

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Ana B. Medić

**BIODEGRADACIJA *n*-ALKANA, POLIČIKLIČNIH
AROMATIČNIH UGLJOVODONIKA I FENOLA
KORIŠĆENJEM SOJA *Pseudomonas aeruginosa* SAN AI**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Ana B. Medić

**BIODEGRADATION OF *n*-ALKANES, POLYCYCLIC
AROMATIC HYDROCARBONS AND PHENOLS BY
STRAIN *Pseudomonas aeruginosa* SAN AI**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentori:

dr Ksenija Stojanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

dr Ivanka Karadžić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Medicinski fakultet

Članovi Komisije:

dr Branimir Jovančičević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

dr Vladimir Beškoski, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

dr Dubravka Relić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Katedre za hemiju u medicini Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Katedre za primenjenu hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Saradnja je proistekla iz želje da se povežu različiti aspekti eksperimentalnog rada, kako bi se napravila spona između hemije životne sredine i biohemije, sa sveobuhvatnim razumevanjem dobijenih rezultata.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Kseniji Stojanović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za priliku da pod njenim mentorstvom završim diplomski i master rad, i sada na kraju, doktorsku disertaciju. Hvala Vam na prenetom znanju, pomoći u radu, strpljenju i smernicama koje ste mi pružili. Mom drugom mentoru dr Ivanki Karadžić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pre svega želim da se zahvalim što je svojim neverovatnim znanjem, iskustvom i posebnom energijom učinila da razumem i zavolim biohemiju i omogućila da mnogo naučim i postanem bolji naučnik. Najlepše hvala na svim idejama i sugestijama koje su bile dovoljne da me pokrenu u trenucima kada nisam videla svetlo na kraju tunela.

Posebno se zahvaljujem članovima Komisije, dr Branimiru Jovančićeviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dr Vladimiru Beškoskom, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Dubravki Relić, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na nesebičnoj podršci tokom svih godina rada i pomoći prilikom izrade i pisanja disertacije.

Veliko hvala kolegamicama dr Mariji Lješević i dr Branki Lončarević sa Katedre za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pomoći prilikom GCxGC-MS i respiratorne analize. Hvala grupi redovnog profesora, Tatjane Simić sa Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pomoći prilikom izrade dvodimenzionalne gel elektroforeze i generisanja 2D mapa, posebno dr Sonji Šuvakov. Grupi redovnog profesora, Tanje Ćirković Veličković sa Katedre za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, posebno dr Katarini Smiljanić, hvala na pomoći prilikom obrade elektroforetskih gelova. Svim članovima laboratorije za masenu spektrometriju i funkcionalnu proteomiku (Odeljenje za fizičku hemiju) Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, dugujem zahvalnost za analizu proteoma. Na inicijalnoj saradnji za istraživanje metaboloma veliko hvala dr Biljani Šmit sa Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu. Zahvaljujem se svim kolegama sa Instituta za hemiju u medicini na pomoći i pozitivnoj atmosferi. Posebnu zahvalnost dugujem dr Lidiji Izrael-Živković na stručnoj pomoći prilikom LC-MS/MS analize, a pre svega na prijateljskim savetima i podršci. Takođe, hvala svim kolegama iz laboratorija 632 i 640 na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu na pomoći koju su mi pružili tokom eksperimentalnog rada.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na neizmernoj ljubavi i ogromnoj podršci koja me bezuslovno prati celog života. Bez vas sve ovo ne bi bilo moguće. Mom Boletu beskrajno hvala što je uz mene u svakom trenutku. Filipu hvala što postoji, što me razume i veruje u mene.

Na kraju, iako nisi tu, tvoji zagrljaji su tu – hvala ti!

SAŽETAK

Biodegradacija *n*-alkana, policikličnih aromatičnih ugljovodonika i fenola korišćenjem soja

***Pseudomonas aeruginosa* san ai**

Negativan uticaj organskih zagađujućih supstanci, uključujući naftu i njene derivate na ekosistem, kao i njihovi toksični efekti na biotu postaju sve veći problem na planeti Zemlji. Cilj ove studije je da se ispita potencijal poliekstremofilne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) san ai za degradaciju toksičnih supstanci: plastičnog aditiva, 2,6-di-*terc*-butilfenola (2,6-DTBP), *n*-alkana (*n*-heksadekana, *n*-nonadekana), policikličnih aromatičnih jedinjenja (fluorena, fenantrena, pirena) i frakcija nafte, kao složenih smeša ugljovodonika. Ispitivanje biodegradacije 2,6-DTBP pod različitim eksperimentalnim uslovima, kao što su: koncentracija 2,6-DTBP, veličina inokuluma, pH i temperatura pokazalo je da *P. aeruginosa* san ai efikasno degraduje ovo fenolno jedinjenje u širokom opsegu pH (5 – 8) i temperature (22 – 43 °C). Pri izlaganju različitim koncentracijama 2,6-DTBP od: 2, 10, 100 i 400 mg/L, *P. aeruginosa* san ai je degradovao 2,6-DTBP sa sledećom efikasnošću: 100 %, 100 %, 85 % i 18 %, redom, u toku 7 dana. Pored toga, pokazano je da sirovi enzimski ekstrakt dobijen iz biomase *P. aeruginosa* san ai ima veću efikasnost u uklanjanju 2,6-DTBP u odnosu na cele ćelije mikroorganizma. Katabolički put biorazgradnje 2,6-DTBP, kao i mehanizmi metaboličke adaptacije *P. aeruginosa* san ai pri rastu na ovom aromatičnom supstratu praćeni su analizom genoma, proteoma i metaboloma. Identifikovani su geni koji kodiraju proteine β -ketoacidne putanje razgradnje aromatičnih jedinjenja. Komparativna proteomska analiza *P. aeruginosa* san ai gajenog na 2,6-DTBP i suncokretovom ulju, pomoću nano tečne hromatografije visokih performansi sa tandem masenom spektrometrijom (nano LC-MS/MS), pokazala je povećanu sintezu enzima koji su uključeni u razgradnju aromatičnog prstena, čija je aktivnost potvrđena enzimskim testovima. Molekularni odgovor *P. aeruginosa* san ai pri degradaciji 2,6-DTBP se može sumirati kroz povećanu sintezu enzima uključenih u metabolizam aminokiselina, produkciju energije i glioksilatnu putanju, kao i enzima ćelijske membrane i stresa. Dobijeni genomski, enzimski i proteomski podaci su u saglasnosti i ukazuju da 2,6-DTBP može biti degradovan preko *orto*-razgradnje aromatičnog prstena.

Pored toga, pokazano je da *P. aeruginosa* san ai ima veliki kapacitet za degradaciju *n*-alkana, policikličnih aromatičnih ugljovodonika i njihovih složenih smeša, kao što su alifatična i aromatična frakcija nafte. *P. aeruginosa* san ai je uspešno degradovao: *n*-heksadekan, *n*-nonadekan, fluoren,

fenantren i piren (početne koncentracije 20 mg/L) sa sledećom efikasnošću: 80 %, 98 %, 96 %, 50 % i 41 %, redom, u toku 7 dana. Efikasnost degradacije frakcija nafte odgovara trećem do četvrtom stepenu na skali biodegradacije nafte, pri čemu je u alifatičnoj frakciji degradovana kompletna serija *n*-alkana, dok je u aromatičnoj frakciji u potpunosti degradovan fluoren i njegovi derivati, i skoro sav fenantren. Na osnovu metabolita identifikovanih pomoću gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) i dvodimenzionalne gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GCxGC-MS), zajedno sa genomskim i enzimskim podacima, može se zaključiti da su *n*-alkani metabolisani preko terminalnog puta oksidacije, dok je fluoren degradovan preko dva puta transformacije, ftalatnog i salicilatnog.

Na osnovu rezultata ove disertacije utvrđeno je da ekološki izolat *P. aeruginosa* san ai ima veoma dobar potencijal za bioremedijaciju područja kontaminiranih fenolnim jedinjenjima i naftnim ugljovodonicima, čak i u ekstremnim uslovima (alkalna sredina ili prisustvo teških metala). Pored toga, *P. aeruginosa* san ai i njegovi metaboliti mogu poslužiti i kao biomarkeri za prepoznavanje ranog zagađenja životne sredine.

Ključne reči: *Pseudomonas aeruginosa* san ai, 2,6-di-*terc*-butilfenol, *n*-alkani, policiklični aromatični ugljovodonici, nafta, biodegradacija, metaboliti.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Hemija životne sredine

ABSTRACT

Biodegradation of *n*-alkanes, polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols by strain

***Pseudomonas aeruginosa* san ai**

The negative impact of organic pollutants, including oil and its derivatives on the ecosystem, as well as their toxic effects on biota, have become a growing problem on the Planet Earth. The aim of present study is to examine the capacity of the polyextremophile *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) san ai for the degradation of toxic substances such as the plastic additive, 2,6-di-*tert*-butylphenol (2,6-DTBP), *n*-alkanes (*n*-hexadecane, *n*-nonadecane), polycyclic aromatic compounds (fluorene, phenanthrene, pyrene) and oil fractions, as complex mixtures of hydrocarbons. The biodegradation study of 2,6-DTBP under various experimental conditions, such as: 2,6-DTBP concentration, inoculum size, pH, and temperature showed that *P. aeruginosa* san ai efficiently degraded 2,6-DTBP in a wide range of pH (5.0 – 8.0) and temperature (22 – 43 °C). Under exposure to 2,6-DTBP concentrations of: 2, 10, 100 and 400 mg/L, the strain degraded: 100 %, 100 %, 85 % and 18 %, respectively for 7 days. In addition, the crude enzyme extract obtained from the biomass of *P. aeruginosa* san ai showed a higher efficiency in 2,6-DTBP removal than whole microbial cell. The catabolic pathway of 2,6-DTBP biodegradation, as well as the mechanisms of metabolic adaptation of the microorganism during growth on this aromatic substrate, were followed by genomics, proteomics and metabolomics analysis of *P. aeruginosa* san ai. The genes encoding the proteins of the β -ketoacid degradation pathway of aromatic compounds in *P. aeruginosa* san ai are identified. Comparative proteomic analysis of *P. aeruginosa* san ai grown on 2,6-DTBP and sunflower oil, using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano LC-MS/MS), showed an up regulation of aromatic ring cleavage enzymes which activity was confirmed by enzymatic tests. The core molecular response of *P. aeruginosa* san ai to 2,6-DTBP can be summarized as up regulation of proteins responsible for amino acids metabolism, energy production, proteins of a glyoxylate shunt, cell membrane and stress. The obtained genomic, enzymatic and proteomic data are in accordance and indicate that 2,6-DTBP could be *ortho*-cleaved.

Additionally, this study showed that *P. aeruginosa* san ai has a high degradation capacity for *n*-alkanes, polycyclic aromatic hydrocarbons and their complex mixtures such as aliphatic and aromatic fraction of oil. *P. aeruginosa* san ai successfully degraded: *n*-hexadecane, *n*-nonadecane, fluorene,

phenanthrene and pyrene with efficiency of 80 %, 98 %, 96 %, 50 % and 41 %, respectively, for 7 days, at initial concentration of 20 mg/L. The degradation efficiency of oil fractions corresponds to the third/fourth stage of the oil biodegradation scale, with the completely removed series of *n*-alkanes in aliphatic fraction, whereas in aromatic fraction all fluorene and its derivatives, and almost all phenanthrene were degraded. Based on the identified metabolites by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry (GCxGC-MS), along with genomic and enzymatic data, it can be concluded that the *n*-alkanes were metabolized via a terminal oxidation pathway while fluorene was degraded by salicylate and phthalate pathway.

The results of doctoral dissertation unambiguously indicated that *P. aeruginosa* san ai, an ecological isolate, has a high capacity for bioremediation of sites contaminated by phenolic compounds and oil hydrocarbons, including extreme conditions (alkaline environments or the presence of heavy metals). Also, *P. aeruginosa* san ai and its metabolites can serve as biomarkers for detection of early environmental pollution.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* san ai, 2,6-di-*tert*-butylphenol, *n*-alkanes, polycyclic aromatic hydrocarbons, crude oil, biodegradation, metabolites.

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Environmental Chemistry

SPISAK SKRAĆENICA

1D – Jednodimenzionalan
2D – Dvodimenzionalan
2,6-DTBP – 2,6-Di-*terc*-butilfenol
ACN – Acetonitril
BBQ – 2,6-Di-*terc*-butil-1,4-benzohinon
BH – Bushnell Hass
BHA – Bushnell Hass Agar
BSA – Goveđi serum albumin (*eng.*, bovine serum albumin)
BSM – Osnovni slani medijum (*eng.*, basal salt medium)
BSTFA – N,O-Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamid
C12O – Katehol 1,2-dioksigenaza
C23O – Katehol 2,3-dioksigenaza
CBB – Coomassie Brilliant Blue
CFU – Colony Forming Unit
CS – Captive Spray
CoA – Koenzim A
COG – Clusters of Orthologous Groups
DMSO – Dimetilsulfoksid
DPQ – 3,3',5,5'-Tetra-*terc*-butil-4,4'-difenohinon
DTT – 1,4-Ditiotreitol
EC broj – Enzyme Commission number
EPS – Egzopolisaharidi
ESI – Elektrosprej jonizacija (*eng.*, electrospray ionization)
FA – Mravlja kiselina (*eng.*, formic acid)
FLU – Fluoren
FMK – Fosfolipidne masne kiseline
GC – Gasna hromatografija (*eng.*, gas chromatography)
GCxGC-MS – Dvodimenzionalna gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (*eng.*, two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry)
GC-MS – Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (*eng.*, gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)
GCS – Glycine Cleavage System
HPLC – Tečna hromatografija visokih performansi (*eng.*, high performance liquid chromatography)
IMG – Integrated Microbial Genomes
KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB – Lurie-Bertani
MALDI – Matricom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija (*eng.*, matrix-assisted laser desorption/ionization)
MATH – Microbial Adhesion to Hydrocarbons
MSM – Mineralni slani medijum (*eng.*, mineral salt medium)
MS/MS – Tandem masena spektrometrija (*eng.*, tandem mass spectrometry)
n-C₁₆ – *n*-Heksadekan
n-C₁₉ – *n*-Nonadekan
NADH – Nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH – Nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat
NMR – Nuklearna magnetna rezonanca
nano LC-MS/MS – nano tečna hromatografija visokih performansi sa tandem masenom spektrometrijom (*eng.*, high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
NSO-jedinjenja – Jedinjenja sa azotom, sumporom i kiseonikom (polarna frakcija nafte)
OD – Optička gustina (*eng.*, optical density)
OECD/SIDS – Organisation for Economic Co-Operation and Development / Screening Information Data Set
PAH – Policiklični aromatični ugljovodonici (*eng.*, polycyclic aromatic hydrocarbons)
PcaGH – Protokatehual 3,4-dioksigenaza
PCR – Polymerase Chain Reaction
PHE – Fenantren
PMSF – Fenilmetilsulfonil-fluorid
POPs – Dugotrajne organske zagađujuće supstance (*eng.*, persistent organic pollutants)
PPAS – Proteoza pepton amonijum so sa smanjenom količinom fosfata (*eng.*, phosphate-limited proteose peptone-ammonium salt)
PPGAS – Proteoza pepton glukoza amonijum so sa smanjenom količinom fosfata (*eng.*, phosphate-limited proteose peptone-glucose-ammonium salt)
PYR – Piren
QS – Quorum Sensing
RL – Ramnolipidi
ROS – Reaktivne kiseonične vrste (*eng.*, reactive oxygen species)
SDS-PAGE – Natrijum-dodecilsulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (*eng.*, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
SOD – Superoksid dismutaza
TCA – Ciklus trikarboksilnih kiselina
TIC – Hromatogram ukupne jonske struje (*eng.*, total ion current)
TMCS – Trimetilhlorosilan
TST – Ukupno vreme skeniranja (*eng.*, total scan time)
US EPA – United States Environmental Protection Agency
UV – Ultraljubičasto (*eng.*, ultraviolet)
V-AQ – Vacuum Aqueous
VIS – Vidljivo (*eng.*, visible)

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DEO | 5 |
| 2.1. Zagađenje životne sredine | 6 |
| 2.2. Pristupi u rešavanju zagađenja, hemijske i biološke metode | 6 |
| 2.3. Zagađenje životne sredine naftom i njenim derivatima | 7 |
| 2.3.1. <i>Sastav nafte</i> | 8 |
| 2.3.2. <i>Identifikacija i karakterizacija zagađujućih supstanci naftnog tipa u zemljištu, sedimentima i vodi</i> | 8 |
| 2.3.3. <i>Biodegradacija nafte</i> | 10 |
| 2.4. Fenolni derivati | 11 |
| 2.4.1. <i>2,6-Di-terc-butilfenol (2,6-DTBP)</i> | 14 |
| 2.5. Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) | 15 |
| 2.6. Uloga <i>Pseudomonasa</i> u bioremedijaciji | 17 |
| 2.6.1. <i>Uloga Pseudomonas aeruginosa u bioremedijaciji</i> | 18 |
| 2.7. Metode za istraživanje molekuskog mehanizma biodegradacije | 20 |
| 2.7.1. <i>Omiks metode</i> | 21 |
| 2.7.1.1. <i>Genomske studije</i> | 22 |
| 2.7.1.2. <i>Proteomske studije</i> | 23 |
| 2.7.1.3. <i>Metabolomske studije</i> | 24 |
| 2.8. Mehanizmi bakterijske biodegradacije ugljovodonika | 24 |
| 2.8.1. <i>Enzimi u degradaciji organskih jedinjenja</i> | 25 |
| 2.8.1.1. <i>Degradacija n-alkana u aerobnim uslovima</i> | 27 |
| 2.8.1.2. <i>Degradacija aromatičnih jedinjenja u aerobnim uslovima</i> | 27 |
| 2.8.1.2.1. <i>Aerobna degradacija PAH</i> | 30 |
| 3. CILJ I PLAN ISTRAŽIVANJA | 33 |
| 4. EKSPERIMENTALNI DEO | 36 |
| 4.1. Mikroorganizam | 37 |
| 4.2. Određivanje hidrofobnosti ćelije mikroorganizma | 37 |
| 4.3. Određivanje hemotaksije mikroorganizma | 37 |
| 4.4. Podloge | 37 |
| 4.4.1. <i>Osnovne mineralne podloge</i> | 37 |
| 4.4.2. <i>Kompleksne podloge</i> | 38 |
| 4.4.3. <i>PPAS/PPGAS podloga</i> | 38 |
| 4.5. Izvori ugljenika | 38 |
| 4.5.1. <i>Supstrati za enzimske testove</i> | 39 |
| 4.6. Razdvajanje nafte na frakcije | 39 |

| | |
|---|----|
| 4.7. Biodegradacija ugljovodonika i 2,6-DTBP pomoću <i>P. aeruginosa</i> san ai | 40 |
| 4.8. Određivanje osnovnih parametara biodegradacije | 41 |
| 4.8.1. Praćenje rasta mikrobne populacije | 41 |
| 4.8.2. Određivanje broja mikroorganizma posrednom metodom | 41 |
| 4.8.3. Određivanje pH | 41 |
| 4.8.4. Odvajanje biomase | 41 |
| 4.9. Hemijske metode za praćenje biodegradacije ugljovodonika i 2,6-DTBP | 41 |
| 4.9.1. Gasnohromatografsko-maseno spektrometrijska analiza | 41 |
| 4.9.2. Dvodimenzionalna gasnohromatografsko-maseno spektrometrijska analiza metabolita fluorena | 44 |
| 4.9.3. Ispitivanje uticaja različitih faktora na efikasnost biodegradacije 2,6-DTBP | 45 |
| 4.9.4. Određivanje koncentracije sekundarnih metabolita | 46 |
| 4.9.4.1. Egzopolisaharidi | 46 |
| 4.9.4.2. Ramnolipidi | 46 |
| 4.10. Biohemijske metode analize mikroorganizma <i>P. aeruginosa</i> san ai | 46 |
| 4.10.1. Homogenizacija biomase | 46 |
| 4.10.2. Određivanje koncentracije proteina | 46 |
| 4.10.3. Određivanje enzimskih aktivnosti | 47 |
| 4.10.3.1. Katehol 1,2-dioksigenaza i katehol 2,3-dioksigenaza | 47 |
| 4.10.3.2. Hidroksilaza | 47 |
| 4.10.3.3. Alkohol dehidrogenaza | 48 |
| 4.10.3.4. Hion reduktaza | 48 |
| 4.10.3.5. Superoksid dismutaza | 48 |
| 4.10.3.6. Katalaza | 48 |
| 4.10.3.7. Oksigenolitička aktivnost | 49 |
| 4.10.3.8. Enzimska degradacija 2,6-DTBP | 49 |
| 4.10.3.9. Određivanje respiratorne aktivnosti | 49 |
| 4.11. Analitičke OMIKS metode | 50 |
| 4.11.1. Analiza genoma | 50 |
| 4.11.2. Separacija proteina | 50 |
| 4.11.2.1. Elektroforetska separacija proteina | 50 |
| 4.11.2.1.1. Jednodimenzionalna elektroforeza – SDS-PAGE | 50 |
| 4.11.2.1.2. Dvodimenzionalna gel elektroforeza | 51 |
| 4.11.3. Analiza proteoma | 51 |
| 4.11.3.1. Priprema uzorka za analizu digestijom u gelu (<i>In gel digestion</i>) | 51 |
| 4.11.3.2. Nano tečna hromatografija visokih performansi sa tandem masenom spektrometrijom | 52 |
| 4.11.3.3. Parametri bioinformatičke pretrage | 54 |
| 5. REZULTATI I DISKUSIJA | 55 |
| 5.1. Preliminarna ispitivanja | 56 |

| | |
|--|-----|
| 5.1.1. Preliminarno ispitivanje potencijala <i>P. aeruginosa</i> san ai za degradaciju organskih jedinjenja | 56 |
| 5.1.2. Uticaj sastava podloge na rast <i>P. aeruginosa</i> san ai | 57 |
| 5.1.3. Rast <i>P. aeruginosa</i> san ai na MSM podlozi uz dodatak PAH | 58 |
| 5.1.4. Rast <i>P. aeruginosa</i> san ai na MSM podlozi uz dodatak fenolnih jedinjenja | 58 |
| 5.1.5. Rast <i>P. aeruginosa</i> san ai na MSM podlozi uz dodatak natrijum-benzoata | 58 |
| 5.2. Biodegradacija ugljovodonika pomoću <i>P. aeruginosa</i> san ai | 58 |
| 5.3. Biodegradacija 2,6-DTBP | 58 |
| 5.3.1. Uticaj različitih faktora na efikasnost biodegradacije 2,6-DTBP | 60 |
| 5.3.1.1. Uticaj početne koncentracije supstrata | 60 |
| 5.3.1.1.1. Toksični intermedijeri koji nastaju pri degradaciji visokih koncentracija 2,6-DTBP | 61 |
| 5.3.1.2. Uticaj veličine inokuluma | 63 |
| 5.3.1.3. Uticaj pH vrednosti | 63 |
| 5.3.1.4. Uticaj temperature | 64 |
| 5.3.2. Dinamika biodegradacije 2,6-DTBP | 65 |
| 5.3.3. Genomska analiza katabolizma 2,6-DTBP | 66 |
| 5.3.4. Komparativna analiza proteoma <i>P. aeruginosa</i> san ai | 67 |
| 5.3.4.1. Enzimi kataboličke razgradnje 2,6-DTBP | 72 |
| 5.3.4.2. Mehanizmi adaptacije <i>P. aeruginosa</i> san ai na aromatične supstrate | 75 |
| 5.3.4.3. 2D mape <i>P. aeruginosa</i> san ai | 80 |
| 5.3.4.4. Degradacija 2,6-DTBP upotrebom sirovog enzimskog ekstrakta | 84 |
| 5.4. Degradacija individualnih <i>n</i> -alkana i PAH primenom <i>P. aeruginosa</i> san ai | 84 |
| 5.4.1. Dinamika degradacije <i>n</i> -nonadekana i fluorena | 85 |
| 5.4.2. Respiratorna aktivnost | 86 |
| 5.5. Biodegradacija zasićene i aromatične frakcije sirove nafte primenom <i>P. aeruginosa</i> san ai | 87 |
| 5.6. Genomska, enzimska i metabolomska analiza biodegradacije ugljovodonika pomoću <i>P. aeruginosa</i> san ai | 92 |
| 5.6.1. Degradacija <i>n</i> -heksadekana i <i>n</i> -nonadekana | 92 |
| 5.6.2. Degradacija fluorena | 93 |
| 5.6.3. SDS-PAGE profil <i>P. aeruginosa</i> san ai nakon rasta na <i>n</i> -alkanu i PAH | 98 |
| 6. ZAKLJUČCI | 99 |
| 7. LITERATURA | 102 |

1. UVOD

1. UVOD

Ana B. Medić

Zagađenje životne sredine fenolnim jedinjenjima, naftnim ugljovodonicima, uključujući i policiklične aromatične ugljovodonike, kao i samom sirovom naftom predstavlja opasan rizik, kako za ekosistem u celini, tako i za zdravlje ljudi. Sve veća rasprostranjenost ovih toksičnih jedinjenja, relativno male biorazgradivosti i njihova svakodnevna upotreba u širokim, industrijskim razmerama, dovodi do zagađenja zemljišta, vode i vazduha. Bioremedijacija je sigurna, efikasna, ekonomična i ekološki prihvatljiva, tehnologija za tretiranje organskih zagađujućih supstanci. Bioremedijacija se zasniva na upotrebi mikroorganizama koji pomoću reakcija koje predstavljaju deo njihovih metaboličkih procesa, transformišu zagađujuće supstance u netoksična ili jedinjenja sa smanjenom toksičnošću. Zbog svojih posebnih „eco-friendly“ karakteristika, bioremedijacija je sve više predmet opsežnih naučnih istraživanja.

Detaljnija studija mehanizama uklanjanja organskih zagađujućih supstanci pomoću mikroorganizama, analizom proteina, kao aktivnih učesnika biodegradacije, kao i metaboličkih intermedijera koji nastaju, omogućava bolje razumevanje molekularnih mehanizama adaptacije mikroorganizama i njihovu primenu u zaštiti životne sredine. Primena novorazvijenih „omiks“ tehnika za analizu genoma, proteoma i metaboloma pruža mogućnost za sveobuhvatano razumevanje mehanizama biorazgradnje na molekulskom nivou.

Zbog prirodne zastupljenosti u zagađenim sredinama i multidegradativnog kapaciteta, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) može imati značajnu ulogu u uklanjanju heterogenih zagađujućih supstanci. Razgranati metabolički putevi, jedinstveno ponašanje poput: formiranja biofilma, produkcije ramnolipida i egzopolisaharida, koji u velikoj meri olakšavaju biodegradaciju lipofilnih supstanci, kao i mogućnost adaptacije na različite životne uslove, favorizuju primenu *P. aeruginosa* u bioremedijaciji, u odnosu na ostale bakterije koje razgrađuju ugljovodonike (*eng.*, hydrocarbonoclastic).

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje potencijala *Pseudomonas aeruginosa* san ai da razgrađuje: *n*-alkane, policiklična aromatična jedinjenja, derivate fenola i frakcije nafte, kao složene smeše ugljovodonika. Kako bi se detaljnije analizirali mehanizmi biodegradacije definisani su sledeći ciljevi:

- ❖ Ispitivanje potencijala *Pseudomonas aeruginosa* san ai za degradaciju pojedinačnih, toksičnih zagađujućih supstanci: *n*-alkana, policikličnih aromatičnih ugljovodonika i derivata fenola;
- ❖ Ispitivanje potencijala *P. aeruginosa* san ai za degradaciju frakcija nafte, kao složenih smeša ugljovodonika;
- ❖ Ispitivanje uticaja različitih faktora na efikasnost biodegradacije, kao što su: početna koncentracija supstrata, veličina inokuluma, pH i temperatura;
- ❖ Ispitivanje stepena biotransformacije i degradacije navedenih jedinjenja pomoću gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (*eng.*, gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS);
- ❖ Analiziranje promena u proteomu *P. aeruginosa* san ai, kako bi se utvrdili mehanizmi metaboličke adaptacije mikroorganizma nakon izlaganja zagađujućoj supstanci, u poređenju sa uobičajenim izvorima ugljenika (jestivo ulje, glukoza);

1. UVOD

Ana B. Medić

- ❖ Određivanje aktivnosti enzima *P. aeruginosa* *san ai*, uključenih u gornji i donji put biodegradacije aromatičnih jedinjenja, kako bi se odredila specifičnost metaboličkog puta degradacije ispitivanih supstanci, korišćenjem različitih supstrata;
- ❖ Određivanje aktivnosti enzima *P. aeruginosa* *san ai* u biodegradaciji zasićenih ugljovodnika;
- ❖ Analiza mehanizama odgovora *P. aeruginosa* *san ai* na zagađujuću supstancu, pomoću multi-omiks pristupa (kombinacija genomske, proteomske i metabolomske analize) za sveobuhvatno razumevanje toka biodegradacije;
- ❖ Identifikacija proteina koji predstavljaju specifičan odgovor mikroorganizma na svaku pojedinačnu ispitivanu supstancu pomoću „bottom up“ komparativne proteomiks analize, zasnovane na upotrebi nano tečne hromatografije visokih performansi sa tandem masenom spektrometrijom (*eng.*, high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, nano LC-MS/MS);
- ❖ Bioinformatička analiza masenih spektara, korišćenjem odgovarajućih baza podataka;
- ❖ Analiza metabolita i proizvoda degradacije policikličnih aromatičnih ugljovodnika pomoću dvodimenzionalne (2D) gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (*eng.*, two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry, GCxGC-MS)

Ova disertacija je podeljena u sedam poglavlja. Nakon uvoda, sledi teorijski deo koji opisuje zagađenje životne sredine različitim organskim jedinjenjima, kao i hemijske i biološke metode za njihovo uklanjanje. Poseban deo posvećen je zagađenju životne sredine naftom i njenim derivatima, metodama za identifikaciju i karakterizaciju zagađujućih supstanci naftnog tipa, i bioremedijaciji kao optimalnom rešenju za njihovo uklanjanje. Najobimniji deo ovog poglavlja opisuje ulogu roda *Pseudomonas* u bioremedijaciji i upotrebu novorazvijenih omiks metoda u analizi genoma, proteoma i metaboloma pri proceni uticaja zagađujuće supstance na mikroorganizme, razumevanju mehanizama adaptacije i biodegradacije na molekulskom nivou i detekcije potencijalnih biomarkera za biomonitoring životne sredine. Takođe, detaljno su opisani mehanizmi bakterijske biodegradacije *n*-alkana, aromatičnih ugljovodnika i fenola, pri čemu je posebna pažnja posvećena enzimima koji su uključeni u degradaciju ovih jedinjenja.

U sledećem poglavlju predstavljani su cilj i plan istraživanja.

U četvrtom poglavlju, eksperimentalnom delu, dat je pregled i opis korišćenih metoda, instrumenata i urađenih analiza, što obuhvata: određivanje hidrofobnosti ćelije mikroorganizma, hemotaksiju, sastav i primenljivost korišćenih podloga, izolovanje alifatične i aromatične frakcije nafte metodom hromatografije na koloni, određivanje osnovnih parametara biodegradacije kao što je praćenje rasta mikrobne populacije, upotrebu GC-MS i (2D) GCxGC-MS analize za praćenje stepena biodegradacije ispitivanih supstrata uz detekciju nastalih metabolita, ispitivanje uticaja različitih faktora na efikasnost biodegradacije, određivanje koncentracije ramnolipida i egzopolisaharida, određivanje aktivnosti različitih enzima koji su uključeni u proces biodegradacije ispitivanih jedinjenja, kao što su katehol 1,2- i 2,3-dioksigenaza, hidroksilaza, alkohol dehidrogenaza, hinon reduktaza, superoksid dismutaza, katalaza, respiratornu aktivnost *P. aeruginosa* *san ai* prilikom biodegradacije ispitivanih jedinjenja, omiks metode u analizi genoma, proteoma i metaboloma.

U petom poglavlju su prikazani i diskutovani rezultati dobijeni u ovom istraživanju praćeni dijagramima, tabelarnim podacima i hromatogramima, za sve urađene analize. Prvi deo poglavlja

1. UVOD

Ana B. Medić

odnosi se na sveobuhvatno razumevanje biodegradacije 2,6-di-*tert*-butilfenola (2,6-DTBP) pomoću *P. aeruginosa* *sensu lato*, pri čemu je dat put njegove transformacije, kao i mehanizmi adaptacije i metabolički odgovor *P. aeruginosa sensu lato* na ovo toksično jedinjenje. U drugom delu pažnja je posvećena biodegradaciji *n*-alkana, policikličnih aromatičnih ugljovodonika i frakcija nafte kao složenih ugljovodoničnih smeša, pri čemu su takođe prikazani mogući putevi transformacije.

U šestom poglavlju izloženi su zaključci izvedeni na osnovu obrade i interpretacije svih dobijenih rezultata. Sedmo poglavlje čini pregled literaturnih navoda.

2. TEORIJSKI DEO

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

2.1. Zagađenje životne sredine

Kvalitet života na Zemlji je neraskidivo povezan sa opštim kvalitetom životne sredine. Zagađenje i njegov uticaj na životnu sredinu je usko povezan sa povećanom antropogenom aktivnošću, tehnološkim razvojem, napretkom hemijske industrije, neadekvatnim tretmanom otpada, kao i manjkom obrazovanja i socijalne svesti (Massard-Guilbaud, Mathis, 2017). Životna sredina, posebno zemljište i vode, je veoma često zagađena organskim zagađujućim supstancama (nafta i njeni derivati, plastični otpad, pesticidi, itd.; Chowdhury et al., 2018). Ove supstance, zbog svojih fizičko-hemijskih svojstava, interaguju sa životnom sredinom gde ostaju dug vremenski period (Chowdhury et al., 2018; Hazrat et al., 2019). Procena sposobnosti migracije bilo koje zagađujuće supstance u prirodnom okruženju smatra se neophodnom fazom za predviđanje ekološke situacije.

Fizičko-hemijske osobine organskog polutanta u velikoj meri određuju njegovu sudbinu u životnoj sredini. Od najveće važnosti su: molekulska masa, struktura molekula, rastvorljivost, napon pare, postojanost na fotohemijsku i biološku degradaciju (Vitorović, Jovančičević, 2005).

Zagađeni ekosistem predstavlja ozbiljnu pretnju za funkcionisanje živih organizama, posebno putem bioakumulacije, kada toksične supstance uđu u lanac ishrane i često utiču na telesne funkcije (Hazrat et al., 2019; Thompson, Darwish, 2019). Ovi mehanizmi su posebno relevantni u slučajevima dugotrajnih zagađujućih supstanci (*eng.*, persistent organic pollutants, POPs), kao što su organohlorni pesticidi, naftni derivati i policiklični aromatični ugljovodonici (*eng.*, polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs). Organska jedinjenja poput PAH-ova snažno se adsorbuju za organsku frakciju zemljišta, ali mogu i isparavati i na taj način se širiti kroz ekosistem, ili se akumulirati u morskim organizmima (Kafel et al., 2012). Većina ovih ekokontaminanata pripada klasi toksičnih, mutagenih, kancerogenih ili teratogenih supstanci (Soto, Sonnenschein, 2010), i kao takvi predstavljaju posebnu opasnost po zdravlje živih organizama.

Na sudbinu organskog polutanta, kada dospe u životnu sredinu, utiču abiotički i biotički procesi. U abiotičke procese se ubrajaju: isparavanje, sorpcija, rastvaranje, fotodegradacija, dok biotički podrazumevaju mikrobiološku degradaciju. Da bi se biodegradacija organskih zagađujućih supstanci odigrala u životnoj sredini moraju biti zadovoljeni određeni uslovi, kao što su: temperatura niža od 66 °C, prisustvo vode, radi lakšeg kretanja mikroorganizama i priliva dovoljne količine nutrijenata (Vitorović, Jovančičević, 2005).

2.2. Pristupi u rešavanju zagađenja, hemijske i biološke metode

Najčešće vidove degradacije organskih zagađujućih supstanci predstavljaju fotohemijska i biološka razgradnja. Na efikasnost degradacije veliki uticaj ima struktura polaznog organskog polutanta. Najbiodegradabilnija jedinjenja imaju jednostavne strukture, slične onima koji se javljaju u prirodi, dok su kompleksnija jedinjenja koja se obično ne nalaze u prirodi otpornija na mikrobiološku razgradnju (Vitorović, Jovančičević, 2005).

Uobičajene tehnike koje se koriste za uklanjanje otpadnog materijala podrazumevaju odlaganje kontaminanata na deponije ili kopanje dubokih jama oko kontaminiranog područja. Ove metode imaju svoje nedostatke. Odlaganjem na deponije zagađenje se samo premešta na drugo mesto pri čemu tokom transporta opasnog materijala može doći do nove kontaminacije, dok druga metoda daje samo privremeno rešenje jer kontaminacija ostaje na istom mestu, zahtevajući praćenje i

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

održavanje izolacionih barijera tokom dugog vremenskog perioda, što stvara dodatne troškove (Vidali, 2001).

Bolji pristup od ovih tradicionalnih metoda je potpuno uklanjanje zagađujućih supstanci ili bar njihova transformacija do manje opasnih ili neškodljivih jedinjenja. Fizičko-hemijske metode koje se koriste za degradaciju zagađujućih supstanci se zasnivaju na spaljivanju na visokoj temperaturi, hemijskoj hidrolizi ili oksidaciji (npr. UV, aeracija ili tretman ozonom). Ove metode mogu biti veoma efikasne u smanjivanju nivoa zagađenja, ali imaju i nekoliko nedostataka: složen tehnološki proces, veliki troškovi za ograničenu primenu, nedostatak javnog prihvatanja, posebno za spaljivanje koje može povećati izloženost zagađujućoj supstanci, kako za stanovništvo u blizini postrojenja, tako i za radnike (Vidali, 2001).

Kako je hemijska degradacija zagađujućih supstanci obično složena i neekonomična, biodegradacija se smatra obećavajućom alternativnom metodom za uklanjanje zagađujućih supstanci iz kontaminiranih područja. Degradacija polutanata životne sredine, posebno organskih jedinjenja (uglјovodonika, uključujući policiklične aromatične uglјovodonike, fenola i njegovih derivata), upotrebom određenih mikroorganizama koji se nalaze u prirodi, smatra se efikasnijom, ekonomičnijom i manje štetnom ekološkom tehnologijom za tretiranje opasnih supstanci (Vidali, 2001). Bioremedijacija koristi metaboličku svestranost mikroorganizama za razgradnju heterogenih opasnih polutanata. Zagađujuća supstanca se transformiše pomoću živih organizama reakcijama koje se odvijaju kao deo njihovih metaboličkih procesa (Seo et al., 2009). Ova metoda zahteva brzo prilagođavanje mikroorganizama novonastalim uslovima okruženja i efikasnu upotrebu zagađujućih supstanci kao supstrata. Cilj bioremedijacije je transformacija organskih polutanata u jedinjenja sa smanjenom toksičnošću ili potpuna mineralizacija/degradacija zagađujuće supstance do ugljen-dioksida i vode, pri čemu ne dolazi do generisanja otpada i kontaminirana područja mogu povratiti svoju prirodnu biološku aktivnost (Beškosti et al., 2011). Mnogi faktori određuju da li će mikroorganizam upotrebiti zagađujuću supstancu kao supstrat i iz tog razloga veoma je važno razumeti katabolički put, mehanizam adaptacije i odgovor specifičkih enzima mikroorganizma na kontaminant.

2.3. Zagađenje životne sredine naftom i njenim derivatima

Nafta je najvažniji i najdominantniji izvor energije u savremenom društvu. Eksploatacija, prerada, transport, akcidentna izlivanja, curenja i drugi načini ispuštanja nafte iz rafinerija i naftnih postrojenja rezultuju kontaminacijom životne sredine, najčešće zemljišta i podzemnih voda. Glavni izvori zagađenja naftom su petrohemijska industrija, naftna postrojenja, uređaji za transport i skladištenje tečnog goriva, sredstva za prevoz naftnih derivata, aerodromi i ilegalne bušotine. Ova zagađenja imaju značajan uticaj na životnu sredinu pri čemu narušavaju ekološku ravnotežu i predstavljaju ozbiljan rizik po zdravlje živog sveta (Xia et al., 2014).

Derivati nafte su proizvodi koje se uglavnom dobijaju destilacijom sirove nafte. Goriva i maziva, koja se dobijaju preradom nafte, iako homogenija po sastavu od sirove nafte, sadrže molekule različitih fizičko-hemijskih karakteristika. Razlike u molekulskoj masi, temperaturi ključanja, rastvorljivosti u vodi, hidrofobnosti, gustini i viskozitetu, omogućavaju jedinstvenu analizu svakog derivata i pružaju osnovu za identifikaciju izvora zagađenja naftnog tipa.

Veoma je bitno da se izvrši karakterizacija izlivenene nafte, odnosno naftnog derivata i da se poveže sa izvorima zagađenja radi procene štete, dugoročnog uticaja na životnu sredinu, konačne „sudbine“ i načina za njihovo uklanjanje. Sudbina i ponašanje izlivenog kontaminanta naftnog tipa

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

zavise od velikog broja fizičko-hemijskih i bioloških faktora, koji uključuju procese isparavanja, rastvaranja, mikrobiološke degradacije, fotooksidacije i interakciju sa sedimentima (Wang, 2003).

Tehnologije za uklanjanje naftnih zagađujućih supstanci iz zemljišta i njegovo „izlečenje“ (remedijaciju) mogu biti abiotičke (fizičke, hemijske i termičke) i biotičke (bioremedijacija u širem smislu).

2.3.1. Sastav nafte

Nafta predstavlja migrirani i akumulirani proizvod dijagenetskih i katagenetskih transformacija organske supstance sedimentnih stena. To je homogena, veoma složena smeša velikog broja hemijskih jedinjenja koja ima visok energetski potencijal (Vitorović, Jovančićević, 2005). Naftu najvećim delom čine ugljovodonici, 50-90 %, dok su ostatak polarna jedinjenja sa azotom, sumporom i kiseonikom (NSO-jedinjenja). Komponentne nafte mogu da se grupišu u četiri frakcije: alifatična (zasićena) frakcija, aromatična frakcija, jedinjenja azota, sumpora i kiseonika (NSO-jedinjenja ili polarna frakcija) i asfalteni. Glavni sastojci alifatične tj. frakcije zasićenih ugljovodonika kod najvećeg broja nafte su *n*-alkani, za kojima po obilnosti slede alkani račvastog niza, uključujući izoprenoide, i ciklični i policiklični ugljovodonici (nafteni). Aromatična frakcija uglavnom sadrži mono- do tetraciklične aromatične ugljovodonike i heterociklična jedinjenja male molekulske mase, među kojima najčešće dominiraju heterocikli sa sumporom. Pored nesupstituisanih aromata, u ovoj frakciji nafte su veoma zastupljeni njihovi alkil-supstituisani derivati (Xia et al., 2014). NSO-frakciju sačinjavaju porfirini, više masne kiseline i alkoholi, aciklični i ciklični ketoni, kao i heterocikli veće molekulske mase. Asfalteni su visokomolekulska aromatična jedinjenja bogata heteroatomima (N, O, S) ili smeše jedinjenja sa većim brojem kondenzovanih aromatičnih prstenova. Zbog planarnosti slažu se u snopove i dostižu veće molekulske mase, pa su nerastvorni u lakim ugljovodoničnim rastvaračima, *n*-pentanu, *n*-heksanu i *n*-heptanu. Obično su u nafti prisutni u malim količinama (≤ 5 %). Ostatak nafte bez asfaltena se naziva maltenima (Vitorović, Jovančićević, 2005; Xia et al., 2014).

2.3.2. Identifikacija i karakterizacija zagađujućih supstanci naftnog tipa u zemljištu, sedimentima i vodi

Metode koje se koriste u laboratorijama za analizu naftnih zagađujućih supstanci, u zavisnosti od potrebnih fizičko-hemijskih informacija, mogu se podeliti u dve grupe: nespecifične i specifične metode (Wang, 2003). Nespecifične analize podrazumevaju određivanje ukupnog sadržaja ekstrahovane organske supstance iz zemljišta, sedimenta ili vode (kao ekstrakciono sredstvo se obično koristi dihlormetan, trihlometan ili azeotropna smeša dihlormetana i metanola u zapreminskom odnosu, 88:12), kao i određivanje grupnog sastava (sadržaj zasićenih-, aromatičnih ugljovodonika i NSO-jedinjenja) ekstrahovane organske supstance, odnosno sadržaja ugljovodonika u njoj, koji predstavlja zbir sadržaja zasićene i aromatične frakcije. U poređenju sa specifičnim metodama, ove metode su jeftinije, zahtevaju kraće vreme pripreme uzorka i kraće vreme same analize. Međutim, ove analize ne mogu biti pouzdan dokaz kontaminacije naftnim polutantom, već predstavljaju samo preliminarne procese u pripremi uzorka za dalja ispitivanja. Specifične analize koje podrazumevaju identifikaciju individualnih jedinjenja i grupa jedinjenja su mnogo pouzdanije pri ispitivanju naftnih zagađujućih supstanci, pri čemu se koriste standardne hromatografske metode (Šolević, 2004). Od hromatografskih metoda za analizu nafte najviše se upotrebljavaju gasna hromatografija (*eng.*, gas chromatography,

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

GC), gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (*eng.*, gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS), tečna hromatografija visokih performansi (*eng.*, high performance liquid chromatography, HPLC) (Wang, 2003).

Prvu fazu u ispitivanju nafte predstavlja taloženje asfaltena pomoću *n*-pentana, *n*-heksana ili *n*-heptana. Zatim se malteni razdvajaju na frakcije pomoću hromatografije na stubu pri čemu se koriste različiti adsorbensi (silika-gel, aluminijum-oksidi, florisil, kombinacija silika-gela i aluminijum-oksida). Frakcije se eluiraju prema rastućoj polarnosti. Prvo se eluira zasićena frakcija pomoću nepolarnog rastvarača *n*-heksana, zatim nešto polarnija aromatična frakcija smešom *n*-heksana i benzena (zapreminski odnos, 2:1), ili u novije vreme zbog toksičnosti benzena smešom *n*-heksana i dihlormetana (zapreminski odnos, 5:1), i na kraju najpolarnija frakcija, NSO jedinjenja smešom metanola i hloroforma (zapreminski odnos, 1:1). Sadržaji ovih frakcija izražavaju se u procentima i predstavljaju grupni sastav maltena, odnosno grupni sastav nafte. Ove frakcije se dalje detaljnije analiziraju instrumentalnim hromatografskim metodama (Stojanović, 2017).

Među naftnim zagađujućim supstancama nađena su jedinjenja koja su po strukturi veoma slična jedinjenjima za koja se zna da postoje u prirodi. Takva jedinjenja nazvana su hemijski fosili ili češće biološki markeri. U geohemiji, biološki markeri se najviše primenjuju za procenu porekla nafte, stepena zrelosti (maturisanosti) nafte, praćenje migracionih puteva nafte, kao i stepena biodegradacije (Vitorović, Jovančićević, 2005).

Specifična markerska jedinjenja koja se analiziraju pri identifikaciji i kvantifikaciji naftnih zagađujućih supstanci su: *n*-alkani, izoprenoidni alifatični alkani (najčešće pristan i fitan), policiklični alkani tipa sterana i terpana i aromatični ugljovodonici (alkilovani derivati benzena, naftalena, fenantrena, dibenzotiofena, fluorena i hrizena).

Raspodela *n*-alkana koja ukazuje na naftno zagađenje karakteriše se ujednačenim sadržajem neparnih i parnih homologa, dok je *n*-alkanski maksimum uobičajeno na nekom *n*-alkanu nižem od C₂₂. U slučaju naftnih derivata opsezi *n*-alkana su znatno uži u poređenju sa sirovim naftama koje obično sadrže *n*-alkane od C₈ do C₄₀. *n*-Alkani kao biomarkeri imaju svoje nedostatke jer čine klasu jedinjenja koja prva podleže mikrobiološkoj degradaciji pa njihovo odsustvo nije pouzdan dokaz da naftnog zagađenja nema. Još jedan nedostatak je i to što raspodela *n*-alkana u nativnoj organskoj supstanci algalnog porekla može biti slična „naftnoj“, pa se može reći da *n*-alkani nisu idealan „otisak prsta“ naftnog zagađenja. Takođe, izoprenoidi, pristan i fitan, osim toga što su sastojci nafte imaju i druge izvore u biosferi, kao što je fitol, izoprenoidni alkohol hlorofila *a*, koji se u njih transformiše već tokom dijageneze, pa je pored ovih biomarkera poželjno analizirati još neka jedinjenja za precizno definisanje naftnog zagađenja. To se odnosi na policiklične alkane tipa sterana i diasterana (C₂₇-C₂₉) i terpana (trciklični diterpani C₁₉-C₃₀, tetraciklični diterpani C₂₄-C₂₇, i posebno pentaciklični triterpani C₂₇-C₃₅ sa hopanskim skeletom) čije su raspodele u naftama specifične, i ne mogu se naći ni u nativnoj organskoj supstanci, niti u organskoj supstanci koja potiče iz nekog drugog izvora. Siguran dokaz naftnog zagađenja je i prisustvo aromatičnih ugljovodonika, alkilovanih derivata benzena, naftalena, fenantrena, dibenzotiofena, fluorena i hrizena (Stojanović, 2017).

Identifikacija specifičnih markera u frakcijama nafte moguća je primenom gasnohromatografsko-masenospektrometrijske instrumentalne tehnike. U okviru ove analize razlikujemo tri pristupa: SIM metoda (*eng.*, Single Ion Monitoring), koja se zasniva na identifikaciji i praćenju odabranog jona, najčešće osnovnog jona, karakterističnog za neko jedinjenje ili klasu jedinjenja, MID metoda (*eng.*, Multi Ion Detection), koja istovremeno prati više jona, tj. nekoliko odabranih jona karakterističnih za jednu ili više klasa jedinjenja i full scan metoda koja detektuje sve

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

jone u odabranom opsegu masa, najčešće od 45 do 550. U tabeli 1 dat je pregled najznačajnijih klasa markerskih jedinjenja sa odgovarajućim fragmentacionim jonima koji se koriste za njihovu identifikaciju (Vitorović, Jovančićević, 2005).

Tabela 1. Karakteristični fragmentacioni joni (m/z) najvažnijih klasa markerskih jedinjenja u zasićenoj i aromatičnoj frakciji nafte (u slučaju većeg broja, najintenzivniji fragmentacioni jon je podebljan; Vitorović, Jovančićević, 2005)

| Jon (m/z) | Klasa jedinjenja |
|---|-------------------------------------|
| 71, 85 ili 99 | <i>n</i> -Alkani |
| 113, 183 i 197 | Aciklični izoprenoidi |
| 149, 163, 177, 191 , 205, 219 i 235 | Pentaciklični triterpani (hopani) |
| 177 | Demetilovani hopani |
| 217 , 218 i 259 (samo za diasterane) | Sterani i diasterani |
| 142, 156 i 170 | Metil-, dimetil i trimetilnaftaleni |
| 178 | Fenantren |
| 192 i 206 | Metil- i dimetilfenantreni |
| 184 | Dibenzotiofen |
| 198 | Metildibenzotiofeni |
| 92 | Alkilbenzeni |
| 166 | Fluoren |
| 180 | Metilfluoreni |

2.3.3. Biodegradacija nafte

Biodegradacija nafte može biti različitog intenziteta. U zavisnosti od toga koje su klase jedinjenja mikrobiološki degradovane, definisana je skala (stepen) biodegradacije nafte od 1 do 9 (tabela 2). *n*-Alkani su najmanje otoporni na biodegradaciju. Ukoliko su *n*-alkani najobilnija jedinjenja u zasićenoj frakciji nafte može se smatrati da nafta nije bila izložena biodegradaciji. Ukoliko su *n*-alkani delom razgrađeni nafta se može okarakterisati kao minimalno biodegradovana, dok su kod umereno degradovane nafte I stepena svi *n*-alkani razgrađeni, ali izoprenoidni alifatični alkani nisu (Vitorović, Jovančićević, 2005).

