s.s. Rezultati su obrađeni u Microsoft Office Excel programu.

3.1.1.8. Određivanje sadržaja huminskih kiselina

Uzorak je osušen na vazduhu (40 g) i mešan sa rastvorom $\text{NaOH}/\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (200 mL) (ISO 5073: 1999), nakon čega je smeša zagrevana na ključalom vodenom kupatilu sa mešanjem 2 h i ohlađena na sobnu temperaturu. Supernatant je odvojen centrifugiranjem (3000 rpm, 10 min). Huminske kiseline su taložene iz supernatanta 6 M HCl do pH 1. Nakon ponovljenog centrifugiranja, supernatant je odbačen. Huminske kiseline su prečišćene prema proceduri koju preporučuje IHSS (International Humic Substance Society 2018) i radu koji su objavili Jednak i saradnici 2017. godine (Jednak et al, 2017).

3.1.2. Mikrobiološke metode

Za izolovanje i određivanje broja mikroorganizama korišćene su mikrobiološke hranljive podloge. Nakon odmeravanja i rastvaranja komponenata podloge su sterilisane u autoklavu 25 min na 121 °C.

3.1.2.1. Podloga za određivanje broja ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija

Hranljivi agar je korišćen za određivanje broja ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih mezofilnih bakterija (HAB). Podloga je pripremana po uputstvu proizvođača (Torlak).

3.1.2.2. Podloga za određivanje broja kvasaca i plesni

Sladni agar je korišćen za određivanje ukupnog broja kvasaca i plesni (KP) i pripreman rastvaranjem suve podloge po uputstvu proizvođača (Torlak).

3.1.2.3. Podloga za određivanje broja mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2

Za određivanje broja mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2 (RNU) korišćena je podloga (UG agar) koja je pripremana rastvaranjem sledećih komponenti:

NH ₄ NO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
ekstrakt zemlje	50 mL
agar	16 g
destilovana voda	1 L

Nakon sterilizacije i hlađenja, u podlogu je dodato 2 g ili 2,35 mL dizela D2 (izvor ugljovodonika) (Bossert et al, 2002).

3.1.2.4. Pomoćni mikrobiološki rastvori

Rastvor za pripremanje serijskih razblaženja

Fiziološki rastvor koncentracije 0,9% natrijum-hlorida je upotrebljavan za pripremanje serijskih razblaženja.

Ekstrakt zemlje

U 100 mL demineralizovane vode dodato je 100 g kontaminirane zemlje. Rastvor je zagrevan do ključanja, ohlađen do sobne temperature i proceden. Filtrat (ekstrakt zemlje) je korišćen za pripremanje podloga.

3.1.2.5. Određivanje broja mikroorganizama

Broj mikroorganizama u uzorcima tokom procesa bioremedijacije je određivan metodom serijskog razblaženja (Gojgić-Cvijović, Vrvić 2003). Ukupan broj hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih mezofilnih bakterija praćen je gajenjem na hranljivom agaru, 48 h na 28 °C. Određivan je i broj kvasaca i plesni na sladnom agaru pri istim uslovima gajenja. Mikroorganizmi koji razgrađuju naftne ugljovodnike brojani su na UG agaru nakon sedam dana inkubacije na 28 °C.

3.1.2.6. Izolovanje konzorcijuma zimogenih mikroorganizama i priprema biomase

Za odvojene studije bioremedijacije zimogeni konzorcijumi su izolovani na isti način. 1 g sedimenta iz isplačne jame odnosno 1 g zemljišta kontaminiranog naftom dodavan je u 100 mL mineralne podloge sa D2 dizelom (istog sastava kao UG podloga, samo bez dodatka agara, deo 3.1.2.3.). Zasejana podloga je inkubirana 7 dana na 28 °C, 200 rpm. 1 mL suspenzije mikroorganizama je prebačen u novu mineralnu podlogu i ponovno inkubiran. Postupak je ponovljen. Alikvoti mešane kulture su suspendovani u fiziološkom rastvoru i zasejavani na agarozne podloge (UG agar). Sa površine podloge za određivanje broja mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2 u sterilnoj zoni fiziološkim rastvorom i sterilnom ezom pojedinačne porasle kolonije su prebacivane u 4 erlenmajera od 250 mL sa po 100 mL Startne podloge 1 (SP1). Nakon dva dana mešanja na horizontalnom šejkeru pri 180 rpm i na 28 °C sadržaj iz erlenmajera od 250 mL je kvantitativno prebacivan u 4 erlenmajera od 5 L sa po 2 L Startne podloge 2 (SP2). Nakon 4 dana mešanja na horizontalnom šejkeru pri 180 rpm i na 28 °C suspenzije su spojene i sadržaj iz erlenmajera je služio kao inokulum za dobijanje 1000 L biomase. Bioreaktor od 1000 L sa Radnom podlogom (RP) je inokulisan sa 8 L u laboratorijskim uslovima umnožene biomase. Mešanje i aeracija u bioreaktoru su izvođeni sistemom kompresora i perforiranih cevi. Nakon 48 h biomasa iz bioreaktora je upotrebljena u postupku bioremedijacije. U podloge SP2 i RP je dodavan komercijalni, netoksični i biodegradabilni biosurfaktant Biosolve® CLEAR kompanije The Westford Chemical Corporation (Westford, MA, SAD). Njegova uloga je bila da kao biodisperzant rastvori dodate ugljovodnike. Originalni rastvor je upotrebljen u koncentraciji 1 mL/L.

Startna podloga 1 je pripremana rastvaranjem sledećih komponenti:

hranljivi bujon	1,2 g
kontaminirana zemlja	5 g
demineralizovana voda	do 100 mL
pH	7

Startna podloga 2 je pripremana rastvaranjem sledećih komponenti:

hranljivi bujon	23,3 g
kontaminirana zemlja	100 g
demineralizovana voda	do 2000 mL
pH	7

Nakon sterilizacije u autoklavu u ohlađenu podlogu SP2 je u sterilnoj zoni dodato 20 g vanbilansnog mazuta koji predstavlja dominantni izvor ugljenika. Dodati ugljovodnici su podlogu učinili selektivnom za rast mikroorganizama UG degradera.

Radna podloga je pripremana rastvaranjem sledećih komponenti direktno u bioreaktoru:

autolizat kvasca	7,5 kg
ekstrakt zemlje	50 L
KCl	100 g
NH ₃	261 mL
H ₃ PO ₄	120 mL
mazut/dizel	10 kg
česmenska voda	900 L
pH	7

Pripremljena podloga nije sterilisana već je selektivnost rasta mikroorganizama postignuta visokom koncentracijom naftnih ugljovodonika.

3.1.2.7. Metagenomska analiza

Ukupna DNK je iz uzorka na početku procesa bioremedijacije ekstrahovana i prečišćena koristeći ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA). Biblioteka amplikona dobijena je umnožavanjem izolovane DNK pomoću PCR-a u dva koraka. U prvom koraku umnoženi su V3 - V4 regioni 16S rRNK gena pomoću 341F (ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT – NNNNN -CCTACGGGNGGCWGCAG) i 805R (GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT – NNNNN – GACTACHVGGGTATCTAATCC) prajmera. Nastali proizvodi su ponovo umnoženi PCR tehnikom upotrebom indeksnih prajmera. Sekvenciranje umnoženog proizvoda nakon drugog PCR-a je urađeno na Illumina MiSeq platformi (San Diego, CA, USA) u Bioengineering Lab. Co., Ltd. (Kanagawa, Japan). Dobijeni podaci su analizirani koristeći QIIME2 softver (verzija 2019.01) (Bolyen et al, 2018). Ukratko, prajmeri su skraćeni i podaci su filtrirani i "okrnjeni" tako da dozvole preklapanje od 20 bp između forward (*eng.*) i reverse (*eng.*) očitavanja, pomoću Dada2 softvera. Moguće himerne sekvence su identifikovane i uklonjene pre anotacije varijanti sekvenci amplikona pomoću MiDAS baze podataka (McIlroy et al, 2015). Nakon sekvenciranja, obrađene sekvence su poređene sa kulturama čije su sekvence deponovane u NCBI (*National Center for Biotechnology Information, NCBI, eng.*) bazi podataka. Rezultati su obrađeni u Microsoft Office Excel programu.

3.1.3. Strukturno-instrumentalne tehnike korišćene za karakterizaciju bioremedijacionog supstrata i huminskih kiselina

3.1.3.1. Elementarna organska mikroanaliza

Sadržaj ugljenika, vodonika, azota i sumpora u uzorku je analiziran upotrebom automatskog analizatora Vario ELIII CHNS/O, Elementar, Hanau, Nemačka. Temperatura sagorevanja je bila 1150 °C, a detektor TCD (*Thermal Conductivity Detector, eng.*). Dinamički opseg rada uređaja je iznosio: C: 0,03–20 mg, H: 0,03–3 mg, N: 0,03–2 mg, S: 0,03–6 mg. Preciznost/standardna devijacija je iznosila <0,1%. Rezultati su prikazani u procentima, a kiseonik je određivan iz razlike do 100%.

3.1.3.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Infracrveni spektar sa Furijeovom transformacijom uzorka je snimljen na FT-IR spektrometru Nicolet 6700, Thermo Nicolet Corp., Madison, WI, u ATR (*attenuated total reflectance, eng.*) režimu i opsegu talasnih dužina 4000-400 cm⁻¹.

3.1.3.3. Spektrofotometrijska analiza za određivanje E4/E6 odnosa

E4/E6 odnos uzorka huminskih kiselina određivan je kao odnos apsorbanci na 465 i 665 nm. Apsorbance rastvora (30 mg uzorka u 100 mL 0,05 M rastvora natrijum-bikarbonata) su snimljene na UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu, UV-1280) (Jednak et al, 2017, Pajaczkowska et al, 2003).

3.1.3.4. Određivanje sadržaja ukupnih naftnih ugljovodonika gasnom hromatografijom

Ukupni naftni ugljovodonici (*total petroleum hydrocarbons, TPH, eng.*) u uzorcima su ekstrahovani po metodi ISO 16703 (ISO 16703:2004).

Gasna hromatografija uzorka je rađena na gasnom hromatografu Agilent 7890A sa plameno jonizujućim detektorom i kolonom HP-5 dimenzija 30 m × 0,32 mm × 0,25 μm. Uslovi analize su bili: injektovanje uzorka na temperaturi pećnice 60 °C (temperatura injektora je bila 250 °C, a detektora 300 °C), 1 min pri istim uslovima, a nakon toga je programski podešena da dostigne 300 °C tj. temperatura je rasla 4 °C/min. Noseći gas je bio vodonik sa protokom 30 cm/s. Za obradu podataka korišćen je softver ChemStation, Agilent Technologies. Rezultati su izraženi po jedinici suve supstance (s.s.).

3.1.3.5. Određivanje sadržaja mikroelemenata i teških metala

Ukupna količina mikroelemenata i teških metala uzoraka razorenih sa koncentrovanom azotnom kiselinom je određivana metodom indukovane kuplovane plazme (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry, ICP-OES, eng.*) na aparatu Vista Pro (Varian) (Jakovljević et al, 1985, Savić, Savić 1989).

3.2. Metode korišćene za karakterizaciju ispitivane bakterije CH-KOV3

3.2.1. Izolovanje ispitivane bakterije CH-KOV3

Za eksperiment proizvodnje egzopolisaharida bakterijska kultura je izolovana višestrukim presevom na mineralnu podlogu sa dizelom D2 kao jedinim izvorom ugljenika. Obogaćena kultura je pripremljena tako što je 1 g sedimenta zasejan u 100 mL mineralne podloge sa D2 dizelom (istog sastava kao UG podloga, samo bez dodatka agara, deo 3.1.2.3.). Zasejana podloga je inkubirana 7 dana na 28 °C, 200 rpm. Postupak je ponovljen 3 puta. Alikvoti mešane kulture su suspendovani u fiziološkom rastvoru i zasejavani na agarozne podloge (UG agar). Čiste kulture su izolovane metodom iscrpljenja. Bakterije koje grade kolonije specifične morfologije (ljigave, sluzave, rastegljive) odabrane su za dalje studije. Odabrane kulture presejane su na tečnu podlogu sa saharozom (PS) (Liu et al, 2010), sledećeg sastava: saharoza, 100 g/L, goveđi ekstrakt, 1 g/L, ekstrakt kvasca, 0,6 g/L, K₂HPO₄ x 3H₂O, 3 g/L, KH₂PO₄, 3 g/L, NaCl, 1 g/L, MgSO₄ x 7H₂O, 0,2 g/L, FeSO₄ x 7H₂O, 0,001 g/L, pH 7. Produkcija egzopolisaharida je trajala 5 dana, na 28 °C. Kao najbolji producent je izdvojena bakterija CH-KOV3.

3.2.2. Molekularna karakterizacija

Analiza 16S rRNK je upotrebljena za identifikaciju ispitivane bakterije CH-KOV3. Genomska DNK je ekstrahovana koristeći DNeasy Blood & Tissue kit (Nemačka). 16S rRNK geni su umnoženi PCR tehnikom koristeći 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') i 1492R (5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3') prajmere. Umnoženi fragmenti su prečišćeni koristeći QIAquick PCR Purification kit i sekvencirani u servisu Macrogen u Holandiji.

3.2.3. Konstrukcija filogenetskog stabla

Filogenetsko stablo roda *Brachy bacterium* je napravljeno uz pomoć MEGA 7.0.18 softvera koristeći metod maksimalne verovatnoće (*maximum likelihood method, eng.*).

3.2.4. Bojenje po Gramu, oksidaza i katalaza test

Bojenje po Gramu ispitivane bakterije, kao i oksidaza i katalaza test izvedeni su po standardnim procedurama. Korišćena je prekonocna kultura mikroorganizma gajenog na hranljivom agaru na 28 °C.

3.2.4.1. Bojenje po Gramu

Napravljen je razmaz mikroorganizma na pločici nakon rasta na Petri šolji, a zatim je preparat osušen i fiksiran u plamenu. Nakon hlađenja preko uzorka su prelivene dve kapi boje Gramovog rastvora (2 minuta), a višak boje upijen je filter papirom. Dodat je Lugolov rastvor, 1 minut. Nakon toga isti je odliven i preparat je ispran 96% etanolom, do prestanka izdvajanja boje sa pločice. Uzorak je ispran destilovanom vodom, a višak vode skupljen filter papirom. Preparat je preliven eozinom i ostavljen 30-60 sekundi. Na kraju procedure bojenja preparat je ispran destilovanom vodom, osušen i posmatran pod svetlosnim mikroskopom (Biological Trinocular Microscope, OPTIC900TPHDF, Colo

LabExperts, Slovenija). Gram-pozitivne bakterije se boje ljubičasto, a Gram-negativne crveno (Gojgić-Cvijović, Vrvić 2003).

3.2.4.2. Oksidaza test

Za ispitivanje produkcije oksidaze korišćen je komercijalni test (BioMérieux, Francuska). Na filter papir navlažen reagensom je nanosena ezom prekonocna kultura. Pojava intenzivne ljubičaste boje u roku od 10 sekundi predstavlja pozitivnu reakciju.

3.2.4.3. Katalaza test

U obeleženu praznu Petri šolju dodato je nekoliko kapi 3% vodonik-peroksida, a zatim ezom zahvaćena velika količina prekonocne kulture sa čvrste podloge i nanosena u rastvor. Burna reakcija i oslobađanje mehurića kiseonika predstavljaju pozitivnu reakciju (Gojgić-Cvijović, Vrvić 2003).

3.2.5. Fiziološko-biohemijska karakterizacija

Za fiziološko-biohemijsku karakterizaciju izolovane bakterije CH-KOV3 korišćeni su komercijalni API testovi (BioMérieux, Francuska): 20 NE, 20 E, CORYNE i ZYM. Svi testovi rađeni su po uputstvu proizvođača (BioMérieux), a u tabelama 3.1.-3.4. navedene su reakcije koje se ispituju.

Tabela 3.1. Oznaka reakcije, supstrata, enzimskih reakcija i opis pozitivnih i negativnih rezultata u API 20NE testu

Oznaka reakcije	Supstrat	Enzimski reakcija	+ rezultati	- rezultati
NO3	kalijum-nitrat	redukcija nitrata do nitrita	roze-crven	obezbojen
		redukcija nitrata do azota	obezbojen	roze-crven
TRP	L-triptofan	produkcija indola	roze	obezbojen, blago žut/zelen
GLU	D-glukoza	fermentacija	žut	plav/zelen
ADH	L-arginin	arginin-dihidrolaza	narandžast/roze/crven	žut
URE	urea	ureaza	narandžast/roze/crven	žut
ESC	eskulin gvožđe citrat	hidroliza (β -glukozidaza)	siv/braon/crn	žut
GEL	želatin (goveđi)	hidroliza (proteaza)	difuzija crnog pigmenta	nema difuzije
PNPG	4-nitrofenil-D-galaktopiranozid	β -galaktozidaza	žut	bezbojan
GLU	D-glukoza			
ARA	L-arabinoza	asimilacija	zamućeno	bistro
MNE	D-manoza			

MAN	D-manitol			
NAG	N-acetil-glukozamin			
MAL	D-maltoza			
GNT	kalijum-glukonat			
CAP	dekanska kiselina			
ADI	adipinska kiselina			
MLT	jabučna kiselina			
CIT	trinatrijum-citrat			
PAC	fenilsirćetna kiselina			
OX		citohrom c-oksidaža	ljubičast	bezbojan

Tabela 3.2. Oznaka reakcije, supstrata, enzimske reakcije, opis pozitivnih i negativnih rezultata u API 20E testu

Oznaka reakcije	Supstrat	Enzimska reakcija	+ rezultati	- rezultati
ONPG	2-nitrofenil- β D-galaktopiranozid	β -galaktozidaža	žut	bezbojan
ADH	L-arginin	arginin-dihidrolaza	crven/narandžast	žut
LDC	L-lizin	lizin-dekarboksilaza	crven/narandžast	žut
ODC	L-ornitin	ornitin-dekarboksilaza	crven/narandžast	žut
CIT	trinatrijum-citrat	korišćenje citrata	plavo-zelen/plav	blago zelen/žut
H₂S	natrijum-tiosulfat	produkcija H ₂ S	crn	bezbojan
URE	urea	ureaza	crven/narandžast	žut
TDA	L-triptofan	triptofan-deaminaza	crveno-braon/	žut
IND	L-triptofan	proizvodnja indola	roze	bezbojan/blago zelen/žut
VP	natrijum-piruvat	proizvodnja acetoina	roze/crven	bezbojan
GEL	želatin	hidroliza (proteaza)	difuzija crnog pigmenta	nema difuzije
GLU	D-glukoza			
MAN	D-manitol	oksidacija/fermentacija	žuto	plavo/žuto-plavo
INO	inozitol			
SOR	D-sorbitol			
RHA	L-ramnoza			
SAC	D-saharoza			

MEL	D-melibioza			
AMY	amigdalín			
ARA	L-arabinoza			
OX	oksidaza	test	citohrom-oksidaza	ljubičast bezbojan

Tabela 3.3. Oznaka reakcije, supstrata, enzimske reakcija, opis pozitivnih i negativnih rezultata u API CORYNE testu

Oznaka reakcije	Supstrat	Enzimska reakcija	+ rezultati	- rezultati
NIT	kalijum-nitrat	redukcija nitrata	roze-crven obezbojen	obezbojen roze-crven
PYZ	pirazin-karboksamid	pirazin-amidaza	braon/narandžast	bezbojan/blago braon/narandžast
PYRA	piroglutaminska kiselina- β - naftilamid	pirolidonil- arilamidaza	narandžast	bezbojan/blago narandžast
PAL	2-naftil-fosfat	alkalna fosfataza	ljubičast	bezbojan
GUR	naftol ASBI- glukuronska kiselina	β -glukuronidaza	plav	bezbojan/blago ljubičast/ narandžast
GAL	2-naftil- β -D- galaktopiranozid	β -galaktozidaza	ljubičast	bezbojan/blago ljubičast
GLU	2-naftil- α -D- glukopiranozid	α -glukozidaza	ljubičast	bezbojan/blago ljubičast/zelen
NAG	1-naftil-N-acetil- β - D-glukozaminid	N-acetil- β - glukozaminidaza	braon	bezbojan/blago ljubičast/braon/siv
ESC	eskulin gvožđe-citrat	β -glukozidaza	crn	bezbojan/siv
URE	urea	ureaza	crven/roze	narandžast/žut/siv
GEL	želatin (goveđi)	hidroliza	difuzija crnog pigmenta	nema difuzije
O	negativna kontrola			
GLU	D-glukoza			
RIB	D-riboza			
XYL	D-ksiloza			
MAN	D-manitol	fermentacija	žuto/žuto- narandžasto	narandžasto/crveno
MAL	D-maltoza			
LAC	D-laktoza (goveđeg porekla)			
SAC	D-saharoza			
GLYG	glikogen			
CAT		katalaza	mehurići	odusustvo mehurića

Tabela 3.4. Oznaka reakcije, supstrata, enzimske reakcija, opis pozitivnih i negativnih rezultata u API ZYM testu

Oznaka reakcije.	Substrat	Enzimska reakcija	pH	+ rezultat
1	-	kontrola	-	-
2	2-naftil fosfat	alkalna fosfataza	8,5	ljubičast

3	2-naftil butirat	esteraza	6,5	ljubičast
4	2-naftil kaprilat	esteraza-lipaza	7,5	ljubičast
5	2-naftil miristat	lipaza	-	ljubičast
6	L-leucil-2-naftilamid	leucin-arilamidaza	-	narandžast
7	L-valil-2-naftilamid	valin-arilamidaza	-	narandžast
8	L-cistol-2-naftilamid	cistin-arilamidaza	-	narandžast
9	N -benzoil-DL-arginin-2-naftilamid	tripsin	8,5	narandžast
10	N -glutaril-fenilalanin-2-naftilamid	α -himotripsin	7,5	narandžast
11	2-naftil fosfat	kisela fosfataza	5,4	ljubičast
12	naftol-AS-BI-fosfat	naftol-AS-BI-fosfohidrolaza	-	plav
13	6-Br-2-naftil- α D-galaktopiranozid	α -galaktozidaza	-	ljubičast
14	2-naftil- β D-galaktopiranozid	β -galaktozidaza	-	ljubičast
15	naftol-AS-BI- β D-glukuronid	β -glukuronidaza	-	plav
16	2-naftil- α D-glukopiranozid	α -glukozidaza	-	ljubičast
17	6-Br-2-naftil- β D-glukopiranozid	β -glukozidaza	-	ljubičast
18	1-naftil-N-acetil- β D-glukozaminid	N-acetil- β -glukozaminidaza	-	braon
19	6-Br-2-naftil- α D-manopiranozid	α -manozidaza	-	ljubičast
20	2-naftil- α L-fukopiranozid	α -fukozidaza	-	ljubičast

Negativan rezultat – obezbojen/blago žut.

3.2.6. Određivanje ukupnih ćelijskih masnih kiselina

Ekstrakcija metil-estara masnih kiselina ispitivane bakterije je urađena po modifikovanoj proceduri koju su dali Minnikin i saradnici (Minnikin et al, 1975). Bakterija je gajena na hranljivom bujonu, a zatim je biomasa odvojena centrifugiranjem 10 min na 8000 rpm. 0,2 g vlažne biomase refluktovano je 3 h smešom toluen:metanol:sumporna kiselina (5:5:0,2 V/V/V). Nakon hlađenja u balonu, dodato je 10 mL zasićenog natrijum-hlorida i ceo rastvor ekstrahovan dva puta smešom hloroform:heksan (1:4 V/V, 2 \times 10 mL). Ekstrakt je ispran destilovanom vodom, osušen upotrebom anhidrovanog natrijum-sulfata, uparen do suva i analiziran upotrebom gasne hromatografije spregnute sa masenim spektrometrom.

3.2.7. Strukturno-instrumentalne tehnike

3.2.7.1. Gasno-masena analiza metil-estara masnih kiselina

Za analizu metil-estara masnih kiselina je korišćen GC-MS uređaj QP2010 Ultra, Shimadzu, Kjoto, Japan i 2D GC \times GC termalni modulator, ZoexCorp. Prva kolona je bila Rtx®-1 (RESTEK, Crossbond® 100% dimetil-polisiloksan, dimenzija 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m), a druga BPX50 (SGE Analytical Science, 2,6 m \times 0,1 mm \times 0,1 μ m). Kolone su bile povezane 2D GC \times GC modulatorom.

Helijum je korišćen kao noseći gas. Temperatura injektora je bila konstantna: 200 °C. Korišćen je sledeći temperaturni program: inicijalna temperatura 40 °C 1 min, nakon toga 4 °C po minuti do 300 °C, izotermalno 300 °C 5 min. Termalna modulacija je bila 6 s. 2D GC×GC–MS podaci su sakupljeni i analizirani pomoću GCMS Solution softvera, Shimadzu. Spektralna analiza je rađena uz korišćenje NIST11 i Wiley8 baze podataka, a relativni odnos komponenata je preračunat iz odgovarajućih površina ispod pika. 2D GC×GC–MS podaci su analizirani koristeći Chrom-Square Ver. 2 (Shimadzu), koji ima mogućnost direktnog očitavanja 2D GC×GC podataka dobijenih sa GCMS Solution softvera, pri čemu ih konvertuje u dvodimenzionalnu sliku.

3.2.7.2. MALDI-TOF MS karakterizacija

MALDI-TOF MS karakterizacija ispitivane bakterije je rađena na aparatu Bruker Autoflex II MALDI-TOF MS (Bremen, Nemačka) koji je opremljen UV azotnim laserom (337 nm) i detektorom (*dual microchannel microplate, eng.*).

Mala količina biomase bakterije CH-KOV3 (prekonoćna kultura na hranljivom agaru) je čačkalicom naneta na MALDI ploču, natopljena sa 1 µL zasićenog rastvora α -cijano-4-hidroksicinaminske kiseline (Sigma–Aldrich, SAD) u 50% acetonitrilu i 2,5% trifluorsirćetnoj kiselini (TFA) i analizirana nakon sušenja.

Spektri su snimani pomoću Flex Control softvera (Bruker Daltonics, Bremen, Nemačka), a uzorci su analizirani šest puta koristeći Flex Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Nemačka). Za svako merenje, preko 3 000 individualnih spektara je sakupljeno i uprosečeno za dobijanje MALDI-TOF MS spektra (10 različitih tačaka na osušenom uzorku, 300 udara laserom). Za eksternu kalibraciju su upotrebljeni proteinski standardi (Bruker Protein Test Standard, Bruker Daltonics, Bremen, Nemačka). MALDI BioTyper db 6903 softver je korišćen za analizu proteinskog profila poređenjem sa obrascima iz proteinskih biblioteka.

