



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD
STUDIJSKI PROGRAM · BIOTEHNOLOGIJA
NAUČNA OBLAST · TEHNOLOŠKO INŽENJERSTVO

Denitrifikator *Pseudomonas stutzeri* – izolovanje, optimizacija bioprocenih parametara i primena

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
prof. dr Siniša Markov

Kandidat:
Ana Vidaković, mast. inž. tehnol.

Novi Sad · 2019

ZAHVALNICA

Sadržaj

Spisak oznaka, skraćenica i simbola	vi
Spisak tabela	vii
Spisak slika	viii
1. UVOD	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	3
3. PREGLED LITERATURE	5
3.1. Azot	6
3.2. Ciklus kruženja azota u prirodi.....	6
3.2.1. Reaktivni azot.....	7
3.2.2. Posledice povećane količine reaktivnog azota u prirodi	9
3.2.3. Procesi azotnog ciklusa	10
3.2.3.1. Azotofiksacija i amonifikacija.....	11
3.2.3.2. Nitrifikacija	13
3.2.3.3. Denitrifikacija	15
3.3. Aerobna denitrifikacija.....	17
3.3.1. Enzimska i genetička priroda denitrifikacije	17
3.3.2. Faktori koji utiču na proces denitrifikacije.....	19
3.3.3. Model mikroorganizam aerobne denitrifikacije – <i>Pseudomonas stutzeri</i>	22
3.3.4. Odabrane metode identifikacije denitrifikatora.....	25
3.3.5. Primena aerobne denitrifikacije	28
3.4. Biotehnološka proizvodnja biomase.....	32
3.4.1. Definisanje sastava hranljive podloge	33
3.4.2. Izbor procesnih parametara od značaja	35
3.4.3. Proizvodnja biomase u uvećanim razmerama.....	36
3.4.4. Modelovanje i optimizacija biotehnoloških procesa	36
3.4.4.1. Postupak odzivne površine	37
3.4.4.2. Izbor eksperimentalnog dizajna.....	38
4. MATERIJAL I METODE	40
4.1. Izolovanje, selekcija i identifikacija denitrifikatora.....	42
4.1.1. Uzorkovanje	42
4.1.2. Izolovanje i selekcija denitrifikatora	42
4.1.3. Identifikacija denitrifikatora	44

4.1.4. Ispitivanje bezbednosti primene denitrifikatora u procesima bioremedijacije	45
4.2. Amplifikacija denitrifikujućih gena	46
4.2.1. Izolovanje genomske DNK i spektrofotometrijsko određivanje kvaliteta DNK	47
4.2.2. Uslovi amplifikacije denitrifikujućih gena primenom PCR metode	47
4.3. Optimizacija sastava hranljivih podloga i odabranih bioprocenih parametara	49
4.3.1. Ispitivanje uticaja inicijalnih koncentracija C i N atoma na broj vijabilnih ćelija denitrifikatora	49
4.3.2. Optimizacija sastava hranljivih podloga za umnožavanje biomase denitrifikatora ..	50
4.3.3. Ispitivanje uticaja odabranih bioprocenih parametara na umnožavanje biomase denitrifikatora	52
4.4. Proizvodnja biomase denitrifikatora u laboratorijskim bioreaktorima	52
4.4.1. Analiza kultivacionih tečnosti	54
4.5. Primena denitrifikatora	55
4.5.1. Izbor i karakterizacija ispitivanih materijala	55
4.5.2. Kontaminacija ispitivanih materijala kalijum-nitratom	56
4.5.2.1. Protokol kontaminacije model supstrata opeke kalijum-nitratom	56
4.5.2.2. Protokol kontaminacije krečnjačkog stenskog materijala kalijum-nitratom.....	56
4.5.3. Izbor i karakterizacija pulpi	57
4.5.4. Priprema bioaktivnog sistema	57
4.5.5. Ispitivanje efikasnosti bioaktivnih sistema	58
5. REZULTATI I DISKUSIJA	60
5.1. Rezultati izolovanja, selekcije i identifikacije denitrifikatora	61
5.1.1. Rezultati izolovanja	61
5.1.2. Rezultati selekcije denitrifikatora	61
5.1.3. Identifikacija potencijalnih denitrifikatora	64
5.1.4. Kinetika denitrifikacije	66
5.1.5. Bezbednost primene denitrifikatora u postupcima bioremedijacije.....	68
5.2. Rezultati amplifikacije denitrifikujućih gena.....	70
5.3. Definisane sastava medijuma i optimizacija odabranih bioprocenih parametara za umnožavanje biomase denitrifikatora	73
5.3.1. Ispitivanje uticaja inicijalnih koncentracija C i N na kinetiku rasta denitrifikatora ...	73
5.3.2. Formulacija sastava medijuma za proizvodnju biomase	79
5.3.3. Ispitivanje uticaja odabranih procesnih parametara na sadržaj biomase <i>P. stutzeri</i> 85	
5.3.3.1. Teorijska vrednost sadržaja biomase <i>P. stutzeri</i>	85

5.3.3.2. Uticaj temperature na sadržaj biomase <i>P. stutzeri</i>	86
5.3.3.3. Uticaj pH vrednosti na sadržaj biomase <i>P. stutzeri</i>	87
5.3.3.4. Uticaj veličine inokuluma na sadržaj biomase <i>P. stutzeri</i>	88
5.4. Validacija optimizovanih parametara kultivacije u laboratorijskim bioreaktorima	89
5.5. Primena denitrifikatora	96
5.5.1. Rezultati ispitivanja efikasnosti denitrifikatora na model supstratima opeke	96
5.5.2. Rezultati ispitivanja efikasnosti denitrifikatora na stenskom materijalu	99
5.5.2.1. Ispitivanje mineraloških karakteristika stenskog materijala	99
5.5.2.2. Ispitivanje teksturalnih karakteristika stenskog materijala	100
5.5.2.3. Ispitivanje efikasnosti denitrifikatora na stenskom materijalu	102
6. ZAKLJUČCI	105
7. LITERATURA	109
8. PRILOZI	118
PRILOG 1.	119
PRILOG 2.	120
PRILOG 3.	122

Spisak oznaka, skraćenica i simbola

ATR (engl. <i>Attenuated Total Reflection</i>)	prigušena totalna refleksija
b_1, b_2, b_3	linearni koeficijenti regresione jednačine
b_{11}, b_{22}, b_{33}	kvadratni koeficijenti regresione jednačine
b_{12}, b_{13}, b_{23}	koeficijenti interakcije regresione jednačine
bp	bazni par
C-NH ₂	organski azot
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DO (engl. <i>dissolved oxygen</i>)	koncentracija rastvorenog kisonika (mg/L)
DTD	kanal Dunav-Tisa-Dunav
FTIR (engl. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)	infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
H	dužina mikrobne ćelije (μm)
KNO ₃	kalijum-nitrat
MALDI MS (engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry</i>)	masena spektrometrija zasnovana na matricom potpomognutom laserskom desorpcijom/ionizacijom
n	teorijski broj ćelija
N ₂	molekulski azot
N ₂ H ₄	hidrazin (diazin)
N ₂ O	azot-suboksid
Nap	nitrat-reduktaza
NH ₃	amonijak
NH ₄ ⁺	amonijumov jon
NH ₂ OH	hidroksilamin
Nir	nitrit-reduktaza
NO	azot-monoksid
NO ₂ ⁻	nitritni jon
NO ₃ ⁻	nirtatni jon
Nor	azot-monoksid-reduktaza
Nos	azot-suboksid-reduktaza
Nr	reaktivni azot
PCR (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)	lančana reakcija polimerizacije
pH	mera aktivnosti vodonikovih jona u rastvoru
R	prečnik mikrobne ćelije (μm)
RSM (engl. <i>Response Surface Method</i>)	metod odzivne površine
TOF (engl. <i>Time of Flight</i>)	analizator sa vremenom preleta
V _č	zapremina mikrobne ćelije (cm ³)
X ₁₋₃	ispitivani faktori u modelovanju
Y	željeni odziv u modelovanju
amplifikacija	<i>in vitro</i> umnožavanje kratke sekvence DNK
bioaktivni sistem	pulpa sa dodatkom suspenzije denitrifikatora
biočišćenje (engl. <i>Biocleaning</i>)	uklanjanje različitih depozita sa građevinskih materijala usled metaboličke aktivnosti mikroorganizama

Spisak tabela

Tabela 1.	
Oksido-redukciona stanja azota	7
Tabela 2.	
Osobine odabranih nitrifikujućih bakterija	15
Tabela 3.	
Pregled odabranih potpunih i nepotpunih denitrifikatora	17
Tabela 4.	
Klasifikacija <i>P. stutzeri</i>	23
Tabela 5.	
Pregled mesta izolacije sojeva <i>P. stutzeri</i>	26
Tabela 6.	
Primeri uspešno primenjenog postupka biočišćenja	33
Tabela 7.	
Instrumentalni parametri pri snimanju MALDI spektara	45
Tabela 8.	
Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju denitrifikujućih gena	47
Tabela 9.	
Boks-Benkenov eksperimentalni plan i varirane vrednosti ispitivanih parametara	51
Tabela 10.	
Karakteristike referentne kulture <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	61
Tabela 11.	
Karakteristike odabranih izolata potencijalnih denitrifikatora	64
Tabela 12.	
Identifikacija odabranih izolata pomoću uređaja VITEK®2 Compact System	64
Tabela 13.	
Rezultati identifikacije pomoću MALDI-TOF MS	66
Tabela 14.	
Kinetika denitrifikacije <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i <i>P. stutzeri</i> D1	67
Tabela 15.	
Rezultati in vitro rezistencije <i>P. stutzeri</i>	69
Tabela 16.	
Rezultati ispitivanja adhezionih osobina <i>P. stutzeri</i>	70
Tabela 17.	
Rezultati Bosk-Benkenovog eksperimentalnog plana	80
Tabela 18.	
Koeficijenti regresione jednačine i njihova značajnost	81
Tabela 19.	
Rezultati živine porozimetrije uzoraka stenskog materijala i odabrane pulpe	100
Tabela 20.	
Promena koncentracije nitrata tokom procesa biočišćenja na stenskom materijalu	103
Tabela 21.	
Karakteristike izolata iz Dunava	120
Tabela 22.	
Karakteristike izolata iz kanala Dunav-Tisa-Dunav	122

Spisak slika

Slika 1. Šematski prikaz Haber-Bošovog procesa dobijanja amonijaka	8
Slika 2. Konzentracija ukupnog neorganskog azota (mg/m ²): a) 1860. godine, b) 1990-tih i c) 2050. godine	10
Slika 3. Ciklus kruženja azota u prirodi	11
Slika 4. Organizacija denitrifikujućih enzima u ćeliji gram-negativne bakterije	18
Slika 5. Mogući odnosi između koncentracije DO i brzine redukcije nitrata	21
Slika 6. SEM snimak <i>P. stutzeri</i>	24
Slika 7. Izgled kolonija <i>P. stutzeri</i> na krvnom agaru	24
Slika 8. Evolucija metoda za identifikaciju mikroorganizama	27
Slika 9. Kriva rasta mikroorganizama	34
Slika 10. Šematski prikaz faza eksperimentalnog postupka	41
Slika 11. Uzorkovanje vode: a) pozicije uzorkovanja, b) kanal Dunav-Tisa-Dunav, c) Dunav	42
Slika 12. Šematski prikaz izolacije, selekcije i ispitivanja kinetike denitrifikatora	44
Slika 13. Šematski prikaz ispitivanja uticaja inicijalne koncentracije izvora ugljenika na broj vijabilnih ćelija denitrifikatora	50
Slika 14. Korišćeni laboratorijski bioreaktori za proizvodnju biomase denitrifikatora: a) Biostat®A plus, ukupne zapremine 3L i b) Chemap AG CH-8604, ukupne zapremine 7L	53
Slika 15. Šematski prikaz postupka ispitivanja efikasnosti biočišćenja na model supstratima opeke	59
Slika 16. Ispitivanje mogućnosti rasta i usvajanja glukoze od strane odabranih izolata na McConkey hranljivoj podlozi	62
Slika 17. Lab-on-chip elektroforeza produkata denitrifikujućih gena: a) <i>napA</i> , b) <i>nirS</i> , c) <i>norB</i> , d) <i>nosZ</i> ; S: 25-1000 bp DNK standard; 1: <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i 2: <i>P. stutzeri</i> D1	71
Slika 18. Uticaj različitih izvora C atoma u koncentraciji od 0,5 g/L sa i bez uticaja mešanja na produkciju biomase: a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1	75
Slika 19. Uticaj različitih izvora C atoma u koncentraciji od 1 g/L sa i bez uticaja mešanja na produkciju biomase: a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1	77

Slika 20.	
Uticaj različitih koncentracija KNO ₃ sa i bez uticaja mešanja na produkciju biomase:	
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1	78
Slika 21.	
Uticaj inicijalnih koncentracija glukoze i KNO ₃ na sadržaj biomase:	
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1 pri konstantnoj koncentraciji peptone (2 g/L)	82
Slika 22.	
Uticaj inicijalnih koncentracija peptona i glukoze na sadržaj biomase:	
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1 pri konstantnoj koncentraciji KNO ₃ (2 g/L)	83
Slika 23.	
Uticaj inicijalnih koncentracija peptona i KNO ₃ na sadržaj biomase:	
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1 pri konstantnoj koncentraciji glukoze (1 g/L)	84
Slika 24.	
Uticaj temperature kultivacije na sadržaj biomase:	
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1	86
Slika 25.	
Uticaj pH vrednosti medijuma na sadržaj biomase:	
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1	87
Slika 26.	
Uticaj veličine inokuluma na sadržaj biomase:	
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1	88
Slika 27.	
Validacija optimizovanih parametara bioprocasa u bioreaktorima za proizvodnju biomase:	
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1 i rezultati analize kultivacione tečnosti u pogledu sadržaja ukupnog azota u slučaju c) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i d) <i>P. stutzeri</i> D1 i sadržaja glukoze u slučaju e) <i>P. stutzeri</i> D1	92
Slika 28.	
Uticaj skladištenja na temperature frižidera na sadržaj biomase:	
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1 i na temperature zamrzivača na sadržaj biomase:	94
a) <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 i b) <i>P. stutzeri</i> D1	
Slika 29.	
Primer integracije površine pika na 1380 cm ⁻¹ kao indirektno metode za procenu efikasnosti bioaktivnih sistema za biočišćenje	96
Slika 30.	
Postavka i praćenje postupka biočišćenja na model supstratima opeke	97
Slika 31.	
Efikasnost bioaktivnih sistema na model supstratima opeke praćena FTIR-ATR uređajem	97
Slika 32.	
Rendgenostrukturalna analiza uzorka stenskog materijala	99
Slika 33.	
Upporedni prikaz raspodele veličine poluprečnika pora stenskog materijala pre i nakon kontaminacije kalijum-nitratom	100
Slika 34.	
Upporedni prikaz raspodele veličine poluprečnika pora kontaminiranog stenskog materijala i odabrane pulpe	101
Slika 35.	
Stenski materijal pre (levo) i nakon (desno) postavke bioaktivnog sistema za biočišćenje	102

1. UVOD

Pored globalnog zagrevanja, jedan od najvećih problema savremenog doba je ubrzan rast broja stanovnika na Zemlji. Potreba za povećanjem prinosa i obezbeđivanjem dovoljne količine hrane podstakla je ljude na sve veću upotrebu veštačkih đubriva na bazi nitrata, što dovodi do disbalansa u ciklusu kruženja azota i akumulacije nitrata u zemljištu i vodi. Konzumiranje namirnica i vode sa povećanim sadržajem nitrata može prouzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme kod odraslih ljudi i dece. Osim toga, višak nitrata u zemljištu i podzemnim vodama utiče na pojavu degradacije građevinskih materijala dejstvom rastvorljivih soli.

Samo ograničen broj mikroorganizama ima sposobnost da nitrate prevede u atmosferski azot putem denitrifikacije i na taj način zatvori ciklus kruženja azota u prirodi. Upravo se procesom denitrifikacije vrši bioremedijacija otpadnih voda, zemljišnih lokaliteta, a od nedavno i biočišćenje različitih građevinskih materijala. Celokupan proces denitrifikacije, kako sa hemijskog, tako i sa biološkog aspekta, najviše je proučavan na vrsti *Pseudomonas stutzeri*, kao jednim od najefikasnijih denitrifikatora. Uzimajući u obzir da stopa akumulacije nitrata eksponencijalno raste, neophodno je izolovati denitrifikatore visoke efikasnosti kako bi se održavao balans u azotnom ciklusu. Potrebe tržišta za aktivnom biomasom denitrifikatora iniciraju njenu proizvodnju u industrijskim razmerama kako bi se mogle tretirati veće površine kontaminirane nitratima.

S obzirom da je proces denitrifikacije detaljno ispitivan uglavnom na referentnim kulturama, javila se potreba za izolovanjem prirodnih sojeva denitrifikatora sa visokim potencijalom u pogledu konverzije nitrata do molekuskog azota. Pored toga, biotehnološki postupak dobijanja biomase denitrifikatora nije do sada proučavan, pa je optimizacija proizvodnih uslova i ispitivanje mogućnosti proizvodnje biomase u većim razmerama osnovni preduslov za industrijalizaciju postupka. Pored klasične primene denitrifikatora u bioremedijaciji voda i zemljišta, oblast biočišćenja različitih građevinskih materijala je relativno nova i nedovoljno istražena. Sistemi za biočišćenje, koji su obično sastavljeni od bakterijskih kultura i nosača (pulpa, gel, itd.) predstavljaju efikasan, neinvazivan i ekološki prihvatljiv način za uklanjanje naslaga soli sa i iz građevinskih materijala i kao takvi se potencijalno mogu koristiti umesto tradicionalnih fizičkih i hemijskih metoda čišćenja, što otvara mogućnosti za ispitivanje različitih aplikacija ovih sistema.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je izolovanje i karakterizacija denitrifikatora uz optimizaciju biotehnoloških uslova proizvodnje njegove biomase i ispitivanje efikasnosti proizvedene biomase u pogledu biočišćenja različitih građevinskih materijala. Realizacija ovako postavljenog osnovnog cilja ove doktorske disertacije zahteva ispunjenje sledećih specifičnih ciljeva:

- Izolovanje, selekcija i identifikacija denitrifikatora iz vodenih ekosistema;
- Optimizacija sastava hranljivih podloga za proizvodnju biomase denitrifikatora;
- Ispitivanje uticaja odabranih parametara kultivacije na proizvodnju biomase denitrifikatora;
- Validacija optimizovanih parametara kultivacije u laboratorijskim bioreaktorima;
- Ispitivanje stabilnosti biomase denitrifikatora resuspendovane u odgovarajućoj tečnosti (fiziološki rastvor i destilovana voda) u pogledu održanja zadovoljavajuće vijabilnosti i vitalnosti ćelija prilikom skladištenja;
- Ispitivanje efikasnosti odabranog denitrifikujućeg bakterijskog izolata u cilju uklanjanja nitrata sa različitih građevinskih materijala u laboratorijskim uslovima.

Očekuje se da će rezultati postavljenih specifičnih ciljeva ove doktorske disertacije imati značajan doprinos u oblasti bioremedijacije sa aspekta postizanja prvih rezultata biotehnološkog postupka proizvodnje biomase denitrifikatora koji će predstavljati pouzdan osnov za uvećanje razmera predloženog bioprocesa. Pored toga, rezultati primene odabranog denitrifikujućeg bakterijskog izolata na model supstratima opeke i stenskog materijala u cilju uklanjanja nitrata ukazaće na široku paletu mogućnosti primene denitrifikatora.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. Azot

Azot je nemetal koji se nalazi u Va grupi i drugoj periodi periodnog sistema elemenata. U elementarnom stanju nalazi se isključivo u obliku dvoatomskih molekula (N_2). Zasluge za otkriće ovog elementa pridobio je škotski lekar Danijel Raderford 1772. godine, objavivši prvi svoj eksperimentalni rad na miševima, mada su u isto vreme Karl Šele, Henri Kavendiš i Džozef Pristli zaključili da je azot sastavni deo vazduha, nazivajući ga „škodljivi vazduh” (Galloway i sar., 2013). Nešto kasnije, Antoan Lavoazje bliže opisuje ovaj element i daje mu naziv *azote* (grč.), što u prevodu znači „onaj koji ne podržava život”. Naziv *nitrogène* (franc.) potiče iz 1790. godine od reči koja znači obrazovanje šalitre (Bothe i sar., 2007; Galloway i sar., 2013).

Azot se, pored ugljenika i kiseonika, smatra glavnim i najsloženijim elementom svih organizama, čineći prosečno 6,35% ukupne suve mase (Bothe i sar., 2007; Stein i Klotz, 2016). Njegova značajnost proističe iz činjenice da je sastavni deo svih aminokiselina koje dalje grade proteine, a prisutan je i u bazama koje izgrađuju nukleinske kiseline (DNK, RNK).

Velika količina azota u obliku N_2 je prisutna u atmosferi, čineći 78 % ukupne zapremine vazduha. Azot je, nasuprot ugljenika, vodonika i kiseonika, najstabilniji upravo u gasovitom stanju. Međutim, gasoviti azot je nedostupan većini organizama, što se može objasniti velikom energijom veze koju ostvaruje, te praktično molekul ostaje inertan. Da bi azot postao aktivan neophodno ga je fiksirati u obliku amonijumovih, nitritnih ili nitratnih jona i omogućiti spontano i neprekidno kruženje azota u prirodi (Bothe i sar., 2007).

3.2. Ciklus kruženja azota u prirodi

O ciklusu kruženja azota govorio je nemački alhemičar Džon Rudolf Glauber pre 350 godina, iako se tada za azot još nije znalo: „To je kao ptica bez krila koja leti danju i noću bez prestanka, prolazi kroz sve elemente noseći sa sobom duh života, jer su od njega sačinjeni minerali, biljke i životinje. Nikada ne nestaje, samo menja svoj oblik – putem hrane dospeva do tela životinja, a potom se ekskretuje. Na taj način se vraća u zemljište, a jedan njegov deo isparava i vraća se u vazduh, i ponovo je među elementima” (Keeney i Hatfield, 2008). Suštinski, ovo objašnjenje se u potpunosti poklapa sa modernom definicijom prema kojoj je

ciklus kruženja azota proces u kom azot, transformišući se kroz razne hemijske oblike, kruži Zemljom.

Tokom transformacija azot prolazi kroz različite oksidacione i redukcionne reakcije gradeći jedinjenja sa oksidacionim brojevima od +5 do -3 (Tabela 1). Sve redoks reakcije tokom kruženja azota u prirodi mogu da izvode bakterije, arhee i gljive, dok od viših oblika života samo biljke mogu da učestvuju u procesu asimilacione redukcije nitrata (Bothe i sar., 2007).

Tabela 1. Oksido-redukciona stanja azota (Stein i Klotz, 2016)

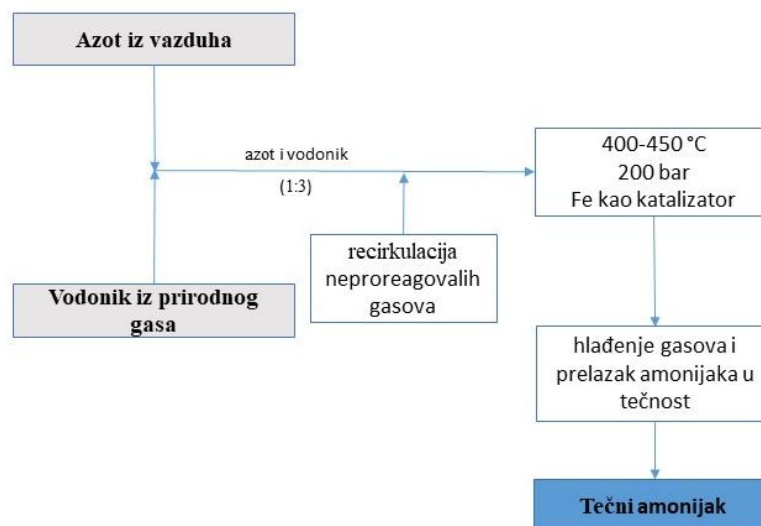
Molekulska formula	Naziv jedinjenja	Oksidaciono stanje	
C-NH ₂	organski azot		Redukcija
NH ₃ , NH ₄ ⁺	amonijak, amonijumov jon	-3	↑ više elektrona
N ₂ H ₄	hidrazin (diazan)	-2	
NH ₂ OH	Hidroksilamin	-1	
N ₂	molekulski azot	0	
N ₂ O	azot-suboksid	+1	↓ manje elektrona
NO	azot-monoksid	+2	
HNO ₂ , NO ₂ ⁻	nitritna kiselina, nitritni jon	+3	
NO ₂	azot-dioksid	+4	
HNO ₃ , NO ₃ ⁻	nitratna kiselina, nitratni jon	+5	Oksidacija

3.2.1. Reaktivni azot

Kao što je napomenuto, molekularni azot (N₂) je neadekvatan za većinu organizama, te konverzija ovog oblika azota u reaktivni azot (Nr), direktno ili indirektno, omogućava rast biomase. Pod reaktivnim azotom podrazumevaju se sledeći oblici: azot-monoksid, azot-dioksid, azot-oksid, nitrati, nitriti, amonijak, amonijumovi joni, ali i organski oblici azota kao što su urea, derivati amina i azot prisutan u proteinima i drugim organskim molekulima. Smatra se da su osnovni izvori reaktivnog azota biološki procesi u ekosistemima i električno pražnjenje usled dejstva munja (Denk i sar., 2017).

Iako se azotni ciklus spontano i neizmenjeno odvija u prirodi oko 2,7 milijardi godina, tokom poslednjih nekoliko decenija dolazi do značajnog povećanja reaktivnog azota u prirodi usled antropogenog dejstva (Cao, 2011). Naime, sa povećanjem populacije raste potreba za većom i efikasnijom proizvodnjom hrane. Korišćenje veštačkog đubriva na bazi azota je u proteklih 50 godina povećalo prinos hrane (žitarica, krtolastih biljaka, itd.) za oko 40% na svetskom nivou (Galloway i sar. 2013). Korišćenje đubriva na bazi azota dovodi do značajnih promena u sastavu zemljišta i biosveta u njemu uz nakupljanje azotnih jedinjenja.

Druga najznačajnija antropogena aktivnost koja povećava nivo reaktivnog azota jeste proizvodnja energije. Naime, tokom proizvodnje energije, oslobađanje reaktivnog azota je slučajno i često nekontrolisano. Na primer, tokom sagorevanja fosilnih goriva, azotna jedinjenja se emituju u atmosferu kao nusprodukti ili se jedinjenja azota stvaraju reakcijom drugih nusprodukata sagorevanja sa azotom iz vazduha što je slučaj tokom Haber-Bošovog procesa dobijanja amonijaka (slika 1) (Galloway i sar., 2013). Iako Haber-Bošova fiksacija azota omogućava i do četiri puta veću produktivnost poljoprivrednih kultura, hemijska đubriva i drugi antropogeni izvori azota imaju daleko veći doprinos količini reaktivnog azota u ekosistemima u odnosu na benefit bioprocasa, što značajno utiče na zagađenje životne sredine (Stein i Klotz, 2016).



Slika 1. Šematski prikaz Haber-Bošovog procesa dobijanja amonijaka

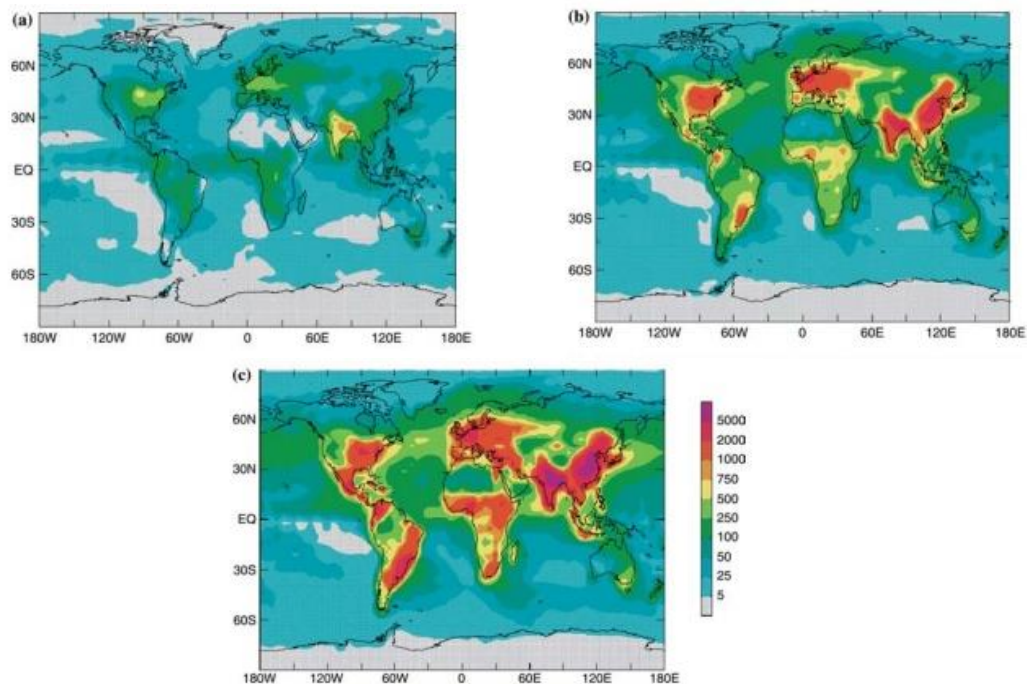
3.2.2. Posledice povećane količine reaktivnog azota u prirodi

Povećana koncentracija reaktivnog azota negativno utiče na produktivnost ekosistema, prouzrokuje njegov disbalans i smanjenje biodiverziteta. Gubitak ravnoteže u azotnom ciklusu se manifestuje kroz tri glavna mehanizma: eutrofikacija, zakišeljavanje šuma i direktna toksičnost pojedinih jedinjenja na žive organizme (Jones i sar., 2013).

Neka azotna jedinjenja poput N_2O i NO_2 imaju snažan uticaj na efekat staklene bašte, te indirektno utiču na klimu i formiranje ozona. Osim oksida azota i amonijak ima uticaj na efekat staklene bašte, ali se često zanemaruje zbog kratkog boravka u atmosferi usled fotolize. Međutim, kada su količine amonijaka u atmosferi veće i temperature visoke, probija se ova prirodno nametnuta fotokatalitička barijera. Nasuprot tome, pojedina azotna jedinjenja veoma lako stupaju u reakciju sa ugljenikovim jedinjenjima formirajući aerosole kao što su fotohemijski smog ili organske čestice. Ovakve pojave imaju suprotno dejstvo na efekat staklene bašte dovodeći do snižavanja temperature na Zemlji, jer predstavljaju fizičku prepreku sunčevim zracima (Stùeken i sar., 2016). Zapravo, može se reći da jedinstveni aspekt uticaja reaktivnog azota na životnu sredinu i živa bića ima kaskadni efekat: povećanje ozona (štetni efekat po zdravlje živih bića), povećanje koncentracije čestica u vazduhu (smanjenje vidljivosti i temperature), zakišeljavanje površinskih voda i šuma (gubitak biodiverziteta), povećan stepen eutrofikacije u svim vodenim ekosistemima, pa i povećani efekat staklene bašte (usled produkcije azotnih oksida) (Galloway i sar., 2004, Keeney i Hatfield, 2008).

Sve veće količine nitratnih i nitritnih jona u vodama, pogotovo u vodi za piće, predstavljaju ozbiljan problem po ljudsko zdravlje. Naime, visoke koncentracije nitrata u vodi za piće mogu da izazovu methemoglobinemiju, tzv. „sindrom plavih beba” i kardiovaskularne probleme, dok visoke koncentracije nitrita oksiduju hemoglobin u methemoglobin, te se na taj način sprečava transport kiseonika do tkiva, što kod težih slučajeva može izazvati smrt usled prestanka disanja (WHO, 2011, Fu i sar., 2014). Prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) maksimalna dozvoljena koncentracija nitrata u vodi za piće je 10 mg/L, dok je za nitrite ta granica < 0,1 mg/L (WHO, 2011).

Evidentno je da napredak industrijalizacije, korišćenje veštačkih đubriva i druge antropogene aktivnosti svakodnevno povećavaju koncentraciju reaktivnog azota u prirodi. Galloway i sar. (2004) su slikovito prikazali galopirajuće promene u koncentraciji reaktivnog azota u prirodi na svetskom nivou (slika 2). Kao što je prikazano na slici 2, procena je da će usled globalnih promena za oko 40 godina koncentracija azota dostići 5000 mg/m². Razmere posledica povećanja koncentracije reaktivnog azota su velike i smanjenje antropogenog uticaja u budućnosti mora biti prioritet, te je poznavanje procesa azotnog ciklusa od izuzetnog značaja.



Slika 2. Koncentracija ukupnog neorganskog azota (mg/m²): a) 1860. godine, b) 1990-tih i c) 2050. godine (Galloway i sar., 2004)

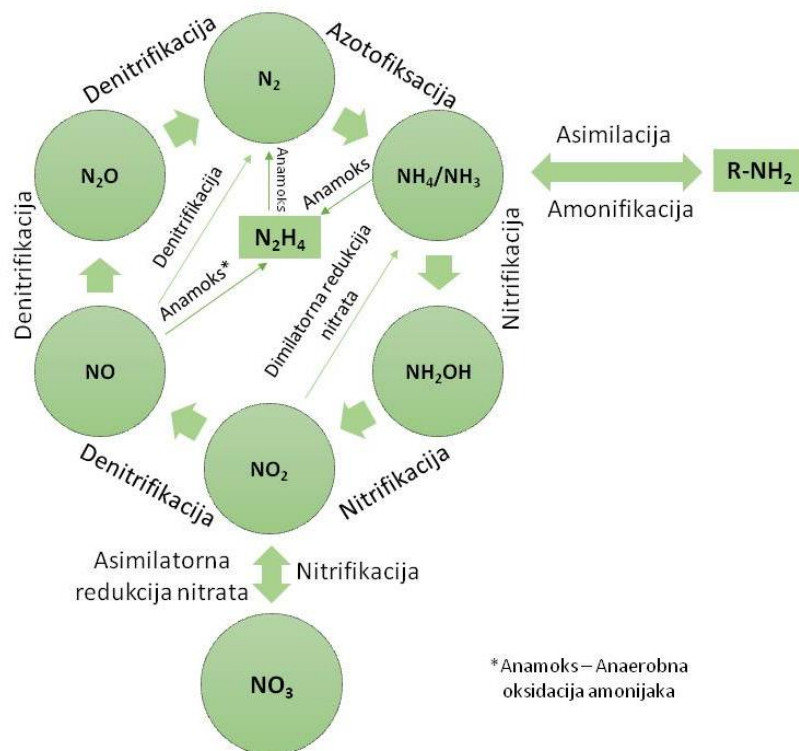
3.2.3. Procesi azotnog ciklusa

Azotni ciklus obuhvata konverziju azota putem oksidaciono-redukcionih procesa koji su uzrokovani postojanjem interakcija između atmosfere, hidrosfere, biosfere i litosfere za koje su najčešće odgovorne metaboličke aktivnosti različitih mikroorganizama. Upravo se zbog toga kaže da je azotni ciklus podstaknut kombinacijom asimilatornih i disimilatornih bioloških transformacija. Iako je većina procesa azotnog ciklusa katalizovana mikroorganizmima u okviru ovog ciklusa ubrajaju se i atmosferske azotifikacije povezane sa dejstvom munja i hemodenitrifikacijom (Thamdrup, 2012). Važno je naglasiti da azotni

ciklus nije samostalan već je usko povezan sa ostalim biogeohemijskim ciklusima (ugljenika, sumpora, fosfora, itd.).

Koncept azotnog ciklusa je prvi put ustanovljen 1913. godine nakon Lohnisovog dokaza prisustva azota u proteinima, amidima, amonijaku i oksidima azota (Keeney i Hatfield, 2008). U gotovo svim procesima konverzije azota (slika 3) primarnu ulogu imaju mikroorganizmi, a sam ciklus se grubo može podeliti na tri najznačajnija procesa:

- azotofiksacija i amonifikacija,
- nitrifikacija i
- denitrifikacija.



Slika 3. Ciklus kruženja azota u prirodi (prilagođeno iz rada Stein i Klotz, 2016)

3.2.3.1. Azotofiksacija i amonifikacija

Azotofiksacija predstavlja redukcionu reakciju prevođenja molekularnog azota iz vazduha u formu amonijaka. Ovo je vitalan ekološki proces, jer sve zelene biljke imaju potrebu za azotom u obliku amonijaka ili nitrata koji im je neophodan za sintezu aminokiselina, tj. izgradnju proteina. Jedini organizmi koji mogu obaviti ovu redukcionu reakciju su neke vrste

bakterija i cijanobakterija. Dakle, ceo život na našoj planeti se praktično zasniva na direktnoj ili indirektnoj zavisnosti od pomenutih organizama. Azotofiksatori obezbeđuju vezu između neizmernog bogatstva azota kao gasa u atmosferi i ostalog živog sveta na planeti Zemlji.

Za seriju redukcionih reakcija u procesu fiksacije azota neophodan je snažan redukujući agens, odnosno elektroni iz procesa fotosinteze ili respiracije, ATP (adenozin-III-fosfat) i enzim nitrogenaza. Trostruka kovalentna veza u molekulu azota je veoma stabilna i potrebna je velika količina energije za njeno kidanje (16 molekula ATP-a i 8 elektrona za fiksiranje svakog molekula azota) (Ward, 2012). Jedini oblici koji mogu redukovati ovu vezu su upravo azotofiksirajuće bakterije i neke cijanobakterije. Kompletna reakcija je katalizovana enzimom nitrogenaza koji je neophodan za ovaj proces, međutim ovaj enzim vrlo brzo postaje neaktivan u prisustvu molekuskog kiseonika (O_2) i ne može funkcionisati u ćeliji u kojoj dolazi do proizvodnje kiseonika u toku fotosinteze (Gajin i sar., 2007). Zbog toga se azotofiksacija kod cijanobakterija obavlja u heterocistama, nefotosintetskim ćelijama čija je glavna uloga vezivanje molekuskog azota.

Mikroorganizmi koji imaju sposobnost fiksacije molekuskog azota se mogu podeliti na asimbiotske i simbiotske azotofiksatore. Asimbiotski azotofiksatori su slobodno živeći, ubikvitarni, heterotrofni mikroorganizmi koji ne formiraju simbiotske zajednice sa drugim živim bićima. Simbiotski azotofiksatori formiraju mutualističke zajednice sa višim biljkama u okviru kojih koriste organska jedinjenja nastala tokom procesa fotosinteze i pri tome vrše fiksaciju molekuskog azota. Najbolji primer simbiotskih azotofiksatora je zajednica bakterija roda *Rhizobium* sa leguminozama. Na početku bakterije dejstvom enzima celulaza prodiru u strukturu korena leguminoza. Tom prilikom dolazi do formiranja kvržica, tj. nodula usled bakterijske produkcije citokina koji stimulišu ćelijske deobe u korenu. U nodulama bakterije se brzo razmnožavaju i prelaze u specifičnu nepravilnu formu – bakteroid. Što je na korenu biljka više nodula to je intenzitet rasta veći, a dokazano je da pozitivno utiču na prinos roda.

Sposobnost aerobne amonifikacije imaju predstavnici *Cyanobacteria*, vrste iz rodova *Azotobacter*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* i neki kvasci (Van Dommelen i Vanderleyden, 2007, Gajin i sar., 2007). U anaerobnim sredinama proces amonifikacije najčešće obavljaju obligatni anaerobi poput predstavnika rodova *Clostridium*, *Methanobacillus* i *Desulfovibrio* ili fakultativno anaerobni mikroorganizmi kao što su *Klebsiella pneumoniae* i *Serratia marcescens* (Van Dommelen i Vanderleyden, 2007).

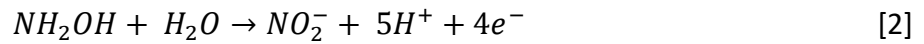
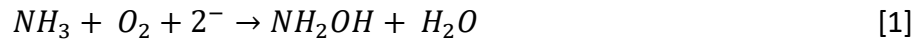
Osim azotofiksacije, u okviru transformacija azotnih jedinjenja do amonijum jona tj. amonijaka spadaju i anaerobna asimilaciona i disimilaciona redukcija nitrata u amonijak. Takođe, pod amonifikacijom se često podrazumeva i konverzija organskog azota u neorganski oblik (amonijak). U tom slučaju, amonifikacija (mineralizacija) predstavlja egzotermni proces razgradnje ostataka uginulih biljaka i životinja usled metaboličkih aktivnosti brojnih heterotrofnih bakterija, aktinomiceta i gljiva (Cao, 2011). Razgradnju proteina do peptida vrše proteolitičke bakterije katalitičkim delovanjem ekstracelularnih enzima proteaza. Dalja razgradnja peptida do aminokiselina odvija se aktivnošću različitih peptidaza. Delovanjem endoenzima dehidrogenaza odvija se oksidativna dezaminacija aminokiselina uz formiranje ketokiselina i amonijaka. Nastali amonijak u kiselim i neutralnim sredinama egzistira kao amonijum jon koji veoma lako asimiluju biljke i mikroorganizmi, dok u baznim sredinama amonijak brzo oksiduje do nitrata (Gajin i sar., 2007).

Pri aerobnim uslovima proces amonifikacije najčešće obavljaju sporogene bakterije *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides* i *B. subtilis* i asporogene bakterije *Chromobacterium prodigiosum* i *Pseudomonas fluorescens*. U anaerobnim sredinama za proces amonifikacije zadužene su od sporogenih bakterija *Clostridium cadaveris*, *C. putrificus* i *C. perfringens*, a od asporogenih *Escherichia coli* i *Proteus vulgaris*. Potvrđeno je da su za amonifikaciju u kiselim zemljištima odgovorne i plesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, itd., dok su u alkalnim zemljištima aktivne aktinomicete koje proizvode egzoćelijske enzime koji razlažu biljne proteine, kazein, albumin, želatin, kao i većinu aminokiselina (Cao, 2011).