Brzina biološke razgradnje nije ista za sva jedinjenja prisutna u nafti, i redosled brzine biodegradacije pojedinih klasa jedinjenja odgovara sledećem nizu: *n*-alkani (najbiodegradabilniji) > mono- i biciklična aromatična jedinjenja > izoprenoidi > monociklični alkani > policiklični aromatični ugljovodonici sa 3 aromatična prstena (pretežno derivati fenantrena) i derivati dibenzotiofena > sterani > hopani > aromatični sterani ≈ diasterani, diahopani i neohopani. Naravno, u procesu biodegradacije

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

ovaj redosled nije uvek striktno ispoštovan, tj. blaga biodegradacija rezistentnijih klasa može započeti i pre potpunog uklanjanja manje rezistentne klase ugljovodonika.

Tabela 2. Klasifikacija nafte na osnovu stepena biodegradacije (Vitorović, Jovančićević, 2005)

| Skala | Uklonjeni ugljovodonici | Stepen biodegradacije |
|-------|---|-----------------------|
| 1 | Nijedan | / |
| 2 | Niži <i>n</i> -alkani | Minimalan |
| 3 | Više od 99 % <i>n</i> -alkana | Umeren (I) |
| 4 | Alkilcikloheksani; delimično izoprenoidi | Umeren (II) |
| 5 | Svi izoprenoidi | Umeren (III) |
| 6 | Biciklični alkani | Srednje visok |
| 7 | Više od 50 % regularnih sterana | Visok |
| 8 | Izmenjeni sterani, dosta dimetilovanih hopana | Vrlo visok |
| 9 | Svi regularni sterani, dominiraju diasterani i demetilovani hopani | Maksimalan |

Unutar svake klase jedinjenja postoji određen redosled mikrobiološke degradacije. Kod *n*-alkana i izoprenoida lakše se degraduju jedinjenja manje molekulske mase, a kod policikličnih alkana jedinjenja sa biološkom konfiguracijom (5 α (H)14 α (H)17 α (H)20R sterani i 22R-epimeri hopana se brže degraduju u poređenju sa geoizomerima, 5 α (H)14 α (H)17 α (H)20S, 5 α (H)14 β (H)17 β (H)20R ili 20S steranima, odnosno 22S-hopanima). Sa povećanjem broja aromatičnih prstenova, kao i stepena alkilovanja (u slučaju da jedinjenja sadrže isti broj aromatičnih prstenova) otpornost na dejstvo mikroorganizama se povećava. Tako su na primer, derivati naftalena degradabilniji od fenantrenskih derivata, a dimetilnaftaleni od trimetilnaftalena. Takođe, položaj alkil-grupe može imati uticaja na intenzitet biodegradacije. Na primer, nađeno je da je generalno 2-metilnaftalen biodegradabilniji od 1-metilnaftalena. Međutim, takođe je utvrđeno da podložnost alkilaromata sa određenim položajem alkil-grupe/a biodegradaciji u mnogome zavisi i od vrste mikroorganizama i od primenjenih uslova, dok su ostale više navedene stavke o biodegradabilnosti naftnih ugljovodonika opšte (Stojanović, 2017).

2.4. Fenolni derivati

Fenol i njegovi derivati predstavljaju jednu od najvećih grupa zagađujućih supstanci u životnoj sredini, najčešće vode i vazduha, zbog svoje sveprisutnosti u mnogim industrijskim otpadnim vodama i široke primene kao antibakterijska i antifungalna sredstva. Fenoli se koriste u proizvodnji kaprolaktama, bisfenola A, dezinfekcionih sredstava, kao i u različitim segmentima medicine, farmacije, hemijske, petrohemijske i tekstilne industrije. Glavne su komponente raznih industrijskih procesa, kao što su prerada uglja, proizvodnja eksploziva, boja, proizvoda od gume. Takođe, relativno dobro su rastvorni u vodi i imaju sposobnost akumulacije u zemljištu, što dodatno rezultuje

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

kontaminacijom površinskih i podzemnih voda kao i zemljišta (Krastanov et al., 2012; Mahiuddin et al., 2011).

Negativan uticaj ovih jedinjenja na životnu sredinu, zdravlje ljudi i kvalitet života detaljno je analiziran i diskutovan u naučnoj literaturi. Fenol i mnogi fenolni derivati su definisani kao prioritetni polutanti. Američka agencija za zaštitu životne sredine definisala je dozvoljenu koncentraciju fenola, njegovih nitro-, metil- i hloro-derivata, u pijaćoj vodi od svega 1 µg/L. Dakle, uklanjanje fenolnih jedinjenja iz otpadnih voda i kontaminiranih područja je od primarnog značaja. U tu svrhu primenjuju se različite fizičke, hemijske i biološke metode.

Primena fizičko-hemijskih tehnologija je poprilično skupa i nije u potpunosti efikasna. Glavni nedostatak ovih metoda je formiranje toksičnih sekundarnih intermedijera. Iz tih razloga, biološke metode za tretiranje i uklanjanje ove vrste polutanata, smatraju se dobrom alternativom zbog mogućnosti potpune razgradnje fenolnih jedinjenja do netoksičnih proizvoda pri čemu je i ekonomski isplativija. U skladu sa tim, većina istraživanja je posvećena mikrobnoj degradaciji toksičnih fenolnih jedinjenja. Međutim, proces razgradnje fenolnih jedinjenja je veoma složen, pri čemu dosta zavisi od vrste, broja i položaja supstituenata. Prisustvo epoksidne veze je od velike važnosti. Dokazano je da prisustvo amino-, metoksi-, sulfonske- i nitro grupe smanjuje efikasnost mikrobne degradacije, dok prisustvo karboksilne- i hidroksilne grupe pospešuje biodegradaciju ovih jedinjenja (Krastanov et al., 2012).

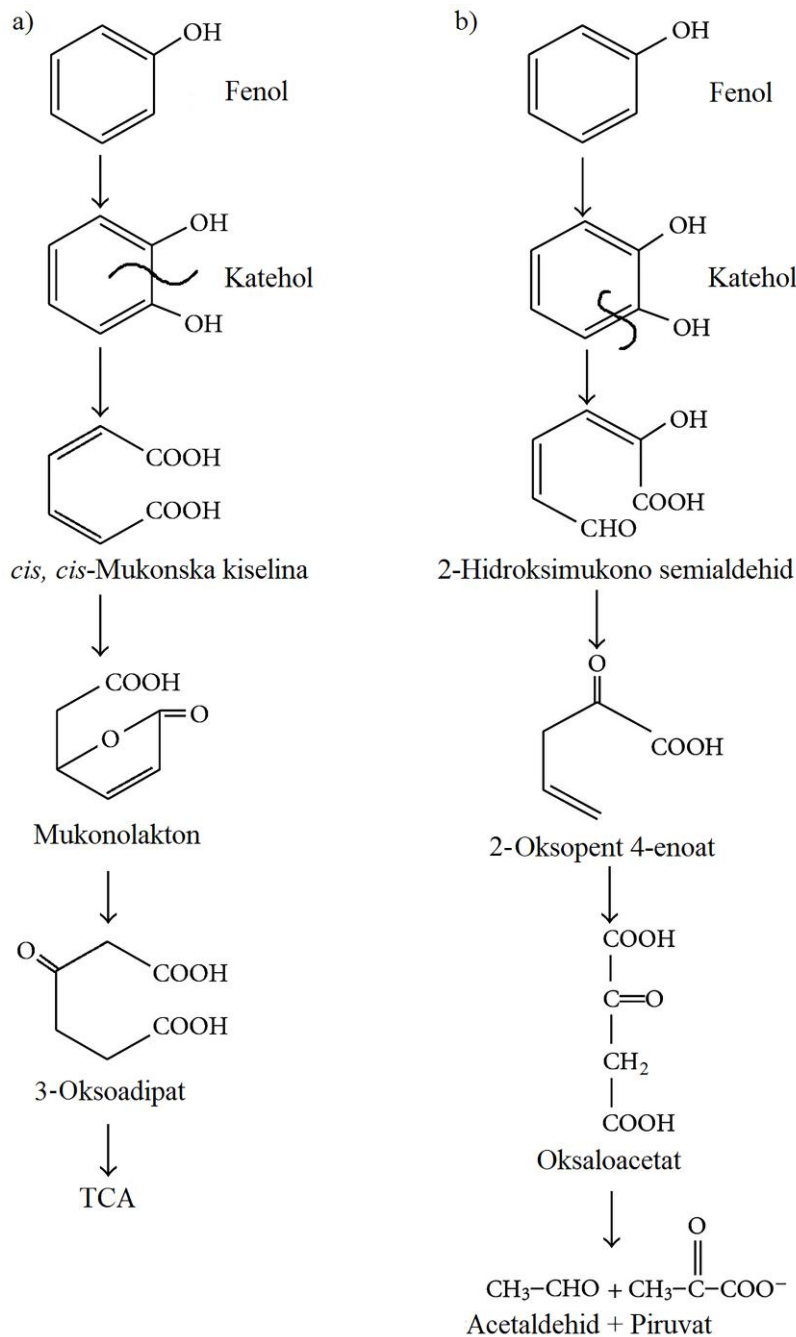
Poznato je da veliki broj mikroorganizama može metabolisati ili mineralizovati fenolna jedinjenja u aerobnim i/ili anaerobnim uslovima. Neki od njih su: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinebacter*, *Arthrobacter bacillus*, *Alcaligenes*, *Streptomyces setonii*, *Trichosporon cutaneum* i *Candida tropicalis* (Gurujeyalakshmi, Oriol, 1988; Krastanov et al., 2012). Metabolički procesi su određeni dejstvom specifičnih enzima. Čiste kulture sojeva *Pseudomonas* se često koriste za ispitivanje metaboličkih putanja razgradnje mnogih aromatičnih jedinjenja uključujući i fenole jer indukovani enzimi nisu specifični i metabolički putevi su raznovrsni, što omogućava efikasno korišćenje širokog spektra supstrata (Sridevi et al., 2012).

Tipičan metabolički put degradacije aromatičnog jedinjenja fenolnog tipa započinje hidroksilacijom benzenovog prstena pri čemu nastaje derivat katehola, a zatim sledi otvaranje prstena putem *orto*- ili *meta* oksidacije (slika 1). Katehol dalje može da se degraduje pomoću katehol 1,2-dioksidogeneze, *orto*-otvaranjem prstena (tzv. intradiolno, pri čemu se raskida veza između dva atoma ugljenika koji sadrže hidroksilne grupe) i oksiduje u *cis*, *cis*-mukonsku kiselinu (slika 1a), ili pomoću katehol 2,3-dioksidogeneze, *meta* otvaranjem prstena (tzv. ekstradiolno, pri čemu se raskida veza između ugljenikovog atoma sa hidroksilnom grupom i susednog ugljenikovog atoma bez hidroksilne grupe) do 2-hidroksimuko semialdehida (slika 1b). Konačni proizvodi oba degradaciona puta su molekuli koji mogu ući u ciklus trikarbonskih kiselina (Mahiuddin et al., 2011).

Studije su potvrdile visoku aktivnost *Pseudomonas putida* za degradaciju fenola, kao i njegovih hlornih derivata *o*-, *m*-, *p*-hlorfenola i 2,4-dihlorfenola (Farrell, Quilty, 2002; Kargi, Eker, 2004). Kumar i saradnici (2005) su u okviru svog istraživanja pokazali da *P. putida* MTCC 1194, u osnovnom slanom medijumu (*eng.*, basal salt medium), uspešno degraduje fenol, koncentracije 1 g/L, u toku 162 h, dok je katehol, koncentracije 0,5 g/L, bio degradovan za 94 h. *Pseudomonas fluorescens* PU1 ima odličan potencijal za degradaciju visokih koncentracija fenola (1000 ppm), u vodenoj sredini, preko *meta*-putanje (Mahiuddin et al., 2011). Leonard i Lindley (1998) su u svojoj studiji opisali biodegradaciju i metabolizam fenola pomoću *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas picketti* i *Alcaligenes eutrophus* preko *meta*-putanje razgradnje.

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić



Slika 1. Pretpostavljeni katabolički put transformacije fenola kod bakterija putem *orto* (a) i *meta* (b) razgradnje (Mahiuddin et al., 2011).

Paller et al. (1995) su u svojoj studiji opisali biodegradaciju fenola pomoću *Trichosporon cutaneum*, *Rhodotorula rubra* i *Acinetobacter calcoacetium* preko *orto*-putanje razgradnje. *Pseudomonas cepacia* i *Bacillus brevis*, izolovani iz industrijskih otpadnih voda koje su sadržale visoke

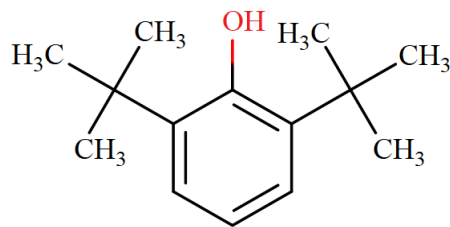
2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

koncentracije fenola, pokazali su izuzetno visoku efikasnost za degradaciju fenolnih jedinjenja. Navedeni adaptirani mikroorganizmi su degrađovali 2,50 g/L i 1,75 g/L fenola za 144 h, redom. Ova studija je pokazala da navedeni mikroorganizmi mogu da razgrade fenole, čak i u prisustvu visokotoksičnih jedinjenja, kao što su tiocijanidi, sulfidi i cijanidi, što ih čini pogodnim za tretman otpadnih voda kontaminiranih različitim polutantima (Arutchelvan et al., 2005).

2.4.1. 2,6-Di-*terc*-butilfenol (2,6-DTBP)

2,6-Di-*terc*-butilfenol (2,6-DTBP; slika 2) je industrijski važna supstanca koja se koristi kao intermedijer za sintezu i proizvodnju različitih fenolnih jedinjenja velike molekulske mase. Takođe, 2,6-DTBP se upotrebljava kao antioksidant u plastici, inhibitor oksidacije i stabilizator za gorivo, ulje i benzin (OECD/SIDS, 1994; Plastic Additive Standards, 2018). Neke fizičke i hemijske osobine 2,6-DTBP date su u tabeli 3 (OECD/SIDS, 1994).



Slika 2. Strukturna formula 2,6-DTBP.

Tabela 3. Fizičke i hemijske osobine 2,6-DTBP (OECD/SIDS, 1994)

| Naziv | 2,6-Di- <i>terc</i> -butilfenol |
|--|-----------------------------------|
| Molekulska formula | C ₁₄ H ₂₂ O |
| Relativna molekulska masa | 206,32 |
| Boja | Bezbojna ili svetlo žuta |
| Tačka topljenja (°C) | 36-37 |
| Tačka ključanja (°C) | 253 |
| Gustina (g/cm ³) | 0,91 |
| <i>n</i> -Oktanolo/voda koeficijent raspodele (log K _{ow}) | 4,5 |
| Rastvorljivost u vodi na 25 °C (mg/L) | 4,11 |

Uticaj plastike, a posebno mikroplastike na žive sisteme u vodenoj sredini postaje sve veći problem na planeti Zemlji. 2,6-DTBP, kao dodatak plastici, smatra se ozbiljnom pretnjom za vodene organizme. Antioksidanti usporavaju proces oksidacije i sprečavaju gubitak čvrstoće, propadanje ili promenu boje plastike. Zbog široke upotrebe 2,6-DTBP postoji mogućnost kontaminacije životne sredine ovim jedinjenjem, posebno površinskih voda, prilikom proizvodnih procesa i putem otpadnih voda. Istraživanja su pokazala da je 2,6-DTBP veoma opasna i toksična supstanca za vodeni svet.

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

Naime, 2,6-DTBP ima visoku akutnu toksičnost za rakove (*Gammarus fasciatus*), ribe (*Pimephalos promelas*), dafnije - planktonske rakove (*Daphnia magna*), zebrice (*Brachydanio rerio*), sa LC₅₀ (mg/L): 0,80, 1,10, 0,45 i 10, redom. Dodatno, potvrđen je uticaj na čovekovo zdravlje u vidu iritacije kože i očiju. Najčešći put degradacije 2,6-DTBP u životnoj sredini predstavlja fotooksidacija, dok je proces biodegradacije veoma otežan zbog same strukture jedinjenja i specifičnog položaja alkil suptituenata, pri čemu je -OH grupa dobro zaštićena (slika 2). Do sada postoji samo jedna publikacija koja je ispitivala proces biodegradacije ovog jedinjenja, pri čemu je dokazano da bakterija *Alcaligenes sp.* F-3-4 može uspešno da koristi 2,6-DTBP, kao izvor ugljenika i energije i efikasno ga degraduje (Zhang et al., 2005).

2.5. Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH)

Policiklični aromatični ugljovodonici su molekuli koji sadrže dva ili više kondenzovanih benzenovih prstenova i široko su rasprostranjeni u životnoj sredini. Fizička i hemijska svojstva PAH-ova zavise od molekulske mase i broja aromatičnih prstenova. Opšte karakteristike PAH-ova su: visoka tačka topljenja i ključanja, nizak napon pare i veoma mala rastvorljivost u vodi (tabela 4; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Zbog nepolarosti PAH-ovi su dobro rastvorni u organskim rastvaračima. Reaktivnost, rastvorljivost u vodi i isparljivost PAH-ova se smanjuje sa povećanjem molekulske mase, a samim tim raste otpornost na biodegradaciju (Abdel-Shafy, Mansour, 2016).

Tabela 4. Fizičke i hemijske osobine određenih PAH-ova (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

| Jedinjenje | Relativna molekulska masa | Boja | Tačka topljenja (°C) | Tačka ključanja (°C) | Gustina (g/cm ³) | <i>n</i> -Octanol:voda koeficijent raspodele (log K _{ow}) | Rastvorljivost u vodi na 25 °C (mg/L) |
|------------|---------------------------|----------|----------------------|----------------------|------------------------------|---|---------------------------------------|
| Fluoren | 166,22 | Beo | 114,8 | 295 | 1,203 | 4,18 | 1,69 |
| Fenantren | 178,23 | Bezbojan | 99,2 | 340 | 1,179 | 4,46 | 1,10 |
| Piren | 202,26 | Bezbojan | 151,2 | 404 | 1,271 | 4,88 | 0,13 |

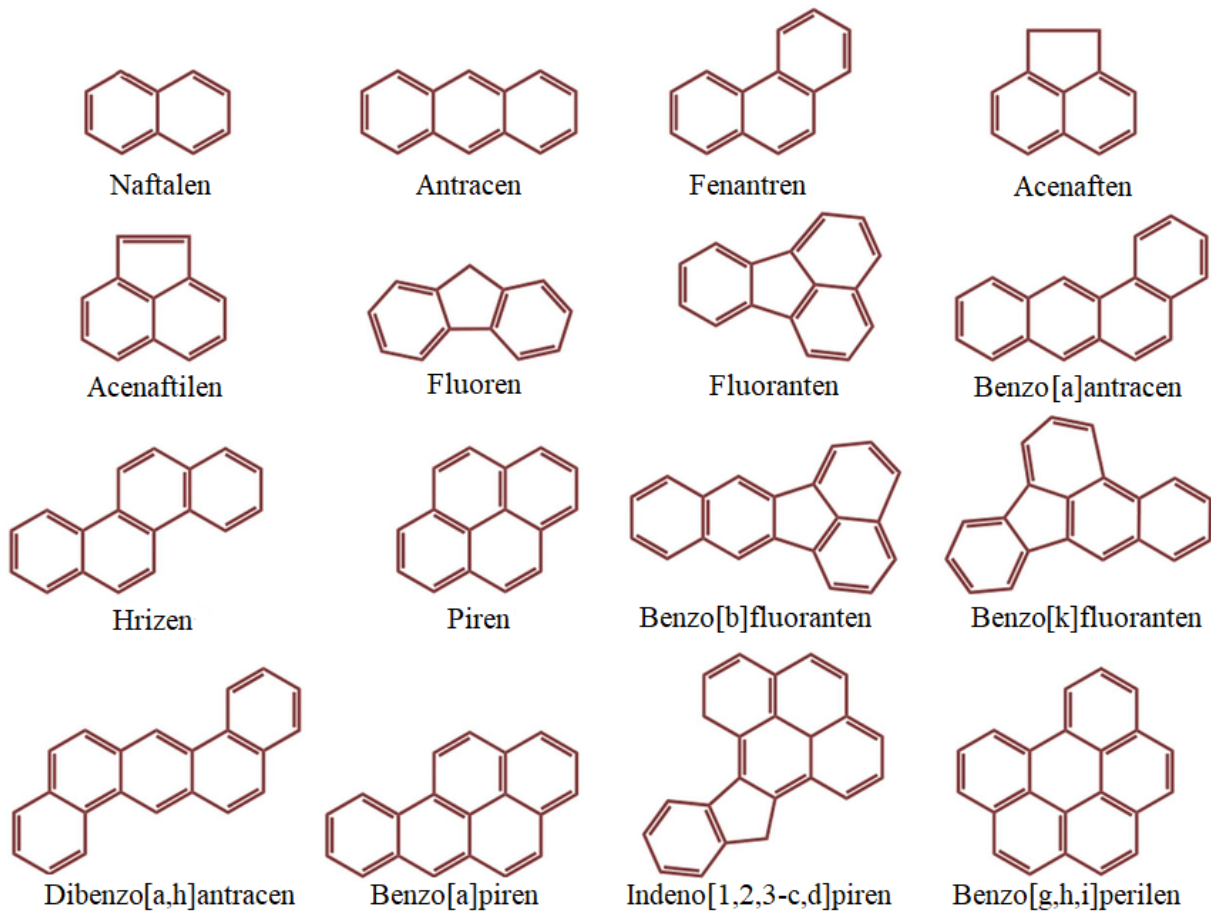
Najčešći izvori PAH-ova su nepotpuno sagorevanje organskih supstanci tokom industrijskih procesa, i drugih delatnosti ljudi, uključujući drumski saobraćaj, duvanski dim, sagorevanje otpada, grejanje pri čemu uglavnom nastaju nesuspstituisani PAH-ovi. Suspstituisani PAH-ovi, kao što su alkilnaftaleni, alkilfenantreni alkilhrizeni, su sastojci nafte i njenih derivata. Neki PAH-ovi se primenjuju kao intermedijeri u hemijskoj industriji, farmaciji i poljoprivredi. Tako se na primer, fluoren koristi u proizvodnji fluorenona, lekova, pigmenata, boja, pesticida i termoosetljive plastike; fenantren u proizvodnji smola i pesticida; piren u proizvodnji pigmenata (Abdel-Shafy, Mansour, 2016).

Raspodela PAH-ova u životnoj sredini je različita, kao i njihov transport i efekti na biološke sisteme. Mnogi PAH-ovi se smatraju kontaminantima životne sredine koji mogu štetno uticati na floru i

2. TEORIJSKI DEO

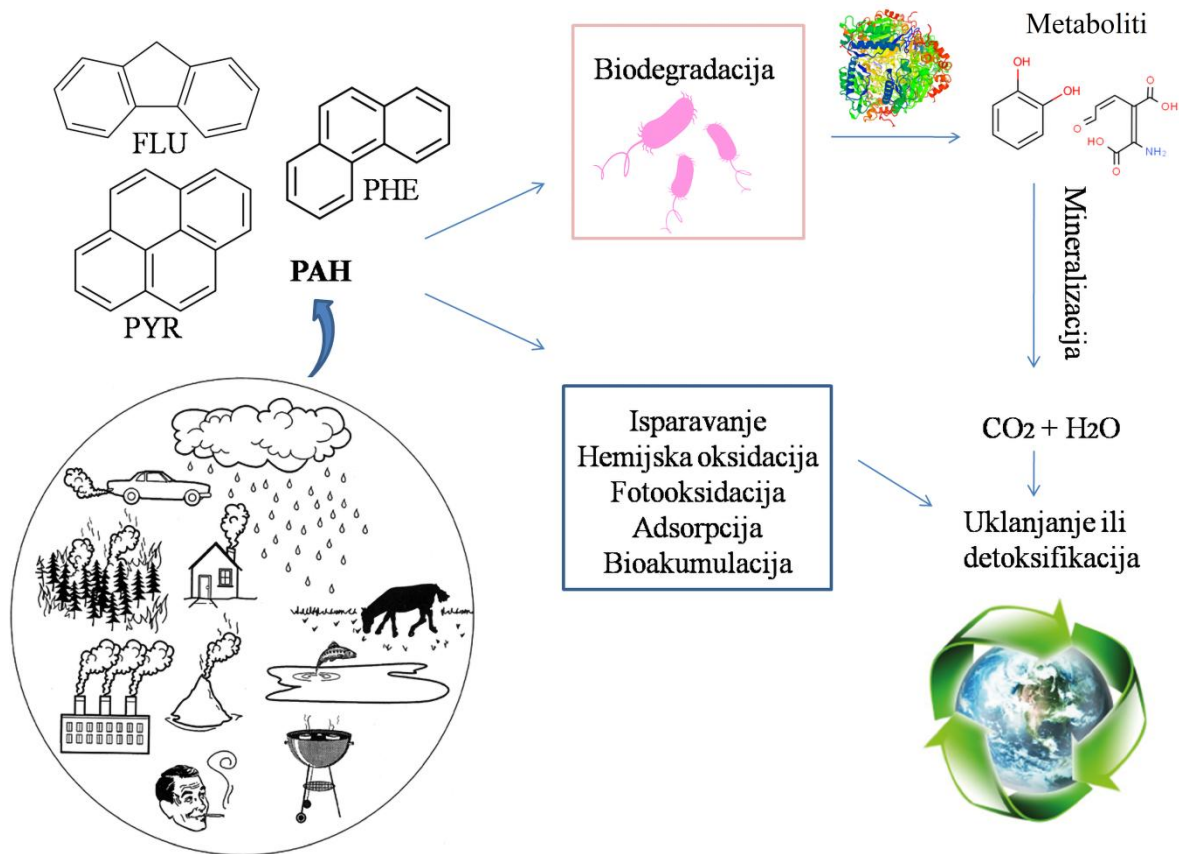
Ana B. Medić

faunu, što rezultuje ulaskom toksičnih jedinjenja u lanac ishrane i ozbiljnim zdravstvenim problemima i genetskim oštećenjima kod ljudi. Zbog njihove toksičnosti, mutagenosti i kancerogenosti američka agencija za zaštitu životne sredine (*eng.*, US Environmental Protection Agency, US EPA) svrstala je 16 PAH-ova na listu prioriternih polutanata (Ghosal et al., 2016; Sudip et al., 2002; slika 3).



Slika 3. 16 PAH-ova sa liste prioriternih zagađujućih supstanci (Ghosal et al., 2016).

PAH-ovi su relativno stabilni i otporni na degradaciju u poređenju sa drugim organskim jedinjenjima. Mnoga istraživanja su urađena da bi se detaljno ispitali mogući putevi degradacije i načini uklanjanja PAH-ova iz životne sredine (Seo et al., 2009). Najčešća metoda za uklanjanje PAH-ova sa kontaminiranih područja je mikrobiološka degradacija. Druge moguće sudbine PAH-ova su: isparavanje, fotooksidacija, hemijska oksidacija, bioakumulacija, adsorpcija (slika 4).



Slika 4. Distribucija i transformacija PAH-ova u životnoj sredini (modifikovano prema Cerniglia et al., 1993).

Legenda: FLU – Fluoren; PHE – Fenantren; PYR – Piren.

2.6. Uloga *Pseudomonasa* u bioremedijaciji

Prirodna zastupljenost mikroorganizama sa multidegradativnim kapacitetom može imati glavnu ulogu u uklanjanju heterogenih zagađujućih supstanci (Brzeszcz, Kaszycki, 2018). Iako je biološka remedijacija organskih zagađujućih supstanci veoma izazovna jer su neke od njih vrlo stabilne i otporne na mikrobiološku razgradnju, istraživanja su pokazala da određen, manji broj mikroorganizama ima sposobnost da akumulira, transformiše ili razgradi toksična organska jedinjenja. Mikroorganizmi sa potencijalom za razgradnju različitih organskih jedinjenja su: *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus laterosporus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus sp.*, i posebno vrste roda *Pseudomonas* (Krastanov, 2013).

Rod *Pseudomonas* je poznat po svojoj sposobnosti da koristi različite ugljovodonike i aromatična jedinjenja kao jedini izvor ugljenika (Kwon, Yeom, 2009; Sridevi, 2012; van Beilen et al., 2001). Do sada su publikovani brojni radovi o degradaciji različitih organskih jedinjenja pomoću nekoliko *Pseudomonas* sojeva, uključujući degradaciju alkilfenola pomoću *Pseudomonas sp.* KL28 (Jeong et al., 2013), *Pseudomonas putida* MT4 (Takeo et al., 2006), i *Pseudomonas veronii* INA06 (Ajithkumar et al., 2003). Za dva soja: *Pseudomonas azelaica* (Kohler et al., 1993) i *Pseudomonas sp.*

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

MS-1 (Toyama et al., 2010) je pokazano da degraduju *orto*-monosupstituisane alkilfenole, dok *Pseudomonas putida* TX2 i *Pseudomonas sp.* TX-1 degraduju *para*-monosupstituisane alkilfenole (Tuan et al., 2011). Do trenutka pisanja ovog rada postoji samo jedna publikacija o biodegradaciji *orto*-disupstituisanih alkilfenola (Zhang et al., 2005).

Pseudomonas putida uspešno degraduje *n*-alkane (van Beilen et al., 2001), *P. aeruginosa* W10 *n*-C₁₆, naftalen, fenantren, fluoranten i piren (Chebbi et al., 2017), *Pseudomonas sp.* F274 fluoren (Grifoll et al., 1994), dok *Pseudomonas sp.* NCIB 9816-4 ima kapacitet da degraduje fluoren, dibenzofuran i dibenzotiofen (Resnick, Gibson, 1996). *P. aeruginosa* DQ8, bakterija izolovana iz zemljišta kontaminiranog naftom, može da degraduje PAH-ove kao što su fluoren, fenantren, fluoranten i piren (Zhang et al., 2011). Kako *Pseudomonas* može da koristi širok spektar ugljovodonika ova bakterija ima ključnu ulogu u njihovom uklanjanju sa kontaminiranog područja. Posebno su važni ekstremofili koji mogu podneti različite uslove prilikom rasta, pa se mogu koristiti za bioremedijaciju zagađenih ekstremnih lokaliteta (Margesin, Schinner, 2001; Mehetre et al., 2019).

2.6.1. Uloga *Pseudomonas aeruginosa* u bioremedijaciji

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), posebno ekološki izolati, mogu da budu od velikog značaja u bioremedijaciji zagađujućih supstanci zbog svog jedinstvenog ponašanja poput: formiranja biofilma, komunikacije mehanizmom „quorum sensing“ (*QS*), kao i razgranatim metaboličkim putevima primarnog i sekundarnog metabolizma. Sve veći broj publikacija potvrđuje potencijal *P. aeruginosa* za bioremedijaciju organskih jedinjenja (Chellaiah et al., 2018; Izrael-Živković et al., 2018, 2019; Rikalović et al., 2014; Zhang et al., 2011).

U svojoj studiji, Chebbi i saradnici (2017) su pokazali da *P. aeruginosa* W10 ima kapacitet da degraduje naftalen, fenantren, fluoranten i piren. *P. aeruginosa* RM1 i SK1, bakterije izolovane iz zagađenog zemljišta tropske oblasti, uspešno degraduju pristan, antracen i piren poreklom iz otpadnog motornog ulja (Salam, 2016). *P. aeruginosa spp.* A5 i A6, izolovani iz područja kontaminiranog naftom u Japanskom moru, pokazali su multidegradativnu sposobnost (Chaerun et al., 2004). Romero et al. (1998) su izolovali *P. aeruginosa* iz oblasti koja je bila ekstremno kontaminirana naftom iz obližnje rafinerije i pokazali da ova bakterija u potpunosti uklanja fenantren u toku 30 dana. *P. aeruginosa* PaK1, izolovan iz mulja u postrojenju za prečišćavanje otpadnih voda u Kini ne može da koristi fenantren, antracen i derivate benzena kao supstrat, ali uspešno degraduje salicilat i naftalen (Takizawa et al., 1999). *P. aeruginosa* DN1, izolovan iz zemljišta kontaminiranog naftom, pokazao je veliku sposobnost korišćenja fluorantena i sirove nafte kao jedinog izvora ugljenika (He et al., 2018).

Zbog velike metaboličke raznovrsnosti, niskih nutritivnih potreba, izražene proizvodnje sekundarnih metabolita (egzopolisaharida, ramnolipida, siderofora) i mogućnosti stvaranja biofilma (Moradali et al., 2017), *P. aeruginosa* ima sposobnost preživljavanja u različitim uslovima, uključujući ekstremna okruženja. Ekstremofilni izolati ove bakterije su klasifikovani u nekoliko kategorija (tabela 5; Karadžić et al., 2020, u štampi).

P. aeruginosa je dobro poznat po svojoj sposobnosti da koristi različite izvore ugljenika, a istovremeno je prisutan na gotovo svim kontaminiranim područjima (Chellaiah et al., 2018). Neki izolati *P. aeruginosa* koji su prikazani u tabeli 5 ubrajaju se u poliekstremofile, dok su drugi oligotrofi sa posebnom sposobnošću da prežive, rastu i degraduju ugljovodonike, uključujući i njihove složene smeše, kao što su frakcije sirove nafte.

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

Tabela 5. Klasifikacija ekstremofila *P. aeruginosa*

| Mikroorganizam | Klasa ekstremofila | Izvori ugljenika koji su korišćeni od strane bakterija koje razgrađuju ugljovodonike | Reference |
|-----------------------------------|---|---|---|
| <i>P. aeruginosa</i> | Psihrofilni | / | Molin, Ternstrom, 1986 |
| <i>P. aeruginosa</i> AP02-1 | Termofilni, Organotrofni | Alkani (C ₅ –C ₁₉), aromatični ugljovodonici (benzen, toluen, <i>o</i> -ksilen), PAH (antracen, naftalen), heterociklični ugljovodonici sa sumporom (1-benzotiofen, dibenzotiofen) | Perfumo et al., 2006 |
| <i>P. aeruginosa</i> FRD1, RM4440 | Otporan na UV zračenje | / | Elasri et al., 1999 |
| <i>P. aeruginosa</i> | Halotolerantni | / | Varjani, Upasani, 2019 |
| <i>P. aeruginosa</i> AspH2 | Halotolerantni Oligotrofni | Naftni ugljovodonici (zasićeni, aromatični), asfalteni, smole | Ali et al., 2014 |
| <i>P. aeruginosa</i> LVD-10 | Halotolerantni, Oligotrofni | Toluen, fenol, <i>p</i> -krezol, fenantren, 4-nitrofenol, indol, dizel | Drakou et al., 2015 |
| <i>P. aeruginosa</i> san ai | Alkalofilni, Metalotolerantni Oligotrofni | 2,6-di- <i>terc</i> -butilfenol, <i>n</i> -alkani (<i>n</i> -C ₁₆ , <i>n</i> -C ₁₉), PAH (fenantren, fluoren, piren) | Karadzic et al., 2004, Avramović et al., 2013, Izrael-Živković et al., 2018, Medić et al., 2019 |
| <i>P. aeruginosa</i> | Oligotrofni | / | Tada et al., 1995 |
| <i>P. aeruginosa</i> | Halotolerantni, Oligotrofni | <i>n</i> -Alkani (<i>n</i> -C ₁₂ -C ₄₂), PAH (naftalen, fluoren, fenantren, dibenzotiofen, fluoranten, piren, antracen i njihovi derivati) | Pasumarthi et al., 2013 |
| <i>P. aeruginosa</i> RM1 i SK1 | Halofilni, Oligotrofni | Fracije ugljovodonika u otpadnom motornom ulju (<i>n</i> -alkani C ₉ -C ₂₆ , antracen, piren) | Salam, 2016 |
| <i>P. aeruginosa</i> BC15 | Metalotolerantni | / | Raja et al., 2006 |
| <i>P. aeruginosa</i> | Metalotolerantni | / | Yamina et al., 2014 |
| <i>P. aeruginosa</i> | Metalotolerantni | / | Teitzel, Parsek, 2003 |

Zbog slučajnih izlivanja i akcidenata, čak i ekstremna područja mogu biti kontaminirana organskim polutantima. U ovakvim uslovima, većina mikroorganizama nije u stanju da efikasno ukloni ili degraduje zagađujuće supstance. Ovaj problem može biti rešen primenom ekstremofilnih mikroorganizama koji su već adaptirani na ovakve okolnosti i uslove. Istraživanja su pokazala da je širok spektar ugljovodonika biodegradovan u uslovima niske (Artik, Antartik) i visoke (pustinje)

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

temperature, kiselih sredina ili šumskog zemljišta, baznih industrijskih otpadnih voda, kao i kontaminiranih zemljišta i voda sa visokim salinitetom (Margesin, Schinner, 2001). Mikroorganizmi koji su prilagođeni ekstremnim uslovima imaju veliki potencijal da se brzo akumuliraju i odgovore na zagađujuću supstancu zahvaljujući razvijenoj, sofisticiranoj, molekularnoj strategiji zasnovanoj na adaptiranim biomolekulima i biohemijskim putanjama. Naime, zahvaljujući razvijenoj strategiji prilagođavanja uslovima ekstremnih temperatura, saliniteta i pH, enzimi odgovorni za biotransformaciju zagađujuće supstance ostaju katalitički aktivni. Na primer, proteini termofila imaju disulfidne mostove i oligomernu strukturu, proteini halofila sadrže povećan broj aminokiselina sa kiselim ostacima, dok se proteini psihrofila, koji su aktivni na niskim temperaturama, odlikuju velikom fleksibilnošću aktivnih centara i niskom energijom aktivacije (Brininger et al., 2018; Karadzic et al., 2004, 2005). Zahvaljujući prilagođenim strukturama enzima, adaptacija mikroorganizma odigrava se kroz tri glavna odgovora: metabolički (globalni i specifični put), odgovor stresom (adaptacija suboptimalnim uslovima rasta) i socijalni odgovor (pokretljivost, hemotaksija, biofilm, međučelijske interakcije) (Nogales et al., 2017). Brzi i specifični odgovor na toksičnu supstancu putem metaboličke adaptacije i ubrzanog rasta *P. aeruginosa* može poslužiti kao rani signal upozorenja da je zagađujuća supstanca prisutna u ekosistemu.

2.7. Metode za istraživanje molekulskog mehanizma biodegradacije

Zbog svoje sveprisutnosti, interakcije sa biotičkim i abiotičkim komponentama životne sredine kao i razgranatih metaboličkih aktivnosti, mikroorganizmi imaju ključnu ulogu u bioremedijaciji životne sredine. Razumevanje uloge mikroorganizma u ovom procesu je složeno, pa je potrebno detaljno ispitati ne samo strukturu i funkciju mikrobne zajednice već i mehanizme biodegradacije na molekulskom nivou.

Raznovrsnost i rasprostranjenost mikroorganizama u životnoj sredini, posebno u kontaminiranim područjima u osnovi je funkcionalne različitosti u procesu bioremedijacije. Razvijene su mnoge metode koje se primenjuju u svrhu izolovanja mikroorganizama sa potencijalom za bioremedijaciju. Neke od klasičnih metoda su: ispitivanje i odabir optimalnih uslova za kultivaciju mikroorganizama u cilju povećanja rasta određenih mikrobnih vrsta kao i analiza mikrobnih zajednica u cilju utvrđivanja njihovog potencijala za korišćenje različitih izvora ugljenika (Shahsavari et al., 2017). Pored klasičnih metoda u mikrobnoj ekologiji, danas se rado koriste i brojne biohemijske metode, kao i metode molekularne biologije. Od biohemijskih analiza, često se koristi određivanje fosfolipidnih masnih kiselina (FMK). Fosfolipidne masne kiseline su esencijalne komponente ćelijske membrane mikroorganizma, koje se brzo razgrađuju nakon smrti ćelije, i služe kao indikator razlike živog i mrtvog organizma. Takođe, različiti profili FMK kod različitih mikroorganizama čine tehniku korisnom za razlikovanje mikrobnih zajednica. Pored FMK u mikrobnoj ekologiji se koriste različiti pristupi u analizi nukleinskih kiselina. Metode koje se primenjuju su: sekvenciranje pojedinačnih DNK, analiza metagenoma, i sekvenciranje 16rDNK. Metodom PCR (*eng.*, Polymerase Chain Reaction), a posebno kvantitativne PCR se mogu proučavati ekspresije određenih funkcionalnih gena, pri čemu se ciljani geni mogu u potpunosti kvantifikovati (Shahsavari et al., 2017).

Analitičke tehnike za procenu degradacije zagađujućih supstanci kao što su HPLC i GC-MS, nisu posebno efikasne u određivanju uticaja zagađujuće supstance na mikroorganizam. Neki od klasičnih testova koji se primenjuju u proučavanju uticaja zagađujućih supstanci na mikroorganizme su: praćenje rasta i prinos biomase, respiratorna aktivnost, enzimski testovi, denitrifikacija (Margesin et al.,

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

2000). Merenje aktivnosti određenih enzima može biti dobar parameter za utvrđivanje toksičnih efekata ispitivanog supstrata na mikroorganizam. Povećana aktivnost enzima koji su uključeni u proces razgradnje organskih zagađujućih supstanci može da ukaže na prisutvo kontaminanta u životnoj sredini, kao i njihove efekte na mikrobnu populaciju.

U detekciji ranog signala za kontaminaciju životne sredine biosenzori/bioreporter i biomarkeri dobijaju sve više značaja. U skladu sa ciljevima ove disertacije, biće ukratko opisani samo ekološki biomarkeri.

Biomarkeri su jedinjenja, koja ukazuju na promene u organizmu kada je izložen nekoj zagađujućoj supstanci. Glavna karakteristika biomarkera je da signaliziraju promene u organizmu, kao i toksične efekte mnogo pre pojave merljivih i vidljivih efekata na nivou organizma. Upotreba biomarkera u studijama izloženosti organizama zagađujućim supstancama se naziva biomonitoring. U proceni izloženosti, postoje tri vrste biomarkera koji mogu biti korisni: biomarkeri osetljivosti, biomarkeri izloženosti i biomarkeri dejstva/efekta. Biomarkeri izloženosti su najčešće korišćeni jer mogu pružiti informacije o načinu izlaganja, metaboličkom putu, a ponekad i o izvoru određenog jedinjenja. Takođe, biomarkeri se mogu klasifikovati u dve grupe: opšti i specifični. U opšte biomarkere ubrajaju se svi oni odgovori organizma na različitim nivoima (genetskom, molekulskom, ćelijskom, fiziološkom) koji nisu uzrokovani samo jednom grupom kontaminanata, dok su specifični biomarkeri – molekulski i biohemijski odgovori koji mogu da se detektuju u organizmu kao posledica izloženosti određenoj klasi kontaminanata (Conti, 2008).

Upotreba biomarkera u monitoringu životne sredine je metoda komplementarna hemijskoj analizi jer pomoću biomarkera može da se detektuje prisustvo zagađujuće supstance u biosistemu, kao i rani efekti te supstance. Dok se pomoću određenih mikroorganizama, bioreportera, može pratiti direktan uticaj kontaminanta na žive organizme (Hansen 2008; Hansen, Usedom, 1997), biomarkeri ukazuju na promene u biološkom odgovoru, na molekulskom nivou, koje su izazvane toksičnim efektima ispitivanog jedinjenja.

Do sada najčešće korišćena kategorija biomarkera za procenu štetnih uticaja širokog spektra kontaminanata su tzv. oksidativni biomarkeri, enzimi oksidativnog stresa (npr. superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1), katalaza (CAT, EC. 1.11.1.6), glutation peroksidaza (EC 1.11.1.9), glutation reduktaza (EC. 1.6.4.2)). Cheung i saradnici (2000) su u svojoj studiji pokazali da sa povećanjem koncentracije PAH-ova, kao što je benzo[a]piren, u tkivu školjke *Perna viridis* dolazi do povećane ekspresije enzima oksidativnog stresa. U biomarkere se svrstavaju i različiti enzimi indukovani prisustvom zagađujuće supstance, geni koji kodiraju te enzime, promene u DNK ili *i*-RNK, određeni metaboliti, o čemu će u nastavku teksta biti više reči.

Novorazvijene „highthroughput“ omiks platforme se u poslednje vreme sve više koriste za procenu uticaja zagađujuće supstance na mikroorganizme, razumevanje mehanizama adaptacije i biodegradacije, kao i detekciju potencijalnih biomarkera (Shahsavari et al., 2017).

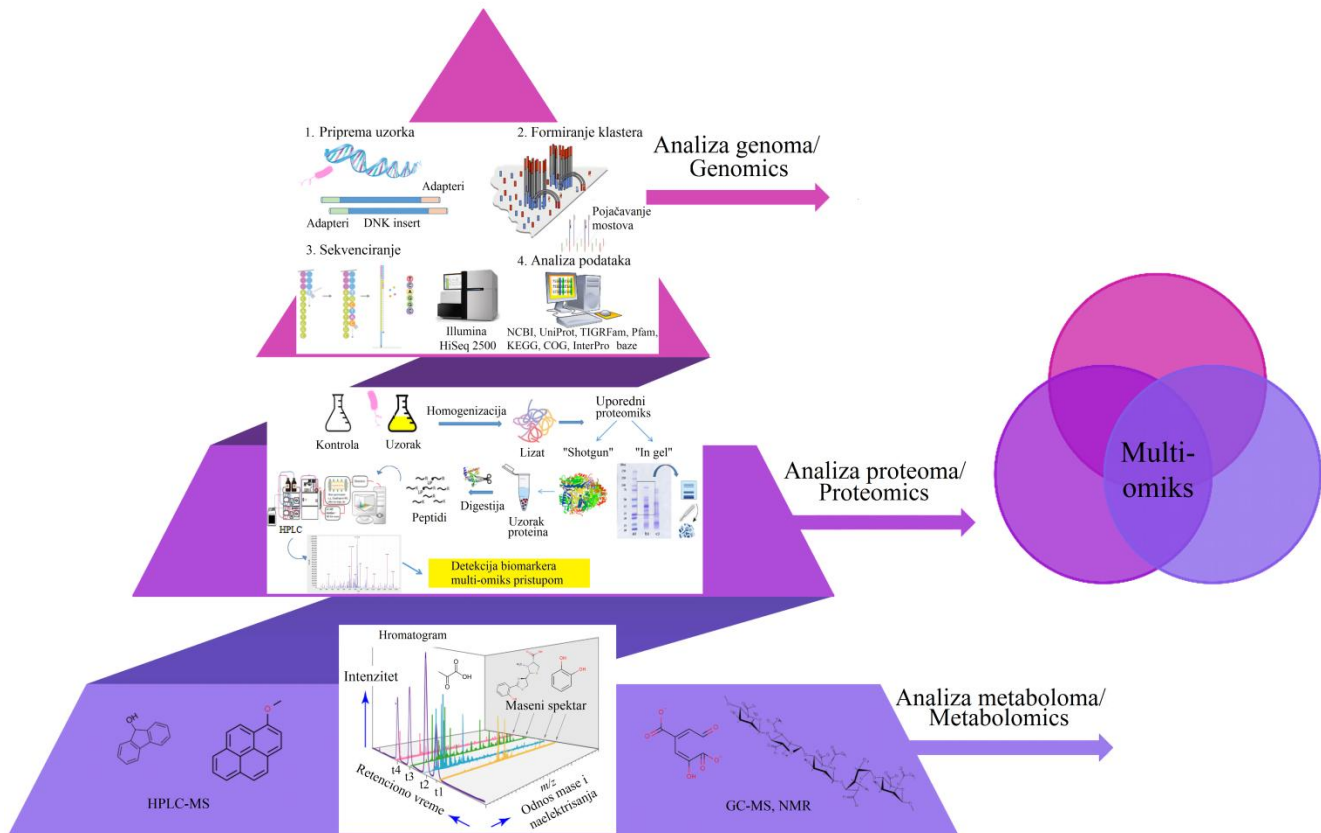
2.7.1. Omiks metode

Nedavni napredak u bioinformatici i bioanalitičkim metodama sveobuhvatne analize („high throughput“), genoma, proteoma i metaboloma, otvorio je nove mogućnosti za razumevanje molekulskog mehanizma biodegradacije (Chauhan, Jain, 2010; slika 5). Ove omiks metode omogućavaju proučavanje ranog molekulskog odgovora organizma na izvore zagađenja, i kao takve mogu se koristiti za identifikaciju specifičnog metaboličkog odgovora na toksičnu supstancu,

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

otkrivanje novih biomarkera, kao i za predviđanje uticaja zagađujuće supstance na biološke vrste i životnu sredinu (Gouveia et al., 2019).



Slika 5. Multi-omiks metode za istraživanje izolata *P. aeruginosa* kao potencijalnih biomarkera za organske zagađujuće supstance (Karadžić et al., 2020, u štampi).

Specifičan ćelijski odgovor tokom rasta na različitim izvorima ugljenika, uključujući i organske zagađujuće supstance, utiče na promene u proteomu mikroorganizma. Uvid u mehanizme koji su povezani sa uklanjanjem organskog polutanta olakšali bi razumevanje molekularnih mehanizama adaptacije mikroorganizma, kao i ulogu mikroorganizama u zaštiti životne sredine. Dodatno, različita sinteza proteina/enzima indukovana različitim uslovima rasta omogućila bi upotrebu ovih jedinjenja kao specifičnih biomarkera za biomonitoring životne sredine (Ghiglione et al., 2016).

2.7.1.1. Genomske studije

Od sekvenciranja ljudskog genoma do danas, uloženi su veliki napor u razumevanju i povezivanju gena sa njihovom funkcijom, kao i nivoa ekspresije u odnosu na druge biomolekule (*i*-RNK, proteine, metabolite). Omiks metode imaju veliki potencijal u proučavanju: fizioloških promena mikroorganizma nakon izlaganja zagađujućoj supstanci, mehanizama adaptacije na specifične uslove životne sredine, otkrivanju i primeni ranih biomarkera u ekotoksikologiji (Shahsavari et al., 2017).

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

Internet baza podataka o genomima (The Genomes Online Database, GOLD; <https://gold.jgi.doe.gov>), kao ažurirani katalog genoma i metagenoma, pokazuje da je sekvencirano 215 881 genoma povezanih sa 313 324 organizama (Mukherjee et al., 2019). Broj sekvenciranih bakterijskih genoma je 60112, a metagenoma 8644 (podaci iz 2019. godine). Prema GOLD, sekvencirano je 723 genoma *Pseudomonas aeruginosa*, pri čemu većina pripada kliničkim izolatima. UniProt (<https://www.uniprot.org/proteomes/>) pruža impresivan broj okarakterisanih proteoma *P. aeruginosa* (2802), demonstrirajući produblјivanje znanja o ovom mikroorganizmu na molekulskom nivou.

Genomi bakterija, posebno *Pseudomonas*, izolovani iz ekstremnih uslova, potvrdili su postojanje gena odgovornih za proteine koji omogućavaju adaptaciju takvim uslovima (Das et al., 2015; He et al., 2018; Izrael-Živković et al., 2019). Analiza genoma bakterije *P. aeruginosa* N002, koja je izolovana sa lokaliteta kontaminiranog sirovom naftom, pokazala je da ova bakterija poseduje aktivni genetski mehanizam za degradaciju sirove nafte koja uključuje gene odgovorne za biodegradaciju ugljovodonika i produkciju biosurfaktanata (Das et al., 2015). Geni koji su uključeni u degradaciju aromatičnih jedinjenja preko katehola (catABC) i protokatehuata (pcaBCG) identifikovani su kod *P. aeruginosa* DN1, mikroorganizma koji ima potencijal da koristi fluoranten i sirovu naftu kao jedini izvor ugljenika (He et al., 2018). Sekvenciranjem genoma *P. aeruginosa* DQ8, bakterije izolovane iz zemlјišta kontaminiranog naftom, pokazano je prisustvo ključnih gena i enzima koji su uključeni u biotransformaciju PAH-ova (fluorena, fenantrena, fluorantena i pirena) preko dva metabolička puta (Zhang et al., 2011). Svi geni koji kodiraju enzime učesnike u degradaciji naftalena identifikovani su u *P. aeruginosa* PaK1, bakteriji koja je izolovana iz mulja u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda (Takizawa et al., 1999). Eaton i Chapman (1992) su pokazali da je degradacija naftalena pomoću *P. aeruginosa* PAO1 povezana sa genima koji kodiraju prva tri enzima naftalenskog degradacionog puta preko salicilata. Ključni geni koji učestvuju u degradaciji aromatičnih jedinjenja su identifikovani u genomu sledećih *P. aeruginosa* izolata: PAO1, KF702, N002 i DSM50071 (Dong et al., 2017). *P. aeruginosa* san ai, izolovan iz mineralnog ulja za sečenje metala (pH 10) je alkalofilna, bakterija tolerantna na teške metale, koja može da razgrađuje ugljovodonike, a poseduje kolekciju gena koji kodiraju ključne enzime odgovorne za transformaciju *n*-alkana, aromatičnih jedinjenja i halogenih derivata benzena (Izrael-Živković et al., 2019; Medić et al., 2019).