3.3. Produkcija egzopolisaharida pomoću ispitivane bakterije CH-KOV3 i postupak izolovanja

Za produkciju egzopolisaharida pomoću ispitivane bakterije CH-KOV3 korišćena je tečna podloga sa saharozom. Uslovi kultivacije su bili: 28 °C i 200 rpm, 5 dana. Nakon centrifugiranja na 10 000g, 10 min, supernatant je pomešan sa dve zapremine etanola i ostavljen preko noći u frižideru na 4 °C. Talog dobijen centrifugiranjem na 10 000g, 10 min je rastvoren u destilovanoj vodi. Procedura taloženja etanolom je ponovljena tri puta. Talog rastvoren u destilovanoj vodi je dijalizovan naspram vodovodske vode, potom naspram destilovane vode, a zatim koncentrovan na vakuum uparivaču i liofilizovan.

3.4. Optimizacija produkcije egzopolisaharida

Analiziran je uticaj temperature (PS tečna podloga, 5 dana, 200 rpm, ispitivane temperature su bile: 20, 28, 37 i 45 °C), pH (PS tečna podloga, 5 dana na 28 °C, 200 rpm, pH vrednost je varirana: 5, 6, 7 i 8) i koncentracije saharoze (PS tečna podloga, 5 dana na 28 °C, 200 rpm, koncentracija saharoze u podlozi je iznosila: 60, 100, 140, 200, 300, 500 i 600 g/L) na produkciju egzopolisaharida. Praćena je i bakterijska kriva rasta, a broj mikroorganizama je određivan metodom serijskog razblaženja kao u odeljku 3.1.2.5.

Svi eksperimenti su izvođeni u erlenmajerima zapremine 500 mL koji su sadržali 200 mL tečne podloge. Prekonoćna kultura (1 mL) je korišćena za inokulaciju.

3.5. Metode korišćene za strukturnu karakterizaciju egzopolisaharida

3.5.1. Analitičke metode

3.5.1.1. Hidroliza i papirna hromatografija

Izolovani egzopolisaharid (2 mg) je hidrolizovan 3 M trifluorsirćetnom kiselinom (2 mL) u zaptivenim bočicama 12 h, na 121 °C. Nakon hidrolize uzorak je uparavan pod sniženim pritiskom na 45 °C do suva. TFA je uklonjena kroz tri ciklusa uparavanja dodatkom 0,4 mL izopropanola. Ostatak u balonu je resuspendovan u 0,02 mL destilovane vode i korišćen za dalju analizu. Analiza hidrolizata je vršena planarnom hromatografijom na Whatman No.1 hromatografskom papiru (silazni metod) u sistemu rastvarača etil-acetat:piridin:voda (10:4:3 V/V/V). Komponente su vizuelizovane upotrebom baznog srebro-nitrata (Chaplin 1986).

3.5.1.2. Parcijalna kisela hidroliza

Parcijalna kisela hidroliza izolovanog egzopolisaharida izvršena je po modifikovanoj metodi koju su dali Dahech i saradnici (Dahech et al, 2012) u cilju određivanja monosaharidnog sastava. Vodeni rastvori egzopolisaharida (10 mg/mL, 8 mL) i 0,125% oksalne kiseline (8 mL) zasebno su zagrevani na 80 °C i pomešani u odnosu 1:1. Hidroliza je trajala 20 min na 80 °C. U jednakim intervalima, na svaka 2 minuta uzimani su alikvoti (2 mL), neutralisani čvrstim barijum-karbonatom do pH vrednosti 6,5-7 (pH vrednost je praćena upotrebom indikatorske hartije), a proizvodi hidrolize analizirani tankoslojnom hromatografijom u sistemu rastvarača hloroform:sirćetna kiselina:voda (6:7:1

V/V/V). Tačke su vizuelizovane prskanjem rastvora 50% sumporne kiseline i zagrevanjem na 100 °C, 10 min. Fruktaza, glukoza i saharoza su korišćene kao standardi.

3.5.1.3. Merenje optičke rotacije

Optička rotacija uzorka egzopolisaharida rastvorenog u Milli-Q vodi (koncentracija 1,1%) je određivana polarimetrom Polartronic MH8, Schmidt and Haensch, Nemačka, u 100 mm dugačkim kivetama, zapremine 4,4 mL, na talasnoj dužini polarizacione svetlosti 589 nm pri temperaturi od 25 °C.

3.5.1.4. Merenje dinamičke i kinematičke viskoznosti

Merenje dinamičke i kinematičke viskoznosti uzorka egzopolisaharida rastvorenog u Milli-Q vodi (koncentracija 1,1%) je urađeno upotrebom kapilarnog viskozimetra Ostwald, Witte, Nemačka na temperaturi od 25 °C.

3.5.1.5. Određivanje molekulske mase

Prosečna molekulska masa izolovanog egzopolisaharida određivana je upotrebom gel permeacione hromatografije na Sepharose CL-4B matriksu po proceduri koju su koristili Stefanović i saradnici (Stefanović et al, 2013).

Uzorak polisaharida je rastvoren u vodi (1 mg/mL). Kolona je eluirana natrijum-hloridom, 0,05 mol/L, sa brzinom protoka 0,1 mL/min (kolona prečnika 1,2 cm, visine 80 cm). Skupljane su frakcije i sadržaj šećera u njima analiziran fenol-sumpornim reagensom. Zapremina svake frakcije je iznosila 3 mL. Standardna prava je napravljena upotrebom dekstrana kao standarda (Fluka). Opseg molekulskih masa je bio od 5-500 kDa.

3.5.1.6. Metilacija i reduktivno cepanje

Za metilaciju je korišćena metoda koju su dali Ciucanu i Kerek (Ciucanu, Kerek 1984), a izmenili Needs i Selvendran (Needs, Selvendran 1993). Liofilizovani egzopolisaharid je osušen na 50 °C 24 h pre upotrebe, a zatim je 10 mg rastvoreno u anhidrovanom dimetil-sulfoksidu (1 mL) pod argonom i metilovano upotrebom prašenog natrijum-hidroksida (0,15 g) i metil-jodida (0,25 mL).

Permetilovani egzopolisaharid je ekstrahovan hloroformom i snimljen mu je infracrveni spektar. Odsustvo karakterističnih signala za hidroksilne grupe u opsegu od 3500-3200 cm^{-1} je ukazalo da je proces metilacije bio kompletan.

Permetilovani egzopolisaharid je dalje reduktivno "cepan" po metodi Rolf i Gray (Rolf, Gray 1984). Redukujući agens je dobijen mešanjem bor-trifluorid-eterata (1,55 mL), trietilsilana (2 mL), trifluorsirćetne kiseline (0,32 mL) i dihlormetana (1,13 mL). Redukujuća smeša (2,75 mL) je dodata metilovanom egzopolisaharidu (5 mg) i reakcija je izvođena 24 h na 0 °C u cilju nastanka odgovarajućih anhidroalditola. Metilovani anhidroalditoli su dalje acetilovani upotrebom anhidrida sirćetne kiseline (0,25 mL) 1 h na sobnoj temperaturi. Acetilovani, metilovani anhidroalditoli su rastvoreni u metilen-hloridu, rastvor je ispran vodom tri puta, a zatim je organski sloj uparen u struji azota i analiziran upotrebom gasno-masene hromatografije.

3.5.2. Strukturno-instrumentalne tehnike upotrebljene za karakterizaciju egzopolisaharida

3.5.2.1. Elementarna organska mikroanaliza

Sadržaj elemenata u izolovanom egzopolisaharidu je analiziran upotrebom automatskog analizatora Vario ELIII CHNS/O pri uslovima datim u odeljku 3.1.3.1.

3.5.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

FT-IR spektar uzorka egzopolisaharida je snimljen na spektrometru Nicolet 6700 pri uslovima datim u odeljku 3.1.3.2.

3.5.2.3. Nuklearna magnetno-rezonantna spektroskopija

Nuklearno-magnetni-rezonantni spektri su snimljeni na Bruker AVANCE III 500 spektrometru na 500,26 MHz (^1H) i 125,8 MHz (^{13}C), na sobnoj temperaturi, u deuterijum-oksidu, sa trimetilsilil-propionatom kao internim referentnim standardom. Hemijska pomeranja su prikazana u ppm.

Standardne 1D NMR i 2D homonuklearne i heteronuklearne korelirajuće dvodimenzionalne tehnike su korišćene za analizu egzopolisaharida i to: ^1H , ^{13}C , DEPT 135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, eng.*), korelaciona spektroskopija i HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence, eng.*).

3.5.2.4. Gasno-masena analiza anhidroalditola

GC-MS analiza anhidroalditola je urađena na GC×GC–MS uređaju (Shimadzu, Kjoto, Japan). Termalni modulator je tokom analize bio isključen. Uzorci su injektovani u *splitless* (eng.) režimu. Injekciona zapremina je bila 1 μL , a temperatura injektora 250 °C. Protok helijuma, nosećeg gasa je iznosio 2,07 mL/min na 40 °C (režim sa konstantnim pritiscima). Temperatura kolone je bila podešena da programski linearno raste od 40–310 °C, 10 °C/min, sa inicijalnim (1 min) i finalnim (7 min) izotermalnim zadržavanjem. Maseni spektar je dobijen upotrebom elektronske jonizacije pri čemu je temperatura jonskog izvora bila 220 °C, a režim skeniranja 40–550 m/z.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U okviru ove doktorske teze je izolovan konzorcijum mikroorganizama degradera ugljovodonika i ispitivana njegova biodegradaciona sposobnost u procesima razgradnje izuzetno kompleksnih lokaliteta kao što su isplačne jame. Na početku studije biodegradacije koja je trajala 180 dana je napravljen bioremedijacioni supstrat (BRS). BRS je dobijen mešanjem zemljišta sa ruba isplačne jame i rastresitog sedimenta bogatog naftnim ugljovodonicima, nakon čega je dodat konzorcijum mikroorganizama i originalni rastvor BioSolve CLEAR. Reinokulacija je rađena na 30 dana korišćenjem prskalice na traktoru. Tokom izvođenja postupka bioremedijacije BRS je analiziran u cilju utvrđivanja toka i uspešnosti upotrebljenog postupka. Ispitivani su fizičko-hemijski parametri kao što su vlaga, pepeo, RVK i TPH, kao i mikrobiološki. Veliki značaj ovoj doktorskoj disertaciji dala je i metagenomska analiza uzorka na početku bioremedijacije koja daje uvid u sastav i strukturu mikrobne zajednice. Na ovaj način identifikovani su i nekulturable autohtoni rodovi koji takođe doprinose procesima biodegradacije.

Konzorcijum mikroorganizama degradera je primenjen i u *ex situ* postupku bioremedijacije zemljišta i proučavana je njegova efikasnost. Tokom 150 dana procesa bioremedijacije praćena je količina ukupnih ugljovodonika i promene u broju ukupnih mikroorganizama i mikroorganizama degradera ugljovodonika. Pored bioremedijacionog postupka ispitivana je postavljena hipoteza o paralelnom procesu humifikacije. Tokom 150 dana procesa bioremedijacije izolovane su i okarakterisane huminske kiseline. Analize koje su rađene u cilju utvrđivanja povećane količine aromatičnih struktura i kiseoničnih funkcionalnih grupa u huminskim kiselinama su bile: elementarna mikroanaliza, E4/E6 odnos i FT-IR spektroskopija. Povećana količina huminskih kiselina koje su obogaćene aromatičnim i kiseoničnim strukturama u zemljištu bi omogućila da ovaj zagađen ekosistem koji je tretiran bioremedijacijom ponovo postane stanište raznovrsnim mikroorganizmima i biljkama.

Mikroorganizmi iz zagađene životne sredine pored biodegradacionog potencijala često imaju i sposobnost sinteze različitih proizvoda. S jedne strane ti proizvodi štite bakteriju u ekstremnim uslovima i omogućavaju joj preživljavanje, dok se sa druge strane proizvodi mogu primeniti u različitim granama industrije. Bakterija CH-KOV3 je izolovana iz kanala otpanih voda Pančevo i u preliminarnim laboratorijskim testovima je pokazala potencijal za sintezu egzopolisaharida. Egzopolisaharidi se široko upotrebljavaju u industriji hrane, medicini i kozmetici. Kako bi se procesi proizvodnje egzopolisaharida unapredili, danas se istraživanja usmeravaju na identifikaciju novih mikrobnih izolata koji u visokom prinosu proizvode polisaharid. U okviru ove doktorske disertacije izolovana bakterija je uspešno molekularno identifikovana i zavedena u NCBI bazu podataka pod pristupnim brojem KC881303.1. Tokom studije izolata CH-KOV3 ispitivane su morfološke karakteristike, fiziološko-biohemijske osobine i masnokiselinski sastav, urađena je MALDI-TOF MS karakterizacija ribozomalnih proteina. Tokom studije proučavan je uticaj uslova fermentacije - temperature, pH vrednosti i koncentracije saharoze u podlozi na produkciju egzopolisaharida pomoću izolovane bakterije. Nakon ispitivanja i optimizacije produkcije egzopolisaharida, deo doktorske teze je bio fokusiran na ispitivanje strukture dobijenog polisaharida sledećim metodama: elementarnom organskom mikroanalizom, hidrolizom i papirnom hromatografijom, parcijalnom hidrolizom oksalnom kiselinom, određivanjem optičke rotacije, dinamičke i kinematičke viskoznosti i molekulske mase, FTIR, 1D i 2D NMR spektroskopijama, gasno-masenom analizom metilacionih proizvoda.

4.1. Tretman isplačne jame postupkom bioremedijacije

U disertaciji je opisan *in situ* proces bioremedijacije isplačne jame u Banatu koja je vlasništvo Naftne industrije Srbije (NIS) (Avdalović et al, 2016). NIS je jedina kompanija koja eksploatiše i proizvodi naftu i gas u Srbiji, a od 2009. godine njen većinski vlasnik je ruska kompanija Gazprom Neft (Banjac et al, 2013). Tokom eksploatacije nafte nastaje isplačni otpad koji se odlaže u tzv. isplačne jame (Kisic et al, 2009, Kokal 2006, Veil 1998). Pored otpadne isplake isplačna jama sadrži nus-proizvode koji nastaju tokom bušenja, a prosečna zapremina isplačne jame u Srbiji iznosi 1000 m³ (Avdalović et al, 2016). Otpadna isplaka (*drilling mud, eng.*) predstavlja radnu tečnost koja se koristi pri bušenju i eksploataciji nafte i prirodnog gasa iz bušotina. Ona je na bazi vode i njenu osnovu čini bentonitska glina, a sadrži i barijum-sulfat barit ili kalcijum-sulfat. Za poboljšanje osobina otpadne isplake dodaju se različiti aditivi (Boussen et al, 2015, Fink 2012).

4.1.1. Karakterizacija isplačne jame pre bioremedijacionog tretmana

Isplačna jama (20 m × 30 m × 2 m) se sastojala od nekoliko slojeva poređanih po sledećem redu:

- (1) sirova nafta, poljoprivredne biljne organske supstance i u manjoj količini otpad. Dimenzije $h \sim 0,1$ m, $V = 60$ m³;
- (2) nauljena bazna voda, dimenzije: $h \sim 0,6$ m, $V = 360$ m³;
- (3) rastresit sediment sa teškom frakcijom nafte i bentonitom, dimenzije: $h \sim 1$ m, $V = 600$ m³;
- (4) kompresovani isplačni materijal baritnog porekla, blago kontaminiran naftom, dimenzije: $h \sim 0,3$ m, $V = 180$ m³.

Pre izvođenja postupka bioremedijacije, urađena je karakterizacija isplačne jame, u cilju utvrđivanja nivoa zagađenosti, a rezultati su prikazani u tabeli 4.1. Najveća količina TPH se nalazila u rastresitom sedimentu, čak 65,3 g/kg s.s., dok su zemlja sa ruba jame i kompresovani isplačni materijal imali daleko manje količine ugljovodonika (1,8 i 1 g/kg s.s. redom).

Tabela 4.1. Fizičko-hemijski i mikrobiološki parametri na ispitivanoj lokaciji

Parametri		Zemlja sa ruba isplačne jame	Rastresit sediment	Kompresovani isplačni materijal
Vlaga (%)		12,9	36	11,5
Pepeo (%)		9,9	42,7	10,4
TPH (g/kg s.s.)		1,8	65,3	1
Elementarni sastav (%)	C	15,8	55,1	15,2
	N	0,62	0,54	0,75
	H	1,99	7,59	1,84
	S	0,98	1,7	0,78
HAB (CFU/g)		2,7x10 ⁶	3,8x10 ⁴	6,2x10 ⁴
RNU (CFU/g)		1,3x10 ⁶	1,5x10 ⁴	3,7x10 ⁴

4.1.2. Faze u tretmanu isplačne jame, priprema i karakterizacija bioremedijacionog supstrata

Nakon određivanja osnovnih fizičko-hemijskih parametara na lokaciji, pristupilo se tretmanu isplačne jame koji se sastojao iz četiri faze:

Faza 1 – Prvi i drugi sloj u isplačnoj jami su nakon odvajanja transportovani kamionima (cisternama) do najbliže NIS stanice za skladištenje radi daljih koraka obrade i upotrebe;

Faza 2 – Rastresit sediment je stabilizovan upotrebom fosfatnih soli alkalnih i zemnoalkalnih metala i mešan sa zemljištem sa ruba isplačne jame;

Faza 3 – Umešan rastresiti sediment sa zemljištem sa ruba isplačne jame je obogaćen prirodnim izvorima organskog ugljenika, azota i fosfora korišćenjem stajskog đubriva;

Faza 4 – Proces *in situ* bioremedijacije.

U drugoj fazi tretmana isplačne jame pripremljen je bioremedijacioni supstrat (BRS) mešanjem zemljišta sa ruba isplačne jame i rastresitog sedimenta. Bioremedijacioni supstrat je okarakterisan, a vrednosti date u tabeli 4.2. se odnose na BRS pre početka procesa bioremedijacije, pre procesa mešanja, vlaženja, biostimulacije i dodatka konzorcijuma mikroorganizama.

Finalna zapremina bioremedijacionog supstrata je iznosila oko 1200 m³, a ukupna količina naftnih ugljovodonika u njemu pre procesa bioremedijacije 32,2 g/kg. Pripreme za proces bioremedijacije supstrata su započele trećom fazom tretmana isplačne jame. Optimalni odnos C:N:P:K (100:10:1:0,1) je postignut prskanjem BRS-a rastvorom amonijum-nitrata, diamonijum-fosfata i kalijum-hlorida upotrebom poljoprivredne prskalice na traktoru. Prskanje je omogućilo adekvatnu vlagu bioremedijacionog supstrata (50–60% retencionog vodnog kapaciteta).

Tabela 4.2. Određivanje fizičko-hemijskih parametara bioremedijacionog supstrata pre početka procesa bioremedijacije

Parametri	Bioremedijacioni supstrat
Totalna zapremina (m ³)	1200
Vlaga (%)	16
Pepeo (%)	13,5
RVK (%)	76
TPH (g/kg s.s.)	32,2
Ukupni azot (%)	0,45
Dostupni fosfor (mg/kg)	96
Dostupni kalijum (mg/kg)	183

Tokom bioremedijacije (faza 4 tretmana isplačne jame) bioremedijacioni supstrat je vlažen, okretan i mešan svakih 15 dana u cilju obezbeđenja adekvatnih nivoa vlage i aeracije. Konzorcijum je pripreman po ranije opisanoj proceduri, a reinokulacija je rađena na svakih 30 dana korišćenjem prskalice na traktoru. U BRS je dodat i originalni rastvor BioSolve CLEAR, 70 mL/m³.

4.1.3. Karakterizacija kompozitnih uzoraka tokom procesa bioremedijacije

Tokom izvođenja postupka bioremedijacije, analizirani su kompozitni uzorci u cilju utvrđivanja toka i uspešnosti upotrebljenog postupka. Kompozitni uzorci uzorkovani tokom procesa bioremedijacije – na početku (KU0), nakon 60 dana (KU60), nakon 120 dana (KU120) i na kraju bioremedijacije (KU180) ispitivani su fizičko-hemijski, a rezultati su prikazani u tabeli 4.3. Vrednosti

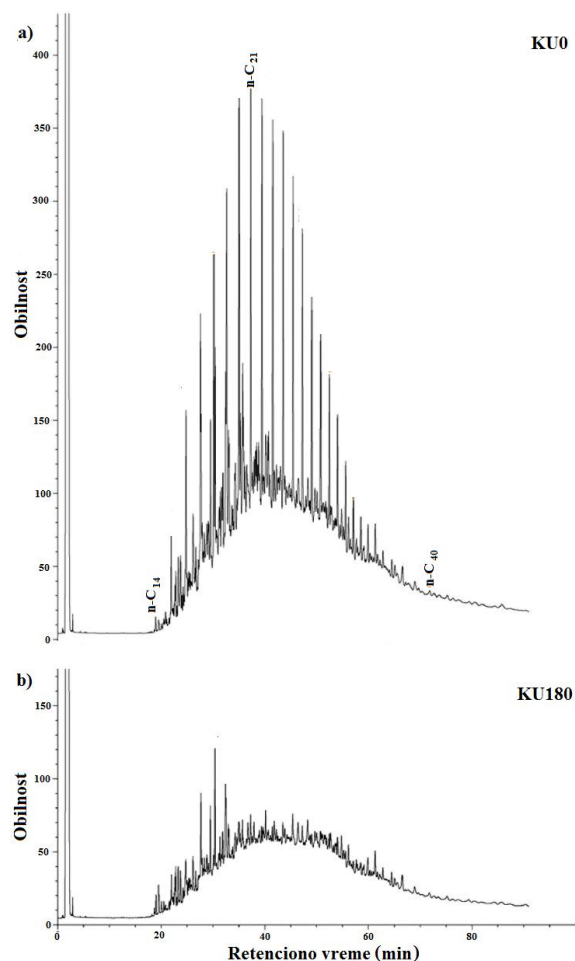
za kompozitni uzorak KU0 su date nakon mešanja, vlaženja biostimulacije i dodatka konzorcijuma mikroorganizama. Kompozitni uzorak u datom vremenu je uzet "cik-cak" metodom pomoću uzorkivača zemljišta Eijkelkamp sa dvadeset nasumičnih mesta, homogenizovan i prosejan (sito 2 mm). Uzorci su transportovani i čuvani u staklenim bocama na +4 °C (ISO 10381-1:2002, Paetz, Wilke 2005).

Tabela 4.3. Fizičko-hemijski parametri kompozitnih uzoraka

Parametri	Oznaka uzorka			
	KU0	KU60	KU120	KU180
Trajanje bioremedijacije (dani)	0	60	120	180
Vlaga (%)	22,5	23,9	20,6	19,6
Pepeo (%)	15,5	15,2	14,2	13,5
RVK (%)	74	73	75	76
TPH (g/kg)	32,2	17,5	8,3	1,5

U nultom danu količina ukupnih ugljovodonika je iznosila 32,2 g/kg. Nakon primene konzorcijuma mikroorganizama, hranljivih supstanci i aeracije tokom trajanja procesa bioremedijacije, degradovano je 45,6% (60. dan), 74,2% (120. dan) i 95,3% (180. dan) od ukupne količine TPH. Mikrobnii konzorcijum je na kraju bioremedijacije smanjio ukupan sadržaj ugljovodonika na 1,5 g/kg, što je po standardima Republike Srbije ispod maksimalnog dozvoljenog nivoa naftnih ugljovodonika u suvom zemljištu (5 g/kg). Ova vrednost je posledica delovanja više specifičnih mikrobnih vrsta koje imaju sklonost ka specifičnim supstratima (Naap et al, 2021). Na degradaciju kontaminanta je pozitivno uticao i dodatak hranljivih supstanci. Do istog zaključka došli su i Feng i saradnici, čiji su rezultati pokazali da je dodatkom hranljivih supstanci razgradnja porasla za 6,3% (Feng et al, 2021).

Na slici 4.1. su prikazani gasni hromatogrami kompozitnog uzorka na početku bioremedijacije (a) i kompozitnog uzorka na kraju bioremedijacije (b) koji jasno ukazuju da je došlo do smanjenja nivoa TPH.



Slika 4.1. Gasni hromatogrami kompozitnih uzoraka KU0 (a) i KU180 (b) (Avdalović et al, 2016).