3.2.3.2. Nitrifikacija

Nitrifikacija je dvostepen proces koji se može definisati kao biološka oksidacija amonijaka ili amonijumovih jedinjenja preko nitrita do nitrata uz oslobađanje energije. Prvi korak u procesu nitrifikacije obuhvata oksidaciju amonijaka do nitrita što je katalizovano metaboličkom aktivnošću amonijum-oksidujućih bakterija. Ipak, reakcija oksidacije nije jednostavna, već se odvija u dva koraka. Prvi korak podrazumeva konverziju amonijaka ili amonijumovih jona do NH_2OH [1]. Za odigravanje ove reakcije, pored enzima amonijum-mono-oksigenaze (AMO), neophodno je prisustvo molekuskog kiseonika i dva elektrona. Smatra se da je donor dva elektrona za izvođenje reakcije ubikvinol, elektronima bogat oblik koenzima Q10. U drugom koraku, dolazi do konverzije NH_2OH u NO_2^- , pri čemu se

oslobađaju četiri elektrona [2]. Ovaj korak se izvodi u periplazmatičnom prostoru, a nastali elektroni se posredstvom citohroma prenose unutar ćelije, gde se troše za odvijanje metaboličkih aktivnosti bakterijske ćelije (Ferguson i sar., 2007, Gajin i sar., 2007).



Za izvođenje drugog koraka, odnosno oksidacije nitrita do nitrata, u procesu nitrifikacije odgovorne su nitrit-oksidujuće bakterije. Reakcija oksidacije je veoma jednostavna i odvija se pomoću enzima nitrit-oksidoreduktaze (NOR) [3] (Ferguson i sar., 2007).



Mikroorganizmi koji obavljaju proces nitrifikacije se jednim imenom nazivaju nitrifikujuće bakterije, bez obzira koji od dva stepena nitrifikacije izvode. Iako je brojnost nitrifikujućih bakterija velika, bakterije roda *Nitrosomonas* i *Nitrobacter* su dominantne tokom prvog i drugog stepena nitrifikacije (Robertson i Groffman, 2015). Detaljniji prikaz najučestalijih nitrifikujućih bakterija dat je u tabeli 2.

Nitrifikujuće bakterije se obično izoluju iz zemljišta i vode neutralnih pH vrednosti. Ove bakterije nisu zahtevne u pogledu količine nutrijenata, a obično rastu i razvijaju se na temperaturama do 30 °C (Tabela 2).

Tabela 2. Osobine odabranih nitrifikujućih bakterija (Ferguson i sar., 2007)

Nitrifikujuće bakterije	Rod	Morfologija	Uslovi rasta		Stanište
			Temperatura [°C]	pH	
Amonijum-oksidujuće bakterije	<i>Nitrosomonas</i>	Pojedinačni pravi štapići, pokretni sa jednom ili dve subpolarne flagele ili nepokretni	5-30	5,8-9,5	zemljište, morska i izvorska voda
	<i>Nitrospira</i>	Spiralno uvijeni štapići, pokretni sa peritrihalnim flagelama ili nepokretni	25-30	7,5-8,0	zemljište
	<i>Nitrosococcus</i>	Diplokoke ili tetrade, pokretne sa peritrihalnim flagelama ili nepokretne	2-30	6,0-8,0	zemljište, morska i izvorska voda
	<i>Nitrosolobus</i>	Loptaste, pleomorfne ćelije, pokretne sa peritrihalnim flagelama	13-30	6,0-8,2	zemljište
Nitrit-oksidujuće bakterije	<i>Nitrobacter</i>	Kratki štapići, pokretni sa jednom polarnom flagelom ili nepokretni	5-40	5,7-10,2	zemljište, morska i izvorska voda
	<i>Nitrospina</i>	Dugački, tanki, nepokretni štapići	20-30	7,0-8,0	morska voda
	<i>Nitrococcus</i>	Sferične ćelije koje se međusobno povezuju formirajući mrežu	20-30	7,0-8,0	morska voda

3.2.3.3. Denitrifikacija

Proces denitrifikacije u užem smislu obuhvata biološku redukciju nitrata preko nitrita do isparljivih gasova N_2O , NH_3 i N_2 . Denitrifikacija je zapravo jedini proces u okviru kog se azot vraća u svoj nereaktivni oblik (N_2) čime se ciklus kruženja azota zatvara. Kada proces denitrifikacije ne bi postojao, azotofiksatori bi vremenom preveli sav molekularni azot iz atmosfere u reaktivni oblik, što bi dovelo do akumulacije ogromne količine nitrata u biosferi.

Ključnu ulogu u ovom procesu imaju, pre svega, bakterije, a potom i pojedine vrste gljiva i algi, koje se jednim imenom nazivaju denitrifikujućim mikroorganizmi ili denitrifikatori. Ovi mikroorganizmi imaju sposobnost korišćenja nitrata kao akceptora elektrona tokom procesa poznatog kao nitratno disanje, pri čemu oslobađaju redukovane oblike azotovih oksida ili molekularni azot. S obzirom da su nitrati manje efikasni akceptori elektrona u odnosu na kiseonik, većina denitrifikatora vrši nitratno disanje samo u slučajevima kada je kiseonik

nedostupan. Tipični denitrifikatori čine 0,1 do 5% ukupne kulturabilne populacije i do 20% ukupne mikrobne biomase zemljišta, odakle se najčešće izoluju (Robertson i Groffman, 2007). Bakterije iz roda *Pseudomonas* su označene kao najučestalije izolovane i najaktivnije denitrifikujuće bakterije zemljišta i vodenih staništa. Za sada je dokazano da su među najefikasnijim pripradnicima roda *Pseudomonas* sledeće vrste: *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. lemoignei*, *P. mallei*, *P. mendocina*, *P. perfectomarinus*, *P. pickettii* i dr. (Lalucat i sar., 2006). Osim roda *Pseudomonas*, proces denitrifikacije mogu da vrše i pripradnici rodova: *Bacillus*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Gallionella*, *Halobacterium*, *Halomonas*, *Hyphomicrobium*, *Janthinobacterium*, *Neisseria*, *Propionibacterium*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, i dr. (Burghate i Ingole, 2013).

Generalno se denitrifikatori mogu podeliti na prave (potpune) ili nepotpune u zavisnosti od krajnjeg proizvoda denitrifikacije koju obavljaju (tabela 3) (Drysdale i sar., 1999). Značajniju grupu čine oni mikroorganizmi koji obavljaju potpunu redukciju nitrata do molekuskog azota zbog efikasnosti procesa i kompletiranja azotnog ciklusa. U drugu grupu spadaju mikroorganizmi koji u procesu konverzije azotnih jedinjenja nisu u mogućnosti da redukuju nitrata do molekuskog azota, već metabolišu azot do određenog stepena uz mogućnost nakupljanja različitih oblika azotnih oksida.

Tabela 3. Pregled odabranih potpunih i nepotpunih denitrifikatora (Drysdale i sar., 1999)

Potpuni denitrifikatori	Nepotpuni denitrifikatori
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Alcaligenes denitrificans</i>
<i>Pasteurella</i> spp.	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
<i>Pseudomonas pickettii</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>
	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Enterobacter intermedium</i>
	<i>Citrobacter freundii</i>

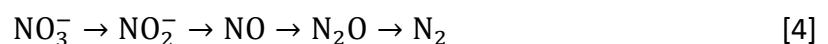
U zavisnosti od načina ishrane denitrifikujućih mikroorganizama, proces denitrifikacije može biti autotrofan ili heterotrofan. Autotrofne denitrifikujuće bakterije zahtevaju relativno veliku količinu energije za pretvaranje ugljen-dioksida ili bikarbonata u složene organske

forme pogodne za rast i razvoj, što za posledicu ima niski prinos biomase po jedinici energije (Burghate i Ingole, 2013). Nasuprot tome, heterotrofni denitrifikatori koriste raznolike oblike C-atoma koji su im neophodni za respiraciju i rast. Usvajaju širok spektar organskih jedinjenja kao što su metanol, etanol, glukoza, acetat, aspartat, mrvlju kiselinu, kao i različite sirovine sekundarnog kvaliteta poput melase, surutke, džibre, i sl (Burghate i Ingole, 2013 i Bosch-Roig i sar., 2016). Osim toga, neke bakterije iz rodova *Paracoccus*, *Thiobacillus* i *Thiosphaera* proces denitrifikacije mogu obaviti uz korišćenje vodonika ili različitih redukcionih oblika sumpora kao izvora energije, dok bakterije iz rodova *Ferrobacillus*, *Gallionella*, *Leptothrix* i *Sphaerotillus* mogu koristiti gvožđe za autotrofnu denitrifikaciju (Burghate i Ingole, 2013). U pogledu ekonomičnosti i selektivnosti, heterotrofna denitrifikacija pokazuje bolje rezultate u poređenju sa autotrofnom, pa shodno tome ima i veću primenu (Wang i Chu, 2016).

3.3. Aerobna denitrifikacija

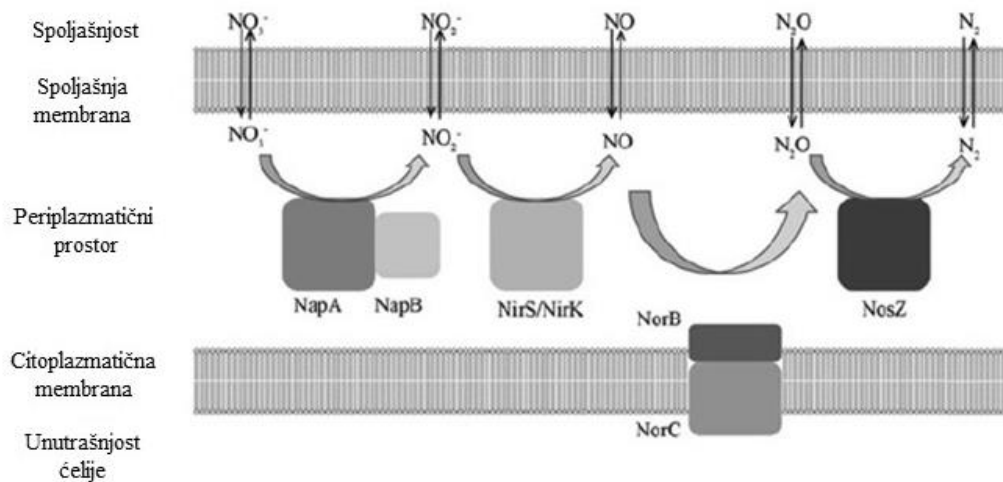
Do skoro se smatralo da se proces denitrifikacije može odvijati isključivo u anaerobnim uslovima posredstvom anaerobnih ili fakultativno anaerobnih mikroorganizama. Međutim, novija istraživanja u oblasti ekološke mikrobiologije posvećena su proučavanju mehanizma aerobne denitrifikacije i izolaciji i karakterizaciji aerobnih denitrifikatora, mikroorganizama koji proces denitrifikacije mogu obavljati i u prisustvu kiseonika (Ji i sar., 2015). Sa aspekta primene, aerobna denitrifikacija je ekonomičnija, jednostavnija i efikasnija u odnosu na anaerobnu, te je zbog toga trenutno u fokusu brojnih istraživanja.

Osnovni koraci u procesu redukcije nitrata do molekuskog azota od strane aerobnih denitrifikatora su sledeći:



3.3.1. Enzimska i genetička priroda denitrifikacije

Svaki korak u procesu denitrifikacije [4] je regulisan delovanjem četiri ključna redukujuća enzima: nitrat-reduktaza (Nap), nitrit-reduktaza (Nir), azot-monoksid-reduktaza (Nor) i azot-suboksid-reduktaza (Nos) (Ji i sar., 2015; Zhao i sar., 2018) (slika 4).



Slika 4. Organizacija denitrifikujućih enzima u ćeliji gram-negativne bakterije (prilagođeno iz rada Ji i sar., 2015)

Svaki proces denitrifikacije započinje redukcijom nitrata, zbog čega prokariotski denitrifikatori moraju imati bar jedan od tri tipa nitrat-reduktaza: disimilacionu nitrat-reduktazu (Nar), periplazmatičnu nitrat-reduktazu (Nap) i/ili asimilacionu nitrat-reduktazu (Nas) (Zhao i sar., 2018). Periplazmatična nitrat-reduktaza je pronađena kod skoro svih predstavnika iz klase *Proteobacteria*. Sposobnost *Paracoccus denitrificans* da katalizuje aerobnu redukciju nitrata ukazala je na korelaciju ove osobine sa aktivnošću Nap pri aerobnim i anaerobnim uslovima. Nap je kodirana na NapFDAGHBC operonu u kome je *napA* gen odgovoran za sintezu katalitičkih podjedinica. Kao terminalna reduktaza Nap proteina, *napA* gen se uobičajeno amplifikuje sa ciljem da se odredi da li je aerobna denitrifikacija katalizovana periplazmatičnom nitrat-reduktazom (Ji i sar., 2015). Dokazano je da Nap ima veliki afinitet prema nitratima, te da se njeno prisustvo može povezati sa visokom efikasnošću mikroorganizma u postupku uklanjanja nitrata (Zhao i sar., 2018). Za razliku od drugih nitrat-reduktaza (Nar i Nas), Nap ispoljava svoju aktivnost i pri aerobnim uslovima, zahvaljujući svom položaju u periplazmatičnom prostoru, te se njeno prisustvo uz ekspresiju *napA* gena mogu smatrati funkcionalnim markerom u identifikaciji aerobnih denitrifikatora (Kraft i sar., 2011; Hunag i sar., 2015).

Redukcija nitrita do azot-monoksida je katalizovana dejstvom dve vrste periplazmatičnih enzima: nitrit-reduktaza sa bakrom (NirK) i nitrit-reduktaza koja sadrži citohrom cd1 (NirS) (slika 4). Iako se prisustvo navedenih enzima često povezuje sa aerobnom denitrifikacijom, postoje indicije da se obe vrste nitrit-reduktaza ne mogu simultano eksprimirati u jednoj

bakterijskoj ćeliji (Ji i sar., 2015; Zhao i sar., 2018). Gen *nirS* je uspešno amplifikovan kod brojnih aerobnih denitrifikujućih sojeva: *Agrobacterium* sp. LAD9 (Chen i Ni, 2012), *Bacillus* YX-6 (Song i sar., 2011), *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 (He i sar., 2015), *Pseudomonas stutzeri* ZF31 (Huang i sar., 2015), *Pseudomonas stutzeri* XL-2 (Zhao i sar., 2018). Nasuprot tome, *nirK* je ređe amplifikovan kod aerobnih denitrifikatora: *Alcaligenes faecalis* JCM20522 i *Hyphomicrobium* sp. NL23 (Ji i sar., 2015).

U trećem koraku denitrifikacije dolazi do redukcije azot-monoksida do azot-suboksida dejstvom azot-monoksid-reduktaza (cNor i qNor). Smatra se da NorB podjedinica ima mogućnost da pri aerobnim uslovima primi elektrone od NorC subjedinice, čime se katalizuje redukcija azot-monoksida do azot-suboksida (slika 4). Ovaj korak se odvija van ćelijske membrane i obično se potvrđuje amplifikacijom *norB* gena. Prisustvo ovog gena potvrđeno je kod aerobnih denitrifikatora kao što su: *Pseudomonas stutzeri* PCN-1 (Zheng i sar., 2014), *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 (He i sar., 2015), *Pseudomonas stutzeri* XL-2 (Zhao i sar., 2018).

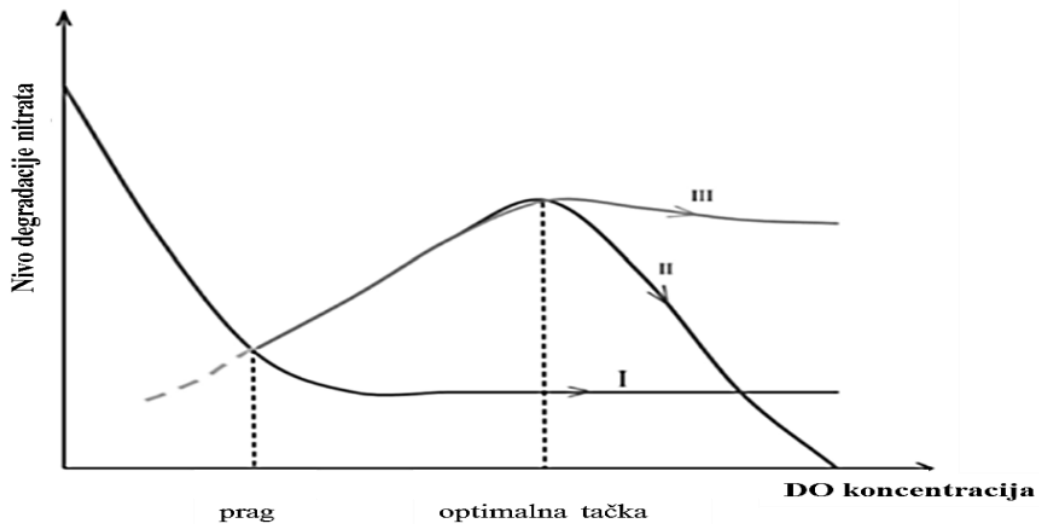
Finalni korak denitrifikacije katalizovan je azot-suboksid-reduktazom (Nos) koja je prisutna u periplazmatičnom prostoru (slika 4). Pretpostavlja se da se aktivnost ovog enzima može značajno smanjiti u prisustvu kiseonika, te se proces denitrifikacije često može zaustaviti na ovom koraku. Kod potpunih aerobnih denitrifikatora može se amplifikovati *nosZ* gen koji ukazuje na mogućnost soja da izvrši redukciju azot-suboksida do molekuskog azota u prisustvu kiseonika. Prisustvo ovog gena zabeleženo je kod sledećih sojeva: *Pseudomonas stutzeri* PCN-1 (Zheng i sar., 2014), *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 (He i sar., 2015), *Pseudomonas stutzeri* XL-2 (Zhao i sar., 2018).

Zbog specifičnog i efikasnog dejstva enzima u slučaju potpunih aerobnih denitrifikujućih mikroorganizama kao krajnji produkt nastaje atmosferski azot, uz produkciju malih količina intermedijera poput N_2O ili NO .

3.3.2. Faktori koji utiču na proces denitrifikacije

Osim aktivnosti enzimskog aparata na proces denitrifikacije utiču brojni spoljašnji faktori kao što su koncentracija rastvorenog kiseonika, izvori ugljenika i C/N odnos, temperatura, pH vrednost, itd.

Jedan od najvažnijih faktora koji direktno utiču na proces denitrifikacije je koncentracija rastvorenog kiseonika (engl. *dissolved oxygen*, DO). Postoje tri moguća tipa odnosa (I-III) između koncentracije DO i brzine redukcije nitrata. Odnos koncentracije DO i brzine redukcije nitrata je karakterističan za svakog aerobnog denitrifikatora, ali generalno postoje tri osnovna tipa odnosa ovih faktora (I-III) (slika 5) (Ji i sar., 2015). U prvom slučaju (I), jasno je da je brzina denitrifikacije veća što je koncentracija DO niža. Međutim, moguće je zapaziti da veća koncentracija gotovo ne utiče na brzinu uklanjanja nitrata, ali se aktivnost denitrifikacionih enzima značajno povećava kada koncentracija DO opadne do određene granične vrednosti, tzv. praga DO. Granične koncentracije DO variraju između mikroorganizama, a mogu se kretati u širokom rasponu od 0,08 do 7,7 mg/L O₂ (Ji i sar., 2015).



Slika 5. Mogući odnosi između koncentracije DO i brzine redukcije nitrata (prilagođeno iz rada Ji i sar., 2015)

Ipak, većina denitrifikatora sledi put denitrifikacije II, dok samo neki putanju III. Brojni denitrifikatori imaju tendenciju da maksimalnu brzinu redukcije nitrata postižu pri određenoj (optimalnoj) koncentraciji DO koja je obično između 3 i 5 mg/L (Ji i sar., 2015). Pri svim nižim i višim koncentracijama DO od optimalne može doći do postepene inaktivacije nitrat-reduktaza što za posledicu ima prestanak procesa denitrifikacije. Ono što je još uvek nepoznanica jeste kakav uticaj na brzinu redukcije nitrata ima koncentracija DO ispod granične vrednosti (predstavljeno isprekidanom linijom na slici 5). Kod značajno manjeg broja denitrifikatora, koji slede putanju III (slika 5), koncentracija DO viša od optimalne ne

utiče značajno na brzinu redukcije nitrata. Klasičan primer denitrifikatora tolerantnih na visoke koncentracije DO su *Pseudomonas stutzeri* YZN-001 (Zhang i sar., 2011), soj 1-1 (Zhu i sar., 2012) i soj X31 (Ji i sar., 2014).

Pored koncentracije rastvorenog DO, dokazano je da prisustvo izvora ugljenika, koji ima dvostruku ulogu (akceptor elektrona i izvor energije), značajno utiče na brzinu procesa denitrifikacije. Naime, potvrđeno je da izvori ugljenika poput glukoze, etanola, metanola i različitih aminokiselina, ubrzavaju proces denitrifikacije i povoljno utiču na prinos biomase (Yang i sar., 2012). Izbor izvora ugljenika koji će se koristiti tokom denitrifikacije uglavnom zavisi od cene i mogućnosti usvajanja datog izvora ugljenika od strane mikroorganizama. Ipak to nije ograničavajući faktor, jer neki denitrifikatori poput *P. stutzeri* 5190 usvajaju čak 51 od 190 ispitivanih izvora ugljenika (Bosch-Roig i sar., 2016). Međutim, za sam proces denitrifikacije je od izuzetnog značaja odrediti optimalnu vrednost C/N odnosa, koji se može opisati kao mera količine elektron donora i elektron akceptora. Kada su vrednosti ovog odnosa izuzetno niske i efikasnost denitrifikacije je niska uz nakupljanje intermedijera (NO_2^- , NO ili N_2O) ili može u potpunosti izostati. Sa druge strane, sa porastom vrednosti C/N odnosa, raste efikasnost denitrifikacije, ali treba imati na umu da nakon završenog procesa zaostaju značajne količine izvora ugljenika (Sobieszuk i Szewczyk, 2006; Krishna Mohan i sar., 2016). Određivanje optimalne vrednosti C/N odnosa je posebno važno u tretmanima otpadnih voda za koje je, zbog heterogenosti sistema, neophodno utvrditi optimalnu vrednost odnosa za svaki sistem posebno. Kod sistema za prečišćavanje otpadnih voda vrednosti C/N odnosa za proces denitrifikacije uglavnom variraju od 1,5 do 5 (Khanitchaidecha i sar., 2010; Krishna Mohan i sar., 2016). Ovaj raspon C/N odnosa se poklapa i sa laboratorijskim istraživanjima u kojima je utvrđeno da pojedini sojevi *P. stutzeri* ostvaruju maksimalnu redukciju nitrata (sa 51, 6 mg/l na 1,2 mg/l) pri C/N odnosu 2,5 (Shivran i sar., 2005).

Odnos između pH vrednosti sredine i procesa denitrifikacije je posebno složen i nedovoljno istražen. Ipak, važi generalno pravilo da pri niskim pH vrednostima sredine brzina denitrifikacije opada, uz povećanu akumulaciju N_2O . Potvrda inhibicije redukcije N_2O do N_2 u kiseloj sredini (pH<5) usled supresije azot-suboksid-reduktaze data je kroz laboratorijske eksperimente sa *Paracoccus denitrificans* (Brenzinger i sar., 2015) i *Pseudomonas mandelii* (Saleh-Lakha i sar., 2009). Osim u eksperimentima sa čistim kulturama, direktan uticaj niske

pH vrednosti na transkripciju denitrifikujućih gena najviše je proučavan u zemljištu (Liu i sar., 2010; Čuhel i sar., 2010) i na ekstraktima ćelija iz zemljišta (Liu i sar., 2014). Optimalna pH vrednost za efikasan proces denitrifikacije je neutralna do blago alkalna, kada kao krajnji produkt nastaje N₂, uz moguće niske koncentracije N₂O (Saleh-Lakha i sar., 2009; Ji i sar., 2015). Tokom denitrifikacije dolazi do povećanja pH vrednosti kao rezultat formiranja alkalnih metabolita i intermedijera (Ji i sar., 2015). Denitrifikacija se može odvijati i u alkalnim sredinama, ali uz produkciju intermedijera (Saleh-Lakha i sar., 2009).

Optimalna temperatura za proces denitrifikacije se nalazi u opsegu od 25 do 37 °C, što je i optimalna temperatura za rast i razvoj mezofila. Na temperaturama ispod 10 °C dolazi do prolongiranja ekspresije gena zaduženih za denitrifikaciju, što utiče na produženje *lag* faze (Saleh-Lakha i sar., 2009). Slično kao i u slučaju niske pH vrednosti, niske temperature inhibiraju aktivnost azotsuboksid-reduktaze, što se negativno odražava na efikasnost procesa denitrifikacije (Ji i sar., 2015). Ipak, pojedini izolati kao što je *Acetivobacter* sp. HA2 mogu vršiti proces denitrifikacije pri temperaturi od 4 °C (Yao i sar., 2013), dok *Bacillus licheniformis* T-7-2 može da raste na temperaturi od 50 °C (Takenaka i sar., 2007).

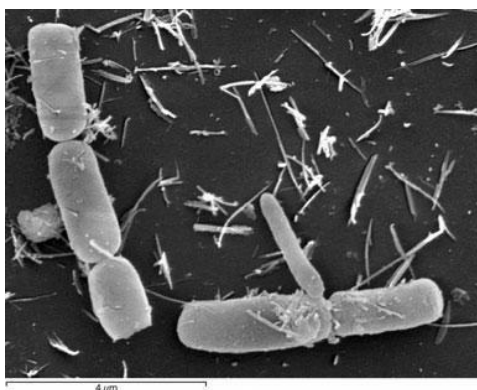
3.3.3. Model mikroorganizam aerobne denitrifikacije – *Pseudomonas stutzeri*

Od svih denitrifikujućih bakterija posebno se izdvaja rod *Pseudomonas*. *P. stutzeri* je jedna od najznačajnijih vrsta ovog roda, pored *P. aeruginosa* i *P. fluorescens*, koja se često označava kao model mikroorganizam u istraživanjima aerobne denitrifikacije. Klasifikacija *P. stutzeri* data je u tabeli 4.

Tabela 4. Klasifikacija *P. stutzeri*

Carstvo	<i>Bacteria</i>
Razdeo	<i>Proteobacteria</i>
Klasa	<i>γ-Proteobacteria</i>
Red	<i>Pseudomonadales</i>
Familija	<i>Pseudomonadaceae</i>
Rod	<i>Pseudomonas</i>
	<i>P. stutzeri</i>
	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>P. chlororaphis</i>
Vrsta	<i>P. fluorescens</i>
	<i>P. pertucinogena</i>
	<i>P. putida</i>
	<i>P. syringae</i>

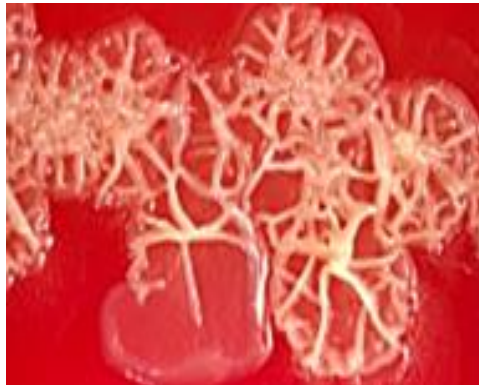
P. stutzeri je štapićasta, gram-negativna bakterija, čije ćelije su dužine 1-3 μm i prečnika 0,5 μm (slika 6). Kolonije ove bakterija su karakteristične po svojim nepravilnim oblicima i različitoj konzistenciji. Mlade kolonije su suve i koherentne, a karakteriše ih naboran izgled, koji je često praćen crvenkasto braon pigmentacijom. Kolonije zapravo liče na kratere sa uzvišenim spoljašnjim ivicama, koje se granaju i spajaju formirajući strukturu koja makromorfološki podseća na korale (slika 7) (Lalucat i sar., 2006; Versalovic i sar., 2011). Međutim, ovi oblici su podložni kolonijalnoj disocijaciji, tj. promeni oblika sa vremenom. Naime, usled čestih presejavanja i uzastopnih kultivacija kolonije postaju glatke, pravilnog kružnog oblika, blede žutih nijansi (Lalucat i sar., 2006). Sve vrste roda *Pseudomonas* su pokretne, te kao predstavnik ovog roda *P. stutzeri* nije izuzetak. Pojedinačne ćelije su aktivno pokretne zahvaljujući polarnoj flageli i pretežno su monotrihne. Kod mladih kultura koje se gaje u složenim medijumima može doći do pojave dve lateralne flagele. Bočne flagele omogućavaju kretanje ćelija u vidu impulsa ili trzaja, ali su veoma osetljive i kratke, te neretko otpadaju. Celokupni način kretanja *P. stutzeri* se može opisati kao hemotaktičan, odnosno odvija se na osnovu hemijskih stimulansa (Lalucat i sar., 2006).



Slika 6. SEM snimak *P. stutzeri* (Ranalli i sar., 2005)

P. stutzeri odlikuje striktno respiratorni metabolizam i pozitivni rezultati katalaza i oksidaza testova. Ne proizvodi fluorescentne pigmente, što je od izuzetnog značaja tokom diferencijacije *Pseudomonas* vrsta. Svi sojevi *P. stutzeri* mogu koristiti nitrata kao akceptore elektrona i na taj način obavljati denitrifikaciju, dok samo pojedini sojevi mogu da razgrađuju naftalin, fenantren i antracen (Lalucat i sar., 2006). Iako većina *Pseudomonas* vrsta proizvodi niz različitih adhezina koji omogućavaju inicijalno vezivanje za supstrat i formiranje biofilma, ova osobina kod *P. stutzeri* nije dovoljno istražena, mada postoje

rezultati koji ukazuju da ova vrsta nema sposobnost stvaranja biofilmova (Abdelkarim i sar., 2009).



Slika 7. Izgled kolonija *P. stutzeri* na krvnom agaru (Versalovic i sar., 2011)

Izuzetna fiziološka i biohemijska raznovrsnost i fleksibilnost sojeva *P. stutzeri* odražavaju se na sposobnost da opstaju i rastu pri različitim uslovima, od mineralizovanih supstrata do supstrata sa oskudnim izvorom ugljenika. Od izvora ugljenika ova vrsta najčešće usvaja D-glukozu, D-manozu, skrob, glicerol, acetat, butirat, izobutirat, propionat, fumarat, glutarat, glikolat i dr. (Lalucat i sar., 2006; Bosch-Roig i sar., 2016). Kao hemolitotrofni mikroorganizam, ima sposobnost oksidacije neorganskih supstrata, što omogućava korišćenje kako organskih tako i neorganskih izvora azota.

Temperaturni opseg rasta *P. stutzeri* je od 4 do 42 °C, dok je optimalna temperatura za rast oko 35 °C. Nijedan od sojeva nije tolerantan na uslove kisele sredine, te je rast inhibiran u sredinama čija je pH vrednost manja od 4,5 usled supresije enzimskih aktivnosti i pucanja plazmatične membrane (Lalucat i sar., 2006). Svi do sad opisani sojevi uglavnom pripadaju grupi aeroba ili fakultativnih anaeroba, koji u prisustvu nitrata, hlorata ili perhlorata mogu koristiti ta jedinjenja kao terminalne akceptore elektrona. S obzirom na opisanu fenotipsku heterogenost, jasno je da se *P. stutzeri* može izolovati iz najrazličitih staništa.

P. stutzeri se najčešće izoluje iz rečnih tokova, mora, sistema za prečišćavanje otpadnih voda, aktivnog mulja i zemljišta gde ima jednu od ključnih uloga u ciklusu kruženja azota i degradaciji pojedinih jedinjenja antropogenog porekla (Tabela 5). Izolacija novih sojeva *P. stutzeri* sa ciljem dobijanja visokoefikasnih potpunih denitrifikatora za primene u najrazličitijim oblastima je u fokusu brojnih istraživanja.

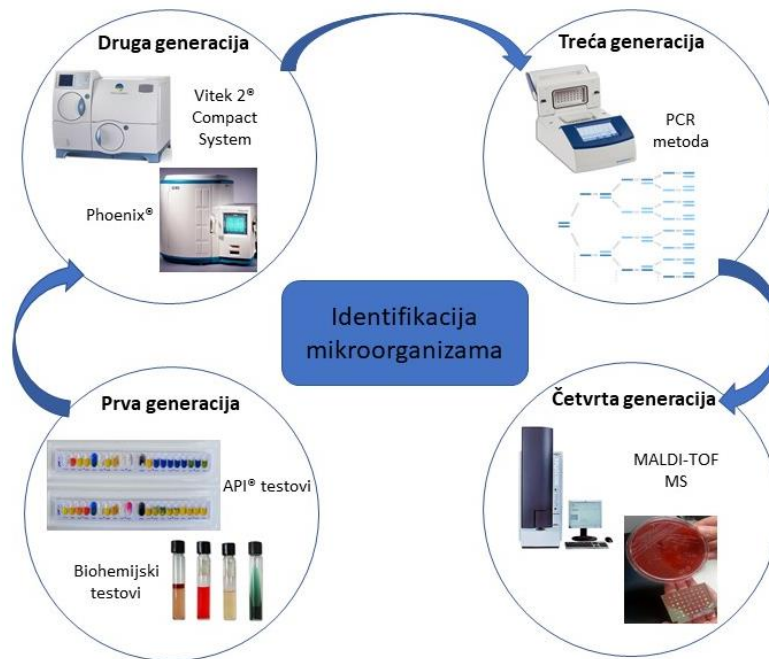
Tabela 5. Pregled mesta izolacije sojeva *P. stutzeri*

Mesto izolacije	Izolat	Literatura
Rečna voda i ribnjaci	<i>P. stutzeri</i> <i>P. stutzeri</i> SC221-M <i>P. stutzeri</i>	Diep i sar., 2009; Deng i sar., 2014; Lv i sar., 2017
Morska voda	<i>P. stutzeri</i> ASM-2-3 <i>P. stutzeri</i>	Kariminiaae-Hamedaanni i sar., 2004; Heinaru i sar., 2016
Rezervoar pijaće vode	<i>P. stutzeri</i> ZF31	Hunag i sar., 2015
Voda iz sistema za obradu otpadnih voda	<i>P. stutzeri</i> WYT1 <i>P. stutzeri</i> C3 <i>P. stutzeri</i> XL-2	Wen i sar., 2010; Ji i sar., 2015; Zhao i sar., 2018
Voda iz iskopa uglja	<i>P. stutzeri</i>	Singh i Tripathi, 2013
Aktivni mulj	<i>P. stutzeri</i> D6	Yang i sar., 2012
Mulj iz sistema za obradu otpadnih voda sa farme svinja	<i>P. stutzeri</i> SU2 <i>P. stutzeri</i> YZN-001	Su i sar., 2001; Zhang i sar., 2011
Zemljište	<i>P. stutzeri</i> A1501 <i>P. stutzeri</i> JX442762	Yan i sar., 2008; Shiyan i Krishnaveni, 2013

Zhang i sar. (2011) su klasifikovali sojeve *P. stutzeri* u tri grupe na osnovu načina denitrifikacije. U prvu grupu spada čak polovina do sada poznatih sojeva koji direktno konvertuju nitrate u molekularni azot bez akumulacije nitrita. Pripadnici druge grupe (oko 25% izolovanih sojeva) proces denitrifikacije obavljaju dvostepeno (preko nitrita), dok kod preostalih izolata nakon procesa denitrifikacije zaostaju nitriti u niskoj koncentraciji.

3.3.4. Odabrane metode identifikacije denitrifikatora

Tradicionalne metode identifikacije bakterija koje uključuju ispitivanje makromorfoloških i mikromorfoloških osobina kultura uz dodatne biohemijske testove su dugotrajne, nepouzdana, subjektivne i često se rezultat identifikacije izražava samo do nivoa roda. Zahvaljujući razvoju i napretku tehnologije i molekularne biologije sada su dostupne brojne automatizovane metode za identifikaciju mikroorganizama. Prema Fernandes Santos i sar. (2013) metode identifikacije se mogu podeliti u četiri generacije (slika 8). Prvoj generaciji pripadaju konvencionalni fenotipski testovi (biohemijski testovi, API® testovi, itd.), dok drugu čine automatizovani fenotipski testovi (Vitek 2®, Phoenix®, itd.). U treću generaciju svrstani su molekularni testovi izvedeni pomoću PCR tehnike, dok najnoviju, četvrtu, generaciju zauzimaju hemotaksonomske metode, tj. MALDI-TOF MS.



Slika 8. Evolucija metoda za identifikaciju mikroorganizama (prilagođeno iz rada Fernandes Santos i sar., 2013)

Jedan od najčešćih modernih načina identifikacije bakterijskih izolata je pomoću Vitek 2[®] Compact System uređaja. Za identifikaciju izolata neophodno je pripremiti suspenziju test mikroorganizma propisane gustine koja se potom unese u odgovarajuće identifikacione kartice, koje se postavljaju unutar aparata. Princip identifikacije zasniva se na nizu biohemijskih reakcija i poređenjem dobijenih rezultata sa bazom podataka unutar softverskog paketa. U zavisnosti od vrste mikroorganizma koji je potrebno identifikovati, rezultati se mogu očekivati u rasponu od nekoliko sati do jednog dana. Najveća mana ovog načina identifikacije je što se na ovaj način mogu identifikovati samo klinički izolati i izolati koji se mogu označiti kao oportunistički patogeni (Spanu i sar., 2003; Lowe i sar., 2006), stoga je upotreba Vitek 2 Compact System uređaja ograničena u pogledu identifikacije denitrifikujućih bakterija, ali se ipak može koristiti (Etchebehere i sar., 2001; Etchebehere i sar., 2002).

Lančana reakcija polimerizacije – PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) je postala nezaobilazna molekularna metoda identifikacije u savremenim mikrobiološkim istraživanjima. Princip PCR metode zasniva se na hibridizaciji specifičnih oligonukleotida (prajmera) i sintezi kopija željenog fragmenta koji je obeležen datim prajmerima u *in vitro* uslovima uz praćenje gel elektroforezom (Garibyan i Avashia, 2013). Za izvođenje ove

metode, neophodno je, pored PCR uređaja, obezbediti odgovarajuće prajmere i kitove sa potrebnim reagensima. U uređaju PCR reakcija se izvodi ponavljanjem 20-30 ciklusa od kojih se svaki sastoji iz tri osnovne faze:

- (1) Zagrevanje – pri kom se reakciona smeša dovodi do temperature od 94-96 °C usled čega dolazi do raskidanja dvostruke zavojnice DNK molekula;
- (2) Hlađenje – tokom kog se temperatura reakcione smeše spušta na 40-60 °C, što omogućava vezivanje prajmera za željeni fragment jednolančanog DNK molekula;
- (3) Zagrevanje – na oko 72 °C kako bi se omogućilo aktiviranje *Taq* polimeraze i započinjanje reakcije polimerizacije.

PCR metoda se pokazala kao relativno brza, pouzdana i efikasna metoda identifikacije svih grupa mikroorganizama. Takođe, mogućnost identifikacije nekulturable sojeva, dakle direktno iz ispitivanog uzorka (voda, zemljište, krv, itd), ovoj metodi daje značajnu prednost u oblasti molekularne biologije. Osim za identifikaciju izolata denitrifikatora pomoću 16S rRNK, PCR metoda se često koristi za detekciju prisustva denitrifikujućih gena (posebno *napA*, *nirS*, *norB* i *nosZ*) na osnovu kojih se može pretpostaviti mogući tok procesa denitrifikacije (Rezaee i sar., 2010; Zheng i sar., 2014; Huang i sar., 2015). Ipak, postojanje gena ne mora ujedno označavati i njihovu aktivnost. Ekspresija odgovarajućih gena se može pratiti pomoću *real-time* PCR metode, ali ova metoda je izuzetno zahtevna i skupa, te se retko primenjuje u istraživanjima vezanim za ispitivanje procesa denitrifikacije (Geets i sar., 2007; Huang i sar., 2011). Iako je PCR metoda postala nezamenljiva u mikrobiološkim istraživanjima, ipak ima i nekoliko mana. Naime, da bi se PCR reakcija izvela na pravilan način često je neophodno optimizovati uslove reakcije, što zahteva dosta vremena. Osim toga, visoka cena kitova neophodnih za izvođenje reakcije utiče na visoku cenu analize.

Osim fenotipskih i molekularnih metoda za identifikaciju denitrifikatora se mogu upotrebiti i hemotaksonomske metode koje klasifikuju mikroorganizme na osnovu sličnosti i razlika u hemijskim markerima (proteini, lipidi, itd.). Trenutno najaktuelnija hemotaksonomska metoda za identifikaciju mikroorganizama je masena spektrometrija zasnovana na matricom potpomognutom laserskom desorpcijom/ionizacijom – MALDI MS (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*). Princip MALDI tehnike je zasnovan na bombardovanju uzorka laserskim snopom čime se postiže jonizacija i desorpcija (analit prelazi iz tečnosti u gas uz otparavanje) bez ikakve hemijske degradacije analita. Količina

uzorka koja je potrebna za analizu je oko 1 μl koji se meša sa jednakom količinom odgovarajućeg matriksa koji ima ulogu rastvarača analita. Matriks je obično organski rastvarač koji ima mogućnost apsorbovanja UV zračenja na talasnoj dužini lasera. Nakon nanošenja matriksa preko analita, matriks isparava za nekoliko sekundi prilikom čega dolazi do njegove kristalizacije, što za posledicu ima zarobljavanje dispergovanih molekula analita. Na pripremljeni uzorak deluje se laserskim snopom usled čega energiju lasera apsorbuju molekuli matriksa koji je potom transformišu u toplotnu energiju, te dolazi do izbacivanja jona analita i matriksa sa ploče na koju su prethodno naneti. MALDI MS je najčešće povezan sa TOF (engl. *Time of Flight*) analizatorom. Princip rada TOF analizatora zasniva se na razdvajanju jona nastalih usled laserske jonizacije na osnovu različitog vremena potrebnog da različiti joni pređu definisano rastojanje do detektora u električnom polju. Što su joni veći, vreme potrebno da dospeju do detektora je duže i obrnuto. Maseni spektar se na kraju dobija akumulacijom izlaznog signala u zavisnosti od vremena, nakon čega se ta vrednost konvertuje u m/z vrednost. Identifikacija mikroorganizama se do kraja najčešće sprovodi poređenjem dobijenog masenog spektra sa postojećim spektrima u bazi podataka (Singhal i sar., 2015). Cherkaoui i sar. (2010) su u svojim istraživanjima izračunali da je prilikom identifikacije jednog mikroorganizma od momenta kontakta sa matriksom do dobijanja rezultata identifikacije u proseku protekne najviše pet minuta, a da je kompletan trošak jedne analize oko 0,5 američkih dolara.

3.3.5. Primena aerobne denitrifikacije

Zahvaljujući metaboličkim predispozicijama aerobnih denitrifikujućih mikroorganizama, aerobna denitrifikacija se može odvijati pri promenljivim koncentracijama kiseonika, odnosno u gotovo svim prirodnim ekosistemima. Ova činjenica otvara širok spektar mogućnosti primene procesa aerobne denitrifikacije.