Ključ razumevanja mehanizama adaptacije *P. aeruginosa* zagađenim sredinama leži u proteomskim promenama i specifičnim metaboličkim putevima koji omogućavaju preživljavanje bakterije kada je izložena ekstremnim uslovima.

2.7.1.2. Proteomske studije

Razvoj proteomskih platformi omogućio je „high throughput“ analizu proteina, uključujući identifikaciju i karakterizaciju proteina, njihove posttranslacione modifikacije, kvantifikaciju, ćelijsku lokalizaciju, interakcije, aktivnosti i funkciju (Simpson, 2003). Ovo je olakšalo proučavanje i praćenje složenih bioloških procesa, uključujući i one u zagađenom okruženju (Richardson, 2001). Identifikacija proteina se uglavnom zasniva na „bottom up“ pristupu (analiza peptida dobijenih proteolitičkom digestijom) primenom masene spektrometrije, zasnovane na mekim (soft) tehnikama jonizacije uzorka, kao što su laserska desorpcija/ionizacija (*eng.*, matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) ili elektrosprej jonizacija (*eng.*, electrospray ionization, ESI). Eksperimentalno, masenospektrometrijski određena molekulska masa peptida i fragmentacionih jona se upoređuje sa predviđenom molekulskom

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

masom peptida dobijenog *in silico* digestijom svakog proteina u bazi podataka, kako bi se identifikovali proteini (Bladwin, 2004).

Proteomske platforme pružaju veliki potencijal za proučavanje mehanizama reakcije na kontaminante životne sredine i istovremeno mogućnost otkrivanja bioloških markera zagađenja životne sredine. Dosadašnja istraživanja pokazala su da se tokom degradacije aromatičnih jedinjenja odigravaju velike promene u proteomu mikroorganizma, u poređenju sa proteomom mikroorganizma koji je rastao na uobičajenim izvorima ugljenika (Kurbatov et al., 2006; Li et al., 2016; Roma-Rodrigues et al., 2010; Santos et al., 2004; Seo et al., 2009; Tsirogianni et al., 2004; Vandera et al., 2015; Verhoef et al., 2010). Nedavna publikacija pokazala je upotrebu proteomske analize za uspešno istraživanje kataboličkog puta fenantrena u *Arthrobacter phenanthrenovorans* (Vandera et al., 2015), na osnovu pojačane sinteze enzima koji su uključeni u degradaciju aromatičnog prstena, kada je kultura rasla na fenantrenu. 1 D gel-elektroforeza u kombinaciji sa tandem masenom proteomskom analizom pokazala se kao osetljiva metoda za detekciju enzima koji su uključeni u degradaciju fenola pomoću *Pseudomonasa* (Tsirogianni et al., 2004).

2.7.1.3. Metabolomske studije

Metabolomska analiza je moćna molekulska metoda koja počiva na analizi metabolita kao direktnih proizvoda enzimske aktivnosti u živim sistemima. Za analizu metabolita upotrebljavaju se veoma osetljive tehnike, kao što su tečna ili gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (LC- ili GC-MS) ili nuklearna magnetna rezonanca (NMR) (Patti et al., 2013).

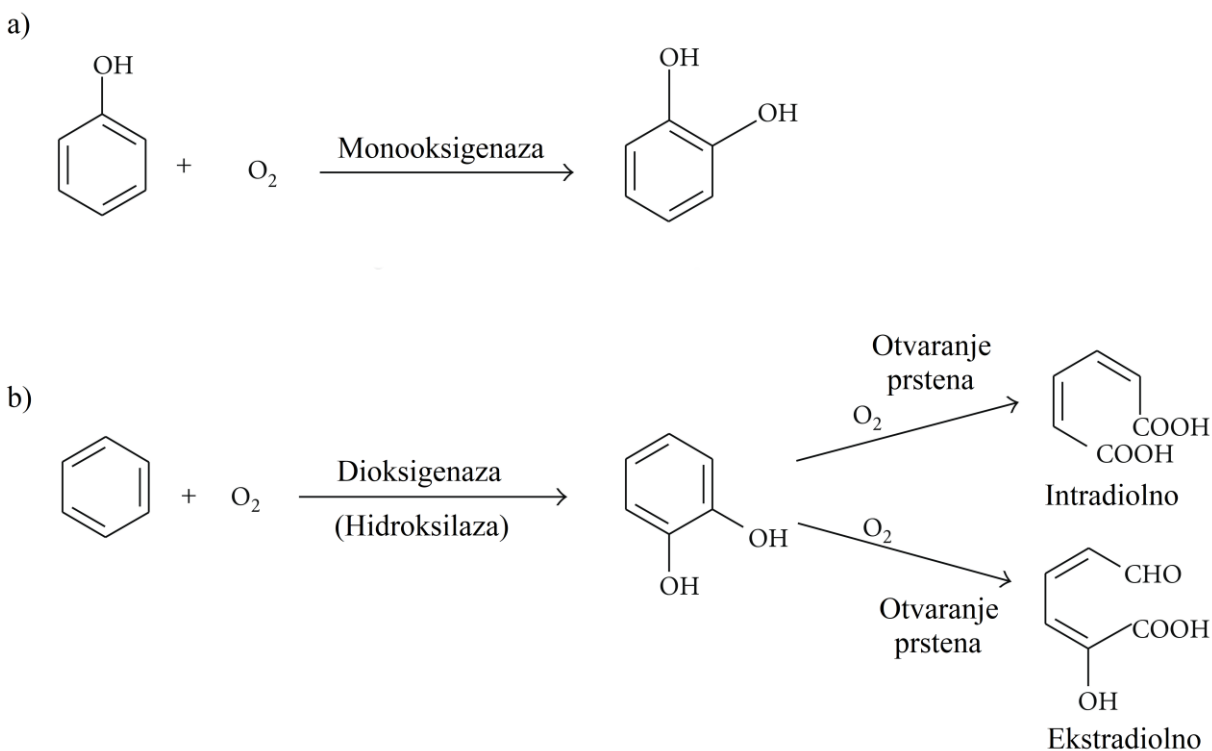
Ispitivanjem određenih metabolita kao specifičnog odgovora na degradaciju fluorena pomoću *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4, koji su identifikovani GC-MS, ¹H NMR i ¹³C NMR analizom (Resnick, Gibson, 1996), potvrđen je degradacioni put fluorena (Seo et al., 2009). Upotrebom GC-MS analize detektovana je ftalna kiselina kao ključni intermedijer tokom rasta *P. aeruginosa* W10 na fenantrenu kao izvoru ugljenika, iz čega je zaključeno da fenantren može biti degradovan preko protokatehuata (Chebbi et al., 2017). Uspešna kombinacija genomske i metabolomske analize zasnovane na GC-MS analizi *P. aeruginosa* DN1 tokom degradacije fluorantena razrešile su put razgradnje ovog ugljovodonika (He et al., 2018).

2.8. Mehanizmi bakterijske biodegradacije ugljovodonika

Opšta svojstva alkana i PAH-ova kao što su mala rastvorljivost u vodi i hidrofobnost, utiču na nisku bioraspoloživost i otežavaju mikrobnu biodegradaciju. Srećom, specifični heterotrofni mikroorganizmi razvili su posebne kataboličke mehanizme koji omogućavaju degradaciju aromatičnog prstena. Shodno tome, postoji veliko interesovanje za identifikaciju i razumevanje potencijalnih mehanizama degradacije *n*-alkana i PAH-ova upotrebom mikroorganizama, što dokazuju brojne studije (Seo et al., 2009). Najčešći mikrobni enzimi koji učestvuju u procesu biodegradacije organskih jedinjenja su oksidoreduktaze (oksidaze, lakaze), peroksidaze i hidrolaze (Karigar, Rao, 2011).

2.8.1. Enzimi u degradaciji organskih jedinjenja

Oksigenaze imaju ključnu ulogu u degradaciji organskih jedinjenja, jer su proizvodi njihove aktivnosti jedinjenja čija je rastvorljivost u vodi znatno veća od polaznih (slika 6a). Uvođenjem atoma kiseonika u organski molekul dolazi do destabilizacije i do otvaranja aromatičnog prstena. Na osnovu broja atoma kiseonika koji koriste za oksigenaciju, oksigenaze se dele na monooksigenaze i dioksigenaze. Katehol dioksigenaze, kao sastavne komponente bakterija, predstavljaju prirodnu strategiju za degradaciju aromatičnih jedinjenja u životnoj sredini. Učestvuju u transformaciji aromatičnih prekursora, preko intradiolnog ili ekstradiolnog otvaranja prstena, do alifatičnih proizvoda (slika 6b). Oksigenaze imaju širok spektar supstrata i ključnu ulogu u desulfurizaciji, dehalogenizaciji, denitrifikaciji, hidroksilaciji, biotransformaciji i biodegradaciji različitih ksenobiotika, alifatične i aromatične strukture, uključujući i fenolna jedinjenja.



Slika 6. Degradacija aromatičnih jedinjenja dejstvom monooksigenaza (a) i dioksigenaza (b) (Karigar, Rao, 2011).

Nekoliko publikacija svedoči o upotrebi monooksigenaza i dioksigenaza u procesima biodegradacije i biotransformacije aromatičnih jedinjenja (Arora et al., 2010). Od značaja su toluen monooksigenaza (EC 1.14.13.2), 3-hidroksibenzoat 6-monooksigenaza (EC 1.14.13.24), benzoat 4-monooksigenaza (EC 1.14.13.12), naftalen 1,2-dioksigenaza (EC 1.14.12.12). Pentahlorfenol-4-monooksigenaza (EC 1.14.13.50), koja katalizuje hidroksilaciju u *para* položaju pri čemu se pentahlorfenol transformiše u tetrahlorhidrohinon, identifikovana je kod *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723 (Saboo, Gealt, 1998). Stiren monooksigenaza (EC 1.14.13) iz

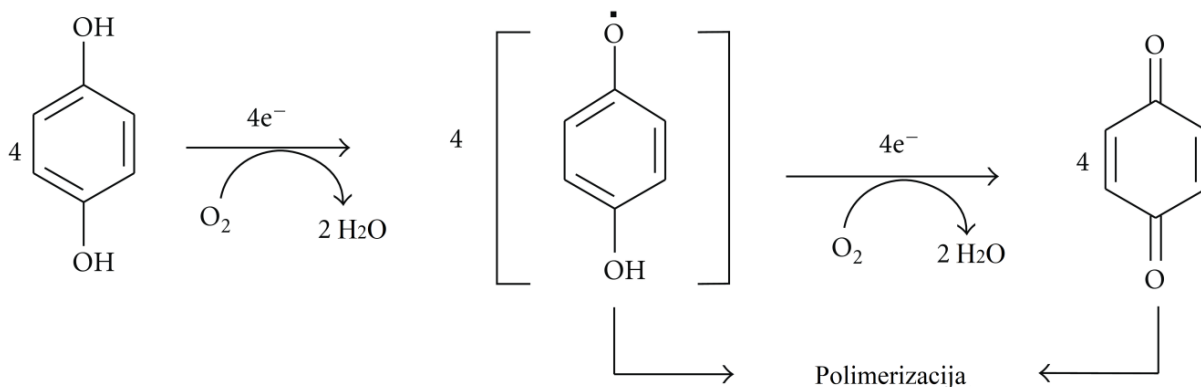
2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

Pseudomonas sp. VLB 120 učestvuje u prevođenju stirena u stiren oksid (Panke et al., 1998), dok 2-hidroksibifenil 3-monooksigenaza (HbpA, EC 1.14.13.44) iz *Pseudomonas azelaica* HBP1 katalizuje *orto*-hidroksilaciju 2-hidroksibifenila do 2,3-dihidroksibifenila (Held et al., 1998).

Primeri monooksigenaza koje su uključene u denitrifikaciju nitroaromatičnih jedinjenja su: 4-nitrofenol 4-monooksigenaza (EC 1.14.13) izolovana iz *Pseudomonas sp.* WBC-3 (Zhang et al., 2009), 4-nitrofenol 2-monooksigenaza (EC 1.14.13.29) izolovana iz *Rhodococcus sp.* PN1 (Takeo et al., 2008) i 2-nitrofenol 2-monooksigenaza (EC 1.14.13.31) koja katalizuje reakciju transformacije 2-nitrofenola u katehol (Zeyer, Kocher, 1988).

Lakaze (*p*-difenol oksidaza, EC 1.10.3.2) čine porodicu oksidoreduktaza koje proizvode određene biljke, gljive, insekti i bakterije, a čija je uloga da katalizuju oksidaciju širokog spektra fenola i aromatičnih supstrata uz istovremenu redukciju kiseonika do vode (slika 7). Takođe, učestvuju u reakcijama dekarboksilacije i demetilovanja. Mnogi mikroorganizmi proizvode intra- i ekstracelularne lakaze koje mogu da katalizuju oksidaciju *orto*- i *para*-difenola, aminofenola, polifenola, poliamina i lignina (Karigar, Rao, 2011). Lakaze predstavljaju interesantnu grupu oksidoreduktaza zbog svog velikog potencijala za primenu u biotehnologiji i bioremedijaciji (Gianfreda et al., 1999). Nekoliko studija potvrđuje upotrebu lakaze za degradaciju PAH-ova i drugih ksenobiotika (Couto, Toca Herrera, 2006). Pointing (2001) je u svojoj studiji pokazao da su PAH-ovi koji potiču iz nafte ili od upotrebe fosilnih goriva uspešno degradovani pomoću lakaze.



Slika 7. Opšti mehanizam reakcije oksidacije fenola pomoću lakaze (Karigar, Rao, 2011).

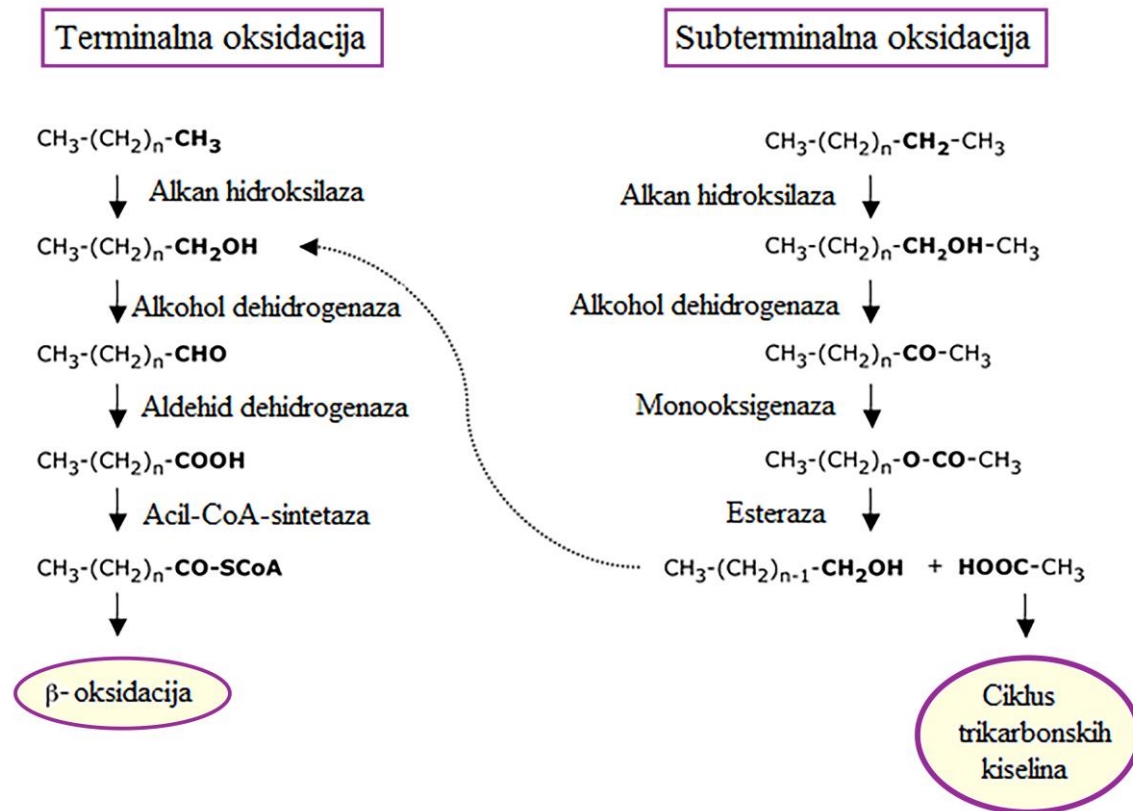
Hidrolaze (EC 3.1. - 3.13.) su ključni enzimi za raskidanje hemijskih veza u toksičnim jedinjenjima čime smanjuju njihovu toksičnost. Hidrolitički enzimi učestvuju u procesu biodegradacije zagađujućih supstanci naftnog tipa, organofosfatnih i organohlorinih insekticida, u reakcijama kondenzacije i alkoholize. Glavne prednosti ove klase enzima su laka dostupnost, širok spektar supstrata i tolerancija prema rastvaračima koji se ne mešaju sa vodom. Na osnovu tipa veze koju hidrolizuju, hidrosilaze mogu da se podele na: amilaze, proteaze, lipaze, DNaze i ksilanaze, koje se uglavnom upotrebljavaju u prehrambenoj industriji, kao aditivi za hranu, biomedicinskim naukama i hemijskoj indistriji, dok su hemicelulaze, celulaze i glikoksidaze od velikog značaja zbog svoje primene u procesima bioremedijacije (Karigar, Rao, 2011).

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

2.8.1.1. Degradacija *n*-alkana u aerobnim uslovima

Degradacija *n*-alkana u aerobnim uslovima obično započinje dejstvom enzima alkan-monooksigenaze ugradnjom atoma kiseonika na terminalni ili subterminalni ugljenikov atom (slika 8). Nastali intermedijeri se zatim transformišu u odgovarajuće kiseline pre ulaska u β -oksidacioni put degradacije (Moreno, Rojo, 2019).



Slika 8. Pretpostavljeni put transformacije *n*-alkana (Moreno, Rojo, 2019).

2.8.1.2. Degradacija aromatičnih jedinjenja u aerobnim uslovima

Razgradnja aromatičnih prstenova pomoću širokog spektra bakterija i gljiva se odvija β -ketoadipatnom putanjom, pri čemu dolazi do transformacije aromatičnih jedinjenja, uključujući i zagađujuće supstance, u netoksične metabolite. Devet esencijalnih enzima i ključnih intermedijera ovog metaboličkog puta prvi put su identifikovani u Gram negativnoj *Pseudomonas putida*, 1966. godine (Ornston, 1966). Spisak enzima koji su uključeni u degradaciju preko β -ketoadipatne putanje dat je u tabeli 6 (Wells, Ragauskas, 2012).

Preko β -ketoadipatne putanje širok spektar organskih jedinjenja se transformišu u jedno od dva aromatična jedinjenja, katehol ili protokatehualat (slika 9). Prvi korak u mikrobiološkoj degradaciji aromatičnih jedinjenja podrazumeva uvođenje dve hidroksilne grupe (u *orto* ili *para* položaju) pomoću

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

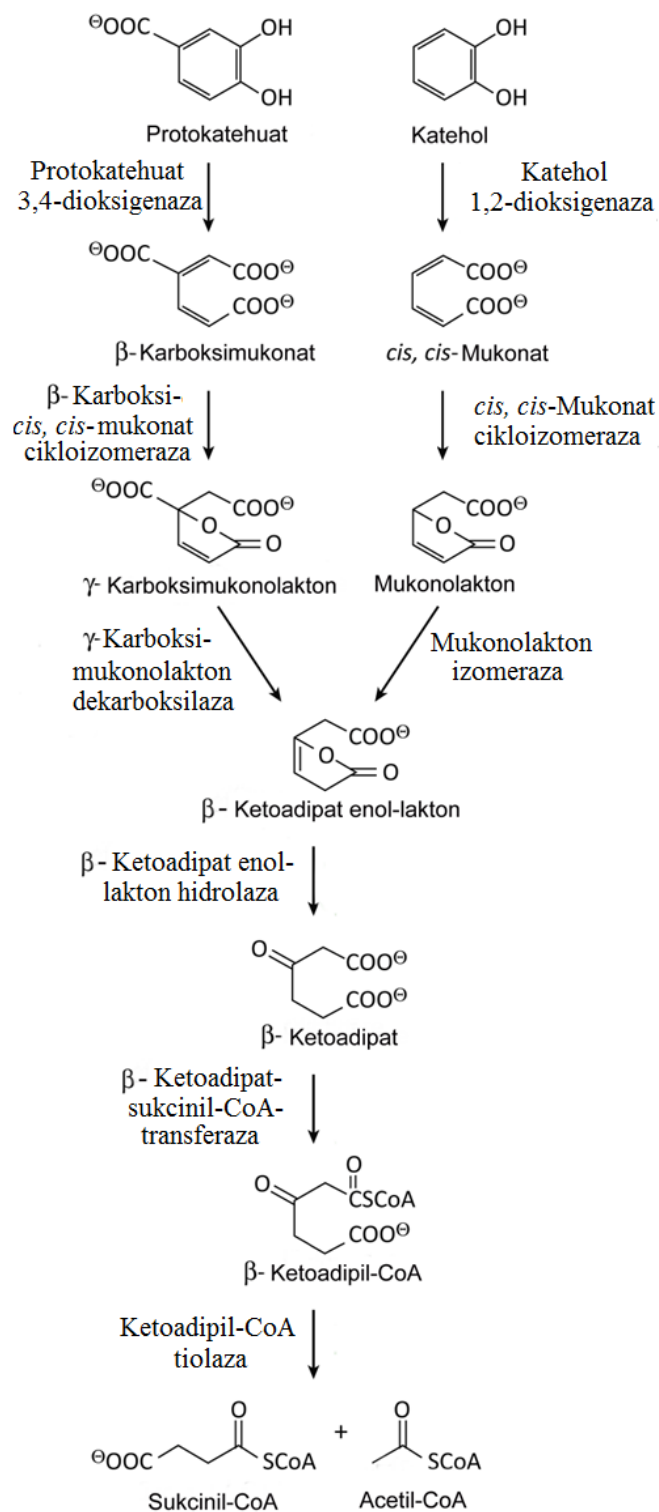
enzima dioksidogenaza pri čemu nastaje *cis*-dihidrodiol. Nakon toga, put transformacije se nastavlja intradiolnim otvaranjem prstena katehola ili protokatehuata pomoću enzima katehol 1,2-dioksidogenaze (CatA) ili protokatehuat 3,4-dioksidogenaze (PcaGH), redom, pri čemu nastaje *cis*, *cis*-mukonat ili β -karboskimukonat, koji dalje mogu da pređu u β -ketoadipat enol-lakton. Ovaj molekularni intermedijer dalje može da se transformiše u istoimeni β -ketoadipat pomoću enzima enol-lakton hidrolaze. Na kraju, nastali β -ketoadipat, iz obe putanje razgradnje, može da se transformiše u metabolite ciklusa trikarbonskih kiselina (TCA ciklus) ili biosinteze viših masnih kiselina (sukcinil-CoA i acetil-CoA) (Wells, Ragauskas, 2012).

Tabela 6. Enzimi uključeni u β -ketoadipatnu putanju (Wells, Ragauskas, 2012)

| Enzim | EC broj | Odgovarajući geni (model organizam) | Referenca |
|--|-----------|---|--|
| Protokatehuat 3,4-dioksidogenaza | 1.13.11.3 | pcaGH (<i>P. putida</i>) | Kim et al., 2008; Harwood, Parales, 1996 |
| β -Karboksi- <i>cis</i> , <i>cis</i> -mukonat cikloizomeraza | 5.5.1.2 | pcaB (<i>P. putida</i>) | Kim et al., 2008; Harwood, Parales, 1996 |
| γ -Karboksi-mukonolakton dekarboksilaza | 4.1.1.44 | pcaC (<i>P. putida</i>) | Kim et al., 2008; Harwood, Parales, 1996 |
| β -Ketoadipat enol-lakton hidrolaza | 3.1.1.24 | pcaD (<i>P. putida</i>), catD (<i>A. calcoaceticus</i>) | Kim et al., 2008; Harwood, Parales, 1996 |
| β -Ketoadipat sukcinil-CoA transferaza | 2.8.3.6 | pcaIJ (<i>P. putida</i>), catIJ (<i>A. calcoaceticus</i>) | Kim et al., 2008; Harwood, Parales, 1996 |
| β -Ketoadipil-CoA tiolaza | 2.3.1 | pcaF (<i>P. putida</i>), catF (<i>A. calcoaceticus</i>) | Kim et al., 2008; Harwood, Parales, 1996 |
| Katehol 1,2-dioksidogenaza | 1.13.11.1 | catA (<i>A. calcoaceticus</i>) | Kim et al., 2008; Harwood, Parales, 1996 |
| <i>cis</i> , <i>cis</i> -Mukonat cikloizomeraza | 5.5.1.1 | catB (<i>P. putida</i>) | Kim et al., 2008; Harwood, Parales, 1996 |
| Mukonolakton izomeraza | 5.3.3.4 | catC (<i>P. putida</i>) | Kim et al., 2008; Harwood, Parales, 1996 |

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić



Slika 9. β -Ketoadipatna putanja transformacije aromatičnih jedinjenja kod bakterija (Wells, Ragauskas, 2012).

2.8.1.2.1. Aerobna degradacija PAH

Biodegradacija naftalena. Naftalen se često upotrebljava kao model jedinjenje za ispitivanje mogućnosti mikrobne degradacije PAH-ova jer predstavlja najjednostavniji i najrastvorljiviji PAH. Dobijene informacije o bakterijskoj degradaciji naftalena dalje se koriste za razumevanje i predviđanje degradacionih puteva složenijih PAH-ova sa tri ili više prstenova. Dosadašnja istraživanja su pokazala da mnoge bakterije iz rodova: *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* i *Streptomyces* mogu da koriste naftalen kao jedini izvor ugljenika i energije.

Degradacija naftalena započinje dejstvom enzima naftalen-dioksigenaze, na aromatični prsten, pri čemu nastaje *cis*-(1R, 2S)-dihidroksi-1,2-dihidronaftalen (*cis*-naftalen dihidrodiol) (slika 10). Dejstvom *cis*-dihidrodiol dehidrogenaze nastali *cis*-naftalen dihidrodiol se dehidrogenizuje u 1,2-dihidroksinaftalen. Potom se 1,2-dihidroksinaftalen metaboliše u salicilat preko 2-hidroksi-2H-hromen-2-karboksilne kiseline, *cis*-*o*-hidroksibenzalpiruvata i 2-hidroksi-benzaldehida. Takođe, 1,2-dihidroksinaftalen se može oksidovati do 1,2-naftohinona, bez prisustva enzima. Na kraju, salicilat se dekarboniluje do katehola, koji se dalje metaboliše otvaranjem prstena, i to: u *meta*-položaju i daljom transformacijom do piruvata i acetaldehida; dok su proizvodi transformacije nakon otvaranja u *orto*-položaju sukcinat i acetil-CoA (Seo et al., 2009).

Fuenmayor et al. (1998) su u svojoj studiji pokazali da se salicilat transformiše u gentisat dejtvm salicilat 5-hidroksilaze. Jouanneau et al. (2007) su izolovali salicilat 1-hidroksilazu iz *Sphingomonas sp.* CHY-1 i potvrdili njena biohemijaska i katabolička svojstva. Kod *Pseudomonas putida* G7 identifikovani su geni koji kodiraju proteine/enzime učesnike u gornjem kataboličkom putu naftalena pri čemu se naftalen transformiše u salicilat, kao i enzime donjeg kataboličkog puta, koji su uključeni u metabolizam salicilata preko katehola *meta*-otvaranjem prstena do piruvata i acetaldehida (Denome et al., 1993; Goyal, Zylstra, 1996; Simon et al., 1993).

Biodegradacija fluorena. Fluoren je najjednostavnije naftenoaromatično jedinjenje, koje se sastoji od tri prstena. Ima strukturne sličnosti sa karbazolom, dibenzotiofenom, dibenzofuranom i dibenzodioxinom. Predstavlja važnu komponentu fosilnih goriva. Iz navedenih razloga je veoma pogodan i važan za ispitivanje mehanizama biorazgradnje PAH-ova. Izolovano je nekoliko bakterija kao što su: *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* i *Sphingomonas*. koje mogu koristiti fluoren kao izvor ugljenika i energije, pri čemu ga uspešno degraduju.

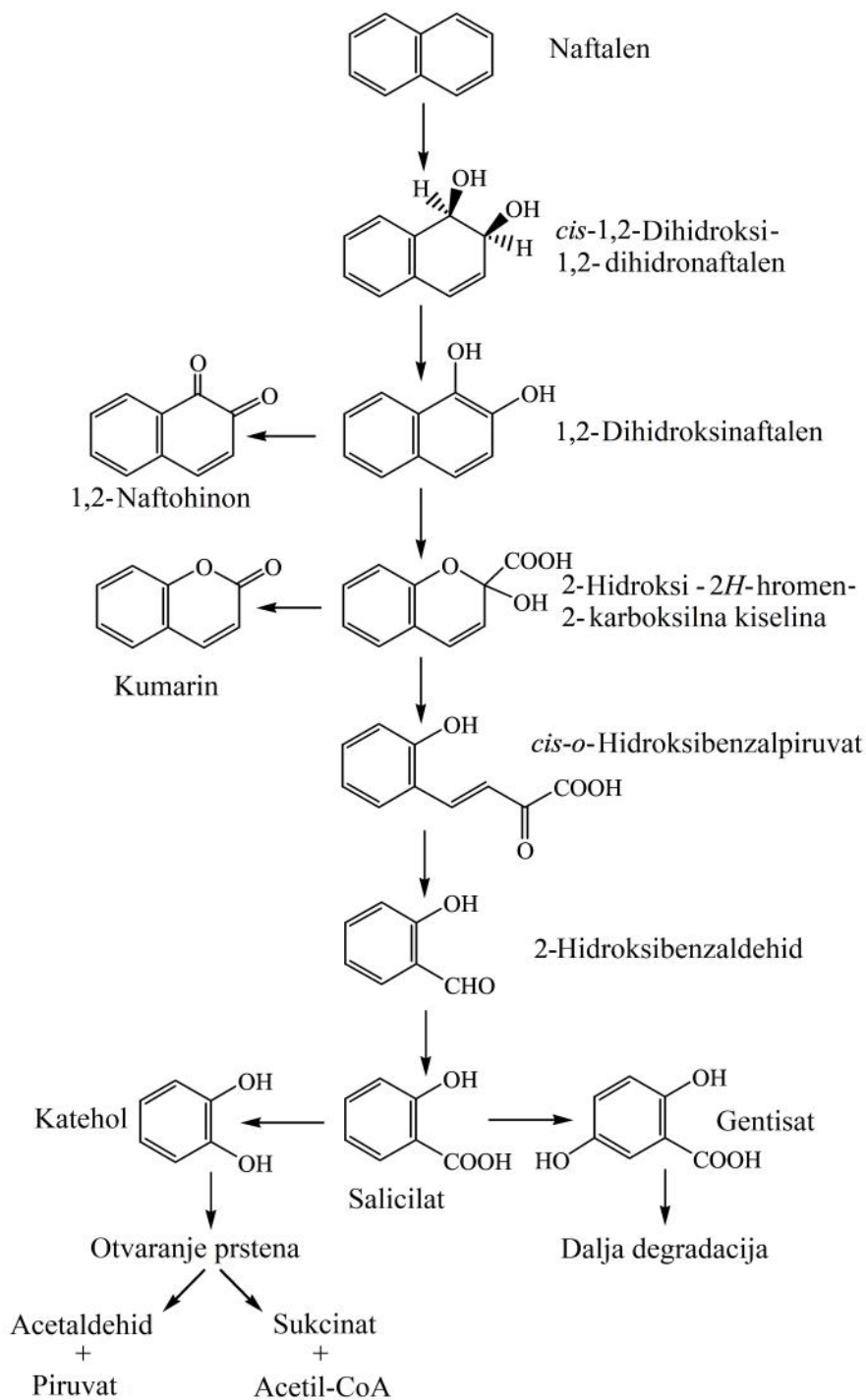
Na slici 11 su prikazana tri glavna katabolička puta degradacije fluorena (I-III).

U prvom mogućem putu (I) početni korak je 1,2-dioksigenacija fluorena pri čemu nastaje fluoren-1,2-diol (2) koji se dalje transformiše u 3-hromanon (7) preko 2-hidroksi-4-(2-okso-indaniliden)-2-butenske kiseline (3), 1-formil-2-indanona (4), 2-indanon-1-karboksilne kiseline (6) i 2-indanona (6). Drugi mogući put (II) započinje 3,4-dioksigenacijom fluorena što dovodi do stvaranja salicilata (27) preko nastanka 2-hidroksi-4-(1-okso-indan-2-iliden)-2-butenske kiseline (20), 2-formil-1-indanona (21), 1-indanon-2-karboksilne kiseline (22), 1-indanona (23), 3-hidroksi-1-indanona (24), 2-hromanona (25) i 3-(2-hidroksi-fenil)-propanske kiseline. Treći put transformacije (III) započinje C-9 monooksigenacijom fluorena što dovodi do stvaranja ftalata (14) koji se dalje transformiše u protokatehualat (15) (Seo et al., 2009). Ovaj put degradacije detektovan je kod *Brevibacterium sp.* DPO1361 (Trenz et al., 1994) i *Pseudomonas sp.* F274 (Grifoll et al., 1995). Nekoliko gena koji su

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić

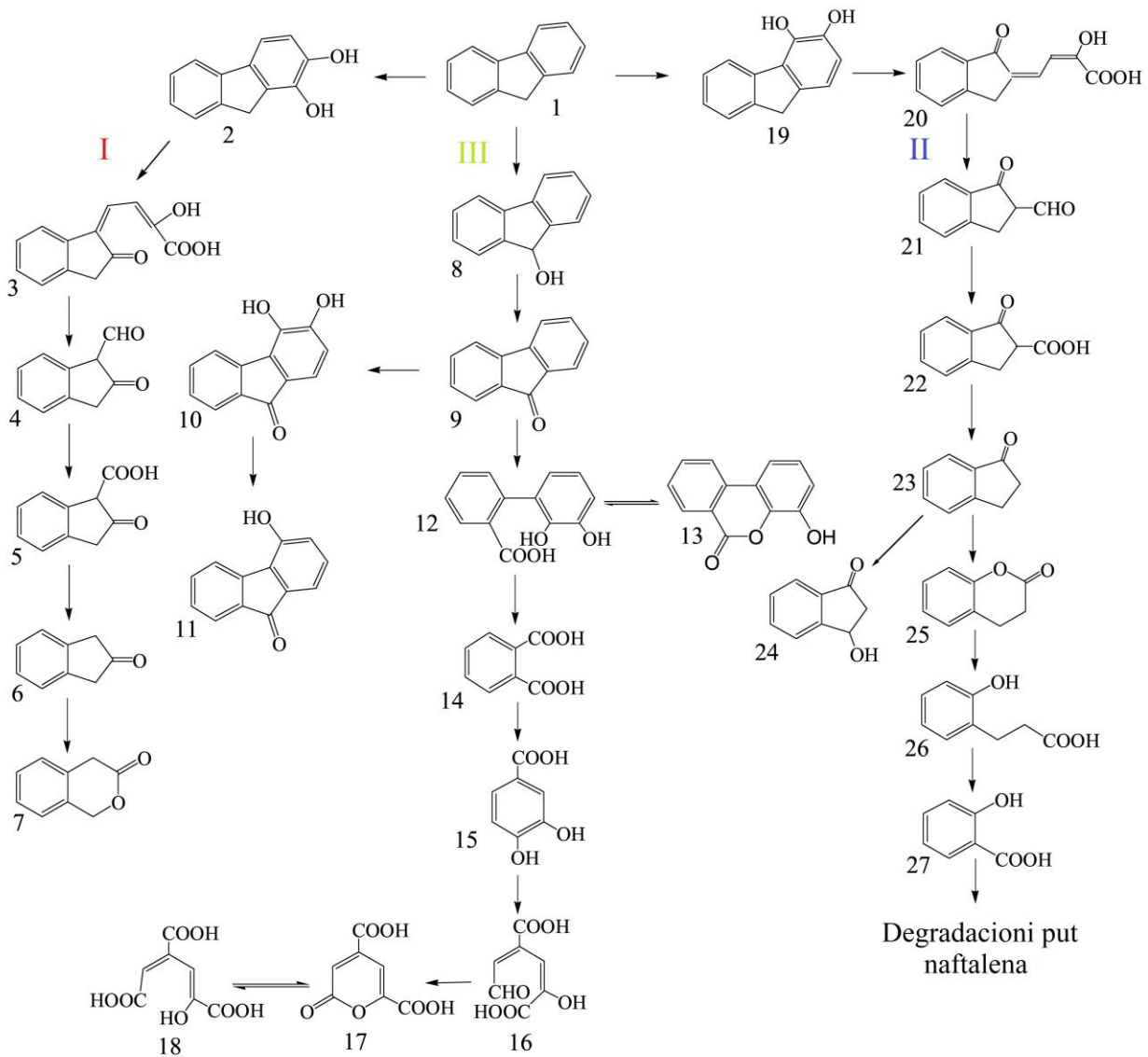
uključeni u degradaciju fluorena preko ftalata su identifikovani kod *Terrabacter sp.* DBF63 (Habe et al., 2004).



Slika 10. Pretpostavljeni katabolički put transformacije naftalena kod bakterija (Seo et al., 2009).

2. TEORIJSKI DEO

Ana B. Medić



Slika 11. Pretpostavljeni katabolički put transformacije fluorena kod bakterija (Seo et al., 2009).

Legenda: 1: fluoren, 2: fluoren-1,2-diol, 3: 2-hidroksi-4-(2-okso-indan-1-iliden)-2-butenska kiselina, 4: 1-formil-2-indanon, 5: 2-indanon-1-karboksilna kiselina, 6: 2-indanon, 7: 3-hromanon, 8: 9-fluorenol, 9: 9-fluorenon, 10: 3,4-dihidroksi-9-fluorenon, 11: 4-hidroksi-9-fluorenon, 12: 2',3'-dihidroksi-bifenil-2-karboksilna kiselina (2'-karboksi-2,3-dihidroksibifenil), 13: 8-hidroksi-3,4-benzenkumarin, 14: ftalat, 15: protokatehuatska kiselina, 16: 4-karboksi-2-hidroksimukonat-6-semialdehid, 17: 2-piron-4,6-dikarboksilna kiselina, 18: 4-karboksi-2-hidroksimukonska kiselina, 19: fluoren-3,4-diol, 20: 2-hidroksi-4-(1-okso-indan-2-iliden)-2-butenska kiselina, 21: 2-formil-1-indanon, 22: 1-indanon-2-karboksilna kiselina, 23: 1-indanon, 24: 3-hidroksi-1-indanon, 25: 2-hromanon, 26: 3-(2-hidroksi-fenil)-propanska kiselina, 27: salicilna kiselina.

3. CILJ I PLAN ISTRAŽIVANJA

3. CILJ I PLAN ISTRAŽIVANJA

Ana B. Medić

U okviru ove doktorske disertacije ispitan je potencijal *Pseudomonas aeruginosa* san ai za degradaciju *n*-alkana (*n*-heksadekana, *n*-nonadekana), policikličnih aromatičnih jedinjenja (fluorena, fenantrena, pirena), alifatične i aromatične frakcije nafte i 2,6-di-*terc*-butilfenola. Odabrani supstrati predstavljaju sveprisutne, štetne, zagađujuće supstance, kako za životnu sredinu, tako i za zdravlje živih organizama.

Preliminarna ispitivanja su pokazala potencijal *P. aeruginosa* san ai za korišćenje različitih supstrata kao izvora ugljenika, pa je stoga, početni cilj ove teze bio je da se, utvrde optimalni uslovi za biodegradaciju pojedinačnih zagađujućih supstanci ispitivanjem različitih podloga za kultivaciju mikroorganizma, početne koncentracije supstrata, veličine inokuluma, pH i temperature. Dalji ciljevi bili su ispitivanje stepena biotransformacije navedenih supstrata, kao i određivanje efikasnosti njihovog uklanjanja pomoću *P. aeruginosa* san ai. Praćenje promena u proteomu ovog mikroorganizma, nastalih kao posledica izlaganja zagađujućoj supstanci, ispitivanje mehanizama metaboličke adaptacije uz određivanje specifičnih enzimskih aktivnosti, omogućili bi da se pretpostave metabolički putevi transformacije i degradacije navedenih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata mogla bi da se proceni mogućnost primene *P. aeruginosa* san ai u postupcima bioremedijacije područja zagađenih ispitivanim jedinjenjima. Krajnji cilj bila je identifikacija specifičnih biomarkera (različiti enzimi indukovani prisustvom zagađujuće supstance, geni, određeni metaboliti) koji bi mogli da se primene u detekciji ranog signala za kontaminaciju životne sredine. Biomarkeri mogu da posluže kao indikatori postojanja mikroorganizama sposobnih ne samo da prežive uslove kontaminacije, već i da efikasno uklone polutant iz zagađenog područja. Identifikacija potencijalnih biomarkera je urađena primenom omiks analitičkih platformi.

Da bi se ispunili zahtevi, iskazani u ciljevima disertacije, osmišljen je sledeći plan istraživanja:

- Ispitivanje potencijala *P. aeruginosa* san ai za biodegradaciju različitih organskih jedinjenja merenjem hidrofobnosti ćelije i određivanjem hemotaksije mikroorganizma;
- Ispitivanje uticaja sastava podloge na rast *P. aeruginosa* san ai;
- Ispitivanje uticaja različitih organskih jedinjenja, koji su korišćeni kao izvori ugljenika, na rast *P. aeruginosa* san ai;
- Ispitivanje uticaja različitih faktora na biodegradaciju 2,6-DTBP (početna koncentracija supstrata, veličina inokuluma, pH, temperatura);
- Ispitivanje stepena biotransformacije i degradacije odabranih jedinjenja pomoću GC-MS analize;
- Analiza toksičnih intermedijera degradacije visokih koncentracija 2,6-DTBP;
- Određivanje respiratorne aktivnosti *P. aeruginosa* san ai prilikom izlaganja ispitivanoj supstanci;
- Ispitivanje degradacije individualnih *n*-alkana i PAH-ova primenom *P. aeruginosa* san ai;
- Određivanje dinamike degradacije 2,6-DTBP, *n*-C₁₉ i FLU;
- Genomska analiza kataboličkog puta alifatičnih i aromatičnih jedinjenja;

3. CILJ I PLAN ISTRAŽIVANJA

Ana B. Medić

- Elektroforetska separacija proteina, SDS-PAGE elektroforeza, generisanje 1D i 2D mapa;
- Nano LC-MS/MS analiza dobijenih peptida;
- Proteomska analiza za identifikaciju proteina koji su uključeni u katabolizam 2,6-DTBP;
- Bioinformatička analiza dobijenih rezultata korišćenjem odgovarajućih baza podataka;
- Enzimska analiza biodegradacije ugljovodonika, određivanje enzimskih aktivnosti;
- Mehanizmi adaptacije *P. aeruginosa* san ai na aromatične supstrate;
- Razdvajanje nafte na frakcije metodom hromatografije na koloni;
- Biodegradacija zasićene i aromatične frakcije sirove nafte upotrebom *P. aeruginosa* san ai;
- Analiza metabolita i proizvoda degradacije ispitivanih jedinjenja pomoću GC-MS i GCxGC-MS analize;
- Obrada i interpretacija rezultata.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Mikroorganizam

Mikroorganizam koji je upotrebljen u eksperimentima biodegradacije, *P. aeruginosa* san ai, je izolovan iz industrijskog mineralnog ulja za sečenje metala pH 10,0 (Karadzic et al., 2004). Mikroorganizam je deponovan kao patentni soj u National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM), Faculty of Food Sciences, Corvinus University of Budapest, Budapest, Hungary, pod oznakom NCAIM (P) B 001380, kao i u kolekciji Instituta za zemljište, Beograd, Srbija, ISS WDCM 375 sa pristupnim brojem ISS 619.

4.2. Određivanje hidrofobnosti ćelije mikroorganizma

Hidrofobnost ćelije određena je uz pomoć MATH (*eng.*, Microbial Adhesion to Hydrocarbons) testa (Rosenberg et al., 1980). U 2 mL vodene suspenzije bakterija, prethodno raslih na hranljivom agaru, apsorbance (*eng.*, optical density, OD) na 580 nm, $OD_{580} = 0,5$ dodato je 0,5 %, 1 %, i 1,5 % (v/v) *n*-C₁₆. Posle vorteksiranja u trajanju od 1 minuta, faze su ostavljene 15 minuta da se razdvoje. Nakon toga je izmerena apsorbancia na 580 nm vodene faze. Rezultati su izračunati na osnovu sledeće jednačine: $[(A_0 - A)/A_0] \times 100$, pri čemu A_0 predstavlja početnu, a A krajnju OD vrednost vodene faze. Apsorbancia je merena na spektrofotometru UV-2600 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ovaj instrument je korišćen u svim eksperimentima u kojima je apsorbancia merena.

4.3. Određivanje hemotaksije mikroorganizma

Hemotaksija je ispitana u Petrijevim šoljama koje su sadržale mineralni slani medijum (*eng.*, mineral salt medium), MSM podlogu, 0,3 % agar i 2,6-DTBP kao izvor ugljenika u krajnjoj koncentraciji 1 mM (Harwood et al., 1994). Podloga je inokulisana sa 10 µL suspenzije ćelija u puferu za hemotaksiju (Mao et al., 2003) i inkubacija je vršena tokom 24 h na 30 °C. Mikroorganizam je prethodno gajen preko noći na Lurie-Bertani (LB) podlozi. Odgovor bakterije je analiziran 24 h nakon izlaganja ispitivanoj supstanci. Kao rezultat pozitivne hemotaksije nastaje oštar prsten koji se formira tokom rasta i ima tendenciju da se širi ka ivicama Petri šolje zbog pokretljivosti bakterija koje prave gradijent koncentracije tokom razgradnje supstance (Parales, Harwood, 2002). Pepton je korišćen kao pozitivan hemoefektor.

4.4. Podloge

Sve podloge osim MSM podloge, su sterilisane u autoklavu na 121 °C i atmosferskom pritisku u trajanju od 20 minuta. MSM podloga je hladno sterilisana pomoću Millipore filtracionog sistema (Merck Millipore, SAD) korišćenjem membranskih filtera dimenzije pora 0,45 µm.

4.4.1. Osnovne mineralne podloge

Kao osnovne podloge za biodegradaciju odabranih supstanci ispitivane su sledeće tri podloge: MSM (mineralni slani medijum, *eng.*, mineral salt medium), BH (Bushnell Hass), kao modifikacija BHA (Bushnell Hass Agar) podloge i BSM (osnovni slani medijum, *eng.*, basal salt medium).

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

Sastojci podloga su bili *p.a.* čistoće, različitih proizvođača: natrijum-hidrogenfosfat-dihidrat, kalijum-hidrogenfosfat, kalijum-dihidrogenfosfat, kalijum-nitrat, amonijum-hidrogenfosfat, amonijum-nitrat, gvožđe (III)-hlorid (MERCK, Nemačka), amonijum-hlorid (Acros Organics, Sjedinjene Američke Države), natrijum-sulfat, magnezijum-sulfat-heptahidrat (Kemika, Hrvatska), amonijum-molibdat-tetrahidrat, kalcijum-hlorid, kalcijum-hlorid-dihidrat, magnezijum-hlorid (Zorka, Srbija), cink-sulfat-heptahidrat (Alkaloid, Makedonija), mangan-sulfat-tetrahidrat (Analar, Engleska).

MSM podloga: 5 mL fosfatnog pufera (KH_2PO_4 8,5 g/L, K_2HPO_4 19,71 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 16,61 g/L, NH_4Cl 5,0 g/L); 3 mL rastvora $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (46,125 g/L); 1 mL rastvora FeCl_3 (0,025 g/L); 1 mL rastvora $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (48,21 g/L); 1 mL rastvora elemenata u tragovima ($\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0,00347 g/L, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,07 g/L) (Tao et al., 2009). pH podloge je bilo u opsegu od 7,2 do 7,4.

BH podloga: 0,2 g/L MgSO_4 , 0,02 g/L CaCl_2 , 1g/L KH_2PO_4 , 1 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L NH_4NO_3 , 0,05 g/L FeCl_3 (Bushnell, Haas, 1941). pH podloge bilo je 7,0.

BSM podloga: 3,815 g/L K_2HPO_4 , 0,5 g/L KH_2PO_4 , 0,825 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,263 g/L KNO_3 , 0,2 g/L Na_2SO_4 , 0,02 g/L CaCl_2 , 0,002 g/L FeCl_3 , 0,02 g/L MgCl_2 (Liu et al., 2014). pH podloge bilo je 7,0.

4.4.2. Kompleksne podloge

LB (Lurie-Bertani) podloga: 5 g/L NaCl , 5 g/L ekstrakt kvasca (Torlak, Srbija), 10 g/L pepton I (Torlak, Srbija) (Karadzic et al., 2004). pH podloge bilo je 7,0.

Hranljivi agar: Hranljivi agar, gotova podloga (Torlak, Srbija).

4.4.3. PPAS/PPGAS

Za produkciju ramnolipida (RL) korišćena je PPAS (proteoza pepton amonijum so sa smanjenom količinom fosfata, *eng.*, phosphate limited proteose peptone-ammonium salt) podloga, kao modifikacija PPGAS (proteoza pepton glukoza amonijum so sa smanjenom količinom fosfata, *eng.*, phosphate limited proteose peptone-glucose-ammonium salt) podloge (Gunther et al., 2005; Rikalović et al., 2013), uz dodatak suncokretovog ulja kao izvora ugljenika (0,7 %, v/v).

4.5. Izvori ugljenika

Supstance koje su korišćene kao izvori ugljenika su: 2,6-di-*terc*-butilfenol (2,6-DTBP), *n*-heksadekan (*n*- C_{16}), *n*-nonadekan (*n*- C_{19}), fluoren (FLU), fenantren (PHE), piren (PYR), katehol (Cat), natrijum-benzoat, timol, hidrohionin, čistoće preko 99 % (svi Sigma, Sjedinjene Američke Države), glukoza (Kemika, Hrvatska), suncokretovo ulje (Vital, Srbija).

Pored pojedinačnih ugljovodonika, kao izvora C, u radu je ispitana i biodegradacija kompleksnih ugljovodoničnih smeša dobijenih frakcionisanjem nafte (naftno polje Turija-Sever, jugoistočni deo Panonskog basena, Srbija).

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

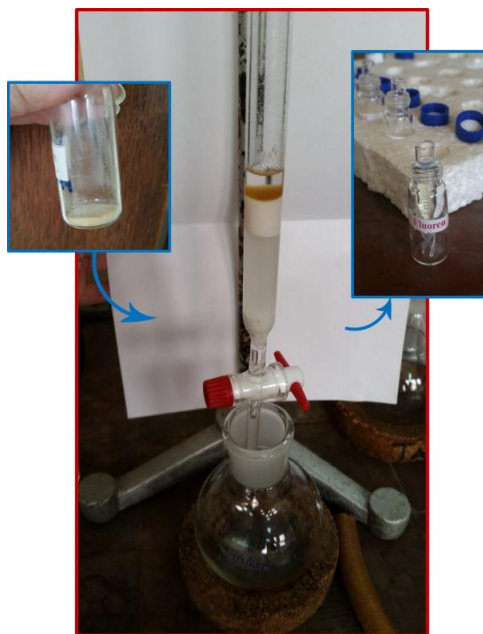
4.5.1. Supstrati za enzimске testove

Pored navedenih izvora ugljenika, kao supstrati za enzimске testove korišćeni su: etanol (Zorka, Srbija), propanol (B.D.H., Engleska), *izopropanol* (Sigma, Sjedinjene Američke Države), 1-butanol, 2-butanol, *terc*-butanol, benzen, fenol, NAD⁺, NADH, NADPH (MERCK, Nemačka) i hinon (Analar, Engleska). Ove hemikalije su bile *p.a.* čistoće.