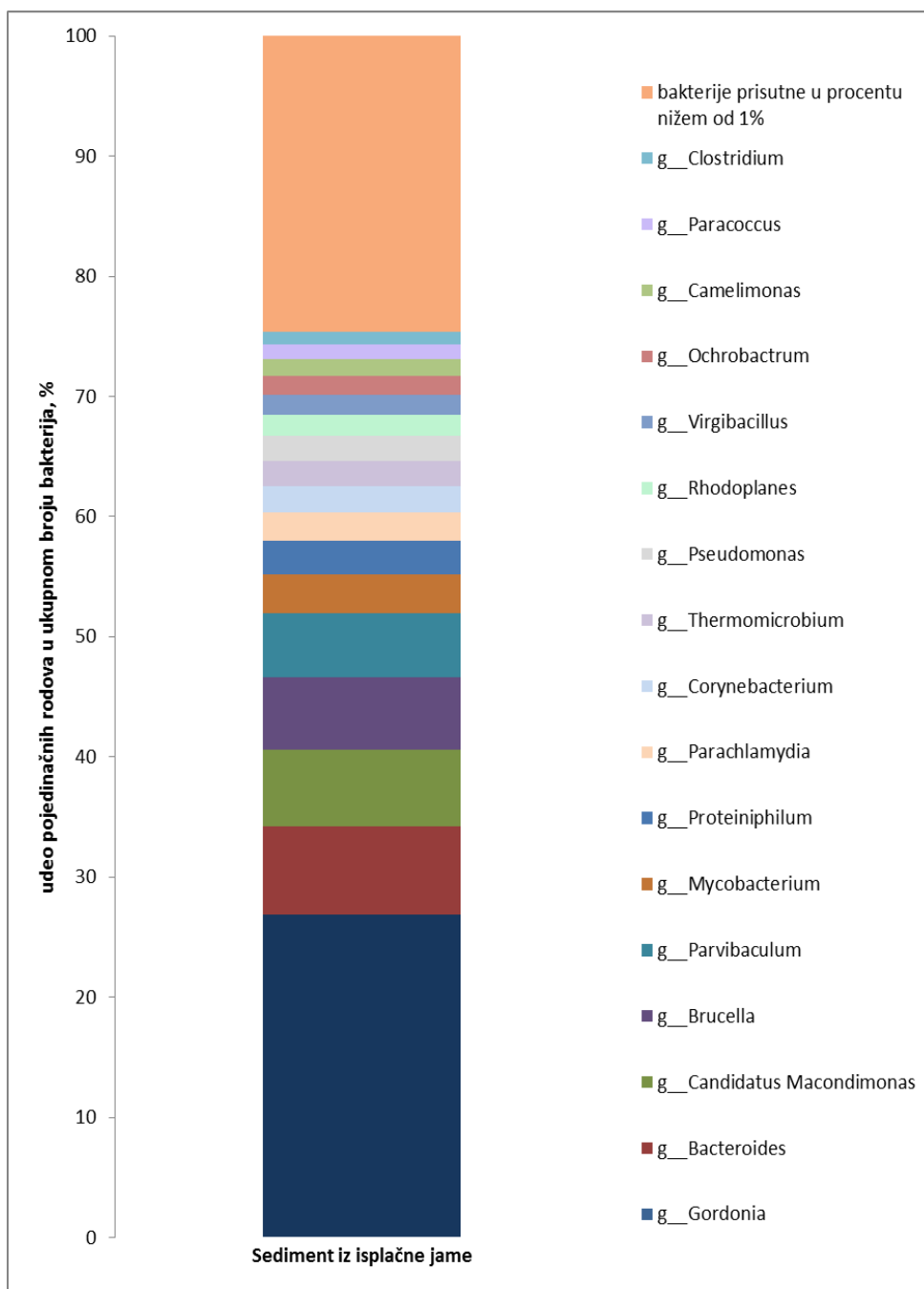
4.1.3.1. Mikrobiološke karakteristike kompozitnih uzoraka

Tokom procesa bioremedijacije određivan je i broj mikroorganizama u ispitivanim reprezentativnim uzorcima. Promena broja mikroorganizama razgrađivača ugljovodonika je od velikog značaja za praćenje uspešnosti procesa bioremedijacije, a rezultati su prikazani u tabeli 4.4. Tokom procesa bioremedijacije, do 120. dana, udeo mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike raste u ukupnom broju bakterija, do 61%. U 120. danu broj RNU je čak 50 puta veći nego u nultom danu. Ranije studije ističu da bioraznolikost kontaminiranog zemljišta opada sa povećanjem populacije mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike, kao posledica toksičnog efekta zagađujućih supstanci (Beškoski et al, 2011, Katsivela et al, 2005). Na kraju procesa bioremedijacije ovi mikroorganizmi čine 23% od ukupnog broja bakterija. Broj mikroorganizama koji razgrađuju naftu je tokom procesa iznosio: $8,8 \times 10^4$ (KU0), $4,2 \times 10^6$ (KU60), $4,7 \times 10^6$ (KU120) i $8,2 \times 10^5$ (KU180) CFU/g. Varjani i Upasani su došli do sličnih rezultata, pri čemu je u eksperimentu bioaugmentacije broj mikroorganizama koji razgrađuju naftu rastao sa $4,95 \times 10^7$ na $1,07 \times 10^8$ CFU/g, a nakon određenog momenta počeo da se smanjuje (Varjani, Upasani 2021).

Tabela 4.4. Ukupan broj bakterija i mikroorganizama razgrađivača ugljovodonika, udeo RNU u HAB-u

Parametri	Oznaka uzorka			
	KU0	KU60	KU120	KU180
Trajanje bioremedijacije (dani)	0	60	120	180
HAB (CFU/g)	$1,1 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
RNU (CFU/g)	$8,8 \times 10^4$	$4,2 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$
Udeo RNU u HAB-u (%)	8	56	61	23

Prednost metagenomske analize je njena mogućnost da detektuje vrste koje nisu kulturabilne u laboratorijskim uslovima. Shodno tome, metagenomska analiza uzorka na početku bioremedijacije (slika 4.2.) je pokazala da su prisutni mikroorganizmi bili rodova *Gordonia* (26,9%), *Bacteroides* (7,3%), *Candidatus Macondimonas* (6,4%), *Brucella* (6,1%), *Parvibaculum* (5,3%), *Mycobacterium* (3,2%), *Proteiniphilum* (2,8%), *Parachlamydia* (2,4%), *Corynebacterium* (2,2%), *Termomicrobium* (2,1%), *Pseudomonas* (2,1%), *Rhodoplanes* (1,7%), *Virgibacillus* (1,7%), *Ochrobactrum* (1,5%), *Camelimonas* (1,4%), *Paracoccus* (1,2%), *Clostridium* (1,1%). Mikroorganizmi prisutni manje od 1 % u uzorku predstavljaju 24,6% od ukupnog broja bakterija. Iako su Devi, Du i Muthukumar u svojim odvojenim studijama (Devi et al, 2022, Du et al, 2022, Muthukumar et al, 2022) došli do zaključka da mikroorganizmi u zemljištu kontaminiranom naftom dominantno pripadaju tipu *Proteobacteria* rezultat dobijen metagenomskom analizom uzorka na početku bioremedijacije isplačne jame je pokazivao malo drugačiji odnos tipova. Mikroorganizmi u ovom uzorku pripadaju sledećim tipovima pobrojanim po zastupljenosti: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chlamydiae* i *Chloroflexi*. *Gordonia*, rod koji je u najvećem procentu prisutan u mikrobnjoj zajednici pripada tipu i klasi *Actinobacteria*, a od ranije je poznato da mikroorganizmi ove klase sa visokom efikasnošću razgrađuju ugljovodonike (Rathore et al, 2021). Vrste unutar roda *Gordonia* mogu degradovati različite supstrate: *Gordonia* može upotrebljavati ftalate za rast (Jin et al, 2016) i degradovati ih u visokom procentu (Kanaujiya et al, 2022), a *Gordonia rubripertincta* CWB2 može razgraditi stiren (Heine et al, 2018). Ranije je pokazano da *G. amicalis* DSM 44461T može transformisati dibenzotiofen (Delegan et al, 2021), a *Gordonia* sp. i37 degradovati izopren (Johnston et al, 2017). Pored roda *Gordonia*, prisutne su bile i vrste roda *Mycobacterium* i *Corynebacterium* koje takođe spadaju u klasu *Actinobacteria*.



Slika 4.2. Metagenomska analiza uzorka na početku procesa bioremedijacije isplačne jame.

4.1.3.2. Poređenje kompozitnog uzorka na kraju bioremedijacije i nekontaminiranog zemljišta

Uzorku na kraju bioremedijacionog procesa je određivana pH vrednost, sadržaj kalcijum-karbonata, sadržaj huminskih kiselina, ukupnog ugljenika, azota, sumpora, odnos azota i sumpora, dostupni fosfor u obliku fosfor-pentoksida i kalijum u obliku kalijum-oksida. Pored toga, izvršena je analiza mikroelemenata i teških metala. Uz kontaminiranu haldu analiziran je i uzorak nekontaminiranog zemljišta u blizini isplačne jame radi međusobnog poređenja. U tabelama 4.5. i 4.6. su prikazani dobijeni rezultati.

Tabela 4.5. Poređenje hemijskih parametara u uzorku nakon procesa bioremedijacije i nekontaminiranog zemljišta

Uzorak	pH		CaCO ₃ (%)	HK (%)	C (%)	N (%)	C/N	S (%)	Dostupni P ₂ O ₅ (mg/100 g)	Dostupni K ₂ O(mg/100 g)
	u KCl	u H ₂ O								
BRS (KU180)	7,88	8,17	25,7	2,71	4,99	0,22	22,8	0,37	30,3	57
Nekontaminirano zemljište	7,68	8,6	12,2	3,14	3,77	0,22	16,8	0,09	19,2	20,9

Tabela 4.6. Sadržaj mikroelemenata i teških metala u uzorku nakon bioremedijacije i nekontaminiranom zemljištu

Uzorak	Cu	Zn	Pb	Ni	Cr	As
BRS (KU180)	13	49,1	10	22,1	26	4,76
Nekontaminirano zemljište	15,4	55,6	15,3	26,6	32,9	6,76
MDK	100	300	100	50	100	25

MDK - maksimalna dozvoljena koncentracija (Službeni glasnik Srbije, 23/1994)

Uzorak na kraju procesa bioremedijacije se na osnovu rezultata analiza hemijskih parametara može svrstati u klasu slabo-alkalnih, jako-karbonatnih, umereno-humoznih zemljišta. Određeno je da je BRS bogat u ukupnom azotu, sa u proseku visokim i vrlo visokim do štetnim sadržajem lako dostupnog fosfora odnosno kalijuma (Manojlović, Čabilovski 2020). Analiza sadržaja mikroelemenata i teških metala u BRS prikazuje da dobijene vrednosti ne prelaze količine dozvoljene za poljoprivredno zemljište u Srbiji (Službeni glasnik Srbije, 23/1994). Na osnovu svih rezultata ispitivanja može se zaključiti da je zemljište na kraju bioremedijacije nezagađeno, odnosno da je bioremedijacioni postupak izveden sa uspehom.

4.2. Nastanak huminskih kiselina tokom *ex situ* bioremedijacije na pilot nivou – dodata vrednost mikrobne aktivnosti

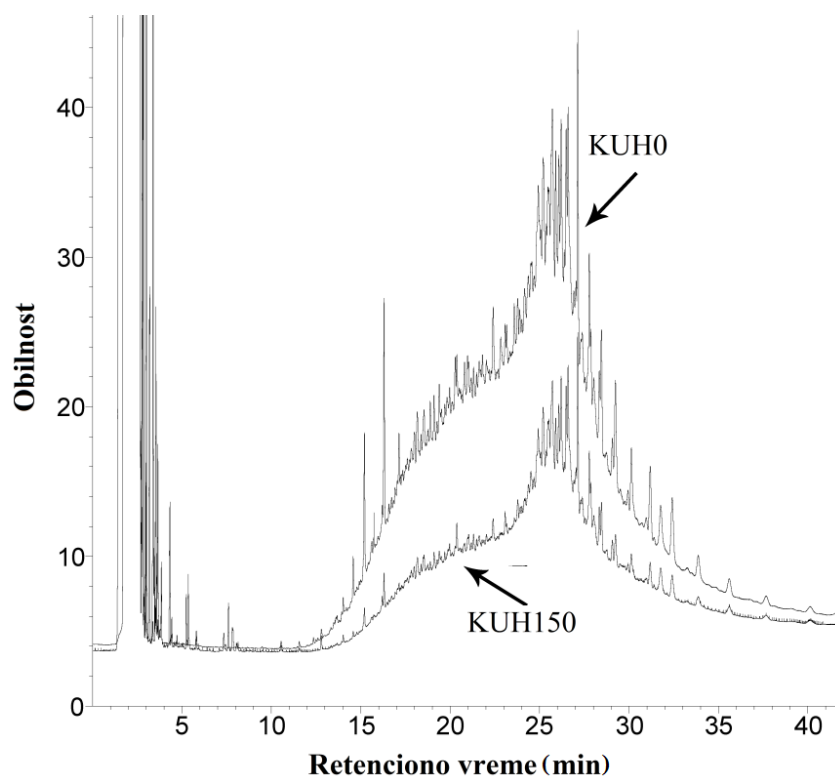
Nakon studije potencijala konzorcijuma mikroorganizama degradera ugljovodonika u procesima biodegradacije naftnog kontaminanta prisutnog u isplačnim jamama, degradaciona sposobnost konzorcijuma izolovanog iz kontaminiranog zemljišta je proučavana u *ex situ* postupku bioremedijacije zemljišta. Paralelno sa praćenjem parametara u toku postupka bioremedijacije ispitivana je i hipoteza o postojanju paralelnog procesa humifikacije. Halda za *ex situ* bioremedijaciju se sastojala iz 150 m³ zemljišta kontaminiranog naftom i rafinerijskim proizvodima prerade nafte, a kontrolna halda (5 m³) iz nekontaminiranog zemljišta uzorkovanog u blizini prve halde. Odnos dužine, širine i dubine obe "gomile" je iznosio 3,75:1:0,02, redom. U obe halde je dodata piljevina kao alternativni izvor ugljenika, ali i u cilju povećanja aeracije i retencionog vodnog kapaciteta. BioSolve®CLEAR je korišćen za povećanje kontaktne površine između mikroorganizama i lipofilnih polutanata u cilju veće rastvorljivosti naftnih ugljovodonika u vodi. Đubrivo sa farme živine je upotrebjeno kao izvor azota i fosfora za biostimulaciju. Obogaćeni konzorcijum mikroorganizama koji razgrađuju naftne ugljovodonike je dodavan svake dve nedelje na obe halde. Pilot bioremedijaciona studija je trajala 150 dana.

4.2.1. Karakterizacija kompozitnih uzoraka

20 uzoraka sa halde je uzorkovano, mešano i homogenizovano u cilju nastanka jednog kompozitnog uzorka (KUH - kompozitni uzorak halda). 4 kompozitna uzorka su uzorkovana i analizirana – na početku bioremedijacije (KUH0), nakon 60 dana (KUH60), 120 dana (KUH120) i na kraju bioremedijacionog procesa, posle 150 dana (KUH150). Kontrolni uzorci su uzeti u isto vreme i na isti način sa kontrolne halde.

4.2.1.1. Sadržaj naftnih ugljovodonika

Gravimetrijska analiza je pokazala da je početni nivo naftnih ugljovodonika na kontaminiranoj haldi sa koje je uzet kompozitni uzorak KUH0 iznosio 21,6 g/kg s.s. Na kraju studije bioremedijacije na kontaminiranoj haldi količina TPH je bila smanjena za 86,6% (koncentracija TPH u uzorku KUH150 je iznosila 2,89 g/kg s.s.). Značajno smanjenje koncentracije organskih zagađujućih supstanci u uzorcima ukazuje na uspešnost bioremedijacije. Na kontrolnoj haldi, TPH se smanjio za 5,55% (od 0,36 do 0,34 g/kg s.s.). Na slici 4.3. prikazani su gasni hromatogrami kompozitnih uzoraka uzetih sa kontaminirane halde na početku i kraju bioremedijacije čiji su rezultati u skladu sa rezultatima gravimetrijske analize.



Slika 4.3. Gasni hromatogrami kompozitnih uzoraka uzetih sa kontaminirane halde u nultom i 150. danu bioremedijacije (Žerađanin et al, 2020).

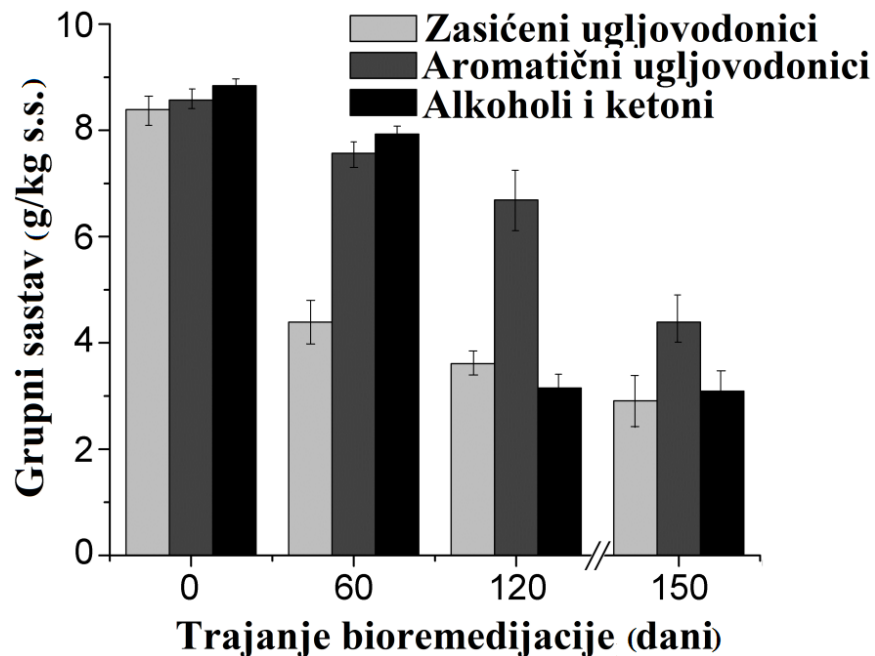
4.2.1.2. Grupni sastav

U cilju određivanja sastava organske supstance u kompozitnim uzorcima uzetim sa kontaminirane halde urađeno je frakciono razdvajanje na koloni. Ekstrahovane su tri frakcije, zasićeni ugljovodonici, aromatični ugljovodonici i alkoholna-keto frakcija, dok masne kiseline nisu izolovane. Rezultati su prikazani na slici 4.4.

Koncentracija alifatičnih ugljovodonika opada tokom procesa bioremedijacije sa 8,39 na 2,91 g/kg s.s. Ova frakcija najviše podleže degradaciji (65,3%) što je u skladu sa literaturom (Volkman et al, 1983). Koncentracija aromatične frakcije je smanjena sa 8,57 na 4,39 g/kg s.s. Pretpostavka je da je do smanjenja (za 48,8%) došlo usled sposobnosti mikroorganizama da koriste ugljovodonike kao izvor ugljenika i energije ili da koristeći aromatičnu frakciju oni proizvode polimerne supstance slične huminskim (Henner et al, 1997, Jednak et al, 2017, Ressler et al, 1999, Sánchez-Monedero et al, 1999). I u radu Wei i saradnika konzorcijum mikroorganizama je procentualno više degradovao zasićene ugljovodonike od aromatične frakcije (količina je smanjena za 89,93% i 82,08%, redom) (Wei et al, 2021). Frakcija alkohola i ketona se smanjila za 65% (sa 8,84 na 3,09 g/kg s.s.).

Iz dobijenih vrednosti je određivana brzina razgradnje ugljovodonika. Brzina degradacije je od početka do kraja procesa bioremedijacije (KUH0-KUH150) iznosila 36,5 mg/kg/dan za alifatične, 27,9 za aromatične ugljovodonike i 38,3 za alkohole i ketone. Poređenja radi, konzorcijum mikroorganizama koji su upotreбили Beškoski i saradnici degraduje alifatičnu frakciju brzinom od 23,7, a aromatičnu 5,7 mg/kg/dan (Beškoski et al, 2010). Dobijeni rezultati ukazuju da mikroorganizmi

konzorcijuma koji je upotrebljen u disertaciji koriste sva ugljovodonična jedinjenja koja se nalaze u organskoj frakciji ekstrahovanoj iz kompozitnih uzoraka uzetih sa kontaminirane halde i veoma efikasno doprinose procesu čišćenja životne sredine.



Slika 4.4. Frakcije ugljovodonika zastupljene u kompozitnim uzorcima tokom trajanja procesa bioremedijacije (Žerađanin et al, 2020).

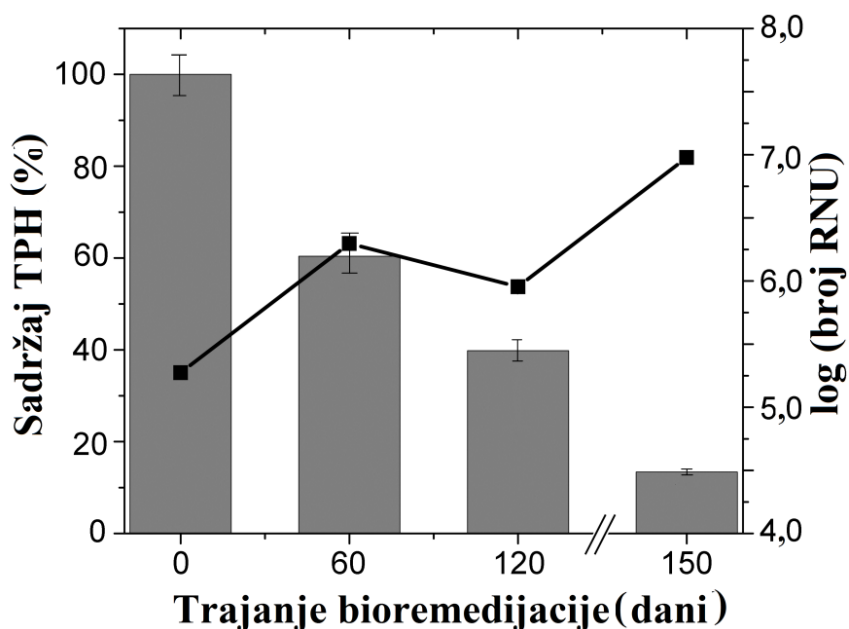
4.2.1.3. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama

Kao što je i ranije istaknuto, određivanje broja mikroorganizama tokom postupka bioremedijacije je od izuzetnog značaja. Nakon početne inokulacije kontaminirane halde formirala se stabilna zajednica mikroorganizama: HAB $1,05 \times 10^6$, RNU $1,88 \times 10^5$ i KP 2×10^3 CFU/g. Na kraju bioremedijacije (KUH150) mikroorganizmi koji razgrađuju naftne ugljovodonike su predstavljali dominantnu mikrobnu populaciju sa udelom od 79,2% u ukupnom broju mikroorganizama (tabela 4.7.). Potvrđeno je prisustvo rodova *Nocardia*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, a pomenuti rodovi sa visokom efikasnošću razgrađuju naftne ugljovodonike (Adeleye et al, 2018, Habib et al, 2018, Varjani, Upasani 2021).

Tabela 4.7. Promene u broju mikroorganizama i sastavu mikrobne zajednice u toku procesa bioremedijacije

Trajanje bioremedijacije (dan)	HAB (CFU/g)	RNU (CFU/g)	RNU u HAB (%)	KP (CFU/g)
0	$1,05 \times 10^6$	$1,88 \times 10^5$	17,9	2×10^3
60	$1,22 \times 10^7$	$1,98 \times 10^6$	16,2	$1,52 \times 10^3$
120	$9,88 \times 10^6$	9×10^5	9,1	9×10^2
150	$1,2 \times 10^7$	$9,5 \times 10^6$	79,2	$6,53 \times 10^2$

Promene u sadržaju naftnih ugljovodonika i broju mikroorganizama koji razgrađuju naftne ugljovodonike tokom procesa bioremedijacije prikazane su na slici 4.5. Na slici je još jednom istaknut izrazit pad količine ugljovodonika u kompozitnim uzorcima i korelacija procesa bioremedijacije sa mikroorganizmima koji razgrađuju ugljovodonike.



Slika 4.5. Promene u sadržaju TPH i broju mikroorganizama koji razgrađuju naftne ugljovodonike u kompozitnim uzorcima od nultog do 150. dana procesa bioremedijacije (Žerađanin et al, 2020).

4.2.1.4. Sadržaj i karakterizacija huminskih kiselina

Paralelno sa praćenjem postupka bioremedijacije i utvrđivanjem parametara koji ga definišu, u ovoj studiji je određivan i sadržaj huminskih kiselina u kompozitnim uzorcima. Sadržaj huminskih kiselina na početku bioremedijacije na kontaminiranoj haldi je iznosio 2,16%, a na kraju 2,94%. Procenat se povećao za 26,5%, što ukazuje da se sa procesom bioremedijacije paralelno odvijao proces humifikacije. Nastale huminske kiseline su od izuzetnog značaja za kvalitet zemljišta i mikroorganizme u njemu (Henner et al, 1997, Lipczynska-Kochany 2018). Stopa humifikacije je iznosila od 0 do 60. dana 38,3, 60-120 dana 55,0, 120-150 dana 73,3 mg/kg po danu. U kontrolnoj haldi sadržaj huminskih kiselina se povećao za 2,8%.

Pored određivanja sadržaja huminskih kiselina tokom procesa bioremedijacije, urađena je i njihova karakterizacija, određivan je elementarni sastav, H/C, O/C i E4/E6 odnosi (tabela 4.8.) i snimljeni FT-IR spektri.

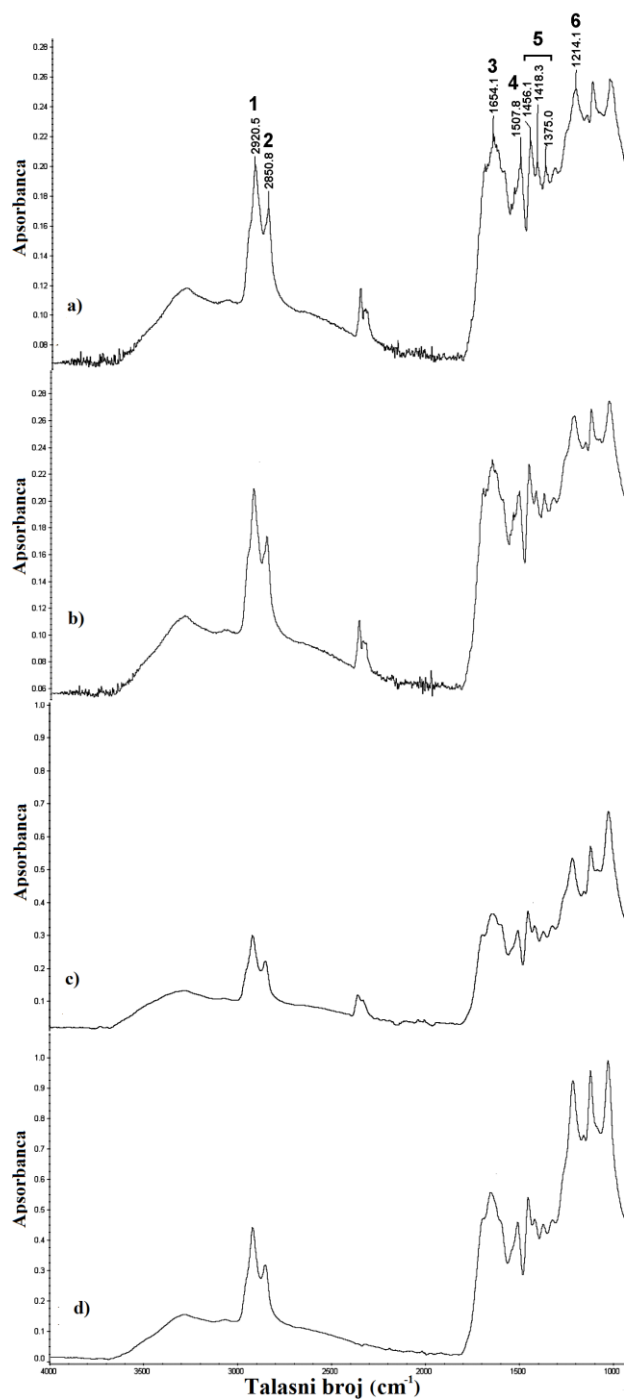
Rezultati mikroanalize za ekstrahovane huminske kiseline na početku procesa bioremedijacije sa kontaminirane halde su pokazali da su sadržaj ugljenika i H/C odnos viši nego u huminskim kiselinama na kraju bioremedijacije. Ovi rezultati ukazuju da je tokom bioremedijacije došlo do povećanja sadržaja aromatičnih struktura u huminskim kiselinama. Tokom bioremedijacije, sadržaj kiseonika je porastao sa 23,23 na 27,97%, a preračunati O/C odnos sa 0,28 na 0,35%. E4/E6 odnos je

povećan sa 2,25 na 3,91. Svi parametri ukazuju da su huminske kiseline na kraju procesa bioremedijacije bogatije kiseoničnim funkcionalnim grupama (Amir et al, 2010, García et al, 1992, Jednak et al, 2017, Pajaczkowska et al, 2003, Yang et al, 2014, Yang et al, 2015). Literaturne vrednosti su prikazane u tabeli 4.8, a vrednosti dobijene u disertaciji pokazuju razlike u odnosu na literaturne usled raznolikosti u strukturi huminskih kiselina.