Generalno, denitrifikacija i nitrifikacija predstavljaju osnovne postupke prilikom konvencionalne biološke obrade otpadnih voda, pored biooksidacije, postupaka uklanjanja fosfata i obrade nastalog mulja. Tokom obrade otpadnih voda nitrifikacija se podrazumeva kao aerobni, a denitrifikacija kao anaerobni proces koji se odvijaju u šaržnim ili kontinualnim reaktorima. Međutim, pojedini denitrifikatori imaju sposobnost simultane heterotrofne nitrifikacije i aerobne denitrifikacije, poput *Pseudomonas stutzeri* KTB (Zhou i sar., 2014) i

Acetivobacter sp. SYF26 (Su i sar., 2015). Duan i sar. (2015) pokazali su da *Vibrio diabolicus* SF16 takođe ima sposobnost simultane nitrifikacije i aerobne denitrifikacije čak i u otpadnim vodama sa visokim salinitetom. Osim toga, nedavno je potvrđeno da dodatak ćelija aerobnog denitrifikatora, *Pseudomonas* sp., aktivnom mulju u membranskom bioreaktoru povećava efikasnost uklanjanja ukupnog azota za oko 30 % u odnosu na aktivan mulj bez dodatih ćelija (Guo i sar., 2017). Takođe, Kang i sar. (2015) su svojim eksperimentima pokazali da *P. aeruginosa* R12 uklanja 97% ukupnog azota tokom tretmana otpadne vode kožne industrije. Do sada postignuti rezultati u obradi otpadnih voda primenom aerobnih denitrifikatora otvaraju mogućnosti za primenu aerobnih denitrifikatora u tretmanima otpadnih tokova različitih grana industrije.

Osim u postupku uklanjanja nitrata iz otpadnih voda, denitrifikatori mogu naći značajnu primenu u uklanjanju policikličnih aromatičnih ugljovodonika i ostataka nafte kako iz vodene sredine (Feijoo- Siota i sar., 2008), tako i iz zemljišta (Galazka i sar., 2012). Neki sojevi poput *P. stutzeri* CMG 463 osim procesa denitrifikacije imaju sposobnost uklanjanja teških metala iz različitih ekosistema (Badar i sar., 2013). Mikroorganizmi mogu smanjiti toksičnost teških metala ili ih potpuno ukloniti iz ekosistema pomoću nekih od sledećih mehanizama: biosorpcija, bioakumulacija, bioprecipitacija ili biotransformacija. Pod terminom biosorpcija podrazumeva se pasivno usvajanje teških metala, tj. adsorpcija teških metala za površinu odumrlih ćelija. Nasuprot tome, mehanizam bioakumulacije zasniva se na prolasku teških metala kroz ćelijsku membranu i nakupljanje istih unutar ćelije gde bivaju aktivno uključeni u metabolički ciklus. Takođe, pojedini produkti metabolizma mikroorganizama tokom postupka bioprecipitacije mogu reagovati sa jonima teških metala pri čemu dolazi do formiranja precipitata koji su manje toksični ili nisu uopšte toksični. Mehanizam biotransformacije teških metala zasniva se na metaboličkoj aktivnosti mikroorganizama tokom koje dolazi do prelaska toksičnog oblika teških metala u netoksičan najčešće putem oksidaciono/redukcionih reakcija (Shukla i sar., 2017).

Zahvaljujući visokoj efikasnosti u uklanjanju nitrata iz različitih ekosistema, denitrifikujući mikroorganizmi su postali tema istraživanja i u oblasti zaštite materijala kulturne baštine (Ranalli i sar., 2005). Naime, svi materijali su od trenutka eksploatacije direktno izloženi uticaju različitih faktora spoljašnje sredine – ciklusi zamrzavanja/odmrzavanja, uticaj sunca, vetra, vlage, mikroorganizama, antropogeno dejstvo, itd. (Vučetić, 2017). Poslednjih

decenija, usled napretka i razvoja industrijalizacije dolazi do promena u sastavu atmosfere, u smislu stvaranja agresivnijeg okruženja, koje direktno utiču na pojavu različitih oblika degradacije građevinskih materijala, uključujući i materijale kulturne baštine. Jedan od najznačajnijih oblika degradacije građevinskih materijala je degradacija izazvana dejstvom soli (Vučetić i sar., 2017, Markov i sar., 2018).

Konvencionalne metode za uklanjanje soli sa građevinskih objekata obuhvataju hemijske i fizičke metode kao što su peskarenje, voda pod pritiskom, organski rastvarači, itd., međutim ove metode su često neefikasne, agresivne, neselektivne i ekološki neprihvatljive. Krajem prošlog veka započeto je sa istraživanjem u oblasti primene mikroorganizama u cilju uklanjanja soli i drugih oblika oštećenja materijala kulturne baštine (Maier i sar., 2000; Capitelli i sar., 2007).

Polazno stanovište za korišćenje vijabilnih ćelija mikroorganizama u konzervaciji i prezervaciji građevinskih materijala i materijala kulturne baštine je njihova ubikvitarnost i mogućnost kolonizacije materijala u različitim okruženjima (Maier i sar., 2000). Prva istraživanja vezana za upotrebu mikroorganizama u cilju sprečavanja eflorescencije (isoljavanja) na građevinskim materijalima započeta su krajem prošlog veka. S obzirom da se uklanjanje naslaga soli odvija posredstvom živih organizama, postupak je dobio naziv biočišćenje (engl. *biocleaning*). Pod terminom biočišćenje podrazumeva se primena vijabilnih ćelija mikroorganizama ili njihovih enzima u cilju uklanjanja različitih depozita i oblika degradacije koji se javljaju na građevinskim materijalima. Ova biološka metoda je veoma efikasna, a pri tome je bezbedna po okolinu i zdravlje operatera i ne dovodi do dodatne degradacije materijala (Capitelli i sar., 2007; Kohli, 2013).

Da bi biočišćenje moglo da se pravilno i što efikasnije izvede neopodno je izabrati pogodan mikroorganizam i adekvatan nosač (potporu) (Bosch-Roig i sar., 2014). Nepatogenost je osnovni uslov koji svaki mikroorganizam, kandidat za postupak biočišćenja, mora da ispuni. Takođe, pre primene, potrebno je ispitati efikasnost odabranog soja u uklanjanju neželjenih depozita na laboratorijskom nivou, uz dodatnu potvrdu da aplikacija odabranog mikroorganizma ne podstiče dalju degradaciju materijala. Kako bi mikroorganizmi očuvali svoju aktivnost tokom trajanja biočišćenja, neophodno je odabrati pogodan nosač, čiji je glavni zadatak obezbeđivanje optimalnih mikroekoloških uslova za vijabilnost ćelija. Prema Bosch-Roig i sar. (2014), idealan nosač bi trebalo da:

- u svom matriksu zadržava ćelije i dovoljnu količinu vode u što dužem vremenskom periodu,
- ima strukturu koja omogućava njegovu aplikaciju na svim tipovima površina (horizontalnim, vertikalnim, hrapavim, glatkim, itd.) i
- se jednostavno priprema, nanosi i uklanja sa površina.

Izbor nosača za primenu u postupku biočišćenja direktno zavisi od vrste mikroorganizma koji će se koristiti, tipa površine na koju će se nanositi, kao i od površinskih karakteristika materijala koji je potrebno očistiti (Vučetić i sar., 2017).

Za razliku od klasičnih primena denitrifikatora u procesima bioremedijacije zemljišta i vodenih ekosistema, upotrebu ovih mikroorganizama u oblasti biočišćenja materijala kulturne baštine prate brojne, nedovoljno proučene specifičnosti, kao što su: (1) nemogućnost unošenja hranljivih podloga za umnožavanje ćelija, što direktno utiče na kratku i ograničenu aktivnost sojeva, (2) problem održavanja vijabilnosti i vitalnosti ćelija, ali i (3) uticaj površinskih karakteristika materijala koji je potrebno tretirati i nosača mikroorganizama.

Iako je postupak biočišćenja relativno nov u oblasti zaštite materijala kulturne baštine, brojna istraživanja potvrđuju visoku efikasnost u uklanjanju soli i drugih depozita sa različitih vrsta materijala na laboratorijskom nivou ili na ograničenim zonama objekata (Tabela 6). Ipak, za potrebe biočišćenja u većim razmerama (npr. kompletni objekti kulturne baštine) neophodno je da se proizvede dovoljno biomase denitrifikatora.

Tabela 6. Primeri uspešno primenjenog postupka biočišćenja

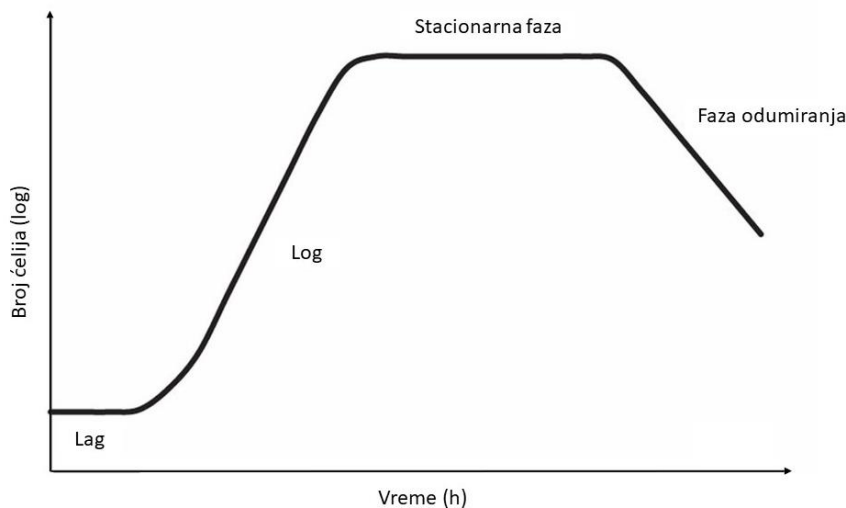
Vrsta oštećenja	Materijal	Mikroorganizam	Nosač	Efikasnost (%)	Literatura
Eflorescencija (nitrati)	Freska	<i>P. stutzeri</i> DSMZ 5190	Agar	92	Bosch-Roig i sar., 2013
Eflorescencija (nitrati)	Opeka i stenski materijal	<i>P. stutzeri</i>	Sepiolit	94 – opeka 100 – stenski materijal	Ranalli i sar., 1996
Eflorescencija (nitrati i sulfati)	Peščar	<i>P. pseudoalcaligenes</i> i <i>D. vulgaris</i>	Carbogel	55 – nitrati 85 – sulfati	Alfano i sar., 2011
Crna kora	Mermer	<i>D. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	Carbogel, sepiolit, Hidrobiogel	98	Cappitelli i sar., 2006
Lepak	Freska	<i>P. stutzeri</i> A29	Vata	80-100	Ranalli i sar., 2005

3.4. Biotehnoška proizvodnja biomase

Na početku svake biotehnoške proizvodnje neophodno je obezbediti: adekvatan soj mikroorganizma, sirovine za pripremu hranljive podloge, optimizovati uslove proizvodnje (sastav hranljive podloge i vrednosti procesnih parametra), bioreaktore i uređaje za izdvajanje i prečišćavanje proizvoda. Proizvodi mikrobiološke sinteze se mogu podeliti na tri glavne kategorije: (1) ćelije mikroorganizama (biomasa), (2) polimeri velikih molekulskih masa i (3) jedinjenja malih molekulskih masa (primarni i sekundarni metaboliti) (Baras i sar., 2009).

Osnovni cilj svake biotehnoške proizvodnje biomase je da se za što kraće vreme dobije što veći broj ćelija. Prinos biomase tokom bioprocesa je usko povezan sa produktivnosti sistema, bilo da je krajnji cilj samo umnožavanje biomase ili neka biotransformacija. Prinos biomase se indirektno može pratiti kroz broj ćelija u zavisnosti od vremena. Ukoliko se prati rast mikroorganizama u zavisnosti od vremena dobija se takozvana kriva rasta (slika 9), na kojoj se mogu jasno zapaziti četiri faze: *lag*, eksponencijalna (*log*), stacionarna i faza odumiranja (Wang i sar., 2015). Tokom *lag* faze dolazi do fiziološkog prilagođavanja mikroorganizama na uslove hranljive podloge. Na *lag* fazu se nadovezuje *log* faza koja je karakteristična po eksponencijalnoj brzini rasta mikroorganizama, odnosno najbržem prirastu biomase za date uslove. Kada je cilj biotehnoškog procesa umnožavanje biomase,

proces treba prekinuti na početku stacionarne faze. U ovoj fazi ne postoji prirast biomase, jer je broj novonastalih ćelija jednak broju onih koji odumiru. Mikroorganizmi prelaze iz *log* u stacionarnu fazu usled utroška nutrijenata iz hranljive podloge, ali i zbog nagomilavanja metaboličkih produkata koji mogu biti ometajući faktori za dalji rast. Posle stacionarne faze sledi faza odumiranja za koju je karakterističan veći broj odumrlih ćelija u odnosu na novonastale (Markov, 2012).



Slika 9. Kriva rasta mikroorganizama

Da bi se biomasa denitrifikatora uspešno proizvodila u većim razmerama, neophodno je najpre optimizovati sastav hranljive podloge za proizvodnju biomase, kao i vrednosti procesnih parametra (temperatura, pH vrednost, mešanje, itd.). Kompletan proces optimizacije se obično sprovodi na laboratorijskom nivou, a tek po definisanju svih potrebnih parametara se prelazi na proizvodnju u većim razmerama. Međutim, uticaj bioprocenih parametara na dobijanje biomase denitrifikatora sa ciljem buduće poluindustrijske ili industrijske proizvodnje do sada nije bio predmet intenzivnih naučnih istraživanja.

3.4.1. Definisane sastava hranljive podloge

Definisane sastava hranljive podloge je jedan od najznačajnijih parametara koji se analizira u biotehnoškim procesima, kako zbog snabdevanja mikroorganizama nutrijentima potrebnim za normalno funkcionisanje, tako i zbog troškova proizvodnje. Naime, procenjuje

se da cena hranljivih podloga u biotehnološkim procesima može iznositi 30-40% troškova proizvodnje (Batista i Fernandes, 2015). Osnovni korak u definisanju sastava hranljive podloge za umnožavanje biomase je izbor izvora ugljenika i azota i određivanje C/N odnosa.

Iako izvori ugljenika uglavnom predstavljaju kvantitativno glavnu komponentu hranljivih podloga, u slučaju denitrifikatora izvori ugljenika se najčešće dodaju u minimalnim količinama kako bi ubrzali proces denitrifikacije i ujedno bili donori elektrona u procesu aerobne respiracije (Zhu i sar., 2015). Kao izvor azota denitrifikatori mogu usvajati razna jedinjenja (Bosch-Roig i sar., 2016), ali bi kao komponentu hranljive podloge za umnožavanje biomase denitrifikatora trebalo izabrati onaj izvor N-atoma koji je dominantno prisutan na mestu buduće primene dobijene biomase. Na taj način, dobijena biomasa tokom postupka primene neće imati dugu lag fazu, odnosno fazu prilagođavanja, što značajno utiče na efikasnost procesa denitrifikacije. Hranljive podloge za standardne biotehnološke procese, pored izvora ugljenika i azota, sadrže i izvore fosfora, kalijuma, sumpora, ali i vitamine, faktore rasta itd. (Markov, 2012) Uzimajući u obzir da denitrifikatori mogu da rastu i razvijaju se u nutritivno siromašnim sredinama (Lalucat i sar., 2006), hranljiva podloga za umnožavanje njihove biomase bi trebalo da bude što jednostavnija kako bi proces umnožavanja bio jednostavan za izvođenje, a celokupan postupak ekonomski opravdan. Osim izbora pogodnih komponenti hranljive podloge važno je odrediti i njihovu optimalnu koncentraciju. Optimalna koncentracija komponenti u hranljivoj podlozi bi trebalo da ispuni dva uslova: postizanje maksimalnog prinosa biomase ili željenog proizvoda i minimalno zaostajanje hranljivih sastojaka u tečnosti po završetku kultivacije. Naime, bez obzira na postignut visok prinos željenog proizvoda, izuzetno je značajno da fermentaciona tečnost nakon završenog bioprocasa bude minimalno opterećena kako se ne bi narušavao balans nutrijenata u vodenim ekosistemima.

3.4.2. Izbor procesnih parametara od značaja

Kao i za sve druge biotehnološke procese, osim sastava hranljivih podloga, neophodno je optimizovati i vrednosti procesnih parametara značajnih za dati proces. Procesni parametri koji direktno utiču na rast i razvoj mikroorganizama su temperatura, pH vrednost, intenzitet mešanja, aeracija i veličina inokuluma.

S obzirom da većina aerobnih denitrifikatora toleriše i aerobne i anaerobne uslove (Lalucat i sar., 2006; Ji i sar., 2015), aeracija kao procesni parametar nije značajan za proizvodnju biomase, pa samim tim intenzitet mešanja kultivacione tečnosti treba biti minimalan, tek da se obezbedi jednaka raspodela hranljivih sastojaka u zapremini suda.

Opšte je poznato da temperatura bitno utiče na brzinu hemijskih reakcija, a samim tim i na brzinu rasta mikroorganizama (Baras i sar., 2009). Svi mikroorganizmi imaju karakterističnu optimalnu temperaturu, tačnije temperaturni opseg, pri kom je rast najintenzivniji. Povećanje ili smanjenje temperature negativno utiče na metaboličke aktivnosti, kaskadno ih usporavajući sve do potpunog zaustavljanja (Gajin i sar., 2007).

Pored temperature, vrednost pH predstavlja jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na prinos biomase, tako što direktno ograničava dostupnost ugljenika i drugih nutrijenata. Takođe, vodonični joni reaguju sa brojnim enzimima u ćelijskom zidu, pri čemu dolazi do njihove konformacijske promene, kao i do promene toka biohemijskih reakcija katalizovanih od strane tih enzima (Baras i sar., 2009). Ekstremne pH vrednosti uzrokuju ireverzibilnu denaturaciju proteina, što za posledicu ima inhibiciju rasta mikroorganizama.

Kada je cilj podići nivo proizvodnje biomase ili željenog proizvoda sa laboratorijskog na poluindustrijski i industrijski nivo, veličina inokuluma predstavlja veoma značajan parametar u tehnokonomskom pogledu. Inokulum predstavlja početnu suspenziju mikroorganizama kojom se zasejavaju reakcioni sudovi u biotehnološkoj proizvodnji. U većini slučajeva veličina inokuluma iznosi oko 10% od zapremine bioreaktora, ali on može varirati u zavisnosti od vrste bioprocasa (Baras i sar., 2009). Pojedine studije pokazuju da veličina inokuluma ima jako mali uticaj na prinos biomase ili ga uopšte nema, ali da ima značajan uticaj na produženje *lag* faze kada je početan broj ćelija mali (oko 10 CFU/ml), odnosno na skraćenje *lag* faze pri većoj početnoj koncentraciji ćelija (Bidlas i sar., 2008). Iako veličina inokuluma u većini slučajeva nema značajan efekat na prinos biomase, neophodno je optimizovati

njegovu vrednost pri prelasku proizvodnje u veće razmere kako bi bioproces bio jednostavniji, efikasniji i jeftiniji.

3.4.3. Proizvodnja biomase u uvećanim razmerama

Optimizacija industrijskih bioprocasa i povećanje razmere proizvodnje imaju za cilj obezbeđivanje visokog prinosa željenog proizvoda ili biomase konzistentnog kvaliteta u optimalnim i homogenim reakcionim uslovima u kojima se smanjuje izloženost mikrobnih ćelija stresu, a povećava metabolička aktivnost (Schmidt, 2005). Pod povećanjem razmere bioreaktora (engl. *scale up*) podrazumeva se povećanje veličine bioreaktora počevši od laboratorijskog, preko poluindustrijskog, do industrijskog nivoa (Baras i sar., 2009).

S obzirom da su bioprocesi multivarijabilni, za svaki proizvod, proces i postrojenje mora postojati posebna strategija za razvoj proizvodnje u uvećanim razmerama. Bez obzira na tip biotehnološke proizvodnje, strategija za povećanje razmere proizvodnje obuhvata detaljnu karakterizaciju kompletnog procesa, uključujući biokatalizatore i parametre koji utiču na prinos proizvoda i njegov kvalitet (Schmidt, 2005). Važan korak u biotehnologiji predstavlja identifikaciju najrelevantnijih parametara procesa i podešavanje njihove optimalne vrednosti kako bi, kao parametri povećanja razmere bioprocasa, mogli biti održavani konstantni što je duže moguće. Povećanje razmere bioreaktora se može smatrati uspešnim ukoliko je u većim razmerama postignut veći ili pak održan isti prinos proizvoda ili biomase kao na laboratorijskom nivou (Schmidt, 2005).

Tokom faze razvoja nekog bioprocasa i prikupljanja prvih rezultata, bioproces se može unaprediti modelovanjem, tj. može se definisati matematičkim jednačinama koje na različite načine mogu biti obrađivane, a sam proces simuliran u nekim od dostupnih softverskih paketa. Rezultati modelovanja i simulacije procesa mogu ukazati na postojanje grešaka tokom vođenja procesa, a često se koriste i za optimizaciju i procenu održivosti sistema (Vučurović i sar., 2012).

3.4.4. Modelovanje i optimizacija biotehnoloških procesa

Optimizacija biotehnoloških procesa treba da se sprovodi u svim fazama procesa. Postupkom optimizacije postiže se odvijanje procesa u uslovima koji obezbeđuju najviši

prinos željenog proizvoda. Optimizacija bilo kog procesa direktno utiče na smanjenje troškova, a samim tim i održanjem proizvodnje. Prilikom optimizacije biotehnoloških procesa mogu se koristiti tradicionalne ili moderne metode.

Jedna od najstarijih, ali i dalje korišćenih strategija tokom planiranja eksperimenata je ispitivanje uticaja pojedinačnih faktora na neki proces (engl. *one-factor-at-a-time technique*). Ovaj način postavke eksperimenata je veoma jednostavan, ali zahteva mnogo manuelnog rada, pri čemu se često izvede mnogo veći broj eksperimenata od zaista potrebnog. Ipak, najveći nedostatak ove tehnike je nemogućnost praćenja interakcija između različitih faktora, pa se ne dobija kompletan uticaj faktora na proces (Cavazzuti, 2013).

Kao alternativa tradicionalnom pristupu planiranja eksperimenata, sve češće su u upotrebi matematički i statistički modeli. Jedna od najaktuelnijih tehnika za modelovanje i optimizaciju bioprocasa je postupak odzivne površine uz primenu različitih tipova eksperimentalnog dizajna (Cavazzuti, 2013; Granato i de Araújo Calado, 2014).

3.4.4.1. Postupak odzivne površine

Postupak odzivne površine (engl. *Response Surface Method*, RSM) se može definisati kao skup matematičkih i statističkih postupaka koji se primenjuju za formiranje empirijskih modela i analizu procesa. Primenom odzivne površine uz prethodno pažljivo odabran eksperimentalni plan, moguće je optimizovati odzive sistema (y) koji direktno zavise od nekoliko nezavisno promenljivih parametara (x_1, x_2, \dots, x_k), čime se redukuje broj potrebnih eksperimenata (Morshedi i Akbarian, 2014).

Glavna prednost primene postupka odzivne površine je mali broj potrebnih eksperimentalnih podataka za ostvarivanje dovoljnog broja informacija koje obezbeđuju statistički validne rezultate. Pored toga, RSM jednačine opisuju nezavisno promenljive parametre sistema i njihov individualan uticaj na odziv sistema, međuzavisnosti ispitivanih promenljivih, kao i kombinovane uticaje nezavisno promenljivih na odabrane odzive sistema, što čini ovaj postupak veoma efikasnim.

Zavisnost između odziva sistema (zavisno promeljivih) i variranih faktora (nezavisno promeljivih) se može predstaviti u opštem obliku kao:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon$$

Gde su:

y – odziv sistema (analizirani parametar),
f – funkcija sistema,
 x_1, x_2, x_k – varirani faktori (ispitivani faktori),
k – broj variranih faktora i
 ε – statistička greška.

Prikazana jednačina se naziva funkcija odziva, dok je njen geometrijski prikaz odzivna površina. Odzivi sistema se grafički mogu predstaviti u vidu prostornih površina ili preko dvodimenzionalnih konturnih grafika (Cox i Reid, 2000; Montgomery i Runger, 2003).

Postupak odzivne površine je do sada uspešno primenjen u brojnim istraživanjima kao alat za modelovanje i optimizaciju sastava hranljivih podloga, tako i za procesne parametre (Martinez-Toledo i Rodriguez-Vazquez, 2011; Hwang i sar., 2012, Peng i sar., 2014; Rončević i sar., 2014; Yang i sar., 2014; Batista i Fernandes, 2015).

3.4.4.2. Izbor eksperimentalnog dizajna

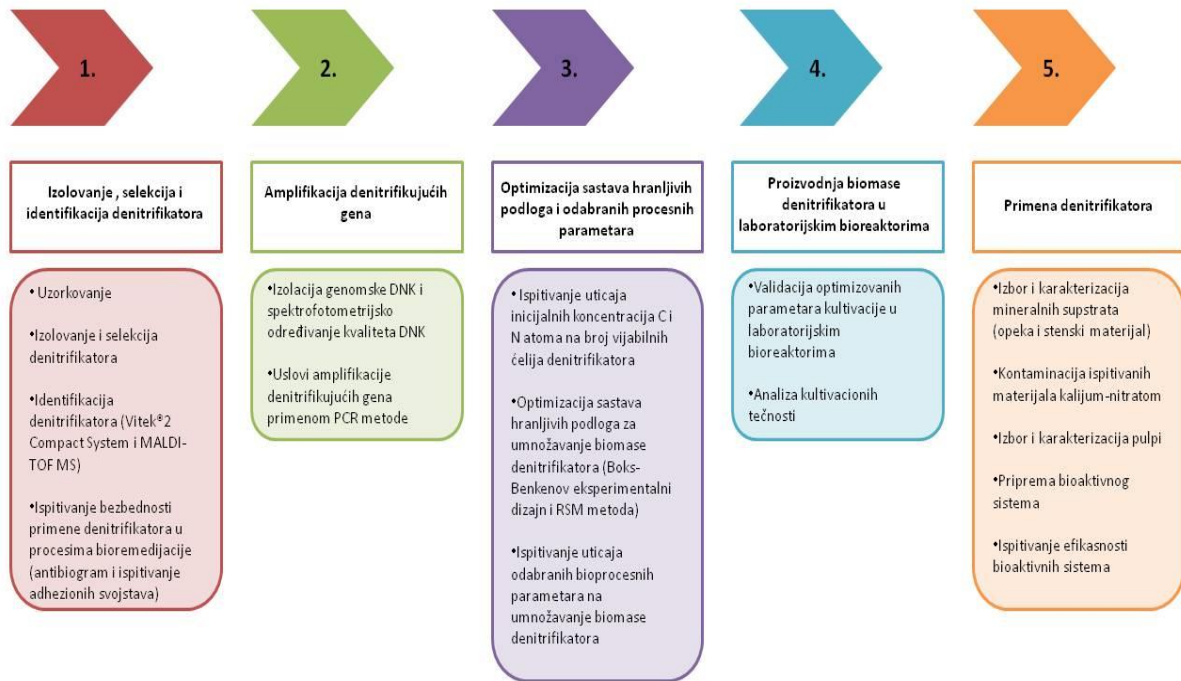
Eksperimentalni dizajn se može definisati kao planirani pristup nekom naučnom problemu koji ima za cilj da se utvrdi uzročno-posledična veza između zavisnih i nezavisnih parametara nekog procesa. U zavisnosti od posmatranog procesa bira se jedan od najčešće korišćenih tipova eksperimentalnog dizajna: centralni kompozitni dizajn, potpuni eksperimentalni dizajn, Plaket-Burmanov dizajn, Boks-Benkenov dizajn, itd. Kada je cilj istraživanja ispitivanje osnovnih interakcija u posmatranom sistemu i definisanje regresionog modela, odnosno polinoma prvog reda, u tom slučaju se najčešće bira potpuni eksperimentalni dizajn. Ukoliko je problem složeniji, tj. kada je potrebno optimizovati neki proces i ispitati uzročno-posledične veze između zavisno i nezavisno promeljivih veličina, koriste se polinomi drugog reda. U tom slučaju se koriste centralni kompozitni, Plaket-Burmanov ili Boks-Benkenov dizajn, pri čemu svaki od nezavisnih faktora mora biti definisan sa tri ili pet nivoa vrednosti u zavisnosti od izabranog dizajna (Morshedi i Akbarian, 2014).

U biotehnološkim procesima uobičajeno se koristi Boks-Benkenov dizajn tokom kog se tri odabrana faktora variraju na tri nivoa sa tri ponavljanja u centralnoj tački, pri čemu je

potrebno izvesti ukupno 15 eksperimenata. Osnovna prednost ovog dizajna je što ne uključuje kombinacije faktora u kojima su svi faktori na maksimalnom ili minimalnom nivou, pa se ekstremni eksperimentalni uslovi ne uzimaju u obzir što doprinosi kvalitetu dobijenih rezultata.

4. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije se sastojao iz pet faza koje su prikazane na slici 10. U ovom poglavlju detaljno su navedeni materijali, metode i uređaji korišćeni za postavljanje i praćenje eksperimenata u svakoj fazi.



Slika 10. Šematski prikaz faza eksperimentalnog postupka

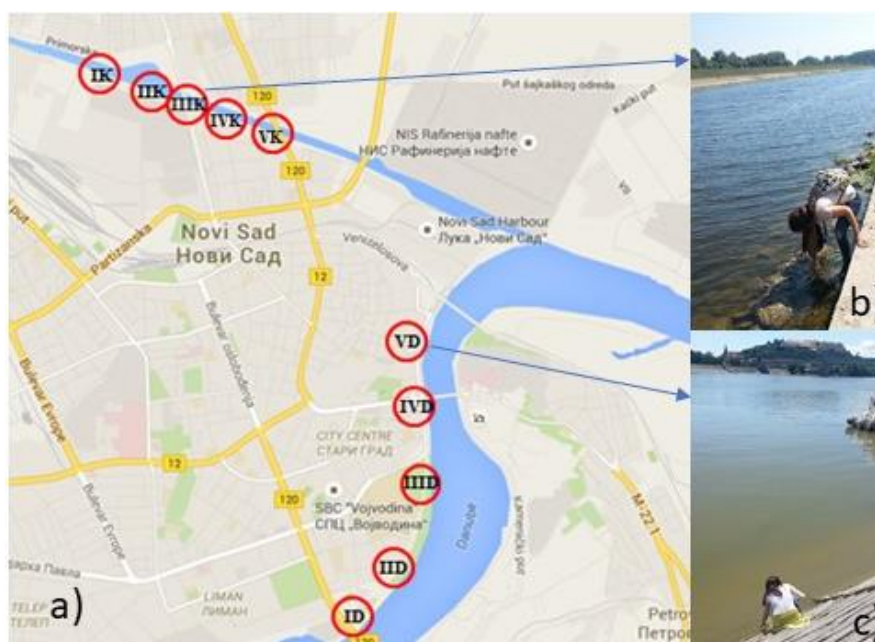
Eksperimentalna istraživanja izokvira ove doktorske disertacije su realizovana u Laboratoriji za mikrobiologiju, Laboratoriji za biohemijsko inženjerstvo i Laboratoriji za ispitivanje materijala u kulturnom nasleđu na Tehnološkom fakultetu Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu. Osim toga, genetičke analize iz domena ove disertacije su urađene na Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu i Institutu za javno zdravlje Vojvodine.

4.1. Izolovanje, selekcija i identifikacija denitrifikatora

Prvi deo oglada realizovanih u okviru ove doktorske disertacije, a u skladu sa postavljenim ciljevima, odnosio se na izolovanje, selekciju i identifikaciju denitrifikatora. Pored toga, ispitana je i bezbednost primene odabranih denitrifikatora u postupcima bioremedijacije.

4.1.1. Uzorkovanje

U periodu od juna do septembra 2015. godine, uzorci vode uzimani su tri puta sa po pet pozicija (ID-VD) duž toka Dunava kroz Novi Sad i kanala Dunav-Tisa-Dunav (DTD) (IK-VK) na potezu kroz gradsku oblast (slika 11). Svi uzorci vode su transportovani do laboratorije za Mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta Novi Sad u hladnom lancu (4 °C).



Slika 11. Uzorkovanje vode: a) pozicije uzorkovanja, b) kanal Dunav-Tisa-Dunav, i c) Dunav

4.1.2. Izolovanje i selekcija denitrifikatora

Za određivanje ukupnog broja mikroorganizama u uzorcima vode, kao i za dobijanje čistih kultura korišćena je podloga opšteg tipa PCA (Plate Count Agar, HiMedia, Mumbai, Indija) uz inkubaciju na 37 °C tokom 24 h.

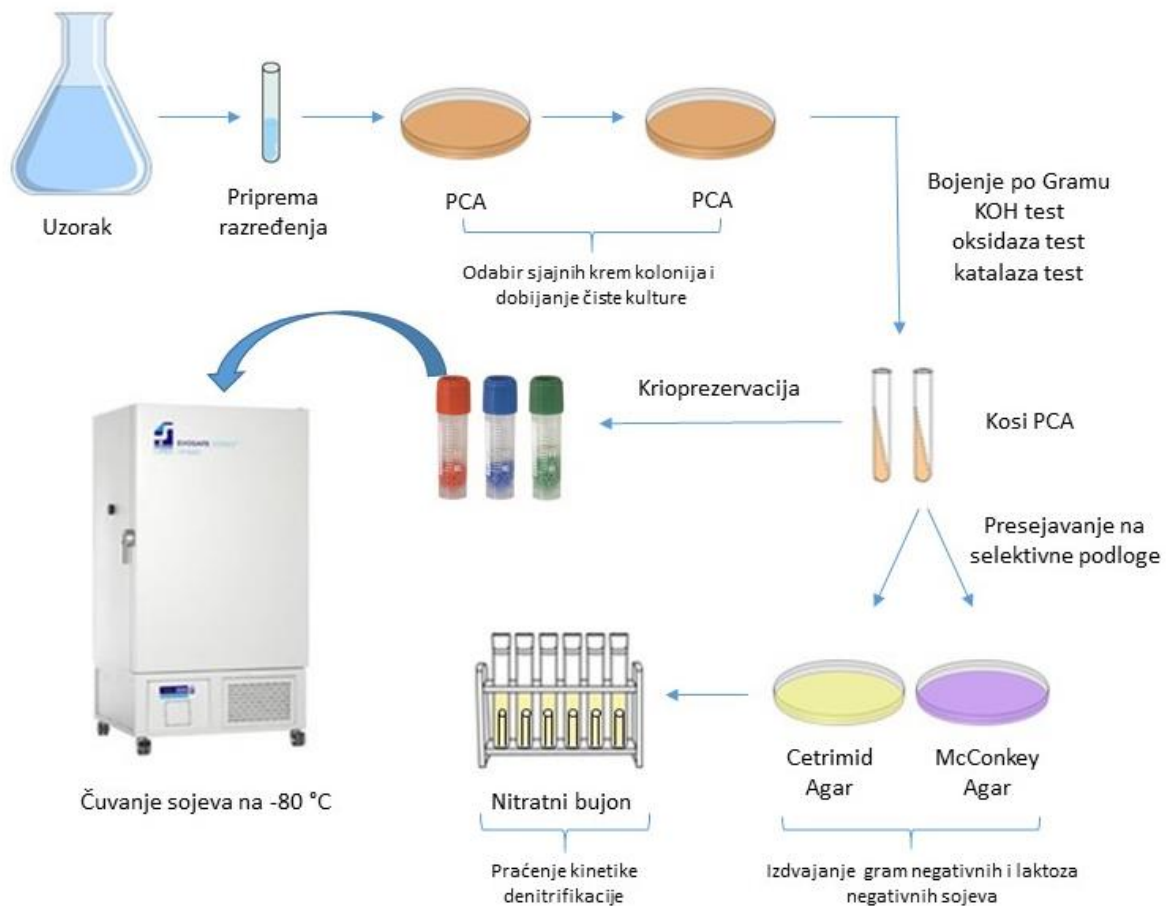
Postupak selekcije denitrifikatora obuhvatao je ispitivanje odabranih fizioloških osobina i kinetike denitrifikacije izolata sa ciljem izdvajanja izolata koji prema fiziološkim osobinama i denitrifikacionoj sposobnosti najviše odgovara *Pseudomonas stutzeri* (Lalucat i sar., 2006).

Za ispitivanje fizioloških osobina odabranih izolata i referentnog soja *Pseudomonas stutzeri* primenjeni su katalaza i oksidaza testovi. Katalaza test je rađen pomoću 3% rastvora vodonik-peroksida (SaniHem, Novi Bečej, Srbija), dok je oksidaza test izveden pomoću oksidaza diskova (Mikrobiologie Bactident Oxidase, Merck, Darmštat, Nemačka). Osim toga, za razvrstavanje bakterija na gram-pozitivne i gram-negativne korišćena je konvencionalna metoda bojenja po Gramu i KOH test pomoću 3% rastvora kalijum-hidroksida.

U daljem postupku selekcije gram-negativnih bakterijskih izolata koji po svojim makromorfološkim i fiziološkim osobinama odgovaraju *P. stutzeri* korišćene su selektivne podloge MacConkey Agar (Torlak, Beograd, Srbija) i Cetrimid Agar (Merck, Darmštat, Nemačka).

Kinetika denitrifikacije je praćena na temperaturama od 30 °C i 37 °C, tako što je u 3 ml sterilnog nitratnog bujona (Difco™ Nitrate Broth, Becton, Dickinson and Company, Pont de Claix, Francuska) preneto 0,2 ml suspenzije odabranih izolata i referentnog soja približne gustine $3 \cdot 10^8$ CFU/ml. Tokom praćenja kinetike denitrifikacije, umnožavanje biomase procenjivano je u odnosu na McFarland-ov nefelometar, dok je izdvajanje gasa praćeno pomoću Durhamovih cevčica. Promena koncentracije nitrata i nitrita u nitratnom bujonu praćena je semi-kvantitativnom metodom pomoću mernih traka (Quantofix® Nitrate Nitrite, Macherey-Nagel, Diren, Nemačka). Osim toga, Grisovi reagensi su korišćeni za kvalitativnu ocenu prisustva nitrita u bujonu. Za detekciju amonijaka u hranljivoj podlozi korišćen je Neslerov reagens. Kompletan postupak izolacije i selekcije denitrifikatora šematski je prikazan na slici 12.

Svi izolati koji su nakon primenjenih testova pokazali iste ili slične osobine kao *P. stutzeri* ATCC 17588 su presejani u hranljivi bujon (Nutrient Broth, HiMedia, Mumbaj, Indija) sa dodatkom glicerola (Lach-ner, Neratovice, Češka) kao krioprotektanta i deponovani u zbirku kultura Odeljenja mikrobiologije Tehnološkog fakulteta Novi Sad u frižideru za ultraniske temperature (Snijders Labs, Tilburg, Norveška) na -80 °C.



Slika 12. Šematski prikaz izolacije, selekcije i ispitivanja kinetike denitrifikatora

4.1.3. Identifikacija denitrifikatora

Izolati koji su deponovani u zbirci kultura su potom podvrgnuti postupku identifikacije. Pre početka svakog oglada i postupka identifikacije svi izolati su osveženi zasejavanjem na PCA hranljivu podlogu uz inkubaciju na 37 °C tokom 24 h. Identifikacija osveženih kultura izvedena je primenom aparata VITEK®2 Compact System (BioMérieux, Carbone, Francuska). Postupak identifikacije se sastojao od pripreme suspenzija osveženih kultura približne gustine $3 \cdot 10^8$ CFU/ml (McFarland standard 1), koja je, prema uputstvu proizvođača, aplikovana u kartice za identifikaciju gram-negativnih bakterija (VITEK®2 GN ID cards, BioMérieux, Carbone, Francuska), nakon čega su kartice postavljane u uređaj.

Nakon identifikacije pomoću VITEK®2 Compact System uređaja, izolat koji je identifikovan kao *Pseudomonas stutzeri* zajedno sa referentnom kulturom *P. stutzeri* ATCC 17588 dodatno

su identifikovani pomoću masene spektrometrije zasnovane na matricom potpomognutom laserskom desorpcijom/ionizacijom – MALDI MS sa TOF analizatorom.

Odbrane kulture su najpre osvežene zasejavanjem na Krvni agar (Columbia Agar + 5% Sheep Blood, BioMérieux, Carpone, Francuska) i inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Biomasa pojedinačne kolonije naneta je direktno na MALDI matricu sa 96 polja (96-spot MALDI target plate, Bruker Daltonics, Bermen, Nemačka) i osušena na vazduhu, a zatim prekrivena sa 1 µL rastvorom matriksa, tj. α-ciano-4-hidroksicinaminskom kiselinom (Bruker Matrix HCCA, Bermen, Nemačka). MALDI-TOF MS spektri su snimljeni pomoću MicroflexLT/SHBioTyper spektrometra (Bruker Daltonics, Masačusets, SAD) koji je opremljen azotnim laserom talasne dužine 337 nm čije dejstvo je kontrolisano pomoću softvera Flexcontrol verzija 3.1. (Bruker Daltonics, Masačusets, SAD). Prikupljanje spektara u masenom opsegu od 2 do 20 kDa je sprovedeno pomoću opcije Execute i akumulacijom 240 laserskih snopova (tabela 7) ostvarenih pri 30-40% maksimalne snage lasera.

Tabela 7. Instrumentalni parametri pri snimanju MALDI spektara

Parametri, jedinica	Vrednosti
Frekvencija lasera, Hz	60,00
Napon jonskog izvora 1, kV	19,90
Napon jonskog izvora 2, kV	18,53
Napon sočiva, kV	6,00

4.1.4. Ispitivanje bezbednosti primene denitrifikatora u procesima bioremedijacije

Za svaki postupak bioremedijacije je značajno utvrditi da odabrani mikroorganizam:

- 1) nije patogen, tj. da ne može da izazove zdravstvene posledice kod ljudi i
- 2) nema mogućnost formiranja biofilмова, te da se mikroorganizmi nakon završenog tretmana mogu lako ukloniti sa mesta aplikacije.

U cilju ispitivanja zdravstvene bezbednosti ljudi, pre svega operatera, tokom postupka bioremedijacije, ispitana je *in vitro* osetljivost referentnog i prirodnog soja *P. stutzeri* na četrnaest različitih antibiotika. Osetljivost ova dva soja prema različitim antibioticima ispitana je pomoću VITEK®2 Compact System (BioMérieux, Carpone, Francuska) uz primenu

antibiogram kartica namenjenih za gram-negativne bakterije (VITEK®2 AST-GN cards, BioMérieux, Carbone, Francuska). Kompletna analiza urađena je na isti način kao u postupku identifikacije odabranih sojeva denitrifikatora pomoću uređaja VITEK®2 Compact System (odjeljak 4.1.3.).