Sve hemikalije i rastvarači korišćeni za LC i GC-MS analizu bile su hromatografske čistoće: amonijum-bikarbonat (Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države), *n*-heksan (Carlo-Erba, Francuska), etil-acetat (J.T. Baker, Sjedinjene Američke Države), acetonitril (Fluka, Sjedinjene Američke Države), mravlja kiselina (FA; Sigma, Sjedinjene Američke Države).

4.6. Razdvajanje nafte na frakcije

Alifatična i aromatična frakcija nafte su izolovane metodom hromatografije na koloni (slika 12; Jovančićević, 1998). Kao adsorbens korišćen je silika-gel (SiO₂). Na odmerenih ~ 10 mg nafte odmeravano je 2,5 g SiO₂. U staklenoj koloni je formiran hromatografski stub unošenjem suspenzije silika-gela (koji je prethodno aktiviran 2 h na 180 °C) u *n*-heksanu.



Slika 12. Izolovanje alifatične i aromatične frakcije nafte.

Uzorak nafte je pripremljen rastvaranjem u minimalnoj količini hloroforma, a potom je dodan tanak sloj silika-gela. Nakon otparavanja rastvarača, tako pripremljen uzorak je nanošen na kolonu. Prva, alifatična (zasićena) frakcija eluirana je sa kolone sa 40 mL *n*-heksana. Druga, aromatična frakcija eluirana je sa 35 mL smeše *n*-heksan/benzen u zapreminskom odnosu 2:1. Polarna (NSO) frakcija eluirana je sa 40 mL smeše metanol/hloroform u zapreminskom odnosu 1:1. Eluati su sakupljeni u balone. Nakon eluiranja, najveća količina rastvarača je uklonjena pomoću rotacionog

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

vakuum uparivača (Senco GG17, Shanghai, Kina). Ostatak je kvantitativno prenet u penicilinke poznate mase i poslednji tragovi rastvarača su uklanjani u struji vazduha. Alifatična i aromatična frakcija nafte su analizirane primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS).

4.7. Biodegradacija ugljovodonika i 2,6-DTBP pomoću *P. aeruginosa* san ai

P. aeruginosa san ai je čuvan na kosom hranljivom agaru, a za potrebe eksperimenata biodegradacije aktiviran višestrukim presejavanjem na kosom hranljivom agaru (Torlak, Srbija) na 30 °C, 24 h (slika 13).



Slika 13. Rast *P. aeruginosa* san ai na hranljivom agaru.

Kao izvor ugljenika u sterilne Erlenmajerove boce, sa širokim grlom, zapremine 500 mL, dodata je odgovarajuća zapremina osnovnog (stock) rastvora ispitivanih supstrata: 2,6-DTBP, *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE, PYR, zasićene i aromatične frakcije nafte, rastvorenih u *n*-heksanu, da bi se dobila željena, konačna koncentracija pri čemu je ostavljeno da *n*-heksan ispari u struji vazduha. Posle formiranja tankog filma ispitivane supstance na dnu Erlenmajer boce, dodato je 100 mL sterilne mineralne podloge, pri čemu je krajnja koncentracija 2,6-DTBP iznosila 2, 10, 100 ili 400 mg/L, dok je krajnja koncentracija *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE, PYR i frakcija nafte bila 20 mg/L (Lin et al., 2014). Natrijum-benzoat, katehol i glukoza su rastvoreni u vodi u odgovarajućim koncentracijama i 1 mL tako pripremljenog stock rastvora je dodat u 99 mL mineralne podloge, pri čemu je konačna koncentracija ovih supstrata bila 3 mM, 3 mM i 1 g/L, redom. Suncokretovo ulje je direktno dodato u podlogu pri čemu je konačna koncentracija iznosila 0,7 % (v/v). Biodegradacija je rađena na 30 °C u trajanju od 7 dana, pri 150 obrtaja/min na horizontalnoj mućkalici Lab-Term Kühner (Basel, Švajcarska). Eksperimenti biodegradacije ugljovodonika i 2,6-di-*terc*-butilfenola izvedeni su na inokulisanim podlogama i na sterilnim podlogama (bez dodatka mikroorganizma), što su bili kontrolni uzorci.

4.8. Određivanje osnovnih parametara biodegradacije

4.8.1. Praćenje rasta mikrobne populacije

Rast bakterija na različitim podlogama je praćen na osnovu promene apsorbance (*eng.*, optical density, OD) u fermentacionoj tečnosti na talasnoj dužini od 580 nm (spektrofotometar UV-2600; Shimadzu, Kyoto, Japan), korišćenjem sterilne podloge kao kontrole (Heyd et al., 2008). Apsorbanca od 0,470 merena na 580 nm odgovara koncentraciji bakterija od 3×10^8 CFU/mL (*eng.*, colony forming unit, CFU), koja je prethodno određena posrednom metodom.

4.8.2. Određivanje broja mikroorganizma posrednom metodom

Broj ćelija mikroorganizma u uzorku u kome je prethodno izmerena apsorbanca je određen posrednom metodom (Gojgić-Cvijović, Vrvić, 2003; slika 14). Od polaznog uzorka pripremljena je serija razblaženja do 10^{-9} , sa faktorom razblaženja 10. Zasejano je po 1 mL odgovarajućeg razblaženja na hranljivi agar u Petri šolji. Nakon inkubacije od 48 h na 30 °C, izrasle kolonije su brojane golim okom i pomnožene sa odgovarajućim razblaženjem. Dobijen rezultat je predstavljen kao CFU (*eng.*, colony forming unit) /mL.

4.8.3. Određivanje pH

Promene pH vrednosti u tečnoj podlozi tokom biodegradacije praćene su na pH-metru tipa HANNA instrument (HI 9017 Microprocessor, Singapur) na sobnoj temperaturi.

4.8.4. Odvajanje biomase

Nakon završenog postupka biodegradacije u tečnoj podlozi, biomasa je odvajana centrifugiranjem na 10000 rpm u toku 20 minuta (Sorvall, Velika Britanija, rotor SS-1). Dobijeni supernatant je korišćen za praćenje biodegradacije hemijskim metodama. Biomasa je analizirana biohemijskim metodama.

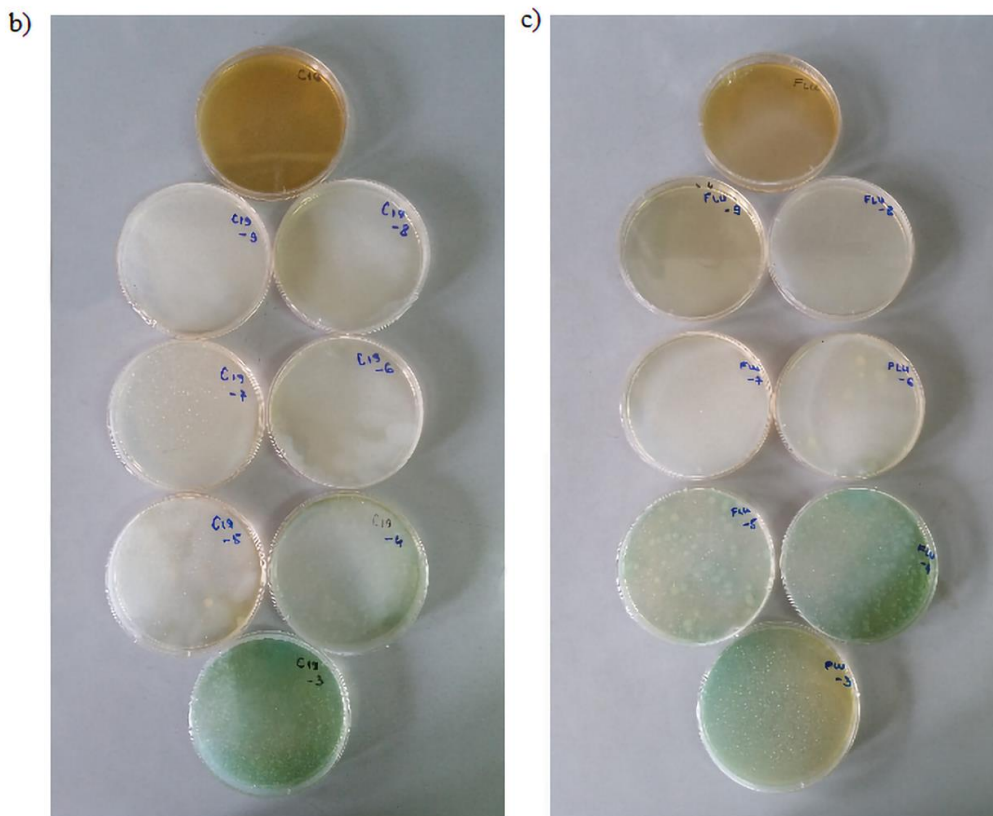
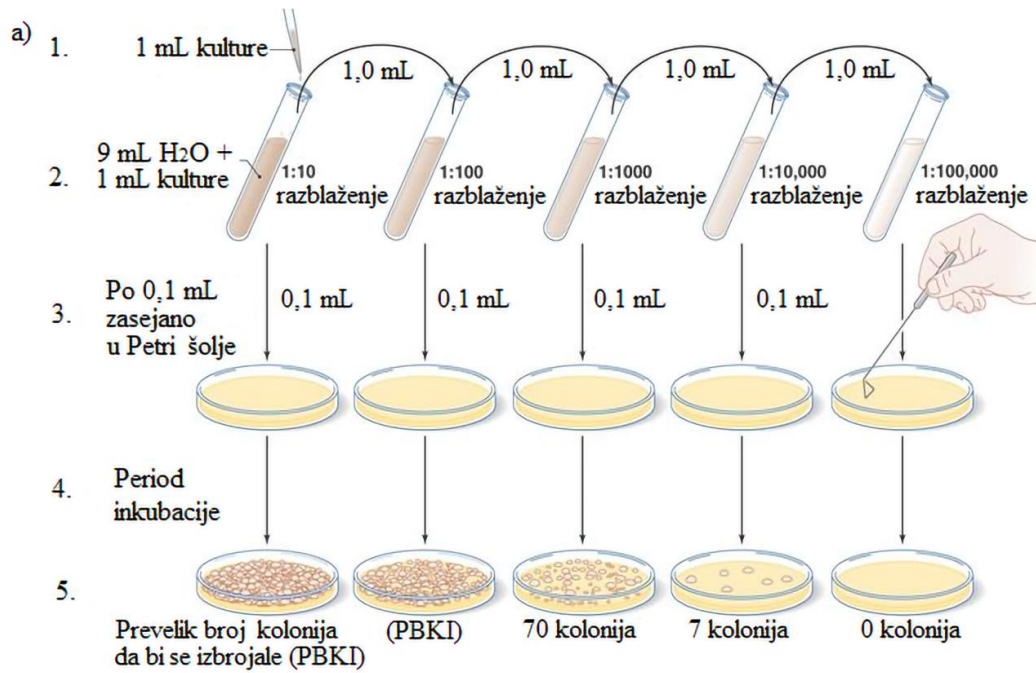
4.9. Hemijske metode za praćenje biodegradacije ugljovodonika i 2,6-DTBP

4.9.1. Gasnohromatografsko-maseno spektrometrijska analiza

Biorazgradnja 2,6-DTBP, *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE, PYR, alifatične i aromatične frakcije nafte, kao i identifikacija njihovih degradacionih proizvoda, izvedena je GC-MS analizom.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

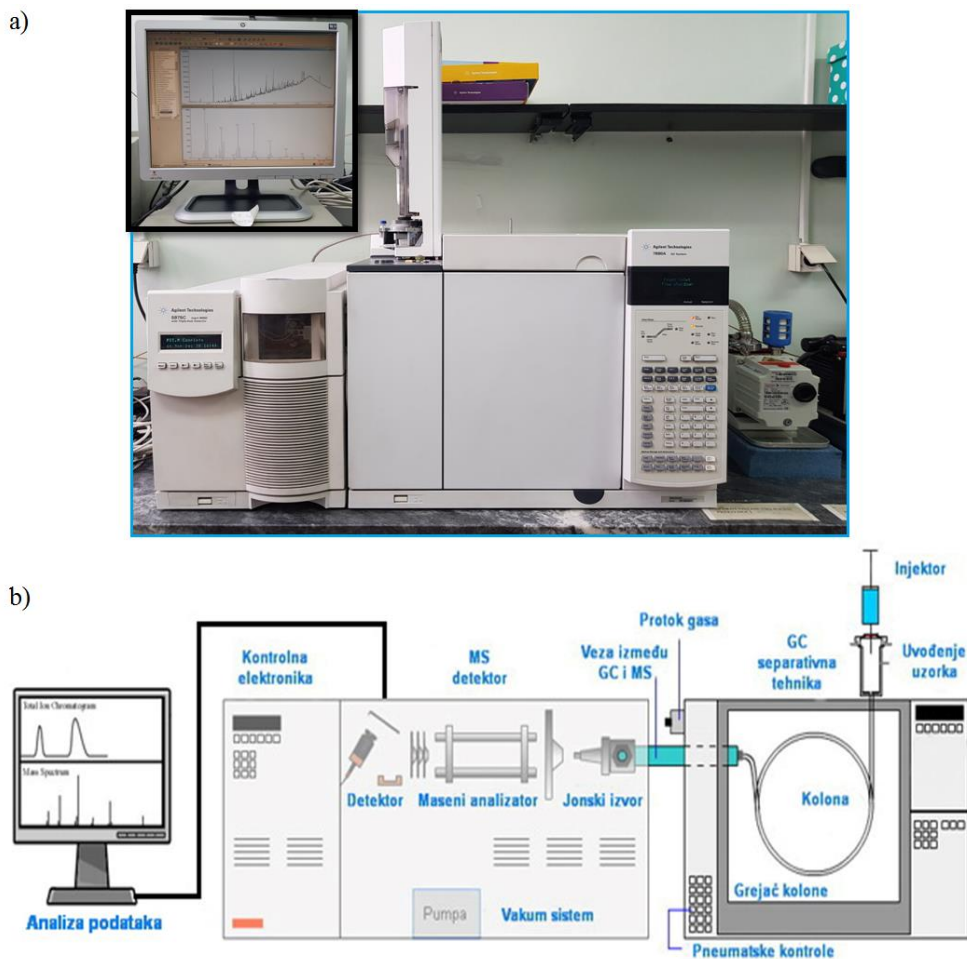


Slika 14. Određivanje broja mikroorganizama posrednom metodom (a) (<https://www.academic.pgcc.edu>), kolonije *P. aeruginosa* san ai gajene na *n*-C₁₉ (b) i FLU (c), posle 24 h inkubacije.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

Sadržaj jedne Erlenmajerove boce je ekstrahovan tri puta *n*-heksanom. Ekstrakti su spojeni, osušeni anhidrovanim natrijum-sulfatom, proceđeni kroz kvantitativni filter papir (veličina pora 2-3 μm , grade 391), nakon čega je rastvarač uparen pomoću rotacionog vakuum uparivača (Senco GG17, Shanghai, Kina), tako da je zapremina svedena na $\sim 0,5$ mL i uzorak je kvantitativno prenet u inserte poznate mase. Nakon uparavanja rastvarača u struji vazduha i merenja mase, uzorak je rastvoren u *n*-heksanu i analiziran na gasnom hromatografu kuplovanom sa masenom spektrometrom (GC-MS), Agilent 7890AGC/Agilent 5975C (slika 15).



Slika 15. a) Gasni hromatograf sa masenim spektrometrom (GC-MS; Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Katedra za primenjenu hemiju) i b) šema aparature za GC-MS (modifikovano prema Stojanović, 2017).

Temperatura injektora iznosila je 250 °C. Kao noseći gas korišćen je helijum sa brzinom protoka od 1,5 mL/min. Kolona je zagrevana u temperaturnom intervalu od 80 do 300 °C, brzinom od 2 °C/min. Temperatura od 300 °C održavana je 20 minuta, a zatim je brzinom od 10 °C/min povećana do krajnje temperature od 310 °C sa zadržkom na ovoj temperaturi od 1 minut. Ručno je injektiran 1 μL

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

uzorka rastvoren u *n*-heksanu (koncentracija 0,02 mg/μL). Korišćena je kolona HP5-MS, dužine 30 m, unutrašnjeg prečnika 0,25 mm i debljine filma 0,25 μm.

Maseni spektrometar je radio u scan (sken) mod-u i detektovao jonske mase od 45,0 do 550,0 Da, sa 0,5 sekundi TST (*eng.*, Total Scan Time - ukupno vreme skeniranja).

Individualni pikovi su identifikovani na osnovu masenih spektara poređenjem sa podacima iz literature (Peters et al., 2005; Philp, 1985; Radke, 1987, 1988) i bibliotekom NIST11.

Za proračun efikasnosti biodegradacije individualnih jedinjenja, napravljena je standardna serija komercijalnih ispitivanih supstanci (2,6-DTBP, *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE, PYR) u *n*-heksanu koji su analizirani pod istim GC-MS uslovima kao uzorci i kontrole. Koncentracije 2,6-DTBP u standardnoj seriji iznosile su 2, 5, 10, 50, 100, 200 i 400 mg/L, dok su koncentracije individualnih ugljovodonika u standardnoj seriji bile 2, 5, 7, 10, 15 i 20 mg/L, kako bi odgovarale opsegu koncentracija ovih jedinjenja u uzorcima (eksperimentima).

Kvantifikacija jedinjenja u uzorcima (sterilna MSM podloga sa ispitivanom supstancom inokulisana sa *P. aeruginosa* san ai), kontroli (sterilna MSM podloga sa ispitivanom supstancom) i standardnoj seriji urađena je integracijom površina pikova (softver GC-MS Data Analysis). Odnos površina pikova i odgovarajućih koncentracija u standardnim serijama individualnih jedinjenja bio je linearno zavisano sa vrlo visokim koeficijentom korelacije ($r^2 \geq 0,991$).

Dodatno, da bi se proverila stabilnost 2,6-DTBP, dve identične standardne serije su napravljene i analizirane pomoću GC-MS. Prva standardna serija analizirana je neposredno nakon pripreme, a druga posle 7 dana od pripreme (vreme koje odgovara trajanju eksperimenta biodegradacije), pri čemu je isto kao i uzorci bila izložena temperaturi od 30 °C tokom ovog perioda. Dobijeni rezultati GC-MS analize nisu pokazali nikakvu značajniju promenu koncentracije 2,6-DTBP u rastvorima standardne serije nakon 7 dana. Sem toga, preciznost eksperimenata potvrđena je merenjem koncentracije 2,6-DTBP i ostalih korišćenih individualnih ugljovodonika u kontrolnim probama, pri čemu su razlike u koncentraciji posle eksperimenta bile manje od 2 % u odnosu na polaznu koncentraciju. Efikasnost degradacije određena je na osnovu koncentracije ciljnog jedinjenja u uzorku i kontroli i izražena je u procentima.

4.9.2. Dvodimenzionalna gasnohromatografsko-maseno spektrometrijska analiza metabolita fluorena

Za analizu metabolita fluorena, ekstrakti su pripremani na isti način kao i ekstrakti za GC-MS analizu, sa time što je kao ekstrakciono sredstvo umesto *n*-heksana korišćen etil-acetat. Urađena je derivatizacija ekstrakata sa N,O-Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamidom i trimetilhlorosilanom (BSTFA + TMCS) (Sigma-Aldrich, SAD) na 60 °C u trajanju od 45 minuta. Derivatizovani ekstrakti su analizirani na dvodimenzionalnom gasnom hromatografu sa masenim spektrometrom (GCxGC-MS), GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japan; slika 16), snabdevenom ZY2 termalnim sistemom modulacije (Zoex Corp.) koji povezuje dve kolone, RtxR-1 (Restek, CrossbondR 100 % dimetil-polisiloksan, 30 m x 0,25 mm; debljine filma 0,25 μm) i BPX50 (SGE Analytical Science, 1 m x 0,1 mm; debljine filma 0,1 μm). Zagrevanje je bilo programirano na sledeći način: početna temperatura od 40 °C održavana je tokom 5 minuta, a zatim je podignuta do 300 °C, brzinom od 5 °C/min. Period modulacije je bio 6 sekundi. Opseg skeniranja *m/z* je bio od 70,0 do 500,0 Da. Podaci su analizirani pomoću GCImage (GCImage LLC) 2.8 softvera. Za identifikaciju jedinjenja na osnovu masenih spektara korišćene su

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

biblioteke WILEY 8, NIST11 i NIST17. Semikvantitativna analiza metabolita urađena je na osnovu površina mrlja na GC×GC-MS hromatogramu uzorka.



Slika 16. Dvodimenzionalni gasni hromatograf sa masenim spetrometrom (GCxGC-MS; Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Katedra za biohemiju).

4.9.3. Ispitivanje uticaja različitih faktora na efikasnost biodegradacije 2,6-DTBP

Uticaj različitih faktora, kao što su: početna koncentracija 2,6-DTBP, pH, temperatura i veličina inokuluma, ispitani su na MSM podlozi, pH 7,2, uz dodatak rastvora 2,6-DTBP u *n*-heksanu (koncentracije 100 mg/L) inokulisanog sa 4×10^7 CFU/mL, mešanjem na horizontalnoj mućkalici (150 rpm) na 30 °C u toku 7 dana, ukoliko drugačije nije naznačeno. Kontrola hemijske razgradnje bila je sterilna MSM podloga sa 2,6-DTBP iste koncentracije, dok je inokulisana sterilna MSM podloga bez 2,6-DTBP, bila kontrola rasta mikroorganizma. Svi eksperimenti su urađeni u triplikatu.

Da bi se ispitao efekat početne koncentracije, nekoliko različitih koncentracija 2,6-DTBP u *n*-heksanu: 2, 10, 100 i 400 mg/L je dodato u MSM podlogu.

Uticaj pH na efikasnost biorazgradnje 2,6-DTBP (koncentracije 100 mg/L) ispitan je modifikovanjem pH vrednosti MSM podloge. Vrednosti postignute dodatkom 0,1 M HCl ili 0,1 M NaOH pre sterilisanja podloge su bile: 5, 6, 7 i 8.

Uticaj temperature na biorazgradnju 2,6-DTBP (koncentracije 100 mg/L) je ispitan na četiri različite temperature: 22, 30, 37 i 43 °C.

Da bi se ispitao efekat veličine inokuluma u sterilnu MSM podlogu dodata je ćelijska suspenzija *P. aeruginosa* san ai tako da se postignu sledeće vrednosti CFU/mL: $2,6 \times 10^7$, $8,3 \times 10^7$ i $1,4 \times 10^8$.

4.9.4. Određivanje koncentracije sekundarnih metabolita

4.9.4.1. Egzopolisaharidi

Koncentracija egzopolisaharida u fermentacionoj tečnosti je određena spektrofotometrijskom metodom „fenol-sumporna kiselina“ (Dubois et al., 1956; Masuko et al., 2005). Reakciona smeša se sastojala od 0,1 ml supernatanta, 0,9 mL destilovane vode, 0,05 ml 80 % rastvora fenola u vodi i 2,5 ml koncentrovane (96 %) sumporne kiseline. Uzorci su vorteksovani i apsorbancija je merena posle 10 minuta na $\lambda = 490$ nm. Sadržaj egzopolisaharida je određen na osnovu jednačine standardne prave. Jednačina standardne prave dobijena je na osnovu apsorbanci rastvora skroba u vodi koncentracije od 0 do 100 mg/L.

4.9.4.2. Ramnolipidi

Koncentracija ramnolipida u fermentacionoj tečnosti nakon rasta mikroorganizma na PPAS podlozi je određena spektrofotometrijskom metodom, primenom orcinolnog testa (Chandrasekaran, BeMiller, 1980). Reakciona smeša se sastojala od 0,15 ml uzorka i 1,35 ml orcinolnog reagensa (0,19 % rastvor orcinola u 53 %, v/v, sumpornoj kiselini; Heyd et al., 2008; Rikalović et al., 2013). Uzorci su zagrevani 30 minuta na 80 °C, zatim ostavljeni 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je merena apsorbancija na $\lambda = 421$ nm. Koncentracija ramnolipida je određena pomoću jednačine standardne prave, koja je dobijena korišćenjem rastvora ramnoze u vodi, kao standarda, uzimajući u obzir da 1 μ g ramnoze odgovara 2,5 μ g ramnolipida (Wang et al., 2007).

4.10. Biohemijske metode analize mikroorganizma *P. aeruginosa* san ai

4.10.1. Homogenizacija biomase

Ukupni proteini su izolovani iz biomase, uzgajane na MSM podlozi u kojoj su dodati različiti izvori ugljenika, u ranoj stacionarnoj fazi. Biomasa je sakupljena centrifugiranjem, nakog čega je zamrznuta, pa homogenizovana u dve zapremine pufera A (50 mM Tris-HCl pufer pH 7,5, 0,1 mM fenilmetilsulfonil-fluorid, PMSF i 0,5 mM 1,4-ditiotreitol, DTT) u staklenom homogenizeru na 0 °C uz 20 zaveslaja. Dobijeni homogenati su ultracentrifugirani 2 sata na 16000 rpm na 4 °C korišćenjem ultracentrifuge Beckman Coulter L5-65, rotor SW 28 (Beckman, Indianapolis, SAD).

Dobijeni supernatanti su upotrebljeni za enzimske testove i analizu proteoma. Za analizu proteoma, proteini su koncentrovani pomoću vakuum koncentratora (Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Nemačka) na temperaturi od 30 °C i modu V-AQ.

4.10.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u homogenatima je određivana Bradford-ovom metodom (Bradford, 1976). Uzorak za analizu se sastojao od 200 μ L homogenata i 1 mL Bradford-ovog reagensa. Dobijeni rastvor je vorteksovani i nakon 10 minuta inkubacije (37 °C) merena je apsorbancija na $\lambda = 595$ nm. Kao slepa proba korišćen je rastvor koji se sastojao od 200 μ L destilovane vode i 1 mL reagensa.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

Koncentracija proteina je određivana na osnovu jednačine standardne prave, koja je dobijena merenjem apsorbanci rastvora goveđeg seruma albumina (BSA) koncentracije od 0 do 0,1 mg/mL.

4.10.3. Određivanje enzimskih aktivnosti

4.10.3.1. Katehol 1,2-dioksigenaza i katehol 2,3-dioksigenaza

Enzimska aktivnost katehol 1,2-dioksigenaze (C12O) u ćelijskim homogenatima merena je spektrofotometrijskom metodom (Briganti et al., 1997; Mahiuddin et al., 2012). Metoda se zasniva na praćenju formiranja *cis*, *cis*-mukonske kiseline koja predstavlja proizvod *orto*-razgradnje katehola. Reakciona smeša sastojala se od: 1 mL 50 mM fosfatnog pufera pH 8,0, 0,1 mL 100 mM DTT, 0,1 mL ćelijskog homogenata dobijenog iz biomase uzgajane na peptonu (LB), natrijum-benzoatu (koncentracije 3 mmol/L), 2,6-DTBP (koncentracije 100 mg/L), FLU, PHE i PYR (svi koncentracije 10 mg/L). Reakcija je započeta dodatkom 0,1 mL 1 mM supstrata (katehol, natrijum-benzoat, 2,6-DTBP, FLU, PHE, PYR) u dimetilsulfoksidu (DMSO). Promena absorbance na $\lambda = 260$ nm je merena tokom 10 minuta reakcije. Jedna jedinica enzimске aktivnosti je definisana kao količina enzima koji proizvede 1 μ mol *cis*, *cis*-mukonata ($\epsilon_{260} = 1,6 \times 10^4$ l/mol x cm) u minuti na 25 °C. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimске aktivnosti po miligramu proteina ćelijskog homogenata (U/mg proteina).

Enzimska aktivnost katehol 2,3-dioksigenaze (C23O) u ćelijskim homogenatima merena je spektrofotometrijskom metodom (Mahiuddin et al., 2012). Metoda se zasniva na praćenju formiranja 2-hidroksimuko-semialdehida koji predstavlja proizvod *meta*-razgradnje katehola. Reakciona smeša sastojala se od: 1 mL 100 mM fosfatnog pufera pH 8,0, 0,1 mL ćelijskog homogenata dobijenog iz biomase uzgajane na peptonu (LB), natrijum-benzoatu, 2,6-DTBP, FLU, PHE, PYR (istih koncentracija, kao što je navedeno u prethodnom pasusu) i 0,1 mL rastvora 100 mM (katehol, natrijum-benzoat) ili 10 mM supstrata (2,6-DTBP, FLU, PHE, PYR) u DMSO. Promena absorbance na $\lambda = 375$ nm je merena tokom 10 minuta reakcije. Jedna jedinica enzimске aktivnosti je definisana kao količina enzima koji proizvede 1 μ mol 2-hidroksimuko semialdehida ($\epsilon_{375} = 4,4 \times 10^4$ l/mol x cm) u minuti na 25 °C. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimске aktivnosti po miligramu proteina ćelijskog homogenata (U/mg proteina).

4.10.3.2. Hidroksilaza

Enzimska aktivnost hidroksilaze u ćelijskim homogenatima merena je spektrofotometrijskom metodom (Jauhari et al., 2014) na $\lambda = 340$ nm, kao smanjenje apsorbance uzorkovano promenom u koncentraciji NADH ili NADPH u toku 10 minuta. Reakciona smeša sastojala se od: 0,9 mL 20 mM fosfatnog pufera pH 7,4, 0,1 mL 0,5 mM NADH ili NADPH, 0,01 mL 1 % rastvora supstrata (katehol, natrijum-benzoat, timol, 2,6-DTBP, *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE, PYR, benzen, fenol, 1-butanol, 2-butanol, *tert*-butanol) u smeši DMSO : H₂O = 80 % : 20 %, v/v i 0,1 mL ćelijskog homogenata dobijenog iz biomase uzgajane na peptonu (LB), natrijum-benzoatu, kateholu, timolu (svi koncentracije 3 mmol/L), 2,6-DTBP, *n*-C₁₆, *n*-C₁₉ (svi koncentracije 100 mg/L), FLU, PHE i PYR (svi koncentracije 10 mg/L). Reakcija je inicirana dodavanjem rastvora supstrata. Jedna jedinica enzimске aktivnosti je definisana kao količina enzima koji u prisustvu supstrata prouzrokuje oksidaciju 1 μ mol NAD(P)H ($\epsilon_{340} = 6220$

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

1/mol x cm) u minuti na 25 °C. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina ćelijskog homogenata (U/mg proteina).

4.10.3.3. Alkohol dehidrogenaza

Enzimska aktivnost alkohol dehidrogenaze u ćelijskim homogenatima merena je spektrofotometrijskom metodom (Jauhari et al., 2014) na $\lambda = 340$ nm pri čemu je praćeno povećanje apsorbance usled nastajanja NADH u toku 10 minuta. Reakciona smeša sastojala se od: 0,9 mL 20 mM Tris-HCl pufera pH 8,8, 0,1 mL 4 mM NAD⁺, 0,01 mL rastvora supstrata (etanol, propanol, izopropanol) i 0,1 mL ćelijskog homogenata dobijenog iz biomase uzgajane na *n*-C₁₆ i *n*-C₁₉, koncentracije 100 mg/L. Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao količina enzima koji u prisustvu supstrata proizvede 1 mM NADH ($\epsilon_{340} = 6220$ 1/mol x cm) u minuti na 25 °C. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina ćelijskog homogenata (U/mg proteina).

4.10.3.4. Hinon reduktaza

Enzimska aktivnost hinon reduktaze u ćelijskim homogenatima merena je spektrofotometrijskom metodom (Mancini et al., 2015) na $\lambda = 340$ nm pri čemu je praćeno smanjenje apsorbance usled oksidacije NADH ili NADPH u toku 10 minuta. Reakciona smeša sastojala se od: 0,9 mL 20 mM fosfatnog pufera pH 7,4, 0,1 mL 0,5 mM NADH ili NADPH, 0,01 mL 0,5 mM hinona rastvorenog u DMSO i 0,1 mL ćelijskog homogenata dobijenog iz biomase uzgajane na 2,6-DTBP, koncentracije 100 mg/L. Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao količina enzima koji u prisustvu supstrata prouzrokuje oksidaciju 1 μ mol NAD(P)H ($\epsilon_{340} = 6220$ 1/mol x cm) u minuti na 25 °C. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina ćelijskog homogenata (U/mg proteina).

4.10.3.5. Superoksid dismutaza

Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u ćelijskim homogenatima merena je spektrofotometrijskom metodom (Sun, Zigman, 1987). Metoda se zasniva na inhibiciji autooksidacije adrenalina u adrenohrom u baznoj sredini. Reakciona smeša sastojala se od: 1,8 mL 50 mM Tris-HCl pufera pH 10,2, 0,1 mL reagensa adrenalina (0,18 g/L u 0,1 M HCl) i 0,1 mL ćelijskog homogenata dobijenog iz biomase uzgajane na suncokretovom ulju, 2,6-DTBP, *n*-C₁₆ ili FLU (koncentracije 1 %, v/v, 100 mg/L, 100 mg/L, 10 mg/L, redom). Promena apsorbance na $\lambda = 340$ nm je merena tokom 10 minuta reakcije. Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao količina enzima koji u prisustvu supstrata prouzrokuje promenu apsorbance ($\Delta A/\text{min}$) od 0,001 pod definisanim uslovima. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina ćelijskog homogenata (U/mg proteina).

4.10.3.6. Katalaza

Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u ćelijskim homogenatima merena je spektrofotometrijskom metodom (Roland, Irwin, 1952). Metoda se zasniva na direktnom merenju

razgradnje vodonik-peroksida pod dejstvom katalaze. Reakciona smeša sastojala se od: 1,8 mL 50 mM fosfatnog pufera pH 7,0, 0,1 mL reagensa (1 mL 0,18 % H₂O₂, rastvorenog u 0,5 mM fosfatnom puferu pH 7,0) i 0,1 mL ćelijskog homogenata dobijenog iz biomase uzgajane na suncokretovom ulju, 2,6-DTBP, *n*-C₁₆ ili FLU (koncentracije 1 %, v/v, 100 mg/L, 100 mg/L, 10 mg/L, redom). Promena apsorbance na $\lambda = 240$ nm je merena tokom 10 minuta reakcije. Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao količina enzima koja razgradi 1 μ mol H₂O₂ do O₂ i H₂O u minuti. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina ćelijskog homogenata (U/mg proteina).

4.10.3.7. Oksigenolitička aktivnost

Ukupna aktivnost dioksigenaza ćelijskih homogenata na supstratu 2,6-DTBP merena je praćenjem potrošnje O₂ amperometrijski, Klarkovom kiseoničnom elektrodom u toku 80 minuta. Reakciona smeša sastojala se od: 4 mL 100 mM fosfatnog pufera pH 8,0, 0,4 mL 10 mM supstrata (2,6-DTBP) rastvorenog u DMSO i 0,4 mL sirovog ekstrakta ćelije (Mancini et al., 2015; Sala-Trepat, Evans, 1971). Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao broj μ mol supstrata transformisanog u jedinici vremena. Specifična aktivnost enzima je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina ćelijskog homogenata (U/mg proteina).

4.10.3.8. Enzimska degradacija 2,6-DTBP

Sirovi proteinski ekstrakti dobijeni iz biomase uzgajane na MSM podlozi sa 2,6-DTBP kao supstratom tokom 48 h korišćeni su za ispitivanje enzimske razgradnje ovog jedinjenja. Eksperiment je izvođen u bocama zapremine 500 mL otpornim na svetlost (Duran, Wertheim, Nemačka) pri čemu se reakciona smeša sastojala od: 50 mL 100 mM fosfatnog pufera pH 8,0, 4 mL 10 mg/L 2,6-DTBP u DMSO i 4 mL sirovog proteinskog ekstrakta uz konstantno mešanje (150 rpm) na magnetnoj mešalici (Heidolph, Schwabach, Nemačka) na temperaturi od 29 ± 2 °C u toku četiri dana. Preostala količina 2,6-DTBP je određena pomoću GC-MS analize, kao što je opisano u poglavlju 4.9.1. Korišćene su dve kontrole: sirovi proteinski ekstrakt bez 2,6-DTBP i supstanca bez proteinskog ekstrakta.

4.10.3.9. Određivanje respiratorne aktivnosti

Da bi se ispitaio intenzitet biotransformacije i mineralizacije: 2,6-DTBP, *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE i PYR merena je respiracija *P. aeruginosa* san ai nakon izlaganja ispitivanim supstancama na MSM podlozi, uz pomoć dvanaesto-kanalnog Micro Oxymax[®] respirometra (Columbus Instruments, Columbus, SAD; slika 17).

Eksperimenti su izvođeni u Micro Oxymax bocama zapremine 500 mL otpornim na svetlost (Duran, Wertheim, Germany) uz konstantno mešanje (150 rpm) na magnetnoj mešalici (Heidolph, Schwabach, Nemačka) u toku 4 dana na određenoj temperaturi (25 i 30 °C za 2,6-DTBP, a 27 °C za *n*-alkane i PAH-ove). Reakciona smeša se sastojala od 100 mL MSM podloge u koju je dodata ispitivana supstanca u željenoj koncentraciji (4 i 10 mg/L za 2,6-DTBP, a 20 mg/L za *n*-alkane i PAH-ove, kao što je opisano u poglavlju 4.7), kao jedini izvor ugljenika, i 5 % posev *P. aeruginosa* san ai. Određena je kumulativna potrošnja kiseonika i produkcija ugljen-dioksida (μ L). Ćelijska respiracija je merena na svakih 300 minuta u toku 4 dana. Dobijeni rezultati su analizirani pomoću Micro Oxymax[®]

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

softvera. Merenja su rađena u triplikatu, a kao slepe probe korišćena su dva rastvora, prvi kao kontrola hemijske razgradnje ispitivane supstance, koji se sastojao od sterilne MSM podloge sa 2,6-DTBP, *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE, PYR u istoj koncentraciji kao u uzorku, i drugi, kao kontrola rasta mikroorganizma koji se sastojao od inokulisane sterilne MSM podloge bez dodatog izvora ugljenika.



Slika 17. Micro Oxymax[®] respirometar (Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Katedra za biohemiju).

4.11. Analitičke OMIKS metode

4.11.1. Analiza genoma

Genom *P. aeruginosa* san ai je deponovan u Gen Bank, BioProject PRJNA19571 sa pristupnim brojem JMKR00000000 (Izrael-Živković et al., 2019). Genom je analiziran pomoću Integrated Microbial Genomes (IMG) (<https://img.jgi.doe.gov/>) (Chen et al., 2019) i Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa et al., 2019).

4.11.2. Separacija proteina

4.11.2.1. Elektroforetska separacija proteina

Homogenati biomase uzgajane na MSM podlozi sa dodatkom 2,6-DTBP, *n*-C₁₆ (koncentracije 100 mg/L), FLU (koncentracije 10 mg/L) ili suncokretovog ulja (koncentracije 100 µL/L) su korišćeni za analizu proteoma.

4.11.2.1.1. Jednodimenzionalna elektroforeza – SDS-PAGE

Separacija proteina SDS-PAGE elektroforezom (natrijum-dodecilsulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu) je rađena na aparaturi Criterion[™] Cell, Bio-Rad sa 4-15 % gradijentnim

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

akrilamidnim gelovima (Criterion™ TGX™ Precast Gels, Bio-Rad). Kao standard korišćeni su markeri Caleidoskop, Bio-Rad.

Za elektroforezu su pripremani sledeći rastvori (Hoefler, 1994):

1. Pufer za tretiranje uzoka (0,125 M Tris HCl, 4 % SDS, 20 % v/v glicerol, 0,2 M DTT, 0,02 % brom fenol plavo, pH 6,8): 2,5 mL „stacking“ gela (3 g Tris, dd H₂O do 50 mL, pH 6,8), 4 mL 10 % SDS (10 g SDS, dd H₂O do 100 mL), 2 mL glicerola, 0,31 g DTT, 2 mg brom fenol plavo, dd H₂O do 10 mL;
2. Pufer za elektroforezu (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS, pH 8,3): 30,28 g Tris, 144,13 g glicina, 10 g SDS, dd H₂O do 10 L;
3. Rastvor za bojenje (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, CBB R-250, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina): 0,5 g CBB, 800 mL metanola, 140 mL sirćetne kiseline, dd H₂O do 2 L;
4. Rastvor za obezbojavanje I (40 % metanol, 7 % sirćetna kiselina): 400 mL metanola, 70 mL sirćetne kiseline, dd H₂O do 1 L;
5. Rastvor za obezbojavanje II (5 % metanol, 7 % sirćetna kiselina): 700 mL metanola, 500 mL sirćetne kiseline, dd H₂O do 10 L.

Uzorak za elektroforezu je pripreman mešanjem jednakih zapremina uzorka i pufera za tretiranje (1:1) uz zagrevanje na ključalom vodenom kupatilu, u toku 5 minuta. U bunarčice na gelu je nanošeno 20 µL uzorka. Elektroforeza je rađena na sobnoj temperaturi, uz radnu voltažu od 100 V. Gel je nakon završetka elektroforeze potopljen u rastvor za bojenje i ostavljen 24 h, uz blago mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon bojenja, gel je obezbojen pomoću rastvora za obezbojavanje I (30 minuta), a zatim i rastvorom za obezbojavanje II (do potpunog obezbojavanja).

4.11.2.1.2. Dvodimenzionalna gel elektroforeza

Prva dimenzija, d-izoelektrofokusanje je rađena na aparaturi Protean i12™ IEF system (Bio-Rad), prema protokolu proizvođača za pripremu proteina iz *Escherichia coli*. U Ependorf kivetama uzorci su pomešani sa rastvorom za rehidrataciju u odnosu 1:3 (v/v). Uzorci su uneti u kanale, preko kojih su stavljene IPG (*eng.*, immobilized pH gradient) trake (11 cm, pH 3-7), Bio-Rad, SAD. Preko uzoraka je sipano mineralno ulje da bi se sprečilo isparavanje. Tako pripremljeni uzorci su ostavljeni preko noći (12-18 h) na sobnoj temperaturi. Sledećeg dana je urađeno izoelektrično fokusiranje na sobnoj temperaturi. Početna radna voltaža je bila 250 V, koja je održavana 20 minuta, zatim je tokom narednih 6 sati podizana do 8000 V, dok se nije nakupilo ukupno 30 000 Volt sati. Nakon izvršenog izoelektrofokusanja je urađena druga dimenzija, tj. SDS-PAGE elektroforeza, prema postupku opisanom u poglavlju 4.11.2.1.1, nakon čega su gelovi bojeni pomoću CBB R-250.

4.11.3. Analiza proteoma

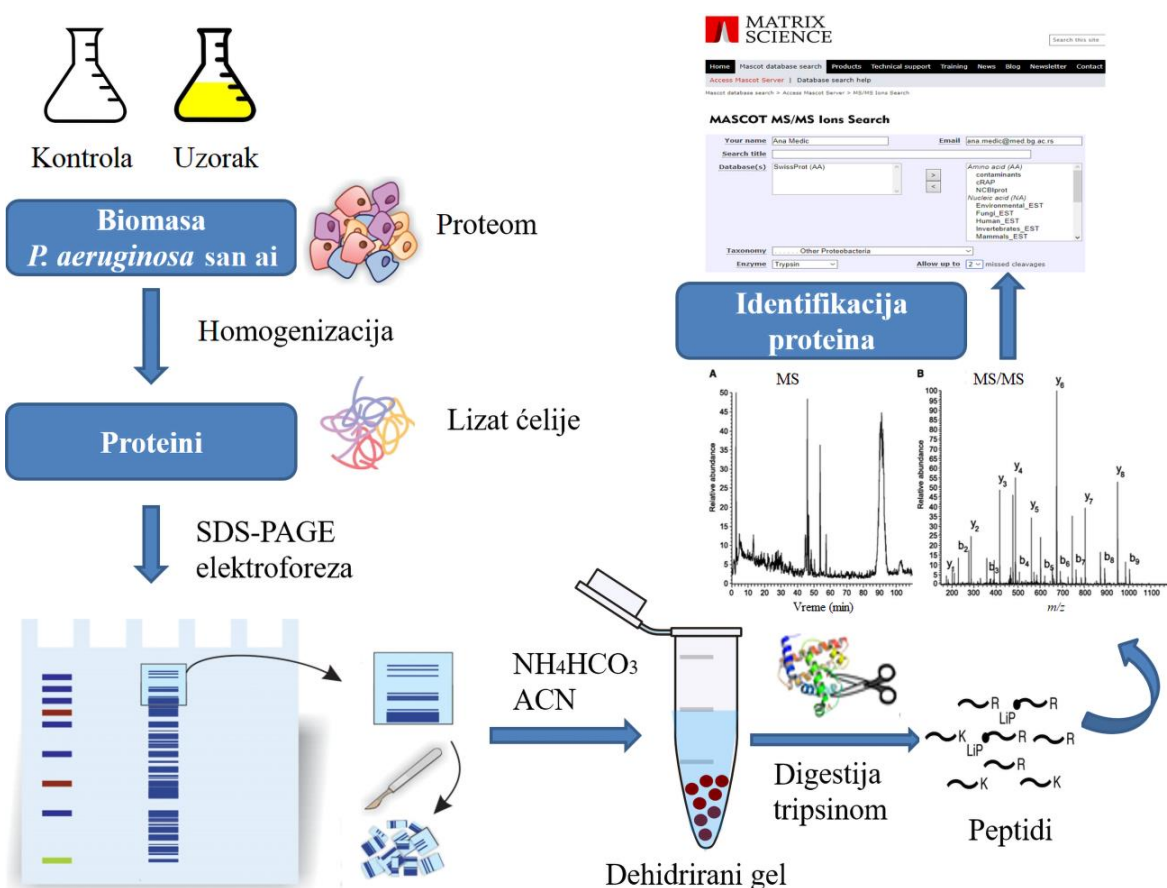
4.11.3.1. Priprema uzorka za analizu digestijom u gelu (*In gel digestion*)

Priprema uzorka za analizu: gel sa elektroforeze je isečen u male trake, a zatim u kvadratiće (~ 1 x 1 mm) i prenesen u Ependorf kivetu. Gel je ispran sa 0,5 mL 50 mM amonijum-bikarbonata u

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

trajanju od 15 minuta na termomikseru (Digital Shaking Drybath, Thermo Fisher Scientific, SAD) nakon čega je ispran sa 0,5 mL 100 % acetonitrilom (ACN), pri istim uslovima. Ovaj korak je ponovljen 3 puta, do obezbojavanja gela. Nakon redukcije zapremine na vakuum koncentratoru (Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Nemačka), u trajanju od 45 minuta, proteini su hidrolizovani tripsinom (Promega, Madison, SAD) koji je rastvoren u 50 mM amonijum-bikarbonatu do konačne koncentracije od 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (slika 18). Digestija je izvođena preko noći na termomikseru (300 rpm, 37 °C). Eluati su sačuvani, a gel je ispran dva puta sa 0,1 mL 5 % ACN/0,1 % mravlje kiseline (FA) u trajanju od po 15 minuta, nakon čega je ispran sa 0,1 mL 50 % ACN/0,1 % FA u trajanju od 15 minuta, na termomikseru. Eluati su spojeni, prebačeni u nove Eppendorf kivete i koncentrovani u vakuum koncentratoru (do zapremine od ~ 10 μL).



Slika 18. Put analize proteoma: priprema uzorka, HPLC analiza, bioinformatička pretraga.

4.11.3.2. Nano tečna hromatografija visokih performansi sa tandem masenom spektrometrijom

Smeše peptida dobijene nakon digestije tripsinom injektovane su autosamplerom (1 μL uzorka) na predkolonu, UHPLC Nanotrap (100 μm x 25 mm) pakovanu sa 200 Å C18 stacionarnom fazom (5 μm , C18AQ, Michrom) pri brzini protoka od 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, rastvarač: smeša 2 % ACN (v/v) u vodi i 0,1 % FA (v/v) u vodi. Peptidi su koncentrovani na predkoloni. Zatim je smeša peptida razdvojena na

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ana B. Medić

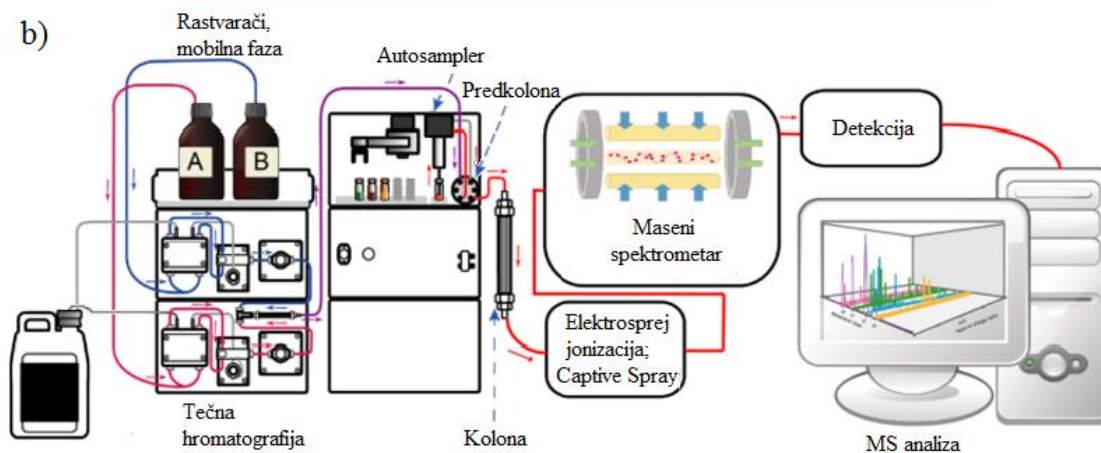
analitičkoj koloni (100 μm x 100 mm) pakovanoj sa 130 A C18 stacionarnom fazom (1,7 μm , ACQUITY, UPLC, M-Class, Waters), kuplovanog sa masenim spektrometrom. Peptidi su eluirani linearnim gradijentom rastvora A (0,1 % FA u H₂O) i B (0,1 % FA u ACN), na sledeći način: 0 min - 50 min – A (98 %), B (2 %); 50 - 55 min – A (5 %), B (95 %) uz brzinu protoka od 400 nL/min.

Peptidi razdvojeni tečnom hromatografijom (LC) analizirani su tandem masenom spektrometrijom (MS/MS) uz elektrosprej jonizaciju (*eng.*, electrospray ionization, ESI), u pozitivnom modu na instrumentu Amazon Speed (Bruker, Bremen, Nemačka), korišćenjem CS (*eng.*, captive spray) izvora (slika 19). Temperatura gasa azota iznosila je 180 °C, protok 3 L/min, dok je napon na kapilari bio 1300 V. Svi MS skenovi (scan) su rađeni u opsegu m/z 400,0-1400,0 Da sa poboljšanom rezolucijom. Nano LC-MS/MS analiza je rađena za pet najobilnijih prekursora.

a)



b)



Slika 19. a) Tečni hromatograf sa tandem masenim spektrometrom (nano LC-MS/MS; Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za hemiju u medicini) i b) šema aparature za LC-MS (Wikipedia.org).

4.11.3.3. Parametri bioinformatičke pretrage

Maseni spektri su prikupljeni i automatski obrađeni pomoću Hystar 3.2 i Data Analysis 4.2 softvera (Bruker, Nemačka). Dekonvolirani .mgf spektri analizirani su pomoću Mascot platforme (verzija 2.3.02, slika 18). Parametri pretrage su bili: takson – Other Proteobacteria, enzim – tripsin, broj preskočenih mesta enzimске hidrolize (*eng.*, missed cleavages) = 2, modifikacije – cistein karbamidometilacija i oksidacija metionina (promenljiva), tolerancija mase prekursora (*eng.*, precursor mass tolerance) = 1,2 Da, MS/MS mass tolerance = 0,6 Da, m/z vrednost = +2, +3, +4 naelektrisanje. Analizirana su samo jedinjenja sa graničnom vrednošću $p < 0,01$.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

5.1. Preliminarna ispitivanja

5.1.1. Preliminarno ispitivanje potencijala *P. aeruginosa* san ai za degradaciju organskih jedinjenja

P. aeruginosa san ai (slika 20) predstavlja ekološki izolat poreklom iz industrijskog otpadnog mineralnog ulja za sečenje. *P. aeruginosa* san ai je poliekstremofil koji može da raste u alkalnoj sredini, kao i u prisustvu teških metala (Izrael-Živković et al., 2018; Karadzic et al., 2004).