Tabela 4.8. Sadržaj huminskih kiselina u kompozitnim uzorcima tokom procesa bioremedijacije, rezultati EOMA, H/C, O/C i E4/E6 odnosi

Trajanje bioremedijacije (dan)	Sadržaj izolovanih HK(%)	Elementarni sastav izolovanih HK(%)					Odnos atomskih masa		E4/E6 Odnos	
		C	H	N	S	O	H/C odnos	O/C odnos		
0	2,16	63,11	8,76	3,4	1,5	23,23	1,67	0,28	2,25	
60	2,39	61,85	8,48	3,56	1,6	24,51	1,65	0,3	2,35	
120	2,72	60,74	8,19	3,23	1,36	26,48	1,62	0,33	2,48	
150	2,94	59,8	7,54	3,33	1,36	27,97	1,51	0,35	3,91	
Literaturne vrednosti									Dužina tretmana	
Jednak <i>et al</i> , 2017						26,25-28,93	1,56-1,69	0,32-0,37	1,97-2,3	90 dana bioremedijacije
Amir <i>et al</i> , 2010		47,5-48,9	6,55-6,9	6,8-7,3	0,7-1,2	36,2-37,6	1,66-1,73			135 dana kompostiranja
Yang <i>et al</i> , 2014		44,66-58,46	5,31-8,01	4,26-6,66	1,07-1,22	26,33-38,29	1,36-1,77	0,34-0,64		Termalni tretman, 30min

FT-IR spektri izolovanih huminskih kiselina sadrže sledeće signale (Slika 4.6.a-d): u oblasti 1600-1660 cm^{-1} koji potiču od aromatičnih C=C i C=O u karboksilnim jedinjenjima, ketonima, hinonima i amidima (I), na 1508 cm^{-1} poreklom od aromatičnih C=C i amida (II), između 1460 i 1370 cm^{-1} koji odgovaraju OH grupama u fenolima, COO⁻ i amidima (II), između 1260 i 1200 cm^{-1} koji potiču od aromatičnih etara C-O-C i amida (III). Amir i saradnici su za huminske kiseline opisali signale na sličnim hemijskim pomeranjima (Amir et al, 2010).



Slika 4.6. FT-IR spektri izolovanih huminskih kiselina iz kompozitnih uzoraka sa halde: 0. dana (**a**), 60. dana (**b**), 120. dana (**c**) i 150. dana (**d**). U FT-IR spektrima su prisutni signali poreklom iz asimetričnih alifatičnih ugljenika iz CH₂ grupa (**1**), simetričnih alifatičnih ugljenika iz CH₂ grupa (**2**), aromatičnih C=C i C=O u karboksilnim jedinjenjima, ketona, hinona i amida (I) (**3**), aromatičnih C=C i amida (II) (**4**), OH grupa u fenolima, COO⁻ i amida (II) (**5**), aromatičnih etara C–O–C i amida (III) (**6**) (Žerađanin et al, 2020).

Na osnovu intenziteta pikova u infracrvenim spektrima zapažena je promena u huminskim kiselinama izolovanim sa kontaminirane halde tokom procesa bioremedijacije. Promene su praćene poređenjem intenziteta pikova (tabela 4.9.) na 1654,1/2920,5 i 1654,1/2850,8 što predstavlja odnos aromatičnih i alifatičnih ugljenika. Porast ovog odnosa indikuje da izolovane huminske kiseline sadrže više aromatičnih struktura na kraju procesa bioremedijacije nego na početku što je potvrđeno i rezultatima dobijenim mikroanalizom. Ovaj porast aromatičnosti može biti posledica transformacije alifatičnih u aromatične strukture posredstvom mikroorganizama (Amir et al, 2010, Castaldi et al, 2005, Haouas et al, 2021, Jednak et al, 2017).

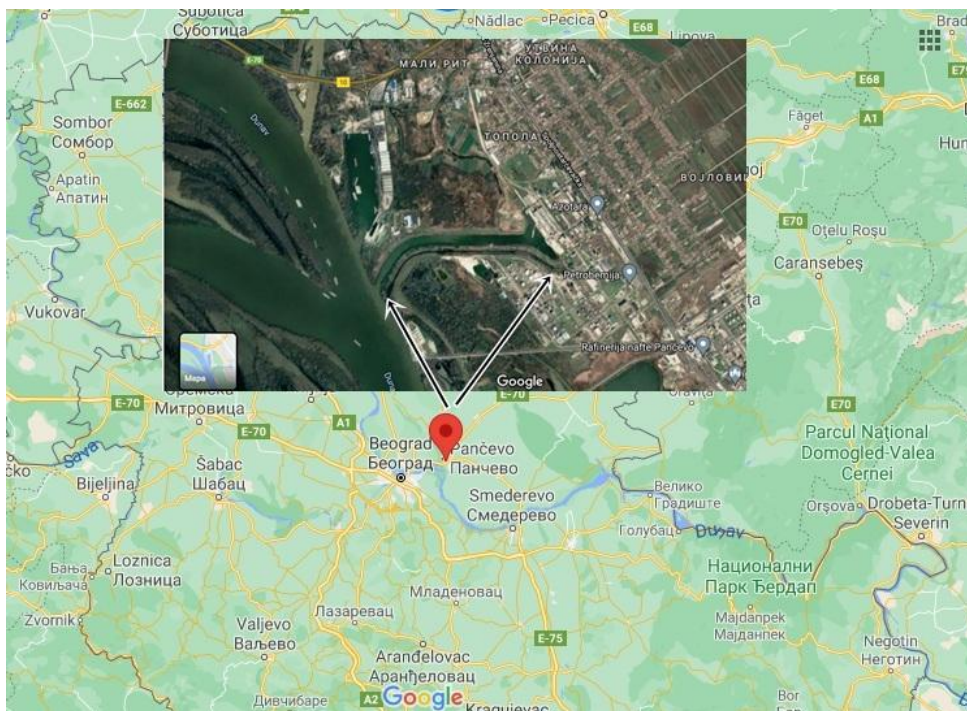
Tabela 4.9. Intenzitet pikova u FT-IR spektrima u toku procesa bioremedijacije kontaminirane halde

Odnos intenziteta pikova na 2920,5, 2850,8 i 1654,1 cm ⁻¹	Trajanje bioremedijacije			
	0	60	120	150
1654,1/2920,5	1,1	1,1	1,17	1,3
1654,1/2850,8	1,31	1,36	1,56	1,7

4.3. Izolovanje i karakterizacija mikroorganizma producenta egzopolisaharida

Mikroorganizmi izolovani iz naftom zagađenog zemljišta, sedimenta i vode pored toga što proizvode set enzima uključen u degradaciju zagađujućih supstanci, poseduju i druge enzime odgovorne za nastanak različitih proizvoda. Ekstremofilni mikroorganizmi produkuju ove proizvode kao odgovor na stresne uslove životne sredine i na taj način opstaju u njoj, a neki od proizvoda mogu pomoći mikroorganizmima da lakše razgrade polutante. Veliki broj mikrobnih proizvoda ima industrijsku primenu, a kako bi se procesi proizvodnje unapredili neophodno je istraživanja usmeriti na otkriće novih sojeva sa velikim proizvodnim potencijalom. U okviru ove doktorske teze ispitivana je sposobnost bakterije CH-KOV3, izolovane iz kanala otpadnih voda Pančevo, da proizvodi egzopolisaharide, optimizovani su uslovi produkcije, a izolovani egzopolisaharid je okarakterisan hemijskim i strukturno-instrumentalnim tehnikama i metodama.

Kanal otpadnih voda (KOV) Pančevo je izgrađen 1962. godine, dugačak je 2000 m, širok 70 m, a dubok 1-2 m. On predstavlja kolektorski kanal otpadnih voda industrijske zone u Pančevu, a uliva se u reku Dunav. Industrijski kompleks se sastoji iz fabrike hemijskih đubriva (HIP Azotara), petrohemijske fabrike (HIP Petrohemija) i rafinerije nafte (NIS Rafinerija). HIP Azotara je proizvodila amonijak, azotnu kiselinu, ureu, kalcijum-amonijum-nitratna đubriva, kao i azotna, fosforna i kalijumova đubriva. HIP Petrohemija je proizvodila etilen-dihlorid koji služi za sintezu vinil-hlorid monomera koji dalje polimerizuje, a NIS Rafinerija proizvode na bazi nafte. Ovaj industrijski kompleks je 1999. godine bio jedna od meta NATO bombardovanja, a njegovo razaranje je doprinelo kako zagađenju vazduha, zemljišta, podzemnih voda, tako i zagađenju kanala organskim i neorganskim jedinjenjima (Gopal, Deller 2002, IMET 2006). Početna istraživanja nakon NATO agresije su pokazala da voda u kanalu nije zagađena, ali da je suprotno tome sediment klasifikovan kao opasni otpad kategorije H-11 zbog visokog sadržaja mineralnog ulja, žive, PAH-ova, BTEX-a i 1,2-dihloreтана (UNEP/UNCHS 1999, Beškoski et al, 2013). Međutim, Čučak i saradnici su u svojoj studiji eksperimentalno rađenoj 2014. godine analizirali prisustvo žive, PAH-ova i polihlorovanih bifenila (*polychlorinated biphenyl, PCB, eng.*) u sedimentu i zaključili da su koncentracije pomenutih polutanata niže u odnosu na prethodne studije uz pretpostavku da je do smanjenja došlo kao posledica prirodne atenuacije. Koncentracija žive (0,4-7,4 mg/kg s.s.) je iste godine prelazila dozvoljene granične vrednosti u odnosu na standarne metode (granična vrednost žive je po DUTCH standardu iznosila 0,3 mg/kg s.s.). Isti autori su zaključili da je ukupna količina PAH-ova (117,46-462,59 µg/kg s.s.) ispod granične vrednosti po DUTCH standardu (1 mg/kg s.s.), kao i koncentracija PCB-a (13,3 do 21 µg/kg s.s., DUTCH standard 20 µg/kg s.s.) (Čučak et al, 2017). Iako perfluorovana jedinjenja nisu proizvod ovog industrijskog kompleksa, Beškoski i saradnici su ih pronašli u sedimentu u koncentraciji od 6,3 ng/g s.s., od kojih koncentracija perfluorooktan-sulfonata iznosi 5,7 ng/g suve mase. Kanal je ranije smatran jednom od glavnih crnih tačaka po zagađenosti u Srbiji, odakle su polutanti Dunavom stizali do Hidroelektrane "Đerdap" i dalje do Crnog mora i time doprinosili globalnom zagađenju (Beškoski et al, 2013). Na slici 4.7. je prikazana lokacija KOV-a.

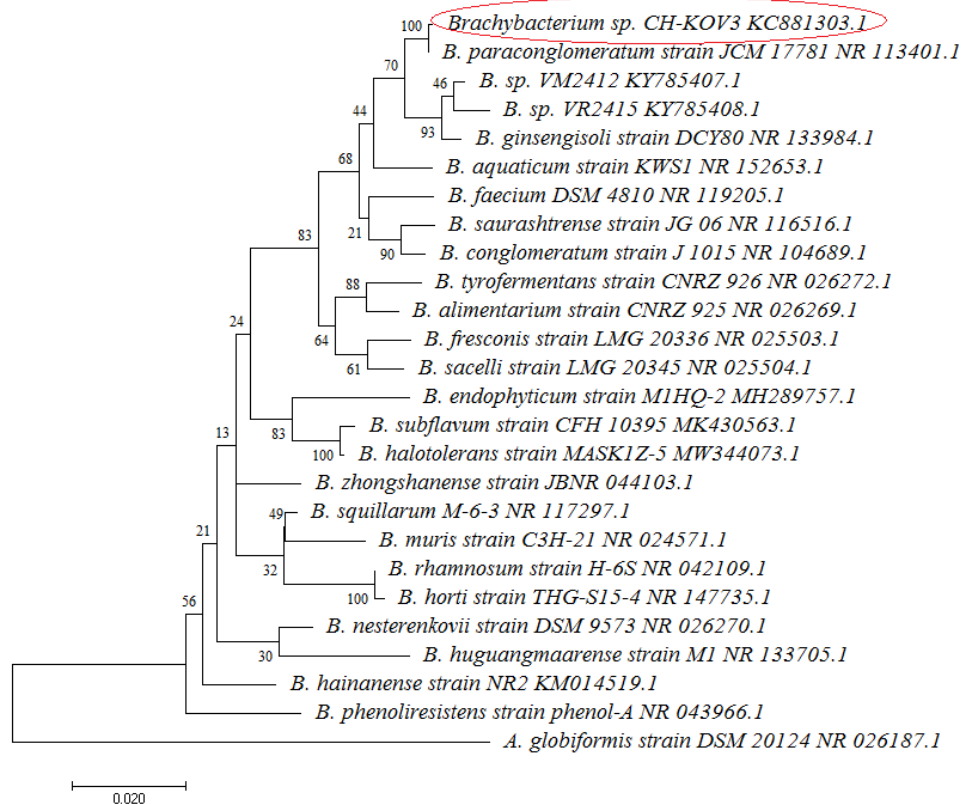


Slika 4.7. Grad Pančevo i kanal otpadnih voda (satelitska mapa, Google Maps).

4.3.1. Molekularna karakterizacija

Parcijalna sekvenca 16S RNK gena bakterije CH-KOV3 je deponovana u bazu podataka NCBI, deo GenBank pod pristupnim brojem KC881303.1. Poređenje sa sekvencama deponovanim u bazi podataka potvrđuje da je izolovani mikroorganizam roda *Brachybacterium*. Rod *Brachybacterium* pripada familiji *Dermabacteraceae*, klasi *Actinobacteria* (Stackebrandt 2014). Bakterije klase *Actinobacteria* se često izoluju iz zemljišta zagađenog pesticidima, herbicidima i drugim dugotrajnim organskim polutantima. Preživljavanje u ovakvim staništima i sposobnost da zagađujuće supstance koriste kao izvor ugljenika omogućava potencijalnu primenu bakterija ove klase u eksperimentima biodegradacije. Kao odgovor na rast na ugljovodonicima ovi mikroorganizmi mogu da proizvode biosurfaktante i bioemulgatore koji redukuju površinski napon na granici faza vazduh/tečnost, čvrsta faza/tečnost ili između nemešljivih tečnosti čime poboljšavaju procese biorazgradnje. Pored toga, bakterije klase *Actinobacteria* uklanjaju polutante i procesima apsorpcije, adsorpcije i desorpcije (Castillo et al, 2006, Colin et al, 2013, Sineli et al, 2016, Uzoigwe et al, 2015, Widehem et al, 2002).

Rod *Brachybacterium* obuhvata 24 vrste: *B. alimentarium*, *B. aquaticum*, *B. avium*, *B. conglomeratum*, *B. endophyticum*, *B. faecium*, *B. fresconis*, *B. ginsengisoli*, *B. hainanense*, *B. halotolerans*, *B. horti*, *B. huguangmaarensense*, *B. muris*, *B. nesterenkovii*, *B. paraconglomeratum*, *B. phenoliresistens*, *B. rhamnosum*, *B. sacelli*, *B. saurashtrense*, *B. squillarum*, *B. subflavum*, *B. tyrofermentans*, *B. vulturis* i *B. zhongshanense* (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ). Filogenetsko stablo (slika 4.8.) zasnovano na 16S rRNK genskim sekvencama prikazuje poziciju *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 u rodu *Brachybacterium* i sličnost sa vrstama unutar roda. Ispitivana bakterija pokazuje najveću sličnost sa *B. paraconglomeratum* JCM17781 (NR 113401) – 99,78 %, a nešto manje sličnosti (98,45 % i 98,31%) sa *B. vulturis* (KY 785407) odnosno *B. avium* (KY 785408).



Slika 4.8. Filogenetsko stablo roda *Brachybacterium*. *A. globiformis* predstavlja spoljašnju grupu.

4.3.2. Ispitivanje morfoloških karakteristika, fiziološko-biohemijskih osobina i masnokiselinskog sastava

Morfološke karakteristike bakterije CH-KOV3 odgovaraju opisu koji je dat za *B. paraconglomeratum* u literaturi. *B. paraconglomeratum* NCIB 9861^T je opisan kao Gram-pozitivna, nepokretna, bakterija koja ne proizvodi spore, aerobna ili fakultativno anaerobna, oksidaza negativna i katalaza pozitivna bakterija. Čelije su pojedinačne, male, ovalne ili u obliku štapića, kolonije su glatke i žute (Takeuchi et al, 1995).

Za identifikaciju pomoću API web softvera su korišćeni rezultati Coryne testa: mikroorganizam redukuje nitrate do nitrita, proizvodi pirazin-amidazu, pirolidonil-arilamidazu, alkalnu fosfatazu, β-glukuronidazu, β-galaktozidazu, α-glukozidazu, N-acetil-β-glukozaminidazu, β-glukozidazu, ali ne proizvodi ureazu, ne hidrolizuje želatin, ne fermentiše D-glukozu, D-ribozu, D-ksilozu, D-manitol, D-maltozu, D-laktozu, D-saharozu i glikogen, proizvodi katalazu. Prilikom unošenja rezultata u apiweb softver nije dobijena adekvatna identifikacija jer apiweb baza pretežno poseduje podatke za kliničke mikroorganizme. Međutim, rezultati dobijeni API testovima (tabela 4.10.) su vrlo značajni jer predstavljaju fiziološko-biohemijski profil izolovanog mikroorganizma. Izolovana bakterija, kao i tipska kultura NCIB 9861^T hidrolizuje eskulin i ne hidrolizuje želatin, redukuje nitrate, fermentiše galaktozu, ne fermentiše ribozu, ksilozu, manitol i sorbitol. Za razliku od tipske kulture ona ne proizvodi ureazu, vodonik-sulfid, daje pozitivan rezultat u Voges-Proskauer testu, ne proizvodi indol, ne fermentiše L-arabinozu, glukozu, laktozu, maltozu, manozu, rafinozu i saharozu (Takeuchi et al, 1995). Veću fiziološko-biohemijsku sličnost ispitivani mikroorganizam pokazuje sa tipskom kulturom

DSM46341, jer kao i ova kultura ne fermentiše veliki broj supstrata. Proizvodnja enzima pomoću ispitivane bakterije takođe korelira sa rezultatima za tipsku kulturu DSM46341. Oba mikroorganizma proizvode esteraza-lipazu, leucin-arilamidazu, valin-arilamidazu, α -galaktozidazu, β -galaktozidazu, α -glukozidazu, β -glukozidazu i N-acetil- β -glukozaminidazu, a za razliku od tipske kulture ispitivani mikroorganizam proizvodi i lipazu i naftol-AS-BI-fosfohidrolazu (DSMZ). Relativno različiti biohemijski profil bakterije *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 u poređenju sa literaturom može se objasniti adaptacijom na uslove staništa iz koga je mikroorganizam izolovan.

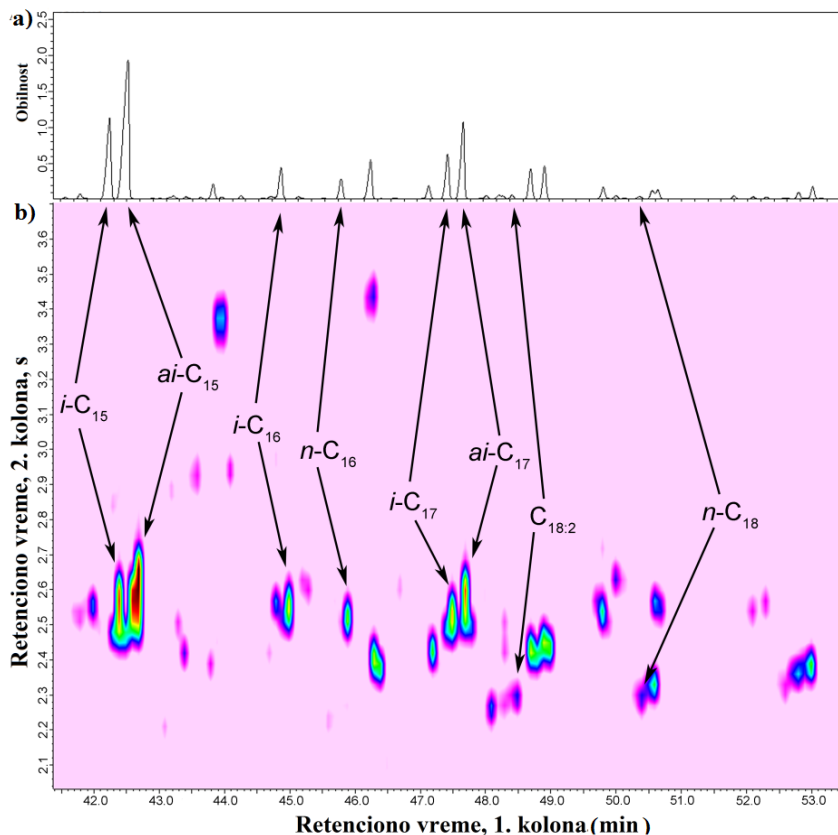
Tabela 4.10. Rezultati API testova

API 20NE		API 20 E		API CORYNE		API ZYM	
Test	Rezultat	Test	Rezultat	Test	Rezultat	Test	Rezultat
NO3	+/-	ONPG	+	NIT	+	1	-
TRP	-	ADH	-	PYZ	+	2	-
GLU	-	LDC	-	PYRA	+	3	-
ADH	-	ODC	-	PAL	+	4	+
URE	-	CIT	-	GUR	+	5	+
ESC	+	H ₂ S	-	GAL	+	6	++
GEL	-	URE	-	GLU	+	7	++
PNPG	+	TDA	-	NAG	+	8	-
GLU	-	IND	-	ESC	+	9	-
ARA	-	VP	+	URE	-	10	-
MNE	-	GEL	-	GEL	-	11	-
MAN	-	GLU	-	O	-	12	+
NAG	-	MAN	-	GLU	-	13	+
MAL	-	INO	-	RIB	-	14	++
GNT	-	SOR	-	XYL	-	15	-
CAP	-	RHA	-	MAN	-	16	++
ADI	-	SAC	-	MAL	-	17	+
MLT	-	MEL	-	LAC	-	18	+
CIT	-	AMY	-	SAC	-	19	-
PAC	-	ARA	-	GLYG	-	20	-
OX	-	OX	-	CAT	+		

(+) pozitivna reakcija, (++) jako pozitivna reakcija, (-) negativna reakcija

Rezultati GC-MS i komprehenzivne 2D GCxGC-MS analize bakterije CH-KOV3 dati su na slici 4.9. i u tabeli 4.11. gde je poređena zastupljenost različitih masnih kiselina u biomasi ovog mikroorganizma i tipske kulture *B. paraconglomeratum* NCIB9861^T. Oba mikroorganizma dominantno sadrže zasićene masne kiseline, izuzetak su mononezasićene C15:1 (4,1 %) i C18:1 (3,1 %) kod tipske kulture i dinezasićena C18:2 (0,61 %) kod testirane bakterije. Visok procenat anteizo-metil računaste masne kiseline C15 prisutan je u strukturama i ispitivane bakterije CH-KOV3 (42,63%) i NCIB9861^T (57,1%). Zastupljenost drugih pojedinačnih masnih kiselina i njihov odnos se razlikuju u ispitivanoj bakteriji u odnosu na pomenutu tipsku kulturu što može biti posledica različitih stresnih uslova u

životnoj sredini iz koje je mikroorganizam izolovan (Buczolits, Busse 2012, Gontia et al, 2011, Takeuchi et al, 1995).



Slika 4.9. Hromatogrami ukupnih masnih kiselina bakterije CH-KOV3: GC-MS (a) i 2D GCxGC-MS (b) (Djurić et al, 2017).