Za ispitivanje adhezionih svojstava *P. stutzeri*, tj. mogućnosti formiranja biofilмова, korišćen je semikvantitativni test adhezije ćelija. Bakterijske kulture su osvežene u Trypton soja bujonu (HiMedia, Mumbaj, Indija) i inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Potom je 0,1 ml suspenzije prenesen u 9 ml Trypton soja bujona sa dodatkom 2% (v/v) glukoze (Lach:ner, Neratovice, Češka) koji je inkubiran na 37 °C tokom 24 h. U sledećem koraku je po 200 µl bakterijske suspenzije pripremljene u Trypton soja bujonu sa dodatkom glukoze raspoređeno u mikrotitar ploču (Spectar Čačak, Čačak, Srbija) u 13 bunarčića, a potom je mikrotitar ploča inkubirana pri identičnim uslovima kao u prethodnim koracima. Kao negativna kontrola umesto suspenzije mikroorganizama u bunarčiće je raspoređena ista zapremina destilovane vode. Nakon perioda inkubacije bunarčići su isprani fosfatnim puferom kako bi se uklonile slobodno suspendovane ćelije, te je mikrotitar ploča osušena na vazduhu. Fiksiranje adhezionih ćelija je izvršeno pomoću 95% etanola (SaniHem, Novi Bečej, Srbija), a bojenje ćelija sa po 100 µl boje kristal-violet (Carlo erba, Val de Reuil, Francuska) tokom 5 min, nakon čega su bunarčići isprani destilovanom vodom. Sposobnost adhezije bakterijskih ćelija utvrđena je merenjem optičke gustine na talasnoj dužini od 620 nm upotrebom automatskog čitača MultiskanGo (ThermoScientific, Masačusets, SAD).

4.2. Amplifikacija denitrifikujućih gena

Amplifikacija denitrifikujućih gena obuhvata dve faze. U prvoj fazi potrebno je izvršiti izolovanje genomske DNK i proveriti kvalitet izolovanog genetičkog materijala, a potom, u drugoj fazi, podesiti uslove reakcije i izvršiti amplifikaciju gena u PCR uređaju i na kraju, postupkom elektroforetskog razdvajanja, očitati dužine amplifikovanih fragmenata.

4.2.1. Izolovanje genomske DNK i spektrofotometrijsko određivanje kvaliteta DNK

Pre postupka izolacije genomske DNK, referentna kultura i prirodni izolat *P. stutzeri* su osveženi kao u postupku identifikacije VITEK®2 Compact System uređajem (poglavlje 4.1.3.). Genomska DNK oba soja je ekstrahovana korišćenjem komercijalnog kita za izolaciju (Agilent Technologies, SAD). Ekstrakcija DNK je urađena u dva ponavljanja prema modifikovanom protokolu koji je detaljno opisan u Prilogu 1.

Nakon završenog postupka ekstrakcije, čistoća i količina dobijene genomske DNK određena je spektrofotometrijski (NanoDrop One Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija) merenjem apsorbance na tri talasne dužine: A_{230} , A_{260} i A_{280} . Čistoća ekstrahovanih DNK određena je na osnovu odnosa izmerenih apsorbanci i to: A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 260 nm određena je približna koncentracija ekstrahovanih DNK i podešena tako da u svim uzorcima bude 100 ng/ μ L.

4.2.2. Uslovi amplifikacije denitrifikujućih gena primenom PCR metode

U cilju utvrđivanja prisustva denitrifikujućih gena (*napA*, *nirS*, *norB* i *nosZ*) u genomu referentnog soja i prirodnog izolata *P. stutzeri* korišćena su 4 para prajmera. Sekvence za prajmere NAP, NIRS, NORB i NOSZ prikazane su u tabeli 8.

Tabela 8. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju denitrifikujućih gena

Gen	Opis	Sekvenca (5'-3')	Temperatura anilinga (°C)	Literatura
<i>napA</i>	Periplazmatična nitrat-reduktaza	Forward: TCTGGACCATGGGCTTCAACCA Reverse: ACGACGACCGGCCAGCGCAG	59	Duan i sar., 2015; Huang i sar., 2015
<i>nirS</i>	Nitrit-reduktaza	Forward: CCTA(Y)TGGCCGCC(R)CA(R)T Reverse: CGTTGAACTT(R)CCGGT	52	Huang i sar., 2015
<i>norB</i>	Azot-monoksid-reduktaza	Forward:CG(N)GA(R)TT(Y)CT(S)GA(R)CA(R)CC Reverse: C(R)TA(D)GC(V)CCR(W)AGAA(V)GC	54	Huang i sar., 2015
<i>nosZ</i>	Azot-suboksid-reduktaza	Forward: CCCGCTGCACACC(A/G)CCTTCGA Reverse: CGTCGCC(C/G)GAGATCTCGATCA	58	Huang i sar., 2015

Tokom amplifikacije svih denitrifikujućih gena upotrebljen je 1 μL ekstrahovane DNK približne koncentracije 100ng/ μL i 12,5 μL PCR Master mix (2x) (Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija). U slučaju NAP prajmera amplifikacija je izvršena sa 1 μL (10 μM) NAP prajmera (Forward i Reverse), dok je u slučaju svih ostalih prajmera (NIRS, NORB i NOSZ) upotrebljen po 1,5 μL odgovarajućeg para prajmera (Forward i Reverse). Amplifikacija svih korišćenih prajmera obavljena je u PCR uređaju (SureCycler 8800 Thermal Cycler, Agilent Technologies, Kalifornija, SAD).

Za NAP prajmer korišćen je program koji se izvodi u sledećim uslovima:

- 1 ciklus: inicijalna denaturacija DNK u trajanju od 5 min na 95 °C;
- 35 ciklusa:
 - Denaturacija na 95 °C u trajanju od 30 s;
 - Aniling na 59 °C u trajanju od 40 s;
 - Ekstenzija na 72 °C u trajanju od 1 min
 - Finalna ekstenzija na 72 °C u trajanju od 10 min.

Za sve ostale prajmere (NIRS, NORB i NOSZ) korišćen je sledeći program:

- 1 ciklus: inicijalna denaturacija DNK u trajanju od 5 min na 95 °C;
- 35 ciklusa:
 - Denaturacija na 95 °C u trajanju od 40 s;
 - Aniling na X °C (Tabela 8) u trajanju od 40 s;
 - Ekstenzija na 72 °C u trajanju od 90 s
 - Finalna ekstenzija na 72 °C u trajanju od 10 min.

Dobijeni produkti PCR reakcija su razdvojeni postupkom elektroforetskog razdvajanja automatskom Lab-on-a-Chip kapilarnom elektroforezom (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Kalifornija, SAD). Rezultati elektroforeze se softverski predstavljaju u vidu simuliranih fotografija gela sa kojih se očitavaju dužine amplifikovanih fragmenata.

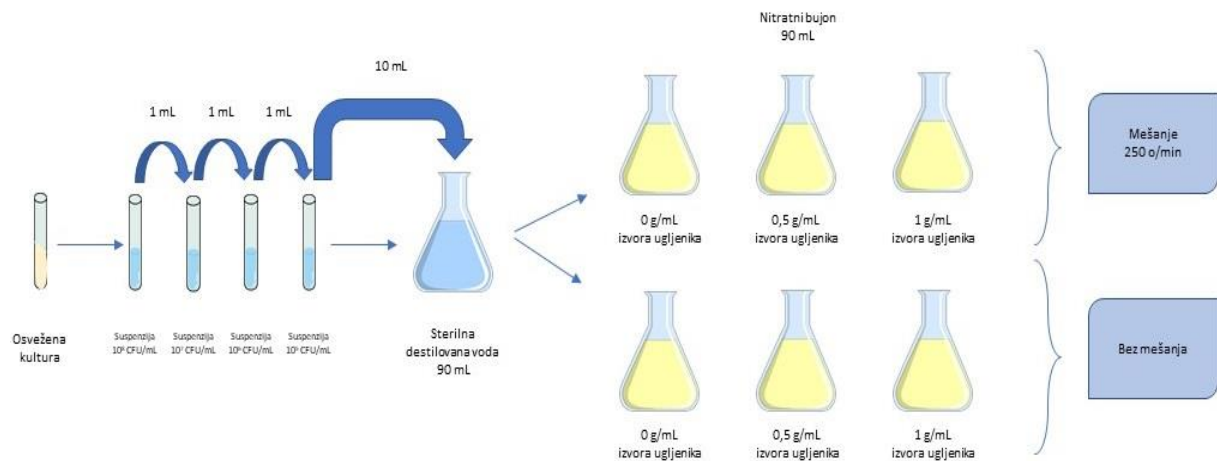
4.3. Optimizacija sastava hranljivih podloga i odabranih bioprocesnih parametara

Kako bi se proces proizvodnje biomase denitrifikatora odvijao najefikasnije, prvenstveno treba optimizovati sastav hranljivih podloga i odabranih procesnih parametara uz postavljanje odgovarajućeg eksperimentalnog plana i korišćenjem klasičnih i modernih matematičkih i statističkih metoda.

4.3.1. Ispitivanje uticaja inicijalnih koncentracija C i N atoma na broj vijabilnih ćelija denitrifikatora

Suspenzije približne gustine 10^8 CFU/mL referentnog i prirodnog soja *P. stutzeri* su pripremane od osveženih, dvadesetčetvoročasovnih, kultura. Od dobijenih suspenzija pripremana je serija razređenja 1:10 do postizanja gustine suspenzije od približno 10^5 CFU/mL. Kompletan sadržaj epruvete sa suspenzijom 10^5 CFU/mL prenet je u erlenmajer sa 90 ml sterilne destilovane vode. Odatle je uzeto po 9 ml suspenzije i preneto u erlenmajer boce sa 90 mL nitratnog bujona sa različitim koncentracijama varirajućih faktora (slika 11).

U okviru ovog eksperimenta izvršeno je pojedinačno variranje izvora ugljenika i azota. Ispitivan je uticaj sledećih izvora ugljenika u koncentracijama od 0, 0,5 i 1 g/L: glukoza (Iach:ner, Neratovice, Češka), saharoza (Iach:ner, Neratovice, Češka) i glicerola (Iach:ner, Neratovice, Češka) (slika 12). S obzirom da je sastavna komponenta nitratnog bujona kalijum-nitrat (1 g/L), ispitan je uticaj povećanja koncentracije KNO_3 (2 g/L i 3 g/L) na broj vijabilnih ćelija denitrifikatora na isti način kao u slučaju ispitivanja uticaja inicijalne koncentracije izvora ugljenika. Osim ispitivanja uticaja inicijalnih koncentracija C i N atoma ispitan je i uticaj mešanja tako što je jedna serija uzoraka podvrgnuta mešanju brzinom 250 o/min (Jeiotech, CMS-350, Daejon, Južna Koreja), dok je druga serija uzoraka ispitivana u statičkim uslovima (slika 13).



Slika 13. Šematski prikaz ispitivanja uticaja inicijalne koncentracije izvora ugljenika na broj vijabilnih ćelija denitrifikatora

U definisanim vremenskim intervalima (0, 1, 3, 5, 13, 19, 24, 30, 39, 48 i 51 h) od početka eksperimenta izvršeno je uzorkovanje kultivacione tečnosti u sterilnim uslovima u cilju određivanja broja vijabilnih ćelija.

4.3.2. Optimizacija sastava hranljivih podloga za umnožavanje biomase denitrifikatora

U cilju optimizacije sastava hranljivih podloga za umnožavanje biomase referentnog soja i prirodnog izolata *P. stutzeri* upotrebljen je Boks-Benkenov eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački, kao i metoda odzivne funkcije (RSM).

U okviru Boks-Benkenovog eksperimentalnog plana ispitivani su sledeći faktori: glukoza (X_1 , 0-2 g/L), KNO_3 (X_2 , 1-3 g/L) i pepton (X_3 , 0,4-4 g/L), dok je kao odziv odabran sadržaj biomase (Y , log). U tabeli 9 prikazane su vrednosti odabranih faktora variranih u skladu sa primenjenim eksperimentalnim planom. Ekseperimenti predviđeni Boks-Benkenovim eksperimentalnim planom izvedeni su na isti način kao eksperimenti ispitivanja uticaja inicijalnih koncentracija izvora ugljenika i azota (slika 11).

Tabela 9. Boks-Benkenov eksperimentalni plan i varirane vrednosti ispitivanih parametara

Redni broj ogleđa	Kodirane vrednosti faktora			Varirane vrednosti faktora		
	X ₁	X ₂	X ₃	Glukoza (g/L)	KNO ₃ (g/L)	Pepton (g/L)
1.	-1	-1	0	0	1	2
2.	1	-1	0	2	1	2
3.	-1	1	0	0	3	2
4.	1	1	0	2	3	2
5.	-1	0	-1	0	2	0,4
6.	1	0	-1	2	2	0,4
7.	-1	0	1	0	2	4
8.	1	0	1	2	2	4
9.	0	-1	-1	1	1	0,4
10.	0	1	-1	1	3	0,4
11.	0	-1	1	1	1	4
12.	0	1	1	1	3	4
13.	0	0	0	1	2	2
14.	0	0	0	1	2	2
15.	0	0	0	1	2	2

Rezultati eksperimenata obrađeni su polinomom drugog reda:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

gde su:

Y – željeni odziv,

X₁₋₃ – ispitivani faktori,

b₀ – odsečak,

b₁, b₂, b₃ – linerani koeficijenti,

b₁₁, b₂₂, b₃₃ – kvadratni koeficijenti i

b₁₂, b₁₃, b₂₃ – koeficijenti interakcije regresione jednačine.

Dobijeni matematički modeli prikazani su grafički – odzivnim površinama, koje su crtane tako što je jedan koeficijent imao konstantnu centralnu vrednost iz eksperimentalnog plana, dok su vrednosti preostalih faktora varirane. Intenzitet uticaja ispitivanih faktora i njihovih interakcija određen je poređenjem statističke t-vrednosti. Statistička analiza eksperimentalnih rezultata urađena je pomoću programa Statistica software verzija 13.2 (Dell, Teksas, SAD).

4.3.3. Ispitivanje uticaja odabranih bioprocenih parametara na umnožavanje biomase denitrifikatora

Ispitivanje uticaja bioprocenih parametara na umnožavanje biomase denitrifikatora izvršeno je pojedinačnim variranjem vrednosti tri odabrana faktora: temperatura (22, 30 i 37 °C), pH vrednost (5, 6 i 7) i zapremina inokuluma (v/v) (1, 3, 5 i 10%). Prilikom variranja vrednosti jednog faktora, druga dva faktora su održavana na definisanim vrednostima: temperatura 30 °C, pH vrednost 7 i zapremina inokuluma (v/v) 10%.

Postavka oglada u potpunosti prati šemu prikazanu na slici 11, s tim što se umesto nitratnih bujona sa dodatim izvorima ugljenika suspenzija ispitivanih mikroorganizama prenosila u nitratne bujone prilagođene potrebama pojedinih oglada.

Za potrebe ispitivanja uticaja pH vrednosti na umnožavanje biomase denitrifikatora pH vrednost nitratnog bujona je sa početne vrednosti (pH=7) korigovana dodatkom 0,1M hlorovodonične kiseline (Elixir Zorka, Šabac, Srbija) do odgovarajućih vrednosti. Vrednost pH nitratnog bujona određivana je pH-metrom (Hanna Instruments, Vunsakat, SAD).

Promena broja mikroorganizama tokom kultivacije u svim ogledima praćena je uzorkovanjem kultivacionih tečnosti u sterilnim uslovima u tačno definisanim vremenskim intervalima (0, 5, 12, 18, 24 i 32 h) u dva nezavisna ponavljanja.

4.4. Proizvodnja biomase denitrifikatora u laboratorijskim bioreaktorima

Pre projektovanja biotehnološkog procesa proizvodnje biomase denitrifikatora veoma je važno potvrditi tačnost rezultata ostvarenih tokom oglada optimizacije parametara kultivacije, izvođenjem nove serije oglada pri tačno definisanim uslovima. Validacija optimizovanih parametara kultivacije na laboratorijskom nivou sprovedena je u 2 laboratorijska bioreaktora različite zapremine (slika 14a-b).

Proizvodnja biomase oba ispitivana denitrifikatora najpre je izvedena u laboratorijskom bioreaktoru (Biostat® A plus, Sartorius AG, Gotingen, Nemačka) ukupne zapremine 3 L (radne zapremine 2 L) sa automatskim mešanjem i regulacijom procesnih parametara (slika

14a). Mešanje u bioreaktoru je internog tipa sa dve paralelno postavljene Ruštonove turbine, pri čemu je odnos prečnika mešalice i prečnika suda 0,38, bez interno postavljenih odbojnika.

Proizvodnja biomase oba ispitivana denitrifikatora izvedena je i u laboratorijskom bioreaktoru (Chemap AG CH-8604, Volketswil, Švedska) ukupne zapremine 7 L (radne zapremine 5 L) sa internom regulacijom temperature. Ovaj bioreaktor opremljen je sa dve paralelno postavljene Ruštonove turbine na rastojanju od 90 mm (odnos prečnika mešalice i prečnika suda je 0,44) i četiri vertikalno postavljena odbojnika (slika 14b).

Parametri kultivacije u oba bioreaktora i u slučaju oba ispitivana denitrifikatora su sledeći:

- Temperatura kultivacije: 30 °C,
- pH vrednost kultivacionog medijuma: 7,
- brzina mešanja: 120 o/min,
- zapremina inokuluma (v/v): 5%,
- trajanje kultivacije: 24 h.



Slika 14. Korišćeni laboratorijski bioreaktori za proizvodnju biomase denitrifikatora: a) Biostat® A plus, ukupne zapremine 3 L i b) Chemap AG CH-8604, ukupne zapremine 7 L

U definisanim vremenskim intervalima (0, 3, 5, 9, 12, 16, 19, 24, 30 i 32 h) izvršeno je uzorkovanje kultivacione tečnosti u sterilnim uslovima u cilju određivanja broja vijabilnih ćelija i za karakterizaciju sastava tečnosti u pogledu sadržaja ukupnog azota i sadržaja glukoze.

4.4.1. Analiza kultivacionih tečnosti

Analiza kultivacionih tečnosti iz oglada spovedenih u laboratorijskim bioreaktorima podrazumevala je određivanje broja vijabilnih ćelija, analizu sadržaja ukupnog azota i glukoze i ispitivanje stabilnosti dobijene biomase denitrifikatora.

Određivanje broja vijabilnih ćelija u svim ogledima obavljeno je metodom površinskog zasejavanja na PCA hranljivu podlogu. Sve zasejane ploče su potom inkubirane na 37 °C tokom 24 h, nakon čega su izbrojane izrasle kolonije i određen je broj vijabilnih ćelija po mililitru ispitivane tečnosti.

Za potrebe analize sadržaja ukupnog azota i glukoze u ogledima koji su izvedeni u laboratorijskim bioreaktorima uzorci kultivacione tečnosti koji su prikupljeni u definisanim vremenskim intervalima su centrifugirani na 10000 o/min u trajanju od 15 min (Rotina 380 R, Hettich, Balingen, Nemačka).

Sadržaj ukupnog azota u supernatantu kultivacione tečnosti određivan je metodom po Kjeldalu (Buchu K-314 Kjeldahl Line Digestion Unit) (Herlich, 1990).

Sadržaj glukoze u supernatantu kultivacione tečnosti određivan je spektrofotometrijski na UV-1800, UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu, Kjoto, Japan) na talasnoj dužini od 340 nm pomoću enzimskog testa Megazyme D-glucose HK Assay Kit (Megazyme, Viklou, Irska).

U cilju ispitivanja stabilnosti proizvedene biomase ispitan je uticaj niskih temperature na održavanje zadovoljavajuće vitalnosti i vijabilnosti ćelija prilikom skladištenja. U tu svrhu talog (proizvedena biomasa) dobijen nakon centrifugiranja kultivacione tečnosti na kraju bioprocasa (nakon 32 h) je podeljen na dva jednaka dela. Jedan deo biomase je resuspendovan u sterilnom fiziološkom rastvoru (8,5% NaCl), a drugi deo u sterilnoj destilovanoj vodi, a potom su dobijene suspenzije raspoređene u sterilne vijale (2 ml). Polovina vijala sa biomasom resuspendovanom u sterilnom fiziološkom rastvoru je čuvana u frižideru na temperaturi od 4 °C, a preostale vijale u zamrzivaču na temperaturi od -20 °C. Isti postupak je primenjen i za vijale sa biomasom resuspendovanom u sterilnoj destilovanoj vodi. U definisanim vremenskim intervalima (0, 7, 14, 21, 28, 35 i 50 dana) određen je broj vijabilnih ćelija prema prethodno opisanom postupku koji je primenjivan u svim prethodnim ogledima.

4.5. Primena denitrifikatora

Ogledi koji obuhvataju ispitivanja mogućnosti i efikasnosti primene odabranih denitrifikatora u oblasti biočišćenja građevinskih materijala podeljeni su u pet faza: (1) izbor i karakterizacija mineralnih supstrata (2) kontaminacija ispitivanih mineralnih supstrata kalijum-nitratom, (3) izbor i karakterizacija pulpi odgovarajućih teksturalnih karakteristika, (4) priprema bioaktivnih sistema i (5) ispitivanje efikasnosti bioaktivnih sistema (pulpa + suspenzija denitrifikatora) na odabranim mineralnim supstratima.

4.5.1. Izbor i karakterizacija ispitivanih materijala

Tokom ispitivanja mogućnosti primene referentnog soja i prirodnog izolata *P. stutzeri* za postupak biočišćenja, konkretnije desalinacije, korišćena su dve mineralne podloge: (1) model supstrati opeka i (2) krečnjački stenski materijal. Model supstrati opeka su pripremljeni tradicionalnom tehnologijom i laboratorijski su ostareni kako bi dobijeni model supstrati prema svojim karakteristikama bili što približniji opekama sa severo-istočnog bedema tvrđave Bač (Vučetić, 2017), dok je krečnjački stenski materijal prirodnog porekla iz okoline Arandjelovca. Tokom eksperimenata korišćeni materijali su bili uniformnih dimenzija: 4 cm x 4 cm x 4 cm (dužina x širina x visina) u slučaju model supstrata opeke i 5 cm x 5 cm x 2 cm (dužina x širina x visina) u slučaju stenskog materijala.

Kramar i sar. (2014) su detaljno ispitali mineraloške i teksturalne karakteristike model supstrata opeke koji su korišćeni u ovom radu.

Mineraloška analiza ispitivanih stenskih materijala urađena je XRD metodom na uređaju DiffractometerPW 1729 CuK α , XRS (Philips, SAD). Teksturalne karakteristike, raspodela veličine pora i ukupna poroznost ispitivanih materijala određene su metodom živine porozimetrije pomoću živinog porozimetra Autopore IV 9500 (Micrometric, SAD) pri pritisku žive od 228 MPa, što omogućava određivanje veličine prečnika pora između 390 μm i 0,005 μm .

4.5.2. Kontaminacija ispitivanih materijala kalijum-nitratom

S obzirom na to da se model supstrati opeka i krečnjački stenski materijal izuzetno razlikuju u pogledu teksturalnih karakteristika kontaminacija ispitivanih materijala kalijum-nitratom obavljena je na dva različita načina kako bi se u oba ispitivana sistema dostigao nivo kontaminacije od približno 500 mg/mL.

4.5.2.1. Protokol kontaminacije model supstrata opeke kalijum-nitratom

Prilikom kontaminacije model supstrata opeke kalijum-nitratom primenjen je protokol prema Vučetić (2017) kako bi se dobila ravnomerna raspodela soli od oko 500 mg/mL po čitavoj zapremini model supstrata:

- (1) Potapanje model supstrata opeke u zasićeni rastvor KNO_3 (31,7 g $\text{KNO}_3/100$ mL H_2O na 20 °C) tokom 2h,
- (2) Sušenje modela u laboratorijskoj sušnici na temperaturi od 105 °C tokom 6 h,
- (3) Sušenje na sobnoj temperaturi (20 °C) tokom 24 h.

4.5.2.2. Protokol kontaminacije krečnjačkog stenskog materijala kalijum-nitratom

Za postizanje ravnomerne kontaminacije uzoraka stenskog materijala kalijum-nitratom ustanovljen je sledeći protokol:

- (1) Sušenje uzoraka stenskog materijala u laboratorijskoj sušnici na temperaturi od 105 °C tokom 2 h,
- (2) Potapanje uzoraka u zasićeni rastvor KNO_3 tokom 22 h

U cilju postizanja koncentracije nitrata od 500 mg/mL u uzorcima stenskog materijala, navedene korake protokola je bilo potrebno naizmenično ponoviti pet puta.

Provera postupka kontaminacije ispitivanih materijala izvršena je merenjem sadržaja nitrata pomoću mernih traka Quantofix® u rastvorima dobijenih ekstrakcijom sprašenih uzoraka ispitivanih materijala sa vodom u odnosu 1:1. Postupak kontaminacije se može smatrati

uspešnim ukoliko sadržaj nitrata u ispitivanim materijalima iznosi 500 mg/mL, a da prethodno nisu uočeni vidljivi kristali soli na površini uzoraka.

4.5.3. Izbor i karakterizacija pulpi

U oglecima posvećenim ispitivanju efikasnosti bioaktivnih sistema u biočišćenju kontaminiranih model supstrata opeke korišćena je pulpa sledećeg sastava (m/m): kaolin:talk:kvarcni pesak=1:1:2. Vučetić (2017) je prethodno projektovala sastav ove pulpe i dokazala njenu efikasnost u procesu biočišćenja u kombinaciji sa referentnim sojem *P. stutzeri* ATCC 17588 na model supstratima opeka.

Za ispitivanje efikasnosti biočišćenja kontaminiranog stenskog materijala primenjena je pulpa sledećeg sastava (m/m): kaolin:talk:kvarcni pesak=1:1:1 u kombinaciji sa referentnim i prirodnim sojem *P. stutzeri*.

Kaolin koji je korišćen za pripremu pulpi predstavlja industrijsku sirovinu, mlevenu kaolinsku glinu, čije veličine čestica ne prelaze 43 µm. Upotrebljeni talk je mleveni industrijski talk, veličine čestica ispod 6,5 µm, dok je kvarcni pesak, takođe industrijska sirovina (kvarcni livački pesak) sa česticama ispod 710 µm.

Karakterizacija pulpi u pogledu teksturalnih karakteristika izvršena je na isti način kao i karakterizacija odabranih materijala (poglavlje 4.6.1.)

4.5.4. Priprema bioaktivnog sistema

Eksperimenti vezani za primenu denitrifikatora su se odvijali paralelno kako bi se ispitala efikasnost kako referentnog soja, tako i prirodnog izolata *P. stutzeri* u procesu biočišćenja kontaminiranih uzoraka građevinskih materijala.

Ispitivani denitrifikatori su inkubirani na 37 °C tokom 24 h u odgovarajućim tečnim hranljivim podlogama čiji sastav je prehodno optimizovan (3.3.2.). Nakon perioda inkubacije, kultivaciona tečnost je centrifugirana (4200 o/min tokom 10 min), a supernatant je odbačen, dok je talog u kome se nalazi biomasa denitrifikatora ispran sterilnom destilovanom vodom. Ovaj postupak je ponovljen 3 puta, nakon čega je talog resuspendovan u sterilnoj destilovanoj vodi, tako da se dobije suspenzija približne gustine 10⁸ CFU/mL.

Bioaktivni sistemi su pripremani homogenizacijom komponenti u suvom stanju (kaolin, talk i kvarcni pesak) u definisanom masenom odnosu, nakon čega je postepeno dodavana tečna faza –suspenzija denitrifikatora ili destilovana voda za blank uzorke uz intenzivnu homogenizaciju. Maseni odnos čvrste i tečne faze u pulpama je iznosio 1:0,5. Pripremljena bioaktivna pulpa je nanošena na slobodnu stranu prethodno kontaminiranih uzoraka građevinskih materijala tako da se formira sloj debljine od 1 cm.

4.5.5. Ispitivanje efikasnosti bioaktivnih sistema

Praćenje efikasnosti bioaktivnih sistema u procesu biočišćenja urađeno je ispitivanjem sadržaja nitratnih soli u uzorcima ispitivanih materijala pre i posle primene bioaktivnih sistema.

U cilju ispitivanja efikasnosti biočišćenja novoprojektovani sistemi su kod svih ispitivanih mineralnih supstrata jedna strana je ostala slobodna, dok su preostale strane uzoraka zatopljene silikonom kako bi se postupak biočišćenja odvijao samo preko jedne površine, što je najpribližnije realnim uslovima na zidinama Tvrdave u Baču (rezultati ostvareni u okviru projekta Vekovi Bača i HEROMAT).

U slučaju ispitivanja efikasnosti procesa biočišćenja na model supstratima opeka, ispitivanje efikasnosti bioaktivnih sistema rađeno je u sledećim vremenskim intervalima: 3 h, 3 dana, 6 dana i 9 dana od trenutka započinjanja eksperimenta. Potrebno je napomenuti da se na model supstrate opeka sveža pulpa nanosila svaka tri dana (u slučaju modela na kojima je efikasnost bioaktivnih sistema ispitivana nakon 6 i 9 dana). U definisanim vremenskim intervalima, bioaktivni sistem je skidan, a svaki ispitivani model je bušen na 3 pozicije na 3 različite dubine (2 mm, 10 mm i 20 mm) (slika 15). Bušenje model supstrata opeke izvedeno je pomoću sistema za određivanje otpora sile bušenja DRMS Cordless (Drilling Resistance Measurement System, SINT Technology, Italija). Tokom bušenja korišćena burgija je bila debljine 5 mm, brzina bušenja 1000 o/min, a brzina prodiranja burgije 20 mm/min. Prahovi materijala sa svake dubine su snimani infracrvenim spektroskopom (FTIR Spectrometer, ALPHA Bruker, Nemačka) primenom ATR modula. Snimanje i obrada dobijenih spektara izvršeno je upotrebom OPUS softverskog paketa. Na snimljenim spektrima izdvajan je pik na 1380 cm^{-1} koji je karakterističan za nitratni anjon (Coenen i sar., 2018), a potom je izvršena

operacija integraljenja površine ispod navedenog pika. Opisana indirektna metoda korišćena je za određivanje sadržaja nitrata po dubini model supstrata opeke i procenu efikasnosti primenjenog bioaktivnog sistema.



Slika 15. Šematski prikaz postupka ispitivanja efikasnosti biočišćenja na model supstratima opeke

Efikasnost primenjenog postupka biočišćenja na kontaminiranim uzorcima stenskog materijala praćena je nakon 1, 2 i 6 dana od trenutka nanošenja bioaktivnog sistema. U seriji uzoraka u kojima se efikasnost biočišćenja utvrđivala nakon 6 dana, posle 48 h je skidan bioaktivni sistem, a zatim je ponovo nanošen sveže pripremljen sistem koji je bilo u kontaktu sa ispitivanim stenskim materijalom još 4 dana (dvostepeno nanošenje bioaktivnog sistema). Nakon definisanih vremenskih intervala, bioaktivni sistemi su uklanjani sa stenskog materijala, a potom je ispitivani mineralni supstrat sprašen. Praškasti uzorci stenskog materijala su potom ekstrahovani sa vodom (1:1) nakon čega je sadržaj nitrata određivan pomoću Quantofix® mernih traka i jonskom hromatografijom (Ion Hromatography System ICS-1000, Thermo Fisher, Masačusets, SAD).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Rezultati izolovanja, selekcije i identifikacije denitrifikatora

5.1.1. Rezultati izolovanja

Ukupan broj mikroorganizama u uzorcima vode iz Dunava je iznosio u proseku 145 cfu/ml, dok je u uzorcima vode iz kanala Dunav-Tisa-Dunav ukupan broj mikroorganizama bio nešto veći i iznosio približno 510 cfu/ml. Iz svakog uzorka su odabrane kolonije pravilnog kružnog oblika, blede žutih nijansi sa bezbojnim obodom, tj. kolonije koje prema svojim makromorfološkim karakteristikama odgovaraju *P. stutzeri* (Lalucat i sar., 2006). Na ovaj način je za dalji proces selekcije izdvojeno ukupno 140 izolata i to 74 izolata iz uzoraka vode iz Dunava i 66 izolata iz uzoraka vode iz kanala DTD.

5.1.2. Rezultati selekcije denitrifikatora

U cilju izdvajanja potencijalnih denitrifikujućih bakterija, svih 140 izolata je podvrgnuto različitim fiziološkim testovima i ispitivanjima mogućnosti rasta na odabranim hranljivim podlogama. Uzimajući u obzir da se *P. stutzeri* ATCC 17588 često koristi kao model mikroorganizam denitrifikacije, selekcija denitrifikatora je izvršena poređenjem rezultata svih 140 kolonija sa karakteristikama referentne kulture datim u tabeli 10. Rezultati za 74 izolata iz Dunava dati su u Prilogu 1, a za 66 izolata iz kanala DTD u Prilogu 2.

Tabela 10. Karakteristike referentne kulture *P. stutzeri* ATCC 17588

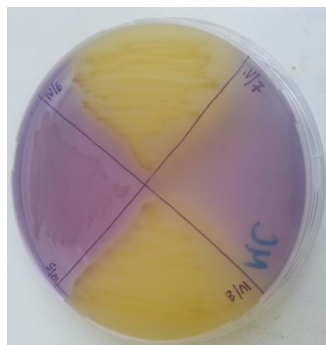
Kultura	Oksidaza test	Katalaza test	KOH test	Bojenje po Gramu	Oblik	MacConkey agar		Cetrimid agar	
						rast	laktoza	rast	pigment
<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-

Analizom rezultata dobijenih za izolate iz Dunava može se zapaziti da je kod 68,9% izolata konstatovano prisustvo enzima citohrom c oksidaze, detektovano preko pojave ljubičastog obojenja usled nastanka indofenola (York i sar. 2004), dok je kod preostalih 31,1% izolata oksidaza test bio negativan. Približno jednak odnos pozitivnih i negativnih rezultata ostvaren

je i tokom katalaza testa, prilikom kog je utvrđeno da je 66,2% izolata katalaza-pozitivno, a 33,8% katalaza-negativno.

Za podelu izolata na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije korišćena je klasična metoda bojenja po Gramu, ali i KOH test kako bi se potvrdila mogućnost primene ovog bržeg i jednostavnijeg testa prilikom testiranja velikog broja bakterija. Rezultati KOH testa ukazuju da je od 74 bakterijska izolata iz Dunava 45 gram-negativno, a 29 gram-pozitivno. Veoma slični rezultati dobijeni su i bojenjem po Gramu, tj. 46 izolata je svrstano u gram-negativne, a 28 izolata u gram-pozitivne bakterije. Na osnovu dobijenih rezultata jasno se može zaključiti da su razlike između KOH testa i metode bojenja po Gramu minimalne, te se KOH test može pouzdano koristiti kao zamena ili pak kao paralelna metoda za klasifikaciju bakterija na gram-pozitivne i gram-negativne. Osim toga, mikroskopskom analizom utvrđeno je da je u uzorcima vode iz Dunava prisutno 15 loptastih i 59 štapićastih oblika.

Naredni korak selekcije podrazumevao je ispitivanje mogućnosti rasta i usvajanja laktoze na hranljivoj podlozi McConkey. Selektivna, diferencijalna podloga McConkey u svom sastavu sadrži žučne soli koje inhibiraju rast većine gram-pozitivnih, te podstiču rast gram-negativnih bakterija poput *P. stutzeri*. Laktoza je takođe jedna od komponenti McConkey hranljive podloge, čije usvajanje od strane ispitivanih izolata je praćeno promenom boje hranljive podloge iz ljubičaste u žutu (slika 16). Na ovaj način je omogućena selekcija izolata koji, kao i *P. stutzeri* ne usvajaju laktozu (Tabela 10) (Lalucat i sar., 2006). Na osnovu rezultata ispitivanja konstatovano je da je 40 od 74 izolata raslo na McConkey hranljivoj podlozi od kojih je čak 26 laktoza-pozitivno. Preostalih 34 izolata nije ispoljilo rast na McConkey podlozi.



Slika 16. Ispitivanje mogućnosti rasta i usvajanja glukoze od strane odabranih izolata na McConkey hranljivoj podlozi

U okviru roda *Pseudomonas* jedna od vrsta koja se često može izolovati iz voda i cevovoda je *P. aeruginosa*. Za razliku od *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* se lako izoluje zasejavanjem na selektivnu podlogu Cetrimid agar, koji pored intenzivnog rasta stimuliše i proizvodnju karakterističnih pigmenata piocijanina (plavo-zelene boje) i fluorescina (žuto-zelene boje). Cetrimid je kvaternarna amonijumova so koja deluje inhibirajuće na brojne bakterije, između ostalih i *P. stutzeri*, ne dozvoljavajući im da razviju karakteristične kolonije. Od svih ispitanih izolata, svega 18 je raslo na Cetrimid agaru, dok je karakteristične pigmente proizvelo samo 8 izolata. Preostalih 56 izolata ispoljilo je iste karakteristike kao *P. stutzeri*, tj. nisu rasli na Cetrimid agaru.

Izolati iz kanala DTD podvrgnuti su istim koracima selekcije kao i izolati iz Dunava. Od ukupno 66 izolata iz kanala DTD, utvrđeno je da je 45 izolata oksidaza-pozitivno, a 40 izolata katalaza-pozitivno. U pogledu rezultata oksidaza i katalaza testova može se konstatovati da 40 od 66 izolata iz kanala DTD ima identične karakteristike kao *P. stutzeri* (Tabela 10).

Bojenjem po Gramu utvrđeno je da 40 izolata pripada gram-negativnim bakterijama, a 26 gram-pozitivnim izolatima. Rezultati KOH testa su veoma slični rezultatima bojenja po Gramu, tj. prema rezultatima KOH testa 39 izolata pripada grupi gram-negativnih, a 27 izolata pripada grupi gram-pozitivnih bakterija. U pogledu morfologije, utvrđeno je da 12 izolata ima loptast, a čak 44 štapićast oblik. Kao i u slučaju izolata iz Dunava i kod izolata iz kanala DTD se može zapaziti dominantna zastupljenost štapićastih bakterija.

Na selektivnoj hranljivoj podlozi McConkey raslo je 42 izolata od kojih je 37 laktoza-negativno kao i referentni soj *P. stutzeri* (Tabela 10). Preostalih 24 izolata nije ispoljilo rast na ovoj selektivnoj podlozi.

Prilikom ispitivanja mogućnosti rasta i proizvodnje pigmenata na Cetrimid agaru, ustanovljeno je da 18 izolata raste na pomenutoj podlozi i to bez produkcije pigmenata. Ostali izolati, njih 48, nije raslo na Cetrimid agaru kao ni referentni soj *P. stutzeri* (Tabela 10).

Nakon detaljnog pregleda morfoloških, biohemijskih i fizioloških osobina izolata iz Dunava i kanala DTD odabrano je ukupno 10 izolata koji ispoljavaju identične ili pak slične osobine kao *P. stutzeri* ATCC 17588 (Tabela 11).

Tabela 11. Karakteristike odabranih izolata potencijalnih denitrifikatora

Izolat	Oksidaza test	Katalaza test	KOH test	Bojenje po Gramu	Oblik	MacConkey agar		Cetrimid agar	
						rast	laktoza	rast	pigment
VD ₁ /1	-	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
ID ₂ /1	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
ID ₂ /3	+	+	-	-	štapićast	+	+	+	-
IVD ₂ /3	+	+	-	-	štapićast	+	+	+	-
ID ₃ /2	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
IID ₃ /4	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
VK ₁ /1	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
IVK ₂ /3	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
IVK ₃ /3	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
IVK ₃ /4	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	-

Na osnovu rezultata prikazanih u tabelama 10 i 11, jasno se može zapaziti da samo četiri izolata (ID₃/2, IID₃/4, IVK₂/3 i IVK₃/3) po svojim karakteristikama potpuno odgovaraju referentnom soju *P. stutzeri*. Preostalih šest izolata (VD₁/1, ID₂/1, ID₂/3, IVD₂/3, VK₁/1 i IVK₃/4) se najmanje po jednoj osobini razlikuje u odnosu na referentni soj, a nasumično su izabrani zbog sličnosti sa ostalim izolatima koji čine dominantnu mikrobnu populaciju u ispitivanim uzorcima vode (prilog 1 i 2).

5.1.3. Identifikacija potencijalnih denitrifikatora

Nakon završenog postupka selekcije, deset odabranih izolata je najpre identifikovano do nivoa vrste primenom uređaja VITEK®2 Compact System (tabela 12).

Tabela 12. Identifikacija odabranih izolata pomoću uređaja VITEK®2 Compact System

Izolat	Rezultat identifikacije	Verovatnoća identifikacije (%)
VD ₁ /1	<i>Citrobacter freundii</i>	99
ID ₂ /1	<i>Aeromonas sobria</i>	98
ID ₂ /3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	95
IVD ₂ /3	<i>Aeromonas sobria</i>	98
ID ₃ /2	<i>Aeromonas sobria</i>	98
IID ₃ /4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99
VK ₁ /1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	95
IVK ₂ /3	<i>Aeromonas sobria</i>	94
IVK ₃ /3	<i>Aeromonas sobria</i>	98
IVK ₃ /4	<i>Aeromonas sobria</i>	97

S obzirom na to da se verovatnoća identifikacije odabranih izolata nalazi u opsegu od 94-99%, dobijeni rezultati se mogu smatrati veoma pouzdanim.

Najveći broj identifikovanih bakterija pripadaju rodu *Aeromonas* (tabela 12). Aeromonasi su najčešći stanovnici jezera, reka, izvora, mora, podzemnih voda, a često se izoluju i iz pijaćih voda, kako hlorisanih, tako i nehlorisanih (Anon., 2006). Od odabranih izolata dva je identifikovano kao *A. hydrophila*, a čak 6 kao *A. sobria*. Obe izolovane vrste pripadaju grupi nepotpunih denitrifikatora, jer imaju sposobnost redukcije nitrata do nitrita, eventualno amonijaka (Drysdale i sar., 1999). Iako aeromonasi imaju mogućnost redukcije nitrata njihova upotreba u postupku denitrifikacije je ograničena jer su u većini slučajeva patogeni za čoveka (*A. hydrophila*) ili vodeni svet, pogotovo ribe (*A. sobria*) (Ottavianni i sar., 2011).

Jedan izolat je identifikovan kao *Citrobacter freundii* (tabela 12), fakultativni anaerob, koji se često izoluje iz zemljišta, vode, kanalizacije, hrane, a može se naći i u crevnom traktu životinja i ljudi (Wang i sar., 2000). Potvrđeno je da je ovaj soj odgovoran za smanjenje koncentracije nitrata, konvertujući ih do nitrita (Baohua i sar., 2015). Iako se ova bakterija smatra nepotpunim denitrifikatorom (Drysdale i sar., 1999), svrstava se u oportunističke patogene, te se isključuje iz daljih eksperimenata.