Slika 20. Rast *P. aeruginosa* san ai na a) hranljivom agaru, b) LB podlozi sa teškim metalima (Pb, Hg) i c) MSM podlozi sa natrijum-benzoatom. Uzorci su osvetljeni UV lampom, na talasnoj dužini 366 nm, pri čemu se vide fluorescentni pigmenti *P. aeruginosa* san ai.

Tribedi i Sil (2013) su pokazali da postoji direktna veza između hidrofobnosti ćelije i potencijala za degradaciju nepolarnih organskih jedinjenja zasnovana na stepenu hidrofobnosti ćelije pomoću MATH testa. Dobijena MATH vrednost za *P. aeruginosa* san ai iznosi 29 %, što ukazuje na

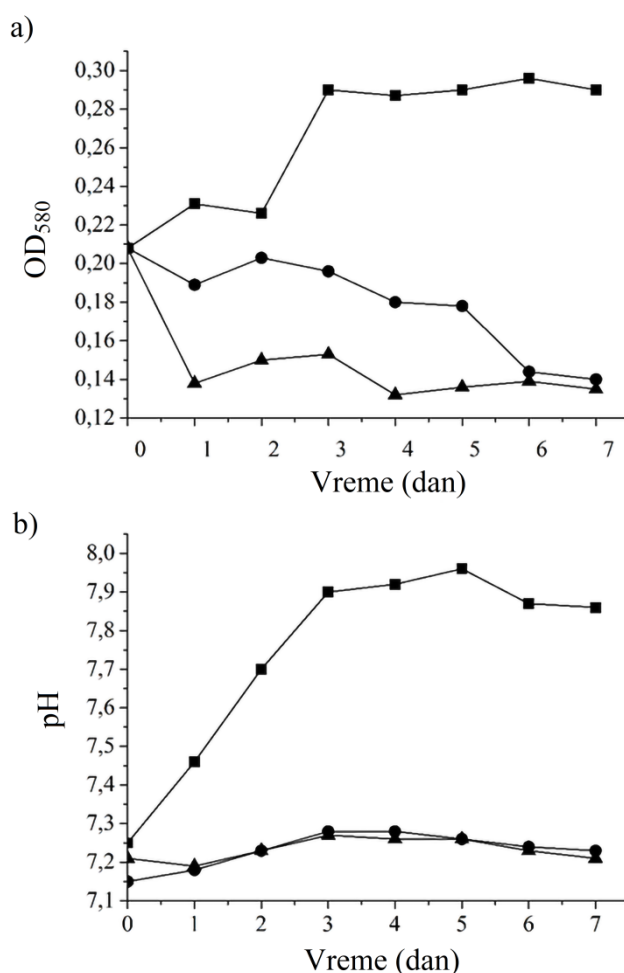
5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

umerenu hidrofobnost ćelije (Kadam et al., 2009) i sugeriše da *P. aeruginosa* san ai ima potencijal za biodegradaciju različitih organskih jedinjenja.

5.1.2. Uticaj sastava podloge na rast *P. aeruginosa* san ai

Na slici 21 su prikazani rezultati dobijeni ispitivanjem različitih mineralnih podloga: MSM, BH, BSM na rast mikroorganizma. Kao izvor ugljenika u podlogu je dodat *n*-C₁₆, koncentracije 2 mg/L. Tokom trajanja ekeperimenta merena je pH vrednost inokulisanih podloga. Kao što je uočljivo sa slike 21, postoje značajne razlike u intenzitetu rasta *P. aeruginosa* san ai na navedenim podlogama. Na MSM podlozi koja oponaša vodenu sredinu kao medijum za rast dobijena je najveća promena u OD₅₈₀ i pH vrednosti što sugeriše prirast u biomasi, pa je stoga ona odabrana kao optimalna podloga.



Slika 21. Uticaj sastava mineralnih podloga: MSM (-■-), BH (-●-), BSM (-▲-) sa dodatkom *n*-C₁₆ (2 mg/L) kao izvora ugljenika, na rast *P. aeruginosa* san ai; a) promene OD₅₈₀;

b) promene pH vrednosti inokulisane podloge.

Svaka tačka predstavlja srednju vrednost dobijenu iz tri ponovljena merenja. Grafički prikazi greške, tzv. error barovi, nisu vidljivi jer su kraći od veličine simbola.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

5.1.3. Rast *P. aeruginosa* san ai na MSM podlozi uz dodatak PAH

Dodatkom odabranih PAH-ova u MSM podlogu, koncentracije 2 mg/L, ispitan je efekat ovih jedinjenja na rast *P. aeruginosa* san ai. Kao što je prikazano u tabeli 7, povećanje OD₅₈₀ nakon inkubacije od 7 dana potvrđuje da *P. aeruginosa* san ai može da raste u prisustvu: FLU, PHE, PYR, hrizena i perilena, kao jedinih izvora ugljenika i energije.

Tabela 7. Rast *P. aeruginosa* san ai na različitim izvorima ugljenika

| Supstrat | <i>P. aeruginosa</i> san ai | Supstrat | <i>P. aeruginosa</i> san ai |
|-----------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|
| Fluoren (FLU) | ++ | 2,6-DTBP | + |
| Fenantren (PHE) | + | Katehol | + |
| Piren (PYR) | ++ | Hidrohinon | ++ |
| Hrizen | ++ | Timol | ++ |
| Perilen | + | Na-benzoat | ++ |

Legenda: Rast je praćen povećanjem OD₅₈₀ tokom 7 dana; (++) dobar rast, OD₅₈₀ > 0,1; (+) rast, OD₅₈₀ > 0,05; (-) nema rasta, OD₅₈₀ < 0,03 (Lin et al., 2014).

5.1.4. Rast *P. aeruginosa* san ai na MSM podlozi uz dodatak fenolnih jedinjenja

Dodatkom fenolnih jedinjenja kao što su: 2,6-DTBP (100 mg/L), katehol (3 mM), hidrohinon (3 mM), timol (3 mM) u MSM podlogu, ispitan je efekat ovih jedinjenja na rast *P. aeruginosa* san ai. Kao što je prikazano u tabeli 7, povećanje OD₅₈₀ nakon inkubacije od 7 dana potvrđuje da *P. aeruginosa* san ai može da raste u prisustvu ovih jedinjenja kao jedinih izvora ugljenika i energije.

5.1.5. Rast *P. aeruginosa* san ai na MSM podlozi uz dodatak natrijum-benzoata

Intenzivan i veoma obilan rast *P. aeruginosa* san ai na MSM podlozi sa dodatkom natrijum-benzoata, koncentracije 3 mM, prilikom inkubacije od 48 h, potvrđuje da *P. aeruginosa* san ai može uspešno da koristi natrijum-benzoat kao jedini izvor ugljenika i energije.

5.2. Biodegradacija ugljovodinka pomoću *P. aeruginosa* san ai

GC-MS analiza odabranih ugljovodonika: *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE, PYR (početne koncentracije 2 mg/L) dodatih u MSM podlogu na kojima je rasla kultura *P. aeruginosa* san ai je pokazala da su oni u potpunosti razloženi/uklonjeni nakon sedam dana. Budući da *P. aeruginosa* san ai razlaže i alifatične i aromatične ugljovodonike može se smatrati multidegradativnom bakterijom.

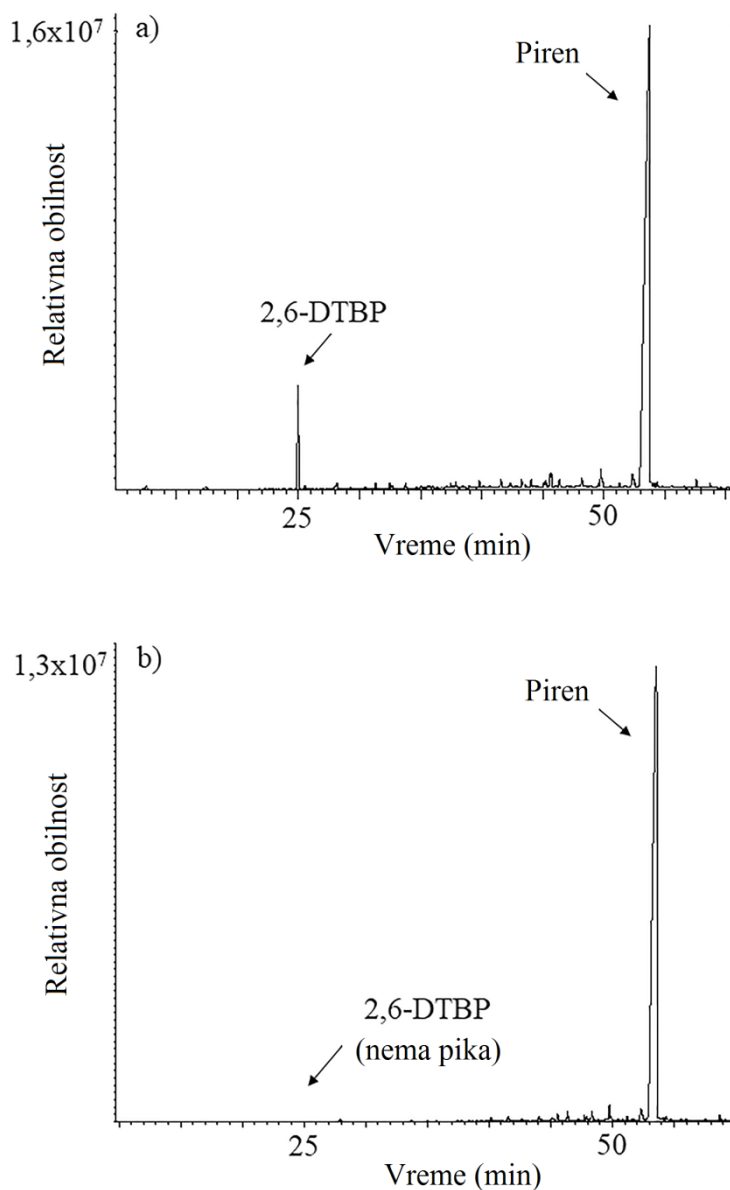
5.3. Biodegradacija 2,6-DTBP

Prilikom preliminarnih proučavanja biodegradacije pirena pomoću *P. aeruginosa* san ai, u GC-MS hromatogramu kontrolne probe uočen je pik koji odgovara 2,6-DTBP, koji je bio kontaminant, verovatno poreklom iz plastične kutije u koju je piren bio upakovan. Međutim, u uzorku koji je bio

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

inokulisan mikroorganizmom 2,6-DTBP nije bilo, što je ukazalo da *P. aeruginosa* san ai može da koristi 2,6-DTBP kao izvor ugljenika (slika 22).



Slika 22. Hromatogram ukupne jonske struje (*eng.*, Total Ion Current, TIC) *n*-heksanskih ekstrakata a) kontrole i b) uzorka inokulisanog sa pirenom (koncentracije 20 mg/L).

Zbog toga su izvedeni preliminarni eksperimenti biodegradacije sa komercijalnim 2,6-DTBP, da bi se proverilo da li *P. aeruginosa* san ai zbilja može da koristi ovo jedinjenje kao jedini izvor ugljenika. To je bilo izuzetno važno imajući u vidu široku rasprostranjenost i toksičnost 2,6-DTBP, posebno za akvatične organizme (OECD/SIDS, 1994), kao i zbog činjenice da je do sada publikovan samo jedan rad koji se tiče njegove biodegradacije, i to pomoću *Alcaligenes sp.* F-3-4 (Zhang et al.,

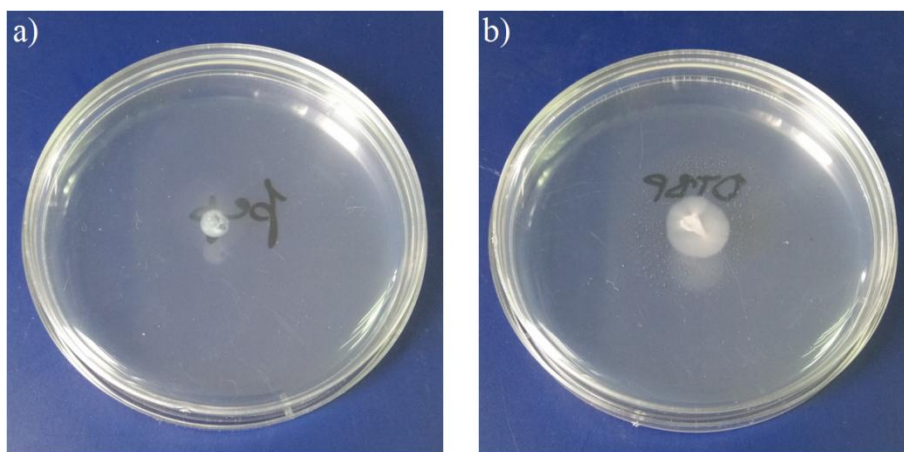
5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

2005). Preliminarni eksperimenti su pokazali da *P. aeruginosa* san ai potpuno degraduje 2,6-DTBP, koncentracije 2 mg/L, tokom 7 dana.

Kao rezultat pozitivne hemotaksije, tokom rasta *P. aeruginosa* san ai na MSM podlozi sa 0,3 % agarom koja je sadržala 1 mM 2,6-DTBP, formirao se obli prsten (slika 23), ukazujući da *P. aeruginosa* san ai uspešno koristi 2,6-DTBP kao izvor ugljenika.

Budući da su preliminarna ispitivanja dala pozitivne rezultate, dalje je u ovom radu detaljno proučavana biodegradacija ovog fenolnog jedinjenja pomoću *P. aeruginosa* san ai, uključujući i uticaj različitih faktora (koncentracije 2,6-DTBP, veličine poseva, pH i temperature) na efikasnost biodegradacije.



Slika 23. Pozitivna hemotaksija *P. aeruginosa* san ai prema a) peptonu (kontrola, pozitivni hemoefektor) i b) 2,6-DTBP.

5.3.1. Uticaj različitih faktora na efikasnost biodegradacije 2,6-DTBP

5.3.1.1. Uticaj početne koncentracije supstrata

Uticaj početne koncentracije supstrata je ispitivan dodavanjem sledećih koncentracija 2,6-DTBP: 2, 10, 100 i 400 mg/L u MSM podlogu koja je inokulisana sa 4×10^7 CFU/mL *P. aeruginosa* san ai. Nakon sedam dana fermentacije: 100 %, 100 %, 85 % i 18 % 2,6-DTBP je redom degradovano (slika 24).

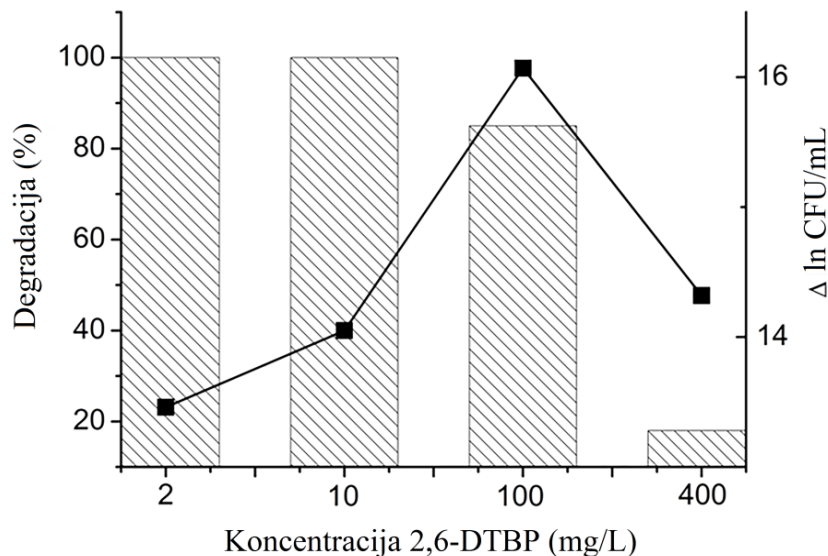
Kao što se zapaža sa slike 24, rast mikroorganizma se povećavao sa povećanjem koncentracije 2,6-DTBP i dostigao maksimum pri koncentraciji od 100 mg/L. Iz tog razloga je koncentracija od 100 mg/L odabrana kao optimalna za dalja ispitivanja uticaja temperature i pH na rast mikroorganizma i biodegradaciju 2,6-DTBP. Naime, poznato je da početna koncentracija supstrata ima snažan uticaj na efikasnost biodegradacije (Zhang et al., 2005). Rezultati prikazani na slici 24 pokazuju da su niže koncentracije 2,6-DTBP, 2 mg/L i 10 mg/L, u potpunosti degradovane, dok je efikasnost degradacije viših koncentracija, 100 mg/L, i pogotovu 400 mg/L, niža.

Pri početnoj koncentraciji 100 mg/L, 85 % 2,6-DTBP je uspešno uklonjeno iz tečne podloge u toku sedam dana, što ukazuje na veliki potencijal soja ne samo da preživi već i efikasno degraduje ovo toksično jedinjenje. Budući da je rastvorljivost 2,6-DTBP u vodi mala, svega 4,0 mg/L (Walker, 1996),

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

može se zaključiti da bi ovo jedinjenje moglo biti u potpunosti uklonjeno iz kontaminiranih voda pomoću *P. aeruginosa* san ai. Pri koncentracijama višim od 100 mg/L, efikasnost uklanjanja 2,6-DTBP opada, ukazujući na verovatno prisustvo toksičnih intermedijera.



Slika 24. Uticaj početne koncentracije supstrata na procenat degradacije 2,6-DTBP (histogram) i intenzitet rasta *P. aeruginosa* san ai (-■-).

Na slici je prikazano povećanje biomase u ranoj stacionarnoj fazi kada je kultura dostigla maksimum rasta (-■-). $\Delta \ln \text{CFU/mL}$ predstavlja razliku između $\ln \text{CFU/mL}$ na početku, u nultom vremenu, i u ranoj stacionarnoj fazi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost dobijenu iz tri ponovljena merenja. Error barovi nisu vidljivi jer su kraći od veličine simbola.

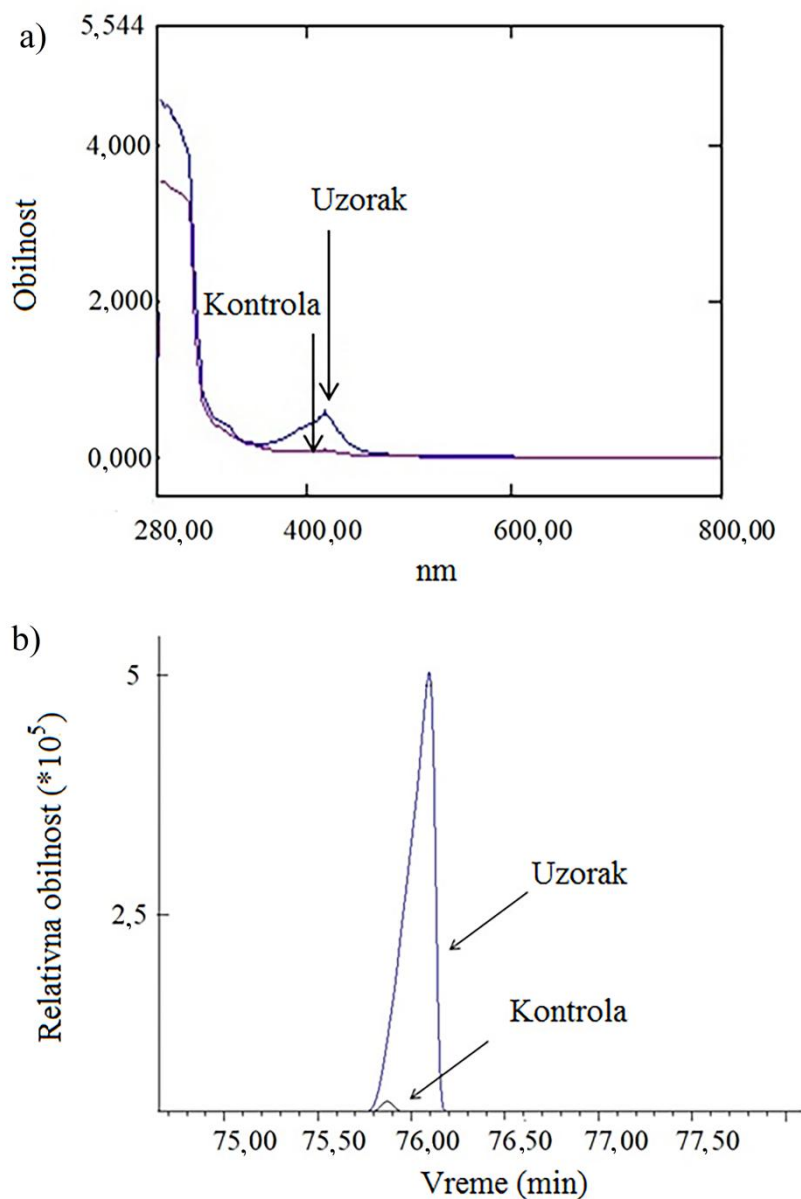
5.3.1.1.1. Toksični intermedijeri koji nastaju pri degradaciji visokih koncentracija 2,6-DTBP

Pri izlaganju *P. aeruginosa* san ai najvećoj početnoj koncentraciji od 400 mg/L, nakon 48 h, uočena je pojava žute boje u tečnoj podlozi. UV-VIS spektar i GC-MS hromatogram *n*-heksanskih ekstrakata kontrole i inokulisanog uzorka sa 2,6-DTBP (slika 25) pokazali su da se pored glavnog pika koji odgovara 2,6-DTBP (pik na 270 nm) pojavljuje još jedan pik sa maksimumom apsorbance na 420 nm (slika 25a), odnosno na retencionom vremenu od 76 minuta (slika 25b).

Maksimum apsorpcije na 420 nm ukazuje na benzohinonsku strukturu i ranije je uočavan u ovom tipu eksperimenata (Silverstein, Bassler, 1967; Smith et al., 1989). GC-MS analiza proizvoda biodegradacije pri visokim koncentracijama 2,6-DTBP (400 mg/L) potvrdila je prisustvo 2,6-di-*terc*-butil-1,4-benzohinona, BBQ (m/z 220) i 3,3',5,5'-tetra-*terc*-butil-4,4'-difenhinona, DPQ (m/z 408) (slika 25b), koji su kao derivati hinona toksični za mikroorganizme ($EC_{50} = 0,5 \text{ mg/L}$, Walker, 1988) i kao takvi inhibiraju rast pseudomonasa pri koncentraciji od 10 mg/L (Trevors, Basaraba, 1980).

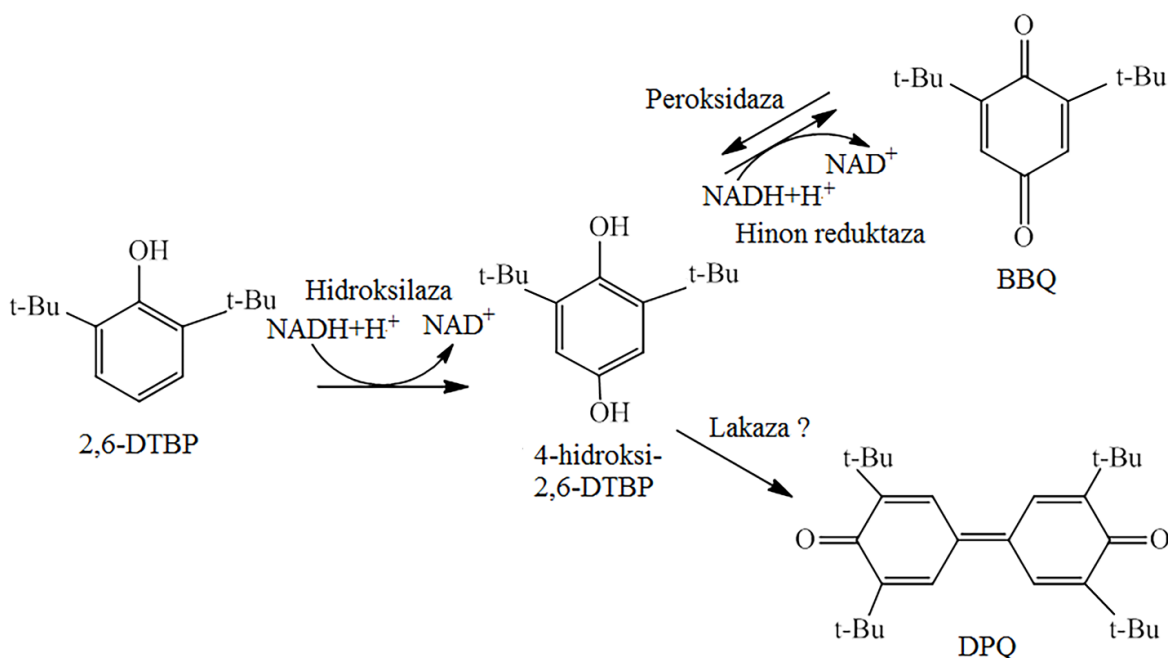
5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić



Slika 25. a) UV-VIS spektar i b) fragmentogram jona (m/z 408) *n*-heksanskih ekstrakata kontrole i inokulisanog uzorka pri koncentraciji 400 mg/L 2,6-DTBP, $t = 30$ °C, $\text{pH} = 7,2$.

Međutim, hinoni i njegovi derivati se mogu redukovati pomoću enzima NAD(P)H-hinon oksidoreduktaze (EC 1.6.5.5.) i dalje transformisati u manje toksična jedinjenja. Nakon izlaganja *P. aeruginosa* san ai visokoj koncentraciji od 400 mg/L 2,6-DTBP, izmerena je aktivnost NAD(P)H-hinon oksidoreduktaze čija je vrednost iznosila 192 mU/mg. Dobijeni rezultat ukazuje da oba identifikovana metabolita, BBQ i DPQ dalje mogu da se prevedu u hidrohinon derivate, čija je toksičnost veoma niska (Trevors, Basaraba, 1980) i koji dodatno mogu da se degraduju, kao što je predloženo na slici 26.



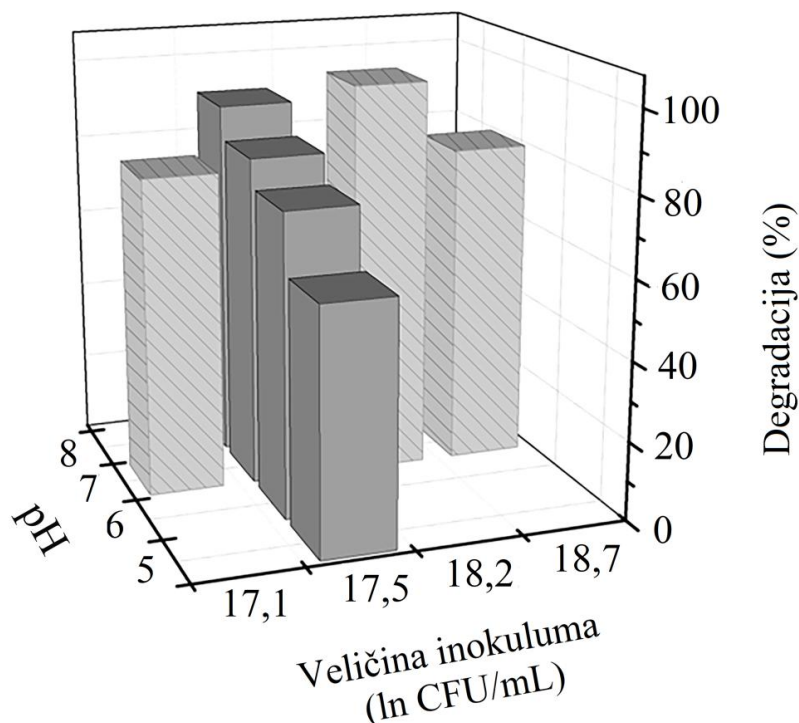
Slika 26. Pretpostavljeni put postanka i degradacije toksičnih intermedijera (BBQ i DPQ).

5.3.1.2. Uticaj veličine inokuluma

Da bi se ispitaio uticaj veličine inokuluma na degradaciju 2,6-DTBP, pored vrednosti CFU/mL od $4,0 \times 10^7$, analizirane su i sledeće gustine poseva (CFU/mL): $2,6 \times 10^7$, $8,3 \times 10^7$ i $1,4 \times 10^8$. Pri ovim posevima postignuti su sledeći procenti degradacije 2,6-DTBP (koncentracije 100 mg/L): 80 %, 99 % i 81 %, redom. Procenat degradacije u ovom eksperimentu ne raste sa porastom veličine inokuluma (slika 27), kao što je ranije publikovano. Naime, pri degradaciji bisfenola A pomoću *Achromobacter xylooxidans* (Zhang et al., 2007) i *Sphingomonas sp* (Sasaki et al., 2005) je pokazano da povećanjem veličine inokuluma dolazi do efekta inhibicije. Nasuprot tome, Zhang et al. (2005) su pokazali da je veličina inokuluma u korelaciji sa efikasnošću degradacije 2,6-DTBP pomoću bakterije *Alcaligenes sp.* F-3-4.

5.3.1.3. Uticaj pH vrednosti

pH vrednost MSM podloge (100 mg/L 2,6-DTBP), podešena je da bude: 5,0, 6,0, 7,0 i 8,0. Na osnovu rezultata GC-MS analize izračunati su sledeći procenti degradacije: 61 %, 76 %, 83 % i 91 %, redom (slika 27). Dobijeni rezultati pokazuju da *P. aeruginosa* san ai može efikasno da degraduje 2,6-DTBP u širokom opsegu pH vrednosti od 5,0 do 8,0, tokom 7 dana. Maksimalna degradacija 2,6-DTBP je postignuta na pH 8,0. Efikasna degradacija 2,6-DTBP u širokom opsegu pH vrednosti ukazuje na postojanje enzimskih mehanizama za degradaciju, stabilnih u datom pH opsegu, što je u skladu sa publikovanim stabilnostima enzima *P. aeruginosa* san ai u pH intervalu 4 - 11 (Karadžić et al., 2006; Tao et al., 2009).



Slika 27. Uticaj veličine inokuluma i pH vrednosti na degradaciju 2,6-DTBP koncentracije 100 mg/L.

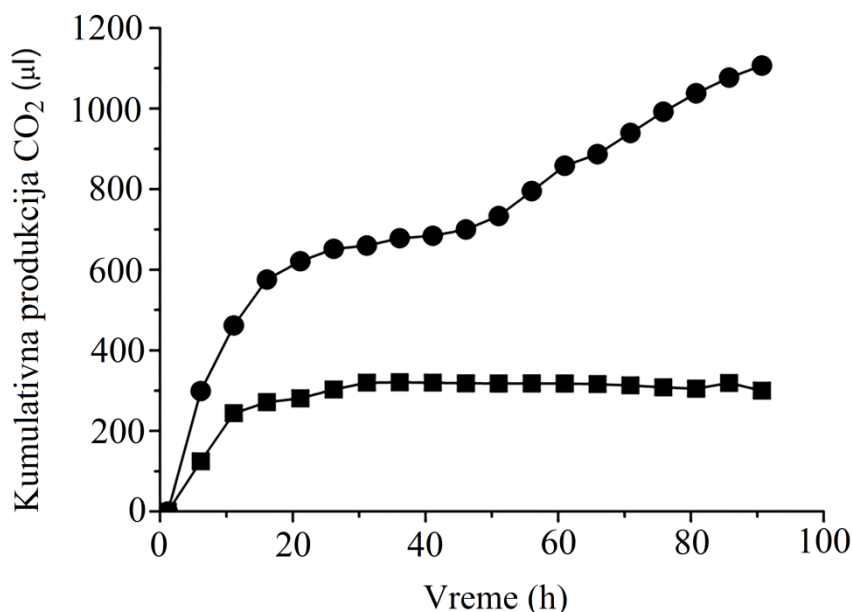
Legenda: Svetlosivi histogrami sa teksturom prikazuju uticaj veličine inokuluma, dok tamno sivi histogrami prikazuju uticaj pH na efikasnost degradacije.

Na slici su prikazane srednje vrednosti rezultata dobijene iz tri ponovljena merenja.

5.3.1.4. Uticaj temperature

Procenat degradacije 2,6-DTBP (100 mg/L) na temperaturama 22, 30, 37 °C iznosio je 45 %, 85 % i 99 %, respektivno, tokom 7 dana, dok je na temperaturi od 43 °C značajno opao, na svega 25 %, za isti period vremena. Poređenjem sa rezultatima za efikasnost degradacije 2,6-DTBP pomoću bakterije *Alcaligenes sp.* F-3-4 (Zhang et al., 2005), soj *P. aeruginosa* san ai je pokazao znatno bolji potencijal za degradaciju u širokom temperaturnom opsegu. Prema literaturnim podacima, povećanje temperature dovodi do bolje rastvorljivosti fenolnih jedinjenja, pri čemu je dostupnost supstrata mikroorganizmu veća i samim tim biodegradacija efikasnija, brža i bolja. Istraživanja pokazuju da je rast mikroorganizama poboljšan sa povećanjem temperature od 10 do 30 °C, dok na višim temperaturama između 35 i 40 °C, kada otpočinje denaturacija proteina (Basha et al., 2010), nema neke značajnije promene u rastu.

Pored toga, poređenje produkcije ugljen-dioksida na 25 i 35 °C potvrđuje tezu da se reakcija ubrzava 2,5 - 3 puta sa porastom temperature za svakih 10 °C (slika 28). Na višim temperaturama dolazi do intenziviranja metabolizma i efikasnije mineralizacije. Glavni razlog za poboljšanu degradaciju je povećana rastvorljivost 2,6-DTBP na višim temperaturama, što dovodi do bolje raspoloživosti supstrata za mikroorganizam.

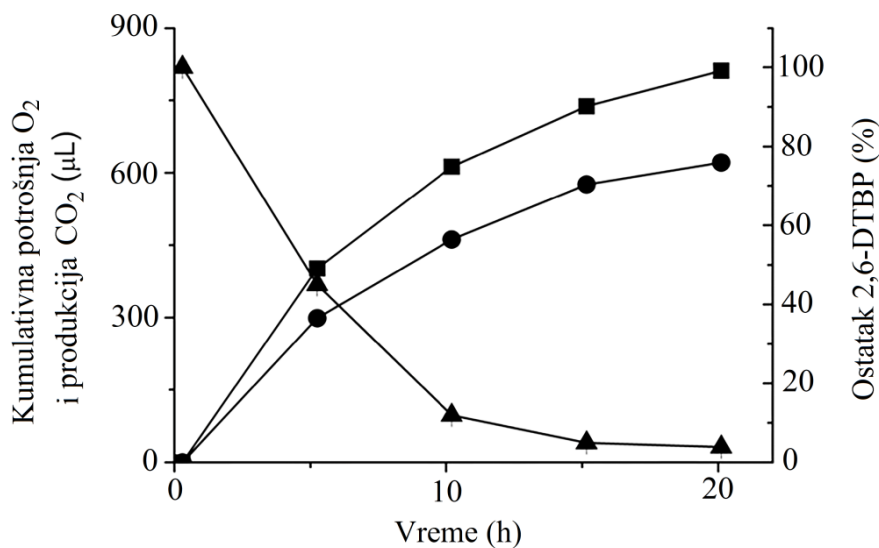


Slika 28. Kumulativna produkcija ugljen-dioksida tokom rasta *P. aeruginosa* san ai na 2,6-DTBP, koncentracije 10 mg/L, na temperaturama 25 °C (-■-) i 35 °C (-●-) (kontrola su oduzete). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost dobijenu iz tri ponovljena merenja. Error barovi nisu vidljivi jer su kraći od veličine simbola.

5.3.2. Dinamika biodegradacije 2,6-DTBP

Dinamika biodegradacije 2,6-DTBP je praćena tokom rasta *P. aeruginosa* san ai na 4 mg/L 2,6-DTBP, koncentraciji pri kojoj je supstrat potpuno rastvorljiv u vodi (Zhang et al., 2007). 2,6-DTBP je brzo uklonjen iz mineralne podloge, uz intenzivnu potrošnju kiseonika i produkciju ugljen-dioksida (slika 29). Najintenzivnija respiracija se odigrala u prvih pet sati fermentacije (402 µL kumulativne potrošnje kiseonika i 293 µL kumulativne produkcije ugljen-dioksida). Za isto vreme, 50 % 2,6-DTBP je mineralizovano. U prvih 10 sati više od 90 % 2,6-DTBP je razgrađeno. Maksimalna vrednost kumulativne produkcije ugljen-dioksida je postignuta nakon 20 sati, kada je 2,6-DTBP u potpunosti degradovan. *P. aeruginosa* san ai je brzo, u toku 20 sati, uklonio sav 2,6-DTBP iz rastvora, što jasno pokazuje dobar potencijal soja za aerobnu biodegradaciju 2,6-DTBP (slika 29). Biodegradacija pomoću *P. aeruginosa* san ai bila je neuporedivo efikasnija nego anaerobna degradacija pomoću aktivnog mulja, pri kojoj je za 5 dana transformisano samo 3,5 % 2,6-DTBP rastvora, početne koncentracije 0,05 mg/L (Freitag et al., 1985).

Kako su prethodni eksperimenti pod različitim uslovima pokazali dobar potencijal *P. aeruginosa* san ai da degraduje 2,6-DTBP, sledeći korak je bio proučavanje genoma i proteoma soja radi boljeg i detaljnijeg razumevanja metaboličkih puteva i mehanizama metaboličke adaptacije i odgovora na zagađujuću supstancu.



Slika 29. Dinamika degradacije 2,6-DTBP koncentracije 4 mg/L (-▲-), kumulativna potrošnja kiseonika (-■-) i kumulativna produkcija ugljen-dioksida (-●-) tokom rasta *P. aeruginosa* san ai na temperaturi 30 °C (kontrolne su oduzete).

Svaka tačka predstavlja srednju vrednost dobijenu iz tri ponovljena merenja. Neki error barovi nisu vidljivi jer su kraći od veličine simbola.

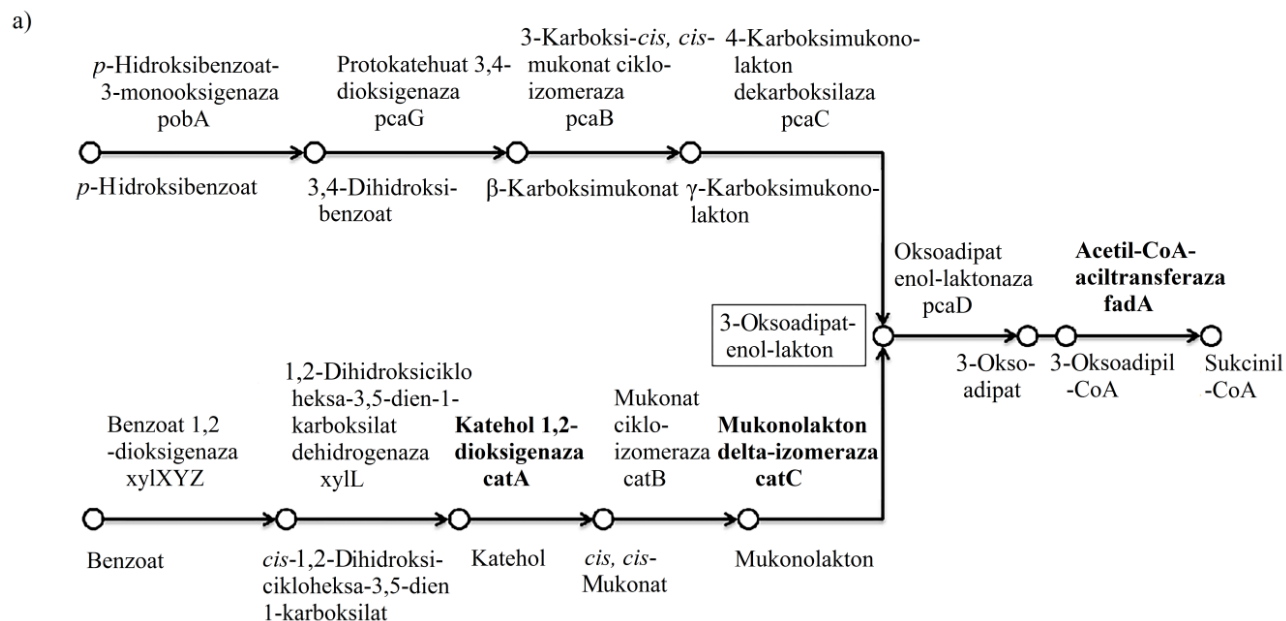
5.3.3. Genomska analiza katabolizma 2,6-DTBP

Identifikovana je grupa gena *P. aeruginosa* san ai koji kodiraju proteine učesnike u katabolizmu aromatičnih jedinjenja (Gen Bank: BioProject PRJNA19571, pristupni broj JMKR00000000) (Izrael-Živković et al., 2019). Proučavanja biodegradacije alkilfenola pomoću različitih sojeva *Pseudomonas* pokazala su široku supstratnu specifičnost katehol 1,2-dioksigenaze i katehol 2,3-dioksigenaze za veliki broj alkilkatehola koji predstavljaju početni proizvod oksidacije alkilfenola (Tuan et al., 2011).

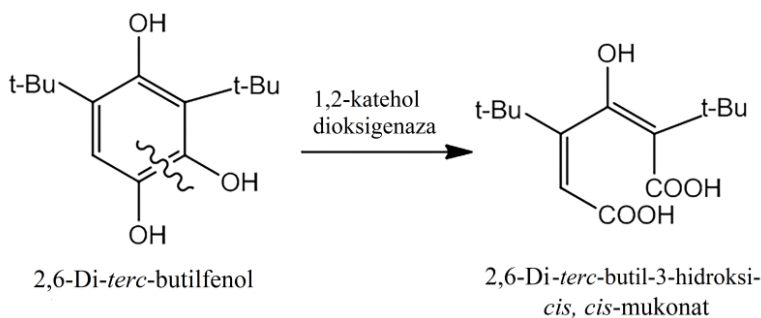
Analizom genoma *P. aeruginosa* san ai, pomoću KEGG-a (*eng.*, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), potvrđeno je prisustvo gena koji kodiraju proteine učesnike u katabolizmu aromatičnih jedinjenja (scaffolds K260DRAFT_scf7180000000062_quiver.15; K260DRAFT_scf71800000000064_quiver.13) (slika 30). Identifikovani su svi geni koji kodiraju proteine uključene u β -ketoacidnu *orto*-degradaciju katehola - *catABC* i protokatehuata - *pcaBCDG* (slika 30a). Genomska analiza je jasno ukazala na potencijal *P. aeruginosa* san ai za degradaciju aromatičnih jedinjenja putem *orto*-razgradnje.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić



b)



Slika 30. β -ketoadipatni put u *P. aeruginosa* san ai (a) i pretpostavljeni put *orto*-degradacije 2,6-DTBP sa 2,4-di-*tert*-butil-3-hidroksi-*cis,cis*-mukonskom kiselinom kao proizvodom degradacije (b).

Legenda: Geni i kodirajući proteini (slika a) su redom: *pobA* – *p*-hidroksibenzoat-3-monooksigenaza, *pcaG* – protokatehualat-3,4-dioksigenaza, *pcaB* – 3-karboksi-*cis,cis* mukonat cikloizomeraza, *pcaC* – 4-karboksimumkonolakton dekarboksilaza, *pcaD* – oksoadipat-enol laktonaza, *catA* – katehol 1,2-dioksigenaza, *catC* – mukonolakton-delta-izomeraza, *catB* – mukonat cikloizomeraza, *xylL* – 1,2-dihidroksicikloheksa-3,5-dien-1-karboksilat dehidrogenaza, *xylXYZ* – benzoat/toluat 1,2-dioksigenaza, *fadA* – acetil-CoA-aciltransferaza.

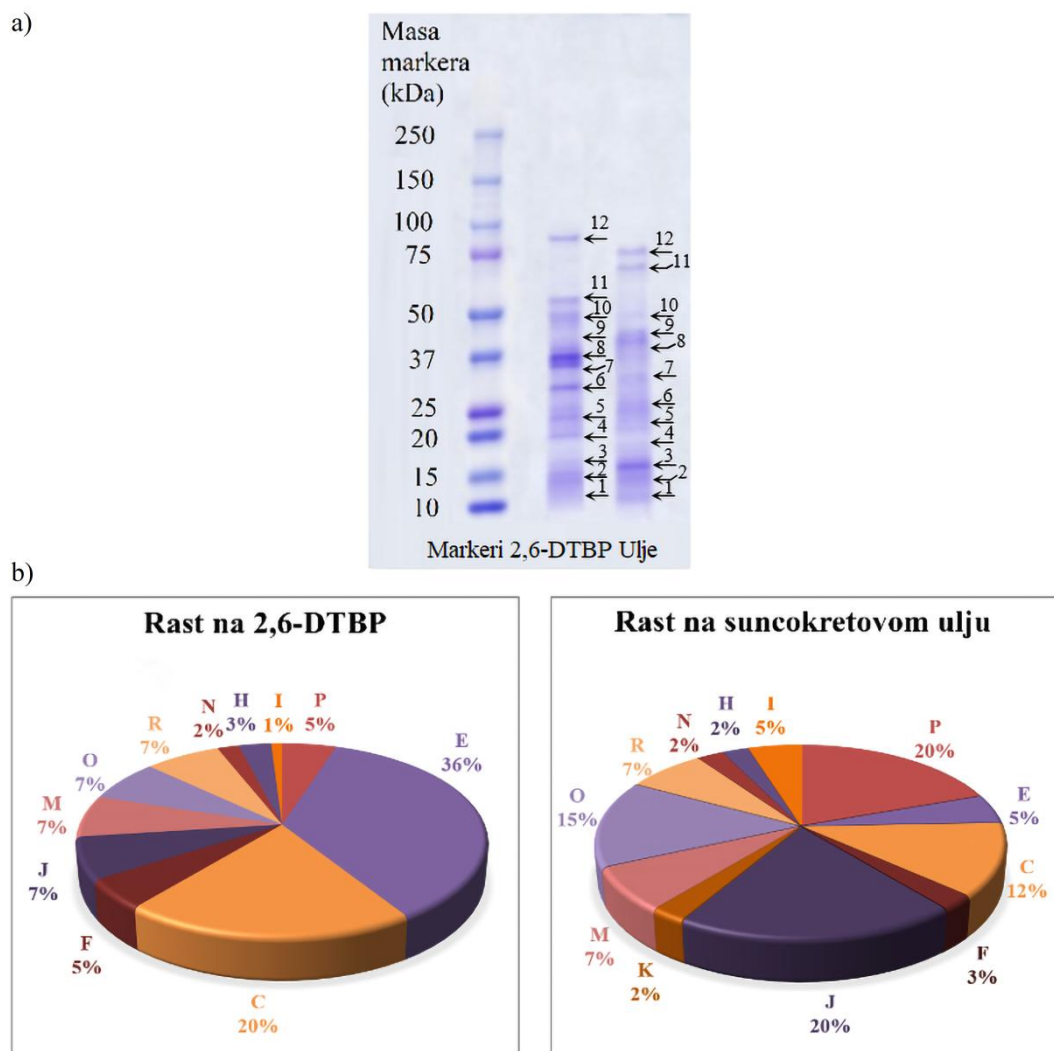
5.3.4. Komparativna analiza proteoma *P. aeruginosa* san ai

Rezultati analize genoma su korelisani i evaluirani analizom proteoma u svrhu identifikacije proteina koji su uključeni u katabolizam 2,6-DTBP. Komparativni proteomiks je urađen na uzorcima koji su dobijeni pri rastu *P. aeruginosa* san ai na 2,6-DTBP i suncokretovom ulju, kao jedinim izvorima ugljenika. Proteini koji su dobijeni iz kultura koje su gajane na dva različita supstrata (2,6-DTBP i suncokretovo ulje) razdvojeni su korišćenjem SDS-PAGE elektroforeze (slika 31a), nakon

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

čega je urađena digestija tripsinom i proteini su analizirani primenom nano LC-MS/MS. U tabeli 8 je prikazana lista svih identifikovanih proteina *P. aeruginosa* san ai tokom rasta na 2,6-DTBP u odnosu na suncokretovo ulje. Ukupno je identifikovano 86 proteina, od čega je 43 jedinstveno za 2,6-DTBP kulturu, a 29 za kulturu uzgajanu na suncokretovom ulju.



Slika 31. a) SDS-PAGE elektroforeza sa označenim odgovarajućim trakama za nano LC-MS/MS analizu; b) funkcionalna klasifikacija identifikovanih proteina iz *P. aeruginosa* san ai uzgajane u MSM podlozi na 2,6-DTBP i suncokretovom ulju.