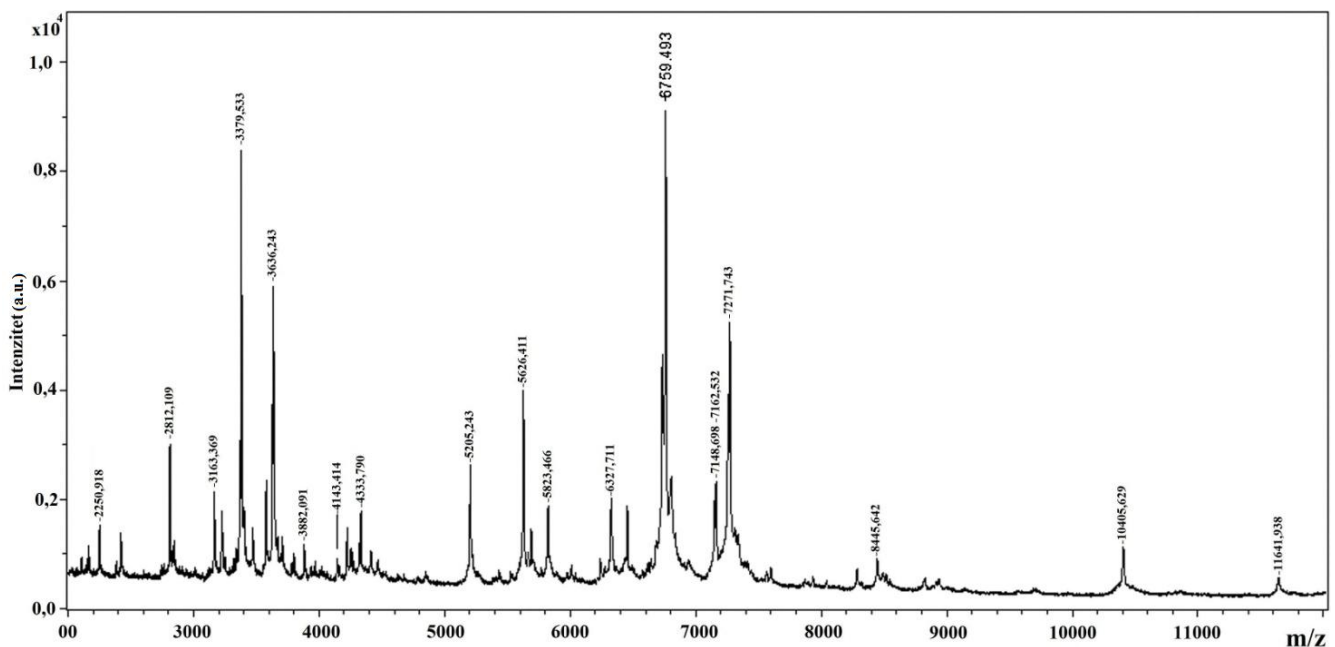
Tabela 4.11. Masnokiselinski profil ukupnih lipida bakterije CH-KOV3 i tipske kulture NCIB9861^T

Tip FAME	Zastupljenost (%)	
	Testirana bakterija	NCIB9861 ^T
<i>i</i> -C ₁₄	/	0,9
C ₁₄	/	2,1
<i>ai</i> -C ₁₅	42,63	57,1
<i>i</i> -C ₁₅	19,93	2,8
C ₁₅	/	5,8
C _{15:1}	/	4,1
<i>i</i> -C ₁₆	/	6,9
<i>ai</i> -C ₁₇	16,18	5,1
<i>i</i> -C ₁₇	9,06	0,9
<i>i</i> -C ₁₆	5,97	/
<i>n</i> -C ₁₆	3,91	6,4
<i>n</i> -C ₁₈	1,71	4,6
C _{18:1}	/	3,1
C _{18:2}	0,61	/

n – FAME normalnog niza, *i* – izo-metil račvaste FAME, *ai* – anteizo-metil račvaste FAME

4.3.3. MALDI-TOF MS karakterizacija

MALDI-TOF MS tehnika sve više dobija na značaju u taksonomiji prokariota u poslednjoj dekadi (Avdalović et al, 2015, Dridi, Drancourt 2011). U ovoj tehnici analiziraju se ribozomalni proteini koji su dominantni u ćeliji kao i drugi proteini kopirani u velikom broju (Ryzhov, Fenselau 2001). Dobijeni maseni spektar predstavlja specifični "otisak prsta" ispitivane bakterije, jer svaki protein ima jedinstven obrazac m/z vrednosti. Do 2016. godine su upotrebom MALDI-TOF MS tehnike analizirani tipski sojevi roda *Brachybacterium* na MALDI Biotyper db 6903 pomoću BioTyper 2.0 softvera i to *Brachybacterium faecium* DSM 4810T DSM, *Brachybacterium muris* 7 RLT, *Brachybacterium nesterenkovii* DSM 9573T DSM i *Brachybacterium nesterenkovii* DSM 9574 DSM. Ova analiza je korišćena i za karakterizaciju celih ćelija bakterije izolovane iz kanala otpadnih voda Pančevo, a rezultati su prikazani na slici 4.10. Ispitivana bakterija *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 nije uspešno identifikovana na nivou vrste u poređenju sa bazom podataka, pošto se baza sa kojom se rezultati porede rutinski koristi za identifikaciju kliničkih mikroorganizama. Drugi autori takođe nisu uspeli da identifikuju mikroorganizme roda *Brachybacterium* MALDI-TOF MS tehnikom (Seng et al, 2013). Dobijeni rezultat je značajan jer proteinski profil *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 predstavlja njegovu karakteristiku, jedinstven "otisak prsta" i do danas je jedini publikovani MALDI-TOF MS spektar roda *Brachybacterium* sp., upravo spektar *B. paraconglomeratum* CH-KOV3 (Djurić et al, 2017).



Slika 4.10. MALDI-TOF MS spektar bakterije *Brachybacterium* sp. CH-KOV3.

a.u. – arbitrarna jedinica

(Djurić et al, 2017).

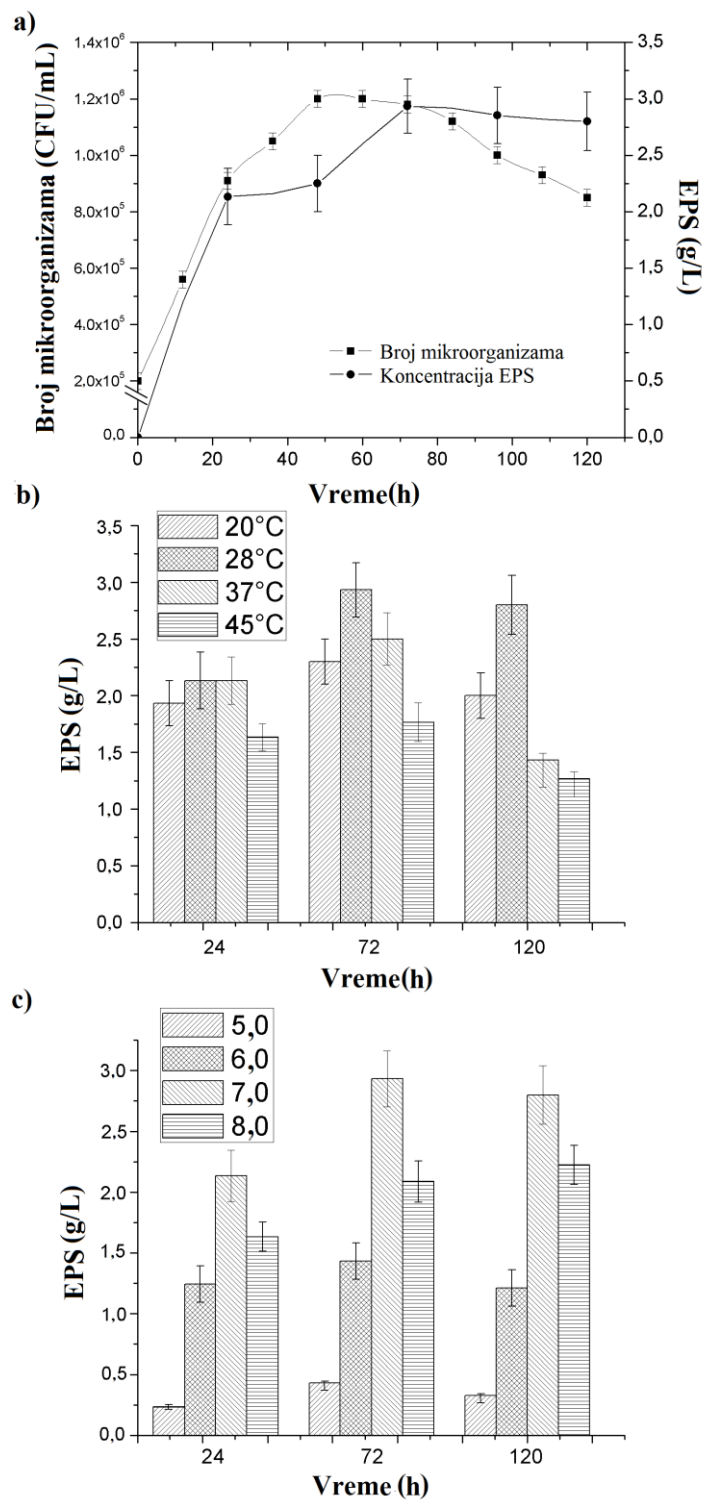
4.4. *Produkcija i optimizacija produkcije egzopolisaharida pomoću ispitivane bakterije CH-KOV3*

Tipična kriva rasta bakterije *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 na saharoznoj podlozi prikazana je na slici 4.11.a). Uočava se da je najveći broj mikroorganizama u 48. času, a potom taj broj neznatno opada do kraja fermentacije. Na istoj slici prikazana je i produkcija egzopolisaharida, a mikroorganizam ga u najvećoj količini proizvodi trećeg dana (72 h) što je slučaj i sa drugim vrstama roda *Brachybacterium* (Moussa et al, 2017).

Uticaj temperature na proizvodnju egzopolisaharida prikazan je na slici 4.11.b). Vremenski intervali uzorkovanja su bili 24, 72 i 120 h. Razlika u prinosu egzopolisaharida se ne uočava u prvih 24 h, ali je izrazita na kraju fermentacije. Bakterija *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 je pokazala najbolju produkciju polisaharida na saharoznoj podlozi na 28 °C, a prinos egzopolisaharida je na toj temperaturi bio u opsegu 2,13-2,63 g/L. Malo niža količina proizvoda je dobijena na 37 °C nakon 24 h – 2,13 g/L, međutim nakon 3. (72 h) i 5. (120 h) dana količina proizvedenog egzopolisaharida prvo raste (2,5 g/L), pa opada (1,43 g/L). Najmanja produkcija ovog polisaharida je bila u opsegu 1,26-1,76 g/L na 45 °C. Dobijeni rezultat odgovara podacima iz literature u kojoj je istaknuto da se najviša produkcija levana postiže na 30 °C i nižim temperaturama (Abdel-Fattah et al, 2012, Liu et al, 2009, Moussa et al, 2017).

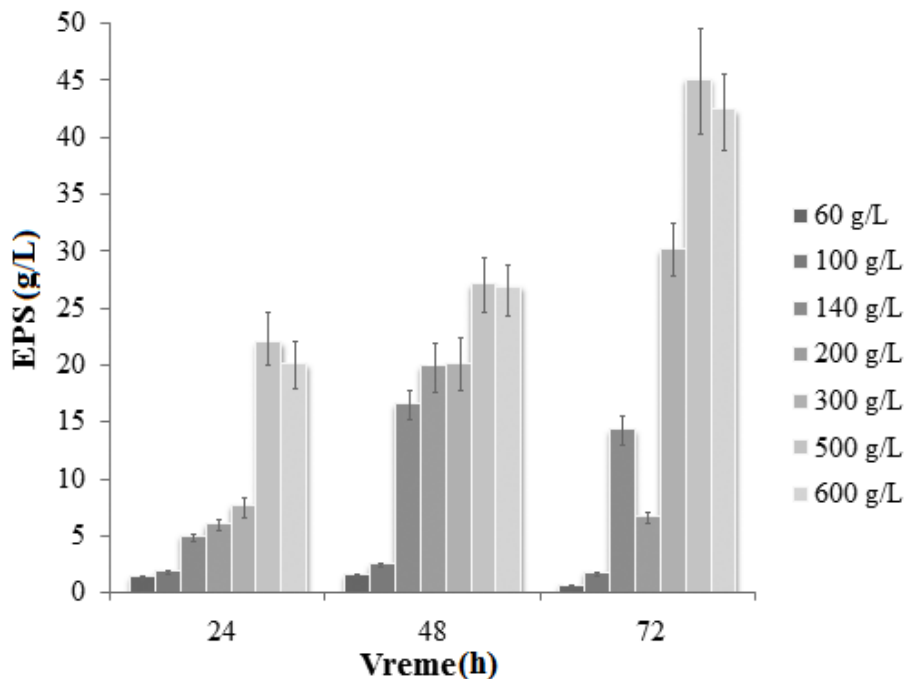
pH podloge je važan faktor koji utiče na ćelije mikroorganizama, njihovu morfologiju i strukturu, unos različitih hranjivih supstanci, a samim tim i na produkciju polisaharida (Kim et al, 2005). Uticaj pH na proizvodnju egzopolisaharida je prikazan na slici 4.11.c) na kojoj se uočava da su u podlozi pH vrednosti 7 dobijeni maksimalni prinosi proizvoda u svim intervalima uzorkovanja (24, 72 i 120 h). S obzirom da je mikroorganizam izolovan iz sedimenta kome je pH vrednost bila 7,3 rezultat nije neočekivan (Beškoski et al, 2013). Uobičajene optimalne pH vrednosti za većinu mikrobnih producenata egzopolisaharida su bliske neutralnim (Kumar et al, 2007), dok su Liu i saradnici i Moussa i saradnici pokazali da *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 i *Brachybacterium phenoliresistens* pogoduje blago alkalna pH (Liu et al, 2009, Moussa et al, 2017).

Na slikama 4.11.b) i c) se uočava da je veći efekat pH vrednosti u odnosu na temperaturu na produkciju polisaharida.



Slika 4.11. Produkcija egzopolisaharida na podlozi sa 100 g/L saharoze: Kriva rasta **(a)**, uticaj temperature **(b)** i uticaj pH **(c)** (Djurić et al, 2017).

Produkcija egzopolisaharida bakterije CH-KOV3 pri različitim koncentracijama šećera u podlozi prikazana je na slici 4.12. na kojoj se uočava da je pri inkubaciji sa 500 g/L saharoze u podlozi dobijeno 45,2 g/L levana. Ova količina dobijenog proizvoda pomoću roda *Brachy bacterium* je pet puta veća od količine dobijene u prethodnoj studiji (Moussa et al, 2017). Poznato je da koncentracija saharoze u podlozi ima uticaja na proizvodnju egzopolisaharida. Öner i saradnici (Öner et al, 2016) su poredili proizvodnju levana na podlogama sa različitom koncentracijom saharoze (60-400 g/L) i u svom revijalnom radu zaključili da je najveći prinos na podlozi sa najvišom koncentracijom saharoze. Do istog zaključka došli su i Kekez i saradnici koji su uočili da bakterija *B. licheniformis* NS032 na podlozi sa 197 g/L saharoze proizvodi 47,8 g/L levana, a na podlozi sa visokom koncentracijom saharoze (398 g/L saharoze) dobijeno je 99,2 g/L istog egzopolishaharida (Kekez et al, 2015).



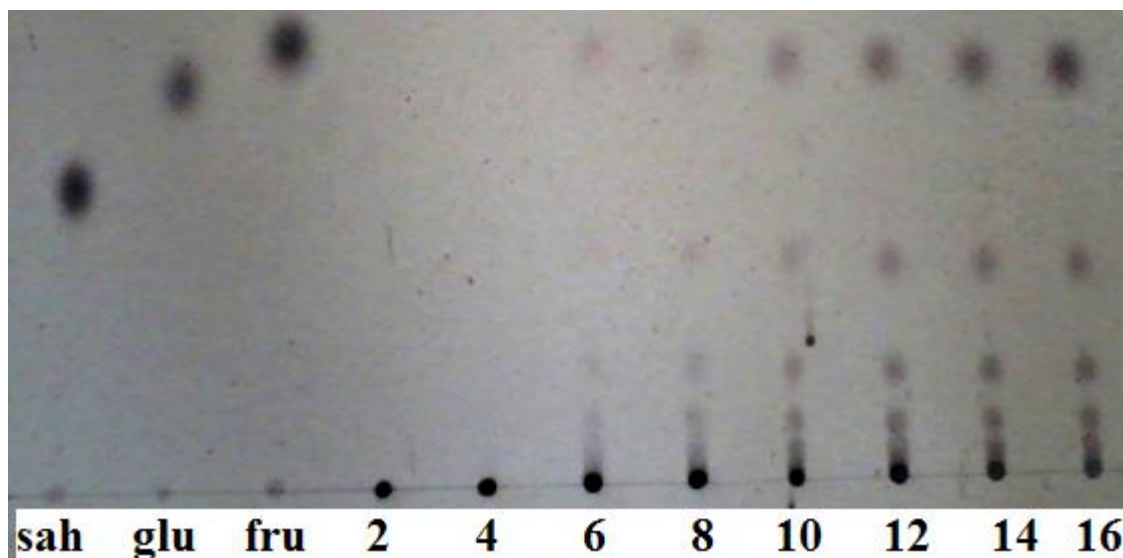
Slika 4.12. Uticaj koncentracije saharoze na proizvodnju egzopolisaharida pomoću bakterije *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3 (Djurić et al, 2017).

4.5. Strukturna karakterizacija egzopolisaharida

Elementalna organska mikroanaliza egzopolisaharida izolovanog nakon fermentacije na saharoznoj podlozi je pokazala da u dobijenom polimeru nema azota i sumpora. Ispitivani polisaharid se sastoji iz ugljenika, vodonika i kiseonika, a relativan odnos ovih elemenata iznosi redom 39,04:6,74:54,22. Dobijene vrednosti su bliske teorijskim vrednostima za neutralne polisaharide, prečišćene od proteina i nukleinskih kiselina (Liu et al, 2010).

Totalna hidroliza egzopolisaharida pomoću trifluorsirćetne kiseline je pokazala prisustvo samo jedne monosaharidne komponente, fruktoze, a negativna vrednost specifične optičke rotacije dobijena u ovoj studiji ($[\alpha]^{25} = -38,5^\circ$, $C=1,1 \text{ g/100 mL}$, H_2O) ukazuje na prisustvo β glikozidnih veza. Na osnovu ove dve analize može se zaključiti da je izolovani polisaharid fruktanskog tipa (Gojgic-Cvijovic et al, 2019, Hibbert et al, 1931, Kekez et al, 2015).

Rezultat parcijalne hidrolize polisaharida proizvedenog pomoću *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 oksalnom kiselinom (0,125 %) na hromatografskoj ploči je prikazan na slici 4.13. Pri ovim uslovima hidroliza polimera je započela posle 6 minuta, a ni posle 16 minuta on nije potpuno hidrolizovan. Proizvodi nastali ovom reakcijom su fruktooligosaharidni fragmenti dužine tri i više monosaharidnih jedinica, kojima se pridaje posebna pažnja zbog njihovih svojstava kao što su niska kaloričnost, nekancerogenost, a mogu delovati i kao prebiotici (Roberfroid 1997, Spiegel et al, 1994). Raspored tačaka (mrlja) na slici odgovara onom koji su dali Dahech i saradnici: najviše tačke od starta (u poređenju sa monosaharidnim standardima) predstavljaju fruktozu, zatim oligosaharidni fragmenti sa sve većom molekulskom masom, polisaharidni lanci kraći od ispitivanog egzopolisaharida i na samom startu levani (Dahech et al, 2012).



Slika 4.13. Tankoslojna hromatografija parcijalno hidrolizovanog egzopolisaharida proizvedenog pomoću *Brachybacterium* sp. CH-KOV3: saharoza (**sah**), glukoza (**glu**), fruktoza (**fru**), 2 min (**2**), 4 min (**4**), 6 min (**6**), 8 min (**8**), 10 min (**10**), 12 min (**12**), 14 min (**14**), 16 min (**16**) (Djurić et al, 2017).

Dinamička viskoznost ($[\mu]^{25}=1,1602 \text{ mPa} \times \text{s}$, $C=1,1\text{g/100mL}$, H_2O) i kinematička viskoznost ($[\nu]^{25}=1,1581 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$, $C=1,1\text{g/100mL}$, H_2O) predstavljaju karakteristike proizvedenog

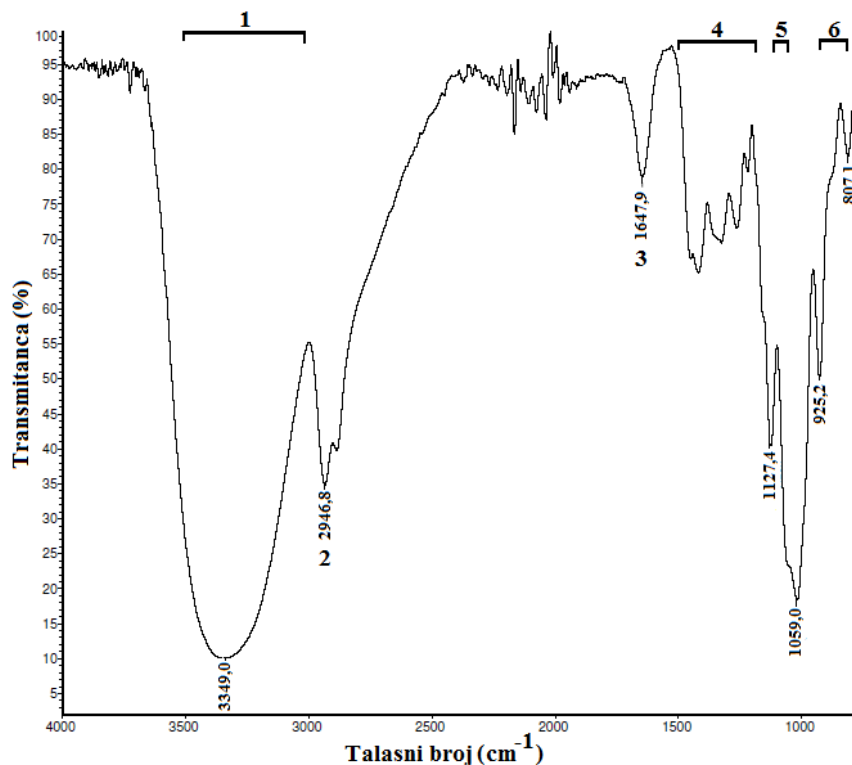
egzopolisaharida pomoću *Brachybacterium* sp. CH-KOV3. U poređenju sa drugim mikrobnim polisaharidima velike molekulske mase levan karakteriše mala viskoznost što ukazuje na kompaktan i sferni oblik ovog fruktana u rastvoru, a zahvaljujući tome on se upotrebljava u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Jakob et al, 2013, Öner et al, 2016).

4.5.1. Određivanje molekulske mase

Molekulska masa egzopolisaharida dobijenog pri fermentaciji zavisi od mikroorganizma producenta i uslova, a najčešće iznosi od 10^4 do 10^{10} Da (Jakob et al, 2013, Young et al, 2021). Egzopolisaharid proizveden upotrebom *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 ima molekulsku masu veću od 10^6 Da, odnosno izlazi iz opsega razdvajanja na Sepharose CL-4B koloni. U radu Veerapandian i saradnika su proizvedene dve vrste levana, niskomolekulski ($3-9,5 \times 10^3$ Da) i visokomolekulski ($2,6-2,8 \times 10^6$ Da), a Gojgić-Cvijović i saradnici su izolovali tri levana različitih molekulskih masa $5,13 \times 10^5$, $5,82 \times 10^6$ i $7,24 \times 10^6$ Da (Gojgic-Cvijovic et al, 2019, Veerapandian et al, 2020).

4.5.2. Infracrvena spektroskopija

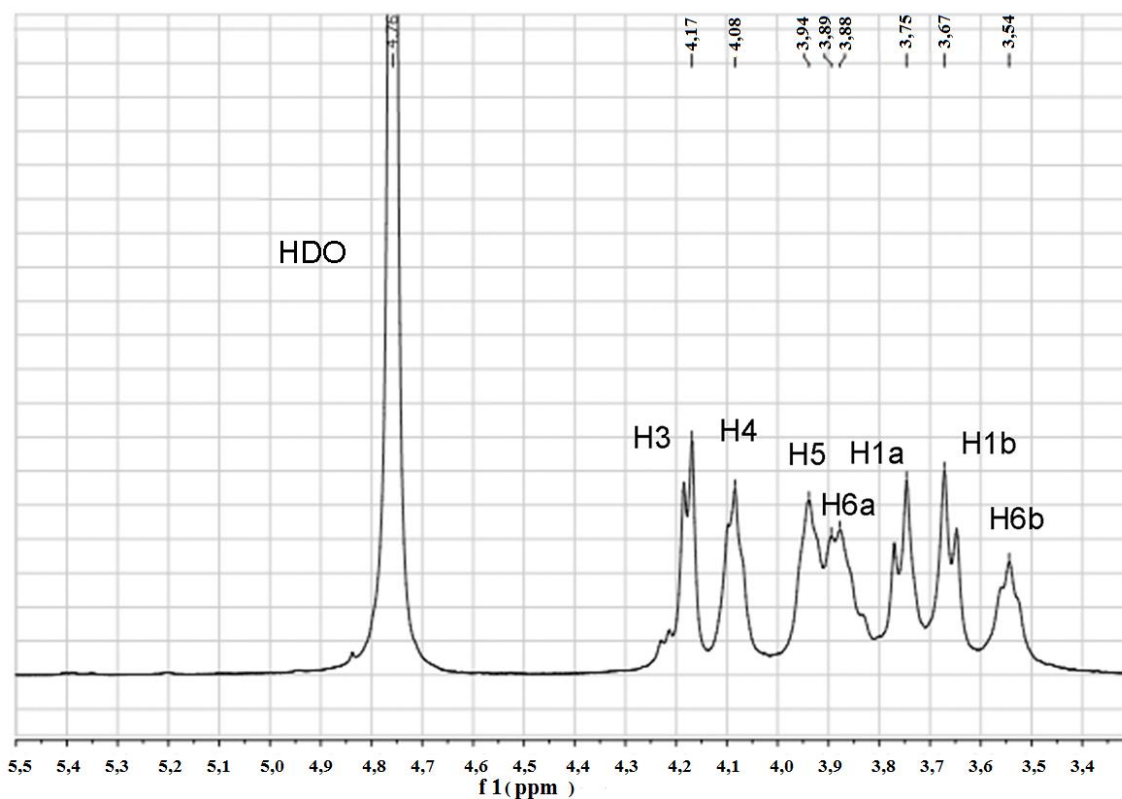
FT-IR spektar egzopolisaharida je prikazan na slici 4.14. i sadrži apsorpcione trake karakteristične za ugljenohidratne strukture, u opsegu od 3500-807 cm^{-1} . Široka traka od 3500-3000 cm^{-1} odgovara valencionim vibracijama –OH grupa, a traka na 2946,8 cm^{-1} potiče od valencionih vibracija C-H. Signali na 1647,9 cm^{-1} i u regionu 1500-1200 cm^{-1} odgovaraju vezanim molekulima vode i C-H deformacionim vibracijama. Trake između 1127,4 i 1059,0 cm^{-1} odgovaraju C-O-C i C-OH valencionim vibracijama. Apsorpcija na 925,2 i 807,1 cm^{-1} potiče od valencionih vibracija furanoznog prstena. Sve apsorpcione trake su identične signalima za levanski tip polisaharida (Kekez et al, 2015, Kekez et al, 2016, Liu et al, 2010).



Slika 4.14. FT-IR spektar EPS-a proizvedenog pomoću *Brachybacterium* sp. CH-KOV3. Brojevima su označene specifične trake: valencione vibracije –OH grupa (1), valencione vibracije C-H (2), vezana voda (3), C-H deformacione vibracije (4), valencione vibracije C-O-C i C-OH (5), skeletne vibracije furanoznog prstena (6) (Djurić et al, 2017).