Od ukupno 140 izolata iz Dunava i kanala DTD identifikacijom pomoću VITEK®2 Compact System uređaja samo jedan izolat (IID₃/4) identifikovan kao *Pseudomonas stutzeri*, koji je interno označen kao *P. stutzeri* D1. Uzimajući u obzir da *P. stutzeri* pripada grupi potpunih denitrifikatora, ovaj soj se može smatrati potencijalno najboljim izborom za procese denitrifikacije otpadnih voda, biočišćenja različitih građevinskih materijala, itd.

Osim fenotipske metode identifikacije odabranih sojeva pomoću VITEK®2 Compact System uređaja, referentni soj i prirodni izolat *P. stutzeri* su dodatno identifikovani trenutno najaktuelnijom hemotaksonomskom metodom, tj. masenom spektrometrijom zasnovanom na matricom potpomognutom laserskom desorpcijom/ionizacijom (MALDI MS) uz TOF analizator. Dobijeni rezultati identifikacije MALDI-TOF MS prikzani su u tabeli 13.

Tabela 13. Rezultati identifikacije pomoću MALDI-TOF MS

Mikroorganizam	Organizam (najbolje poklapanje)	Rezultat	Organizam (drugo najbolje poklapanje)	Rezultat
<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,278*	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,173
<i>P. stutzeri</i> D1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,226	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,116

*Značenje dobijenih vrednosti: (I) 2,300-3,000 – najverovatnija identifikacija do nivoa vrste; (II) 2,000-2,299 – sigurna identifikacija do nivoa roda, verovatna identifikacija do nivoa vrste; (III) 1,700-1,999 – verovatna identifikacija do nivoa roda i (IV) 0,000-1,699 – nepouzdan nivo identifikacije

Na osnovu rezultata MALDI-TOF MS analize prikazanih u tabeli 13 jasno se može uočiti da dobijeni spektri oba testirana mikroorganizma pokazuju najbolje poklapanje i drugo najbolje poklapanje sa spektrom *Pseudomonas stutzeri*. Izuzetno visoke vrednosti poklapanja spektara ukazuju na visoku pouzdanost identifikacije do nivoa roda, pa čak i do nivoa vrste. Iako se prvobitno smatralo da je identifikacija mikroorganizama pomoću MALDI-TOF MS rezervisana samo za kliničke izolate, najnovija istraživanja pokazuju da se ova metoda može sasvim pouzdano koristiti za identifikaciju i taksonomiju izolata iz vode, zemljišta, hrane, itd (Peix i sar., 2018). U skladu sa tim, rezultati prikazani u ovom radu ukazuju na efikasnu primenu MALDI-TOF analize u identifikaciji denitrifikujućih bakterija.

Rezultati identifikacije dobijeni pomoću MALDI-TOF MS analizom i VITEK®2 Compact System uređajem su u odličnoj korelaciji, te se može zaključiti da je u okviru ovog rada uspešno izolovan i identifikovan soj *Pseudomonas stutzeri*. Sva dalja ispitivanja obavljena su paralelno sa prirodnim izolatom i referentnim sojem *P. stutzeri* kako bi se utvrdio njihov potencijal i efikasnost u procesu denitrifikacije, te ispitala mogućnost proizvodnje njihove biomase u uvećanim razmerama.

5.1.4. Kinetika denitrifikacije

Praćenje kinetike denitrifikacije je jedan od osnovnih kriterijuma na osnovu kog se može odrediti orijentaciona uspešnost novog izolata u odnosu na referentni soj. Veoma je značajno da se na početku istraživanja utvrdi da li postoji razlika u efikasnosti u potencijalu denitrifikacije između sojeva. Ukoliko se pokaže da novi izolat ima bolje performanse, onda su opravdana dalja istraživanja koja uključuju karakterizaciju soja na genskom nivou i podešavanje uslova za proizvodnju biomase u manjim i većim razmerama.

U cilju ispitivanja kapaciteta denitrifikacije referentnog soja i prirodnog izolata *P. stutzeri* ispitana je kinetika denitrifikacije na temperaturama od 30 i 37 °C praćenjem promena odabranih parametara tokom 60 h (tabela 14).

Tabela 14. Kinetika denitrifikacije *P. stutzeri* ATCC 17588 i *P. stutzeri* D1

Vreme (h)	Temperatura (°C)	Mikroorganizam	Zamućenost (McFarland No.)	Gas (+/-)	Quantofix® merne trake		Grisovi reagensi Nitriti (+/-)	Neslerov reagens Amonijak (+/-)
					Nitrati (mg/L)	Nitriti (mg/L)		
8	30	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	-	500	80	+	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	1	-	500	80	+	-
	37	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	-	500	80	+	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	3	-	500	80	+	-
24	30	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	+	500	80	+	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	3	+	50	1	+	-
	37	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	+	50	1	+	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	3	+	50	1	+	-
34	30	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	+	50	1	+	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	3	+	10	1	-	-
	37	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	+	50	1	+	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	3	+	50	1	+	-
48	30	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	+	10	1	-	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	3	+	<10	<1	-	-
	37	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	+	10	1	+	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	3	+	<10	<1	-	-
60	30	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	+	<10	<1	-	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	3	+	<10	<1	-	-
	37	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	3	+	<10	<1	-	-
		<i>P. stutzeri</i> D1	3	+	<10	<1	-	-

Na osnovu rezultata oglada ispitivanja kinetike denitrifikacije prikazanih u tabeli 14 moguće je zapaziti da prve nagle promene u količini prisutnih nitrata i nitrita praćene pojavom gasa u Durhamovim cevčicama nastaju oko 24 h od početka oglada u slučaju oba ispitvana soja. Uzimajući u obzir da su u okviru ovog oglada korišćene kvalitativne i semi-kvantitativne metode, moguće je da se promene u koncentraciji nitrata i nitrita javljaju i ranije, ali zbog prirode primenjenih metoda manje varijacije u koncentraciji nitrata i nitrita nisu mogle biti

registrovane. U periodu između 24 i 34 h nisu zabeležene značajnije promene, osim u slučaju *P. stutzeri* D1 kod koga je uočen dalji pad koncentracije nitrata sa 50 na 10 mg/L pri temperaturi od 30 °C. U periodu od 48 h, *P. stutzeri* D1 uspešno redukuje prisutne nitrata (početna koncentracija 3 g/L u obliku KNO₃) do nivoa koji je ispod granice detekcije mernih traka Quantofix® (<10 mg/L), bez akumulacije uobičajenih intermedijera procesa denitrifikacije i uz prisustvo gasa u Durhamovim cevčicama. Na osnovu dobijenih rezultata, moguće je zapaziti da je referentnom soju *P. stutzeri* potreban duži period (između 48 i 60 h) kako bi ostvario iste rezultate kao testirani prirodni izolat. U dostupnim istraživanjima pokazano je da izolati *P. stutzeri* imaju mogućnost da za 24 h prevedu nitrata do molekularnog azota kada je pri početnoj koncentraciji nitrata od 0,16 g/L (Huang i sar., 2015) i 0,722 g/L (Zhao i sar., 2018), koja je značajno niža od koncentracije nitrata primenjene u eksperimentima ispitivanja kinetike denitrifikacije. Neki sojevi *P. stutzeri* su visoko efikasni u procesu denitrifikacije (99,24% za 96 h) čak i u sredini sa 92% kiseonika (Su i sar., 2001). Od izuzetnog je značaja da ispitivani sojevi denitrifikatora budu što efikasniji u pogledu brzine denitrifikacije na laboratorijskom nivou u tačno definisanim uslovima, jer prilikom njihovog korišćenja u npr. postrojenjima za prečišćavanje voda dolazi do smanjenja efikasnosti za oko 10-20% (Hung i sar., 2006). Do pada efikasnosti sojeva pri prelasku u veća postrojenja dolazi usled varijacija u C/N odnosu, prisustva drugih mikroorganizama i rastvorenih materija koje mogu delovati inhibitorno, itd.

Rezultati prikazani u tabeli 14 ukazuju da je proces denitrifikacije nezavisan od primenjenih temperatura u slučaju oba ispitivana mikroorganizma, što je u skladu sa rezultatima Deng i sar. (2014). Sposobnost mikroorganizma da u potpunosti redukuje nitrata do molekularnog azota bez intermedijera na različitim temperaturama omogućava širok spektar njihove primene u postupcima denitrifikacije. Sličan postupak denitrifikacije bez nastalih intermedijera zabeležen je kod *P. stutzeri* ASM-2-3, izolovanog iz morske vode u Japanu (Kariminiaae-Hamedani i sar., 2004).

5.1.5. Bezbednost primene denitrifikatora u postupcima bioremedijacije

Svaki postupak bioremedijacije je vrlo specifičan jer zavisi kako od karakteristika lokaliteta koji je potrebno tretirati, tako i od odabranog mikroorganizma koji će se u tu svrhu koristiti. Stoga, svakom postupku bioremedijacije treba pristupiti individualno, ispitujući sve faktore

koji mogu imati uticaj na tok procesa. Posmatrano sa mikrobiološkog aspekta, za svaki postupak bioremedijacije potrebno je odabrati odgovarajući mikroorganizam koji pored efikasnosti mora da zadovolji još dva opšta zahteva:

- Mikroorganizam ne sme biti patogen, odnosno ni u jednom trenutku pre, tokom i nakon bioremedijacije zdravlje ljudi i životinja ne sme biti ugroženo;
- Odabrani mikroorganizam ne bi trebalo da bude inicijator, odnosno pionir, u formiranju biofilmova i mora se lako uklanjati sa tretiranog mesta po završetku bioremedijacije (Bosch-Roig i sar., 2014).

Shodno postavljenim zahtevima u okviru ovog rada ispitana je *in vitro* rezistencija (Tabela 15) i adhezijska svojstva (Tabela 16) oba soja *P. stutzeri*.

Tabela 15. Rezultati *in vitro* rezistencije *P. stutzeri*

Antibiotik	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588		<i>P. stutzeri</i> D1	
	MIC*	Interpretacija rezultata	MIC	Interpretacija rezultata
tikarcilin	≤ 8	senzitivan	16	senzitivan
piperacilin	≤ 4	senzitivan	≤ 4	senzitivan
piperacilin/ tazobactam	≤ 4	senzitivan	≤ 4	senzitivan
ceftazidim	≤ 1	senzitivan	≤ 1	senzitivan
cefepim	≤ 1	senzitivan	≤ 1	senzitivan
imipenem	≤ 0,25	senzitivan	≤ 0,25	senzitivan
meropenem	≤ 0,25	senzitivan	≤ 0,5	senzitivan
amikacin	≤ 2	senzitivan	≤ 2	senzitivan
gentamicin	≤ 1	senzitivan	≤ 1	senzitivan
tobramicin	≤ 1	senzitivan	≤ 1	senzitivan
ciprofloksacin	≤ 0,25	senzitivan	≤ 0,25	senzitivan
levofloksacin	≤ 0,12	senzitivan	≤ 0,12	senzitivan
kolistin	≤ 0,5	senzitivan	≤ 0,5	senzitivan
trimetoprim/sulfamektazol	≤ 20	senzitivan	≤ 20	senzitivan

*MIC- Minimalna inhibitorna koncentracija

Ispitivanjem uticaja četrnaest antibiotika na rast ispitivanih sojeva *P. stutzeri* konstatovano je da su oba mikroorganizma senzitivna prema svim antibioticima (Tabela 15). Ovakvi rezultati nedvosmisleno ukazuju da su odabrani sojevi zdravstveno bezbedni i da se mogu sa sigurnošću koristiti u bioremedijacionim postupcima.

Prema Abdelkarim i sar. (2009) adhezijska sposobnost mikroorganizama može biti: visoka, ukoliko je $OD_{620} \geq 1$; srednja, pri $0,1 \geq OD_{620} \geq 1$ i niska, ukoliko je $OD_{620} < 0,1$.

Tabela 16. Rezultati ispitivanja adhezionih osobina *P. stutzeri*

Uzorak	OD ₆₂₀ * (sred. vred. ± st. dev)
destilovana voda	0,025 ± 0,004
<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	0,072 ± 0,005
<i>P. stutzeri</i> D1	0,075 ± 0,009

* OD₆₂₀ – vrednost apsorbance na talasnoj dužini od 620 nm

Na osnovu rezultata ispitivanja adhezionih osobina *P. stutzeri* može se zaključiti da oba testirana soja imaju nisku adhezionu sposobnost (Tabela 16). Na ovaj način pokazano je da je mogućnost adhezije ispitivanih sojeva *P. stutzeri* za abiotičke površine minimalna, kao i mogućnost da su ovi sojevi primarni kolonizeri biofilmova. Pošto ispitivani sojevi ne ispoljavaju tendenciju ka samoagregaciji ćelija i formiranju biofilmova, mogu se koristiti u različitim postupcima bioremedijacije bez straha da će pojava biofilmova na tretiranom mestu izazvati nove ekološke probleme.

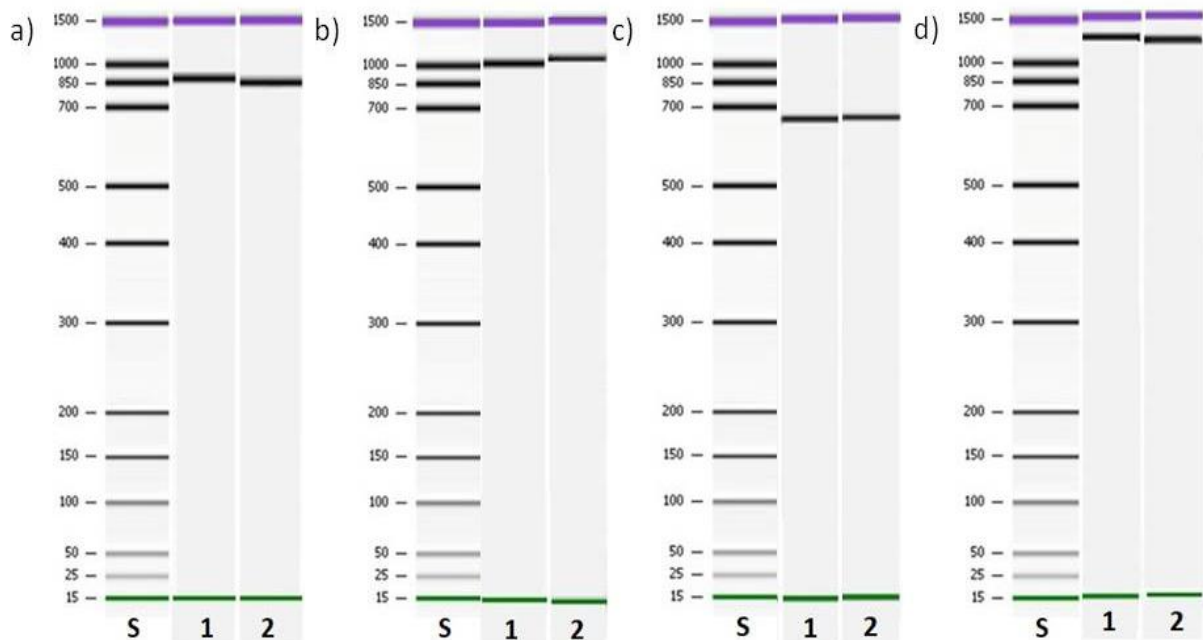
Prikazani rezultati in vitro ispitivanja rezistencije i adhezionih svojstava *P. stutzeri*, kao i kinetike denitrifikacije (poglavlje 4.1.4.) potvrđuju da oba ispitivana soja ispunjavaju sva tri kriterijuma prema Bosch-Roig i sar. (2014) za korišćenje mikroorganizama u postupcima bioremedijacije. Ispunjenje postavljenih kriterijuma je zapravo preduslov za dalju karakterizaciju sojeva na genetičkom nivou i optimizaciju biotehnoloških parametara za proizvodnju biomase.

5.2. Rezultati amplifikacije denitrifikujućih gena

U okviru ovog rada izvršena je amplifikacija četiri ključna denitrifikujuća gena: *napA*, *nirS*, *norB* i *nosZ* u genomu *P. stutzeri* ATCC 17588 i *P. stutzeri* D1 pomoću PCR metode. Na osnovu dobijenih rezultata amplifikacije prikazanih na slici 17 a-d, jasno se može uočiti da su sva četiri gena ključna za proces denitrifikacije uspešno amplifikovana iz genoma odabranih denitrifikatora.

Prvi u nizu amplifikovanih gena je *napA*, koji je zadužen za regulaciju NAP, tj. periplazmatične nitrat-reduktaze. U slučaju referentnog soja veličina amplifikovanog fragmenta *napA* gena je iznosila 875 bp, dok je veličina amplifikovanog fragmenta istog gena

u slučaju prirodnog izolata iznosila 850 bp (slika 17a). Dobijene veličine fragmenata gena *napA* se poklapaju sa veličinom fragmenta od 877 bp istog gena amplifikovanog iz genoma *P. stutzeri* ZF1 (Huang i sar., 2015) i 876 bp amplifikovanog iz genoma izolata koji pripadaju rodovima *Pseudomonas*, *Achromobacter* i *Acinetobacter* (Zhu i sar., 2012). Efikasna amplifikacija *napA* gena iz genoma testiranih bakterija ukazuje na to da upravo periplazmatična nitrat-reduktaza katalizuje prvi korak u procesu denitrifikacije, tj. redukciju nitrata do nitrita (Kraft i sar., 2011). Osim toga *napA* se često koristi kao funkcionalni marker za identifikaciju aerobnih denitrifikujućih bakterija (Hunag i sar., 2015), a uzimajući u obzir da je postojanje ovog gena u genomu *P. stutzeri* ATCC 17588 i *P. stutzeri* D1 dokazano, može se zaključiti da testirani mikroorganizmi imaju sposobnost aerobne denitrifikacije.



Slika 17. Lab-on-chip elektroforeza produkata denitrifikujućih gena: a) *napA*, b) *nirS*, c) *norB*, d) *nosZ*; S: 25-1000 bp DNK standard; 1: *P. stutzeri* ATCC 17588 i 2: *P. stutzeri* D1

Pored *napA* gena, u genomu referentnog soja i prirodnog izolata *P. stutzeri* utvrđeno je prisustvo *nirS* gena, koji reguliše aktivnosti nitrit-reduktaze koja sadrži citohrom cd1 (NirS) u postupku redukcije nitrita do azot-monoksida. Veličina amplifikovanog fragmenta *nirS* u slučaju referentnog soja iznosila je 1060 bp, a u slučaju prirodnog izolata 1065 bp (slika 17b). Fragmenti *nirS* amplifikovani su u slučaju brojnih denitrifikatora, međutim veličina fragmenta značajno varira između ispitivanih sojeva. U većini naučnih istraživanja, veličina fragmenta *nirS* iznosi između 800 i 850 bp (Song i sar., 2011; Chen i Ni, 2012; Huang i sar.,

2015). Ipak, postoje istraživanja koja navode da je veličina ovog fragmenta značajno manja, približno 425 bp (He i sar., 2015), dok je, nasuprot tome, druga grupa naučnika uspešno amplifikovala fragment *nirS* veličine oko 1000 bp (Zhao i sar., 2018), kao što je slučaj u ogledu sprovedenom u okviru ovog rada. Do velikih varijacija u veličini amplifikovanih fragmenata *nirS*, ali i drugih denitrifikujućih gena, najverovatnije dolazi usled korišćenja kompleksnih degenerativnih prajmera.

Treći korak u procesu denitrifikacije koji obuhvata redukciju azot-monoksida do azot-suboksida je regulisan delovanjem enzima azot-monoksid reduktaza (Nor). Sposobnost mikroorganizma da redukuje NO do N₂O potvrđuje se amplifikacijom gena *norB*. Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih na slici 17c, može se konstatovati da je iz uzoraka DNK oba bakterijska soja uspešno amplifikovan fragment veličine 675 bp. Prema Huang i sar. (2015), veličina sekvence *norB* gena bi trebalo da iznosi približno 669 bp, što je u odličnoj korelaciji sa ostvarenim rezultatima u okviru ovog rada. Sličan red veličine fragemnta *norB* gena (približno 650 bp) amplifikovan je i u slučaju drugih denitrifikatora (Zheng i sar., 2014; He i sar., 2015) sa izuzetkom *P. stutzeri* XL-2 kod koga dužina ovog fragmenta iznosi čak 991 bp (Zhao i sar., 2018).

Završni korak denitrifikacije, koji je karakterističan za potpune denitrifikatore, podrazumeva redukciju azot-suboksida do molekuskog azota posredstvom azot-suboksid-reduktaze (Nos). Aktivnost ovog enzima je često supresovana u prisustvu kiseonika, mada kod pojedinih mikroorganizama aktivnost Nos je nezavisna od koncentracije prisutnog kiseonika (Zheng i sar., 2014). Utvrđivanjem postojanja *nosZ* gena u genomu nekog mikroorganizma može se dokazati sposobnost tog mikroorganizma da završni korak denitrifikacije obavlja pri aerobnim uslovima, te se takav mikroorganizam može svrstati u grupu potpunih aerobnih denitrifikatora. Kao što je na slici 17d prikazano, iz molekula DNK referentnog soja amplifikovan je fragment veličine 1230 bp, a iz molekula DNK prirodnog izolata fragment veličine 1225 bp. Iako prema dostupnoj literaturi veličina fragmenta *nosZ* gena iznosi oko 300 bp (Zheng i sar., 2014; He i sar., 2015; Huang i sar., 2015), postoje navodi koji ukazuju da velična amplifikovanog fragmenta *nosZ* gena zavisi od dizajniranih prajmera, kao i uslova PCR reakcije (Scala i Kerkhof, 1998). Navedene činjenice su potvrđene u najnovijim istraživanjima, uspešnom amplifikacijom fragmenta *nosZ* gena veličine 999 bp u genomu *P. stutzeri* XL-2 (Zhao i sar., 2018).

Na osnovu prikazanih rezultata amplifikacije četiri ključna gena denitrifikacionog procesa iz genoma ispitivanih denitrifikatora može se zaključiti da oba ispitivana soja poseduju sve gene neophodne za obavljanje potpune denitrifikacije u aerobnim uslovima. Zahvaljujući uspešnoj amplifikaciji denitrifikujućih gena, može se pretpostaviti da se u slučaju oba ispitivana soja *P. stutzeri* proces denitrifikacije odvija prema sledećim redukcionim koracima: nitrat → nitrit → azot-monoksid → azot-suboksid → molekularni azot.

5.3. Definisavanje sastava medijuma i optimizacija odabranih bioprocenih parametara za umnožavanje biomase denitrifikatora

5.3.1. Ispitivanje uticaja inicijalnih koncentracija C i N na kinetiku rasta denitrifikatora

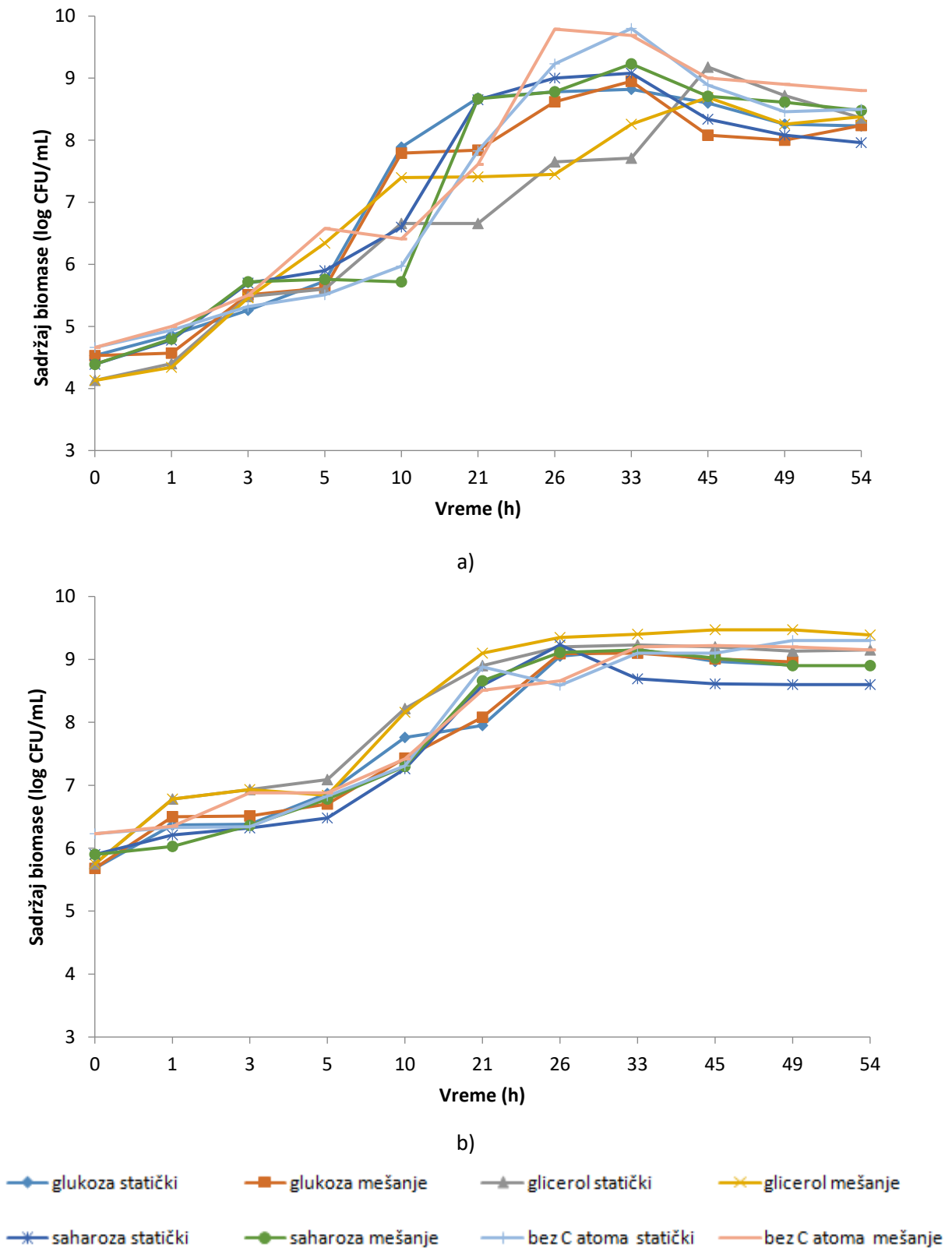
U novijim istraživanjima je pokazano da prisustvo C atoma u medijumu može značajno da ubrza konverziju nitrata do molekularnog azota (Lu i sar., 2009; Yang i sar., 2012; Zhu i sar., 2015). Bosch-Roig i sar. (2016) su dokazali da *P. stutzeri* 5190 kao izvor C ili N atoma može da usvaja širok spektar jedinjenja. Takođe, osim uobičajenih izvora ugljenika koji se koriste u biotehnološkim procesima, sprovode se istraživanja o mogućnosti upotrebe biodegradabilne plastike kao izvor C atoma u procesu denitrifikacije, što je od izuzetnog značaja u pogledu zaštite životne sredine (Zhang i Zhang, 2018). Izbor N atoma isključivo zavisi od mesta buduće primene dobijene biomase denitrifikatora, odnosno treba izabrati onaj izvor N atoma koji je dominantan na mestu primene kako bi se izbegla pojava duge *lag* faze. Sem izbora odgovarajućeg C i N atoma mora se obratiti pažnja i na utvrđivanje optimalne koncentracije ovih elemenata u hranljivoj podlozi, kako bi se bioprocen odvijao nesmetano i sa što manje zaostalih nutrijenata u kultivacionoj tečnosti po završetku procesa.

U cilju pravilne formulacije sastava hranljivih podloga za umnožavanje biomase denitrifikatora u okviru preliminarnih eksperimenata ispitan je uticaj inicijalnih koncentracija tri različita izvora ugljenika, kao i uticaj početne koncentracije kalijum nitrata na kinetiku

rasta i produkciju biomase odabranih denitrifikatora. Pored toga, ispitan je i efekat mešanja na prinos biomase *P. stutzeri* sojeva ATCC 17588 i D1.

U okviru ovog rada za ispitivanje uticaja početne koncentracije C atoma na kinetiku rasta denitrifikatora odabrani su: glukoza kao uobičajen izvor C atoma i zbog svoje dostupnosti na tržištu; saharoza kao najkorišćeniji disaharid u biotehnologiji i glicerol zbog njegove ekonomičnosti, jer se javlja kao jedan od nusproizvoda u industriji nafte.

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 18a moguće je zaključiti da do maksimalnog umnožavanja biomase (9,5 log jedinica) u slučaju referentnog soja dolazi kada u medijumu nisu prisutni izvori C atoma, nezavisno od uticaja mešanja. Nasuprot tome, najveći broj kolonija *P. stutzeri* D1 (9,1 log jedinice) ustanovljen je u medijumu sa dodatkom 0,5 g/L glicerola koji je bio podvrgnut mešanju (slika 18b). Osim toga, moguće je zapaziti da je eksponencijalna faza u slučaju referentnog soja traje do 30 h kod svih ispitivanih medijuma, sem medijuma bez dodatka C atoma u statičkim uslovima u kome eksponencijalna faza traje 24 h. Na osnovu ispitivanja uticaja različitih izvora ugljenika na kinetiku rasta i produkciju biomase *P. stutzeri* D1 moguće je zapaziti da između ispitivanih medijuma nema razlike u dužini pojedinačnih faza rasta, te da je u svim slučajevima kraj eksponencijalne faze oko 24 h od početka kultivacije. Ispitivani denitrifikatori nisu dostigli fazu odumiranja ni nakon 50 h kultivacije u svim ispitivanim medijumima.

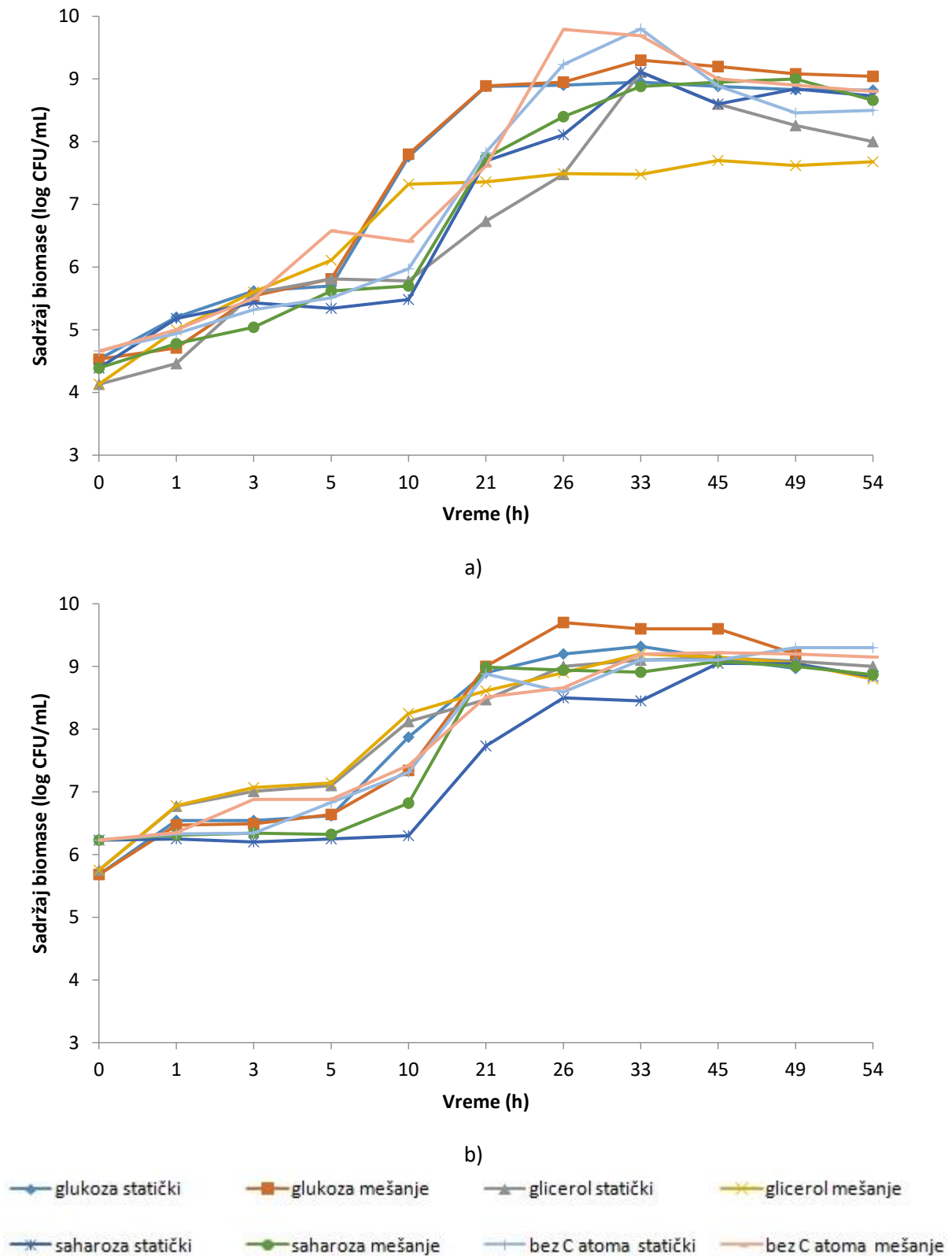


Slika 18. Uticaj različitih izvora C atoma u koncentraciji od 0,5 g/L sa i bez uticaja mešanja na produkciju biomase: a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1

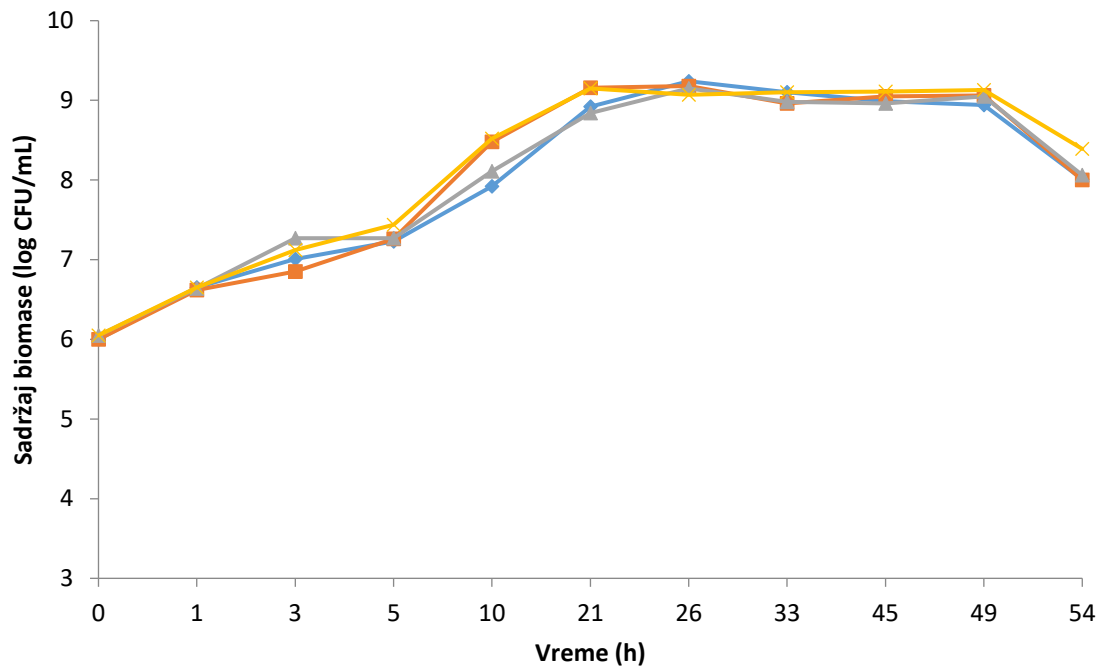
Pri koncentraciji od 1 g/L ispitivanih izvora ugljenika u slučaju *P. stutzeri* ATCC 17588 zapaža se da u medijumu sa dodatkom glukoze uz primenjeno mešanje dolazi do skraćenja eksponencijalne faze koja u ovom slučaju traje do 20 h (slika 19a). Na kraju eksponencijalne faze u pomenutom medijumu ukupan broj ćelija je bio oko 9 log jedinica, što je za oko 0,5 log jedinice manje u odnosu na broj ćelija u medijumu bez dodatka izvora C atoma. Ovakav rezultat ukazuje na mogućnost da referentni soj lakše usvaja ugljenik iz peptona koji se nalazi u sastavu nitratnog bujona, te da nema potrebe za dodavanjem novih izvora C atoma kako bi se postigao veći prinos biomase. Ukoliko se uporede krive rasta za *P. stutzeri* D1 za medijume u kojima je koncentracija izvora C atoma 1 g/L, jasno se može zapaziti da se maksimalan broj kolonija (9,7 log jedinica) na kraju eksponencijalne faze ostvaruje u medijumu sa dodatkom glukoze (slika 19b).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se najveća brojnost (9,5 log jedinica) *P. stutzeri* ATCC 17588 postiže u medijumu bez dodatka C atoma, dok se maksimalan broj (9,7 log jedinica) *P. stutzeri* D1 ostvaruje u medijumu sa dodatkom 1 g/L glukoze.

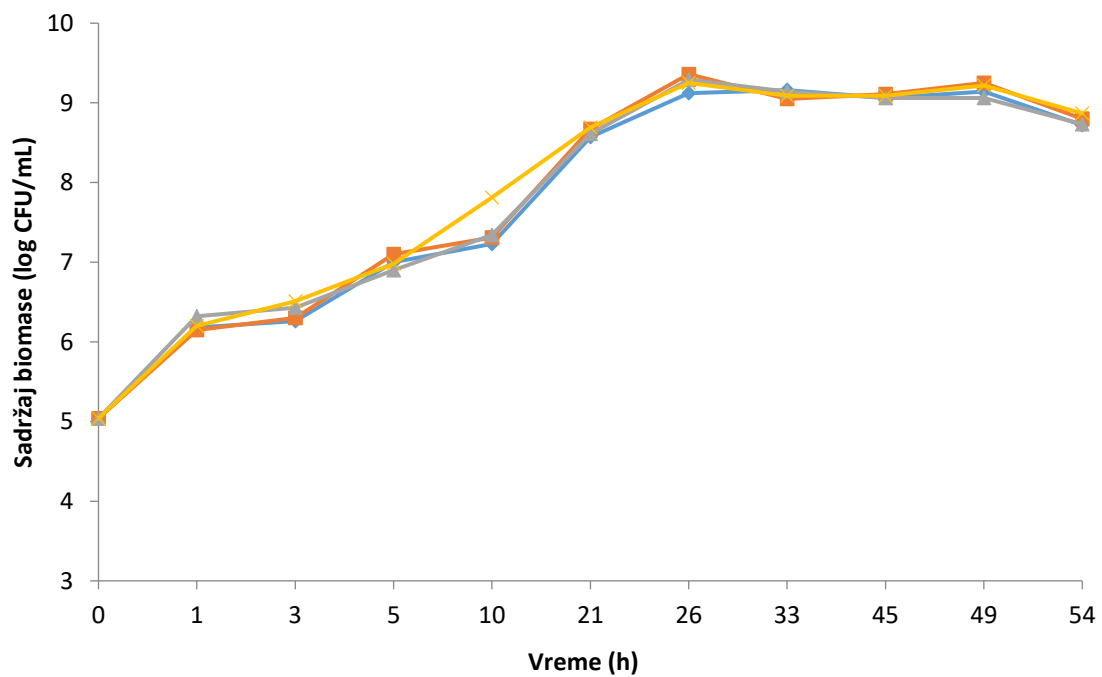
Tokom eksperimenata u kojima se ispitivao uticaj povećane inicijalne koncentracije kalijum-nitrata na 2 i 3 g/L (početna koncentracija kalijum-nitrata u sastavu nitratnog bujona je 1 g/L) na kinetiku rasta ispitivanih denitrifikatora zapaženo je da nema bitnih razlika (slika 20a-b). Naime, pri povećanim koncentracijama kalijum-nitrata oba mikroorganizma dostižu maksimalnu brojnost od približno 9 log jedinica između 20 i 24 h od početka kultivacije. Pri povećanim koncentracijama kalijum-nitrata u medijumu nakon 48 h može se zapaziti početak faze odumiranja kod oba ispitivana mikroorganizma.



Slika 19. Uticaj različitih izvora C atoma u koncentraciji od 1 g/L sa i bez uticaja mešanja na produkciju biomase: a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1



a)



b)

◆ 2 g/L statički
 ■ 2 g/L mešanje
 ▲ 3 g/L statički
 ✕ 3 g/L mešanje

Slika 20. Uticaj različitih koncentracija KNO_3 sa i bez uticaja mešanja na produkciju biomase: a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1

Rezultati izvedenih eksperimenata ukazuju na veoma male razlike u kinetici rasta i postignutom maksimalnom broju mikroorganizama u ispitivanim medijumima sa i bez uticaja mešanja. Dobijeni rezultati su u skladu sa dostupnim istraživanjima u kojima je pokazano da mešanje nije značajan faktor kako za rast denitrifikatora, tako i za sam proces denitrifikacije (Yang i sar., 2012). Eliminisanje uticaja jednog faktora je veoma pogodno sa aspekta smanjenja broja promenljivih u bioprocima, pri čemu se lakše uočavaju uticaji i interakcije između drugih faktora značajnih za dati bioproc. Takođe, izvođenje bioprocisa u statičkim uslovima na industrijskom nivou doprinosi značajnoj uštedi električne energije.

5.3.2. Formulacija sastava medijuma za proizvodnju biomase

Prilikom formulacije sastava hranljivih podloga za proizvodnju biomase odabranih denitrifikatora bilo je neophodno odabrati komponente i definisati njihove koncentracije. Za potrebe definisanja sastava medijuma za proizvodnju biomase denitrifikatora odabrane su sledeće komponente: KNO_3 , pepton i glukoza. Polazna ideja za izbor ovih komponenti je proistekla iz sastava nitratnog bujona, koji se koristi za diferencijaciju bakterija na osnovu sposobnosti redukcije nitrata. Dve glavne komponente nitratnog bujona, KNO_3 i pepton, odabrane su kao komponente medijuma za umnožavanje biomase odabranih denitrifikatora. U nitratnom bujonu se pepton nalazi u koncentraciji od 4 g/L, dok je koncentracija KNO_3 3 g/L. U okviru ovog rada koncentracije KNO_3 i peptona su varirane kao što je prikazano u tabeli 9, kako bi se smanjila cena medijuma za umnožavanje biomase denitrifikatora.