Metaboličke kategorije klasifikovane prema COG (*eng.*, Clusters of Orthologous Groups of proteins):

- C – produkcija energije, E – metabolizam aminokiselina, I – lipidni metabolizam,
- J – translacija, H – metabolizam koenzima, K – transkripcija, M – biogeneza ćelijskih zidova,
- N – ćelijska pokretljivost, O – PTM, šaperonska funkcija, P – transport neorganskih jona,
- R – predviđanje opšte funkcije, F – metabolizam nukleotida,

COG kategorije – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

Tabela 8. Identifikovani proteini *P. aeruginosa* san ai nakon rasta na 2,6-DTBP i suncokretovom ulju (1D elektroforeza)

| Identifikovani protein | Naziv | Mascot skor | Preklapanje peptida | Prekrivenost (%) | Molekulska masa (kDa) | Tačka No | COG klasifikacija | RZ* |
|--|-------------|-------------|---------------------|------------------|-----------------------|----------|-------------------|------|
| Azurin | AZUR_PSEAE | 1191 | 10 | 60 | 16,0 | 2** | C | +1,1 |
| Azurin | AZUR_PSEAI | 696 | 12 | 76 | 13,9 | 1 | C | O |
| ATP sintaza podjedinica α | ATPA_PSEAB | 81 | 4 | 8 | 55,5 | 11 | C | P |
| ATP sintaza podjedinica β | ATPB_PSEAB | 78 | 3 | 9 | 49,5 | 10 | C | -1,2 |
| ATP sintaza gama lanca | ATPG_PSEAB | 85 | 2 | 6 | 31,5 | 6 | C | P |
| Izocitrat liaza | ACEA_PSEAE | 76 | 2 | 5 | 58,9 | 11 | C | P |
| Izocitrat dehidrogenaza [NADP] | IDH_PSEAB | 118 | 4 | 10 | 45,6 | 9 | C | O |
| Elektrontransfer flavoprotein podjedinica α | ETFA_PSEAE | 46 | 1 | 3 | 31,4 | 7 | C | O |
| Elektrontransfer flavoprotein podjedinica β | ETFB_PSEAB | 65 | 2 | 11 | 26,4 | 6 | C | O |
| C4-dikarboksilat-transportni periplazmični protein DctP | DCTP_PSEAE | 176 | 6 | 22 | 37,0 | 9 | C | P |
| Sukcinat-CoA ligaza (ADP-formiranje) podjedinica α | SUCD_PSEAE | 57 | 1 | 4 | 30,2 | 6 | C | O |
| Dihidrolipoil dehidrogenaza | DLDH1_PSEAE | 190 | 6 | 17 | 48,6 | 10 | C | -1,2 |
| Glicerol kinaza 2 | GLPK2_PSEAE | 185 | 6 | 14 | 55,9 | 11 | C | P |
| Citohrom c4 | CYC4_PSEAE | 132 | 2 | 15 | 20,7 | 4 | C | P |
| Glutarat-semialdehid dehidrogenaza DavD | DAVD_PSEAE | 76 | 2 | 6 | 51,6 | 10 | E | P |
| Glicin dehidrogenaza | GCSP1_PSEAE | 702 | 11 | 12 | 103,9 | 12 | E | P |
| Glicin dekarboksilaza | GCSH1_PSEAE | 48 | 1 | 7 | 13,8 | 1 | E | O |
| Glutaminaza-asparaginaza | ASPQ_PSEAE | 177 | 6 | 18 | 38,6 | 8 | E | P |
| Periplazmični protein za vezivanje putrescina SpuD | SPUD_PSEAB | 132 | 5 | 16 | 40,6 | 9 | E | +8,1 |
| Aromatično-aminokiselinska aminotransferaza | PHHC_PSEAE | 142 | 7 | 22 | 43,2 | 9 | E | P |
| Leucin-, izoleucin-, valin-, treonin-, i alanin-vezujući protein | BRAC_PSEAE | 128 | 2 | 6 | 39,7 | 9 | E | +8,1 |

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

| Nastavak tabele 8 | | | | | | | | |
|---|------------|-------------|---------------------|------------------|-----------------------|----------|-------------------|------|
| Identifikovani protein | Naziv | Mascot skor | Preklapanje peptida | Prekrivenost (%) | Molekulska masa (kDa) | Tačka No | COG klasifikacija | RZ* |
| Alifatična amidaza | AMIE_PSEAB | 70 | 3 | 10 | 38,5 | 8 | E | P |
| Histidin amonijak liaza | HUTH_PSEAB | 56 | 1 | 2 | 53,7 | 10 | E | P |
| Urokanat hidrataza | HUTU_PSEA7 | 241 | 3 | 5 | 61,2 | 11 | E | P |
| Aspartat aminotransferaza | AAT_PSEAE | 80 | 1 | 3 | 43,3 | 9 | E | P |
| Aminotrasferaza aminokiselina razgranatog lanca | ILVE_PSEAE | 161 | 3 | 11 | 34,1 | 7 | E | P |
| Keto-kiselina reduktiozomeraza (NADP ⁺) | ILVC_PSEAB | 164 | 4 | 17 | 36,4 | 7 | E/H | P |
| Arginin deiminaza | ARCA_PSEAE | 215 | 5 | 15 | 46,4 | 9 | E | P |
| Ornitin karbamoiltransferaza, katabolička | OTCC_PSEAE | 420 | 13 | 35 | 38,1 | 8 | E | P |
| Argininsukcinat liaza | ARLY_PSEAB | 99 | 4 | 11 | 51,6 | 10 | E | P |
| N-acetil-gama-glutamil-fosfat reduktaza | ARGC_PSEAB | 92 | 3 | 8 | 36,6 | 8 | E | P |
| Metilmalonat-semialhid dehidrogenaza (acilacija) | MMSA_PSEAE | 339 | 7 | 18 | 53,6 | 11 | E | P |
| 5-Aminovalerat aminotransferaza DavT | DAVT_PSEAE | 129 | 5 | 15 | 45,2 | 9 | E | -1,2 |
| S-adenozilmetionin sintaza | METK_PSEAB | 78 | 2 | 6 | 42,7 | 9 | E | P |
| Format-zavisna fosforibozilglicinamid formiltransferaza | PURT_PSEAB | 47 | 2 | 6 | 42,3 | 9 | F | P |
| Nukleozid-difosfat kinaza | NDK_PSEAB | 46 | 1 | 6 | 15,4 | 2 | F | O |
| Orotat fosforiboziltransferaza | PYRE_PSEAB | 83 | 1 | 8 | 23,3 | 4 | F | P |
| 6,7-Dimetil-8-ribitulumazin sintaza | RISB_PSEAB | 85 | 2 | 19 | 16,4 | 2 | H | P |
| Dehidrataza δ aminolevulinske kiseline | HEM2_PSEAE | 167 | 6 | 21 | 37,0 | 8 | H | P |
| Vezujući protein | ACPI_PSEAE | 78 | 3 | 32 | 8,7 | 1 | I | O |
| Acetil-CoA acetiltransferaza | ATOB_PSEAE | 135 | 4 | 11 | 40,4 | 9 | I | P |
| Lipid A deacilaza PagL | PAGL_PSEAE | 48 | 1 | 5 | 18,4 | 3 | I | O |
| Izoleucin-t-RNK ligaza | SYI_PSEAB | 60 | 1 | 1 | 105,4 | 12 | J | P |

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

| Nastavak tabele 8 | | | | | | | | |
|---|-------------|-------------|---------------------|------------------|-----------------------|----------|-------------------|-------|
| Identifikovani protein | Naziv | Mascot skor | Preklapanje peptida | Prekrivenost (%) | Molekulska masa (kDa) | Tačka No | COG klasifikacija | RZ* |
| Glutamil-t-RNK(Gln) amidotransferaza, podjedinica A | GATA_PSEAE | 164 | 2 | 5 | 51,8 | 10 | J | P |
| Faktor recikliranja ribozoma | RRF_PSEAB | 56 | 1 | 5 | 20,5 | 4 | J | O |
| 30S ribozomalni protein S7 | RS7_PSE14 | 57 | 2 | 15 | 17,6 | 3 | J | O |
| 50S ribozomalni protein L21 | RL21_PSEA8 | 44 | 1 | 10 | 11,7 | 1 | J | O |
| 30S ribozomalni protein S16 | RS16_PSEA7 | 61 | 2 | 33 | 9,2 | 1 | J | O |
| 30S ribozomalni protein S9 | RS9_PSEA7 | 44 | 1 | 6 | 14,6 | 2 | J | O |
| 50S ribozomalni protein L20 | RL20_PSEA7 | 44 | 1 | 8 | 13,3 | 1 | J | O |
| 50S ribozomalni protein L25 | RL25_PSEA8 | 164 | 4 | 27 | 21,9 | 4 | J | O |
| Elongacioni faktor Ts | EFTS_PSEAB | 77 | 3 | 16 | 30,6 | 6 | K | P |
| Elongacioni faktor Tu | EFTU_PSEAB | 86 | 2 | 5 | 43,3 | 9 | K | P |
| DNK-vezujući HU-beta protein | DBHB_PSEAE | 122 | 2 | 33 | 9,1 | 1 | K | O |
| Porin spoljašnje membrane F | PORF_PSEAE | 161 | 5 | 16 | 37,6 | 8 | M | O |
| Protein spoljašnje membrane OprJ | OPRJ_PSEAE | 85 | 2 | 5 | 51,9 | 10 | M | P |
| Protein spoljašnje membrane OprM | OPRM_PSEAE | 48 | 1 | 2 | 52,6 | 10 | M | P |
| Lipoprotein spoljašnje membrane | LOLA_PSEAB | 74 | 1 | 6 | 23,1 | 5 | M | P |
| Protein TolB | TOLB_PSEAE | 80 | 1 | 2 | 47,7 | 10 | M | P |
| Porin D | PORD_PSEAE | 114 | 5 | 10 | 48,4 | 9 | M | O |
| Porin B | PORB_PSEAE | 123 | 7 | 16 | 50,8 | 10 | M | O |
| Flagelin - tip A | FLICA_PSEAI | 622 | 8 | 23 | 40,0 | 8,12 | N | +6,5 |
| Glutation hidrolaza proenzim | GGT_PSEAE | 72 | 2 | 4 | 58,9 | 11 | O | P |
| 60 kDa Šaperon | CH60_PSEA7 | 183 | 4 | 10 | 57,0 | 11 | O | -9,1 |
| Šaperon SurA | SURA_PSEAE | 48 | 1 | 3 | 46,9 | 10 | O | P |
| Tiol:disulfid izmenljivi protein DsbA | DSBA_PSEAB | 894 | 7 | 34 | 23,4 | 5 | O | +1,22 |

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

| Nastavak tabele 8 | | | | | | | | |
|---|-------------|-------------|---------------------|------------------|-----------------------|----------|-------------------|------|
| Identifikovani protein | Naziv | Mascot skor | Preklapanje peptida | Prekrivenost (%) | Molekulska masa (kDa) | Tačka No | COG klasifikacija | RZ* |
| Tiol peroksidaza | TPX_PSEAE | 46 | 1 | 6 | 17,2 | 2 | O | O |
| Tioredoksin | THIO_PSEAE | 50 | 1 | 11 | 11,9 | 1 | O | O |
| Alkil hidroperoksid reduktaza C | AHPC_PSEAB | 78 | 3 | 17 | 20,5 | 4 | O | P |
| Šaperon protein DnaK | DNAK_PSEAB | 64 | 2 | 3 | 68,4 | 10 | O | O |
| 10 kDa Šaperon | CH10_PSEU5 | 64 | 2 | 18 | 10,3 | 1 | O | O |
| Bakterioferitin | BFR_PSEAE | 66 | 1 | 5 | 17,9 | 2 | P | O |
| Katalaza | CATA_PSEAE | 76 | 1 | 2 | 55,6 | 11 | P | P |
| Fe(3+)-Piočelin receptor | FPTA_PSEAE | 82 | 3 | 4 | 79,9 | 11 | P | +1,1 |
| Protein za regulaciju unosa gvožđa | FUR_PSEAE | 59 | 1 | 9 | 15,2 | 2 | P | O |
| Periplazmični protein za transport žive | MERP_PSEFL | 76 | 2 | 19 | 9,5 | 1 | P | O |
| Superoksid dizmutaza (Fe) | SODF_PSEAE | 50 | 1 | 5 | 21,3 | 4 | P | 1,0 |
| Protein za vezivanje fosfora PstS | PSTS_PSEAB | 98 | 2 | 8 | 34,5 | 7 | P | O |
| Mukonolakton δ -izomeraza | CATC_PSEAE | 90 | 1 | 8 | 11,3 | 1 | Q | P |
| Toluen-4-monooksigenaza | TMOA_PSEME | 61 | 2 | 9 | 58,1 | 11 | Q | P |
| N5-Karboksiaminoimidazol ribonukleotid mutaza | PURE_PSEAE | 138 | 2 | 19 | 16,9 | 3 | R | P |
| Ekotin | ECOT_PSEAB | 55 | 1 | 7 | 17,3 | 3 | R | +1,6 |
| UPF0312 protein PLES_04211 | Y421_PSEA8 | 2659 | 9 | 52 | 20,8 | 4 | S | 1,0 |
| Neokarakterisan protein PA3922 | Y3922_PSEAE | 101 | 3 | 8 | 51,2 | 10 | S | P |
| Neokarakterisan protein PA1579 | Y1579_PSEAE | 60 | 1 | 6 | 22,1 | 4 | S | +1,1 |

* Relativna zastupljenost (RZ) je odnos zastupljenosti proteina između kulture koja je rasla na 2,6-DTBP nasuprot kulturi koja je rasla na suncokretovom ulju; + povećana ekspresija proteina; – smanjena ekspresija proteina; P – prisustvo, proteini koji su identifikovani u kulturi gajenoj na 2,6-DTBP, a nema ih u kulturi gajenoj na suncokretovom ulju; O – odsustvo proteina u kulturi gajenoj na 2,6-DTBP, a identifikovani u kulturi gajenoj na suncokretovom ulju; ** Broj trake je isti u oba gela (proteini iz ćelija gajene na suncokretovom ulju i 2,6-DTBP).

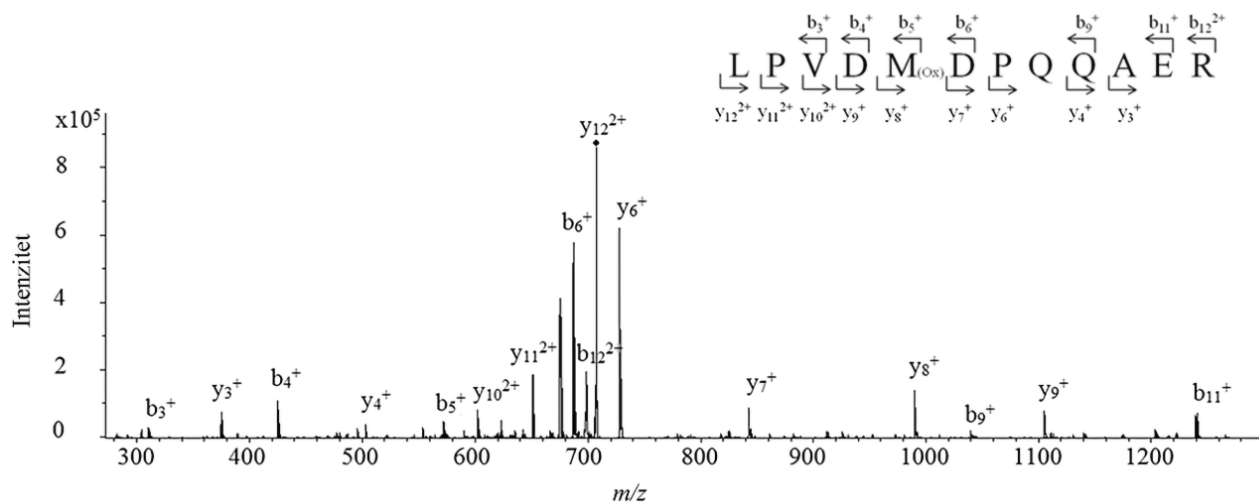
5.3.4.1. Enzimi kataboličke razgradnje 2,6-DTBP

Dva enzima koja su direktno uključena u razgradnju aromatičnih jedinjenja identifikovana su u kulturi koja je rasla na 2,6-DTBP, dok u kulturi koja je rasla na suncokretovom ulju oni nisu detektovani. Ta dva enzima su mukonolakton- δ -izomeraza (CATC_PSEAE) (slika 32), enzim koji je

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

odgovoran za *orto*-razgradnju aromatičnih jedinjenja preko katehola, i acetil-CoA aciltransferaza (ATOB_PSEAE), enzim koji je odgovoran za transformaciju β -keto adipil-CoA (3-oksoadipil-CoA) u sukcinil-CoA (slika 30a). Rezultati koji su dobijeni proteomskom analizom sugerišu *orto*-razgradnju 2,6-DTBP.



Slika 32. Tandem maseni spektar peptida LPVDMDPQQAER koji potiče iz mukonolakton-delta-izomeraze ($m/z = 707,80$).

Proteini su analizirani proteomskom metodom. Mukonolakton-delta-izomeraza je identifikovana pretragom pomoću MASCOT sa skorom 90. Specifični b i y joni su imali masenu tačnost unutar 44 ppm. Više od 30 % fragmentisanih jona je identifikovano da pripada datom peptidu.

Da bi se detaljnije ispitao i razumeo put razgradnje ovog aromatičnog jedinjenja, koji pri aerobnoj degradaciji podrazumeva aktivaciju prstena hidrosilacijom (tzv. gornji put) i otvaranje prstena (tzv. donji put), urađeni su enzimski testovi na hidrosilaze i obe katehol- dioksigenaze.

Detektovana je aktivnost svih ispitivanih enzima, što jasno pokazuje potencijal *P. aeruginosa* san ai da aktivira i razgradi aromatičnu strukturu. Homogenati soja *P. aeruginosa* san ai gajenog na nekoliko izvora ugljenika (pepton, katehol, *n*-heksadekan, natrijum-benzoat, 2,6-DTBP i timol) pokazuju hidrosilaznu aktivnost kako na alifatičnim ugljovodonicima, tako i na supstituisanim fenolima i natrijum-benzoatu (tabela 9). Specifična aktivnost (U/mg) monooksigenaze hidrosilaze na 2,6-DTBP i *terc*-butil-alkoholu iznosila je 0,2 i 0,07, što pokazuje da je moguća hidrosilacija kako alifatičnog, tako i aromatičnog dela molekula 2,6-DTBP.

Enzimska aktivnost sirovog proteinskog ekstrakta sa 2,6-DTBP je merena pomoću kiseonične elektrode. Vrednosti specifičnih aktivnosti enzimskih ekstrakata *P. aeruginosa* san ai gajene na LB i 2,6-DTBP iznosile su 0,02 i 0,23 U/mg i ukazuju na aktivaciju aromatičnog prstena i inducibilnost enzima koji su odgovorni za dalju degradaciju.

Pored hidrosilaze, ispitana je aktivnost enzima degradacije katehola koji su uključeni u otvaranje prstena (tabela 10). Praćena je *orto*-razgradnja katehola kao rezultat aktivnosti katehol 1,2-dioksigenaze (C120) povećanjem apsorbance na dve talasne dužine: na 260 nm (što ukazuje na akumulaciju *cis*, *cis*-mukonske kiseline, Mahiudddin et al., 2012) i na 290 nm (što ukazuje na prisustvo 2,4-di-*terc*-butil-3-hidroksi-*cis*, *cis*-mukonske kiseline, kao pretpostavljenog proizvoda razgradnje

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

2,6-DTBP; slika 30b, pomeranje za hidroksilnu grupu je približno 30 nm, Silverstain, Bassler, 1967). Takođe, analizirana je i *meta*-razgradnja prstena merenjem enzimskih aktivnosti na 375 nm, što ukazuje na akumulaciju 2-hidroksimuko semialdehida (Briganti et al., 1997; Mahiudddin et al., 2012). Na osnovu dobijenih rezultata, koji su prikazani u tabeli 8, može se izvesti zaključak da su svi ispitivani supstrati razgrađeni preko *orto*-putanje. Dobijeni rezultati za *P. aeruginosa* san ai su u saglasnosti sa rezultatima za *P. putilda* (Loh, Chua, 2002) i *P. aeruginosa* 142 (Feisti, Hegeman, 1969; Haigler et al., 1992; Romanov, Hausinger, 1994) koji su pokazali da ovi mikroorganizmi koriste *orto*-razgradnju katehola i natrijum-benzoata.

Tabela 9. Aktivnost hidrosilaze iz *P. aeruginosa* san ai uzgajane na različitim izvorima ugljenika u enzimskom testu sa različitim supstratima

| Izvor ugljenika | Supstrat | Specifična aktivnost (U/mg) |
|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| Pepton | Katehol | 0,08 |
| | 2,6-DTBP | 0,20 |
| | <i>Terc</i> -butanol | 0,07 |
| | 2-Butanol | 0,10 |
| | <i>n</i> -Butanol | 0,20 |
| | Benzen | 0,15 |
| | Fenol | 0,17 |
| Katehol | Katehol | 0,70 |
| | 2,6-DTBP | 1,23 |
| <i>n</i> -Heksadekan | <i>n</i> -Heksadekan | 0,07 |
| | 2,6-DTBP | 0,30 |
| Na-benzoat | Na-benzoat | 3,05 |
| | 2,6-DTBP | 0,80 |
| 2,6-DTBP | 2,6-DTBP | 1,04 |
| Timol | Timol | 0,50 |
| | 2,6-DTBP | 3,40 |

Orto-degradacija katehola pomoću enzima iz biomase *P. aeruginosa* san ai gajene na 2,6-DTBP ukazuje da se 2,6-DTBP može *orto*-razgraditi istim enzimima koji učestvuju u nastanku *cis*, *cis*-mukonske kiseline iz katehola. Identifikovani enzim CATC_PSEAE zajedno sa aktivnošću C120 podržava hipotezu da razgradnja 2,6-DTBP počinje *orto* otvaranjem aromatičnog prstena. Veliko povećanje apsorbance na 290 nm ukazuje na prisustvo 2,4-di-*terc*-butil-3-hidroksi-*cis*, *cis*-mukonske kiseline, kao proizvoda *orto* razgradnje 2,6-DTBP uz pretpostavku da se hidrosilacija odigrala u položaju 3 i 4. Reakcija hidrosilacije može biti rezultat dejstva monooksigenaza ili hidrosilujućih dioksigenaza čija je uloga da dodaju hidroksilne grupe (Karigar, Rao, 2011), pri čemu nastaje intermedijer koji se dalje razgrađuje dioksigenazama (Harayama et al., 1992; Vaillancourt et al., 2006).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

Tabela 10. Poređenje aktivnosti katehol 1,2-dioksigenaze i katehol 2,3-dioksigenaze iz *P. aeruginosa* san ai gajene na različitim izvorima ugljenika, korišćenjem različitih enzimskih supstrata

| Izvor ugljenika | Enzimski supstrat | Specifična aktivnost, U/mg | |
|-----------------|-------------------|----------------------------|------------------|
| | | A ₂₆₀ | A ₃₇₅ |
| Na-benzoat | Na-benzoat | 0,160 | 0,002 |
| | Katehol | 0,150 | 0,010 |
| | 2,6-DTBP | 0,110; 0,150* | 0,008 |
| 2,6-DTBP | 2,6-DTBP | 0,100; 0,160* | 0,004 |
| | Katehol | 0,080 | <0,001 |
| Pepton | Na-benzoat | 0,020 | <0,001 |
| | 2,6-DTBP | 0,030 | <0,001 |
| | Katehol | 0,009 | 0,007 |

* Apsorbanca na 290 nm merena je samo za 2,6-DTBP.

Prilikom proteomske analize identifikovan je enzim toluen-4-monooksigenaza (TMOA; Tabela 8), odgovoran za hidrosilaciju aromatičnog prstena. Zbog široke supstratne specifičnosti TMOA (Tao et al., 2009) ovaj enzim bi mogao biti dobar kandidat za hidrosilaciju aromatičnog prstena 2,6-DTBP.

5.3.4.2. Mehanizmi adaptacije *P. aeruginosa* san ai na aromatične supstrate

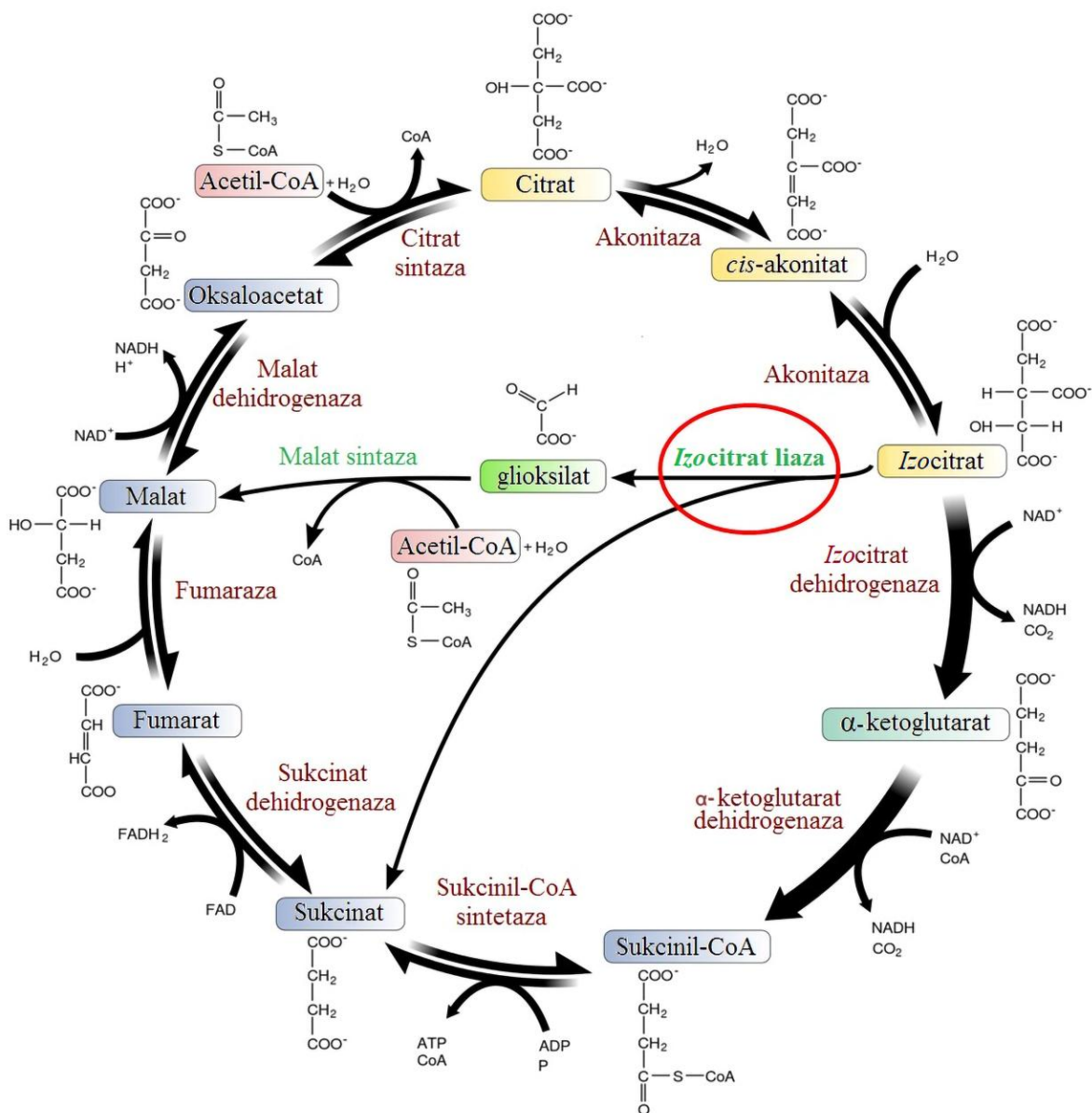
Analiza proteoma *P. aeruginosa* san ai koji je rastao na 2,6-DTBP kao jedinom izvoru ugljenika pokazala je da se odgovor ćelije može opisati kroz povećanu sintezu proteina uključenih u metabolizam aminokiselina i produkciju energije, dok u kulturi koja je rasla na suncokretovom ulju dominiraju proteini koji su uključeni u translaciju, produkciju energije i metabolizam i transport neorganskih jona (slike 30b i 31).

Iskorišćenje energije. Pokazano je da nakon izlaganja toksičnoj supstanci postoji povećana potreba za energijom, pa time i pojačana sinteza proteina koji su uključeni u proces proizvodnje energije (Li et al., 2016; Santos et al., 2004). Rezultati ove studije pokazuju da *P. aeruginosa* san ai koristi specifične metaboličke puteve kako bi se kontrolisala potrošnja energije i gubitak ugljenika. Naime, u proteomu kulture *P. aeruginosa* san ai, gajene na 2,6-DTBP, je detektovan ključni enzim gliksilatne putanje, *izocitrat liaza* (ACEA), (slike 30a i 33). Skraćujući ciklus TCA, ova gliksilatna putanja kontroliše iskorišćenje energije, sprečava produkciju slobodnih radikala i održava ćelijski redoks potencijal smanjujući protok elektrona tokom disanja. Gliksilatna putanja je dvostepeni metabolički put, u koji su uključene *izocitrat liaza* i *malat sintaza*, i služi kao alternativni put ciklusu trikarbonskih kiselina (TCA ciklus) (White, 2000).

Nasuprot tome, u kulturi gajenoj na suncokretovom ulju detektovan je enzim *izocitrat dehidrogenaza* (IDH) koji transformiše *izocitrat* u β -ketoglutarat i sugerise postojanje kompletnog Krebsovog ciklusa. Zapravo, *izocitrat* je tačka grananja TCA ciklusa gde dolazi ili do gliksilatne prečice ili se odvija ceo ciklus. Detektovani enzim gliksilatnog šanta, nakon izlaganja 2,6-DTBP, pokazuje da *P. aeruginosa* san ai racionalizuje potrošnju energije i smanjuje gubitak ugljenika u obliku CO₂ tokom biodegradacije ugljovodonika.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić



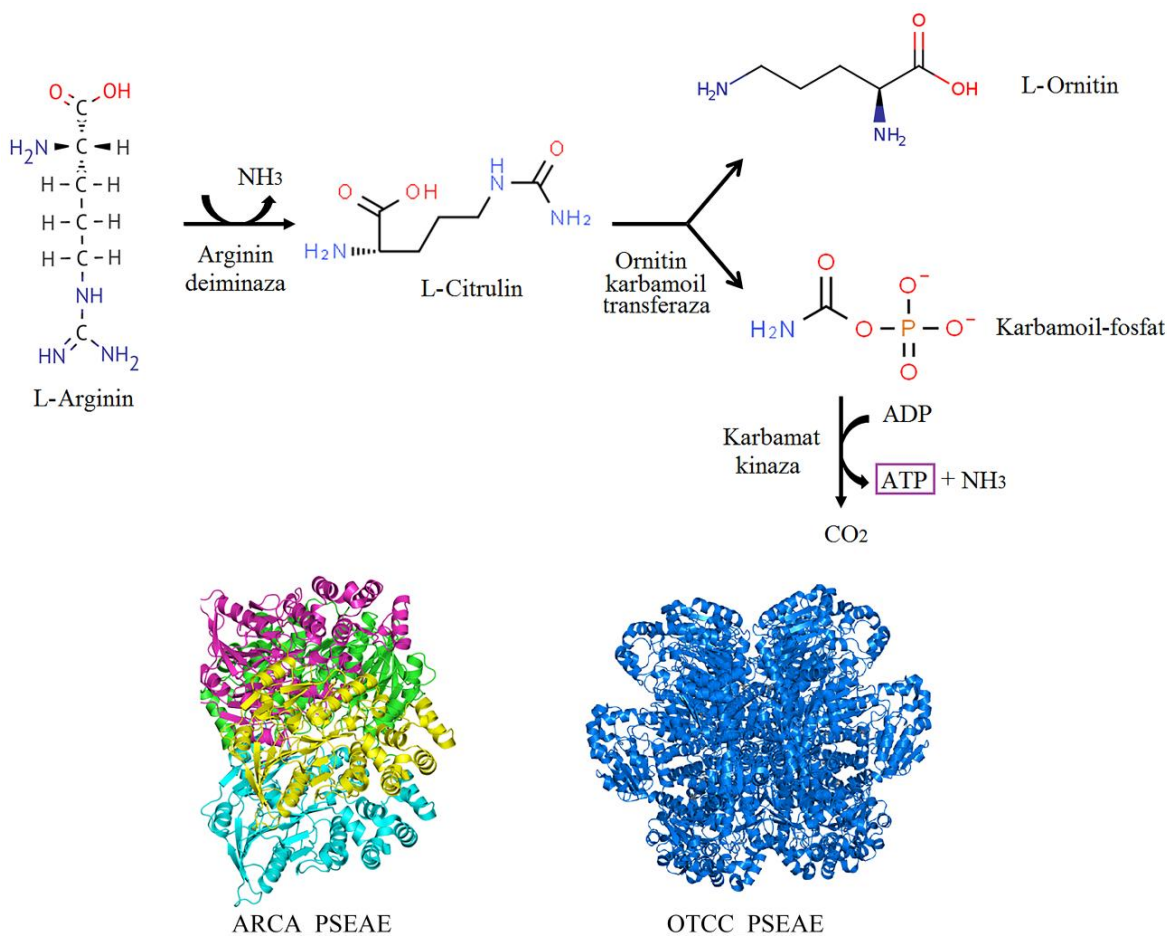
Slika 33. Ciklus trikarbonskih kiselina sa naglašenom glioksilatnom putanjom (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glyoxylate_cycle.jpg).

Ova teza je podržana povećanom ekspresijom dihidrolipoil dehidrogenaze (DLDH1) u kulturi koja je gajena na suncokretovom ulju. Naime, DLDH1, kao komponenta kompleksa α -keto kiselinskih dihidrogenaza, daje NADH i obezbeđuje elektrone za respiratorni lanac, pojačavajući respiraciju, dok, sa druge strane, enzimi glioksilatne putanje smanjuju protok elektrona i respiraciju. Enzimi glioksilatnog šanta su takođe pronađeni u *Arthrobacter phenanthrenivorans* koji je uzgajan na fenantrenu (Vandera et al., 2015), *A. chlorophenolicus* koji je rastao na fenolu (Unell et al., 2009) i *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK koji je rastao na pirenu (Badejo et al., 2013).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

Metabolizam aminokiselina. Kultura *P. aeruginosa* san ai gajena na 2,6-DTBP (slike 30b i 31) ima intenzivan metabolizam aminokiselina. Slično je uočeno i kod *P. putida* S-12 koja je gajena na *p*-hidroksibenzoatu (Verhoef et al., 2010). Posebno je izražen metabolizam i transport razgranatih, nepolarnih aminokiselina. Identifikovano je nekoliko enzima koji su uključeni u sintezu nepolarnih aminokiselina: aminotrasferaza aminokiselina razgranatog lanca (ILVE), keto-kiselina redukoizomeraza (NADP⁺) (ILVC), metilmalonat semialdehid dehidrogenaza (MMSA), glutaminaza-asparaginaza (ASPQ), aspartat aminotransferaza (AAT), aromatično-aminokiselinska aminotransferaza (PHHC), leucin-, *izoleucin*-, valin-, treonin-, i alanin-vezivni protein (BRAC). Pored anabolizma nepolarnih aminokiselina, katabolizam glicina, histidina i arginina je intenziviran. Degradacija arginina pomoću enzima arginin deiminaze (ADI) je proces u kom se proizvodi 1 mol adenzin trifosfata (ATP) i može biti indukovana pod različitim uslovima izazvanih stresom (Eschbach et al., 2004; Izrael-Živković et al., 2018). U ovom istraživanju je potvrđena povećana ekspresija ADI enzima. Identifikovani enzimi su arginin deiminaza (ARCA) i katabolička ornitin karbamoiltransferaza (OTCC). OTCC katalizuje fosforilaciju citrulina, pri čemu nastaje ornitin i karbamoil fosfat koji služe za produkciju ATP iz adenzin difosfata (ADP) (slika 34).



Slika 34. Arginin deiminazna (ADI) putanja i strukture identifikovanih proteina (ARCA_PSEAE, PDBe 1RXX i OTCC_PSEAE, PDBe 1DXH).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

Takođe, identifikovani su enzimi koji su uključeni u biosintezu L-arginina: N-acetilgama-glutamil-fosfat reduktaza (ARGC) i argininsukcinat liaza (ARLY). Više od trećine proteina koji su uključeni u metabolizam aminokiselina i čija je biosinteza povećana bili su povezani sa metabolizmom glutamina i glutarata: 5-aminovalerat aminotrasferaza DavT (DAVD), ASPQ, PHHC, histidin amonijačna-liaza (HUTH) i AAT. Vandera i saradnici (2015) su u svojim studijama pokazali sličan trend. Pored toga, u kulturi gajenoj na 2,6-DTBP su identifikovani enzimi uključeni u kataboličku degradaciju L-histidina (HUTH i HUTU) i glicina (glicin dehidrogenaza, GCSP1). GCSP1 je deo sistema za razgradnju (dekarboksilaciju) glicina (*eng.*, glycine cleavage system, GCS) koji je veoma osetljiv na promene u oksido-redukcionom stanju u respiratornom lancu (npr. oksidacioni uslovi stimulišu proces, dok redukcionni uslovi snažno inhibiraju ovaj proces). N5, N10-metilen-H4 folat je intermedijer koji nastaje pri razgradnji glicina i može se koristiti za biosintezu S-adenozil-metionina. U ovoj studiji je detektovana povećana sinteza S-adenozilmetionin sintaze (METK), enzima koji je odgovoran za ovaj proces. Glutamat koji nastaje degradacijom histidina se može dalje koristiti u biosintezi. Katabolizam glicina i histidina mogu se dovesti u vezu sa očuvanjem produkcije energije i biosinteza osnovnih gradivnih jedinica za ostale strukture molekula.

Proteini ćelijske membrane. Najveće promene u proteomu kulture *P. aeruginosa* san ai gajena na 2,6-DTBP, u poređenju sa kulturom gajenom na suncokretovom ulju, su uočene u membranskim proteinima. Sadržaj proteina spoljašnje membrane OPRJ i OPRM u kulturi koja je gajena na 2,6-DTBP je povećan, dok su porin D (PORD) i B (PORB) identifikovani samo u kulturi koja je gajena na suncokretovom ulju (tabela 8). Visok sadržaj komponenti glavne efluks pumpe za *n*-heksan i *p*-ksilen kao i OPRJ i OPRM, ukazuje na aktivni odgovor ćelije nakon izlaganja aromatičnim ugljovodonicima, što potvrđuje da *P. aeruginosa* san ai može preživeti i rasti kada je izložen 2,6-DTBP. Povećan sadržaj proteina koji su uključeni u sistem efluks pumpe i smanjen sadržaj porina pokazan je i u studiji *P. putida* KT2440 koja je bila izložen fenolu (Roma-Rodriguez et al., 2010). Za ove procese efluksa potrebna je dodatna energija, pri čemu dolazi do povećane produkcije i potrošnje ATP, što je u saglasnosti sa povećanom ekspresijom ATP sintaze nađenom u ovoj studiji.

Identifikovani protein Tol B (TOLB) i spoljni membranski protein lipoproteina (LOLA) su važni za integritet membrane. TOLB povezuje unutrašnju i spoljašnju membranu i peptidoglikanski sloj, dok LOLA učestvuje u translukaciji lipoproteina iz unutrašnje u spoljašnju membranu. Pored šaperonina SurA (SURA) koji je uključen u pravilno organizovanje proteina spoljašnje membrane, OPRJ, OPRM i TOLB učestvuju u prilagođavanju strukture membrane u svrhu preživljavanja ćelije kada je izložena 2,6-DTBP. Prisustvo PORD i PORB u kulturi gajenoj na suncokretovom ulju ukazuje na difuziju hranljivih jedinjenja, kao što su glicerol (PORB) i aminokiseline (PORD). Povećana količina glicerola može se pripisati delovanju ekstracelularne lipaze iz *P. aeruginosa* san ai koja hidrolizuje ulje do glicerola i više masne kiseline (Karadžić et al., 2006).

Posttranslacione modifikacije i šaperoni. Dobijeni rezultati analize proteoma kulture gajene na 2,6-DTBP ukazuju na povećanu sintezu translacionih elongacionih faktora EFTU i EFTS, kao i ribozomalnih proteina (GATA i RRF) koji učestvuju u transluciji proteina. Sa druge strane, u kulturi koja je gajena na suncokretovom ulju povećan je sadržaj nekoliko malih ribozomalnih proteina i šaperona (CH60, CH10, DNAK), što ukazuje na pojačanu sintezu proteina. SURA je protein koji je osetljiv na aromatične ostatke i identifikovan je samo u kulturi koja je gajena na 2,6-DTBP.

Posttranslacione modifikacije su uglavnom povezane sa proteinima oksidativnog stresa: proenzim glutation hidrolaze (GGT), tiol-disulfid proteina DsbA (DSBA) i alkil hidroperoksid

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

reduktaze C (AHPC) u kulturi gajenoj na 2,6-DTBP i tiol peroksidaze (TPX) i tioreodoksin (THIO) u kulturi gajenoj na suncokretovom ulju (tabela 8). Kako mehanizam toksičnosti fenolnih derivata uključuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), kao što su: superoksid, hidroksilni radikali, vodonik peroksid i slobodni radikali, enzimi koji mogu da neutrališu ROS identifikovani u ovoj studiji su povećana katalaza (CAT) i alkil hidroperoksid reduktaza C (AHPC), enzim koji je kinetički i značajniji nego CAT jer je primarno sredstvo za uklanjanje H₂O₂ (slika 31). Analiza proteoma je potvrđena rezultatima enzimskih testova, koji ukazuju na neznatno povećanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i čak šest puta povećanu specifičnu aktivnosti katalaze u *P. aeruginosa* san ai koja je rasla na 2,6-DTBP u poređenju sa suncokretovim uljem, potvrđujući oksidativni stres uzrokovan izlaganjem 2,6-DTBP (tabela 11).

Tabela 11. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) *P. aeruginosa* san ai koja je gajena na različitim izvorima ugljenika

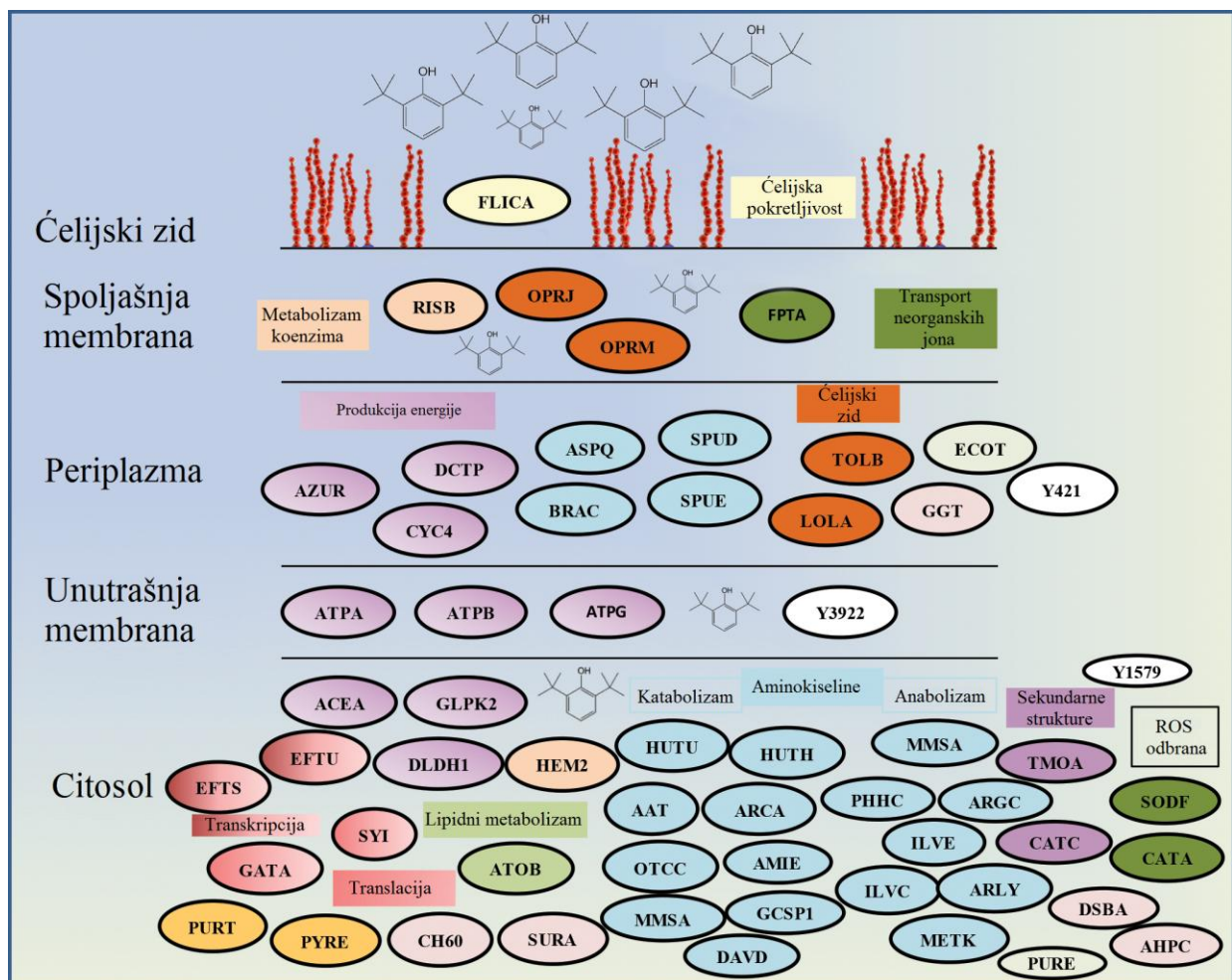
| Izvor ugljenika | Enzimska aktivnost | |
|-------------------|--------------------|------------|
| | SOD (U/mg) | CAT (U/mg) |
| 2,6-DTBP | 18,70 | 2,68 |
| Suncokretovo ulje | 9,51 | 0,40 |

Takođe, povećana sinteza proteina DSBA koji je odgovoran za SH-grupu ukazuje na naglašenu izmenu tiolne grupe u kulturi izloženoj 2,6-DTBP. U kulturi koja je rasla na suncokretovom ulju, kao jedinom izvoru ugljenika, identifikovani su tioreodoksin koji katalizuje reakciju prelaza ditiola u disulfid i specifična tiolna peroksidaza koja katalizuje redukciju vodonik-peroksida i organskih hidroperoksida do vode i alkohola. Rezultati ove studije ukazuju na uspešnu odbranu ćelija *P. aeruginosa* san ai od ROS i održavanje redoks homeostaze, kada je ona izložena i 2,6-DTBP i suncokretovom ulju.

Na slici 35 su sumirane promene u proteomu *P. aeruginosa* san ai nakon izlaganja 2,6-DTBP.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić



Slika 35. Šematski prikaz odgovora *P. aeruginosa* san ai na plastični aditiv 2,6-DTBP. Skraćenice proteina su iste kao i u tabeli 8. Proteini koji pripadaju istoj COG kategoriji su obeleženi istom bojom (Medić et al., 2019).

5.3.4.3. 2D mape *P. aeruginosa* san ai

Kao pilot eksperiment generisane su 2D mape proteinskih profila biomase *P. aeruginosa* san ai nakon rasta na: *n*-C₁₆, FLU, 2,6-DTBP i suncokretovom ulju, koje su prikazane na slici 36.

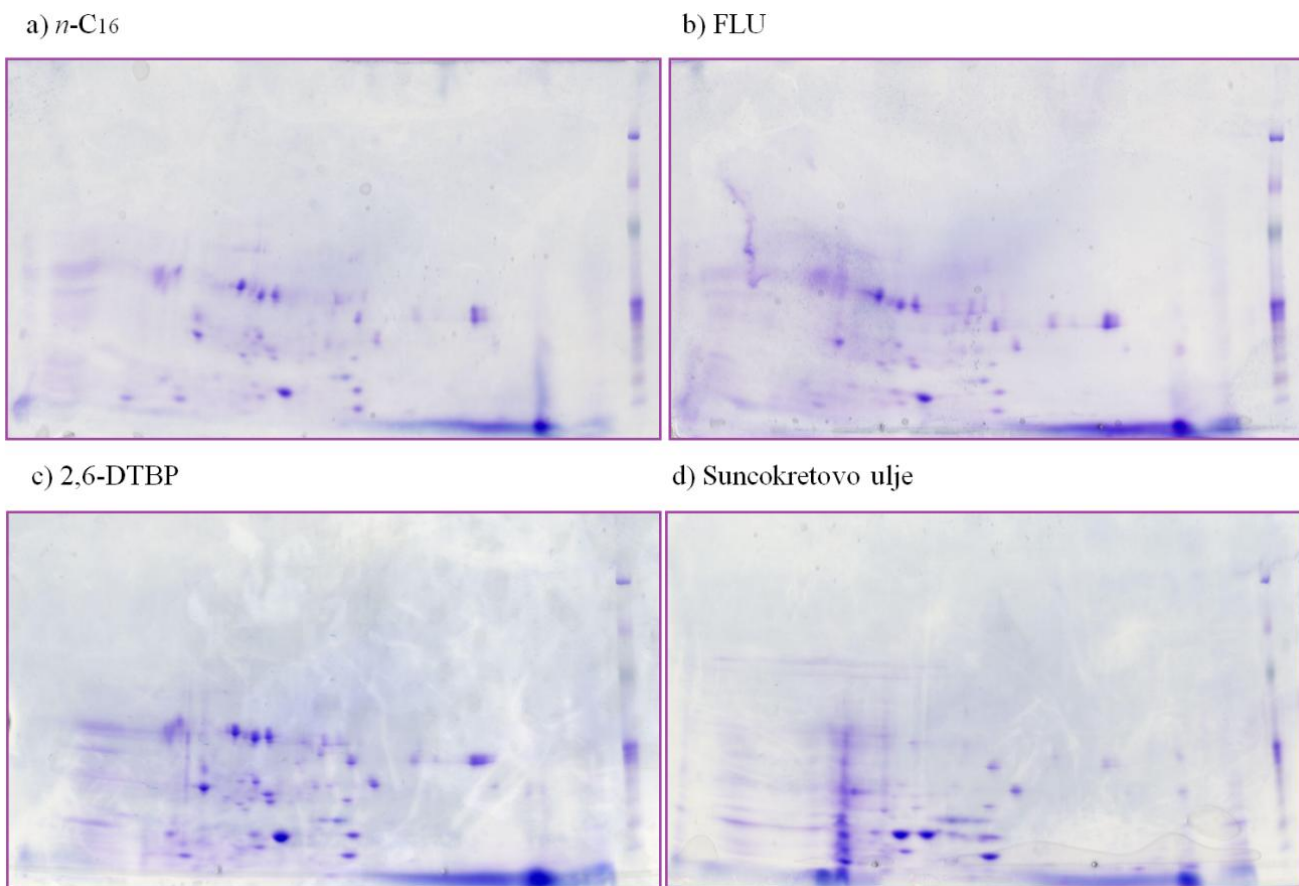
Mape pokazuju da su proteinski profili *n*-C₁₆, FLU i 2,6-DTBP veoma slični, dok se značajne razlike uočavaju kod kulture gajenoj na suncokretovom ulju. 2D pristupom je dobijena bolja separacija proteina nego korišćenjem samo jedne dimenzije, SDS PAGE, ali kvalitet dobijenih mapa nije bio zadovoljavajući za dalju doslednu analizu ukupne 2D mape. Analizirani su samo pojedini delovi gela, kao što je prikazano na slici 37.

Kao što slika 37c pokazuje postoje razlike u profilu proteina biomase rasle na 2,6-DTBP i ulju. Na slici 37d je prikazan deo mape gde se vide razlike, a na slikama 37 (a i b) su date pojedinačne mape proteina biomase sa ulja i 2,6-DTBP.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

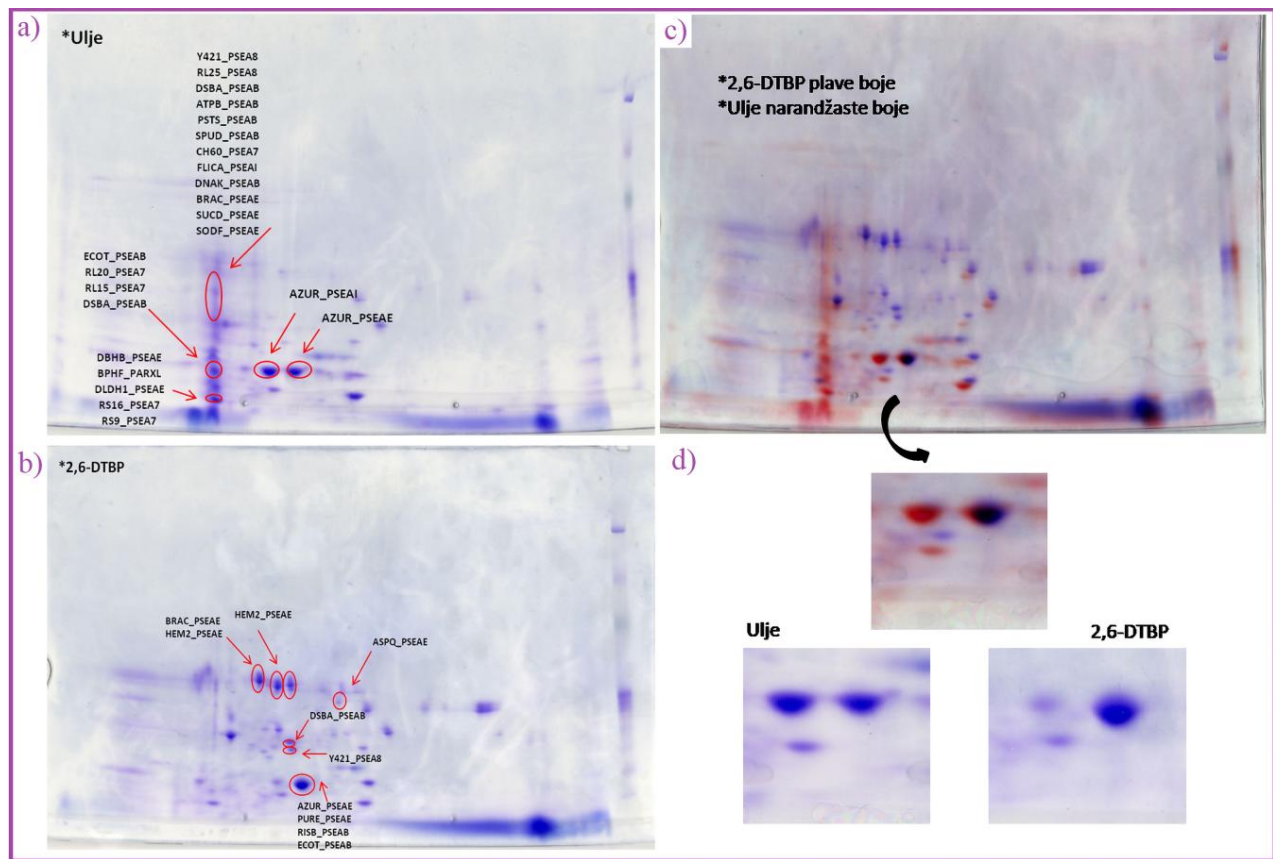
Proteini identifikovani u odabranim delovima su (tabela 12): azurin (AZUR_PSEAE), leucin-, izoleucin-, valin-, treonin-, i alanin-vezivni protein (BRAC_PSEAE), tiol:disulfid izmenjivi protein (DSBA_PSEAB), ekotin (ECOT_PSEAB), ribozomalni proteini u obe kulture; 6,7-dimetil-8-ribitulumazin sintaza (RISB_PSEAB), glutaminaza-asparaginaza (ASPQ_PSEAE), N5-karboksiaminoimidazol ribonukleotid mutaza (PURE_PSEAE), dehidrataza delta aminolevulinske kiseline (HEM2_PSEAE) u kulturi gajenoj na 2,6-DTBP; ATP sintaza podjedinica beta (ATPB_PSEAB), sukcinat-CoA ligaza (ADP-formiranje) podjedinica alfa (SUCD_PSEAE), dihidrolipoil dehidrogenaza (DLDH1_PSEAE), DNK-vezujući HU-beta protein (DBHB_PSEAE), A-tip flagelin (FLICA_PSEAI), superoksid dismutaza (Fe) (SODF_PSEAE), protein za vezivanje fosfora (PSTS_PSEAB) u kulturi gajenoj na suncokretovom ulju. Značajna razlika, koja je prikazana na slici 37d, odnosi se na azurin (AZUR_PSEAE) i prekursor azurina (AZUR_PSEAI), koji je identifikovan samo u kulturi koja je gajena na suncokretovom ulju.