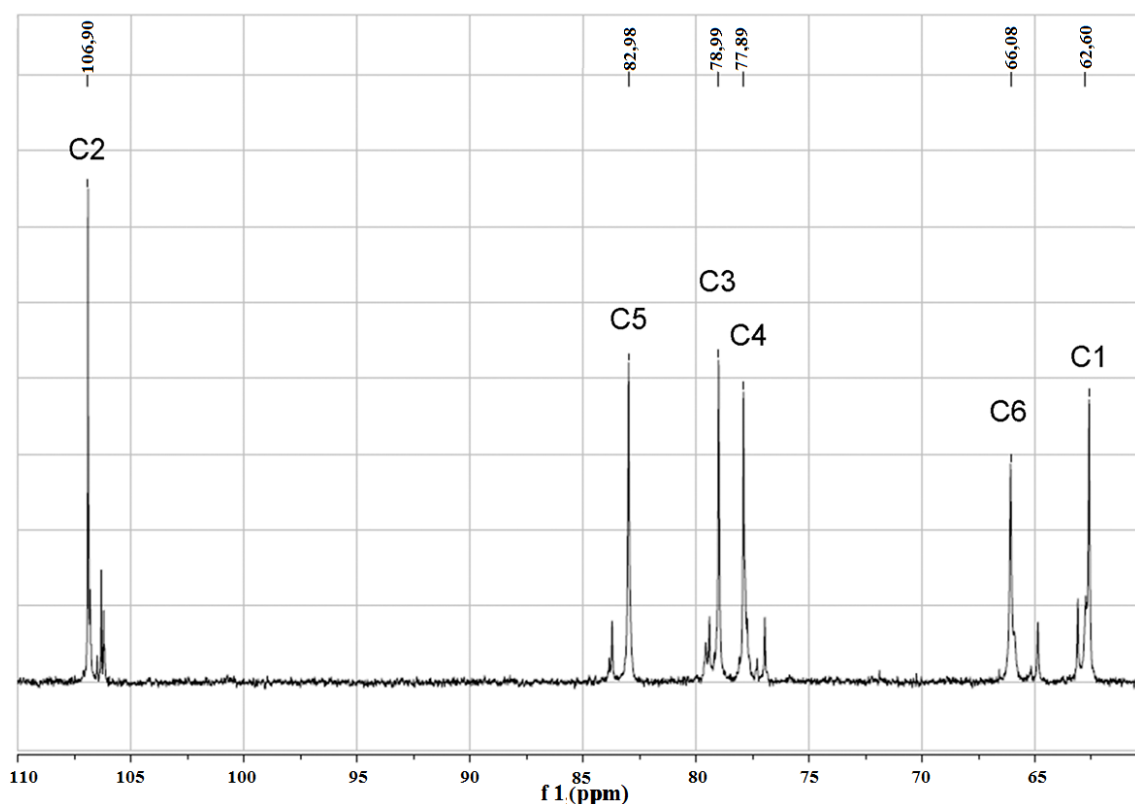
4.5.3. NMR spektroskopija

^1H NMR spektar egzopolisaharida pokazuje tipična hemijska pomeranja za ugljenohidratne protone u prstenu i prikazan je na slici 4.15. Nije zabeležen signal u regionu anomernog protona što ukazuje na odsustvo ili nisku zastupljenost glikozidnih protona. ^1H NMR spektar se sastoji iz sedam glavnih protonskih signala između 3,4 i 4,3 ppm koji potiču od β -fruktofuranoznih jedinica i koji ukazuju da je egzopolisaharid levanskog tipa strukture. Slična hemijska pomeranja između 3,4 i 4,2 su zabeležena za levane proizvedene pomoću rodova *Bacillus* i *Leuconostoc* (Bouallegue et al, 2020, Taylan et al, 2019).



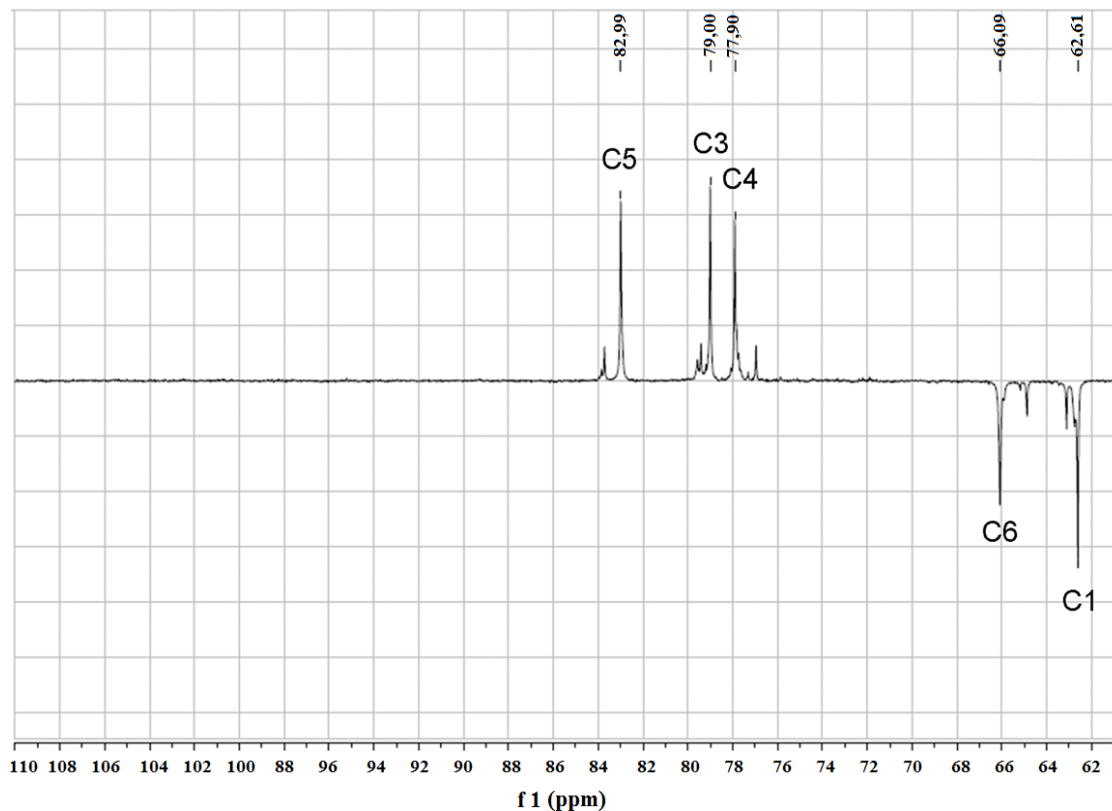
Slika 4.15. ^1H NMR spektar egzopolisaharida proizvedenog pomoću *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3 (Djurić et al, 2017).

^{13}C NMR spektar egzopolisaharida (slika 4.16) sadrži hemijska pomeranja u opsegu 62,6-107 ppm i pokazuje tipična hemijska pomeranja za ugljenohidratne ugljenike u prstenu. Prisutno je šest signala: 106,9 ppm (C2), 82,98 ppm (C5), 78,99 ppm (C3), 77,89 ppm (C4), 66,08 ppm (C6) i 62,60 ppm (C1). ^{13}C NMR spektar egzopolisaharida ukazuje da je analizirani polisaharid fruktan levanskog tipa, a hemijska pomeranja su vrlo slična pomeranjima za levane čiji su producenti rodovi *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Gluconobacter*, *Kozakia* i *Neosasaia* (Bouallegue et al, 2020, Jakob et al, 2013, Moussa et al, 2017).



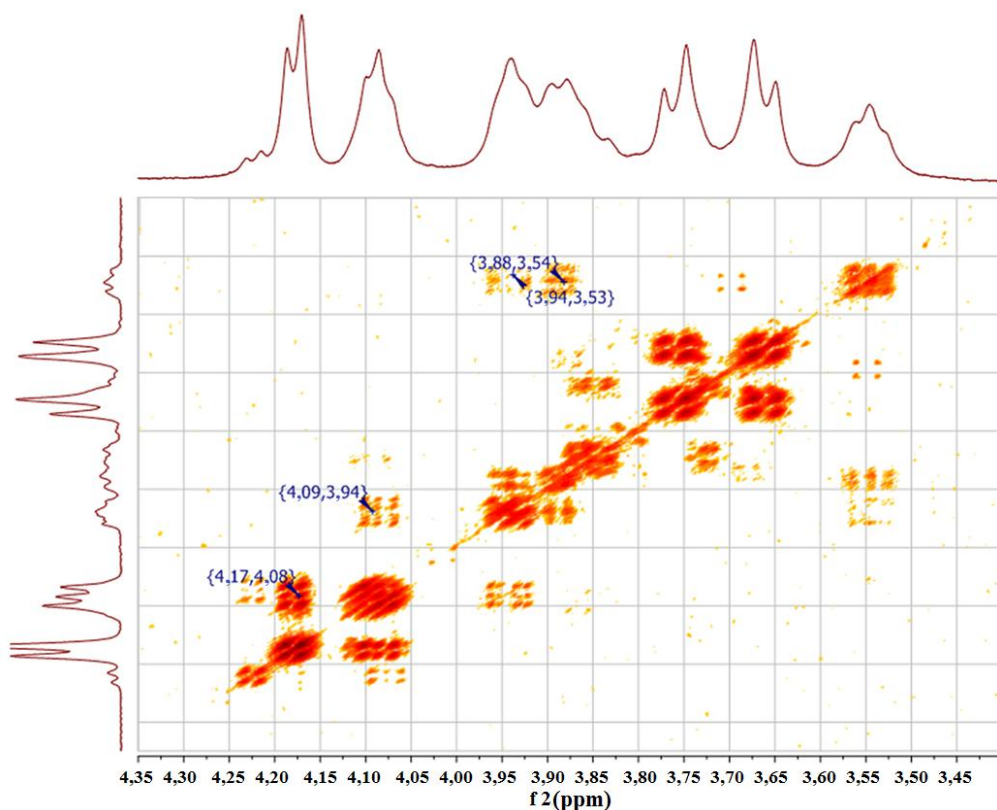
Slika 4.16. ^{13}C NMR spektar EPS-a proizvedenog pomoću *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 (Djurić et al, 2017).

DEPT 135 analiza se koristi u određivanju stepena hidrogenacije svakog ugljenika pri čemu CH i CH₃ signali imaju pozitivnu, a CH₂ negativnu amplitudu. DEPT spektar egzopolisaharida (slika 4.17.) prikazuje intenzivne signale na 82,99, 79 i 77,9 koji potiču od CH protona na C-5, C-3 i C-4 ugljenicima i signale na 66,09 i 62,61 koji pripadaju CH₂ protonima na C-6 i C-1 ugljenicima. Dahech i saradnici su dobili slična hemijska pomeranja za levan proizveden pomoću roda *Bacillus* (Dahech et al, 2013).



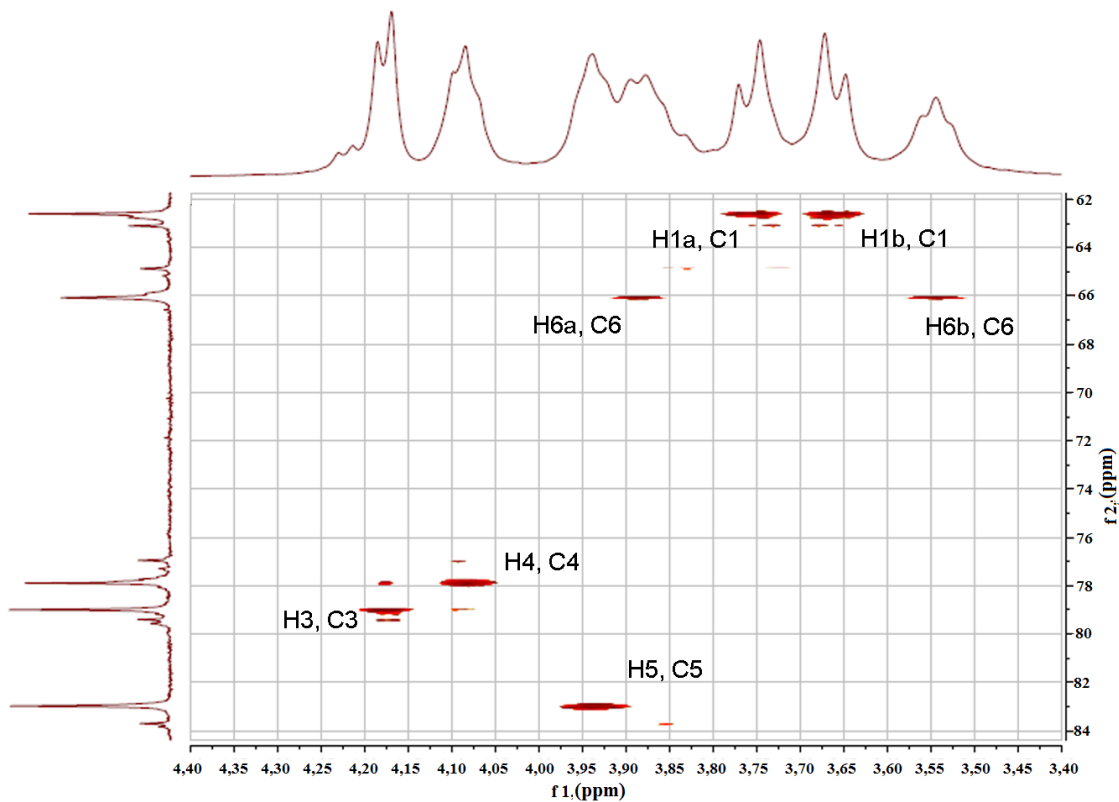
Slika 4.17. DEPT 135 spektar egzopolisaharida koji proizvodi *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3. U spektru su obeleženi C atomi za koje su vezani CH, CH₃ (pozitivna amplituda) i CH₂ (negativna amplituda) protoni (Djurić et al, 2017).

2D H-H COSY NMR tehnika prikazuje korelacije između vodonika u strukturi, a snimljeni spektar egzopolisaharida je prikazan na slici 4.18. Spektar sadrži sledeće korelacije: H6a/H6b (3,88/3,54), H5/H6b (3,94/3,53), H4/H5 (4,09/3,94) i H3/H4 (4,17/4,08), a iste su istaknute i u prethodno publikovanim studijama levana. Dahech i saradnici su u snimljenom spektru egzopolisaharida proizvedenog pomoću *B. licheniformis* apostrofirali H5/H6, H4/H5 i H3/H4 korelacije, a Gojgic-Cvijović i saradnici su za levan poreklom iz *B. licheniformis* NS032 opisali sledeće interakcije: H1/H1' (3,76/3,66), H6/H6' (3,88/3,54), H5/H6' (3,94/3,54), H5/H6 (3,94/3,88), H4/H5 (4,08/3,94) i H3/H4 (4,18/4,08) (Dahech et al, 2013, Gojgic-Cvijovic et al, 2019).



Slika 4.18. Homonuklearni 2 D (COSY) spektar egzopolisaharida proizvedenog pomoću *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3 (Djurić et al, 2017).

2D hetero korelacioni spektar HSQC ukazuje na direktne korelacije između skeletnih protona i ugljenika saharidnih jedinica iz kojih se sastoji polisaharid. Identifikovane tačke u spektru egzopolisaharida proizvedenog pomoću bakterije CH-KOV3 (slika 4.19.) prikazuju korelacije na: 3,94/82,98 (H5 i C5), 3,89, 3,55/66,08 (H6a, H6b/C6), 3,76, 3,66/62,6 (H1a, H1b/C1), 4,17/78,99 (H3/C3) i 4,09/77,89 (H4/C4). Odsustvo interakcija između C2 i bilo kog vodonika potvrđuje kvaternarni anomerni karakter ovog ugljenika, a dobijene vrednosti i korelacije su u skladu sa prethodno publikovanim vrednostima za levanski tip fruktana proizvedenog pomoću dve različite bakterije roda *Bacillus* (Gojgic-Cvijovic et al, 2019, Matulová et al, 2011).



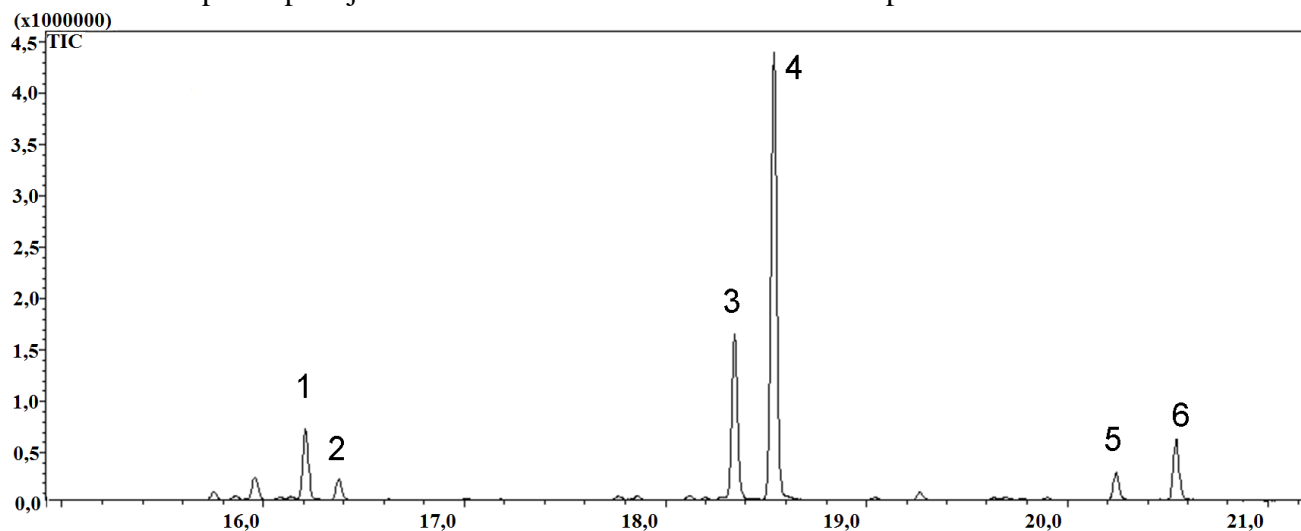
Slika 4.19. Heteronuklearni 2D (HSQC) spektar EPS-a proizvedenog pomoću *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3 (Djurić et al, 2017).

4.5.4. Gasno-masena analiza metilacionih proizvoda

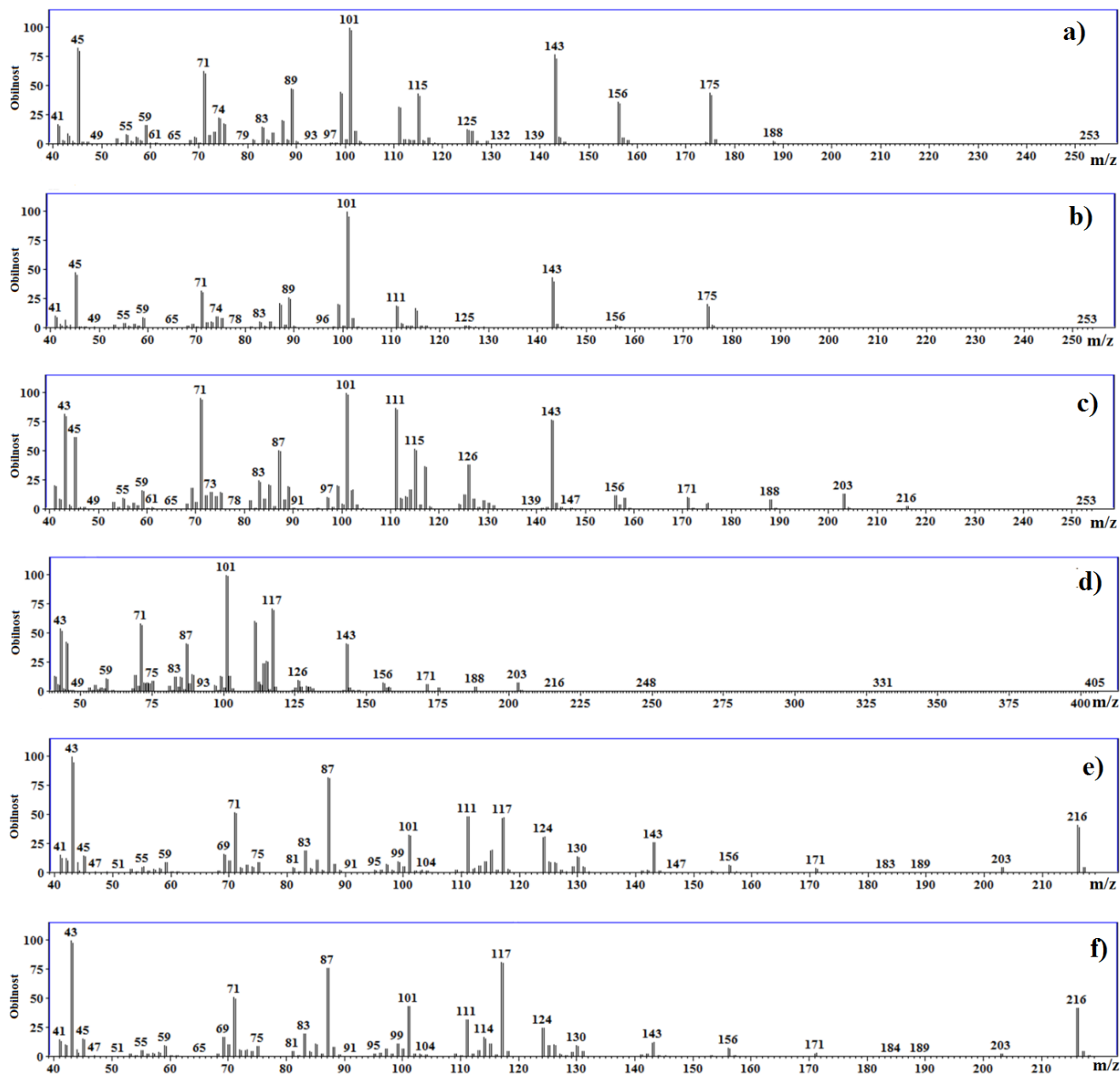
Egzopolisaharid je permetilovan i podvrgnut reduktivnom "cepanju" i acetilaciji monomernih jedinica koje su dalje analizirane upotrebom GC-MS tehnike. Na hromatogramu (slika 4.20.) se uočavaju tri grupe pikova identifikovane na osnovu njihovih retencionih vremena i obrazaca fragmentacije (Rolf, Gray 1984, Simms et al, 1990). Obrasci fragmentacije dva dominantna pika (3 i 4) na retencionim vremenima 18,3 i 18,5 min odgovaraju 6-O-acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri-O-metil-D-manitolu i 6-O-acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri-O-metil-D-glucitolu, redom i predstavljaju (2,6) vezane fruktofuranozne jedinice. Zbir površina ova dva pika iznosi 77,5% i odgovara glavnom lancu egzopolisaharida. Dva pika eluirana na 16,2 i 16,4 min (pikovi 1 i 2) su identifikovani kao 2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol i 2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, redom i odgovaraju neredukujućim terminalnim jedinicama glikanskih molekula. Fruktozni ostaci koji ukazuju na tačke grananja polisaharidnog lanca - (2,1) grananje odgovaraju pikovima na retencionim vremenima 20,2 i 20,5 min, koji su identifikovani fragmentogramima (pikovi 5 i 6) kao 1,6-di-O-acetil-2,5-anhidro-3,4-di-O-metil-D-manitol i 1,6-di-O-acetil-2,5-anhidro-3,4-di-O-metil-D-glucitol, redom. Sumarna površina pikova koji odgovaraju neredukujućim terminalnim jedinicama iznosi 11,2%, a pikova koji ukazuju na tačke grananja 11,3%. Odnos skoro 1:1 ukazuje da je na svakoj tački grananja dodata jedna neredukujuća fruktofuranozna jedinica.

Rezultati GC-MS analize ukazuju da je glavni lanac sačinjen od fruktofuranoznih jedinica vezanih (2,6) vezama. Prisustvo male količine di-O-metil-fruktoze (oko 11%) ukazuje na umereno račvanje egzopolisaharida. Glavni lanac je supstituisan na poziciji O-1 jednom D-fruktofuranozom (oko 11%).

Maseni spektri parcijalno metilovanih anhidroalditol acetata su prikazani na slici 4.21.



Slika 4.20. Gasni hromatogram parcijalno metilovanih anhidroalditol acetata egzopolisaharida. Pikovi su identifikovani kao: 2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol (**1**), 2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (**2**), 6-O-acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri-O-metil-D-manitol (**3**), 6-O-acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri-O-metil-D-glucitol (**4**), 1,6-di-O-acetil-2,5-anhidro-3,4-di-O-metil-D-manitol (**5**), 1,6-di-O-acetil-2,5-anhidro-3,4-di-O-metil-D-glucitol (**6**) (Djurić et al, 2017).



Slika 4.21. Maseni spektri parcijalno metilovanih anhidroalditol acetata: **A)** 2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol, **B)** 2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, **C)** 6-O-acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri-O-metil-D-manitol, **D)** 6-O-acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri-O-metil-D-glucitol, **E)** 1,6-di-O-acetil-2,5-anhidro-3,4-di-O-metil-D-manitol, **F)** 1,6-di-O-acetil-2,5-anhidro-3,4-di-O-metil-D-glucitol (Djurić et al, 2017).

5. ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske teze ispitivana je primena mikroorganizama izolovanih iz životne sredine zagađene naftom i rafinerijskim proizvodima prerade nafte za bioremedijaciju i proizvodnju egzopolisaharida.

U delu istraživanja koji se odnosio na bioremedijaciju izvedene su dve studije. U prvoj studiji je izolovan konzorcijum mikroorganizama koji imaju sposobnost razgradnje naftnih ugljovodonika, nakon čega je ispitivan njegov biodegradacioni potencijal na uzorku sedimenta iz isplačne jame.

Izvedeni su sledeći zaključci:

- Konzorcijum mikroorganizama degradera ugljovodonika je izolovan iz uzoraka prikupljenih iz isplačne jame višestrukim presejavanjem na mineralnoj podlozi koja je kao izvor ugljenika sadržala dizel D2, a zatim na UG agaru. Biomasa konzorcijuma je umnožena do finalne zapremine od 1000 L, nakon čega su mikroorganizmi upotrebljeni u postupku bioremedijacije.
- Hemijskom karakterizacijom bioremedijacionog supstrata dobijenog mešanjem zemljišta sa ruba isplačne jame i rastresitog sedimenta, utvrđeno je prisustvo naftnih ugljovodonika u količini od 32,2 g/kg. Ovaj supstrat je upotrebljen u bioremedijacionoj studiji koja je trajala 180 dana i u kojoj je ispitivana sposobnost konzorcijuma mikroorganizama degradera ugljovodonika izolovanih sa lokaliteta isplačne jame za degradaciju naftnih zagađujućih supstanci.
- Bioremedijacioni supstrat je nakon inokulacije metagenomski analiziran i utvrđeno je prisustvo sledećih rodova: *Gordonia*, *Bacteroides*, *Candidatus Macondimonas*, *Brucella*, *Parvibaculum*, *Mycobacterium*, *Proteiniphilum*, *Parachlamydia*, *Corynebacterium*, *Termomicrobium*, *Pseudomonas*, *Rhodoplanes*, *Virgibacillus*, *Ochrobactrum*, *Camelimonas*, *Paracoccus* i *Clostridium*. Rod *Gordonia* pripada klasi *Actinobacteria* koje su u literaturi prepoznate kao degraderi ugljovodonika. Prednost metagenomske analize se ogleda u tome što se pored mikroorganizama koji rastu na Petri šoljama mogu identifikovati i nekulturable mikroorganizmi, čime se dobija kompletna informacija o sastavu mikrobne zajednice.
- Nakon primene izolovanog konzorcijuma mikroorganizama u studiji degradacije naftnih ugljovodonika u bioremedijacionom supstratu je degradovano 45,6% (60. dan), 74,2% (120. dan) i 95,3% (180. dan) ukupne količine TPH.
- Na kraju procesa bioremedijacije supstrat je hemijski analiziran i okarakterisan kao slabo-alkalni, jako-karbonatni i slabo-humozni u poređenju sa standardima koji se odnose na klasifikaciju zemljišta. Određeno je da je bioremedijacioni supstrat bogat u ukupnom azotu, sa visokim i vrlo visokim sadržajem lako dostupnog fosfora odnosno kalijuma. Analiza pokazuje da dobijene vrednosti sadržaja mikroelemenata i teških metala ne prelaze količine dozvoljene za poljoprivredno zemljište u Srbiji. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja može se zaključiti da je supstrat na kraju bioremedijacije nezagađen, odnosno da je bioremedijacioni postupak izveden sa visokim procentom uspešnosti.