Kao treća komponenta medijuma za proizvodnju biomase denitrifikatora odabrana je glukoza na osnovu rezultata dobijenih u okviru eksperimenata prikazanih u poglavlju 5.3.1. Sadržaj glukoze u medijumu za proizvodnju biomase variran je u skladu sa postavljenim Boks-Benkenovim eksperimentalnim planom.

Nakon odabira komponenti, definisanje sastava hranljivih podloga za proizvodnju biomase odabranih denitrifikatora izvršeno je u skladu sa postavljenim ciljem rada i predloženim Boks-Benkenovim eksperimentalnim planom. S obzirom da je cilj ovog oglada formulacija sastava medijuma za proizvodnju biomase denitrifikatora, sadržaj biomase je odabran kao odzivni parametar. Za definisani odziv uspostavljen je polinom drugog reda u cilju

sagledavanja uticaja ulaznih promenljivih (KNO_3 , pepton i glukoza). Rezultati oglada prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. Rezultati Boks-Benkenovog eksperimentalnog plana

Redni broj oglada	Sadržaj biomase	Sadržaj biomase
	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 (log CFU/mL)	<i>P. stutzeri</i> D1 (log CFU/mL)
1	7,80	7,18
2	7,49	6,20
3	7,58	7,61
4	5,86	6,23
5	7,20	5,98
6	5,63	6,20
7	8,53	8,51
8	8,48	7,48
9	5,77	7,70
10	5,28	6,53
11	8,36	7,95
12	8,38	8,62
13	6,95	6,90
14	6,97	6,30
15	6,59	6,70

Razvoj adekvatnih matematičkih modela je značajan korak prilikom optimizacije, simulacije i upravljanja procesima (Hodžić i Hodžić, 2014). Kako bi se definisale zavisnosti koje opisuju uticaj pojedinačnih komponenti hranljive podloge na broj mikroorganizama na kraju bioprocesa, rezultati prikazani u tabeli 18 fitovani su polinomom drugog reda. Intenzitet uticaja statistički značajnih koeficijenata regresione jednačine određen je poređenjem apsolutnih vrednosti Studentovog testa (*t*-test). Regresioni koeficijenti i njihova značajnost prikazani su u tabeli 16 za oba ispitivana soja *P. stutzeri*.

Na osnovu predznaka koeficijenata u regresionim jednačinama moguće je ustanoviti uticaj svakog faktora pojedinačno, ali i uticaj njihovih međusobnih interakcija na definisani odziv. Naime, ukoliko je predznak pozitivan to ukazuje na sinergistički uticaj određenih faktora na analizirani odziv. Nasuprot tome, ukoliko je predznak koeficijenta negativan, veza između određenih faktora i odziva sistema je antagonistička.

Tabela 18. Koeficijenti regresione jednačine i njihova značajnost

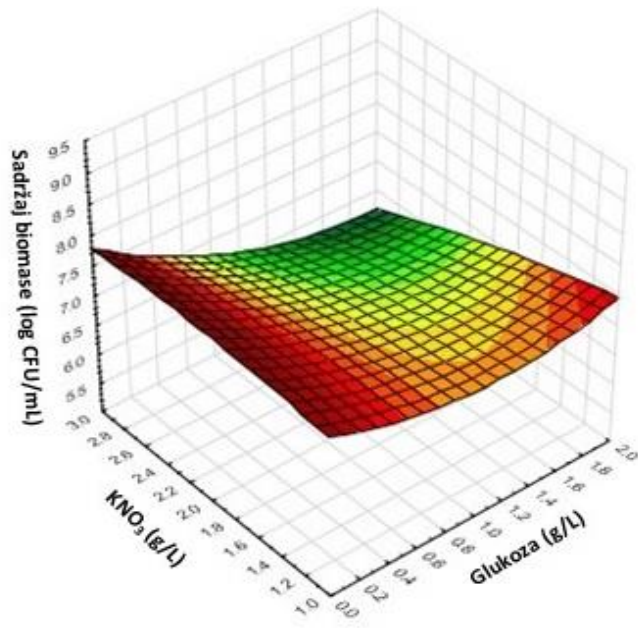
Odzivi	Sadržaj biomase <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 (log)		Sadržaj biomase <i>P. stutzeri</i> D1 (log)	
	Koeficijent	t-vrednost	Koeficijent	t-vrednost
Odsečak				
b ₀	6,76588	7,18236	8,94928	7,44287
Linearni				
b ₁ [*]	-1,05680	-1,90973	0,62697	0,88764
b ₂ ^{**}	0,22577	0,28982	-2,08125	-2,09311
b ₃ ^{***}	0,23200	0,68347	-0,68468	-1,58023
Kvadratni				
b ₁₁	0,42917	2,37809	-0,24292	-1,05456
b ₂₂	-0,08333	-0,46176	0,41458	1,79980
b ₃₃	0,01784	0,31541	0,17708	2,45305
Interakcije				
b ₁₂	-0,35250	-2,03303	-0,10000	-0,45185
b ₁₃	0,21296	2,21764	-0,16066	-1,31072
b ₂₃	0,08098	0,84329	0,24663	2,01206

Legenda: *1- glukoza, ** 2-KNO₃, ***3-pepton

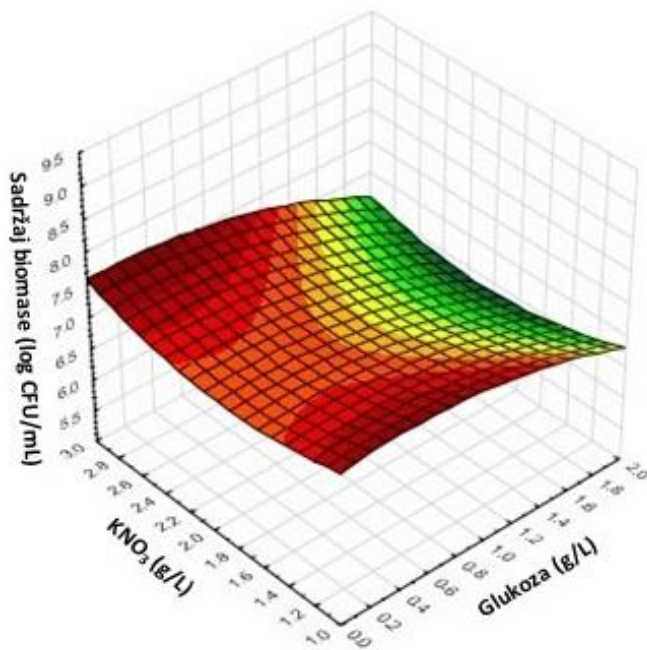
Na osnovu vrednosti prikazanih u tabeli 18, može se zapaziti da na definisani odziv u slučaju referentnog soja *P. stutzeri* najviše uticaja ima linearni i kvadratni član koncentracije glukoze. Osim toga, na broj kolonija referentnog soja utiču i uzajamne interakcije glukoze sa druga dva faktora (b₁₂ i b₁₃).

U slučaju *P. stutzeri* D1 najveći uticaj na odziv sistema imaju linearni član KNO₃, kvadratni član peptona i koeficijent interakcije KNO₃ i peptona (b₂₃).

Kako bi se bolje razumeo uticaj variranih faktora na sadržaj biomase nacrtae su odzivne površine koje su prikazane na slikama 20-22.



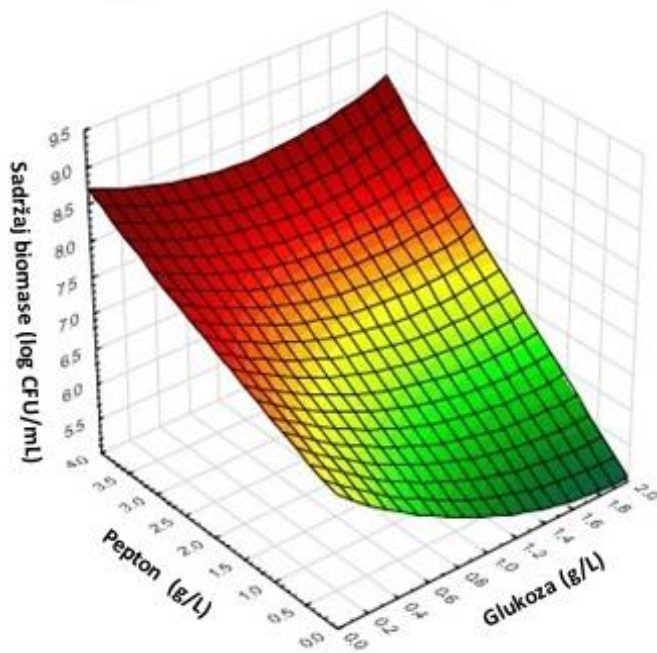
a)



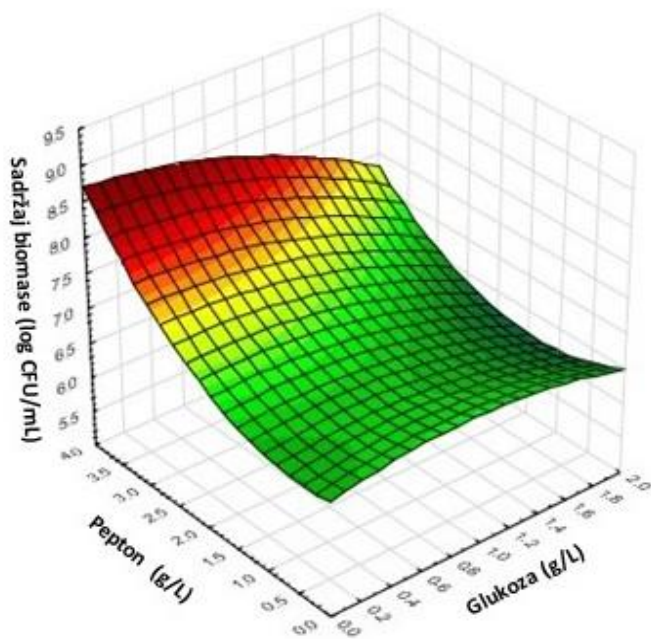
b)

Slika 21. Uticaj inicijalnih koncentracija glukoze i KNO_3 na sadržaj biomase a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1 pri konstantnoj koncentraciji peptona (2 g/L)

Uticaj inicijalne koncentracije glukoze i KNO_3 na sadržaj biomase *P. stutzeri* ATCC 17588 i D1 pri konstantnoj koncentraciji peptona od 2 g/L prikazan je na slici 21a-b. Na osnovu dobijenog modela prikazanog na slici 21a, može se konstatovati da se maksimalan sadržaj biomase (približno 8 log CFU/mL) referentnog soja ostvaruje u medijumu bez glukoze, dok koncentracija KNO_3 nema uticaj na definisani izlaz modela. U slučaju soja D1, maksimalni sadržaj biomase (približno 7,5 log CFU/mL) se postiže pri najnižoj (1 g/L) i najvišoj (3 g/L) koncentraciji KNO_3 kada se koncentracija glukoze nalazi u opsegu od 0 g/L do 1 g/L (slika 21b).



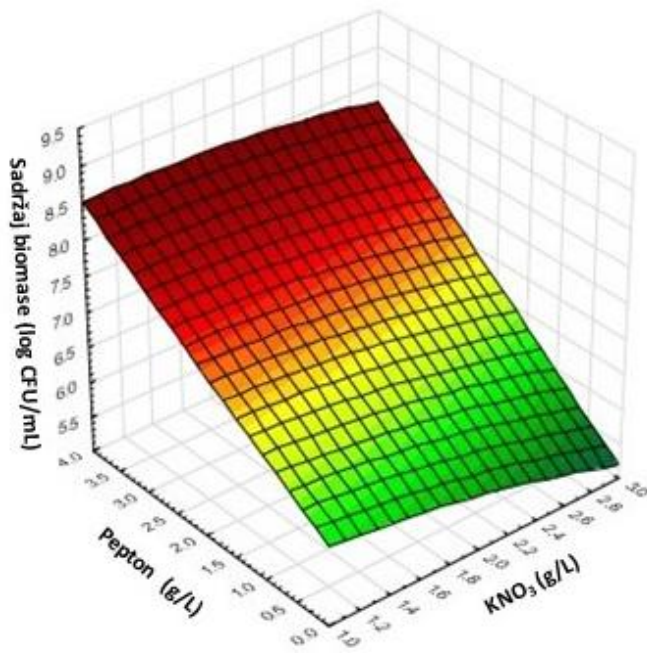
a)



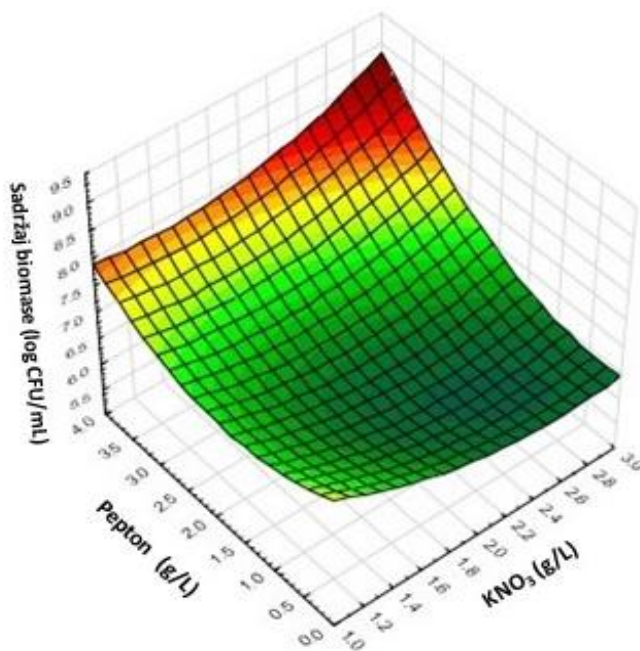
b)

Slika 22. Uticaj inicijalnih koncentracija peptona i glukoze na sadržaj biomase a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1 pri konstantnoj koncentraciji KNO_3 (2 g/L)

Slike 22a-b prikazuje predikciju sadržaja biomase u kultivacionoj tečnosti po završetku bioprocesa pri konstantnoj koncentraciji KNO_3 (2 g/L) i pri variranim inicijalnim koncentracijama glukoze i peptona. Na osnovu prikazanih rezultata jasno se zapaža da u slučaju referentnog soja (slika 22a), sadržaj biomase se povećava sa povećanjem koncentracije peptona, skoro nezavisno od koncentracije glukoze. Nasuprot tome, najveći sadržaj biomase *P. stutzeri* D1 (slika 22b) se zapaža u medijumu sa maksimalnom koncentracijom peptona (4 g/L) i koncentracijom glukoze u opsegu od 0 g/L do 1 g/L.



a)



b)

Slika 23. Uticaj inicijalnih koncentracija peptona i KNO_3 na sadržaj biomase a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1 pri konstantnoj koncentraciji glukoze (1 g/L)

Slike 23a-b prikazuje modelom predviđen uticaj inicijalnih koncentracija peptona i KNO_3 na sadržaj biomase referentnog soja i prirodnog izolata *P. stutzeri* pri koncentraciji glukoze od 1 g/L. Na osnovu prikazanih rezultata može se uočiti da je za ostvarenje maksimalnog sadržaja biomase oba ispitivana denitrifikatora potrebna maksimalna koncentracija peptona u kultivacionom medijumu. Takođe, za umnožavanje biomase *P. stutzeri* D1 neophodna je i najveća koncentracija KNO_3 (3 g/L) (slika 23b), dok za referentni soj koncentracija KNO_3 nema značajan uticaj na sadržaj biomase (slika 23a).

Zahvaljujući prikazanim modelima može se zaključiti da je optimalan sastav hranljivih podloga za produkciju biomase ispitivanih mikroorganizama sledeći:

- 1) za *P. stutzeri* ATCC 17588 (približno 8,5 log CFU/mL) – 0 g/L glukoze, 2 g/L KNO₃ i 4 g/L peptona i
- 2) za *P. stutzeri* D1 (približno 8,6 log CFU /mL) – 1 g/L glukoze, 3 g/L KNO₃ i 4 g/L peptona.

Na osnovu prikazanih rezultata može se konstatovati da na sadržaj biomase ispitivanih denitrifikatora ulazni faktori imaju različit uticaj. Ovakav rezultat ukazuje na činjenicu da iako testirani sojevi pripadaju istoj vrsti svaki od njih ispoljava različitu metaboličku aktivnost, te se sastav hranljivih podloga mora optimizovati individualno, za svaki soj, bez obzira na njihovu filogenetsku sličnost.

5.3.3. Ispitivanje uticaja odabranih procesnih parametara na sadržaj biomase *P. stutzeri*

5.3.3.1. Teorijska vrednost sadržaja biomase *P. stutzeri*

Prema Lalucat i sar. (2006), ćelija *P. stutzeri* je cilindričnog oblika prosečnog prečnika (R) 0,5 μm i dužine (H) 2 μm. Na osnovu ovih podataka moguće je izračunati teorijsku vrednost sadržaja biomase u jedinici zapremine. Zapravo, teorijska vrednost maksimalnog sadržaja biomase mikroorganizma je veličina koja definiše idealno pakovanje ćelija u jedinici zapremine. Na osnovu poznatog prečnika i dužine ćelija moguće je izračunati njenu zapreminu (V_c):

$$V_c = \left(\frac{R}{2}\right)^2 \pi H = 3,925 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^3$$

Dalje, teorijski broj ćelija (n) u zapremini od 1 ml, tj. 1 cm³ (V) iznosi:

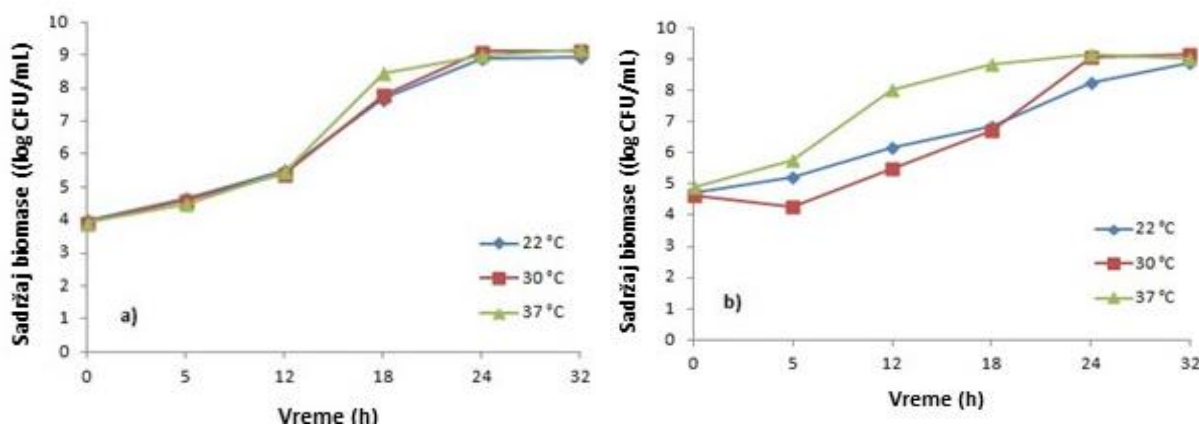
$$n = \frac{V}{V_c} = 2,55 \cdot 10^{12} \text{ ćelija}$$

Izračunata teorijska vrednost odgovara maksimalnom sadržaju biomase po mililitru kultivacione tečnosti. U daljim eksperimentima optimizacije procesnih parametara moguće je utvrditi efikasnost bioprocasa pri definisanim uslovima sredine poređenjem dobijenih vrednosti sadržaja biomase sa teorijskom vrednošću.

5.3.3.2. Uticaj temperature na sadržaj biomase *P. stutzeri*

Temperatura je jedan od najvažnijih procesnih faktora koji utiču na rast mikroorganizama, ali i na efikasnost procesa denitrifikacije. U okviru ovog rada ispitan je uticaj tri temperature (22 °C, 30 °C i 37 °C) na rast i produkciju biomase referentnog soja i prirodnog izolata *P. stutzeri* (slika 24a-b).

Kod oba soja *P. stutzeri* se na sve tri ispitivane temperature može zapaziti lag faza u prvih 5 h kultivacije. Pojava kratke lag faze može biti posledica adaptacije ćelija na novonastale uslove, tj. promena hranljive podloge i temperature. Na temperaturi od 37 °C oba ispitivana soja ispoljavaju najbrži rast, pri čemu je sadržaj biomase na kraju eksponencijalne faze (nakon 24 h) iznosio približno 9 log CFU/mL. Rast *P. stutzeri* D1 na temperaturi od 30 °C je blago usporeniji u odnosu na temperaturu od 37 °C, ali i pored toga nakon 24 h oba ispitivana soja dostižu 9 log CFU/ml. U pogledu sadržaja biomase oba ispitivana mikroorganizma, temperatura od 22 °C je najmanje efikasna, tj. maksimalan sadržaj biomase na kraju eksponencijalne i početku stacionarne faze iznosi približno 8 log CFU/mL.



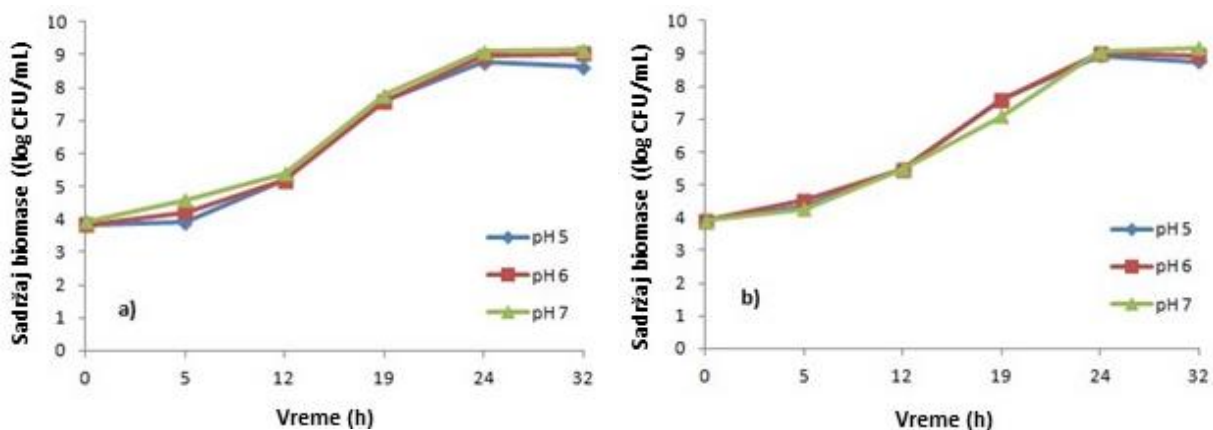
Slika 24. Uticaj temperature kultivacije na sadržaj biomase:
a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1

Uzimajući u obzir da je na temperaturama od 30 °C i 37 °C postignut podjednak sadržaj biomase za ispitivane sojeve *P. stutzeri*, može se zaključiti da je temperatura od 30 °C najpogodnija za postizanje maksimalnog sadržaja biomase. Osim toga, vođenje procesa temperaturama što bližim ambijentalnim je jednostavnije i efikasnije u ekonomskom pogledu. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji upućuju na to da je temperatura od 30 °C dvostruko efikasna, tj. optimalna je za rast i produkciju biomase, a istovremeno se na toj temperaturi najjače ispoljava denitrifikaciona aktivnost

mikroorganizama poput *Bacillus* YX-6 (Song i sar., 2011), *P. stutzeri* ZF31 (Huang i sar., 2015) i *P. stutzeri* XL-2 (Zhao i sar., 2018).

5.3.3.3. Uticaj pH vrednosti na sadržaj biomase *P. stutzeri*

Prema Lalucat i sar. (2006) nijedan soj *P. stutzeri* nije tolerantan na uslove kisele sredine i ne raste u sredinama sa pH vrednosti ispod 4,5. Pored toga što pH vrednost direktno utiče na rast mikroorganizama, ovaj procesni parametar utiče i na aktivnost enzima i gena koji su povezani sa denitrifikujućom aktivnosti mikroorganizama. Stoga su ogledi ispitivanja uticaja pH vrednosti na sadržaj biomase postavljeni tako da se ispita efekat pH vrednosti od 5, 6 i 7 jedinica na rast oba soja *P. stutzeri*, jer su ove vrednosti optimalne za proces denitrifikacije (Ji i sar., 2015).



Slika 25. Uticaj pH vrednosti medijuma na sadržaj biomase:

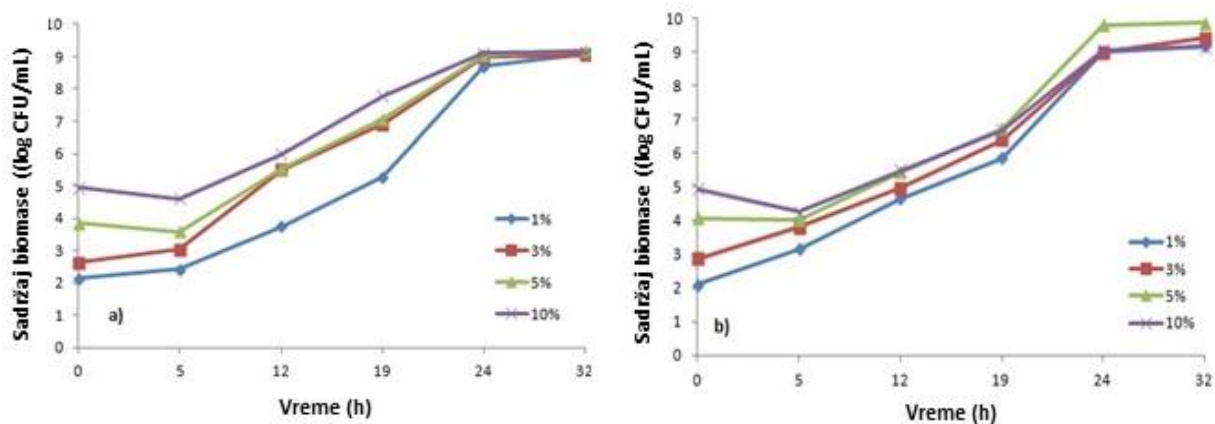
a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 25a-b može se konstatovati da ispitivane pH vrednosti nemaju značajan uticaj na sadržaj biomase niti na kinetiku rasta oba soja *P. stutzeri*. Bez obzira na početnu vrednost pH oba ispitivana soja na kraju kultivacije dostižu vrednost sadržaja biomase od 9 log CFU/mL. Ovakvi rezultati su veoma pogodni prilikom prelaska sa laboratorijskog nivoa na poluindustrijsku ili industrijsku proizvodnju jer ni veće oscilacije u pH vrednosti tokom bioprocasa ne remete njegov tok, niti utiču na prinos biomase, što značajno pojednostavljuje vođenje takvog procesa. S obzirom da pH vrednost ne utiče na tok bioprocasa, proces proizvodnje biomase odabranih denitrifikatora bi trebao da se odvija u neutralnoj sredini (pH oko 7), jer je u takvim uslovima (pH 7-7,5) i denitrifikujuća aktivnost najveća (Ji i sar., 2015).

5.3.3.4. Uticaj veličine inokuluma na sadržaj biomase *P. stutzeri*

Kada je cilj podići biotehnošku proizvodnju na veće razmere, onda parametar kao što je veličina inokuluma postaje veoma značajan. Naime, tokom industrijske ili poluindustrijske proizvodnje mogu se ostvariti značajne uštede ukoliko se proces započinje sa manjom količinom inokuluma, a da se pri tome održi visok prinos željenog proizvoda ili biomase (Schmidt, 2005). U okviru ovog rada ispitan je uticaj četiri veličine inokuluma (1%, 3%, 5% i 10% (v/v)) na sadržaj biomase *P. stutzeri* ATCC 17588 i *P. stutzeri* D1 (slika 26a-b).

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 26a može se zapaziti da se u slučaju referentnog soja, bez obzira na veličinu inokuluma, na kraju bioprocesa dostiže sadržaj biomase u rasponu od 8,5 do 9,1 log CFU/mL. Na slici 26b se može zapaziti da je najveći sadržaj biomase (9,8 log CFU/mL) *P. stutzeri* D1 ostvaren kada je na početku kultivacije upotrebljen inokulum od 5%. Za sve ostale veličine inokuluma u slučaju *P. stutzeri* D1 sadržaj biomase je u rasponu od 8,6 do 9,2 log CFU/mL. Najmanji sadržaj biomase kod oba ispitivana mikroorganizma se može zapaziti pri korišćenju inokuluma od 1%. Osim postizanja najmanjeg sadržaja biomase, pri najmanjoj zapremini inokuluma bioproces je znatno usporeniji u odnosu na kultivacije sa većim zapreminama inokuluma.



Slika 26. Uticaj veličine inokuluma na sadržaj biomase:
a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1

Upotreba inokuluma čija je veličina veća od 10% (v/v) može da prouzrokuje probleme tokom bioprocesa. Tačnije, što je na početku bioprocesa veći broj ćelija veća je kompeticija za supstratom i obrnuto (Thakur i sar., 2014). Stoga je za bioproces koji se odvija u većim razmerama neophodno odabrati optimalnu vrednost veličine inokuluma koja daje maksimalan prinos željenog proizvoda ili biomase i ne ometa tok procesa.

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 26a-b može se zaključiti da je zapremina inokuluma od 5% (v/v), najpogodnija za proizvodnju biomase *P. stutzeri* D1. S obzirom da se u slučaju *P. stutzeri* ATCC 17588 na kraju bioprocesa dobijaju približno isti sadržaji biomase, veličina inokuluma od 5% (v/v) se može smatrati najoptimalnijom kako bi se izbegli eventualni problemi pri proizvodnji sa maksimalnim ili minimalnim veličinama inokuluma (Thakur i sar., 2014).

Ukoliko se uporede vrednosti sadržaja proizvedene biomase u ogledima optimizacije odabranih procesnih parametara (slike 24-26) sa izračunatom teorijskom vrednosti sadržaja biomase (poglavlje 5.3.3.1.), može se konstatovati da su eksperimentalne vrednosti sadržaja biomase manje za približno 3 log jedinice u odnosu na teorijsku vrednost. Ovakav rezultat je očekivan, jer se tokom izračunavanja teorijske vrednosti sadržaja biomase polazi od pretpostavke da su ćelije idealno raspoređene jedna do druge u definisanoj zapremini, što u realnim uslovima nije moguće. Uzimajući u obzir da je u svim ogledima optimizacije odabranih procesnih parametara sadržaj biomase iznosio približno 9 log CFU/mL, te da ćelije nisu idealno raspoređene u kultivacionoj tečnosti, može se zaključiti da su izvedeni ogledi efikasni i konzistentni u pogledu proizvodnje biomase odabranih denitrifikatora.

5.4. Validacija optimizovanih parametara kultivacije u laboratorijskim bioreaktorima

Pre projektovanja predloženog biotehnološkog procesa dobijanja biomase denitrifikatora u uvećanim razmerama, neophodno je izvršiti validaciju rezultata ostvarenih u ogledima optimizacije sastava hranljivog medijuma i odabranih procesnih parametara. Validacija optimizovanih parametara kultivacije u ovom radu izvršena je izvođenjem nove serije oglada pod tačno definisanim uslovima u dva bioreaktora ukupnih zapremina 3 L i 7 L. Izvođenjem ovih oglada u laboratorijskim bioreaktorima ujedno se vrši validacija optimizovanih parametara i ispitivanje mogućnosti proizvodnje biomase denitrifikatora u uvećanim razmerama. Pod uspešnom validacijom rezultata se smatra adekvatno poklapanje rezultata dobijenih u ogledima optimizacije sa rezultatima kultivacije izvedene pri optimizovanim parametrima. Ukoliko su odstupanja u rezultatima izražena, optimizacioni rezultati se mogu

smatrati neodgovarajućim, te se ogledi optimizacije moraju ponoviti (Baras i sar., 2009). Bitno je naglasiti da u ovom radu nije praktikovana klasična šema biotehnologije koja podrazumeva da se pri prelasku iz manjih u veće zapremine postupno povećava zapremina za 10 puta kako bi se ispitala stabilnost biotehnološkog procesa. U eksperimentima validacije optimizovanih parametara u laboratorijskim reaktorima proizvodnja biomase denitrifikatora je iz 100 mL kultivacione tečnosti direktno povećana na 2 L i na 5 L, odnosno, pri prelasku iz erlenmajera u laboratorijske bioreaktore zapremina kultivacione tečnosti je povećana 20, odnosno 50 puta.

Osim praćenja broja bakterija tokom kultivacije, po završetku biosinteze uzorci kultivacione tečnosti su analizirani u pogledu sadržaja glukoze i ukupnog azota kako bi se u potpunosti sagledala efikasnost izvedenog bioprocasa.

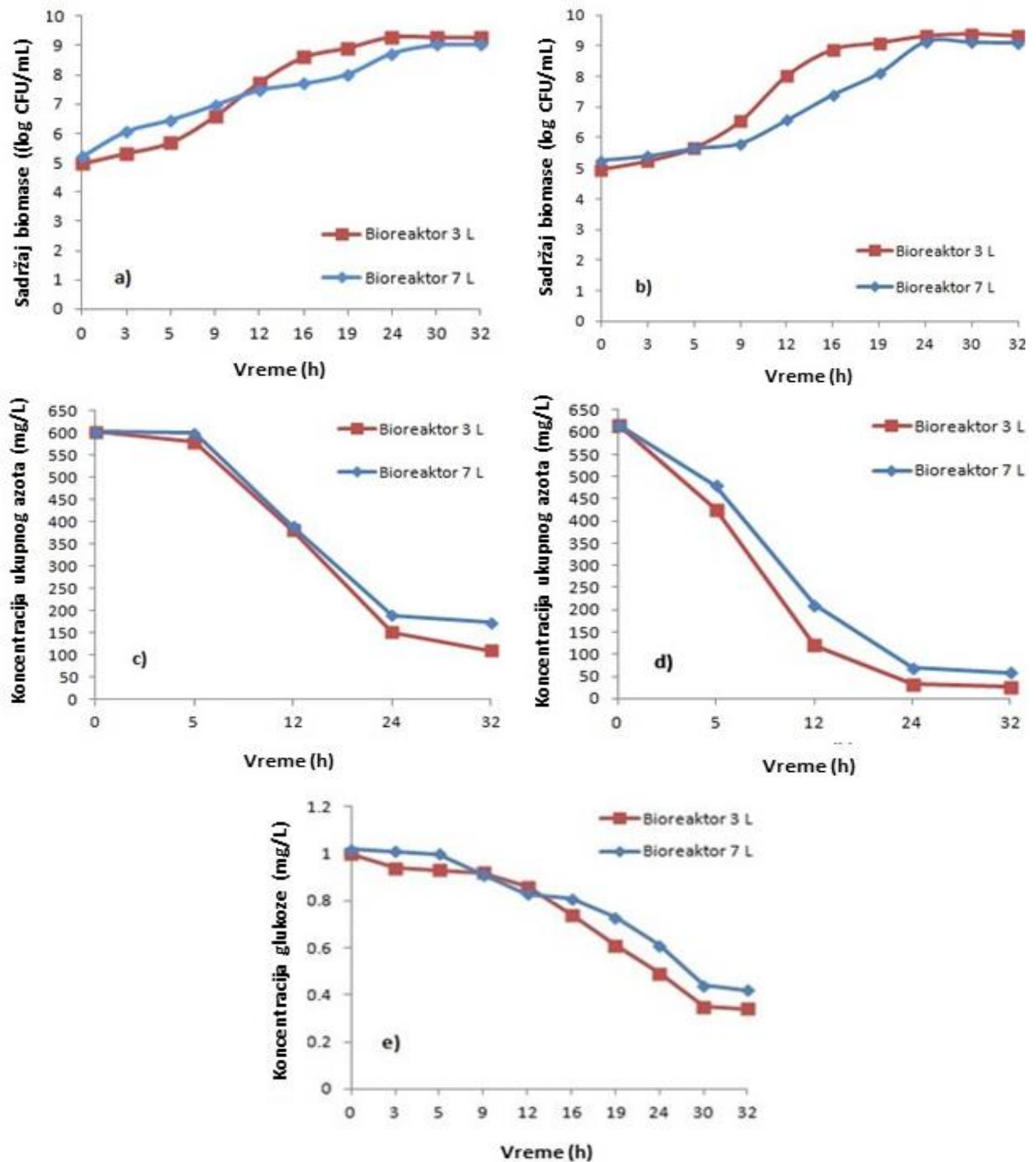
Na slikama 27a-b prikazana je kriva rasta *P. stutzeri* ATCC 17588 i *P. stutzeri* D1 tokom kultivacije izvedene u bioreaktorima ukupnih zapremina 3 L i 7 L. Na osnovu krivi rasta oba testirana mikroorganizma može se zapaziti *lag* faza tokom prvih 5 h kultivacije koja označava period prilagođavanja mikroorganizama odgovarajućoj tečnoj hranljivoj podlozi za umnožavanje biomase (slike 27a-b). U ogledima koji su se odvijali u bioreaktoru zapremine 3 L uočava se jasna eksponencijalna faza rasta u periodu između 5-og i 24-og časa kultivacije na čijem kraju se ostvaruje maksimalni sadržaj biomase ispitivanih denitrifikatora od približno 9 log CFU/mL. Ukoliko se analiziraju krive rasta tokom kultivacija u bioreaktoru od 7 L može se zapaziti da je eksponencijalna faza blago usporena što dovodi do neznatnog smanjenja sadržaja biomase ispitivanih mikroorganizama (približno 8,8 log CFU/mL). Razlog za usporavanje bioprocasa može biti promena geometrije suda, razlike u tipu impelera između bioreaktora i postojanja odbojnika u bioreaktoru od 7 L. Iako mešanje nije kritičan parametar za proizvodnju biomase *P. stutzeri* ATCC 17588 i D1, jer mogu da rastu i u aerobnim i u anaerobnim uslovima, neophodno je tokom bioprocasa podesiti brzinu mešanja tako da se obezbedi homogena raspodela nutrijenata po čitavoj radnoj zapremini suda. Promena tipa impelera i postojanje odbojnika može povećati brzinu mešanja, što u pojedinim slučajevima može uticati na prelazak sa jednog tipa metabolizma na drugi ili do usporavanja rasta mikroorganizama (Schmidt, 2005). Iako je eksponencijalna faza nešto sporija u bioreaktorima od 7 L, oba mikroorganizma nakon 24 h dostižu brojnost od oko 9 log CFU/mL. U svim izvedenim ogledima nakon 24 h može se uočiti početak stacionarne faze

kada je, zbog ekonomske isplativosti i efikasnosti bioprocesa, najbolje zaustaviti proizvodnju biomase denitrifikatora.

Osim praćenja direktnog pokazatelja uspešnosti procesa, kao što je u slučaju ovog rada sadržaj biomase odabranih denitrifikatora, veoma je važno analizirati opterećenost otpadnog toka bioprocesa. U cilju zaštite životne sredine, ali i smanjenja troškova proizvodnje, opterećenost otpadnih tokova, tj. prisustvo ostataka organskog i neorganskog porekla mora biti svedena na minimum.

Uzimajući u obzir da su glavne komponente hranljivih podloga za umnožavanje biomase odabranih sojeva *P. stutzeri* bila azotna jedinjenja po završetku bioprocesa uzorci kultivacionih tečnosti su analizirani u pogledu sadržaja ukupnog azota. Dobijeni rezultati prikazani su grafički na slici 26c za *P. stutzeri* ATCC 17588 i na slici 26d za *P. stutzeri* D1. Takođe, kao izvor C atoma u hranljivoj podlozi za umnožavanje biomase *P. stutzeri* D1 korišćena je glukoza, te je njena potrošnja od strane ispitivanog denitrifikatora praćena u definisanim vremenskim intervalima tokom kultivacije.

Na osnovu rezultata analiza sadržaja ukupnog azota u kultivacionim tečnostima prikazanim na slikama 27c-d, može se zaključiti da do smanjenja sadržaja azota dolazi skoro odmah po inokulaciji hranljive podloge. Na početku bioprocesa u kultivacionoj tečnosti u slučaju *P. stutzeri* ATCC 17588 sadržaj ukupnog azota je bio 603 mg/mL, a u slučaju *P. stutzeri* D1 617 mg/mL. Tokom eksponencijalne faze, kada je rast mikroorganizama najintenzivniji, dolazi do značajnog smanjenja koncentracije ukupnog azota. Sa početkom stacionarne faze, promene sadržaja ukupnog azota u kultivacionim tečnostima su minimalne. Na kraju umnožavanja biomase referentnog soja u bioreaktoru od 3 L koncentracija ukupnog azota je u slučaju referentnog soja iznosila 110 mg/mL, odnosno postignuta je konverzija azota od 81,76%, dok je u bioreaktoru od 7 L koncentracija ukupnog azota po završetku bioprocesa iznosila 174 mg/mL, tj. ostvarena je konverzija azota od 71,14%. Na kraju kultivacije *P. stutzeri* D1 u bioreaktoru od 3 L, koncentracija azota je iznosila svega 26 mg/mL, a u bioreaktoru od 7 L 58 mg/mL. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je tokom kultivacije prirodnog izolata u bioreaktoru manje zapremine postignuta konverzija azota od 95,79%, a u bioreaktoru veće zapremine 90,60%.