Slika 36. 2D elektroforeza *P. aeruginosa* san ai nakon rasta na a) *n*-C₁₆, b) FLU, c) 2,6-DTBP i d) suncokretovom ulju.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić



Slika 37. Proteinske 2 D mape *P. aeruginosa* san ai nakon rasta na suncokretovom ulju (a) i 2,6-DTBP (b). Na slici su označeni analizirani delovi gelova.

Prikazane su razlike u profilu proteina (c) i sintezi prekursora azurina (d).

Tabela 12. Identifikovani proteini *P. aeruginosa* san ai nakon rasta na 2,6-DTBP i suncokretovom ulju i razdvajanja 2 D elektroforezom

| Identifikovani protein | Naziv | Mascot skor | Preklapanje peptida | Prekrivenost (%) | M* (kDa) | COG | I** |
|---|-------------|-------------|---------------------|------------------|----------|-----|-----|
| Azurin | AZUR_PSEAE | 665 | 9 | 58 | 16,0 | C | D/U |
| Azurin | AZUR_PSEAI | 696 | 12 | 76 | 13,9 | C | U |
| ATP sintaza podjedinica beta | ATPB_PSEAB | 119 | 5 | 13 | 49,5 | C | U |
| Sukcinat-CoA ligaza (ADP-formiranje) podjedinica alfa | SUCD_PSEAE | 45 | 1 | 4 | 30,2 | C | U |
| Dihidrolipoil dehidrogenaza | DLDH1_PSEAE | 81 | 1 | 2 | 48,6 | C | U |

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

| Nastavak tabele 12 | | | | | | | |
|---|-------------|-------------|---------------------|------------------|----------|-----|-----|
| Identifikovani protein | Naziv | Mascot skor | Preklapanje peptida | Prekrivenost (%) | M* (kDa) | COG | I** |
| Glutaminaza-asparaginaza | ASPQ_PSEAE | 166 | 4 | 13 | 38,6 | E | D |
| Periplazmični protein za vezivanje puterscina SpuD | SPUD_PSEAB | 67 | 1 | 2 | 40,6 | E | U |
| Leucin-, isoleucin-, valin-, treonin-, i alanin-vezivni protein | BRAC_PSEAE | 1273 | 18 | 48 | 39,7 | E | D/U |
| 6,7-Dimetil-8-ribitulumazin sintaza | RISB_PSEAB | 84 | 1 | 11 | 16,4 | H | D |
| Dehidrataza delta aminolevulinske kiseline | HEM2_PSEAE | 88 | 1 | 3 | 37,0 | H | D |
| 30S ribozomalni protein S16 | RS16_PSEA7 | 59 | 2 | 33 | 9,2 | J | U |
| 30S ribozomalni protein S9 | RS9_PSEA7 | 43 | 1 | 6 | 14,6 | J | U |
| 50S ribozomalni protein L15 | RL15_PSEA7 | 41 | 1 | 8 | 15,2 | J | U |
| 50S ribozomalni protein L20 | RL20_PSEA7 | 43 | 1 | 8 | 13,3 | J | U |
| 50S ribozomalni protein L25 | RL25_PSEA8 | 164 | 4 | 27 | 21,9 | J | U |
| DNK-vezujući HU-beta protein | DBHB_PSEAE | 122 | 2 | 33 | 9,1 | K | U |
| A-tip flagelin | FLICA_PSEAI | 67 | 4 | 16 | 40,0 | N | U |
| 60 kDa šaperon | CH60_PSEA7 | 67 | 2 | 3 | 57,0 | O | U |
| Tiol:disulfid izmenljivi protein DsbA | DSBA_PSEAB | 126 | 3 | 20 | 23,4 | O | D/U |
| Šaperon protein DnaK | DNAK_PSEAB | 62 | 2 | 3 | 68,4 | O | U |
| Superoksid dismutaza (Fe) | SODF_PSEAE | 49 | 2 | 13 | 21,3 | P | U |
| Protein za vezivanje fosfora PstS | PSTS_PSEAB | 96 | 2 | 8 | 34,5 | P | U |

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

| Nastavak tabele 12 | | | | | | | |
|--|------------|-------------|---------------------|------------------|----------|-----|-----|
| Identifikovani protein | Naziv | Mascot skor | Preklapanje peptida | Prekrivenost (%) | M* (kDa) | COG | I** |
| N5-karboksi-aminoimidazol ribonukleotid mutaza | PURE_PSEAE | 137 | 2 | 19 | 16,9 | R | D |
| Ekotin | ECOT_PSEAB | 82 | 2 | 13 | 17,3 | R | D/U |
| UPF0312 protein PLES_04211 | Y421_PSEA8 | 244 | 5 | 32 | 20,8 | S | D/U |

*M – Molekulska masa; **I – Identifikovani proteini u kulturi gajenoj na 2,6-DTBP (D), suncokretovom ulju (U) i u obe kulture (D/U); za oznake COG skraćenica videti legendu slike 31.

5.3.4.4. Degradacija 2,6-DTBP upotrebom sirovog enzimskog ekstrakta

Ispitivanje degradacije 2,6-DTBP pomoću sirovog enzimskog ekstrakta iz kulture *P. aeruginosa* san ai dobijene nakog gajenja na ovom supstratu pokazalo je da sirovi enzimski ekstrakt degraduje 98 % 2,6-DTBP, koncentracije 10 mg/L u toku četiri dana. Kadri et al. (2018) su u svojoj studiji primenili sličnu strategiju za ukljanjanje ugljovodonika pomoću sirovog enzimskog ekstrakta iz *Alcanivorax borkumensis* koji je pokazao visoku efikasnost za degradaciju ugljovodonika. Ovaj pristup je pokazao veću efikasnost sirovog enzimskog ekstrakta u bioremedijaciji aromatičnih zagađujućih supstanci u poređenju sa celom mikrobnom ćelijom. Najzad, rezultati ove studije potvrđuju da sirovi enzimi dobijeni iz *P. aeruginosa* san ai brzo i u kraćem vremenskom periodu (4 dana) sa skoro istom efikasnošću (98 %) degraduju 2,6-DTBP (koncentracija 10 mg/L), kao pri korišćenju celog mikroorganizma za biodegradaciju (7 dana, 100 %).

5.4. Degradacija individualnih *n*-alkana i PAH primenom *P. aeruginosa* san ai

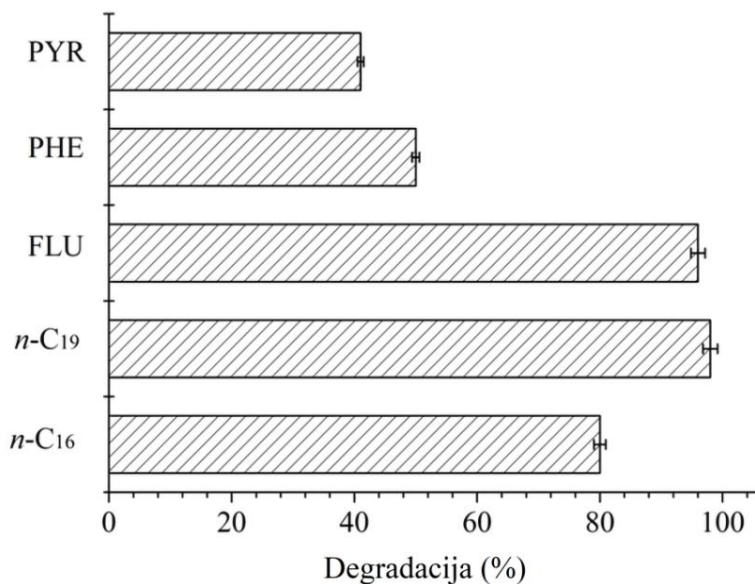
Na osnovu GC-MS analize ugljovodonika, *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE i PYR u kontroli i inokulisanim uzorcima utvrđeno je da procenat biodegradacije navedenih jedinjenja, koncentracije 20 mg/L, dostiže sledeće vrednosti: 80 %, 98 %, 96 %, 50 % i 41 %, za sedam dana. Kao što pokazuje slika 38 *P. aeruginosa* san ai ima veliki kapacitet za degradaciju *n*-alkana (*n*-C₁₆, *n*-C₁₉) i PAH-ova (FLU, PHE, PYR). PAH-ovi koji sadrže tri prstena (FLU, PHE) su efikasnije degradovani od PYR koji ima četiri prstena (slika 38), što je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima (Zhang et al., 2011). FLU, kao naftenoaromatični ugljovodonik koji sadrži aromatične i metilenske strukture, skoro je u potpunosti razgrađen. Sličan potencijal za degradaciju PAH-ova je nađen kod *Pseudomonas sp.* BZ-3 i *P. aeruginosa* DQ8 (Lin et al., 2014; Zhang et al., 2011), dok *P. aeruginosa* SJTD-1 efikasno mineralizuje srednje- i dugolančane *n*-alkane, preferirajući *n*-heksadekan (Liu et al., 2014). Sličan afinitet za srednjelančane alkane pronađen je kod *P. aeruginosa* B1 (Tao et al., 2012).

Rezultati dobijeni iz eksperimenta biodegradacije ugljovodonika su u skladu sa poznatom osobinom *P. aeruginosa* san ai da sintetiše biosurfaktante, tačnije ramnolipide (RL) i egzopolisaharide (EPS), čija je uloga emulgovanje ugljovodonika (Dimitrijević et al., 2011; Rikalović et al., 2013). Naime, tokom rasta *P. aeruginosa* san ai na PPAS podlozi sa sirovom naftom kao jedinim izvorom

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

ugljenika detektovana su oba biosurfaktanta. Vrednost za RL iznosi 37,4 mg/L, dok je vrednost za EPS 39,7 mg/L.



Slika 38. Procenti biodegradacije *n*-alkana (*n*-C₁₆, *n*-C₁₉) i PAH-ova (FLU, PHE, PYR), početne koncentracije 20 mg/L, pomoću *P. aeruginosa* san ai, tokom 7 dana. Na slici su prikazane srednje vrednosti rezultata dobijene iz tri ponovljena merenja.

5.4.1. Dinamika degradacije *n*-nonadekana i fluorena

Kako su *n*-C₁₉ i FLU skoro u potpunosti razgrađeni u toku 7 dana (98 % i 96 %, redom, slika 38) praćena je dinamika njihove degradacije prilikom rasta *P. aeruginosa* san ai na ovim jedinjenjima, koncentracije 20 mg/L, kao jedinom izvoru ugljenika (slika 39). Kao što se zapaža sa slike 39 degradacija oba ugljovodonika odgovara kinetici prvog reda. Izračunate su konstante biodegradacije pomoću jednačine:

$$\ln [A] = \ln [A_0] - kt,$$

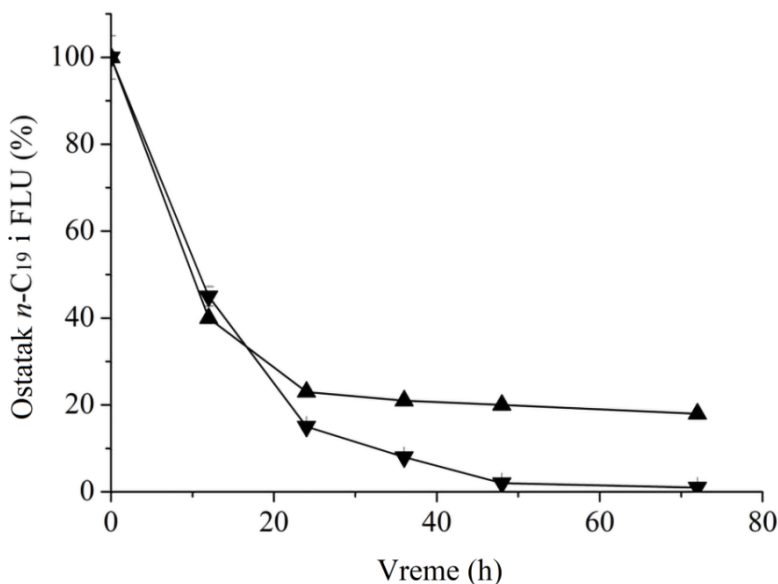
gde [A] predstavlja preostalu koncentraciju ugljovodonika (*n*-C₁₉ i FLU) u određenom vremenu, [A₀] početnu koncentraciju ugljovodonika, k konstantu brzine biodegradacije i t predstavlja vreme (dan). Konstante iznose 1,59 1/dan za *n*-C₁₉ i 0,51 1/dan za FLU. Konstanta brzine degradacije za *n*-C₁₉ *P. aeruginosa* san ai je veća od publikovane vrednosti za degradaciju *n*-C₂₆ (0,11 1/dan) pomoću *Pseudomonas* sp. BP10 (Jauhari et al., 2014), što ukazuje na lakšu degradaciju *n*-alkana kraćeg niza. Rezultat je u saglasnosti sa biodegradacijom u prirodnim uslovima gde i aerobne i anaerobne bakterije radije koriste *n*-alkane kraćeg nego dužeg niza (Peters et al., 2005). Pored toga, rezultati su pokazali da *P. aeruginosa* san ai ima bolji kapacitet za degradaciju PAH-ova (0,51 1/dan za FLU), nego *Pseudomonas* sp. BZ-3 (0,11 1/dan za PHE) (Lin et al., 2014).

Period poluživota je izračunat korišćenjem jednačine: $t_{1/2} = \ln 2/k$, i iznosio je 0,43 dana za *n*-C₁₉ i 1,36 dana za FLU. Viša konstanta brzine i niži period poluživota za *n*-C₁₉ ukazuje na lakšu biodegradaciju *n*-alkana nego PAH-ova. Kao što rezultati pokazuju, *P. aeruginosa* san ai je brzo uklonio oba ugljovodonika (*n*-C₁₉ i FLU, koncentracije 20 mg/L) iz podloge na kojoj je rastao.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

Rezultati jasno potvrđuju odličan potencijal *P. aeruginosa* san ai za aerobnu degradaciju *n*-alkana i PAH-ova. Grifoll i saradnici (1994) su u svojoj studiji pokazali intenzivnu upotrebu FLU u prva tri dana rasta *Pseudomonas* F274 i skoro potpunu degradaciju FLU, što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja.



Slika 39. Dinamika degradacije *n*-C₁₉ i FLU (C = 20 mg/L) primenom *P. aeruginosa* san ai.

Prikazane su preostale koncentracije (%) *n*-C₁₉ (-▼-) i FLU (-▲-) nakon degradacije.

Svaka tačka predstavlja srednju vrednost dobijenu iz tri ponovljena merenja. Neki eror barovi nisu vidljivi jer su kraći od veličine simbola.

U poređenju sa drugim bakterijama koje razgrađuju ugljovodonike, *P. aeruginosa* san ai ima dodatnu prednost jer ima mogućnost preživljavanja i rasta u ekstremnim okruženjima, na mestima koja su zagađena teškim metalima, kao i u izrazito alkalnoj sredini (Izrael-Živković et al., 2018; Karadzic et al., 2004). Teški metali (kadmijum, hrom, olovo, cink, a naročito nikel i vanadijum) prisutni su u sirovoj nafti, pa i u životnoj sredini prilikom njenog izlivanja. Takođe, otpadne vode iz naftnih postrojenja mogu biti alkalne (Censi et al., 2006). Stoga, pri zagađenju sirovom naftom i izlivanju otpadnih voda iz naftne industrije, alkalofilna, metalotolerantna, bakterija *P. aeruginosa* san ai koja razlaže ugljovodonike, može predstavljati idealan mikroorganizam za remedijaciju kontaminiranog lokaliteta.

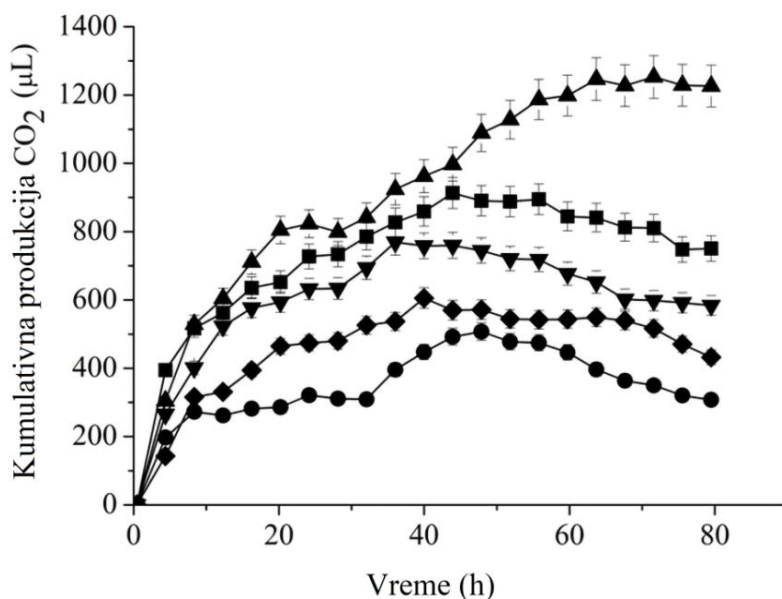
5.4.2. Respiratorna aktivnost

Respiracija je pokazatelj mikrobne aktivnosti, pri čemu različiti supstrati indukuju različite respiracije. Kumulativna produkcija ugljen-dioksida koja je praćena tokom ispitivanja biodegradacije odabranih *n*-alkana i PAH-ova prikazana je na slici 40. Svi supstrati uzrokovali su intenzivnu, ali različitu respiraciju, što ukazuje na aktivni metabolizam kulture tokom rasta na ovim jedinjenjima. Najintenzivnija respiracija u prisustvu ispitivanih jedinjenja odigrala se prvog dana sa kumulativnom produkcijom CO₂ (μL): za piren 280, *n*-C₁₆ 470, *n*-C₁₉ 630, fenantren 750 i fluoren 820. Kumulativna produkcija CO₂ dostigla je maksimum drugog dana, kada je i uklanjanje *n*-C₁₉ i FLU iz podloge bilo

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

najveće (slika 38). Međutim, stepen respiracije nije u potpunoj korelaciji sa procentima degradacije prikazanim na slici 38, što se može objasniti kao rezultat razlika u metabolizmu tokom biodegradacije *n*-alkana i PAH-ova. Kao ključni intermedijeri degradacije PAH-ova nastaju salicilna i ftalna kiselina. Ova jedinjenja se preko β -ketoacidne putanje transformišu u sukcinat (C4) i adipat (C6) koji kasnije ulaze u centralni metabolizam TCA (Sudarsan et al., 2016). S druge strane, degradacijom *n*-alkana nastaje acetat (C2), kao rezultat β -oksidacije, koji indukuje glioksilatni ciklus kao prečicu u TCA ciklusu kako bi se sprečili gubici energije u obliku ugljen-dioksida. Stoga, postoji razlika između TCA i glioksilatne putanje u odnosu ugljenika: $C_2 \rightarrow 2 C_1$ za TCA ciklus; $C_2 + C_2 \rightarrow C_4$ za glioksilatnu putanju (White, 2000).



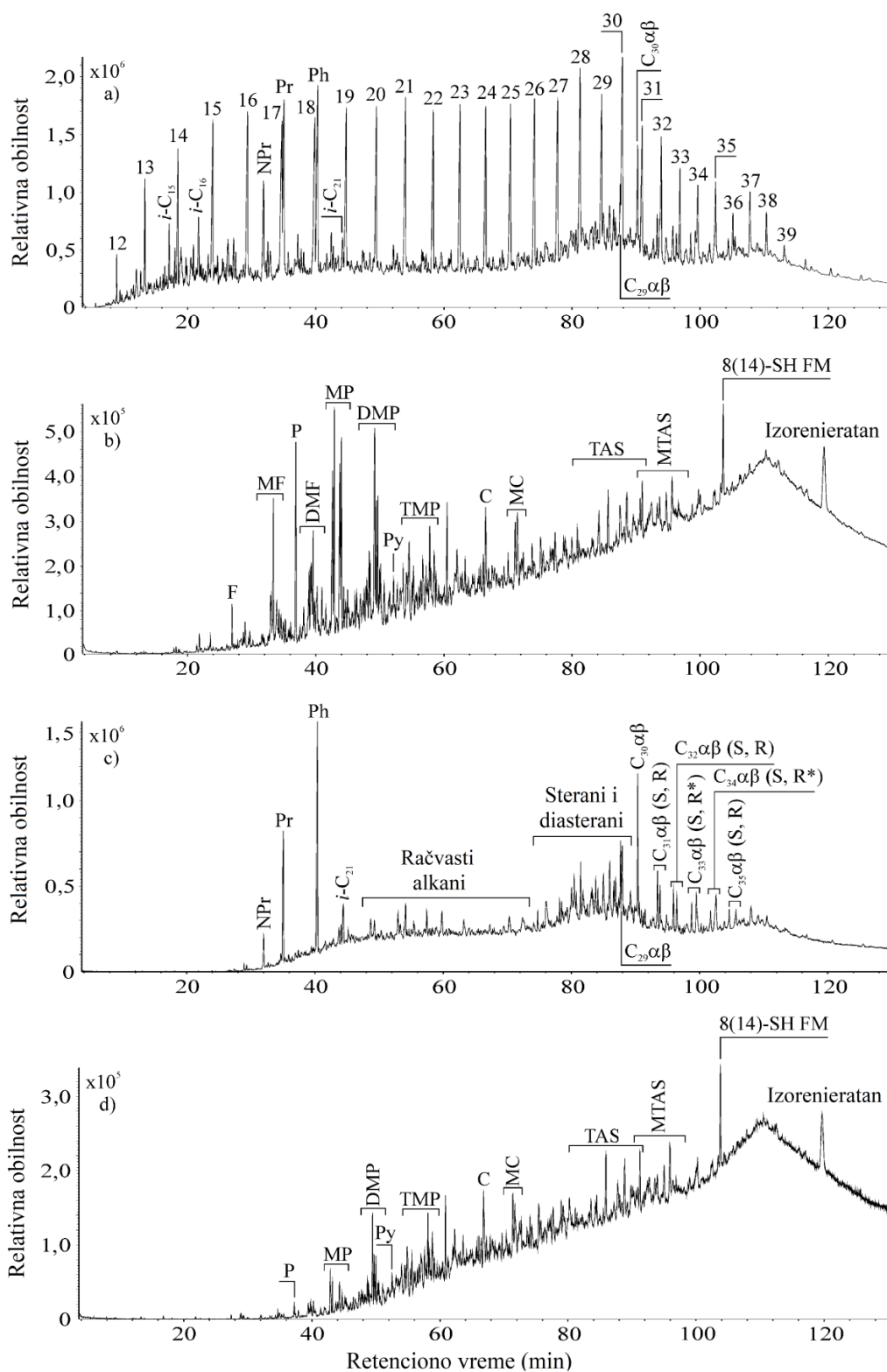
Slika 40. Kumulativna produkcija ugljen-dioksida prilikom rasta *P. aeruginosa* san ai na *n*-alkanima i PAH-ovima, koncentracije 20 mg/L (kontrola su oduzete). Prikazana je kumulativna produkcija CO₂ za: *n*-C₁₆ (-◆-), *n*-C₁₉ (-▼-), fluorene (-▲-), fenantren (-■-) i piren (-●-). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost dobijenu iz tri ponovljena merenja. Neki error barovi nisu vidljivi jer su kraći od veličine simbola.

5.5. Biodegradacija zasićene i aromatične frakcije sirove nafte primenom *P. aeruginosa* san ai

Da bi se ispitao potencijal *P. aeruginosa* san ai za degradaciju složenih smeša ugljovodonika izvedeni su eksperimenti na alifatičnoj i aromatičnoj frakciji nebiodegradovane, parafinske sirove nafte. Nafta, koja sadrži veliki broj različitih ugljovodonika je razdvojena na frakcije radi lakše i preciznije identifikacije jedinjenja. Bez razdvajanja bilo bi teško izvesti preciznu identifikaciju (naročito u TIC) zbog ko-eluiranja više jedinjenja u jednom GC-MS hromatografskom piknu. Pored toga, neka jedinjenja koja su prisutna u manjim količinama (posebno aromatični ugljovodonici) mogu biti prekrivena jedinjenjima koja su prisutna u većim koncentracijama u sirovoj nafti, kao što su *n*-alkani. Kao što se može videti na slici 41a,b i alifatična i aromatična frakcija ispitivane nafte sadrže brojne ugljovodonike različitih struktura.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić



Slika 41. Hromatogram ukupne jonske struje (*eng.*, Total Ion Current, TIC) kontrole (a, b) i inokulisanog uzorka (c, d) alifatične i aromatične frakcije sirove nafte.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

Legenda: *n*-Alkani su označeni prema broju atoma ugljenika; Pr – Pristan; Ph – Fitin; NPr – Norpristan; *i*-C₁₅ – C₁₅ regularni izoprenoid; *i*-C₁₆ – C₁₆ regularni izoprenoid; *i*-C₂₁ – C₂₁ regularni izoprenoid; C₂₉αβ – C₂₉17α(H)21β(H)-30-Norhopan; C₃₀αβ – C₃₀17α(H)21β(H)-Hopan; C₃₁αβ – C₃₁17α(H)21β(H)-Homohopan; C₃₂αβ – C₃₂17α(H)21β(H)-Bishomohopan; C₃₃αβ – C₃₃17α(H)21β(H)-Trishomohopan; C₃₄αβ – C₃₄17α(H)21β(H)-Tetrakishomohopan; C₃₅αβ – C₃₅17α(H)21β(H)-Pentakishomohopan; R i S označavaju konfiguraciju na C-22 u molekulu C₃₁-C₃₅ hopana; (S epimer eluira pre R epimera u odgovarajućim dubletima); * – Ko-eluiranje račvastih alkana; Termin račvasti alkani podrazumeva sve račvaste alkane koji sadrže jednu ili više alkil-grupa u bočnom nizu; F – Fluoren; MF – Metilfluoreni; P – Fenantren; MP – Metilfenantreni; DMP – Dimetilfenantreni; Py – Piren; TMP – Trimetilfenantreni; C – Hrizen; MC – Metilhrizeni; TAS – Triaromatični steroidi; MTAS – Metilovani triaromatični steroidi; 8(14)-SH FM – 8(14)-Sekohopanoid sa fluorenskim prstenom.

Masa alifatične frakcije u inokulisanom uzorku smanjena je za 45 %, dok je masa aromatične frakcije smanjena za 25 %. U kontrolnim uzorcima naftnih frakcija nije detektovana promena mase. Rezultati ukazuju na manju otpornost alifatičnih nego aromatičnih ugljovodonika na biodegradaciju, što je u skladu sa rezultatima eksperimenta biodegradacije sa pojedinačnim ugljovodonicima (slika 38), kao i biodegradacijom u prirodnim uslovima koja se odigrava u naftnim rezervoarima koji se nalaze na malim dubinama, obično ≤ 800 m, i gde temperatura ne prelazi 70 °C – 80 °C (Peters et al., 2005).

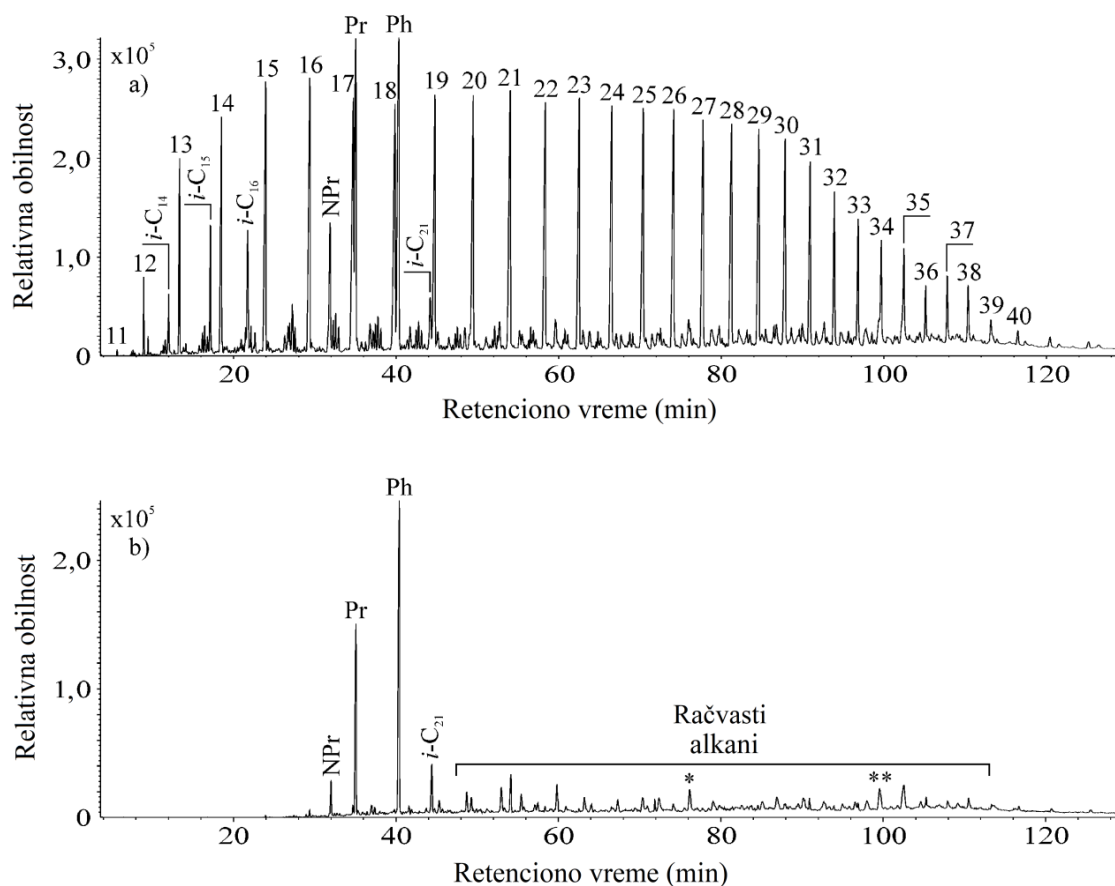
Poređenjem TIC alifatične frakcije kontrole i inokulisanog uzorka uočene su značajne razlike. U kontrolnom uzorku identifikovana je serija *n*-alkana u opsegu C₁₂ – C₃₉, dok je u inokulisanom uzorku, primenom *P. aeruginosa* san ai, serija *n*-alkana u potpunosti degradovana u toku 7 dana (slika 41a, c). Kao rezultat, nakon degradacije, u inokulisanom uzorku alifatične frakcije dominiraju izoprenoidi, hopani i sterani (slika 41c). Detaljnim ispitivanjem inokulisane alifatične frakcije korišćenjem *m/z* 71 (karakterističan fragmentogram jona za *n*-alkane) potvrđeno je potpuno odsustvo ovih ugljovodonika (slika 42). *n*-Alkoholi i masne kiseline kao mogući proizvodi degradacije *n*-alkana nisu detektovani u inokulisanim uzorcima, čak ni korišćenjem njihovih specifičnih jonskih fragmentograma, što ukazuje na moguću potpunu mineralizaciju *n*-alkana tokom rasta *P. aeruginosa* san ai na složenoj smeši ugljovodonika.

Poređenjem TIC aromatične frakcije kontrole i inokulisanog uzorka uočeno je da *P. aeruginosa* san ai tokom 7 dana u potpunosti degraduje fluoren i skoro sav fenantren (slika 41b, d). Ovim rezultatima je jasno potvrđen visok kapacitet *P. aeruginosa* san ai za degradaciju fluorena.

Sadržaj metil- i dimetil- derivata fluorena i fenantrena koji su dominirali u aromatičnoj frakciji kontrolnog uzorka je značajno smanjen u inokulisanom aromatičnoj frakciji sirove nafte, dok je sadržaj hrizena, metilhrizena, triaromatičnih steroida, 8(14)-sekohopanoida sa fluorenskim prstenom nepromenjen (slika 41b, d). Ovakav rezultat ne iznenađuje jer je poznato da npr. triaromatični steroidi predstavljaju jedinjenja koja su najotpornija na „napad“ mikroorganizama u naftnim bušotinama (Peters et al., 2005). Detaljnija analiza jonskih hromatograma derivata naftalena (*m/z* 142 + 156 + 170), fluorena (*m/z* 166 + 180 + 194) i fenantrena (*m/z* 178 + 192 + 206), kontrole i inokulisanog uzorka aromatične frakcije (slika 43) pokazuje da se otpornost aromatičnih ugljovodonika na biodegradaciju povećava sledećim redosledom: derivati naftalena < derivati fluorena < derivati fenantrena. Pored toga, može se izvesti zaključak da se otpornost aromatičnih ugljovodonika na biodegradaciju povećava sa stepenom metilovanja. Ova zapažanja su u skladu sa procesima koji se dešavaju u prirodnim naftnim bušotinama (George et al., 2002; Volkman et al., 1984), kao i prirodnom mikrobnom degradacijom ostataka nafte u životnoj sredini (Novaković et al., 2012).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić



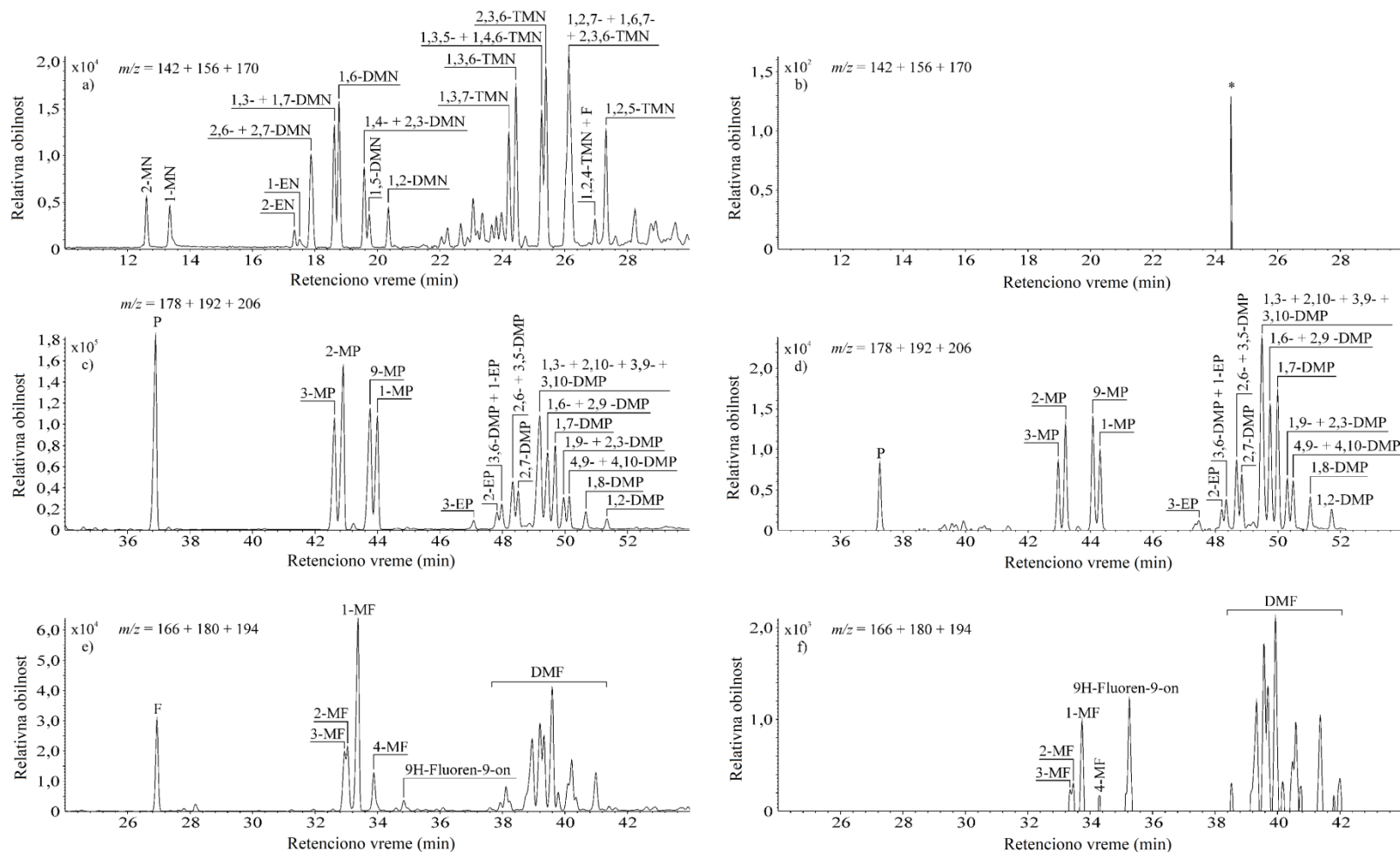
Slika 42. GC-MS jonski fragmentogram *n*-alkana (m/z 71) kontrole (a) i inokulisanog uzorka (b) alifatične frakcije sirove nafte.

Legenda: * – Ko-eluranje monoaromatičnih steroida sa aromatičnim prstenom C; ** – Ko-eluiranje C₃₄17 α (H)21 β (H)(22R)-tetrakishomohopana; Skraćenice ostalih jedinjenja date su u legendi slike 41.

Promene koje su detektovane u distribuciji alifatičnih i aromatičnih ugljovodonika u kontrolnim i inokulisanim uzorcima pokazuju da efikasnost razgradnje ugljovodonika korišćenjem *P. aeruginosa* san ai tokom 7 dana odgovara trećem do četvrtom stepenu biodegradacije na skali biodegradacije nafte (u naftnim rezervoarima), koja se kreće od 0 do 10 (0 podrazumeva da nema biodegradacije, dok maksimalna faza 10 podrazumeva uklanjanje gotovo svih ugljovodonika iz nafte, izuzev oleanana, gamacerana, diasterana, diahopana i aromatičnih steroida; Head et al., 2003; Peters et al., 2005; Wenger et al., 2002). Poređenja radi, isti stepen biodegradacije (3-4) u naftnim bušotinama postiže se nakon nekoliko stotina hiljada ili miliona godina (Stojanović et al., 2009; Šolević et al., 2008). Rezultati ove studije potvrđuju veliki kapacitet *P. aeruginosa* san ai za biodegradaciju kompleksnih smeša ugljovodonika, koja sledi proces biodegradacije u prirodnim geološkim uslovima.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić



Slika 43. GC-MS jonski fragmentogram metilovanih naftalena (m/z 142 + 156 + 170), fenantrena i njegovih metilovanih derivata (m/z 178 + 192 + 206), kao i fluorena i njegovih metilovanih derivata (m/z 166 + 180 + 194), kontrole (a, c, e) i inokulisanog uzorka (b, d, f) aromatične frakcije sirove nafte.

Legenda: MN – Metilnaftalen; DMN – Dimetilnaftalen; TMN; Trimetilnaftalen; EN – Etilnaftalen; EP – Etilfenantren; DMF – Dimetilfluoreni; * – Nečistoća; Skraćenice ostalih jedinjenja date su u legendi slike 41.

5.6. Genomska, enzimska i metabolomska analiza biodegradacije ugljovodonika pomoću *P. aeruginosa* san ai

Identifikovani geni *P. aeruginosa* san ai koji kodiraju proteine učesnike u katabolizmu alifatičnih i aromatičnih jedinjenja, potvrđuju potencijal ovog mikroorganizma za degradaciju oba tipa ugljovodonika (Izrael-Živković et al., 2019; Medić et al., 2019).

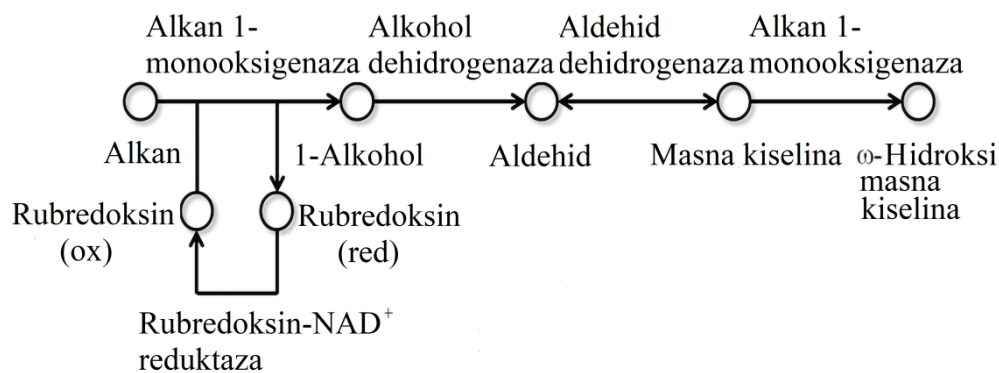
5.6.1. Degradacija *n*-heksadekana i *n*-nonadekana

Svi geni koji kodiraju proteine neophodne za degradaciju *n*-alkana: alkan monooksigenaza, rubredoksin, rubredoksin reduktaza, alkohol dehidrogenaza i aldehid dehidrogenaza pronađeni su u genomu *P. aeruginosa* san ai (tabela 13).

Tabela 13. Geni i odgovarajući proteini *P. aeruginosa* san ai uključeni u degradaciju *n*-alkana

| Geni | Protein |
|---------------|--|
| alkB1_2, alkM | Alkan 1-monooksigenaza |
| adh1 | Alkohol dehidrogenaza |
| aldh | Aldehid dehidrogenaza |
| rubB, alkT | Rubredoksin-NAD ⁺ reduktaza |

Na slici 44 je prikazana KEGG mapa degradacije *n*-alkana pomoću *P. aeruginosa* san ai.



Slika 44. KEGG mapa degradacije *n*-alkana pomoću *P. aeruginosa* san ai (na slici su označeni metaboliti i enzimi).

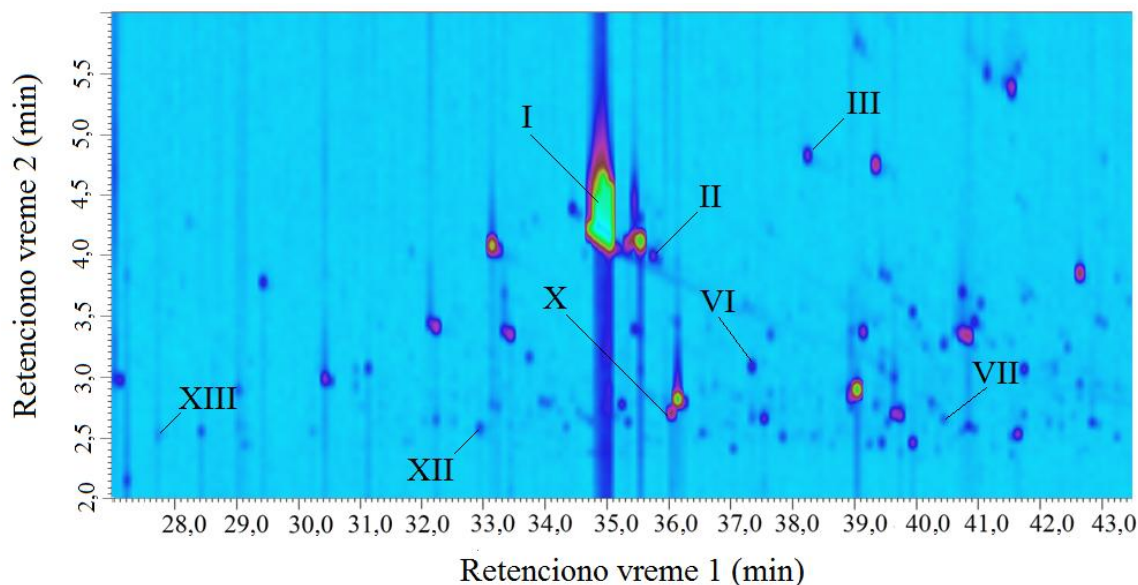
Pored biodegradacije *n*-alkana sa parnim brojem ugljenikovih atoma, *P. aeruginosa* san ai je pokazao sposobnost transformacije *n*-C₁₉ alkana sa neparnim brojem C-atoma. Ovo je prvi rezultat za *P. aeruginosa* koji pokazuje sposobnost za degradaciju *n*-alkana sa neparnim brojem C atoma.

P. aeruginosa san ai je efikasno uklonilo oba testirana *n*-alkana iz ispitivane podloge (slika 38). Na osnovu GC-MS analize identifikovani su sledeći *n*-C₁₆ metaboliti: 1-heksadekanol (Mw = 242, karakteristični fragmentacioni joni *m/z*: 55, 69, 83, 97, 111, 125) i *n*-heksadekanska kiselina (Mw = 256, karakteristični fragmentacioni joni *m/z*: 73, 60, 129, 213, 83, 97, 157, 171), koji

nedvosmisleno ukazuju da metabolička putanja razgradnje kod *P. aeruginosa* san ai podrazumeva terminalni put oksidacije *n*-alkana. Kao rezultat transformacije *n*-C₁₉ identifikovan je 1-nonadekanol (Mw = 284, karakteristični fragmentacioni joni *m/z*: 55, 69, 83, 97, 111, 125, 139). Dodatno, određena je specifična aktivnost alkan monooksigenaze/hidroksilaze, prvog aktivirajućeg enzima u metaboličkom putu *n*-alkana. Dobijene vrednosti, 0,234 U/mg za *n*-C₁₆ i 0,436 U/mg za *n*-C₁₉, pokazuju da se hidroksilacija odigrava na oba *n*-alkana, ali da je intenzivnija za *n*-C₁₉. Takođe, ispitana je aktivnost alkohol dehidrogenaze iz biomase *P. aeruginosa* san ai, dobijene nakon gajenja na *n*-C₁₆ i *n*-C₁₉, korišćenjem etanola, propanola i *izopropanola*, kao supstrata. Na osnovu dobijenih vrednosti specifične aktivnosti za etanol, propanol i *izopropanol* koje su iznosile redom: 0,281, 0,225 i 0,348 U/mg nakon gajenja na *n*-C₁₆ i 0,421, 0,251 i 0,204 U/mg nakon gajenja na *n*-C₁₉, potvrđena je izražena aktivnost alkohol dehidrogenaza. U skladu sa ovim rezultatima, u genomu *P. aeruginosa* san ai pronađeno je nekoliko gena koji kodiraju alkohol dehidrogenazu, uključujući enzim koji preferira propanol, za koji je poznato da ima široku specifičnost supstrata uključujući primarne i sekundarne alkohole (<https://www.brenda-enzymes>).

5.6.2. Degradacija fluorena

Ispitan je katabolički put razgradnje FLU kao najjednostavnijeg naftenoaromatičnog jedinjenja, koji ima strukturne sličnosti sa karbazolom, dibenzotiofenom, dibenzofuranom i dibenzodioxinom. Takođe, fluoren je važna komponenta fosilnih goriva i nalazi se na US EPA listi prioritarnih zagađujućih supstanci (*eng.*, United States Environmental Protection Agency Priority Pollutant List). U ovoj studiji, primenom GCxGC-MS analize identifikovano je sedam metabolita nastalih tokom degradacije fluorena korišćenjem *P. aeruginosa* san ai (slika 45; tabela 14).



Slika 45. Hromatogram ukupne jonske struje (*eng.*, Total Ion Current, TIC) fluorena i njegovih metabolita nakon 48 h degradacije (oznake jedinjenja su date u tabeli 14 i legendi slike 46).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

Tabela 14. GCxGC retenciona vremena i karakteristični fragmentacioni joni (m/z) fluorena i njegovih derivata koji su identifikovani u ovoj studiji

| Broj jedinjenja na slici 46 | Retenciono vreme (min) | m/z (relativna obilnost, %) | Identifikacija metabolita upotrebom NIST biblioteke | Vreme | | |
|-----------------------------|------------------------|---|---|-------|------|------|
| | | | | 18 h | 24 h | 48 h |
| I | 34,80 | 166 (100), 165 (81), 167 (24), 164 (17), 82 (16), 163 (13) | Fluoren | + | + | + |
| II | 35,70 | 182 (100), 181 (78), 166 (29), 165 (28), 183 (24), 152 (18) | 9H-Fluoren-9-ol | + | + | + |
| III | 38,20 | 180 (100), 152 (39), 181 (22), 151 (19), 76 (17), 150 (11), 153 (8) | 9H-Fluoren-9-on | + | + | + |
| VI | 37,30 | 147 (100), 73 (63), 148 (19), 295 (14), 149 (9) | 1,2-Benzen-dikarboksilnaiselina, bis(trimetilsilil) estar (Ftalna kiselina, di-TMS) | + | + | + |
| VII | 40,40 | 73 (100), 193 (85), 370 (23), 194 (18), 74 (13), 355 (13) | Benzoeva kiselina, 3,4-bis(trimetilsilil)oksi-trimetilsilil estar (Protokatehuinska kiselina, di-TMS) | - | - | + |
| X | 36,00 | 73 (100), 267 (95), 268 (24), 74 (15), 91 (9) | Salicilina kiselina (2TMS) | + | + | + |
| XII | 32,90 | 73 (100), 75 (38), 111 (33), 147 (25) | Adipinska kiselina (2TMS) | - | - | + |
| XIII | 27,70 | 147 (100), 73 (65), 148 (23), 75 (18) | Čilibarna kiselina (2TMS) | - | - | + |

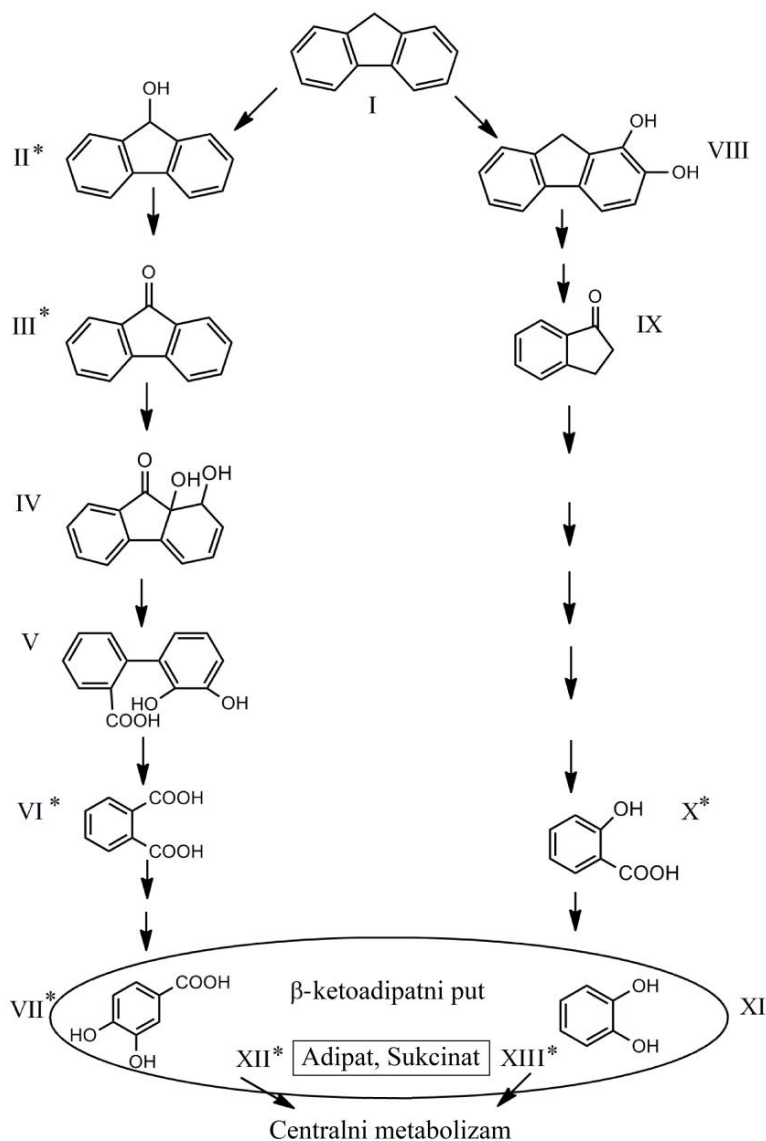
(+) – Identifikovano; (-) – Nije identifikovano.

Prisustvo 9H-fluoren-9-ola (II) i 9H-fluoren-9-ona (III) ukazuje da aktivacija prstena započinje monoooksigenacijom u položaju C-9, nakon čega dolazi do dehidratacije (slika 46). Visoke vrednosti specifične aktivnosti hidrosilaze za FLU, PHE i PYR koje redom iznose: 0,420, 1,286 i 0,846 U/mg, jasno pokazuju enzimsku aktivaciju prstena. Jedinjenja IV (1,1a-dihidroksi-1-hidro-9-fluorenol) i V (2'-karboksi-2,3-dihidroksibifenil) (Grifoll et al., 1994; Habe et al., 2004) nisu identifikovana u ovoj studiji, ali je detektovan krajni proizvod transformacije fluorena – ftalat (VI) (slika 46). Svi identifikovani metaboliti koji su prikazani na slici 46 podržavaju predloženi ftaladni put degradacije fluorena (Grifoll et al., 1994; Habe et al., 2004). U ovoj studiji takođe je detektovana i salicilna kiselina (X) (slika 46), što ukazuje na postojanje dodatnog puta degradacije koji započinje dioksigenacijom FLU (jedinjenje broj VIII) i dalje se vrši preko nekoliko derivata 1-indanona (jedinjenje broj IX; Grifoll et al., 1995). Odnos ftalne i salicilne kiseline u GCxGC-MS hromatogramima je 1:3, što ukazuje na povećanu akumulaciju salicilne kiseline, iako metaboliti salicilnog puta nisu identifikovani

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

posle 18 h mikrobnog rasta. U ranijim istraživanjima pokazano je da akumulacija intermedijera tokom rasta *Pseudomonas* na aromatičnim jedinjenjima zavisi i može biti ograničena aktivnošću određenih enzima β -ketoadipatnog puta (Sudarsan et al., 2016). Salicilat (X) prelazi u katehol (XI), dok ftalat (VI) prelazi u protokatehuat (VII), pri čemu oba procesa pripadaju β -ketoadipatnoj putanji (slika 46).



Slika 46. Pretpostavljeni metabolički put degradacije fluorena pomoću *P. aeruginosa* san ai.

Legenda: I – Fluoren; II – 9H-Fluoren-9-ol; III – 9H-Fluoren-9-on; IV – 1,1a-Dihidroksi-1-hidro-9-fluorenon; V – 2'-Karboksi-2,3-dihidroksibifenil; VI –Ftalna kiselina; VII – Protokatehuinska kiselina; VIII – 3,4-Fluoren-diol; IX – 1-Indanon; X – Salicilna kiselina; XI – Katehol. Jedinjenja označena zvezdicom (*) su detektovana u ovoj studiji.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

Zanimljivo je da su dosadašnja istraživanja pokazala da je formiranje katehola „usko grlo“ u β -ketoadipatnom putu (Sudarsan et al., 2016), što je u skladu sa povećanom količinom salicilne kiseline nađenom u ovoj studiji. Katehol i protokatehuat kao intermedijeri β -ketoadipatnog enol-laktone daju 3-oksoadipat i sukcinil koji ulaze u TCA ciklus (Nogales et al., 2017). Svi geni koji kodiraju proteine uključene u β -ketoadipatnu orto-degradaciju (catABC katehola i pcaBCDG protokatehuata) identifikovani su u genomu *P. aeruginosa* san ai (slika 30a; Medić et al., 2019). Iako se mislilo da ftalatni i salicilatni put ne mogu postojati istovremeno, nedavno istraživanje o degradaciji pirena pomoću *Mycobacterium sp.* WY10 nesumnjivo je pokazalo da oba puta istovremeno mogu imati ulogu u degradaciji (Sun et al., 2019). Takođe, Zhang et al. (2011) su na osnovu identifikovanih metabolita predložili dva puta degradacije FLU pomoću *P. aeruginosa* DQ8, iako glavni metaboliti – ftalat i salicilat u toj studiji nisu detektovani. Identifikacija adipata (XII) i sukcinata (XIII), kao proizvoda β -ketoadipatnog puta, potvrđuje kataboličku degradaciju FLU prikazanu na slici 46. Na osnovu ovih rezultata može se izvesti zaključak da postoje dva puta degradacije FLU korišćenjem *P. aeruginosa* san ai, ftalatni i salicilatni.

Kako KEGG ne daje detaljnu sliku degradacije PAH, u smislu proteina-enzima uključenih u proces, urađena je pretraga proteina iz *P. aeruginosa* uključenih u degradaciju FLU preko ftalata, koji su homologni proteinima iz *Terrabacter sp.* DBF63 (Habe et al., 2004), pomoću blustp suite (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Kao što tabela 15 pokazuje, nađeni su sledeći homologni proteini: DbfA (fluoren 9-monooksigenaza; 9-fluorenol 4,4a-dioksigenaza) za reakciju I \rightarrow II i III \rightarrow IV, FlnB (9-fluorenol dehidrogenaza) za reakciju II \rightarrow III i FlnE (2-hidroksi-6-okso-6-(2'-karboksifenil)-heksa-2,4-dienoat hidrolaza) za transformaciju V \rightarrow VI.

Tabela 15. Analiza homolognih proteina koji su uključeni u biodegradaciju FLU u ftalat

| Proteini <i>Terrabacter sp.</i> DBF63 uključeni u biodegradaciju FLU / Accession | Homologni proteini <i>P. aeruginosa</i> / Accession | Broj aminokiselina | Podudarnost (%) |
|---|---|--------------------|-----------------|
| DbfA, Angularna dioksigenaza, velika podjedinica / Q93UV3 | Dioksigenaza, velika podjedinica / AGG56547.1 | 443/267 | 41 |
| FlnB, 9-Fluorenol dehidrogenaza / Q93UV4 | SDR grupa oksidoreduktaza / WP_134300711 | 357/266 | 36 |
| FlnE, 2-hidroksi-6-okso-6-(2'-karboksifenil)-heksa-2,4-dienoat hidrolaza / Q83ZF0 | Alfa/beta hidrolaza / WP_148113522 | 328/182 | 35 |
| FlnD, 2'-karboksi-2,3-dihidroksibifenil 1,2-dioksigenaza / Q83ZE9 | Ekstradiol dioksigenaza za cepanje prstena / WP_049955909 | 298/282 | 34 |
| FlnC, Dehidrogenaza/reduktaza kratkog lanca / Q83ZE7 | SDR grupa oksidoreduktaza / WP_009685945 | 252/253 | 48 |

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ana B. Medić

Identifikovani metaboliti, II, III i VI su u skladu sa KEEG mapom degradacije FLU, ukazujući da je transformacija katalizovana setom enzima prikazanih u tabeli 16 koji su uključeni u fitalatni put degradacije. Pored toga, identifikovani salicilat (XI) nedvosmisleno potvrđuje postojanje salicilatnog puta (slika 46).

Kada se salicilat pojavljuje kao intermedijer u β -ketoacidnom putu, preko katehola, aktivnost katehol dioksigenaze mora biti izražena. Da bi se ispitala ova tvrdnja, aktivnost katehol dioksigenaze iz biomase dobijene nakon gajenja *P. aeruginosa* san ai na FLU, PHE i PYR je merena korišćenjem katehola i nekoliko aromatičnih jedinjenja kao supstrata. Rezultati ove analize (tabela 16) pokazuju da je preferentna putanja, *orto*-razgradnja za sva ispitivana jedinjenja. Najzad, *orto*-degradacija katehola koja je potvrđena upotrebom sirovih ezimskih ekstrakata dobijenih iz biomasa *P. aeruginosa* san ai koja je gajena na navedenim PAH-ovima, ukazuje da bi svi ispitivani PAH-ovi mogli biti transformisani preko *orto*-putanje istim enzimima, dajući *cis*, *cis*-mukonsku kiselinu kao proizvod degradacije.

Tabela 16. Aktivnost katehol dioksigenaza *P. aeruginosa* san ai

| Izvor ugljenika | Supstrat | Aktivnost katehol dioksigenaza (U/mg) | |
|-----------------|----------|---------------------------------------|--------------------------|
| | | Katehol 1,2-dioksigenaza | Katehol 2,3-dioksigenaza |
| FLU | FLU | 0,275 | 0,039 |
| | Katehol | 0,150 | 0,001 |
| PHE | PHE | 0,285 | 0,010 |
| | Katehol | 0,274 | <0,001 |
| PYR | PYR | 0,151 | <0,001 |
| | Katehol | 0,371 | <0,001 |

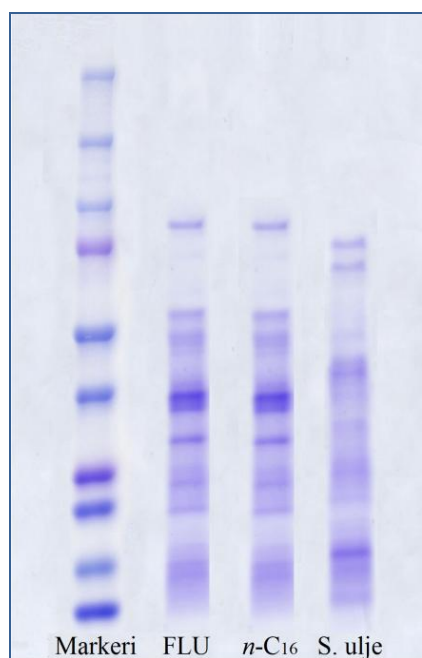
Istraživanja su pokazala da prilikom izlaganja mikroorganizma toksičnoj supstanci, kao što su derivati fenola, dolazi do efikasne odbrane ćelije od reaktivnih kiseoničnih vrsta (poglavlje 5.3.4.2). Takođe, enzimski antioksidanti koji su zaduženi za neutralizaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng.*, Reactive Oxygen Species, ROS) korišćeni su kao biomarkeri u ekotoksikološkim studijama za ispitivanje uticaja PAH-ova na životnu sredinu (Hook et al., 2014). Korišćenjem enzimskih testova za superoksid dismutazu i katalazu, kao predstavnika proteina koji učestvuju u neutralizaciji ROS, dokazano je povećanje specifičnih aktivnosti ovih enzima u *P. aeruginosa* san ai prilikom rasta na ugljovodonicima u poređenju sa suncokretovim uljem, što potvrđuje pojačan oksidativni stres izazvan ugljovodonicima (tabela 17).

Tabela 17. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) *P. aeruginosa* san ai koja je gajena na različitim izvorima ugljenika

| Izvor ugljenika | Enzimska aktivnost | |
|---------------------------|--------------------|------------|
| | SOD (U/mg) | CAT (U/mg) |
| <i>n</i> -C ₁₆ | 30,70 | 1,70 |
| FLU | 21,10 | 0,80 |
| Suncokretovo ulje | 9,51 | 0,40 |

5.6.3. SDS-PAGE profil *P. aeruginosa* san ai nakon rasta na *n*-alkanu i PAH

Na slici 47 je prikazan SDS-PAGE profil biomase *P. aeruginosa* san ai gajene na *n*-alkanu (*n*-C₁₆), PAH (FLU) i suncokretovom ulju. Poređenjem profila proteina kulture koja je gajena na suncokretovom ulju, kao dobro ispitanom izvoru ugljenika, i kultura gajenih na ugljovodicima uočavaju se značajne razlike. U eksperimentu biodegradacije 2,6-DTBP, kao model aromatičnog jedinjenja fenolne strukture, detaljno je analiziran proteom kulture nakon izlaganja ovom jedinjenju u poređenju sa suncokretovim uljem. Pronađeni su enzimi β -ketoacidnog puta (slika 30a), koji su dokazali specifičnu metaboličku adaptaciju *P. aeruginosa* san ai na fenolni derivat, kao i njegovu *orto*-razgradnju. Kako su profili proteina svih ispitanih jedinjenja veoma slični (slike 37 i 47) može se pretpostaviti da je u biodegradaciju *n*-alkana i PAH-ova uključena ista mašinerija enzima kao i kod aromatičnog jedinjenja 2,6-DTBP, što je u saglasnosti sa svim dobijenim rezultatima.



Slika 47. SDS-PAGE elektroforeza *P. aeruginosa* san ai nakon rasta na *n*-C₁₆, FLU i suncokretovom ulju (S. ulje).

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Ana B. Medić

U okviru ove studije ispitivana je biodegradacija toksičnih supstanci: 2,6-DTBP, *n*-C₁₆, *n*-C₁₉, FLU, PHE, PYR i frakcija nafte, kao složenih ugljovodoničnih smeša, pomoću poliektremofilne bakterije *P. aeruginosa* san ai. Saglasno postavljenim ciljevima, odabrani su uslovi za biodegradaciju navedenih supstanci: optimalna podloga, pH, temperatura, veličina poseva. Procenat biodegradacije pojedinačnih jedinjenja i proizvodi transformacije određeni su primenom GC-MS i GCxGC-MS. Kombinacijom analize genoma i proteoma detaljno su proučeni mehanizmi njihove biodegradacije.

Na osnovu rezultata doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

- ❖ Hidrofobnost ćelije *P. aeruginosa* san ai, koja je iznosila 29 %, potvrdila je potencijal ovog soja za degradaciju organskih jedinjenja.
- ❖ *P. aeruginosa* san ai je pokazao najbolji rast na MSM podlozi i iz tog razloga je ova podloga odabrana kao optimalna za izvođenje eksperimenata.
- ❖ *P. aeruginosa* san ai je degradovao 2,6-DTBP pri različitim koncentracijama: 2, 10, 100 i 400 mg/L sa sledećom efikasnošću: 100 %, 100 %, 85 % i 18 %, redom, što ukazuje na dobar potencijal soja, ne samo da preživi već i da uspešno degraduje ovo fenolno jedinjenje iz kontaminiranog područja.
- ❖ Koncentracija od 100 mg/L 2,6-DTBP je izabrana kao optimalna za dalja ispitivanja uticaja pH, temperature i veličine poseva.
- ❖ Budući da je *P. aeruginosa* san ai efikasno degradovao 2,6-DTBP koncentracije 100 mg/L u toku 7 dana, što je znatno više od rastvorljivosti ovog jedinjenja u vodi (4,0 mg/L), može se zaključiti da bi 2,6-DTBP mogao biti u potpunosti uklonjen iz kontaminiranih voda pomoću *P. aeruginosa* san ai.
- ❖ Prilikom biotransformacije 2,6-DTBP, najveće ispitivane koncentracije od 400 mg/L, identifikovani su toksični intermedijeri, 2,6-di-*terc*-butil-1,4-benzohinon i 3,3',5,5'-tetra-*terc*-butil-4,4'-difenohinon, koje *P. aeruginosa* san ai može da redukuje pomoću enzima NAD(P)H-hinon oksidoreduktaze u derivate hidrohina, čija je toksičnost veoma niska.
- ❖ *P. aeruginosa* san ai uspešno degraduje 100 mg/L 2,6-DTBP u širokom opsegu pH (5 – 8) i temperature (22 – 43 °C). Maksimalna degradacija je postignuta pri pH 8,0 i na temperaturi od 37 °C.
- ❖ Praćenjem produkcije ugljen-dioksida *P. aeruginosa* san ai tokom rasta na 2,6-DTBP, koncentracije 4 mg/L, pokazano je da je za 10 sati više od 90 % 2,6-DTBP razgrađeno, dok je nakon 20 sati, 2,6-DTBP u potpunosti degradovan.
- ❖ Sirovi enzimski preparat dobijen iz *P. aeruginosa* san ai je efikasnije i u kraćem vremenskom roku degradovao 2,6-DTBP u poređenju sa mikoorganizmom.
- ❖ Analizom genoma *P. aeruginosa* san ai, pomoću KEGG utvrđeno je prisustvo gena koji kodiraju proteine učesnike u katabolizmu aromatičnih jedinjenja.
- ❖ Komparativna proteomska analiza *P. aeruginosa* san ai pokazala je da se molekularni odgovor ćelije na zagađujuću supstancu može opisati kroz povećanu sintezu proteina

6. ZAKLJUČCI

Ana B. Medić

odgovornih za transport aminokiselina sa naglašenim metabolizmom glutamata, i produkciju energije kroz povećanu sintezu enzima glioksilatne putanje.

- ❖ Kombinacija genomske, proteomske analize i enzimskih testova je jasno potvrdila potencijal *P. aeruginosa* san ai za degradaciju aromatičnih jedinjenja, uključujući i 2,6-DTBP, putem *orto*- razgradnje.
- ❖ Uticaj plastike, a posebno mikroplastike na žive sisteme u vodenoj sredini postaje sve veći problem na planeti Zemlji, a 2,6-di-*terc*-butil fenol, kao plastični aditiv, smatra se ozbiljnom pretnjom za vodene organizme. Rezultati ove disertacije nedvosmisleno pokazuju da se *P. aeruginosa* san ai uspešno može koristiti za degradaciju ovog fenolnog kontaminanta.
- ❖ GC-MS analiza potvrdila je veliki kapacitet *P. aeruginosa* san ai za degradaciju *n*-alkana (*n*-C₁₆, *n*-C₁₉) i PAH-ova (FLU, PHE, PYR). Postignuta je sledeća efikasnost degradacije: 80 %, 98 %, 96 %, 50 % i 41 %, redom, za sedam dana.
- ❖ Rezultati respiratorne analize pokazali su da svi ispitivani ugljovodonični supstrati izazivaju intenzivnu, ali različitu respiraciju što potvrđuje aktivni metabolizam kulture tokom rasta na ovim jedinjenjima.
- ❖ *P. aeruginosa* san ai uspešno degraduje alifatičnu i aromatičnu frakciju nafte u toku sedam dana.
- ❖ Pored parnih *n*-alkana *P. aeruginosa* san ai degraduje i *n*-alkane sa neparnim brojem ugljenikovih atoma.
- ❖ Identifikovani metaboliti degradacije *n*-C₁₆ i *n*-C₁₉ (za period od sedam dana): 1-heksadekanol, 1-nonadekanol i *n*-heksadekanska kiselina pokazuju da metabolička putanja razgradnje kod *P. aeruginosa* san ai podrazumeva terminalni put oksidacije *n*-alkana.
- ❖ Identifikovani metaboliti degradacije fluorena (posle 48 h) pokazuju da se razgradnja ovog jedinjenja odigrava kroz dva puta: ftalatni i salicilatni.
- ❖ Alkalofilna, metalotolerantna bakterija *P. aeruginosa* san ai pokazala je visok kapacitet za razgradnju *n*-alkana i PAH-ova, uključujući složene ugljovodonične smeše (frakcije nafte), pa se može smatrati veoma značajnom za bioremedijaciju lokaliteta zagađenih naftnim polutantima, uključujući i ekstremne sredine. Takođe, može se koristiti kao biomarker za prepoznavanje ranog zagađenja životne sredine.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M. (2016) A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25, 107-123.
- Ajithkumar, B., Ajithkumar, V., Iriye, R. (2003) Degradation of 4-amyphenol and 4-hexylphenol by a new activated sludge isolate of *Pseudomonas veronii* and proposal for a new subspecies status. *Research in Microbiology*, 154, 17-23.
- Ali, H.R., Ismail, D.A., El-Gendy, N.S. (2014) The biotreatment of oil-polluted seawater by biosurfactant producer halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* AspH2. *Energy Sources Part A Recovery Utilization and Environmental Effects*, 36, 1429-1436.
- Arora, P.K., Srivastava, A., Singh, V.P. (2010) Application of monooxygenases in dehalogenation, desulphurization, denitrification and hydroxylation of aromatic compounds. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 1, 112.
- Arutchelvan, A., Kanakasabai, V., Nagarajan, S., Muralikrishnan, V. (2005) Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 27, 238-243.
- Avramović, N., Nikolić-Mandić, S., Karadžić, I. (2013) Influence of rhamnolipids, produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM(P), B001380 on their Cr(VI) removal capacity in liquid medium. *Journal of the Serbian Chemistry Society*, 78, 639-652.
- Badejo, A.C., Choi, C.W., Badejo, A.O., Shin, K.H., Hyun J.H., Lee, Y.G. (2013) A global proteome study of *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK grown on pyrene and glucose reveals the activation of glyoxylate, shikimate and gluconeogenic pathways through the central carbon metabolism highway. *Biodegradation*, 24, 741-752.
- Basha, K.M., Rajendran, A., Thangavelu, V. (2010) Recent advances in the biodegradation of phenol: A review. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1, 219-234.
- Beškoski, V., Gojgić-Cvijović, G., Milić, J., Ilić, M., Miletić, S., Šolević, T., Vrvic, M. (2011) Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) - A field experiment. *Chemosphere*, 83, 34-40.
- Bladwin, M. (2004) Protein identification by mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3, 1-9.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Briganti, F., Pessione, E., Giunta, C., Scozzafava, A. (1997) Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. *FEBS Letters*, 416, 61-64.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Brininger, C., Spradlin, S., Cobani, L., Evilia, C. (2018) The more adaptive to change, the more likely you are to survive: Protein adaptation in extremophiles. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 84, 158-169.
- Brzeszcz, J., Kaszycki, P. (2018) Aerobic bacteria degrading both *n*-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. *Biodegradation*, 29, 359-407.
- Bushnell, L.D., Haas, H.F. (1941) The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41, 653-673.
- Catalog Plastic Additive Standards Guide, New Haven, USA, 2018.
- Censi, P., Spoto, S. E., Saiano, F., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., Ottonello, D. (2006) Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. *Chemosphere*, 64, 1167-1176.
- Cerniglia, C.E. (1993) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology*, 4, 331-338.
- Chaerun, S.K., Tazaki, K., Asada, R., Kogure, K. (2004) Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, 30, 911-922.
- Chandrasekaran, E.V., BeMiller, J.N. (1980) Constituent analyses of glycosaminoglycans. In: Methods in carbohydrate chemistry, Whistler, R.L., Wolfrom, M.L. (eds.), Academic Press, New York, USA, Vol 3, pp. 89-96.
- Chauhan, A., Jain, R.K. (2010) Biodegradation: gaining insight through proteomics. *Biodegradation*, 21, 861-879.
- Chebbi, A., Hentati, D., Zaghden, H., Baccar, N., Rezgui, F., Chalbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M. (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 122, 128-140.
- Chellaiah, E.R. (2018) Cadmium (heavy metal) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Applied Water Science*, 8, 154.
- Chen, I.A., Chu, K., Palaniappan, K., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Huntemann, M., Varghese, N., White, J.R., Seshadri, R., Smirnova, T., Kirton, E., Jungbluth, S.P., Woyke, T., Eloë-Fadrosch, E.A., Ivanova, N.N., Kyrpides, N.C. (2019) IMG/M v.5.0: an integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Research*, 47, D666-D677.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S. (2001) Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*, 52, 189-203.
- Chowdhury, A.R., Datta, R., Sarkar, D. (2018) Heavy metal pollution and remediation. In: *Green Chemistry: An Inclusive Approach*, Török, B., Dransfield, T. (eds.), Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, pp. 359-373.
- Conti, M.E. (2008) Biomarkers for environmental monitoring - WIT Press. *WIT Transactions on State of the Art in Science and Engineering*, 30.
- Couto, R., Toca Herrera, J.L. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, 24, 500-513.
- Das, D., Baruah, R., Roy, A.S., Singh, A.K., Boruah, H.P.D., Kalita, J., Bora, T.C. (2015) Complete genome sequence analysis of *Pseudomonas aeruginosa* N002 reveals its genetic adaptation for crude oil degradation. *Genomics*, 105, 182-190.
- Denome, S.A., Stanley, D.C., Olson, E.S., Young, K.D. (1993) Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *Journal of Bacteriology*, 175, 6890-6901.
- Dimitrijević, A., Veličković, D., Rikalović, M., Avramović, N., Milosavić N., Jankov R., Karadžić, I. (2011) Simultaneous production of exopolysaccharide and lipase from extremophilic *Pseudomonas aeruginosa* san-ai strain: a novel approach for lipase immobilization and purification. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1397-1401.
- Dong, W., He, C., Li, Y., Huang, C., Chen, F., Ma, Y. (2017) Complete genome sequence of a versatile hydrocarbon degrader, *Pseudomonas aeruginosa* DN1 isolated from petroleum-contaminated soil. *Gene Reports*, 7, 123-126.
- Drakou, F., Koutinas, M., Pantelides, I., Vyrides, I. (2015) Insights into the metabolic basis of the halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain LVD-10 during toluene biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 99, 85-94.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Eaton, R. Chapman, P. (1992) Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *Journal of Bacteriology*, 174, 7542-7554.
- Elasri, M.O., Miller, R.V. (1999) Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2025-2031.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D., Schobert, M. (2004) Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of Bacteriology*, 186, 4596-604.
- Farrell, A., Quilty, B. (2002) The enhancement of 2-chlorophenol degradation by a mixed microbial community when augmented with *Pseudomonas putida* CP1. *Water Research*, 36, 2443-2450.
- Feisti, C.F., Hegeman, G.D. (1969) Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: Regulation of tangential pathways. *Journal of Bacteriology*, 100, 869-877.
- Freitag, D., Ballhorn, L., Geyer, H., Korte, F. (1985) Environmental hazard profile of organic chemicals: An experimental method for the assessment of the behaviour of organic chemicals in the ecosphere by means of simple laboratory tests with ¹⁴C labelled chemicals. *Chemosphere*, 14, 1589-1616.
- Fuenmayor, S.L., Wild, M., Boyes, A.L., Williams, P.A. (1998) A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas sp.* strain U2. *Journal of Bacteriology*, 180, 2522-2530.
- George, S.C., Boreham, C.J., Minifie, S.A., Teerman, S.C. (2002) The effect of minor to moderate biodegradation on C-5 to C-9 hydrocarbons in crude oils. *Organic Geochemistry*, 33, 1293-1317.
- Ghiglione, J-F., Martin-Laurent, F., Pesce, S. (2016) Microbial ecotoxicology: an emerging discipline facing contemporary environmental threats. *Environment Science and Pollution Research*, 23, 3981-3983.
- Ghosal, D, Ghosh, S, Dutta, T.K, Ahn, Y. (2016) Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1369.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M. (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3, 1-25.
- Gojgić-Cvijović, G., Vrvic, M. (2003) Praktikum za mikrobiološku hemiju. Centar za hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd.
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J. (2019) Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *Journal of Proteomics*, 198, 66-77.
- Goyal, A.K., Zylstra, G.J. (1996) Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 230-236.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Grifoll, M., Selifonov, S.A., Chapman, P.J. (1994) Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2438-2449.
- Grifoll, M., Selifonov, S.A., Gatlin, C.V., Chapman, P.J. (1995) Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 3711-3723.
- Gunther, N.W., Nunez, A., Fett, W., Solaiman, D.K.Y. (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2288-2293.
- Gurujeyalakshmi, G., Oriol, P. (1988) Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 500-502.
- Habe, H., Chung, J.S., Kato, H., Ayabe, Y., Kasuga, K., Yoshida, T., Nojiri, H., Yamane, H., Omori, T. (2004) Characterization of the upper pathway genes for fluorene metabolism in *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Journal of Bacteriology*, 186, 5938-5944.
- Haigler, B.E., Pettigrew, C.A., Spain, J.C. (1992). Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2237-2244.
- Hansen, P.D. (2008) Biosensors and eco-toxicology. *Engineering in Life Sciences*, 8, 26-31.
- Hansen, P.D., Usedom, A. (1997) New biosensors for environmental analysis. In: *Frontiers in biosensorics II: practical applications*, Scheller, F.W., Schubert, F., Fedrowitz, J. (eds.), Birkhäuser Basel, Basel, Switzerland, pp. 109-120.
- Harayama, S., Kok, M., Neidle, E.L. (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology*, 46, 565-601.
- Harwood, C.S., Parales, R.E. (1996) The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology*, 50, 553-590.
- Hazrat, A., Ezzat, K., Ikram, I. (2019) Review Article Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, Article ID 6730305.
- He, C., Li, Y., Huang, C., Chen, F., Ma, Y. (2018) Genome sequence and metabolic analysis of a fluoranthene-degrading strain *Pseudomonas aeruginosa* DN1. *Frontiers Microbiology*, 9, 2595.
- Head, I.M., Jones, D.M., Larter, S. (2003) Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*, 426, 344-352.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Held, M., Suske, W., Schmid, A., Engesser, K.H., Kohler, H.P.E., Witholta, B., Wubbolts, M. (1998) Preparative scale production of 3-substituted catechols using a novel monooxygenase from *Pseudomonas azelaica* HBP 1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5, 87-93.
- Heyd, M., Kohnert, A., Tan, T.H., Nusser, M., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., Franzreb, M., Berensmeier, S. (2008) Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1579-1590.
- Hoefer (1994) Protein electrophoresis applications guide. Hoefer Scientific Instruments, USA.
- Hook, S., Gallagher, E., Batley, G. (2014) The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10, 327-341.
- Izrael-Živković, L., Beškoski, V., Rikalović, M., Kazazić, S., Shapiro, N., Woyke T., Gojgić-Cvijović, G., Vrvic, M., Maksimović, N., Karadžić, I. (2019) High-quality draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* san ai, an environmental isolate resistant to heavy metals. *Extremophiles*, 23, 399-405.
- Izrael-Živković, L., Rikalović, M., Gojgić-Cvijović, G., Kazazić, S., Vrvic, M., Brčeski, V., Lončarević, B., Gopčević, K., Karadžić, I. (2018) Cadmium specific proteomic responses of a highly resistant *Pseudomonas aeruginosa* san ai. *RSC Advances*, 8, 10549-10560.
- Jauhari, N., Mishra, S., Kumari, B., Singh, S.N. (2014) Bacteria-mediated aerobic degradation of hexacosane in vitro conditions. *Bioresource Technology*, 170, 62-68.
- Jeong, J.J., Kim, J.H., Kim, C., Hwang, I., Lee, K. (2013) 3- and 4-Alkylphenol degradation pathway in *Pseudomonas* sp. strain KL28: genetic organization of lap gene cluster and substrate specificities of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase. *Microbiology*, 149, 3265-3277.
- Jouanneau, Y., Micoud, J., Meyer, C. (2007) Purification and characterization of a three-component salicylate 1-hydroxylase from *Sphingomonas* sp. strain CHY-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7515-7521.
- Jovančićević, B. (1998) Praktikum organske geohemije sa hemijom goriva. Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Kadam, T.A., Rupa, L., Balhal, D.K., Totewad, N.D., Gyananath, G. (2009) Determination of the degree of hydrophobicity - A technique to assess bacterial colonization on leaf surface and root region of lotus plant. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 23, 135-139.
- Kadri, T., Magdouli, S., Rouissi, T., Kaur Brar, S. (2018) Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 279-287.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Kafel, A., Gospodarek, J., Zawisza-Raszka, A., Rozpedek, K., Szulinka, E. (2012) Effects of petroleum products polluted soil on ground beetle *Harpalus rufipes*. *Ecological Chemistry and Engineering A*, 19, 731-740.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., Tanabe, M. (2019) New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 47, D590-D595.
- Karadzic, I., Masui, A., Fujiwara, N. (2004) Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* growth in cutting oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 145-152.
- Karadžić, I., Masui, A., Izrael-Živković, L., Fujiwara, N. (2006) Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as metal working fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102, 82-89.
- Karadžić, I., Maupin-Furlow, J. (2005) Improvement of two-dimensional gel electrophoresis proteome maps of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *Proteomics*, 5, 354-359.
- Karadžić, I., Rikalović, M., Izrael-Živković, L., Medić, A. (2020) *Pseudomonas aeruginosa* extremophilic isolates as biomarkers of heavy metal and organic pollution and their potential for application in contemporary ecotoxicology. In: Unique ecosystems - amazing microbes, series extreme environments, Panday, A. (ed.), CRC Press (Taylor & Francis group) - u štampi.
- Kargi, F., Eker, S. (2004) Kinetics of 2,4-dichlorophenol degradation by *Pseudomonas putida* CP1 in batch culture. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55, 25-28.
- Karigar, C.S., Rao, S.S. (2011) Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Research*, Article ID 805187.
- Kim, S.J., Kweon, O., Jones, R.C., Edmondson, R.D., Cerniglia, C.E. (2008) Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation*, 19, 859-881.
- Kohler, H.P., Maarel, M., Kohler-Staub, D. (1993) Selection of *Pseudomonas sp.* strain HBP1 Prp for metabolism of 2-propylphenol and elucidation of the degradative pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 860-866.
- Kumar, A., Kumar, S. (2005) Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*, 22, 151-159.
- Krastanov, A., Alexieva, Z., Yemendzhiev, H. (2013) Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Engineering in Life Sciences*, 13, 76-87.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Kurbatov, L., Albrecht, D., Herrmann, H., Petruschka, L. (2006) Analysis of the proteome of *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different sources of carbon and energy. *Environmental Microbiology*, 8, 466-478.
- Kwon, K.H., Yeom, S.H. (2009) Optimal microbial adaptation routes for the rapid degradation of high concentration of phenol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32, 435-442.
- Leonard, D., Lindely, N.D. (1998) Growth of *Ralstoni eutropha* on inhibitory concentrations of phenol-diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylase activity. *Enzyme Microbiology Technology*, 25, 271-277.
- Li, F., Song, W., Wei, J., Liu, C., Yu, C. (2016) Comparative proteomic analysis of phenol degradation process by *Arthrobacter*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 110, 189-198.
- Lin, M., Hu, X., Chen, W., Wang, H., Wang, C. (2014) Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 94, 176-181.
- Liu, H., Xu, J., Liang, R., Liu, J. (2014) Characterization of the medium- and long-chain *n*-alkanes degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes. *PLoS ONE*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105506>.
- Loh, K., Chua, S. (2002) *Ortho* pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of *meta* pathway at high substrate concentrations. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 620-626.
- Mahiudddin, Md., Fakhruddin, A.N.M., Mahin, A.A. (2012) Degradation of phenol *via meta* cleavage pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1. *ISRN Microbiology*, Article ID 741820.
- Mancini, S., Abicht, H.K., Gonskikh, Y., Solioz, M. (2015) A copper-induced quinone degradation pathway provides protection against combined copper/quinone stress in *Lactococcus lactis* IL1403. *Molecular Microbiology*, 95, 645-659.
- Mao, H., Cremer, P.S., Manson, M.D. (2003) A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis, *PNAS*, 100, (9) 5449-5454.
- Margesin, R., Schinner, F. (2001) Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 650-663.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40, 339-346.
- Massard-Guilbaud, G., Mathis, C.F. (2017) A brief introduction to the history of pollution: from local to global. In: *Microbial Ecotoxicology*, Cravo-Laureau, C., Cagnon, C., Lauga, B., Duran, R. (eds.), Springer International Publishing AG, pp. 3-15.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura S.I., Lee, Y. (2005) Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339, 69-72.
- Medić, A., Stojanović, K., Izrael-Živković, L., Beškoski, V., Lončarević, B., Kazazić, S., Karadžić, I. (2019) A comprehensive study of conditions of the biodegradation of a plastic additive 2,6-di-*tert*-butylphenol and proteomic changes in the degrader *Pseudomonas aeruginosa* s.n. *RSC Advances*, 9, 23696-23710.
- Mehetre, G., Dastager S., Dharne, M. (2019) Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. *Science of the Total Environment*, 679, 52-60.
- Molin, G., Ternstrom, A. (1986) Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water, and soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36, 257-274.
- Moradali, M.F., Ghods, S., Rehm, B.H.A. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, article 39.
- Moreno, R., Rojo, F. (2019) Enzymes for aerobic degradation of alkanes in bacteria. In: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids, Rojo, F. (ed.), Springer International Publishing, pp. 117-142.
- Mukherjee, S., Stamatis, D., Bertsch, J., Ovchinnikova, G., Katta, H.Y., Mojica, A., Chen, I.A., Kyrpides, N.C., Reddy, T. (2019) Genomes OnLine database (GOLD) v.7: updates and new features. *Nucleic Acids Research*, 47, D649-D659.
- Nogales, J., García, J.L., Díaz, E. (2017) Degradation of aromatic compounds in *Pseudomonas*: A systems biology view. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids, Rojo, F. (ed.), Springer, Cham, pp. 1-49.
- Novaković, M., Ali Ramadan, M.M., Šolević Knudsen, T., Antić, M., Beškoski, V., Gojgić-Cvijović, G., Vrić, M., Jovančičević, B. (2012) Degradation of methyl-phenanthrene isomers during bioremediation of soil contaminated by residual fuel oil. *Environmental Chemistry Letters*, 10, 287-294.
- OECD/SIDS (1994) Screening Information Data Set (SIDS) of OECD High Production. Volume Chemicals Programme, 1994.
- Ornston, L.N. (1966) The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. II. Enzymes of the protocatechuate pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 3787-3794.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Paller, G., Hommel, R.K., Kleber, H.P. (1995) Phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250. *Journal of Basic Microbiology*, 35, 325-335.
- Panke, S., Witholt, B., Schmid, A., Wubbolts, M.G. (1998) Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas sp.* strain VLB120. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2032-2043.
- Parales, R., Harwood, S. (2002) Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Current Opinion Microbiology*, 5, 266-273.
- Pasumarthi, R., Chandrasekaran, S., Mutnuri, S. (2013) Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. *Marine Pollution Bulletin*, 76, 276-282.
- Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G. (2013) Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 263-269.
- Perfumo, A., Banat, I.M., Canganella, F., Marchant, R. (2006) Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 132.
- Peters, K.E., Walters, C.C., Moldowan, J.M. (2005) *The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Petroleum Exploration and Earth history*, Vol. 2. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Philp, R.P. (1985) *Fossil Fuel Biomarkers, Applications and Spectra*. Elsevier, New York, USA.
- Pointing, S.B. (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 20-33.
- Preston, S., Coad, N., Townend, J., Killham, K., Paton, G.I. (2000) Biosensing the acute toxicity of metal interactions: are they additive, synergistic, or antagonistic? *Environment Toxicology and Chemistry*, 19, 775-780.
- Radke, M. (1987) Organic geochemistry of aromatic hydrocarbons. In: *Advances in Petroleum Geochemistry*, Radke, M. (ed.), Academic Press, London, UK, pp.141-205.
- Radke, M. (1988) Application of aromatic compounds as maturity indicators in source rocks and crude oils. *Marine and Petroleum Geology*, 5, 224-236.
- Raja, E.C., Anbazhagan, K., Selvam, G.S. (2006) Isolation and characterization of a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 577-585.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Resnick, S.M., Gibson, D.T. (1996) Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4073-4080.
- Richardson, S.D. (2001) Mass spectrometry in environmental sciences. *Chemical Reviews*, 101, 211-225.
- Rikalović, M., Abdel-Mawgoud, A.M., Déziel, E., Gojgić-Cvijović, G., Nestorović, Z., Vrvic M., Karadžić, I. (2013) Comparative analysis of rhamnolipids from novel environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Surfactants and Detergents*, 16, 673-682.
- Rikalović, M., Vrvic, M., Karadžić, I. (2014) Bioremediation by rhamnolipids produced by environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Bioremediation Processes, Challenges and Future Prospects, Velazquez-Fernandez, J.B., Muniz-Hernandez, S. (eds.), Nova Science Publishers, New York, USA, pp. 299-333.
- Roland, F.B., Irwin, W.S. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195,133-140.
- Romanov, V., Hausinger, R.P. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* 142 uses a three-component ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase for metabolism of 2,4-dichloro- and 2-chlorobenzoate. *Journal of Bacteriology*, 176, 3368-3374.
- Roma-Rodrigues, C., Santos, P.M., Benndorf, D., Rapp, E., Sá-Correia, I. (2010) Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome. *Journal of Proteomics*, 73, 1461-1478.
- Romero, M.C., Cazau, S., Giorgieri, Arambarri, A.M. (1998) Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollution*, 101, 355-359.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9, 29-33.
- Salam, S.B. (2016) Metabolism of waste engine oil by *Pseudomonas* species. *3 Biotech*, 6, 98.
- Sala-Trepat, J.M., Evans, W.C. (1971) The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species 4-oxalocrotonate pathway. *European Journal of Biochemistry*, 20, 400-413.
- Santos, M.P., Benndorf, D., Sá-Correia I. (2004) Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics*, 4, 2640-2652.
- Sasaki, M., Maki, J., Oshiman, K., Matsumura, Y., Tsuchido, T. (2005) Biodegradation of bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Biodegradation*, 16, 449-459.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Seo, J.S., Keum, Y.S., Li, Q.X. (2009) Bacterial degradation of aromatic compounds. *The International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6, 278-309.
- Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Khudur, L.S., Taha, M., Bal, A.S. (2017) From microbial ecology to microbial ecotoxicology. In: *Microbial Ecotoxicology*, Cravo-Laureau, C., Cagnon, C., Lauga, B., Duran, R. (eds.), Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, pp. 17- 40.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. (1967) *Spectrometric identification of organic compounds*, Second Edition. John Wiley & Son, Hoboken, USA.
- Simon, M.J., Osslund, T.D., Saunders, R., Ensley, B.D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W.C., Cruder, D.L., Gibson, D.T., Zylstra, G.J. (1993) Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, 127, 31-37.
- Simpson, R. (2002) *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, pp. 15- 50.
- Smith, M., Yager, J., Steinmetz, K., Eastmond, D. (1989) Peroxidase-dependent metabolism of benzene's phenolic metabolites and its potential role in benzene toxicity and carcinogenicity. *Environmental Health Perspectives*, 82, 23-29.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C. (2010) Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nature Reviews Endocrinology*, 6, 363-370.
- Sridevi, V., Chandana Lakshmi, M.V.V., Manasa, M., Sravani, M. (2012) Metabolic pathways for the biodegradation of phenol. *IJESAT*, 3, 695-705.
- Stojanović, K. (2017) *Geohemija nafte i gasa*. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd.
- Stojanović, K., Jovančičević, B., Šajnović, A., Sabo, T., Vitorović, D., Schwarzbauer, J., Golovko, A. (2009) Pyrolysis and Pt(IV)- and Ru(III)-ion catalyzed pyrolysis of asphaltenes in organic geochemical investigation of a biodegraded crude oil (Gaj, Serbia). *Fuel*, 88, 287-296.
- Sudarsan, S., Blank, L.M., Dietrich, A., Vielhauer, O., Takors, R., Schmid, A., Reuss, M. (2016) Dynamic of benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Metabolic Engineering Communications*, 3, 97-110.
- Sudip, S.K., Singh, O.V., Jain, R.K. (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20, 243-248.
- Sun, M., Zigman, S. (1987) An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autooxidation. *Analytical Biochemistry*, 90, 81-89.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Sun, S., Wang, H., Chen, Y., Lou, J., Wua, L., Xu, J. (2019) Salicylate and phthalate pathways contributed differently on phenanthrene and pyrene degradations in *Mycobacterium sp.* WY10. *Journal of Hazardous Materials*, 364, 509-518.
- Sütterlin, H., Alexy, R., Kümmerer, K. (2008) The toxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride alone and in mixtures with other anionic compounds to bacteria in test systems with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida*. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 71, 498-505.
- Šolević, T. (2004) Promene zagađivača naftnog tipa u aluvijalnim podzemnim vodama izazvane dejstvom mikroorganizama. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet.
- Šolević, T., Stojanović, K., Bojesen-Koefoed, J., Nytoft, H.P., Jovančićević, B., Vitorović, D. (2008) Origin of oils in the Velebit oil-gas field, SE Pannonian Basin, Serbia - source rocks characterization based on biological marker distributions. *Organic Geochemistry* 39, 118-134.
- Tada, Y., Ihmori, M., Yamaguchi, A. (1995) Oligotrophic bacteria isolated from clinical materials. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 493-494.
- Takeo, M., Prabu, SK., Kitamura, C., Hirai, M., Takahashi, H., Kato, D., Negoro, S. (2006) Characterization of alkylphenol degradation gene cluster in *Pseudomonas putida* MT4 and evidence of oxidation of alkylphenols and alkylcatechols with medium-length alkyl chain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102, 352-361.
- Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., Wang, Y.W., Fukuda, M., Kiyohara, H. (1999) Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 721-731.
- Tao, L., Hua, W.F., Ping, G.L., Liang, L.X., Jin, Y.X., Jun, L.A. (2012) Biodegradation of *n*-hexadecane by bacterial strains B1 and B2 isolated from petroleum contaminated soil. *Chemistry*, 55, 1968-1975.
- Tao, X., Lu, G., Liu, J., Li, T., Yang, L. (2009) Rapid degradation of phenanthrene by using *Sphingomonas sp.* GY2B immobilized in calcium alginate gel beads. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6, 2470-2480.
- Teitzel, G.M., Parsek, M.R. (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2313-2320.
- Thompson, L.A., Darwish, W.S. (2019) Environmental chemical contaminants in food: Review of a global problem. *Hindawi Journal of Toxicology*, Article ID 2345283.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Toyama, T., Maeda, N., Murashita, M., Chang, Y., Kikuchi, S. (2010) Isolation and characterization of a novel 2-sec-butylphenol-degrading bacterium *Pseudomonas sp.* strain MS-1. *Biodegradation*, 21, 157-165.
- Trevors, J.T., Basaraba, J. (1980) Toxicity of benzoquinone and hydroquinone in short-term bacterial bioassays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 25, 672-675.
- Tribedi, P., Sil, A.K. (2013) Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by *Pseudomonas sp.* AKS2. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 295-303.
- Tsirogianni, I., Aivaliotis, M., Karas, M., Tsiotis, G. (2004) Mass spectrometric mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil pseudomonad. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1700, 117-123.
- Tuan, N.N., Hsieh, H.C., Lin Y.W., Huang, S.L. (2011) Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresource Technology*, 102, 4232-4240.
- Unell, M., Abraham, P.E., Shah, M., Zhang, B., Rückert, C., VerBerkmoes, N.C., Janson, J.K. (2009) Impact of phenolic substrate and growth temperature on the *Arthrobacter chlorophenolicus* proteome. *Journal of Proteome Research*, 8, 1953-1964.
- Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T., Eltis, L.D. (2006) The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 241-267.
- van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Rothlisberger, M., Witholt, B. (2001) Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology*, 147, 1621-1630.
- Vandera, E., Samiotaki, M., Parapouli, M., Panayotou, G., Koukkou, A.I. (2015) Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 on phenanthrene, phthalate and glucose. *Journal of Proteomics*, 113, 73-89.
- Varjani, S., Upasani, V.N. (2019) Evaluation of rhamnolipid production by a halotolerant novel strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresources Technology*, 288, 121577.
- Verhoef, S., Ballerstedt, H., Volkers, R.J., de Winde, J.H., Ruijssenaars, H.J. (2010) Comparative transcriptomics and proteomics of *p*-hydroxybenzoate producing *Pseudomonas putida* S12: novel responses and implications for strain improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 679-690.
- Vidali, M. (2001) Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1163-1172.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Vitorović, D., Jovančićević, B. (2005) Osnovi organske geohemije za studente Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Hemisjki fakultet Univerziteta u Beogradu, ŠKR Veličković, Beograd.
- Volkman, J.K., Alexander, R., Kagi, R.I., Rowland, S.J., Sheppard, P.N. (1984) Biodegradation of aromatic hydrocarbons in crude oils from the Barrow Sub-basin of Western Australia. *Organic Geochemistry*, 6, 619-632.
- Walker, J.D. (1988) Effects of chemicals on microorganisms. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 60, 1106-11212.
- Walker, J.D. (1996) Testing decisions of the TSCA Interagency Testing Committee for chemicals on the Canadian Environmental Protection Act domestic substances list and priority substances list: Di-tert-butylphenol, ethyl benzene, brominated flame retardants, phthalate esters, chloroparaffins, chlorinated benzenes and anilines, Environmental toxicity and risk assessment. ASTM, Philadelphia, USA.
- Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P.J., Goddard, W.A., Tang, Y. (2007) Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and Bioengineering*, 98, 842-853.
- Wang, Z., Fingas, M.F. (2003) Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 47, 423-452.
- Wells, T., Ragauskas, J. (2012) Biotechnological opportunities with the β -ketoadipate pathway. *Trends in Biotechnology*, 30, 627-637.
- Wenger, L.M., Davis, C.L., Isaksen, G.H. (2002) Multiple controls on petroleum biodegradation and impact in oil quality. *SPE Reservoir Evaluation & Engineering*, 5, 375-383.
- White, D. (2000) The Physiology and Biochemistry of Procarotes, Second Edition. Oxford University Press, New York, USA.
- Xia, W., Du, Z., Cui, O., Dong, H., Wang, F., He, P., Tang, Y.C. (2014) Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas sp.* WJ6 with biodegradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 276, 489-498.
- Yamina, B., Tahar, B., Lila, M., Hocine, H., Laure, F.M. (2014) Study on cadmium resistant-bacteria isolated from hospital wastewaters. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 718-726.
- Zeyer, J., Kocher, H.P. (1988) Purification and characterization of a bacterial nitrophenol oxygenase which converts *ortho*-nitrophenol to catechol and nitrite. *Journal of Bacteriology*, 170, 1789-1794.

7. LITERATURA

Ana B. Medić

- Zhang, C., Zeng, G., Yuan, L., Yu, J., Li, J., Huang, G., Xi, B., Liu, H. (2007) Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. *Chemosphere*, 68, 181-190.
- Zhang, Y., Fang, Z., Xu, D., Xiao, Y., Zhao, J., Qiang, Z. (2005) Degradation of 2,6-di-*tert*-butylphenol by an isolated high-efficiency bacterium strain. *Journal of Environmental Sciences*, 17, 271-275.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., Xu, P. (2011) Degradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, 102, 4111-4116.

Web reference:

- Integrated Microbial Genomes (IMG): <https://img.jgi.doe.gov/> (poslednji put pristupljeno sajtu 22. 05. 2020).
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG): <https://www.genome.jp/kegg/> (poslednji put pristupljeno sajtu 22. 05. 2020).
- Standard Protein BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (poslednji put pristupljeno sajtu 22. 05. 2020).
- The Comprehensive Enzyme Information System: <https://www.brenda-enzymes> (poslednji put pristupljeno sajtu 22. 05. 2020).

BIOGRAFIJA

Ana B. Medić je rođena 13.06.1989. u Beogradu, gde je završila Osnovnu školu i Zemunsku gimnaziju. Osnovne akademske studije, studijski program „Hemija životne sredine“ na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisala je 2008. godine i diplomirala 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,77 i ocenom 10 na odbrani završnog rada. Master akademske studije na smeru „Diplomirani hemičar – master“ na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2012. i završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i ocenom 10 na odbrani master rada. Doktorske akademske studije, studijskog programa „Hemija“, na Katedri za primenjenu hemiju, upisala je 2013. godine na istom fakultetu i položila sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10,0.

Bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (stipendija za studente doktorskih akademskih studija) 2014. godine, dok se nije zaposlila na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu u zvanju asistenta gde i sada radi. Dobitnik je stipendije namenjene mladim istraživačima, 2018. godine, FEBS Junior Travel Fellowship. Od 2018. godine, uključena je na projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Geohemijska ispitivanja sedimenata – fosilna goriva i zagađivači životne sredine“, OI 176006.

Objavila je dva rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), nekoliko saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima i održala predavanje na IV Simpozijumu srpskog udruženja za proteomiku-SePA pod naslovom „Proteom *Pseudomonas aeruginosa* san ai pri biodegradaciji 2,6-di-*terc*-butilfenola“. Takođe, koautor je jednog poglavlja u knjizi. Član je Biohemijskog društva Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Ana B. Medić

Broj indeksa DH 18/2013

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Biodegradacija *n*-alkana, policikličnih aromatičnih ugljovodonika i fenola
korišćenjem soja *Pseudomonas aeruginosa* san ai

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 25. maja 2020. godine

Potpis autora

A. Meguš

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
dokorskog rada**

Ime i prezime autora Ana B. Medić
Broj indeksa DH 18/2013
Studijski program Doktor hemijskih nauka
Naslov rada Biodegradacija *n*-alkana, policikličnih aromatičnih ugljovodonika i fenola
korišćenjem soja *Pseudomonas aeruginosa* san ai
Mentori Dr Ksenija Stojanović, Dr Ivanka Karadžić

Izjavljujem da je štampana verzija mog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, 25. maja 2020. godine

A. Medić

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Biodegradacija *n*-alkana, policikličnih aromatičnih ugljovodonika i fenola
korišćenjem soja *Pseudomonas aeruginosa* san ai

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- ③ Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

U Beogradu, 25. maja 2020. godine

Potpis autora


A. Medić

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.