U drugoj bioremedijacionoj studiji, proučavana je efikasnost *ex situ* postupka bioremedijacije kontaminiranog zemljišta. Pored praćenja stepena mikrobiološke razgradnje naftnih zagađujućih supstanci, određivan je i njegov grupni sastav, kao i promene u količini frakcija tokom studije. Tokom postupka bioremedijacije ispitivano je i paralelno odvijanje procesa humifikacije, određivana je količina nastalih huminskih kiselina i promene u njihovoj strukturi.

Na osnovu rezultata može se zaključiti:

- U *ex situ* postupku bioremedijacije zemljišta, konzorcijum mikroorganizama degradera ugljovodonika izolovanih sa mesta zagađenja, je degradovao 86,6% ukupne količine TPH za 150 dana.
- Analizom grupnog sastava uzoraka uzetih sa halde tokom *ex situ* postupka bioremedijacije, utvrđeno je da je koncentracija alifatičnih ugljovodonika smanjena sa 8,39 na 2,91 g/kg s.s., a aromatičnih ugljovodonika sa 8,57 na 4,39 g/kg s.s. Frakcija alkohola i ketona se smanjila za 65% (sa 8,84 na 3,09 g/kg s.s.).
- Paralelno sa *ex situ* postupkom bioremedijacije praćen je proces humifikacije u kontaminiranom zemljištu. Procenat huminskih kiselina se na kontaminiranoj haldi povećao za 26,5%.
- Strukturnom analizom (elementarna analiza, E4/E6 odnos, IR spektroskopija) izolovanih huminskih kiselina tokom procesa bioremedijacije utvrđen je povećan sadržaj aromatičnih struktura i kiseoničnih funkcionalnih grupa. Zagađen ekosistem koji je tretiran bioremedijacijom, nakon bioremedijacionog postupka može ponovo postati stanište brojnim mikroorganizmima i biljkama, jer veća količina huminskih kiselina bogatih aromatičnim i kiseoničnim funkcionalnim grupama pozitivno utiče na mikrobn rast i njihov metabolizam, indukuje sintezu enzima, a zahvaljujući svojoj strukturi, huminske kiseline predstavljaju i redoks aktivna jedinjenja.

U delu istraživanja sposobnosti mikroorganizma izolovanog iz zagađene životne sredine označenog kao CH-KOV3 za proizvodnju egzopolisaharida, bakterija je molekularno identifikovana kao vrsta roda *Brachybacterium* i sekvenca 16s rRNK zavedena u NCBI bazu podataka pod pristupnim brojem KC881303.1. Izolovani mikroorganizam je okarakterisan fenotipski i genotipski, a nakon čega je optimizovana proizvodnja egzopolisaharida gajenjem mikroorganizma na saharoznim podlogama. Dobijeni egzopolisaharid je detaljno strukturno okarakterisan.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- Izolovana bakterija poseduje brojne enzime kao što su α - i β -glukozidaza, N-acetil- β -glukozaminidaza, α - i β -galaktozidaza, β -glukuronidaza, pirazin-amidaza, alkalna fosfatasa, esteraza-lipaza, lipaza, leucin-arilamidaza, valin-arilamidaza, naftol-AS-BI-fosfohidrolaza.

- Upotrebom 2D GCxGC-MS tehnike je određivan masnokiselinski profil ukupnih lipida izolovane bakterije, od kojih su dominantno prisutni bili *ai-C15*, *i-C15*, *ai-C17*, *i-C17*, *i-C16*, *n-C16*, *n-C18* i C18:2 metil-estri masnih kiselina.
- Upotrebom MALDI-TOF MS tehnike je dobijen proteinski profil izolata CH-KOV3 koji predstavlja jedinstven "otisak prsta" i do danas je jedini publikovani spektar roda *Brachy bacterium*.
- Optimalna temperatura za produkciju polisaharida je 28 °C.
- pH vrednost je uticala na proizvodnju egzopolisaharida, a pri pH vrednosti 7 su dobijeni maksimalni prinosi proizvoda u svim intervalima uzorkovanja (24, 72 i 120 h).
- Najviši prinos egzopolisaharida je dobijen u podlogama sa početnom koncentracijom saharoze 500 g/L (45,2 g/L levana).
- Elementarna mikroanaliza izolovanog egzopolisaharida i njene vrednosti su pokazale da je polisaharid neutralan, prečišćen od proteina i nukleinskih kiselina (C:H:O / 39,04:6,74:54,22).
- Na osnovu totalne hidrolize egzopolisaharida pomoću trifluorsirćetne kiseline i određene negativne vrednosti specifične optičke rotacije ($[\alpha]^{25} = -38,5^\circ$, C=1,1 g/100 mL, H₂O) je zaključeno da je izolovani polisaharid fruktanskog tipa.
- Parcijalnom hidrolizom egzopolisaharida proizvedenog pomoću *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3 oksalnom kiselinom (0,125%) su nastali fruktooligosaharidni fragmenti dužine tri i više monosaharidnih jedinica. Proizvodima nastalim ovom reakcijom se pridaje posebna pažnja zbog njihovih karakteristika kao što su niska kaloričnost i nekancerogenost, a mogu delovati i kao prebiotici.
- Za izolovani egzopolisaharid određivana je dinamička odnosno kinematička viskoznost, a njihove vrednosti su iznosile $[\mu]^{25} = 1,1602 \text{ mPa} \times \text{s}$ i $[\nu]^{25} = 1,1581 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$, C=1,1 g/100 mL, H₂O. Ovakve vrednosti ukazuju na sferičan i kompaktni oblik polisaharida u rastvoru.
- Izolovani egzopolisaharid ima molekulsku masu veću od 10⁶ Da, što odgovara masi visokomolekulskih levana.
- FT-IR spektar izolovanog egzopolisaharida sadrži apsorpcione trake karakteristične za ugljenohidratne strukture.
- Dobijeni 1D NMR i 2D NMR (DEPT135, COSY i HSQC) spektroskopski podaci su identični podacima u literaturi za levanski tip polisaharida. ¹H NMR spektar se sastoji iz sedam glavnih protonskih signala koji potiču od β-fruktofuranoznih jedinica, a dobijena hemijska pomeranja u ¹³C NMR spektru su vrlo slična pomeranjima za levane čiji su producenti rodovi *Bacillus*, *Brachy bacterium*, *Gluconobacter*, *Kozakia* i *Neoasai*. DEPT spektar egzopolisaharida prikazuje intenzivne signale koji potiču od CH protona na C-5, C-3 i C-4 ugljenicima i signale koji pripadaju CH₂ protonima na C-6 i C-1 ugljenicima. 2D H-H COSY NMR snimljeni spektar

egzopolisaharida je sadržao sledeće korelacije: H6a/H6b, H5/H6b, H4/H5 i H3/H4, a iste su istaknute i u prethodno publikovanim studijama levana. U 2D hetero korelacionom spektru HSQC identifikovane su tačke koje prikazuju korelacije H5 i C5; H6a i H6b/C6; H1a i H1b/C1; H3/C3 kao i H4/C4.

- Rezultati metilacione analize ukazuju da je glavni lanac egzopolisaharida sačinjen od fruktofuranoznih jedinica vezanih (2,6) vezama. Prisustvo male količine di-O-metil-fruktoze (oko 11%) ukazuje na umereno račvanje egzopolisaharida. Glavni lanac polimera je supstituisan na poziciji O-1 jednom D-fruktofuranozom (oko 11%).

6. LITERATURA

- Abarquero**, D., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology* **57** (2022) 16. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15227>
- Abdalla**, A. K., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., et al, Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity. *Frontiers in Microbiology* **12** (2021) 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664395>
- Abdel-Fattah**, M. A., Gamal-Eldeen, M. A., Helmy, A. W., Esawy, A. M., Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydrate Polymers* **89** (2012) 314. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.041>
- Adeleye**, A. O., Nkereuwem, M. E., Omokhudu, G. I., Amoo, A. O., Shiaka, G. P., et al, Effect of microorganisms in the bioremediation of spent engine oil and petroleum related environmental pollution. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* **22** (2018) 157. <https://dx.doi.org/10.4314/jasem.v22i2.1>
- Ajona**, M., Vasanthi, P., Bioremediation of petroleum contaminated soils – A review. *Materials Today: Proceedings* **45** (2021) 7117. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.949>
- Al-Sayegh**, A., Al-Wahaibi, Y., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., et al, Microbial enhanced heavy crude oil recovery through biodegradation using bacterial isolates from an Omani oil field. *Microbial Cell Factories* **14** (2015) 141. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0330-5>
- Amir**, S., Jouraiphy, A., Meddich, A., Gharous, E. M., Winterton, P., et al, Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Journal of Hazardous Materials* **177** (2010) 524. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.064>
- Andrew**, M., Jayaraman, G., Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate Research* **487** (2020) 107881. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107881>
- Ates**, O., Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **3** (2015) 200. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>
- Avdalović**, J., Beškoski, V., Gojgić-Cvijović, G., Mattinen, M. L., Stojanović, M., et al, Microbial solubilization of phosphorus from phosphate rock by iron-oxidizing *Acidithiobacillus* sp. B2. *Minerals Engineering* **72** (2015) 17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2014.12.010>
- Avdalović**, J., Đurić, A., Miletić, S., Ilić, M., Milić J., et al, Treatment of a mud pit by bioremediation. *Waste Management and Research* **34** (2016) 734. <https://doi.org/10.1177/0734242X16652961>
- Banjac**, M., Ramić, B., Lilić, D., Pantić, A., Energy in Serbia 2013. Republic of Serbia, The Ministry of Mining and Energy, Department of Strategic Planning in Energy Sector, Belgrade, Serbia, 2013. <https://biogas.org.rs/wp-content/uploads/2019/11/Brosura-Energija-u-Srbiji-2013..pdf> (Pristupljeno 09.05.2022.)
- Beškoski**, V. P., Takić, M., Milić, J., Ilić, M., Gojgić-Cvijović, G., et al, Change of isoprenoids, steranes and terpanes during ex situ bioremediation of mazut on the industrial scale. *Journal of the Serbian Chemical Society* **75** (2010) 1605. <https://doi.org/10.2298/JSC100505091B>
- Beškoski**, V. P., Gojgić-Cvijović, G., Milić, J., Ilić, M., Miletić, S., et al, *Ex situ* bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – A field experiment. *Chemosphere* **83** (2011) 34. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.020>
- Beškoski**, V. P., Gojgić-Cvijović, G., Milić, J., Ilić, M., Miletić, S., i saradnici, Bioremedijacija zemljišta kontaminiranog naftom i naftnim derivatima: mikroorganizmi, putanje razgradnje, tehnologije. *Hemijaska Industrija* **66** (2012) 275. <https://doi.org/10.2298/HEMIND110824084B>

- Beškosi**, V. P., Takemine, S., Nakano, T., Slavković Beškosi, L., Gojgić-Cvijović, G., et al, Perfluorinated compounds in sediment samples from the wastewater canal of Pančevo (Serbia) industrial area. *Chemosphere* **91** (2013) 1408.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.079>
- Biswas**, R., Sarkar, A., ‘Omics’ tools in soil microbiology: The state of the art. In: Adhya, T. K., Lal, B., Mohapatra, B., Paul, D., Das, S. (eds.), *Advances in soil microbiology: Recent trends and future prospects, Microorganisms for sustainability 3, Volume 1: Soil-microbe interaction*, Springer Nature, Singapore, 2018, pp. 35. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6178-3_3
- Blagodatskaya**, E., Kuzyakov, Y., Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry* **67** (2013) 192.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024>
- Bolyen**, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., et al, QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *PeerJ Preprints* (2018).
<https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>
- Bossert**, I. D., Shor, L. M., Kosson, D. S., Methods for measuring hydrocarbon biodegradation in soils. In: Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach L. D. (eds.), *Manual of environmental microbiology*, 2nd ed., ASM Press, Washington DC, 2002, pp. 343.
- Boussen**, S., Sghaier, D., Chaabani F., Jamoussi, B., Messaoud, S. B., et al, The rheological, mineralogical and chemical characteristic of the original and the Na₂CO₃-activated Tunisian swelling clay (Aleg Formation) and their utilization as drilling mud. *Applied Clay Science* **118** (2015) 344.
<https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.10.017>
- Brown**, L. D., Cologgi, D. L., Gee, K. F., Ulrich, A. C., Bioremediation of oil spills on land. In: Fingas, M. (ed.), *Oil spill science and technology*, 2nd ed., Gulf Professional Publishing, 2017, pp. 699.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809413-6.00012-6>
- Bouallegue**, A., Casillo, A., Chaari, F., La Gatta, A., Lanzetta, R., et al, Levan from a new isolated *Bacillus subtilis* AF17: Purification, structural analysis and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules* **144** (2020) 316. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.108>
- Buczolits**, S., Busse, H. J., Genus II. *Brachybacterium* Collins, Brown and Jones 1988, 46VP. In: Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., et al, (eds.), *Bergey’s manual of systematic bacteriology. The Actinobacteria, Part A and B, vol 5, 2nd ed.*, Springer, New York, 2012, pp.730. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>
- Cassidy**, D., Irvine, R. L., Interaction between organic contaminants and soil affecting bioavailability. In: Irvine, R. L., Sikdar, S. K. (eds.), *Fundamentals and applications of bioremediation: Principles*, Technomic publishing, Lancaster, Pennsylvania, 1998, pp. 259. ISBN:1-56676-308-8
- Castaldi**, P., Alberti, G., Merella, R., Melis, P., Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Management* **25** (2005) 209. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2004.12.011>
- Castillo**, M. A., Felis, N., Aragón, P., Cuesta, G., Sabater, C., Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* **58** (2006) 196. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.020>
- Chandra**, S., Sharma, R., Singh, K., Sharma, A., Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology* **63** (2013) 417.
<https://doi.org/10.1007/s13213-012-0543-3>
- Chaplin**, M. F., Monosaccharides. In: Chaplin, M. F., Kennedy J. F. (eds.), *Carbohydrate analysis: A practical approach*, IRL Press, Oxford, England, 1986, pp. 1. ISBN 0947946446
- Circic**, J., Oostland, J., De Vries, J. W., Woortman, A. J. J., Loos, K., Size exclusion chromatography with multi detection in combination with matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight

mass spectrometry as a tool for unravelling the mechanism of the enzymatic polymerization of polysaccharides. *Analytical Chemistry* **84** (2012) 10463. <https://doi.org/10.1021/ac302704q>

Ciucanu, I., Kerek, F., A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrates Research* **131** (1984) 209. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85242-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8)

Colin, V. L., Pereira, C. E., Villegas, L. B., Amoroso, M. J., Abate, C. M., Production and partial characterization of bioemulsifier from a chromium-resistant actinobacteria. *Chemosphere* **90** (2013) 1372. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.002>

Cooper, D. G., Goldenberg, B. G., Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **53** (1987) 224. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>

Čučak, D. I., Spasojević, J. M., Babić, O. B., Maletić, S. P., Simeunović, J. B., et al, A chemical and microbiological characterization and toxicity assessment of the Pančevo industrial complex wastewater canal sediments, Serbia. *Environmental Science and Pollution Research* **24** (2017) 8458. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8513-8>

Dahech, I., Belghith, K. S., Belghith, H., Mejdoub, H., Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules* **51** (2012) 329. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.04.030>

Dahech, I., Fakhfakh, J., Damak, M., Belghith, H., Mejdoub, H., et al, Structural determination and NMR characterization of a bacterial exopolysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules* **59** (2013) 417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.036>

Das, R., Kazy, S. K., Microbial diversity, community composition and metabolic potential in hydrocarbon contaminated oily sludge: prospects for *in situ* bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research* **21** (2014) 7369. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2640-2>

Delegan, Y., Kocharovskaya, Y., Frantsuzova, E., Streletskii, R., Vetrova, A., Characterization and genomic analysis of *Gordonia alkanivorans* 135, a promising dibenzothiophene-degrading strain. *Biotechnology Reports* **29** (2021) e00591. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00591>

Devi, S. P., Jani, K., Sharma, A., Jha, D. K., Bacterial communities and their bioremediation capabilities in oil-contaminated agricultural soils. *Environmental Monitoring and Assessment* **194** (2022). <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09669-9>

Djurić, A., Gojgić-Cvijović, G., Jakovljević, D., Kekez, B., Stefanović Kojić, J., et al, *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 isolated from an oil-polluted environment—a new producer of levan. *International Journal of Biological Macromolecules* **104** (2017) 311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.034>

Dridi, B. B., Drancourt, M., Characterization of prokaryotes using MALDI-TOF mass spectrometry. In: Rainey, F., Oren, A. (eds.), *Methods in microbiology, taxonomy of prokaryotes*, vol. 38, Academic Press, London, 2011, pp. 283. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00013-9>

DSMZ. <https://lpsn.dsmz.de/genus/brachybacterium> (Pristupljeno 07.04.2022.)

Du, J., Liu, J., Jia, T., Chai, B., The relationships between soil physicochemical properties, bacterial communities and polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soils proximal to coking plants. *Environmental Pollution* **298** (2022) 118823. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118823>

DUTCH. Ministry of Housing Spatial Planning and the Environment, 2000

Feng, L., Jiang, X., Huang, Y., Wen, D., Fu, T., et al, Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid. *Environmental Pollution* **273** (2021) 116476. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116476>

Fink, J. K., *Petroleum engineer's guide to oil field chemicals and fluids.* Elsevier, Oxford, 2012, pp. 1. ISBN 978-0-12-383844-5

Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A. M., Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* **29** (2011) 388. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>

Frickmann, H., Zautner, A. E., Moter, A., Kikhney, J., Hagen, R. M., et al, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology* **43** (2017) 263. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2016.1169990>

García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Polo, A., A comparative chemical-structural study of fossil humic acids and those extracted from urban wastes. *Resources, Conservation and Recycling* **6** (1992) 231. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(92\)90033-X](https://doi.org/10.1016/0921-3449(92)90033-X)

Gojgić-Cvijović, G., Vrvić M. M., Praktikum za mikrobiološku hemiju. Praktikum, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2003. ISBN 86-81405-15-2

Gojgić-Cvijović, G., Milic, J., Solevic, T., Beskoski, V., Ilic, M., et al, Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation* **23** (2012) 1. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9481-1>

Gojgić-Cvijović, G. D., Jakovljević, D. M., Loncarević, B. D., Todorović, N. M., Pergal, M. V., et al, Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *International Journal of Biological Macromolecules* **121** (2019) 142. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.019>

Gontia, I., Kavita, K., Schmid, M., Hartmann, A., Jha, B., *Brachybacterium saurashtrense* sp. nov., a halotolerant root-associated bacterium with plant growth-promoting potential. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61** (2011) 2799. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023176-0>

GOOGLE MAPS. <https://www.google.com/maps> (Pristupljeno 09.05.2022.)

Gopal, S., Deller, N. Precision bombing, widespread harm two case studies of the bombings of industrial facilities at Pancevo and Kragujevac during operation Allied force, Yugoslavia 1999. <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/BD0C292CAB9B6018C1256C7E00566161-iever-yug-05nov.pdf> (Pristupljeno 09.05.2022.)

Grinev, V. S., Tregubova, K. V., Anis'kov, A.A., Sigida, E. N., Shirokov, A. A., et al, Isolation, structure, and potential biotechnological applications of the exopolysaccharide from *Paenibacillus polymyxa* 92. *Carbohydrate Polymers* **232** (2020) 115780. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115780>

Groysman, A., Corrosion in systems for storage and transportation of petroleum products and biofuels: Identifications, monitoring and solutions, Springer, Dordrecht, Netherlands, 2014, pp. 1. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7884-9>

Habib, S., Ahmad, S. A., Johari, W. L. W., Shukor, M. Y. A., Yasid, N. A., Bioremediation of petroleum hydrocarbon in Antarctica by microbial species: An overview. *Pertanika Journal of Science and Technology* **26** (2018) 1. ISSN 0128-7680 [http://www.pertanika.upm.edu.my/Pertanika%20PAPERS/JST%20Vol.%2026%20\(1\)%20Jan.%202018/01%20JST-0684-2016-3rdProof.pdf](http://www.pertanika.upm.edu.my/Pertanika%20PAPERS/JST%20Vol.%2026%20(1)%20Jan.%202018/01%20JST-0684-2016-3rdProof.pdf)

Hamidi, M., Okoro, O. V., Milan, P. B., Khalili, M. R., Samadian, H., Fungal exopolysaccharides: Properties, sources, modifications, and biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **284** (2022) 119152. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119152>

Haouas, A., Modafar C. E., Douira, A., Ibsouda-Koraichi, S., Filali-Maltouf, A., et al, Evaluation of the nutrients cycle, humification process, and agronomic efficiency of organic wastes composting enriched with phosphate sludge. *Journal of Cleaner Production* **302** (2021) 127051. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127051>

He, Z., Gentry, T. J., Schadt, C. W., Wu, L., Lievich, J., et al, GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *The ISME (International Society for Microbial Ecology) Journal* **1** (2007) 67. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.2>

Head, M., Jones, D. M., Larter, S. R., Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* **426** (2003) 344. <https://doi.org/10.1038/nature02134>

Heine, T., Zimmerling, J., Ballmann, A., Kleeberg, S. B., Rückert, C., et al, On the enigma of glutathione-dependent styrene degradation in *Gordonia rubripertincta* CWB2. *Applied and Environmental Microbiology* **84** (2018) e00154-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00154-18>

Henner, P., Schiavon, M., Morel, J. L., Lichtfouse, E., Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Analisis* **25** (1997) 56.

Hibbert, H., Tipson, R. S., Brauns, F., Studies on the reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXIV. The constitution of levan and its relation to inulin. *Canadian Journal of Research* **4** (1931) 221. <https://doi.org/10.1139/cjr31-014>

Hou, T.-Y., Chiang-Ni, C., Teng, S.-H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of food and drug analysis* **27** (2019) 404. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>

Ilić, M., Transformacije zagađivača naftnog tipa u procesu simulacije biodegradacije u laboratorijskim aerobnim uslovima. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2011.

Imam, A., Suman, S. K., Ghosh, D., Kanaujia P.K., Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *Trends in Analytical Chemistry* **118** (2019) 50. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.023>

Imam, A., Kanaujia, P. K., Ray, A., Suman, S. K., Removal of petroleum contaminants through bioremediation with integrated concepts of resource recovery: A review. *Indian Journal of Microbiology* **61** (2021) 250. <https://doi.org/10.1007/s12088-021-00928-4>

IMET, 2006. D'Appolonia, Implementation of the Pančevo Action Programme (Phase II), Final Report, vol. IX, Clean Up of the Pančevo Canal, Italian Ministry of the Environment and Territory.

Imron, M. F., Kurniawan, S. B., Ismail, N. I., Abdullah, S. R. S., Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. *Journal of Cleaner Production* **251** (2020) 119716. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119716>

INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCE SOCIETY. <http://humic-substances.org/> (Pristupljeno 09.05.2022.)

ISO 11465:1993. Soil quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — gravimetric method.

ISO 10693:1995. Soil quality – Determination of carbonate content – volumetric method. Geneve.

ISO 11274:1998. Soil quality – Determination of the water-retention characteristic – laboratory methods, Geneve.

ISO 5073:1999. Brown coals and lignites — Determination of humic acids.

ISO 10381-1:2002. Soil quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

ISO/DIS 10390:2002. Soil Quality – Determination of pH. Geneve.

ISO 16703:2004. Soil quality – Determination of content of hydrocarbon in the range C₁₀ to C₄₀ by gas chromatography, Geneve.

Jakob, F., Pfaff, A., Novoa-Carballal, R., RübSam, H., Becker, T., et al, Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydrate Polymers* **92** (2013) 1234. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.054>

Jakovljević, M., Pantović, D., Blagojević, S., Određivanje sadržaja mikroelemenata u zemljištu metodom atomske apsorpcione spektroskopije, Praktikum iz hemije zemljišta i voda. Praktikum, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1985, pp. 40.

- Jakovljević, M., Pantović, M., Hemija zemljišta i voda.** Poljoprivredni fakultet, Naučna knjiga, Beograd, 1991
- Jednak, T., Avdalović, J., Miletić, S., Slavković-Beškoski, L., Stanković, D., et al,** Transformation and synthesis of humic substances during bioremediation of petroleum hydrocarbons. *International Biodeterioration and Biodegradation* **122** (2017) 47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.009>
- Jin, D., Kong, X., Liu, H., Wang, X., Deng, Y., et al,** Characterization and genomic analysis of a highly efficient dibutyl phthalate-degrading bacterium *Gordonia* sp. strain QH-12. *International Journal of Molecular Sciences* **17** (2016) 1012. <https://doi.org/10.3390/ijms17071012>
- Johnston, A., Crombie, A. T., El Khawand, M., Sims, L., Whited, G.M., et al,** Identification and characterisation of isoprene-degrading bacteria in an estuarine environment. *Environmental Microbiology* **19** (2017) 3526. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13842>
- Joshi, S., Desai, A.,** Biosurfactant's role in bioremediation of NAPL and fermentative production. In: Sen, R. (ed.), *Biosurfactants. Advances in experimental medicine and biology*, Springer, New York, 2010, pp. 222. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_17
- Jovančičević, B., Antić, M., Šolević, T., Vrvic, M., Kronimus, A., et al,** Investigation of interactions between surface water and petroleum-type pollutants. *Environmental Science and Pollution Research* **12** (2005) 205. <https://doi.org/10.1065/espr2004.12.229>
- Jovančičević, B., Antić, M., Pavlović, I., Vrvic, M., Beškoski, V., et al,** Transformation of petroleum saturated hydrocarbons during soil bioremediation experiments. *Water, Air, and Soil Pollution* **190** (2008) 299. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9601-z>
- Kanaujiya, D. P., Sivashanmugam, S., Pakshirajan, K.,** Biodegradation and toxicity removal of phthalate mixture by *Gordonia* sp. in a continuous stirred tank bioreactor system. *Environmental Technology and Innovation* **26** (2022) 102324. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102324>
- Katsivela, E., Moore, E. R. B., Maroukli, D., Strömpl, C., Pieper, D., et al,** Bacterial community dynamics during *in situ* bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. *Biodegradation* **16** (2005) 169. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-4883-y>
- Kekez, B. D., Gojgic-Cvijovic, G. D., Jakovljevic, D. M., Stefanovic Kojic, J. R., Markovic, M. D., et al,** High levan production by *Bacillus licheniformis* NS032 using ammonium chloride as the sole nitrogen source. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **175** (2015) 3068. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1475-8>
- Kekez, B., Gojgić-Cvijović, G., Jakovljević, D., Pavlović, V., Beškoski, V., et al,** Synthesis and characterization of a new type of levan-graft-polystyrene copolymer. *Carbohydrate Polymers* **154** (2016) 20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.001>
- Khalid, F. E., Lim, Z. S., Sabri, S., Gomez-Fuentes, C., Zulkharnain, A., et al,** Bioremediation of diesel contaminated marine water by bacteria: A review and bibliometric analysis. *Journal of Marine Science and Engineering* **9** (2021) 155. <https://doi.org/10.3390/jmse9020155>
- Kim, H. O., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, S. W., Hwang, H. J., et al,** Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology* **96** (2005) 1175. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.021>
- Kisic, I., Mesic, S., Basic, F., Brkic, V., Mesic, M., et al,** The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. *Geoderma* **149** (2009) 209. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.11.041>
- Klyne, W., Part II: The determination of molecular pattern, Optical rotation.** In: Braude, E. A., Nachod, F. C. (eds.), *Determination of organic structures by physical methods*, Academic Press Inc., New York, 1955, pp. 73.