Slika 27. Validacija optimizovanih parametara bioprocasa u bioreaktorima za proizvodnju biomase a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1 i rezultati analize kultivacione tečnosti u pogledu sadržaja ukupnog azota u slučaju c) *P. stutzeri* ATCC 17588 i d) *P. stutzeri* D1 i sadržaja glukoze u slučaju e) *P. stutzeri* D1

Osim profila potrošnje ukupnog azota u slučaju prirodnog izolata *P. stutzeri* napravljen je profil potrošnje glukoze, kao jedne od glavnih komponenti hranjive podloge za umnožavanje biomase. Kriva potrošnje glukoze od strane *P. stutzeri* D1 (slika 27e) u

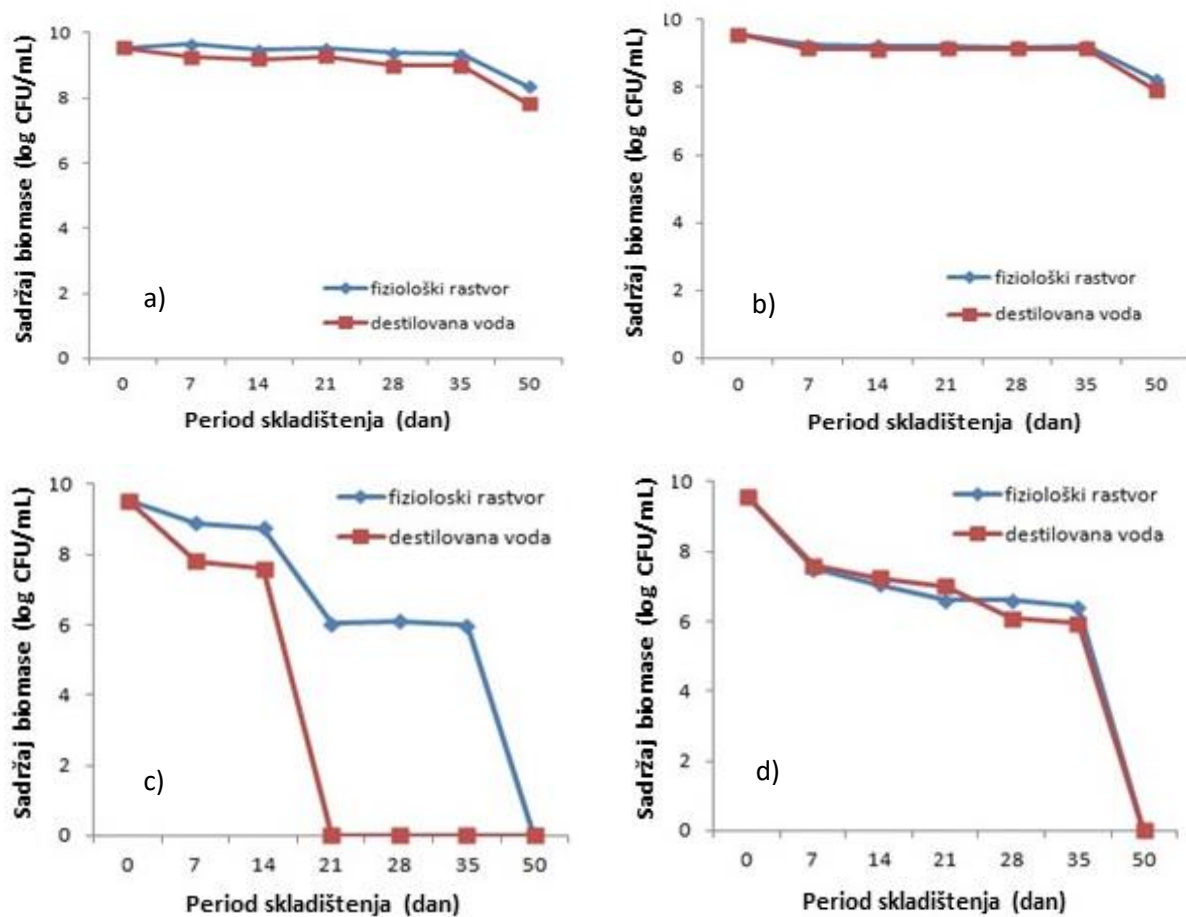
potpunosti prati njegovu krivu rasta (slika 27b). Tokom lag faze (0-5 h) koncentracija glukoze ostaje nepromenjena, dok u eksponencijalnoj fazi (5-30 h) rasta koncentracija glukoze značajno opada. Nakon eksponencijalne faze, do kraja izvođenja bioprocesa, koncentracija glukoze se menja značajno. Ukoliko se uporedi koncentracija glukoze na početku i na kraju bioprocesa, može se zaključiti da je ukupna potrošnja glukoze oko 0,7 mg/mL kada se kultivacija odvija u bioreaktoru manje zapremine i približno 0,6 mg/mL kada se kultivacija odvija u bioreaktoru od 7 L.

Rezultati ispitivanja stabinosti proizvedene biomase u pogledu održavanja vitalnosti i vijabilnosti ćelija na temperaturi frižidera (4 °C) i temperaturi zamrzivača (-20 °C) prikazane su na slici 28a-d.

Rezultati prikazani na slikama 28a-b. jasno ukazuju da je uticaj temperature frižidera na ispitivan sadržaj biomase ispitivanih denitrifikatora tokom 50 dana ispitivanja približno isti. Naime, prilikom skladištenja biomase odabranih denitrifikatora u obliku suspenzije pripremljene sa sterilnim fiziološkim rastvorom i sa sterilnom destilovanom vodom tokom 35 dana ne dolazi do značajne razlike u broju ćelija. Prilikom ispitivanja sadržaja biomase testiranih denitrifikatora 50-og dana od početka oglada zapaženo je da je došlo do smanjenja sadržaja biomase za približno jednu log jedinicu i u suspenzijama pripremljenim sa sterilnim fiziološkim rastvorom i sa sterilnom destilovanom vodom.

Nasuprot tome efekat temperature zamrzivača (-20 °C) na ispitivane mikroorganizme je značajno drugačiji u odnosu na efekat temperature frižidera (slike 28c-d). U svim uzorcima suspenzija ispitivanih mikroorganizama koji su bili skladišteni na temperaturi zamrzivača sadržaj biomase se smanjio za približno jednu log jedinicu već nakon nedelju dana i ostaje približno konstantan sve do 14-og dana ispitivanja. U slučaju referentnog soja nakon tri nedelje oglada, sadržaj biomase u sterilnom fiziološkom rastvoru opada sa približno 9,7 na 6 log CFU/mL, nakon čega se broj ćelija ne menja značajno do 35-og dana, a potom 50-og dana nije konstatovan rast nijedne kolonije. Nasuprot tome, pokazano je da temperatura od -20 °C ima letalan efekat po ćelije referentnog soja koje su se nalazile u sterlinoj destilovanoj vodi nakon 3 nedelje skladištenja. Relativno brzo odumiranje ćelija na temperaturama ispod 0 °C može biti povezano sa formiranjem kristala leda koji narušavaju integritet ćelijske membrane, usled čega dolazi do smrti ćelija (Uzunova-Doneva i Donev, 2005). Efikasan način za rešenje ovog problema je upotreba krioprotektanata, poput glicerola, koji se u određenoj

zapremeni dodaje suspenziji ćelija pre skladištenja na temperaturama ispod 0 °C. Glicerol obavija ćelijsku membranu stvarajući tanak film koji štiti ćeliju od razornog dejstva kristala leda, omogućavajući ćeliji da preživi u takvoj sredini. Ipak, u ovom radu, prilikom skladištenja ćelija nisu dodati krioprotektanti, jer u daljoj primeni pripremljenih suspenzija oni mogu negativno uticati na postupak biočišćenja.



Slika 28. Uticaj skladištenja na temperaturi frižidera na sadržaj biomase a) *P. stutzeri* ATCC 17588 i b) *P. stutzeri* D1 i na temperaturu zamrzivača na sadržaj biomase c) *P. stutzeri* ATCC 17588 i d) *P. stutzeri* D1

Na osnovu prikazanih rezultata na slikama 28c-d, može se konstatovati da tečnost za pripremu suspenzije (fiziološki rastvor i destilovana voda) gotovo nema uticaj na vitalnost i vijabilnost ćelija *P. stutzeri* D1 prilikom skladištenja na temperaturi od -20 °C. Nakon prvobitnog smanjenja sadržaja biomase za približno jednu log jedinicu nakon nedelju dana skladištenja, brojnost ćelija ostaje približno konstantna do 35-og dana ogleda. Potom, slično kao i kod suspenzije referentnog soja pripremljene u sterilnom fiziološkom rastvoru i skladištene na temperaturi zamrzivača (slika 28a), 50-og dana od početka ogleda, dolazi do

naglog smanjenja sadržaja biomase, odnosno u pripremljenim suspenzijama nisu detektovane vijabilne ćelije.

Prikazani rezultati ispitivanja uticaja niskih temperatura skladištenje suspenzija na vijabilnost odabranih denitrifikatora ukazuju na mogućnost čuvanja sveže pripremljenih suspenzija denitrifikatora na temperaturi frižidera u sterilnoj destilovanoj vodi i sterilnom fiziološkom rastvoru tokom mesec dana uz potpuno očuvanje vijabilnosti i vitalnosti ćelija. Ovo je veoma značajno iz ugla primene denitrifikatora u postupku biočišćenja građevinskih materijala, jer čuvanje denitrifikatora u destilovanoj vodi omogućava njihovu direktnu primenu u adekvatne nosače za postupak biočišćenja, bez unošenja dodatnih jona koji mogu izazvati dalje oštećenje materijala. Osim toga, na ovaj način se može izbeći postupak liofilizacije ćelija, što smanjuje kompleksnost pripreme suspenzije ćelija i cenu postupka biočišćenja. Sa druge strane, skladištenje suspenzija denitrifikatora na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nije preporučljivo, jer bez odgovarajućeg krioprotektanta ćelije brzo odumiru i pripremljena suspenzija gubi na kvalitetu. Za razliku od ćelija referentnog soja, jasno se može uočiti da ćelije prirodnog izolata duže zadržavaju vitalnost i vijabilnost na temperaturi zamrzivača. Može se pretpostaviti da su prirodni sojevi naviknuti na razne, često ekstremne, promene okoline (temperatura, vlažnost, nedostatak nutrijenata, itd.), te se u laboratorijskim uslovima lakše prilagođavaju nametnutim uslovima u odnosu na referentne sojeve.

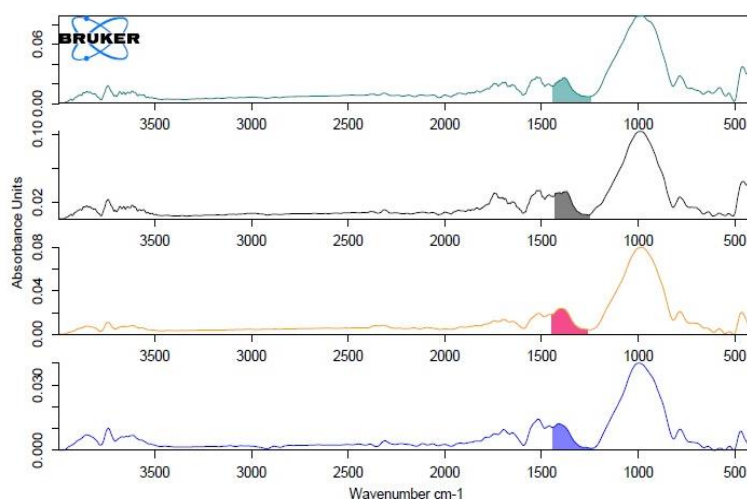
Na osnovu rezultata ogleđa izvedenih u laboratorijskim bioreaktorima može se zaključiti da je tokom svih kultivacija sadržaj biomase ispitivanih denitrifikatora iznosio približno 9 log CFU/mL , što je u odličnoj korelaciji sa rezultatima ostvarenim tokom optimizacije odabranih procesnih parametara, te se validacija optimizovanih parametara može smatrati u potpunosti uspešnom. Pored toga, može se zapaziti da pri prelasku iz sudova manjih u sudove većih zapremina ne dolazi do značajnih varijacija u toku kultivacije niti u sadržaju biomase. Stabilnost i održivost proizvodnje biomase denitrifikatora kako u manjim, tako i u većim zapreminama ukazuje na mogućnost podizanja nivoa proizvodnje na poluindustrijski i industrijski nivo. Takođe, otpadni tok bioprocasa sadrži male količine ukupnog azota i glukoze, te se može smatrati minimalno opterećenim, što je povoljno za bioprocen u smislu iskorišćenja nutrijenata i po očuvanje životne sredine. Osim toga, mogućnost skladištenja biomase u obliku suspenzija na temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom mesec dana, značajno utiče na jednostavnost i efikasnost postupka biočišćenja u ekonomskom pogledu.

5.5. Primena denitrifikatora

U završnom segmentu disertacije paralelno je ispitivana efikasnost *P. stutzeri* ATCC 17588 i *P. stutzeri* D1 na model supstratima opeke i na odabranom stenskom materijalu, dva najzastupljenija građevinska materijala.

5.5.1. Rezultati ispitivanja efikasnosti denitrifikatora na model supstratima opeke

Visoka efikasnost referentnog soja *P. stutzeri* u kombinaciji sa pulpom P11, sastava: kaolin:talk:kvarcni pesak=1:1:2, na model supstratima opeke je ranije dokazana (Vučetić, 2017). Uzimajući u obzir da se u okviru ovog rada efikasnost bioaktivnog sistema ispituje FTIR metodom (slika 29), a ne spektrofotometrijski kao prema Vučetić (2017), neophodno je bilo paralelno ispitati efikasnost kako referentnog soja, tako i prirodnog izolata *P. stutzeri*.



Slika 29. Primer integracije površine pika na 1380 cm^{-1} kao indirektno metode za procenu efikasnosti bioaktivnih sistema za biočišćenje

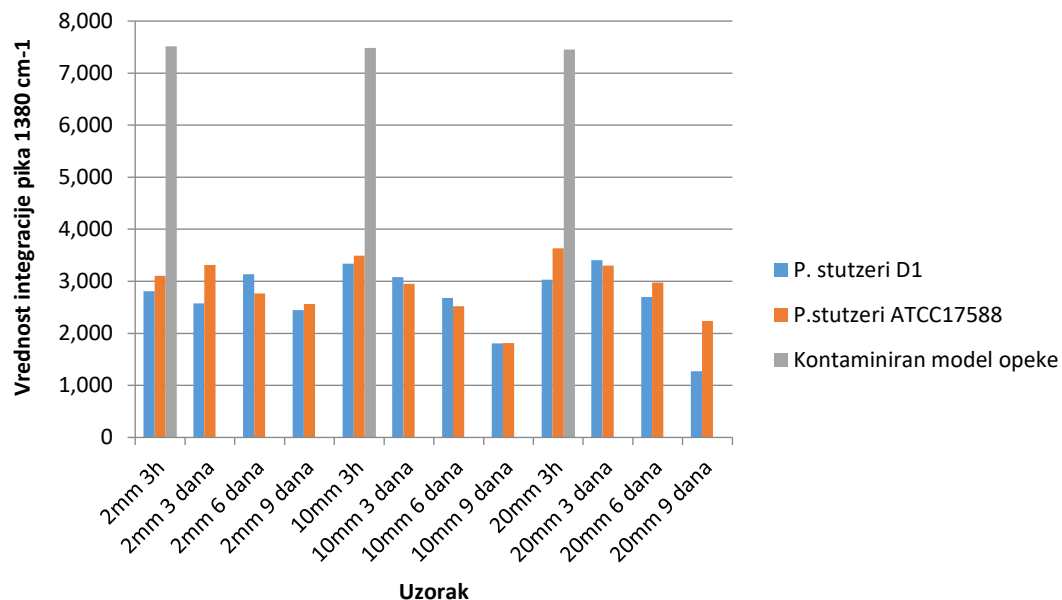
Kompletna karakterizacija model supstrata opeke i pulpe P11 korišćene u okviru ovog eksperimenta detaljno je predstavljena u radu Vučetić i sar. (2017). Ova grupa autora je u radu istakla visoku efikasnost dve pulpe kao nosača mikroorganizama P9 i P11, ali je za oglede u okviru ovog rada odabrana pulpa P11, jer su sve njene komponente jeftine i lako

dostupne, što je veoma značajno sa aspekta primene u realnim uslovima. Na slici 30 prikazana je postavka oglada biočišćenja na model supstratima opeka.



Slika 30. Postavka i praćenje postupka biočišćenja na model supstratima opeke

Dobijeni rezultati indirektnog praćenja efikasnosti bioaktivnih sistema predstavljeni su grafički na slici 30.



Slika 31. Efikasnost bioaktivnih sistema na model supstratima opeke praćena FTIR-ATR uređajem

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 31, može se zapaziti da su najveće vrednosti integracije površine pika na 1380 cm^{-1} dobijene prilikom ispitivanja kontaminiranog modela opeke. Ovakav rezultat je očekivan, s obzirom da su model supstrati opeke kontaminirani kalijum-nitratom prema usvojenom protokolu datom u poglavlju 4.5.2.1. Takođe, može se zapaziti da su vrednosti integracije površine pika 1380 cm^{-1} za kontaminiran model opeke

približno jednake po dubini supstrata, što je potvrda da je protokol kontaminacije model supstrata opeke uspešan, tj. da je koncentracija kalijum-nitrata uniformna po zapremini supstrata.

Aktivnost bioaktivnog sistema sa referentnim sojem *P. stutzeri* i prirodnim izolatom *P. stutzeri* D1 može se zapaziti već nakon 3 h tretmana na svim ispitivanim dubinama model supstrata opeke. Naime, nakon 3 h od početka tretmana uočava se značajno smanjenje vrednosti integracije površine pika 1380 cm^{-1} , sa početne vrednosti od približno 7,500 na oko 3,000-3,500. Relativno posmatrano, može se konstatovati da je sadržaj soli tokom prva 3 h u zapremini model supstrata opeke smanjen za približno 50 %. Ovako značajno smanjenje sadržaja kalijum-nitrata na samom početku tretmana je posledica difuzije vode iz pulpe u materijal usled čega dolazi do rastvaranja prisutnih soli. Pored toga, u prvim časovima je najintenzivnija metabolička aktivnost primenjenih denitrifikatora kojima su nitrati, u trenutku postavljanja bioaktivnog sistema na površinu model supstrata opeke, glavni izvor energije.

Sa produženjem tretmana biočišćenja uočava se trend smanjenja vrednosti površine integracije ispod pika 1380 cm^{-1} na svim ispitivanim dubinama supstrata. Nakon 9 dana tretmana na površini uzoraka (2 mm) efikasnost oba ispitivana bioaktivna sistema je približno jednaka i iznosi oko 70%. Razlike u efikasnosti primenjenih sojeva *P. stutzeri* tokom tretmana biočišćenja su minimalne. Jedina značajna razlika između ispitivanih sojeva može se zapaziti u vrednosti integracije površine ispod karakterističnog pika prilikom ispitivanja model supstrata opeke nakon ukupno 9 dana tretmana, na dubini od 20 mm (slika 30). Naime, *P. stutzeri* D1 nakon 9 dana tretmana postiže najveća efikasnost uklanjanja nitrata od približno 95% na dubini od 20 mm, dok na istoj dubini referentni soj *P. stutzeri* uklanja oko 72% prisutnih nitrata. Ovakvi rezultati ukazuju na to da primenjeni denitrifikatori efikasno uklanjaju nitrate ne samo sa površine, već i iz dubine kontaminiranih modela, kao i da je sistem trostepene aplikacije bioaktivnih sistema (3x3 dana) najefikasniji u tretmanu biočišćenja model supstrata opeke u slučaju oba ispitivana bioaktivna sistema. Posebno treba istaći da praćenje efikasnosti po dubini supstrata u dostupnim publikacijama nije posebno istraženo, već se rezultati efikasnosti izražavaju samo kao rezultat uklanjanja nitrata sa površine uzoraka (Ranalli i sar., 1996; Alfano i sar., 2011). Osim toga, prikazani

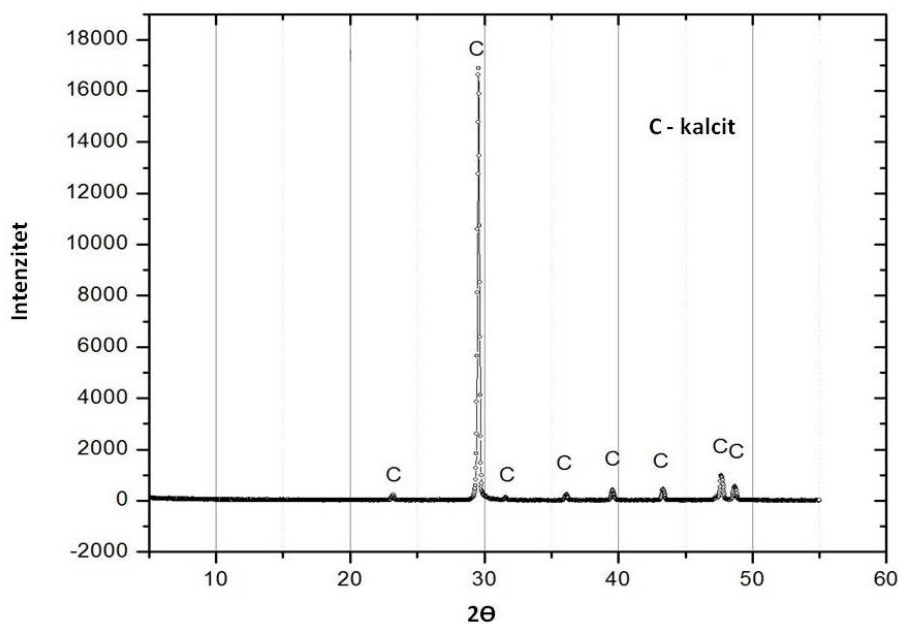
rezultati za referentni soj *P. stutzeri* su u odličnoj korelaciji sa prethodnim ispitivanjima sprovedenim od strane Vučetić (2017).

5.5.2. Rezultati ispitivanja efikasnosti denitrifikatora na stenskom materijalu

Sa obzirom na to da je stenski materijal prirodnog porekla i da ima značajne razlike kako u mineraloškom sastavu tako i u teksturalnim karakteristikama u odnosu na opeku, bilo je neophodno najpre izvršiti kompletnu karakterizaciju ispitivanog prirodnog materijala.

5.5.2.1. Ispitivanje mineraloških karakteristika stenskog materijala

Rezultati mineraloških karakteristika stenskog materijala korišćenog u okviru ovog rada prikazani su na slici 32.



Slika 32. Rendgenostrukturalna analiza uzorka stenskog materijala

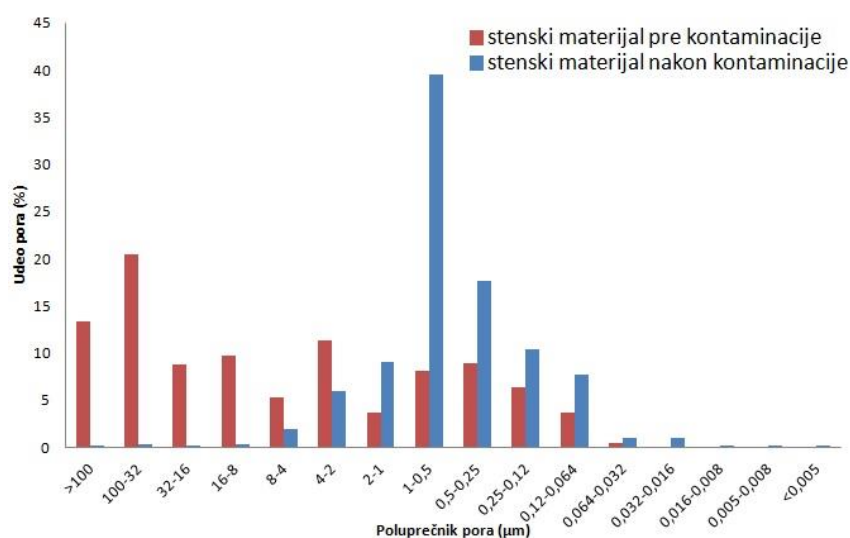
Na osnovu rendgenostrukturalne analize stenskog materijala može se konstatovati prisustvo samo jedne mineralne forme – kalcita (C). S obzirom da rendgenostrukturalnom analizom nisu identifikovane druge mineralne forme, može se smatrati da je stenski materijal korišćen u ovom radu po svom mineraloškom sastavu 100% kalcit.

5.5.2.2. Ispitivanje teksturalnih karakteristika stenskog materijala

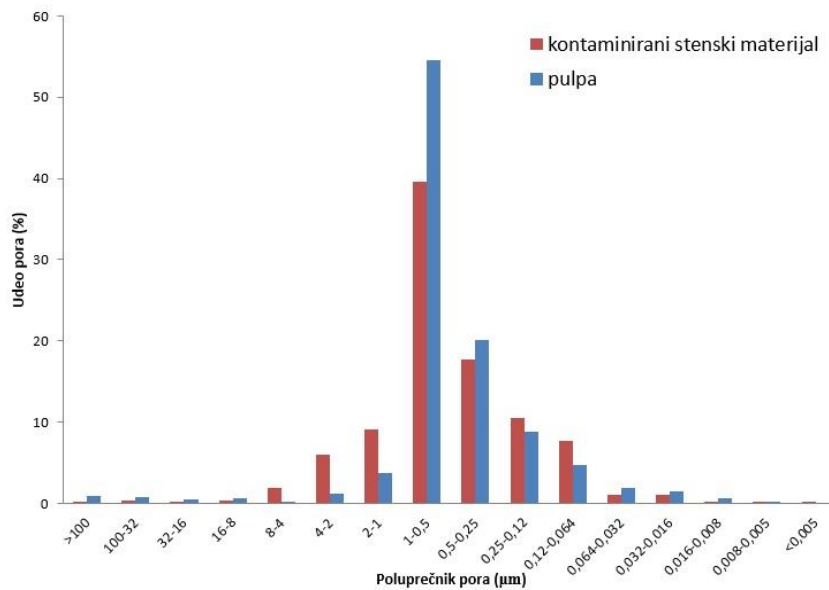
U nastavku ogleda određene su teksturalne karakteristike modela stenskog materijala pre i nakon kontaminacije kalijum-nitratom, kao i odabrane pulpe, tj. nosača mikroorganizama u postupku biočišćenja. Rezultati teksturalne karakterizacije uzoraka stenskog materijala i pulpe prikazani su u tabeli 19 i slici 33.

Tabela 19. Rezultati živine porozimetrije uzoraka stenskog materijala i odabrane pulpe

Uzorak	Ukupna zapremina pora (%)
Nekontaminiran model stenskog materijala	14,32
Kontaminiran model steskog materijala	1,74
Pulpa	47,79



Slika 33. Usporedni prikaz raspodele veličine poluprečnika pora stenskog materijala pre i nakon kontaminacije kalijum-nitratom



Slika 34. Uporedni prikaz raspodele veličine poluprečnika pora kontaminiranog stenskog materijala i odabrane pulpe

Na osnovu rezultata živine porozimetrije nekontaminirani uzorci stenskog materijala se mogu okarakterisati kao modeli sa srednjom do visokom vrednošću ukupne poroznosti, oko 14% (tabela 19). Nasuprot tome, kontaminirani uzorci stenskog materijala imaju značajno niže vrednosti ukupne poroznosti (1,74%), što je posledica zatvaranja pora usled prisustva kalijum nitrata. Ukupna zapremina pora pulpe u suvom stanju iznosi 47,79%, te se može očekivati da pulpa ima odličan kapacitet biočišćenja.

Rezultati teksturalne karakterizacije stenskog materijala (slika 33) ukazuju na različitu poroznu strukturu ispitivanih kontaminiranih i nekontaminiranih modela. Naime, modeli stenskog materijala pre kontaminacije kalijum-nitratom imaju dominantan udeo pora čiji su poluprečnici veći od 32 μm, dok kontaminirani modeli imaju dominantan udeo pora (oko 40%) u rasponu od 0,5-1 μm. Pomeranje raspodele veličine pora ka manjim vrednostima nakon kontaminacije rezultat je popunjavanja velikih pora stenskog materijala kristalima soli.

Na osnovu uporednog prikaza rezultata živine porozimetrije kontaminiranog stenskog materijala i odabrane pulpe (slika 34) može se očekivati da će se biočišćenje odvijati mehanizmom advekcije. Naime, da bi se postupak biočišćenja odvijao u željenom smeru (iz kontaminiranog stenskog materijala u pulpu) i mehanizmom advekcije, neophodno je da pulpa ima veći udeo sitnijih pora u odnosu na kontaminirani sistem. Na osnovu prikazanih rezultata jasno se može zaključiti da odabrana pulpa ima veći udeo pora u rasponu od 0,5-1

μm u odnosu na kontaminirani stenski materijal i da poseduje sitne pore koje omogućavaju odvijanje advekcije sušenjem (slika 34).

5.5.2.3. Ispitivanje efikasnosti denitrifikatora na stenskom materijalu

Efikasnost bioaktivnih sistema, tj. denitrifikatora *P. stutzeri* ATCC 17588 i *P. stutzeri* D1 umešanih u odabranu pulpu, praćena je paralelno. S obzirom da stenski materijal sadrži karbonate (slika 31), efikasnost procesa biočišćenja se nije mogla pratiti FTIR metodom kao u slučaju opeka. Naime, usled prisustva karbonata u uzorku, za koje se karakterističan pik nalazi u rasponu talasnih dužina od $1300\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (Henry i sar., 2017), dolazi do preklapanja karakterističnog pika nitrata na talasnoj dužini od 1380 cm^{-1} , te je nemoguće na ovaj način pratiti tok postupka biočišćenja. Iz tog razloga je u okviru preliminarnih ispitivanja efikasnost biočišćenja određivana semikvantitativno – mernim tračicama Quantofix®, kako bi se ispitala mogućnost upotrebe tračica za brzu procenu efikasnosti bioaktivnih sistema u postupku biočišćenja. Osim toga, efikasnost biočišćenja utvrđena je i kvantitativnom metodom – jonskom hromatografijom. Izgled stenskog materijala pre i nakon postavke pulpe sa odabranim denitrifikatorima prikazan na slici 35, dok su dobijeni rezultati ispitivanja promene koncentracije nitrata tokom biočišćenja prikazani u tabeli 20.



Slika 35. Stenski materijal pre (levo) i nakon (desno) postavke bioaktivnog sistema za biočišćenje

Tabela 20. Promena koncentracije nitrata tokom procesa biočišćenja na stenskom materijalu

Trajanje postupka biočišćenja (dan)	Koncentracija nitrata (mg/mL) određena pomoću Quantofix® mernih traka		Koncentracija nitrata (mg/mL) određena pomoću jonske hromatografije	
	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	<i>P. stutzeri</i> D1	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	<i>P. stutzeri</i> D1
	0	500	500	476
1	100	50	249	65,1
2	100	50	332	197
6*	50	10	296	80,3

* - sveža pulpa je naneta nakon 48 h (dvostepeno nanošenje pulpe)

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 20. može se zapaziti da je, bez obzira na primenjeni mikroorganizam i način određivanja koncentracije nitrata, proces biočišćenja najintenzivniji tokom prvog dana. Dobijeni rezultat je u skladu sa rezultatima dostupnih istraživanja u kojima se navodi da je efikasnost denitrifikatora najveća tokom prvih časova primene (Bosch-Roig i sar., 2013; Bosch-Roig i sar., 2014; Vučetić i sar., 2017).

Na osnovu rezultata merenja koncentracije nitrata pomoću Quantofix® mernih traka može se zapaziti da se tokom prvog dana koncentracija nitrata smanjuje sa početnih 500 mg/L na 100 mg/L u slučaju referentnog soja *P. stutzeri*, odnosno na 50 mg/L u slučaju *P. stutzeri* D1 i ostaje nepromenjena i nakon 48 h od početka postupka biočišćenja. Po završetku šestog dana, odnosno dvostepenog nanošenja bioaktivnog sistema na kontaminirani stenski materijal, koncentracija nitrata u slučaju *P. stutzeri* ATCC 17588 je bila 10 puta manja, a u slučaju *P. stutzeri* D1 čak 50 puta manja u odnosu na koncentraciju nitrata u stenskom materijalu pre postupka biočišćenja (500 mg/mL).

Na osnovu rezultata jonske hromatografije utvrđeno je da je početna koncentracija nitrata u kontaminiranom stenskom materijalu 476 mg/mL koji je korišćen u ispitivanjima postupka biočišćenja pomoću referentnog soja *P. stutzeri*, dok je početna koncentracija nitrata u stenskom materijalu korišćenom u ispitivanjima biočišćenja pomoću *P. stutzeri* D1 nešto viša i iznosi 599 mg/mL (tabela 18). Razlika u inicijalnim koncentracijama nitrata je najverovatnije posledica korišćenja prirodnog stenskog materijala čije teksturalne karakteristike mogu da variraju od uzorka do uzorka. Bez obzira na razliku u početnoj koncentraciji nitrata u stenskom materijalu, postupak biočišćenja je za oba ispitivana soja bio najintenzivniji tokom prvog dana kada je u slučaju referentnog soja *P. stutzeri* koncentracija nitrata smanjena na 249 mg/mL, a u slučaju prirodnog izolata *P. stutzeri* D1 na 65,1 mg/mL. Tokom drugog dana,

može se zapaziti povećanje koncentracije nitrata u stenskom materijalu, pa je u slučaju *P. stutzeri* ATCC 17588 koncentracija nitrata iznosila 332 mg/mL, a u slučaju *P. stutzeri* D1 197 mg/mL. Do povećanja koncentracije u uzorcima stenskog materijala je najverovatnije došlo usled kretanja vlage i soli iz stenskog materijala u pulpu. Prilikom nanošenja vlažnog bioaktivnog sistema na kontaminirani uzorak stenskog materijala dolazi do kretanja vlage iz pulpe u stenski materijal (faza navlaživanja), pri čemu se pulpa suši, usled čega u narednom koraku vlaga zajedno sa solima, mehanizmom advekcije, prelazi iz stenskog materijala u pulpu (Vučetić, 2017). Ipak, ukoliko bioaktivni sistem nakon opisanog postupka ostane na tretiranom materijalu može doći do spontanog prelaska vlage sa rastvorenim solima iz pulpe u stenski materijal usled čega dolazi do porasta koncentracije nitrata u stenskom materijalu. Zbog toga je veoma značajno odrediti optimalno trajanje postupka biočišćenja. Nakon dvostepenog nanošenja pulpe, primećeno je značajno smanjenje koncentracije nitrata u odnosu na početnu vrednost, ali je koncentracija nitrata veća nakon 6 dana, nego nakon jednog dana od početka postupka biočišćenja (tabela 20). Takođe, važno je napomenuti da i sama pulpa, bez mikroorganizama, utiče na smanjenje koncentracije nitrata u mineralnim supstratima i to sa efikasnošću oko 50% u pogledu uklanjanja nitrata sa površine uzoraka i oko 15% u pogledu uklanjanja nitrata iz dubine uzoraka tokom aplikacije od 3 dana (Vučetić, 2017). Dakle, pulpa bez mikroorganizama predstavlja sistem male efikasnosti, dok metabolički aktivni denitrifikatori inkorporirani u mineralne pulpe značajno utiču na povećanje efikasnosti istih, čineći ih efikasnim do vrlo efikasnim sistemima za biočišćenje.

Rezultati prikazani u tabeli 20 ukazuju na uspešno sprovedene postupke biočišćenja primenom odabranih denitrifikatora. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da je za odabrani stenski materijal optimalno trajanje postupka biočišćenja jedan dan kada se ostvaruje efikasnost biočišćenja od 47,7% u slučaju referentnog soja, a u slučaju prirodnog izolata *P. stutzeri* čak 89,2%. Ostvareni rezultati nesumnjivo ukazuju na visoku efikasnost ispitivanih sojeva, posebno *P. stutzeri* D1, te se mogu primenjivati kao biološki aktivne komponente sistema za biočišćenje.

6. ZAKLJUČCI

Istraživanja koja su obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom su proistekla iz potrebe za rešavanjem problema akumulacije nitrata u prirodi kroz izolovanje i karakterizaciju denitrifikatora, optimizaciju biotehnoloških parametara za proizvodnju biomase i procenu mogućnosti primene aktivne biomase odabranih denitrifikatora u cilju uklanjanja nitrata sa različitih građevinskih materijala. Sveobuhvatan prikaz procesa od izolovanja do proizvodnje biomase denitrifikatora se ne može pronaći u dostupnoj literaturi, a od izuzetne je važnosti u procesima bioremedijacije u kojima je neophodno ukloniti akumulirane nitrata sa velikih površina, za šta je potrebno obezbediti dovoljnu količinu aktivne biomase. U okviru doktorske disertacije karakterizacijom visoko efikasnog denitrifikatora *P. stutzeri* D1 i detaljnim prikazom postupka optimizacije bioprocenih parametara i validacije optimizovanih bioprocenih parametara u laboratorijskim bioreaktorima načinjeni su prvi koraci ka definisanju idejnog rešenja i uvećanju razmera predloženog bioprocena. Osim toga, visoka efikasnost odabranih denitrifikatora u postupcima biočišćenja različitih građevinskih materijala, koja je postignuta u laboratorijskim uslovima predstavlja dobar osnov za nastavak istraživanja u realnim uslovima, kako na građevinskim materijalima, tako i u tretmanima zemljišta i otpadnih voda.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske teze se mogu rezimirati u okviru sledećih zaključaka:

- * Tokom postupka izolovanja denitrifikatora iz vodenih sredina izdvojeno je ukupno 140 izolata i to 74 izolata iz Dunava i 66 izolata iz kanala Dunav-Tisa-Dunav. Na osnovu makromorfoloških, mikromorfoloških i kulturabilnih osobina u postupku selekcije denitrifikatora izdvojeno je 10 izolata koji po svojim osobinama odgovaraju *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588, soju koji predstavlja model mikroorganizam u proučavanju procesa denitrifikacije.
- * Odabrani izolati su identifikovani pomoću Vitek 2[®] Compact System uređaja i to osam izolata kao *Aeromonas sobria*, dva izolata kao *Aeromonas hydrophila* i po jedan izolat kao *Citrobacter freundii* i *Pseudomonas stutzeri* koji je u daljim analizama označen kao *P. stutzeri* D1. Izolat D1 i referentni soj *P. stutzeri* su dodatno identifikovani metodom četvrte generacije, MALDI-TOF MS, čime je nesumnjivo potvrđeno da oba soja pripadaju vrsti *Pseudomonas stutzeri*.

- * Praćenjem kinetike denitrifikacije utvrđeno je da izolat D1 uspešno redukuje 3 g/L kalijum-nitrata u kultivacionoj tečnosti u vremenskom intervalu od 34 do 48 h, a referentni soj *P. stutzeri* redukuje istu koncentraciju kalijum-nitrata u intervalu od 48 do 60 h. Pored praćenja kinetike denitrifikacije, za oba soja je urađen antibiogram i test sposobnosti adhezije ćelija čime je pokazano da su oba soja senzitivna prema svim ispitivanim antibioticima i da je mogućnost adhezije ćelija za površinu minimalna. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se oba soja mogu označiti kao denitrifikatori i da je njihova upotreba u postupcima bioremedijacije bezbedna.
- * U okviru ove doktorske disertacije izvršena je amplifikacija četiri ključna denitrifikujuća gena: *napA*, *nirS*, *norB* i *nosZ* u genomu *P. stutzeri* ATCC 17588 i *P. stutzeri* D1 pomoću PCR metode čime je pokazano da ispitivani sojevi imaju sposobnost da vrše potpunu aerobnu denitrifikaciju. Zahvaljujući uspešnoj amplifikaciji denitrifikujućih gena, može se pretpostaviti da se u slučaju oba ispitivana soja *P. stutzeri* proces denitrifikacije odvija prema sledećim redukcionim koracima:
nitrat → nitrit → azot-monoksid → azot-suboksid → molekulski azot.
- * Sastav hranljive podloge za maksimalnu proizvodnju biomase ispitivanih sojeva definisan je pomoću statističkih tehnika. Da bi se ostvarila maksimalna proizvodnja biomase soja D1 hranljiva podloga se mora sastojati od 1 g/L glukoze, 3 g/L KNO₃ i 4 g/L peptona, a u slučaju referentnog soja hranljiva podloga mora da sadrži 2 g/L KNO₃ i 4 g/L peptona.
- * Na osnovu rezultata dobijenih prilikom ispitivanja uticaja odabranih procesnih parametara može se zaključiti da se maksimalni sadržaj biomase oba ispitivana soja od približno 9 log CFU/mL postiže za 24 h pri temperaturi od 30 °C, početnoj pH vrednosti kultivacionog medijuma od 7 jedinica i uz veličinu inokuluma od 5 % (v/v).
- * Validacija optimizovanih parametara kultivacije izvršena je izvođenjem nove serije oglada pod tačno definisanim uslovima u dva bioreaktora ukupnih zapremina 3 L i 7 L, uz karakterizaciju otpadnog toka bioprocesa. Rezultati validacije optimizovanih parametara kultivacije ukazuju na stabilnost bioprocesa prilikom uvećanja zapremine kultivacione tečnosti za 20 i 50 puta pri čemu je sadržaj biomase oba soja *P. stutzeri*

iznosio približno 9 log CFU/mL. Po završetku bioprocesa u bioreaktorima kultivacione tečnosti su analizirane u pogledu sadržaja ukupnog azota i glukoze. U slučaju *P. stutzeri* ATCC 17588 tokom kultivacije u bioreaktoru ukupne zapremine 3 L postignuta je konverzija ukupnog azota od 81,76%, a u bioreaktoru veće zapremine 71,14%. Efikasnije iskorišćenje nutrijenata zapaženo je u slučaju *P. stutzeri* D1 kod kojeg je tokom proizvodnje biomase u bioreaktoru od 3 L konvertovano 95,79% ukupnog azota i 70% glukoze, dok je u bioreaktoru od 7 L iskorišćeno 90,60% ukupnog azota i 60% glukoze.

- * Rezultati ispitivanja uticaja niskih temperatura skladištenja suspenzija na vijabilnost odabranih denitrifikatora ukazuju na mogućnost čuvanja sveže pripremljenih suspenzija denitrifikatora na temperaturi frižidera u sterilnoj destilovanoj vodi i sterilnom fiziološkom rastvoru tokom 30 dana uz potpuno očuvanje vijabilnosti i vitalnosti ćelija. Ovo je veoma značajno iz ugla primene denitrifikatora u postupku biočišćenja građevinskih materijala, jer čuvanje denitrifikatora u destilovanoj vodi omogućava njihovu direktnu inkorporaciju u glinene pulpe tokom formiranja bioaktivnih sistema za postupak biočišćenja, bez unošenja dodatnih jona koji mogu izazvati dalje oštećenje materijala.
- * Ispitana je i praktična primena proizvedene biomase odabranih denitrifikatora u cilju biočišćenja građevinskih materijala. Umešavanjem biomase u novorazvijene mineralne pulpe obrazovani su bioaktivni sistemi čija je efikasnost praćena na model supstratima opeke i prirodnom stenskom materijalu koji su veštački kontaminirani kalijum-nitratom. Na površini model supstrata opeke (2 mm) nakon trostepene aplikacije bioaktivnog sistema efikasnost biočišćenja je iznosila približno 70% u slučaju oba soja *P. stutzeri*, dok je u dubini materijala (20 mm) efikasnost biočišćenja iznosila 72% primenom referentnog soja i 95% tokom upotrebe prirodnog izolata. Ispitivanjem bioaktivnih sistema primenjenih na kontaminirane uzorke stenskog materijala konstatovano je da se najveća efikasnost postiže tokom prvih 24 h, kada je efikasnost bioaktivnog sistema sa *P. stutzeri* ATCC 17588 47,7%, a bioaktivnog sistema sa *P. stutzeri* D1 čak 89,2%. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani bioaktivni sistemi, a posebno sistemi sa *P. stutzeri* D1, imaju veliki potencijal za primenu u postupcima biočišćenja različitih građevinskih materijala.

7. LITERATURA

- Abdelkarim M., Kamel C., Fathi K., Amina B. (2009): Use of *Pseudomonas stutzeri* and *Candida utilis* in the improvement of the conditions of *Artemia* culture and protection against pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:107-115.
- Alfano G., Lustrato G., Belli C., Zanardini E., Cappitelli F., Mello E., Sorlini C., Ranalli G. (2011): The bioremoval of nitrate and sulfate alterations on artistic stonework: The case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65:1004-1011.
- Anon., (2006): *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. United States Environment Protection Agency. Office of Science and Technology, Vašington, Sjedinjene Američke Države.
- Badar U., Shoeb E., Qureshi F.M., Akhtar J., Ahmed N. (2013): Removal of Copper via Bioreactor by Soil Isolate *Pseudomonas stutzeri*. *Academic Research International*, 4:253-259.
- Baohua L., Xiangliang P., Daoyong Z., Duujong L., Fahad A.M., Mortuza M.G. (2015): Anaerobic nitrate reduction with oxidation of Fe (II) by *Citrobacter freundii* strain PXL1 – a potential candidate for simultaneous removal of As and nitrate from groundwater. *Ecological Engineering* 77:196-201.
- Baras J., Veljković V., Popov S., Povrenović D., Lazić M., Zlatković B. (2009): Osnovi bioprocenog inženjerstva. Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, Leskovac, Srbija.
- Batista K.A., Fernandes K.F. (2015): Development and optimization of a new culture media using extruded bean as nitrogen source. *MethodsX* 2:154-158.
- Bosch-Roig P., Decorosi F., Giovannetti L., Ranalli G., Viti C. (2016): Connecting phenome to genome in *Pseudomonas stutzeri* 5190: an artwork biocleaning bacterium. *Research in Microbiology* 167:757-765.
- Bosch-Roig P., Lustrato G., Zanardini E., Ranalli G. (2014): Biocleaning of Cultural Heritage stone surfaces and frescoes: which delivery system can be the most appropriate? *Annals of Microbiology* 65:1227-1241.
- Bosch-Roig P., Regidor-Ros J., Soriano-Sancho P., Montes-Estellés R. (2013): Biocleaning of animal glue on wall paintings by *Pseudomonas stutzeri*. *Chimica Oggi-Chemistry Today* 31:50-53.
- Bothe H., Ferguson S.J., Newton W.E. (2007): *Biology of the Nitrogen Cycle*, Elsevier, Njujork, Sjedinjene Američke Države, 1-17.
- Brenzinger K., Dörsch P., Braker G. (2015): pH-driven shifts in overall and transcriptionally active denitrifiers control gaseous product stoichiometry in growth experiments with extracted bacteria from soil. *Frontiers in Microbiology* 6:1-11.
- Burghate S.P., Ingole Dr.N.W. (2013): Fluidized Bed Biofilm Reactor – A Novel Wastewater Treatment Reactor. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology* 3:145-155.
- Cao H.L. (2011): *Molecular ecology of ammonia oxidizing archaea and bacteria*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Hong Kongu.
- Cappitelli F., Toniolo L., Sansonetti A., Gulotta D., Ranalli G., Zanardini E., Sorlini C. (2007): Advantages of Using Microbial Technology over Traditional Chemical Technology in Removal of Black Crusts from Stone Surfaces of Historical Monuments. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5671-5675.

- Cappitelli F., Zanardini E., Ranalli G., Mello E., Daffonchio D., Sorlini C. (2006): Improved Methodology for Bioremoval of Black Crusts on Historical Stone Artworks by Use of Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3733-3737.
- Cavazzuti M. (2013): Optimization Methods: From Theory to Design Scientific and Technological Aspects in Mechanics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Nemačka, 1-10.
- Chen Q., Ni J. (2012): Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113:619-623.
- Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel J. (2010): Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology* 48:1169-1175.
- Coenen K., Gallucci F., Mezari B., Hensen E., van Sint Annaland M. (2018): An in-situ IR study on the adsorption of CO₂ and H₂O on hydrotalcites. *Journal of CO₂ Utilization* 24:228-239.
- Cox D.R., Reid N. (2000): The theory of design of experiments. Chapman & Hall, Velika Britanija.
- Čomić Lj. (1999): Ekologija mikroorganizama. Prirodno matematički fakultet, Kragujevac.
- Čuhel J., Šimek M., Laughlin R.J., Bru D., Chèneby D., Watson C.J., Philippot L. (2010): Insights into the effect of soil pH on N₂O and N₂ emissions and denitrifier community size and activity. *Applied and Environmental Microbiology* 76:1870-1878.
- Deng B., Fu L., Zhang X., Zheng J., Peng L., Sun J., Zhu H., Wang Y., Li W., Wu X., Wu D. (2014): The denitrification characteristics of *Pseudomonas stutzeri* SC221-M and its application to water quality control in grass carp aquaculture. *PLoS ONE* 9:1-20.
- Denk T., Mohn J., Decock C., Lewicka-Szczebak D., Harris E., Butterbach-Bahl K., Kiese R., Wolf B. (2017): The nitrogen cycle: A review of isotope effects and isotope modeling approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 105:121-137.
- Diep C.N., Cam P.M., Vung N.H., Lai T.T., My N.T.X. (2009): Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment. *Bioresource Technology* 100: 3787-3791.
- Drysdale G.D., Kasan H.C., Bux F. (1999): Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. *Water SA* 25:357-362.
- Duan J., Fang H., Su B., Chen J., Lin J. (2015): Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresource Technology* 179:421-428.
- Etchebehere C., Errazquin I., Barrandeguy E., Dabert P., Moletta R., Muxí L. (2001): Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. *FEMS Microbiology Ecology* 35:259-265.
- Etchebehere C., Errazquin M.I., Dabert P., Muxí L. (2002): Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. *FEMS Microbiology Ecology* 40:97-106.
- European project- HEROMAT, Protection of Cultural Heritage Objects with Multifunctional Advance Materials, rukovodilac projekta prof. dr Jonjaua Ranogajec, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

- Feijoo-Siota L., Rosa-Dos-Santos F., de Miguel T., Villa T.G. (2008): Biodegradation of Naphtalene by *Pseudomonas stutzeri* in Marine Environments: Testing Cells Entrapment in Calcium Alginate for Use in Water Detoxification. *Bioremediation Journal* 12:185-192.
- Ferguson S.J., Richardson D.J., van Spanning R.J.M. (2007): Biochemistry and Molecular Biology of Nitrification, u *Biology of Nitrogen Cycle* (urednici: Bothe H., Ferguson S.J. i Newton W.E.). Elsevier, Njujork, Sjedinjene Američke Države, 209-222.
- Fernandes Santos A., Cayo R., Schandert L., Gales A.C. (2013): Evaluation of MALDI-TOF MS in microbiology laboratory. *Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine* 49:191-197.
- Fu F., Dionysiou D.D., Liu H. (2014): The use of zero-valent iron for groundwater remediation and wastewater treatment: A review. *Journal of Hazardous Materials* 267:194-205.
- Gajin S., Čomić Lj., Karaman M., Simeunović J. (2007): Ekologija mikroorganizama, Prirodno-matematički fakulteta u Novom Sadu, Novi Sad.
- Galazka A., Krol M., Perzynski A. (2012): The Efficiency of Rhizosphere Bioremediation with *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas stutzeri* in Soils Freshly Contaminated with PAHs and Diesel Fuel. *Polish Journal of Environmental Studies* 21:345-353.
- Galloway J.N., Dentener F.J., Capone D.G., Boyer E.W., Howarth R.W., Seitzinger S.P., Asner G.P., Cleveland C.C., Green P.A., Holland E.A., Karl D.M., Michaels A.F., Porter J.H., Townsend A.R., Vorosmarty C.J. (2004): Nitrogen cycles: past, present and future. *Biogeochemistry* 70:153-226.
- Galloway J.N., Leach A.M., Bleeker A., Erisman J.W. (2013): A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 368:20130120.
- Garibyan L., Avashia N. (2013): Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology* 133:1-8.
- Geets J., de Cooman M., Wittebolle L., Heylen K., Vanparys B., de Vos P., Verstraete W., Boon N. (2007): Real-Time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:211-221.
- Granato D., de Araújo Calado V.M. (2014): The use and importance of design of experiments (DOE) in process modeling in food science and technology, u *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology* (urednici: Granato D. i Ares G.). John Wiley & Sons, Ltd, Nju Džersi, Sjedinjene Američke Države, 3-18.
- Guo J., Guo P., Li S., Li X., Luo C., Wang H., Jiang Q. (2017): Screening an Effective Aerobic Denitrification Strain and its Performance in MBR. *Polish Journal of Environmental Studies* 26:1089-1096.
- He D., Zheng M., Ma T., Li C., Ni J. (2015): Interaction of Cr(VI) reduction and denitrification by strain *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 under aerobic conditions. *Bioresource Technology* 185:346-352.
- Heinaru E., Naanuri E., Grünbach M., Jõessar M., Heinaru A. (2016): Functional redundancy in phenol and toluene degradation in *Pseudomonas stutzeri* strains isolated from the Baltic Sea. *Gene* 589:90-98.
- Henry D.G., Watson J.S., John C.M. (2017): Assessing and calibrating the ATR-FTIR approach as a carbonate rock characterization tool. *Sedimentary Geology* 347:36-52.

- Herlich K. (1990): Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, 17-19.
- Hodžić E., Hodžić E. (2014): Modeliranje i simulacija struktura kompleksnih proizvodnih sistema. Technical Journal 8:150-156.
- Huang T., Guo L., Zhang H., Su J., Wen G., Zhang K. (2015): Nitrogen-removal efficiency of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri* strain ZF31, isolated from a drinking-water reservoir. Bioresource Technology 196:209-216.
- Hunag S., Chen C., Yang X., Wu Q., Zhang R. (2011): Distribution of typical denitrifying functional genes and diversity of the *nirS*-encoding bacterial community related to environmental characteristics of river sediments. Biogeosciences 8:3041-3051.
- Hung C.-H., Tsai K.-H., Su Y.-K., Liang C.-M., Su M.-H., Horng S.-J. (2006): Optimal operations for groundwater denitrification of drinking water using heterotrophic biological denitrification process. Water Science & Technology: Water Supply 6:125-130.
- Hwang C.F., Chang J.H., Hwang J.Y., Tsai C.C., Lin C.K., Tsen H.Y. (2012): Optimization of Medium Composition for Improving Biomass Production of *Lactobacillus plantarum* Pi06 Using Taguchi Array Design and Box-Bhenken Method. Biotechnology and Bioprocess Engineering 17:827-834.
- Integrativni projekat Vekovi Bača, rukovodilac projekta dr Slavica Vujović, Pokrajinski zavod za zaštitu spomenika kulture, Petrovaradin.
- Ji B., Wang H., Yang K. (2014): Nitrate and COD removal in an upflow biofilter under an aerobic atmosphere. Bioresource Technology 158:156-160.
- Ji B., Yang K., Zhu L., Jiang Y., Wang H., Zhou J., Zhang H. (2015): A Review of Important Advances of the Last 30 Years 20:643-651.
- Jones L., Provins A., Holland M., Mills G., Hayes F., Emmett B., Hall J., Sheppard L., Smith R., Sutton M., Hicks K., Ashmore M., Haines-Young R., Harper-Simmonds L. (2013): A review and application of the evidence for nitrogen impacts on ecosystem services. Ecosystem Services 7:76-88.
- Kang K.H., Lee G., Kim J.K. (2015): Efficient aerobic denitrification in the treatment of leather industry wastewater containing high nitrogen concentration. Environmental Engineering Research 20:79-87.
- Kariminiaae-Hamedani H.R., Kanda K., Kato F. (2004): Denitrification activity of the bacterium *Pseudomonas* sp. ASM-2-3 isolated from the Ariake Sea Tideland. Journal of Bioscience and Bioengineering 97:39-44.
- Keeney D.R., Hatfield J.L. (2008): The nitrogen cycle, historical perspective, and current and potential future concerns, u Nitrogen in the environment: sources, problems and management (urednici: Hatfield J.L. i Follett R.F.). University of Nebraska Lincoln, Digital Commons University of Nebraska Lincoln 1-18.
- Khanitchaidecha W., Nakamura T., Sumino T., Kazama F. (2016): Performance of intermittent aeration reactor on NH₄-N removal from groundwater resources. Water Science & Technology 61:3061-3069.
- Kohli R. (2013): Microbial Cleaning for Removal of Surface Contamination, u Surface Contamination and Cleaning (urednici: Kohli R. i Mittal K). Elsevier, Njujork, Sjedinjene Američke Države.
- Kraft B., Strous M., Tegetmeyer H. (2011): Microbial nitrate respiration – Genes, enzymes and environmental distribution 155:104-117.

- Kramar S., Ducman V., Vučetić S., Velkavrh E., Radeka M., Ranogajec J. (2014): Characterization of the substrates from two cultural-heritage sites and a preparation of model substrates. *Materials and technology* 48:505-508.
- Krishna Mohan T.V., Nancharaiah Y.V., Venugopalan V.P., Satya Sai P.M. (2016): Effect of C/N ratio on denitrification of high-strength nitrate wastewater in anoxic granular sludge sequencing batch reactors. *Ecological Engineering* 91:441-448.
- Lalucat J., Bennasar A., Bosch R., García-Valdés, Palleroni N.J. (2006): Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70:510-547.
- Liu B., Frostegard A., Bakken L.R. (2014): Impaired reduction of N₂O to N₂ in acid soils is due to a posttranscriptional interference with the expression of *nosZ*. *mBio* 5:1-10.
- Liu B., Mokved P.T., Frostegard A., Bakken L.R. (2010): Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH. *FEMS Microbiology Ecology* 72:407-417.
- Lowe P., Haswell H., Lewis K. (2006): Use of Various Common Isolation Media to Evaluate the New VITEK 2 Colorimetric GN Card for Identification of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Clinical Microbiology* 44:854-856.
- Lu S., Hu H., Sun Y., Yang J. (2009): Effect of carbon source on the denitrification in constructed wetlands. *Journal of Environmental Sciences* 21:1036-1043.
- Lv P., Luo J., Zhuang X., Zhang D., Huang Z., Bai Z. (2017): Diversity of culturable aerobic denitrifying bacteria in the sediment, water and biofilms in Liangshui River of Beijing, China. *Scientific Reports* 7:1-12.
- Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. (2000): *Environmental microbiology*. Elsevier, San Diego, Sjedinjene Američke Države.
- Markov S., Vidaković A., Šovljanski O. (2018): Primena bakterija u uklanjanju soli sa objekata kulturne baštine. XII Kongres mikrobiologa Srbije MIKROMED 2018 REGIO, 10-12.05.2018. Beograd, Srbija, 173-174.
- Markov S.L. (2012): *Mikrobiologija*. Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
- Martínez-Toledo A., Rodríguez-Vázquez R. (2011): Response surface methodology (Box-Bhenken) to improve a liquid media formulation to produce biosurfactant and phenanthrene removal by *Pseudomonas putida*. *Annals of Microbiology* 61:605-613.
- Montgomery D.C., Runger G.C. (2003): *Applied statistics and probability for engineers*. John Wiley & Sons, Ltd, Njujork, SAD, 410-461.
- Morshedi A., Akbarian M. (2014): Application of Response Surface Methodology: Design of Experiments and Optimization: A mini review. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* 4:2434-2439.
- Ottaviani D., Parlani C., Citterio B., Masini L., Leoni F., Canonico C., Sabatini L., Bruscolini F., Pianetti A. (2011): Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. *Applied and Environmental Microbiology* 144:538-545.
- Peix A., Ramirez-Bahena M.H., Velazquez E. (2018): The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution* 57:106-116.
- Peng Y., He Y., Wu Z., Lu J., Li C. (2014): Screening and optimization of low-cost medium for *Pseudomonas putida* Rs-198 culture using RSM. *Brazilian Journal of Microbiology* 45:1229-1237.

- Ranalli G., Alfano G., Belli C., Lustrato G., Colombini M.P., Bonaduce I., Zanardini E., Abbruscato P., Cappitelli F., Sorlini C. (2005): Biotechnology applied to cultural heritage: bioremediation of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. *Journal of Applied Microbiology* 98:75-83.
- Ranalli G., Chiavarini M., Guidetti V., Marsala F., Matteini M., Zanardini E., Sorlini C. (1996): The use of microorganisms for the removal of nitrates and organic substances on artistic stoneworks. *Proceedings of the 8th International Congress of Deterioration and Conservation of Stone, Berlin, Nemačka, 1415-1420.*
- Rezaee A., Godini H., Dehestani S., Kaviani S. (2010): Isolation and characterization of a novel denitrifying bacterium with high nitrate removal: *Pseudomonas stutzeri*. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 7:313-318.
- Robertson G.P., Groffman P.M. (2015): Nitrogen Transformations u Soil microbiology, ecology and biochemistry (urednik: Paul E.A.). Academic Press, Burlington, Masačustes, Sjedinjene Američke Države, 421-446.
- Rončević Z.Z., Grahovac J.A., Vučurović D.G., Dodić S.N., Bajić B.Ž., Tadijan I.Ž., Dodić J.M. (2014): Optimization of medium composition for the production of compounds effective against *Xanthomonas campestris* by *Bacillus subtilis*. *Acta Periodica Technologica* 45:247-258.
- Saleh-Lakha S., Shannon K.E., Henderson S.L., Goyer C., Trevors J.T., Zebarth B.J., Burton D.L. (2009): Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelli*. *Applied and Environmental Microbiology* 75:3903-3911.
- Schmidt F.R. (2005): Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68:425-435.
- Shivran H.S., Kumar S., Kumar D., Singh R.V. (2005): The effect of carbon as an energy source for biological denitrification though *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Environmental Science and Engineering* 47:115-118.
- Shiyan S.P., Krishnaveni M. (2013): Hydrogen production by *Pseudomonas stutzeri* JX442762 isolated from thermal soil at Mettur power station, Salem district, Tamil Nadu, India. *Journal of Pharmacy Research* 6:112-116.
- Shukla A., Parmar P., Saraf M. (2017): Radiation, radionuclides and bacteria: An in-perspective review. *Journal of Environmental Radioactivity* 180:27-35.
- Singh D.N., Tripathi A.K. (2013): Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed. *Bioresource Technology* 128:215-221.
- Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Viridi J.S. (2015): MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* 6:1-16.
- Sobieszuk P., Szewczyk K.W. (2006): Estimation of (C/N) ratio for microbial denitrification. *Environmental Technology* 27:103-108.
- Song Z.-F., An J., Fu G.-H., Yang X.-L. (2011): Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture* 319:188-193.
- Spanu T., Sanguinetti M., Ciccaglione D., D'Inzeo T., Romano L., Leone F., Fadda G. (2003): Use of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Clinical Isolates of Staphylococci from Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 41:4259-4263.
- Stein L.Y., Klotz M.G. (2016): The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26:94-98.

- Stüeken E.E., Kipp M.A., Koehler M.C., Buick R. (2016): The evolution of Earth's biogeochemical nitrogen cycle. *Earth-Science Reviews* 160:220-239.
- Su J.F., Zhang K., Huang T.L., Wen G., Guo L., Yang S.F. (2015): Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low nutrient conditions by a newly isolated bacterium, *Acetivibrio* sp. SYF26. *Microbiology* 161:829-837.
- Su J.-J., Liu B.Y., Liu C.-Y. (2001): Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. *Journal of Applied Microbiology* 90:457-462.
- Takenaka S., Zhou Q., Kuntiya A., Seesuriyachan P., Murakami S., Aoki K. (2007): Isolation and characterization of thermotolerant bacterium utilizing ammonium and nitrate ions under aerobic conditions. *Biotechnology Letters* 29:385-390.
- Thakur V., Tewari R., Sharma R. (2014): Evaluation of Production Parameters for Maximum Lipase Production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and Scale-Up in Bioreactor. *Chinese Journal of Biology* 2014:1-14.
- Thamdrup B. (2012): New pathways and processes in the global nitrogen cycle. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 43:407-428.
- Uzunova-Doneva T., Donev T. (2005): Anabiosis and conservation of microorganisms, *Journal of Culture Collections* 4:17-28.
- Van Dommelen A., Vanderleyden J. (2007): Associative Nitrogen Fixation, u *Biology of Nitrogen Cycle* (urednici: Bothe H., Ferguson S.J. i Newton W.E.). Elsevier, Njujork, Sjedinjene Američke Države, 179-192.
- Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (2011): *Manual of Clinical Microbiology*. Department of Pathology, Texas Children's Hospital and Department of Pathology and Immunology, Baylor College of Medicine, Houston, Teksas.
- Vučetić S. (2017): Degradacija i zaštita materijala nepokretnog kulturnog nasleđa. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
- Vučetić S., Ranogajec J., Markov S., Vidaković A., Hiršenberger H., Bera O. (2017): Development and modeling of the effective bioactive poultices for reducing the nitrate content in building materials. *Construction and Building Materials* 142:506-513.
- Vučurović D.G., Dodić S.N., Popov S.D., Dodić J.M., Grahovac J.A. (2012): Process model and economic analysis of ethanol production from sugar beet raw juice as part of the cleaner production concept. *Bioresource Technology* 104:367-372.
- Wang J.T., Chang S.C., Chen Y.C., Luh K.T. (2000): Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 33:258-262.
- Wang J., Chu L. (2016): Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. *Biotechnology Advances* 34:1103-1112.
- Wang L., Fan D., Chen W., Terentjev E.M. (2015): Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep15159.
- Ward B. (2012): The global nitrogen cycle, u *Fundamentals of Geobiology* (urednici: Knoll A.H., Canfield D.E. i Konhauser K.O.). Blackwell Publishing Ltd, Nju Džersi, Sjedinjene Američke Države.

- Wen Y., Ren Y., Wei C.H., Li K.Y., Lin F.M., Chen X.Y. (2010): A study on nitrogen removal efficiency of *Pseudomonas stutzeri* strains isolated from an anaerobic/anoxic/oxic wastewater treatment process. *African Journal of Biotechnology* 9:869-873.
- World Health Organization (2011): Nitrate and nitrite in drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Ženeva, Švajcarska.
- Yan Y., Yang J., Dou Y., Chen M., Ping S., Peng J., Lu W., Zhang W., Yao Z., Li H., Liu W., He S., Geng L., Zhang X., Yang F., Yu H., Zhan Y., Li D., Lin Z., Wang Y., Elmerich C., Lin M., Jin Q. (2008): Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of the root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *PANS* 105:7564-7569.
- Yang F., Long L., Sun X., Wu H., Li T., Xiang W. (2014): Optimization of Medium Using Response Surface Methodology for Lipid Production by *Scenedesmus* sp. *Marine Drugs* 12:1245-1257.
- Yang X., Wang S., Zhou L. (2012): Effect of carbon source, C/N ratio, nitrate and dissolved oxygen concentration on nitrite and ammonium production from denitrification process by *Pseudomonas stutzeri* D6. *Bioresource Technology* 104:65-72.
- Yao S., Ni J., Ma T., Li C. (2013): Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acetivibrio* sp. HA2. *Bioresource Technology* 139:80-86.
- York M.K., Taylor M.M., Hardy J., Henry M. (2004): Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria, *Clinical microbiology procedures handbook*, ASM Press, Vašington, 3.17-39.1.
- Zhang J., Wu P., Hao B., Yu Z. (2011): Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresource Technology* 102:9866-9869.
- Zhang X., Zhang J. (2018): Effect of dissolved oxygen on biological denitrification using biodegradable plastic as the carbon source. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 121:032015.
- Zhao B., Yang Cheng D., Tan P., An Q., Song Guo J. (2018): Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal. *Bioresource Technology* 250:564-573.
- Zheng M., He D., Ma T., Chen Q., Liu S., Ahmad M., Gui M., Ni J. (2014): Reducing NO and N₂O emission during aerobic denitrification by newly isolated *Pseudomonas stutzeri* PCN-1. *Bioresource Technology* 162:80-88.
- Zhou M., Ye H., Zhao X. (2014): Isolation and characterization of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* KTB for bioremediation of wastewater. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 19:231-238.
- Zhu L., Ding W., Feng L., Kong Y., Xu J., Xu X. (2012): Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem. *Bioresource Technology* 108:1-7.
- Zhu S., Zheng M., Li C., Gui M., Chen Q., Ni J. (2015): Special role of corn flour as an ideal carbon source for aerobic denitrification with minimized nitrous oxide emission. *Bioresource Technology* 186:44-51.

8. PRILOZI

PRILOG 1.**Protokol za ekstrakciju DNK
(Agilent Technologies, SAD, modifikovano)**

1. Odmeriti najviše 0,1 g osvežene biomase bakterija u sterilne epruvice.
2. Odmerene uzorke sterilno preneti u sterilan avan.
3. Dodati 500 µl pufera za ekstrakciju i izmacerirati.
4. Dobijeni macerat vratiti u sterilnu epruveticu i dobro homogenizovati na vorteksu
5. Sadržaj epruvice preneti u epruveticu sa filterom (F) koja se potom postavlja unutar veće epruvete (V).
6. Kompletan sadržaj (F+V) centrifugirati pri sledećim uslovima: 14000 o/min tokom 1 min.
7. Nakon centrifugiranja izvaditi (F) i prosuti sadržaj koji se nalazi u (V), a zatim opet vratiti (F) u (V).
8. Dodati 500 µl pufera za ispiranje.
9. Centrifugirati pri sledećim uslovima: 14000 o/min tokom 1 min.
10. Ponoviti postupak pod rednim brojem 7.
11. Dodati 500 µl 80% etanola.
12. Centrifugirati pri sledećim uslovima: 14000 o/min tokom 1 min.
13. Postupke pod rednim brojevima 11. i 12. ponoviti naizmenično 3 puta.
14. Potom ponoviti postupak pod rednim brojem 7.
15. Centrifugirati pri sledećim uslovima: 14000 o/min tokom 2 min.
16. Nakon centrifugiranja izvaditi (F), prosuti sadržaj koji se nalazi u (V), a potom (F) postaviti u novu (V).
17. Direktno na filter epruvice (F) dodati 100 µl elucionog pufera.
18. Zatvoriti poklopac epruvice (F) i inkubirati 10 min na sobnoj temperaturi.
19. Centrifugirati pri sledećim uslovima: 14000 o/min tokom 1 min.
20. Nakon centrifugiranja odbaciti tubicu sa filterom (F), a ekstrahovanu DNK koja se nalazi u epruveti (V) čuvati na -20 °C.

PRILOG 2.

Tabela 21. Karakteristike izolata iz Dunava

Izolot	Oksidaza test	Katalaza test	KOH test	Bojenje po Gramu	Oblik	MacConkey agar		Cetrimid agar	
						rast	laktoza	rast	pigment
Prvo uzorkovanje (08.06.2015.)									
ID ₁ /1	-	+	+	-	štapićast	-	-	-	-
ID ₁ /2	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
ID ₁ /3	-	-	+	+	štapićast	+	-	-	-
ID ₁ /4	-	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
ID ₁ /5	+	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
ID ₁ /6	+	-	+	+	štapićast	+	-	-	-
ID ₁ /7	+	+	-	+	štapićast	-	-	-	-
IID ₁ /1	+	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
IID ₁ /2	+	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
IID ₁ /3	-	+	+	+	loptast	-	-	-	-
IIID ₁ /1	+	+	-	-	štapićast	-	-	-	-
IIID ₁ /2	+	+	+	+	loptast	-	-	-	-
IIID ₁ /3	+	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
IIID ₁ /4	+	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
IIID ₁ /5	-	+	+	-	štapićast	-	-	-	-
IIID ₁ /6	-	+	+	+	loptast	+	-	-	-
IVD ₁ /1	-	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
IVD ₁ /2	+	-	-	-	štapićast	-	-	-	-
IVD ₁ /3	+	+	-	-	štapićast	+	+	+	+
IVD ₁ /4	+	+	-	-	štapićast	-	-	+	+
IVD ₁ /5	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	+
IVD ₁ /6	-	+	+	+	štapićast	+	+	+	+
IVD ₁ /7	-	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
IVD ₁ /8	+	+	-	-	štapićast	+	+	+	+
VD ₁ /1	-	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
VD ₁ /2	+	+	-	-	loptast	+	+	-	-
VD ₁ /3	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	+
VD ₁ /4	+	+	-	-	štapićast	+	+	+	+
VD ₁ /5	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	+
VD ₁ /6	-	+	-	-	štapićast	+	+	+	+
VD ₁ /7	-	-	+	+	loptast	-	-	-	-
VD ₁ /8	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
Drugo uzorkovanje (22.06.2015.)									
ID ₂ /1	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
ID ₂ /2	+	+	-	-	štapićast	-	-	+	-
ID ₂ /3	+	+	-	-	štapićast	+	+	+	-
ID ₂ /4	-	+	+	+	loptast	+	+	-	-
IID ₂ /1	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
IID ₂ /2	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
IID ₂ /3	-	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
IID ₂ /4	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-

IIID ₂ /1	-	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
IIID ₂ /2	+	+	-	-	štapićast	+	+	+	-
IIID ₂ /3	-	-	+	+	loptast	-	-	-	-
IIID ₂ /4	+	-	-	-	štapićast	+	+	-	-
IIID ₂ /5	+	+	-	-	štapićast	-	-	-	-
IIID ₂ /6	-	+	+	+	loptast	-	-	-	-
IVD ₂ /1	+	-	+	+	štapićast	+	+	-	-
IVD ₂ /2	+	+	-	-	štapićast	-	-	+	-
IVD ₂ /3	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
IVD ₂ /4	-	-	-	-	štapićast	-	-	-	-
VD ₂ /1	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
VD ₂ /2	+	-	+	+	štapićast	+	+	+	-
VD ₂ /3	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	-
VD ₂ /4	-	-	+	+	loptast	-	-	-	-
Treće uzorkovanje (29.06.2015.)									
ID ₃ /1	+	-	-	-	štapićast	-	-	-	-
ID ₃ /2	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
ID ₃ /3	+	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
ID ₃ /4	+	-	-	-	štapićast	-	-	-	-
ID ₃ /5	+	+	-	-	loptast	-	-	-	-
IID ₃ /1	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	-
IID ₃ /2	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
IID ₃ /3	+	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
IID ₃ /4	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
IID ₃ /5	+	-	-	-	štapićast	-	-	+	-
IIID ₃ /1	+	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIID ₃ /2	+	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
IVD ₃ /1	+	+	-	-	loptast	+	+	-	-
IVD ₃ /2	-	+	-	-	loptast	+	+	-	-
IVD ₃ /3	-	-	+	+	loptast	-	-	-	-
IVD ₃ /4	+	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
IVD ₃ /5	-	+	+	+	loptast	-	-	-	-
VD ₃ /1	+	-	-	-	štapićast	+	+	-	-
VD ₃ /2	-	+	-	-	loptast	+	+	-	-
VD ₃ /3	+	-	-	-	štapićast	+	-	+	-

PRILOG 3.

Tabela 22. Karakteristike izolata iz kanala Dunav-Tisa-Dunav

Izolat	Oksidaza test	Katalaza test	KOH test	Bojenje po Gramu	Oblik	MacConkey agar		Cetrimid agar	
						rast	laktoza	rast	pigment
Prvo uzorkovanje (10.06.2015.)									
IK ₁ /1	-	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
IK ₁ /2	+	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIK ₁ /1	+	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIK ₁ /2	+	+	+	+	loptast	-	-	-	-
IIK ₁ /3	-	+	+	+	loptast	-	-	-	-
IIK ₁ /4	+	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
IIK ₁ /5	-	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
IIK ₁ /6	+	+	+	+	loptast	-	-	-	-
IIK ₁ /7	+	+	-	-	štapićast	-	-	+	-
IIIK ₁ /1	+	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
IIIK ₁ /2	-	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIIK ₁ /3	-	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIIK ₁ /4	+	+	+	+	štapićast	-	-	+	-
IIIK ₁ /5	-	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
IVK ₁ /1	-	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
IVK ₁ /2	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	-
IVK ₁ /3	+	+	-	-	štapićast	-	-	+	-
IVK ₁ /4	+	-	+	+	štapićast	-	-	-	-
IVK ₁ /5	-	+	-	-	štapićast	+	-	+	-
IVK ₁ /6	-	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
VK ₁ /1	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
VK ₁ /2	+	-	-	-	štapićast	+	+	+	-
VK ₁ /3	+	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
VK ₁ /4	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	-
VK ₁ /5	+	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
VK ₁ /6	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
VK ₁ /7	+	+	+	+	loptast	-	-	-	-
Drugo uzorkovanje (24.06.2015.)									
IK ₂ /1	+	-	-	-	štapićast	-	-	-	-
IK ₂ /2	+	+	+	+	štapićast	+	-	-	-
IK ₂ /3	+	+	+	+	štapićast	+	-	+	-
IIK ₂ /1	+	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIK ₂ /2	+	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIK ₂ /3	+	-	-	-	štapićast	+	-	+	-
IIIK ₂ /1	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	-
IIIK ₂ /2	+	+	-	-	štapićast	-	-	+	-
IIIK ₂ /3	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIIK ₂ /4	-	-	+	+	loptast	-	-	-	-
IIIK ₂ /5	-	+	+	+	loptast	-	-	-	-
IVK ₂ /1	+	-	-	-	štapićast	+	-	+	-

IVK ₂ /2	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
IVK ₂ /3	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
VK ₂ /1	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	-
VK ₂ /2	-	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
VK ₂ /3	+	+	+	+	loptast	+	-	-	-
VK ₂ /4	-	+	+	+	loptast	-	-	-	-
VK ₂ /5	+	-	-	-	štapićast	+	-	+	-
Treće uzorkovanje (30.06.2015.)									
IK ₃ /1	+	+	+	+	loptast	+	-	-	-
IK ₃ /2	+	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IK ₃ /3	+	+	+	+	loptast	+	-	-	-
IIK ₃ /1	-	+	+	+	loptast	+	-	-	-
IIK ₃ /2	-	-	-	-	štapićast	+	-	+	-
IIK ₃ /3	+	+	-	-	štapićast	-	-	-	-
IIK ₃ /4	+	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIIK ₃ /1	-	-	-	-	štapićast	+	+	-	-
IIIK ₃ /2	-	-	+	+	štapićast	+	-	-	-
IIIK ₃ /3	-	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IIIK ₃ /4	+	+	+	+	loptast	-	-	-	-
IVK ₃ /1	+	+	-	-	štapićast	+	+	-	-
IVK ₃ /2	-	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
IVK ₃ /3	+	+	-	-	štapićast	+	-	-	-
IVK ₃ /4	+	+	-	-	štapićast	+	-	+	-
IVK ₃ /5	+	+	+	+	štapićast	-	-	-	-
VK ₃ /1	+	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
VK ₃ /2	-	-	-	-	štapićast	+	-	-	-
VK ₃ /3	+	-	-	-	štapićast	+	-	+	-
VK ₃ /4	-	-	+	-	štapićast	+	-	-	-

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ana Vidaković
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Siniša Markov, redovni profesor
Naslov rada: NR	Denitrifikator <i>Pseudomonas stutzeri</i> – izolovanje, optimizacija bioprocenih parametara i primena
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Autonomna Pokrajina Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	(8 poglavlja/ 123 stranice / 35 slika / 22 tabele / 125 referenci / 3 priloga)
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Biotehnologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Denitrifikator, <i>Pseudomonas stutzeri</i> , biomasa, bioaktivni sistem, biočišćenje
UDK	

Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	
<p>U okviru ove doktorske disertacije prikazan je postupak izolacije i karakterizacije denitrifikatora uz optimizaciju biotehnoških uslova proizvodnje biomase i ispitivanje efikasnosti proizvedene biomase u pogledu biočišćenja različitih građevinskih materijala. U okviru istraživanja koja su obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom, izolovan je nov soj denitrifikatora koji je pomoću metode MALDI TOF identifikovan kao <i>Pseudomonas stutzeri</i>. U svim eksperimentima karakteristike i performanse novoizolovanog soja <i>P. stutzeri</i>, interno označenog kao D1, su poređene sa referentnom kulturom <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588, koji je model mikroorganizam na kome se izučava proces denitrifikacije. Primenom PCR metode utvrđeno je postojanje četiri ključna denitrifikujuća gena (<i>napA</i>, <i>nirS</i>, <i>norB</i> i <i>nosZ</i>) u genomu <i>P. stutzeri</i> D1 i referentnog soja, čime je pokazano da ispitivani sojevi imaju genetsku predispoziciju za izvođenje potpune aerobne denitrifikacije. Takođe, uz primenu Boks-Benkenovog eksperimentalnog dizajna i metode odzivne površine, definisan je sastav hranljive podloge za dobijanje maksimalnog sadržaja biomase <i>P. stutzeri</i> D1 (1 g/L glukoze, 3 g/l KNO₃ i 4 g/L peptone) i <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 (2 g/L KNO₃ i 4 g/L peptona). Osim toga, optimizovani su i odabrani bioproceni parametri za proizvodnju biomase oba denitrifikatora – temperatura 30 °C, pH vrednost kultivacionog medijuma 7 jedinica i veličina inokuluma 5% (v/v). Validacija optimizovanih parametara kultivacije izvršena je izvođenjem nove serije oglada pri definisanim uslovima u laboratorijskim bioreaktorima ukupnih zapremina 3 L i 7 L, čime je pokazana stabilnost bioprocena prilikom uvećanja zapremine kultivacione tečnosti uz ostvarenje maksimalnog sadržaja biomase od 9 log CFU/ml za oba ispitivana soja uz minimalno opterećenje otpadnog toka. Rezultati primene denitrifikatora u vidu bioaktivnog sistema (pulpa sa suspenzijom denitrifikatora) koji je nanošen na površinu veštački kontaminiranih model supstrata opeke ukazuju na visoku efikasnost uklanjanja nitrata i to 95 % u slučaju <i>P. stutzeri</i> D1 i 72% u slučaju referentnog soja. Ispitivanjem bioaktivnih sistema primenjenih na kontaminirane uzorke stenskog materijala konstatovano je da se najveća efikasnost postiže tokom prvih 24 h, kada je efikasnost bioaktivnog sistema sa <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 47,7%, a bioaktivnog sistema sa <i>P. stutzeri</i> D1 čak 89,2%.</p> <p>U okviru doktorske disertacije izolovanjem i karakterizacijom visoko efikasnog denitrifikatora <i>P. stutzeri</i> D1 i detaljnim prikazom postupka optimizacije bioprocenih parametara i validacije optimizovanih bioprocenih parametara u laboratorijskim bioreaktorima načinjeni su prvi koraci ka definisanju idejnog rešenja i uvećanju razmera predloženog bioprocena. Takođe, visoka efikasnost odabranih denitrifikatora u postupcima biočišćenja različitih građevinskih materijala, koja je postignuta u laboratorijskim uslovima predstavlja dobar osnov za nastavak istraživanja u realnim uslovima, kako na građevinskim materijalima, tako i u tretmanima zemljišta i otpadnih voda.</p>	
Datum prihvatanja teme od strane	11.05.2017.

Senata: DP	
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: dr Jonjaua Ranogajec, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom, redovni profesor</p> <p>mentor: dr Siniša Markov, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom, redovni profesor</p> <p>član: dr Jovana Grahovac, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom, vanredni profesor</p> <p>član: dr Aleksandra Ranitović, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom, docent</p> <p>član: dr Nataša Ćurčić, Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, naučni saradnik</p>

University of Novi Sad
Faculty of Technology Novi Sad
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Ana Vidaković
Mentor: MN	PhD Siniša Markov, Full professor
Title: TI	Denitrifier <i>Pseudomonas stutzeri</i> – isolation, optimization of bioprocess parameters and application
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, 1 Bulevar cara Lazara
Physical description: PD	(8 chapters/ 123 pages / 35 figures / 22 tables / 125 references / 3 accessories)
Scientific field SF	Technological Engineering
Scientific discipline SD	Biotechnology
Subject, Key words SKW	Denitrifier, <i>Pseudomonas stutzeri</i> , biomass, bioactive system, biocleaning

UC	
Holding data: HD	Library of the Faculty of Technology Novi Sad, 21000 Novi Sad, 1 Bulevar cara Lazara
Note: N	None
Abstract: AB	
<p>The main goal of this PhD thesis is to establish the procedure of isolation and characterization of denitrifiers along with the optimization of biotechnological conditions for the biomass production and testing the efficiency of the produced biomass in terms of biocleaning of various building materials.</p> <p>Within the research involved in this PhD thesis, novel denitrifier strain was isolated and identified as <i>Pseudomonas stutzeri</i> by using MALDI TOF. In all experiments, the characteristics and performances of the newly isolated strain of <i>P. stutzeri</i> (internally denoted as D1) were compared with the reference strain <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588, which is a model microorganism for studying the denitrification process. By using PCR method the presence of four key denitrification genes (<i>napA</i>, <i>nirS</i>, <i>norB</i> and <i>nosZ</i>) in genome of the both strains was established indicating their genetic predisposition to perform complete aerobic denitrification. Also, the composition of the cultivation medium for obtaining the maximum content of biomass of <i>P. stutzeri</i> D1 (1 g/L glucose, 3 g/l KNO₃ and 4 g/L peptone) and <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 (2 g/L KNO₃ and 4 g/L peptone) was determined by employing Box-Bhenken experimental design and RSM. In addition, the selected bioprocess parameters were optimized for the production of biomass of the both denitrifiers – temperature 30 °C, pH value of the cultivation medium of 7 units and inoculum size of 5% (v/v). Validation of the optimized bioprocess parameters was carried out by performing new series of experiments under previously define conditions in laboratory bioreactors with total volumes of 3 L and 7 L. The results of validation showed the stability of bioprocess while increasing the volume of the cultivation broth with the achievement of a maximum biomass content og 9 log CFU/ml for the both strains with minimum load of waste stream. The results of the application of the denitrifiers as a part of bioactive system (poultice with a suspension of denitrifiers) used onto the artificially contaminated brick model supstrates indicate a high efficiency of nitrate removal, namely 95% in the case of <i>P. stutzeri</i> D1 and 72% in the case of reference strain. By examing bioactive systems applied to contaminated stone material it was found that the highest efficiency in nitrate removal was achieved during the first 24 h (47.7% for the reference strian and 89.2% for the <i>P. stutzeri</i> D1).</p> <p>The results obtained in this PhD thesis including the established procedure for isolation and characterization of denitrifiers and detailed presentation of the optimization and validation process of bioprocess parameters represent the first steps made towards defining the conceptual solution and scale up of the proposed bioprocess. Moreover, the high efficiency of selected denitrificators in the biological treatment of various building materials, achieved in laboratory conditions is a good basis for continuing research in real conditions on construction materials, as well as in soil and wastewater treatment.</p>	

Accepted on Senate on: AS	11/5/2017
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: PhD Jonjaua Ranogajec, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, Full Professor</p> <p>mentor: PhD Siniša Markov, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, Full Professor</p> <p>member: PhD Jovana Grahovac, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, Associate Professor</p> <p>member: PhD Aleksandra Ranitović, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, Assistant Professor</p> <p>member: PhD Nataša Ćurčić, Institute of Food Technology in Novi Sad, Research Associate</p>