- Kokal**, S. L., Crude oil emulsions. In: Fanchi, J. R., (ed.), Petroleum engineering handbook, Vol. I. Richardson, TX: Society of petroleum engineers, 2006, pp. 533.
- Kumar**, A. S., Mody, K., Jha, B., Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of Basic Microbiology* **47** (2007) 103. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610203>
- Kumar**, V., Singh, S., Shahi, S. K., Bioremediation: An eco-sustainable approach for restoration of contaminated sites. In: Singh, J., Sharma, D., Kumar, G., Sharma, N. (eds.), Microbial bioprospecting for sustainable development, Springer, Singapore, 2018, pp. 115. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_6
- Kumar**, L., Chugh, M., Kumar, S., Kumar, K., Sharma J., et al, Remediation of petrorefinery wastewater contaminants: A review on physicochemical and bioremediation strategies. *Process Safety and Environmental Protection* **159** (2022) 362. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.01.009>
- Kuppusamy**, S., Maddela, N. R., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., An overview of total petroleum hydrocarbons. In: Kuppusamy, S., Maddela, N. R., Megharaj, M., Venkateswarlu, K. (eds.), Total petroleum hydrocarbons: Environmental fate, toxicity, and remediation, Springer, Cham, Switzerland, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-24035-6>
- Lagos** M. L., Maruyama, F., Nannipieri, P., Mora, M. L., Ogram, A., et al, Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini–review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **15** (2015) 504. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000042>
- Lipczynska-Kochany**, E., Humic substances, their microbial interactions and effects on biological transformations of organic pollutants in water and soil: A review. *Chemosphere* **202** (2018) 420. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.104>
- Liu**, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., et al, Production, characterization and antioxidant activities *in vitro* of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers* **78** (2009) 275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.046>
- Liu**, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., et al, Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresource Technology* **101** (2010) 5528. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.151>
- Lješević**, M., Gojgić-Cvijović, G., Ieda, T., Hashimoto, S., Nakano, T., et al, Biodegradation of the aromatic fraction from petroleum diesel fuel by *Oerskovia* sp. followed by comprehensive GC×GC-TOF MS. *Journal of Hazardous Materials* **363** (2019) 227. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.005>
- Macaulay**, B. M., Rees, D., Bioremediation of oil spills: A review of challenges for research advancement. *Annals of Environmental Science* **8** (2014) 9. ISSN 1939-2621
- Madhavi**, A., Srinivasulu, M., Rangaswamy, V., Microbes and their role in bioremediation of soil: A detailed review. In: Malik, J. A. (ed.), Handbook of research on microbial remediation and microbial biotechnology for sustainable soil, IGI Global, Hershey PA, USA, 2021, pp. 65. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-7062-3.ch003>
- Madigan**, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, D. H., Stahl, D. A., Brock biology of microorganism, 15th ed., Pearson, 2019. ISBN 978-1292235226
- Malla**, M. A., Dubey, A., Yadav, S., Kumar, A., Hashem, A., et al, Understanding and designing the strategies for the microbe-mediated remediation of environmental contaminants using omics approaches. *Frontiers in Microbiology* **9** (2018) 1132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01132>
- Manojlović**, M., Čabilovski, R., Praktikum iz agrohemije. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2020. ISBN 978-86-7520-486-2

Marco, D. E., Abram, F., Editorial: Using genomics, metagenomics and other “omics” to assess valuable microbial ecosystem services and novel biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology* **10** (2019) 151. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00151>

Matulová, M., Husárová, S., Capek, P., Sancelme, M., Delort, A. M., NMR structural study of fructans produced by *Bacillus* sp. 3B6, bacterium isolated in cloud water. *Carbohydrate Research* **346** (2011) 501. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.012>

McIlroy, S. J., Saunders, A. M., Albertsen, M., Nierychlo, M., McIlroy, B., et al, MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. *Database* 2015 (2015) 1. <https://doi.org/10.1093/database/bav062>

Minnikin, D. E., Alshamaony, L., Goodfellow, M., Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *Journal of General Microbiology* **88** (1975) 200. <https://doi.org/10.1099/00221287-88-1-200>

Morales-Martínez, Y., López-Cuellar, M. del R., Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Hernández, A. I., Rheological behaviour of acetylated pectins from cactus pear fruits (*Opuntia albicarpa* and *O. matudae*). *Food Hydrocolloids* **85** (2018) 110. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.009>

Moussa, T. A. A., Al-Qaysi, S. A. S., Thabit, Z. A., Kadhem, S. B., Microbial levan from *Brachybacterium phenoliresistens*: characterization and enhancement of production. *Process Biochemistry* **57** (2017) 9. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.008>

Muthukumar, B., Parthipan, P., AlSalhi, M. S., Prabhu, N. S., Rao, T. N., et al, Characterization of bacterial community in oil-contaminated soil and its biodegradation efficiency of high molecular weight (>C40) hydrocarbon. *Chemosphere* **289** (2022) 133168. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133168>

Naap, A. P., Allebrandt, S. R., Pereira, J. E. S., Streit, R. S. A., Bücker, F., Scale-up treatment of petroleum hydrocarbon-contaminated soil using a defined microbial consortium. *International Journal of Environmental Science and Technology* (2021). <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03467-z>

Nadzir, M.M., Nurhayati, R. W., Idris, F. N., Nguyen, M. H., Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: A review. *Polymers* **13** (2021) 530. <https://doi.org/10.3390/polym13040530>

Nannipieri, P., Ascher-Jenull, J., Ceccherini, M. T., Pietramellara, G., Renella, G., et al, Beyond microbial diversity for predicting soil functions: A mini review. *Pedosphere* **30** (2020) 5. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60824-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60824-6)

Needs, P. W., Selvendran, R. R., Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. *Carbohydrates Research* **245** (1993) 1. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)80055-J](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)80055-J)

Nicolaus, B., Kambourova, M., Toksoy Oner, E., Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology* **31** (2010) 1145. <https://doi.org/10.1080/09593330903552094>

O’Brien, P. L., DeSutter, T. M., Casey, F. X. M., Wick, A. F., Khan, E., Evaluation of soil function following remediation of petroleum hydrocarbons—a review of current remediation techniques. *Current Pollution Reports* **3** (2017) 192. <http://dx.doi.org/10.1007/s40726-017-0063-7>

Okoh, E., Yelebe, Z. R., Oruabena, B., Nelson, E. S., Indiamawe, O. P., Clean-up of crude oil-contaminated soils: bioremediation option. *International Journal of Environmental Science and Technology* **17** (2020) 1185. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02605-y>

Öner, E. T., Hernández, L., Combie, J., Review of levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances* **34** (2016) 827. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>

- Ortiz-Soto**, M. E., Porras-Dominguez, J. R., Seibel, J., Lopez-Munguia, A., A close look at the structural features and reaction conditions that modulate the synthesis of low and high molecular weight fructans by levansucrases. *Carbohydrate Polymers* **219** (2019) 130. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.014>
- Ossai**, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., Hamid, F. S., Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology and Innovation* **17** (2020) 100526. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>
- Paetz**, A., Wilke, B.-M., Soil sampling and storage. In: Margesin, R., Schinner, F., (eds.), Manual for soil analysis-monitoring and assessing soil bioremediation, Springer, Berlin, 2005, pp. 1. ISBN 978-3-540-25346-4
- Pajaczkowska**, J., Sulkowska, A., Sulkowski, W., Jedrzejczyk, M., Spectroscopic study of the humification process during sewage sludge treatment. *Journal of Molecular Structure* **651-653** (2003) 141. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(03\)00103-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(03)00103-0)
- Pansu**, M., Gautheyrou, J. (eds.), Handbook of soil analysis - mineralogical, organic and inorganic methods, Springer, Berlin, Nemačka, 2006. ISBN 978-3-540-31210-9
- Paul**, D., Kumar, S., Mishra, M., Parab, S., Banskar, S., et al, Molecular genomic techniques for identification of soil microbial community structure and dynamics. In: Adhya, T. K., Lal, B., Mohapatra, B., Paul, D., Das, S. (eds.), Advances in soil microbiology: Recent trends and future prospects, Microorganisms for sustainability 3, Springer, Singapore, 2018, pp. 9. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6178-3_2
- Pavel**, L.V, Gavrilesu, M., Overview of *ex situ* decontamination techniques for soil cleanup. *Environmental Engineering and Management Journal* **7** (2008) 815.
- Pearce**, K. N., Kinsella, J. E., Emulsifying proprieties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26** (1978) 716. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>
- Probst**, A. J., Lum, P. Y., John, B., Dubinsky, E. A., Piceno, Y. M., et al, Microarray of 16S rRNA gene probes for quantifying population differences across microbiome samples. In: He, Z. (ed.), Microarrays current technology, innovations and applications, Caister Academic Press, 2014, pp. 99.
- Prosser**, J. I., Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of ‘omics’ in soil microbial ecology. *Nature reviews Microbiology* **13** (2015) 439. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3468>
- Raju**, M. N., Scalvenzi, L., Petroleum degradation: promising biotechnological tools for bioremediation. In: Zoveidavianpoor, M. (ed.), Recent insights in petroleum science and engineering, InTech, Rijeka, 2018, pp. 351. <https://doi.org/10.5772/65538>
- Rana**, S., Upadhyay, L. S. B., Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **157** (2020) 577. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084>
- Rathore**, D. S., Sheikh, M., Singh, S. P., Marine Actinobacteria: New horizons in bioremediation. In: Prasad, R., Kumar, V., Singh, J., Upadhyaya, C. P. (eds.), Recent developments in microbial technologies. Springer Nature, Singapore, 2021, pp. 425. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4439-2>
- Ressler**, B. P., Kneifel, H., Winter, J., Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53** (1999) 85. <https://doi.org/10.1007/s002530051619>
- Restaino**, O. F., Finamore, R., Diana, P., Marseglia, M., Vitiello, M., et al, A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate. *Analytica Chimica Acta* **958** (2017) 59. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.005>

- Roberfroid** M. B., Health benefits of non-digestible oligosaccharides. In: Kritchevsky, M. B., Bonfield, C. (eds.), *Dietary fiber in health and disease*, Plenum Press, New York, 1997, volume 427, pp. 211.
- Rolf**, D., Gray, G. R., Analysis of the linkage positions in D-fructofuranosyl residues by the reductive-cleavage method. *Carbohydrates Research* **131** (1984) 17. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85399-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85399-9)
- Rühmann**, B., Schmid, J., Sieber, V., Fast carbohydrate analysis via liquid chromatography coupled with ultra violet and electrospray ionization ion trap detection in 96-well format. *Journal of Chromatography A* **1350** (2014) 44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.014>
- Rühmann**, B., Schmid, J., Sieber, V., Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology* **6** (2015a) 565. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00565>
- Rühmann**, B., Schmid, J., Sieber, V., High throughput exopolysaccharide screening platform: From strain cultivation to monosaccharide composition and carbohydrate fingerprinting in one day. *Carbohydrate Polymers* **122** (2015b) 212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.021>
- Ryzhov**, V., Fenselau, C., Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Analytical Chemistry* **73** (2001) 746. <https://doi.org/10.1021/ac0008791>
- Sánchez-Monedero**, M. A., Roig, A., Cegarra, J., Bernal, M. P., Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresource Technology* **70** (1999) 193. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00018-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00018-8)
- Savić**, J., Savić, M., Osnovi analitičke hemije: Klasične metode, Sarajevo, 1990, pp. 174.
- Schmid**, J., Sieber, V., Rehm, B., Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology* **6** (2015) 496. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>
- Schwarzbauer**, J., Jovančićević, B., Fossil matter in the geosphere. Springer, Cham, Switzerland, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11938-0>
- Shakya**, M., Verma, P., Kumar, S., Sandhu, S. S., Microbes: A novel source of bioremediation for degradation of hydrocarbons. In: Panpatte, D. G., Jhala, Y. K. (eds.), *Microbial rejuvenation of polluted environment: Volume 1, Microorganisms for sustainability 25*, Springer Nature, Singapore, 2021, pp. 247. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7447-4_10
- Shibulal**, B., Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., et al, Microbial enhanced heavy oil recovery by the aid of inhabitant spore-forming bacteria: an insight review. *The Scientific World Journal* **2014** (2014) 1. <https://doi.org/10.1155/2014/309159>
- Simms**, P. J., Boyko, W. J., Edwards, J. R., The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. *Carbohydrate Research* **208** (1990) 193. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)80099-O](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)80099-O)
- Sineli**, P. E., Tortella, G., Dávila Costa, J. S., Benimeli, C. S., Cuzzo, S. A., Evidence of α -, β - and γ -HCH mixture aerobic degradation by the native actinobacteria *Streptomyces* sp. M7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32** (2016) 81–89. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2037-0>
- SLUŽBENI GLASNIK SRBIJE**. Pravilnik o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje i metodama njihovog ispitivanja, 23/1994. <http://www.pravno-informacioni-sistem.rs/SlGlasnikPortal/eli/rep/sgrs/ministarstva/pravilnik/1994/23/1/reg> (Pristupljeno 09.05.2022.)
- Spiegel**, J. E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, V. H., Schmitt, D. F., Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technology (Chicago)* **48** (1994) 85.

- Stackebrandt, E.**, The family *Dermabacteraceae*. In: Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds.), *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 4th ed., Springer, Berlin Heidelberg, 2014, pp. 289. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_170
- Stefanović, J.**, Jakovljević, D., Gojgic-Cvijović, G., Lazić, M., Vrvic, M., Synthesis, characterization, and antifungal activity of nystatin-gum arabic conjugates. *Journal of Applied Polymer Science* **127** (2013) 4736. <http://dx.doi.org/10.1002/app.38084>
- Takeuchi, M.**, Fang, C. X., Yokota, A., Taxonomic study of the genus *Brachybacterium*: proposal of *Brachybacterium conglomeratum* sp. nov., nom. rev., *Brachybacterium paraconglomeratum* sp. nov., and *Brachybacterium rhamnsum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45** (1995) 160. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-160>
- Taylan, O.**, Yilmaz, M. T., Dertli, E., Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules* **136** (2019) 436. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.078>
- Tchobanian, A.**, Van Oosterwyck, H., Fardim, P., Polysaccharides for tissue engineering: Current landscape and future prospects. *Carbohydrate Polymers* **205** (2019) 601. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.039>
- TORLAK.** Suve podloge "Torlak" - Katalog. Torlak - Institut za imunologiju i virusologiju, Anonymus, 2010, Beograd.
- Uhlik, O.**, Strejcek, M., Junkova, P., Sanda, M., Hroudova, M., et al, Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time of flight mass spectrometry- and MALDI biotyper-based identification of cultured biphenyl-metabolizing bacteria from contaminated horseradish rhizosphere soil. *Applied and Environmental Microbiology* **77** (2011) 6858. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.05465-11>
- UNEP/UNCHS**, 1999. The Kosovo Conflict: Consequences for the Environment and Human Settlements, Final Report. <<https://postconflict.unep.ch/publications/finalreport.pdf> (Pristupljeno 09.05.2022.)
- Uzoigwe, C.**, Grant Burgess, J., Ennis, C. J., Rahman P. K. S. M., Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology* **6** (2015) 245. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245>
- Varjani, S.**, Upasani, V. N., Bioaugmentation of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 – A novel oily waste degrader for treatment of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* **319** (2021) 124240. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124240>
- Veerapandian, B.**, Shanmugam, S. R., Varadhan, S., Sarwareddy, K. K., Mani, K. P., et al, Levan production from sucrose using chicken feather peptone as a low cost supplemental nutrient source. *Carbohydrate Polymers* **227** (2020) 115361. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115361>
- Veil, A. J.**, Summary of offshore drilling waste disposal practices. US EPA, US Department of Energy, 1998. http://www.veilenvironmental.com/publications/oil/Data_summary.pdf.PDF (Pristupljeno 09.05.2022.)
- Volkman, J. K.**, Alexander, R., Kagi, R. I., Woodhouse, G. W., Demethylated hopanes in crude oils and their applications in petroleum geochemistry. *Geochimica Cosmochimica Acta* **47** (1983) 785. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(83\)90112-6](https://doi.org/10.1016/0016-7037(83)90112-6)
- Wang, J.**, Salem, D. R., Sani, R. K., Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate Polymers* **205** (2019) 8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.011>
- Wei, X.**, Peng, P., Meng, Y., Li, T. T., Fan, Z. P., et al, Degradation performance of petroleum-hydrocarbon degrading bacteria and its application in remediation of oil contaminated soil. *IOP*

- Conference Series: Earth and Environmental Science* **766** (2021) 012096. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/766/1/012096>
- Widehem**, P., Aït-Aïssa, S., Tixier, C., Sancelme, M., Veschambre, H., et al, Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2. *Chemosphere* **46** (2002) 527. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00192-8)
- Wilke**, B.-M., Determination of chemical and physical soil properties. In: Margesin, R., Schinner, F. (eds.), *Manual for soil analysis-monitoring and assessing soil bioremediation*, Springer, Berlin, 2005, pp. 47. ISBN 978-3-540-25346-4
- Xu**, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., et al, Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Frontiers in Microbiology* **9** (2018) 2885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>
- Yang**, Y., Li, H., Li, J., Variation in humic and fulvic acids during thermal sludge treatment assessed by size fractionation, elementary analysis, and spectroscopic methods. *Frontiers of Environmental Science and Engineering* **8** (2014) 854. <https://doi.org/10.1007/s11783-014-0755-9>
- Yang**, K., Miao, G., Wu, W., Lin, D., Pan, B., et al, Sorption of Cu²⁺ on humic acids sequentially extracted from a sediment. *Chemosphere* **138** (2015) 657. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.061>
- Young**, I. D., Latousakis, D., Juge, N., The immunomodulatory properties of β-2,6 fructans: A comprehensive review. *Nutrients* **13** (2021) 1309. <https://doi.org/10.3390/nu13041309>
- Yugi**, K., Kubota, H., Hatano, A., Kuroda, S., Trans-omics: How to reconstruct biochemical networks across multiple ‘omic’ layers. *Trends in Biotechnology* **34** (2016) 276. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.013>
- Žeradanin**, A., Avdalović, J., Lješević, M., Tešić, O., Miletić, S., et al, Evolution of humic acids during *ex situ* bioremediation on a pilot level – an added value of the microbial activity. *Journal of the Serbian Chemical Society* **85** (2020) 821. <https://doi.org/10.2298/JSC190916131Z>

A. BIOGRAFSKI PODACI O KANDIDATKINJI

Aleksandra (Negoslav) Žerađanin, devojačko Đurić, je rođena 07.05.1990. godine u Beogradu, Srbija. Osnovnu i srednju medicinsku školu završila je u Beogradu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2009. godine kao redovan student na odseku za biohemiju, a diplomirala u julu 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,13 i ocenom 10 na odbrani završnog rada (naziv rada „Levan soja *Brachy bacterium paraconglomeratum* – optimizacija produkcije i osnovna strukturna karakterizacija”). Školske 2013/14. upisala je master studije na studijskom programu „Diplomirani biohemičar-master“ na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i završila septembra 2014. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i ocenom 10 na odbrani master rada (naziv rada „Ispitivanje strukture i osobina levana dobijenog pomoću *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3”). Iste godine upisala je doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program doktor biohemijskih nauka i do sada položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00.

Aleksandra Žerađanin je od 2015. do zaposlenja 2017. godine bila stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u oblasti Hemija (Stipendija za studente doktorskih akademskih studija).

Od 2013. godine angažovana je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi. Kao istraživač pripravnik zaposlena je od 2017. godine u Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, na projektu III43004 finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Trenutno je učesnik na međunarodnom projektu finansiranom od strane Japanske agencije za međunarodnu saradnju (JICA), BioICEP i Solvay programima, a od septembra i deo tima koji će realizovati Twinning projekat. Aleksandra je i jedan od članova istraživačke grupe koja je nagrađena projektom u okviru poziva „Pokreni se za nauku” kompanije Filip Moris i Centra za razvoj liderstva.

B. OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE

Aleksandra Žerađanin je do sada prezentovala rezultate svog naučno-istraživačkog rada u 7 radova sa SCI liste od kojih 3 čine deo disertacije. Radovi se nalaze u sledećim kategorijama: jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (kategorija M21a), jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (kategorija M21), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorija M22) i četiri rada u međunarodnom časopisu (kategorija M23). Rezultati naučno-istraživačkog rada proistekli iz doktorske disertacije prezentovani su i u vidu 9 saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja.

Radovi u časopisima međunarodnog značaja koji su deo doktorske disertacije:

Radovi u časopisima međunarodnog značaja:

M21, Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. **Djurić, A.**, Gojgić-Cvijović, G., Jakovljević, D., Kekez, B., Stefanović Kojić, J., Mattinen, M.-L., Harju, I.E., Vrvić, M.M., Beškoski, V., *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3 isolated from an oil-polluted environment—a new producer of levan, *International Journal of Biological Macromolecules*, **104**, 2017, 311-321 (DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.034, IF₂₀₁₇ 3.909, Polymer Science 10/87)
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.034>

M22, Rad u istaknutom međunarodnom časopisu

1. Avdalović, J., **Đurić, A.**, Miletić, S., Ilić, M., Milić, J., Vrvić, M.M., Treatment of a mud pit by bioremediation, *Waste Management & Research*, **34**, 2016, 734-739 (DOI: 10.1177/0734242X16652961, IF₂₀₁₆ 1.803, Environmental Sciences 117/229)
<https://doi.org/10.1177/0734242X16652961>

M23, Rad u međunarodnom časopisu

1. **Žerađanin, A.**, Avdalović, J., Lješević, M., Tešić, O., Miletić, S., Vrvić, M. M., Beškoski, V., Evolution of humic acids during ex situ bioremediation on a pilot level – an added value of the microbial activity, *Journal of Serbian Chemical Society*, **85**(6), 2020, 821-830 (DOI: 10.2298/JSC190916131Z, IF₂₀₂₀ 1.240, Chemistry, Multidisciplinary 141/179)
<https://doi.org/10.2298/JSC190916131Z>

Ostali radovi u časopisima međunarodnog značaja:

M21a, Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. Joksimović, K., **Žerađanin, A.**, Randjelović, D., Avdalović, J., Miletić, S., Gojgić-Cvijović, G., Beškoski, V., Optimization of microbial fuel cell operation using Danube River sediment; *Journal of Power Sources* **475**, 2020, 228739 (DOI: [10.1016/j.jpowsour.2020.228739](https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2020.228739), IF₂₀₂₀ 9.127, Material Science, Multidisciplinary 45/334)

<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2020.228739>

M23, Rad u međunarodnom časopisu

1. **Žerađanin, A.**, Joksimović, K., Avdalović, J., Gojgić-Cvijović, G., Nakano, T., Miletić, S., Ilić, M., Beškoski, V., Bioremediation of river sediment polluted with polychlorinated biphenyls: A laboratory study. *Journal of the Serbian Chemical Society* **87**(1), 2022, 95-107 (DOI: [10.2298/JSC211217113Z](https://doi.org/10.2298/JSC211217113Z), IF₂₀₂₀ 1.240, Chemistry, Multidisciplinary 141/179)

<https://doi.org/10.2298/JSC211217113Z>

2. Marić, N., Štrbački, J., Polk, J., Beškoski Slavković, L., Avdalović, J., Lješević, M., Joksimović, K., **Žerađanin, A.**, Beškoski, V.P. Spatial-temporal assessment of hydrocarbon biodegradation mechanisms at a contaminated groundwater site in Serbia. *Chemistry and Ecology* **38**, 2022 (DOI: [10.1080/02757540.2021.2017903](https://doi.org/10.1080/02757540.2021.2017903), IF₂₀₂₀ 2.244, Environmental Sciences 188/274, Ecology 95/166)

<https://doi.org/10.1080/02757540.2021.2017903>

3. Miletić, S., Avdalović, J., Milić, J., Ilić, M., **Žerađanin, A.**, Joksimović, K., Spasić, S., Oxidized humic acids from the soil of heat power plant. *Journal of Serbian Chemical Society*, **85**(3), 2020, 421-426 (DOI: [10.2298/JSC190726099M](https://doi.org/10.2298/JSC190726099M), IF₂₀₂₀ 1.240, Chemistry, Multidisciplinary 141/179)

<https://doi.org/10.2298/JSC190726099M>

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александра Жераћанин

Број индекса ДБ02/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биохемијска карактеризација бактерија изолованих из нафтом загађених локалитета и њихова примена за биоремедијацију и производњу егзополисахарида”

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

Потпис аутора

У Београду, 22.06.2022.

А. Жераћанин

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Александра Жераћанин**

Број индекса **ДБ02/2014**

Студијски програм **Биохемија**

Наслов рада **„Биохемијска карактеризација бактерија изолованих из нафтом загађених локалитета и њихова примена за биоремедијацију и производњу егзополисахарида”**

Ментор **др Владимир Бешкоски, редовни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета.**

др Јелена Авдаловић, виши научни сарадник Универзитета у Београду, Института за хемију, технологију и металургију, Института од националног значаја за Републику Србију

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

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

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

Потпис аутора

У Београду, 22.06.2022.

А. Жераћанин

образац изјаве о коришћењу

Изјава о коришћењу

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

„Биохемијска карактеризација бактерија изолованих из нафтом загађених локалитета и њихова примена за биоремедијацију и производњу егзополисахарида“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 22. 06. 2022.

А. Мерађашић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела