

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Tanja M. Narančić

**METABOLIČKA RAZNOVRSNOST  
BAKTERIJA IZOLOVANIH IZ  
POVRŠINSKOG REČNOG SEDIMENTA  
POD UTICAJEM PETROHEMIJSKIH  
EFLUENATA:  
*Pseudomonas* sp. TN301 KAO  
PROIZVOĐAČ  
POLIHIDROKSIALKANOATA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Tanja M. Narančić

**METABOLIC VERSATILITY OF  
BACTERIA ISOLATED FROM SURFACE  
RIVER SEDIMENT INFLUENCED BY  
PETROCHEMICAL EFFLUENTS:  
THE CASE OF *Pseudomonas* sp. TN301  
AS POLYHYDROXYALKANOATE  
PRODUCER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

**MENTORI:**

**dr Jasmina Nikodinović-Runić**, viši naučni saradnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu

**dr Đorđe Fira**, vanredni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**dr Jasmina Nikodinović-Runić**, viši naučni saradnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu

**dr Đorđe Fira**, vanredni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Branka Vasiljević**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu

**DATUM ODBRANE:**

*Ova teza je urađena u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u Beogradu, i laboratoriji dr Kevin O'Connor-a, „School of Biomolecular and Biomedical Science“, UCD, Dablin, Irska.*

*Ovom prilikom bih se zahvalila:*

*dr Jasmini Nikodinović-Runić, koja je preokrenula moj naučni život i podsetila me zbog čega sam poželela da se bavim naukom. Zahvaljujem joj se na svojoj nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada i tokom pisanja ove teze, na savetima, 24/7 dostupnosti i pozitivnosti;*

*dr Branki Vasiljević, za ukazano poverenje na početku mog naučnog putovanja, na svim korisnim savetima tokom eksperimentalnog rada, kao i za kritičku ocenu rada;*

*prof dr Đorđu Firi, na savetima i kritičkoj oceni rada;*

*Laboratoriji 05, svojim dragim kolegama Ivani, Nadi, Tanji, Lidiji Š., Sandri, Saši, Vanjici, i naravno Miloju, za veselu atmosferu i podršku u radu;*

*Sanjici i Lidiji, saborcima i prijateljima, na podršci i deljenju svih lepih, ali i teških trenutaka;*

*Laboratoriji G1, dr Kevin O'Connor-u, Shane-u, Maciek-u, Emiliji, Sue, Will-u, Fede-u, Reeta-i, za fantastično eksperimentalno i životno iskustvo;*

*Porodici i prijateljima, za ljubav, podršku i strpljenje;*

*Posebnu zahvalnost dugujem Stefanu, bez čijeg bezgraničnog razumevanja, ljubavi i podrške ne bih uspela da uradim sve ovo;*

*I naravno, Vladimiru i mami, zato što su Vladimir i mama.*

***Tati***

**Metabolička raznovrsnost bakterija izolovanih iz površinskog rečnog sedimenta pod uticajem petrohemijskih efluenata: *Pseudomonas* sp. TN301 kao proizvođač polihidroksialkanoata**

**REZIME:**

Mono- i poliaromatična jedinjenja predstavljaju široko rasprostranjene zagađivače životne sredine. Ova jedinjenja veoma dugo opstaju u datoj sredini, a mnoga od njih imaju i toksična, kancerogena i mutagena svojstva. Sredine zagađene aromatičnim jedinjenjima su najčešće kontaminirane i teškim metalima, a odlikuju se i neravnotežnim odnosom esencijalnih nutrijenata. Sa druge strane, ovakve sredine su dobar izvor bakterija sa sposobnošću preživljavanja u izuzetno teškim uslovima. Cilj ovog rada je bila izolacija robustnih bakterija sa potencijalnom biotehnološkom aplikacijom iz sedimenata koji su pod uticajem petrohemijskih efluenata. Upotrebom dve različite strategije izolovanja, toplotnog pretretmana i medijuma za rast i sporulaciju *Actinobacteria*, i predobogaćivanja uzoraka naftalenu u kombinaciji sa odabirom brzo rastućih bakterija sa sposobnošću rasta na naftalenu kao jedinom izvoru ugljenika i energije izolovane su 34 Gram-pozitivne i 4 Gram-negativne bakterije. Izolati sa sposobnošću degradacije od 9 do 15 najčešćih aromatičnih polutanata poput benzena, bifenila i naftalena pripadali su rodovima *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Actinobacteria*, *Sinorhizobium* i *Pseudomonas*. *Rhodococcus* sp. TN105, *Gordonia* sp. TN103 i *Arthrobacter* sp. TN221 su identifikovani kao novi sojevi. Od 11 izolata sa sposobnošću rasta u prisustvu bar jednog od testiranih teških metala (živa, kadmijum, nikel) u 100 mM koncentracijama, 8 je imalo sposobnost degradacije 15 različitih aromatičnih jedinjenja. Rezistenciju na bar jedan od testiranih antibiotika pokazalo je 60% izolata. Međutim, nije primećena visoka učestanost multirezistencije na antibiotike. Trećina izolata je imala sposobnost da akumulira bar jedan od biopolimera. Dvanaest izolata, uglavnom pripadnika rodova *Bacillus* i *Arthrobacter* su akumulirali polifosfate, 3 *Bacillus* sp. izolata su akumulirala polihidroksibutirat (PHB), *Pseudomonas* sp. TN301 je akumulirao polihidroksialkanoate srednje duzine niza (mcl-PHA), dok su 4 Gram-pozitivna izolata akumulirala egzopolisaharide. U ovom radu je po prvi put pokazana sposobnost pripadnika roda *Bacillus* da konvertuju toluen u PHB. *Pseudomonas* sp. TN301 se istakao zbog svoje sposobnosti da akumulira mcl-PHA do 22% suve ćelijske

mase iz poliaromatičnog jedinjenja naftalena. Razvijen je metod za dodavanje izrazito hidrofobnih poliaromatičnih jedinjenja u kultivacioni medijum. Najveća masa i najviši nivo akumuliranog mcl-PHA postignuti su dodavanjem sintetičkog surfaktanta Tween-a 80 (0.5 g l<sup>-1</sup>). Pokazano je da *Pseudomonas* sp. TN301 ima sposobnost akumulacije mcl-PHA iz širokog opsega poli- i monoaromatičnih jedinjenja, kao i njihovih smeša. Ovaj rad predstavlja prvu sveobuhvatnu studiju metabolički raznovrsnih, u prvom redu Gram-pozitivnih bakterija sa velikim aplikacionim potencijalom u procesu bioremedijacije sredina zagađenih mešovitim polutantima, ali i sa drugim biotehnološkim aplikacijama kao sto je konverzija otpadnog materijala u biopolimere. U ovom radu je po prvi put pokazana sposobnost bakterijskog soja da konvertuje različita poliaromatična jedinjenja i njihove smeše u biodegradabilni polimer (mcl-PHA). S obzirom na to da ima odlike biodegradabilnog termoelastomera, mcl-PHAsve više dobija na važnosti, pa je izolacija novih sojeva sa sposobnošću njegove produkcije od izuzetnog značaja.

**KLJUČNE REČI:** monoaromatična jedinjenja, poliaromatična jedinjenja, biodegradacija, bioremedijacija, teški metali, polifosfati, egzopolisaharidi, polihidroksibutirat, polihidroksialkanoat, *Pseudomonas*

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Primenjena mikrobiologija

**UDK BROJ:** [579.26:579.69]:[579.841.1:577.12] (043.3)

**DODATNA POSEBNA KLASIFIKACIONA OZNAKA ZA DATU OBLAST:**

**Metabolic versatility of bacteria isolated from surface river sediment influenced by petrochemical effluents: The case of *Pseudomonas* sp. TN301 as polyhydroxyalkanoate producer**

**SUMMARY:**

Mono- and polyaromatic compounds are among the most prevalent and persistent pollutants in the environment. They have been reported as toxic, carcinogenic and mutagenic. Contaminated sites usually contain complex mixture of aromatic compounds and heavy metals, and are characterized by essential nutrients imbalance. On the other hand, polluted sites proved to be valuable sources of bacteria capable of surviving in these harsh environments. The aim of this study was to obtain robust bacteria with potential biotechnological application from the river sediments affected by the proximity of a petrochemical industrial site. Using two different isolation strategies, heat pretreatment and media for growth and sporulation of *Actinobacteria* and naphthalene enrichment combined with the selection of fast growing bacteria capable of using naphthalene as the sole source of carbon and energy, 34 Gram-positive and 4 Gram-negative bacterial strains were isolated. Isolates that were able to use 9 or more common aromatic pollutants, such as benzene, biphenyl, naphthalene etc. as a sole source of carbon and energy included members of *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Actinobacteria*, *Sinorhizobium*, and *Pseudomonas* genus. *Rhodococcus* sp. TN105, *Gordonia* sp. TN103 and *Arthrobacter* sp. TN221 were identified as novel strains. Out of 11 isolates able to grow in the presence of one or more metals (mercury, cadmium, nickel) at high concentration (100 mM), eight could degrade 15 different aromatic compounds. Antibiotic resistance to at least one of the tested antibiotics was found among 60% of the isolates. However, high incidence of multiresistance was not observed. One third of the isolates could accumulate at least one biopolymer. Twelve isolates (mainly *Bacillus* sp. and *Arthrobacter* sp.) accumulated polyphosphate, three *Bacillus* sp. accumulated polyhydroxybutyrate (PHB), and *Pseudomonas* sp. TN301 accumulated medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA), while four Gram-positive isolates could accumulate exopolysaccharides. This study is the first report of a *Bacillus* strain capable of converting toluene to PHB. *Pseudomonas* sp. TN301 was



distinguished by its ability to accumulate mcl-PHA up to 22% of cell dry weight from the naphthalene. A method of supplying highly hydrophobic polyaromatic hydrocarbons to a culture medium was developed. The best biomass and mcl-PHA yields were achieved with the addition of synthetic surfactant Tween 80 (0.5 g l<sup>-1</sup>). It was shown that *Pseudomonas* sp. TN301 can accumulate mcl-PHA from a wide range of poly- and monoaromatic hydrocarbons, and mixtures thereof.

This is the first comprehensive study on the metabolically diverse, primarily Gram-positive bacteria with great application potential for mixed pollution bioremediation studies, as well as in other biotechnological applications such as waste conversion to biopolymers. Also, this is the first report of the ability of a bacterial strain to convert a range of polyaromatic hydrocarbon compounds to the biodegradable polymer (mcl-PHA). Mcl-PHA is gaining importance as a promising biodegradable thermoelastomer and therefore isolation of new producing strains is highly significant.

**KEY WORDS:** monoaromatic compounds, polyaromatic hydrocarbons, biodegradation, , heavy metals, bioremediation, polyphosphates, exopolysaccharides, polyhydroxybutyrate, polyhydroxyalkanoate, *Pseudomonas*

**SCIENTIFIC FIELD:** Biology

**SCIENTIFIC DISCIPLINE:** Applied microbiology

**UDC NUMBER:** [579.26:579.69]:[579.841.1:577.12] (043.3)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Kontaminacija životne sredine aromatičnim jedinjenjima</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Monoaromatični ugljovodonici .....	2
1.1.2. Poliaromatični ugljovodonici .....	4
1.1.3. Kompleksna zagađenja .....	5
<b>1.2. Bioremedijacija</b> .....	<b>6</b>
1.2.1. Biodiverzitet bakterija u sredinama kontaminiranim aromatičnim ugljovodonocima .....	8
1.2.2. Katabolizam mono- i poliaromatičnih ugljovodonika.....	10
1.2.2.1. Biodegradacija monoaromatičnih jedinjenja .....	11
1.2.2.2. Biodegradacija poliaromatičnih jedinjenja .....	12
1.2.2.3. Geni koji kodiraju enzime katabolizma aromatičnih ugljovodonika i njihova primena u praćenju bioremedijacije .....	14
<b>1.3. Mikrobiološki polimeri</b> .....	<b>15</b>
1.3.1. Polifosfati.....	15
1.3.2. Egzopolisaharidi .....	16
1.3.3. Polihidroksialkanoati .....	17
<b>1.4. Biotehnoška konverzija aromatičnih ugljovodonika u vrednu termoplastiku</b> .....	<b>18</b>
1.4.1. Polihidroksialkanoati (PHA) - svojstva i aplikacije .....	18
1.4.1.1. Biodegradabilnost.....	20
1.4.1.2. Biokompatibilnost .....	21
1.4.2. Biosinteza PHA .....	22
1.4.2.1. Biosinteza scl-PHA.....	22
1.4.2.2. Biosinteza mcl-PHA .....	24
1.4.3. Biotehnoška konverzija monoaromatičnih ugljovodonika u mcl-PHA.....	26
<b>2. CILJEVI</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1. Specifični ciljevi rada</b> .....	<b>31</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1. Uzorkovanje i hemijska analiza rečnog sedimenta</b> .....	<b>32</b>

3.1.1. Mikroanaliza uzoraka rečnog sedimenta .....	32
3.1.2. Određivanje prisustva teških metala u uzorcima sedimenata .....	33
<b>3.2. Izolovanje i gajenje bakterija iz uzoraka rečnog sedimenta .....</b>	<b>33</b>
3.2.1. Reagensi.....	33
3.2.2. Podloge za gajenje bakterija .....	34
3.2.3. Podloge za biohemijske testove.....	35
3.2.4. Izolovanje bakterija iz uzoraka rečnog sedimenta metodom direktne kultivacije i metodom predobogaćivanja uzorka naftalenom.....	36
3.2.4.1. <i>Selektivna izolacija Gram-pozitivnih bakterija</i> .....	36
3.2.4.2. <i>Selektivna izolacija Gram-negativnih bakterija</i> .....	36
<b>3.3. Karakterizacija bakterija izolovanih iz uzoraka rečnog sedimenta.....</b>	<b>37</b>
3.3.1. Sposobnost degradacije aromatičnih jedinjenja .....	37
3.3.2. Rast bakterija na različitim temperaturama .....	37
3.3.3. Rast bakterija u prisustvu teških metala .....	37
3.3.4. Rast bakterija u prisustvu antibiotika .....	38
3.3.5. Analiza akumulacije polifosfata .....	38
3.3.6. Analiza proizvodnje egzopolisaharida.....	39
3.3.7. Analiza akumulacije polihidroksialkanoata (PHA).....	39
3.3.7.1. <i>Akumulacija PHA iz monoaromatičnih jedinjenja</i> .....	40
3.3.7.2. <i>Akumulacija PHA iz poliaromatičnih jedinjenja</i> .....	40
<b>3.4. Molekularno biološke metode .....</b>	<b>41</b>
3.4.1. Izolovanje ukupne DNK iz bakterijskih izolata .....	41
3.4.2. Sintaza DNK u reakciji lančane polimerizacije.....	42
3.4.2.1. <i>Umnožavanje gena za 16S rRNK</i> .....	45
3.4.2.2. <i>Umnožavanje gena za katehol dioksidaze</i> .....	45
3.4.2.3. <i>Umnožavanje gena za PHA ketotiolazu (phaA), polimerazu (phaC) i transacilazu (phaG)</i> .....	46
3.4.3. Agarozna gel elektroforeza.....	46
3.4.4. Liganje DNK fragmenata .....	47
3.4.5. Priprema i transformacija <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija .....	47
3.4.6. Izolacija i restrikciona analiza plazmida .....	48
3.4.7. Sekvenciranje DNK.....	48

<b>3.5. Taksonomska identifikacija bakterija .....</b>	<b>49</b>
3.5.1. Bojenje po Gramu.....	49
3.5.2. Standardni biohemijski testovi za identifikaciju bakterija .....	49
3.5.3. Umnožavanje i sekvenciranje gena za 16S rRNK.....	51
3.5.4. Filogenetska analiza bakterija .....	52
<b>3.6. Analitičke metode.....</b>	<b>52</b>
3.6.1. Određivanje koncentracije proteina.....	52
3.6.2. PHA esej.....	52
3.6.3. Esej za utvrđivanje koncentracije azota.....	53
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka rečnog sedimenta.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2. Izolacija bakterija iz rečnog sedimenta.....</b>	<b>57</b>
4.2.1. Selektivna izolacija Gram-pozitivnih bakterija .....	57
4.2.2. Selektivna izolacija bakterija korišćenjem pretretmana naftalenom .....	58
<b>4.3. Katabolički potencijal za razgradnju aromatičnih ugljovodonika i     identifikacija izolovanih bakterija .....</b>	<b>58</b>
4.3.1. Sposobnost izolata da degraduju aromatična jedinjenja.....	58
4.3.2. Identifikacija izolata na osnovu sekvence gena za 16S rRNK i filogenetska analiza.....	61
4.3.3. Prisustvo gena za katehol 1,2- i katehol 2,3-dioksigenazu kod izabranih izolata.....	63
<b>4.4. Metabolička raznovrsnost Gram-pozitivnih izolata .....</b>	<b>65</b>
4.4.1. Rast Gram-pozitivnih izolata na različitim temperaturama i pri povišenim koncentracijama soli .....	65
4.4.2. Rast Gram-pozitivnih izolata u prisustvu povišenih koncentracija teških metala.....	65
4.4.3. Rast Gram-pozitivnih izolata u prisustvu antibiotika .....	66
4.4.4. Analiza akumulacije polifosfata kod Gram-pozitivnih izolata.....	68
4.4.5. Analiza proizvodnje egzopolisaharida kod Gram-pozitivnih izolata .....	69
4.4.6. Akumulacija polihidroksialkanoata kod Gram-pozitivnih izolata.....	70
<b>4.5. Metabolička raznovrsnost Gram-negativnih izolata .....</b>	<b>72</b>
4.5.1. Sposobnost rasta Gram-negativnih izolata na poli- i monoaromatičnim ugljovodonicima .....	72

4.5.2. Rast Gram-negativnih izolata u nepovoljnim sredinskim uslovima.....	73
4.5.3. Akumulacija polifosfata kod Gram-negativnih izolata .....	74
4.5.4. Akumulacija polihidroksialkanoata kod Gram-negativnih izolata .....	74
<b>4.6. <i>Pseudomonas</i> sp. TN301 – karakterizacija i potencijal u biotehnološkoj primeni proizvodnje biopolimera.....</b>	<b>77</b>
4.6.1. Osnovne biohemijske karakteristike izolata <i>Pseudomonas</i> sp. TN301 .....	77
4.6.2. Analiza sekvenci gena za akumulaciju mcl-PHA kod <i>Pseudomonas</i> sp. TN301 .....	78
4.6.3. Sposobnost <i>Pseudomonas</i> sp. TN301 da akumulira mcl-PHA iz monoaromatičnih ugljovodonika .....	79
4.6.4. Sposobnost <i>Pseudomonas</i> sp. TN301 da akumulira mcl-PHA iz poliaromatičnih ugljovodonika .....	80
4.6.4.1. Uticaj različitih rastvarača i surfaktanta Tween-a 80 na rast <i>Pseudomonas</i> sp. TN301 i akumulaciju mcl-PHA na naftalenu kao model supstratu .....	81
4.6.4.2. Rast <i>Pseudomonas</i> sp. TN301 na drugim poliaromatičnim jedinjenjima i njihovim smešama i akumulacija mcl-PHA .....	83
4.6.5. Poređenje dinamike akumulacije mcl-PHA iz glukoze i naftalena kod <i>Pseudomonas</i> sp. TN301 .....	85
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>87</b>
<b>5.1. Izolacija bakterija iz zagađenog rečnog sedimenta.....</b>	<b>87</b>
5.1.1. Mikroanaliza rečnog sedimenta i prisustvo teških metala.....	87
5.1.2. Strategija izolovanja bakterija .....	89
<b>5.2. Metabolička raznovrsnost TN izolata .....</b>	<b>92</b>
<b>5.3. Aplikativni potencijal TN izolata.....</b>	<b>94</b>
5.3.1. Bioremedijacija.....	94
5.3.2. Biokataliza .....	95
5.3.3. Proizvodnja biopolimera.....	96
5.3.3.1. Polifosfati.....	96
5.3.3.2. Egzopolisaharidi (EPS).....	97
5.3.3.3. Polihidroksialkanoati (PHA) .....	98
<b>5.4. Biotehnološka konverzija poliaromatičnih ugljovodonika u PHA.....</b>	<b>99</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>102</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>105</b>

<b>PRILOZI.....</b>	<b>120</b>
<b>Prilog I: Sekvence konzervisanih regiona gena za katehol 1,2-dioksigenazu (C12O) i katehol 2,3-dioksigenazu (C23O).....</b>	<b>121</b>
<b>Prilog II: Sekvence fragmenata gena za sintezu polihidroksialkanoata (<i>phaA</i>, <i>phaC</i>, <i>phaG</i>) .....</b>	<b>122</b>

**Skraćenice korišćene u ovom radu:**

<b>Ac CoA</b>	acetil koenzim A
<b>BTEX</b>	smeša benzena, toluena, etilbenzena i ksilena; <i>eng.</i> <u>B</u> enzene, <u>T</u> oluene, <u>E</u> thylbenzene, <u>X</u> ylene
<b>CFU</b>	<i>eng</i> <u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nits
<b>C12O</b>	katehol 1,2-dioksigenaza
<b>C23O</b>	katehol 2,3-dioksigenaza
<b>EPS</b>	egzopolisaharidi
<b>mcl-PHA</b>	polihidroksialkanoati lanaca srednjih dužina, <i>eng</i> <u>M</u> edium <u>C</u> hain <u>L</u> ength <u>P</u> olyhydroxyalkanoate
<b>PHA</b>	polihidroksialkanoat
<b>PHB</b>	polihidroksibutirat

## 1. UVOD

Kao posledica drastičnog porasta ljudskih aktivnosti (najpre industrijskih i poljoprivrednih), a u manjoj meri zahvaljujući i prirodnim procesima, došlo je do uvođenja velikog broja polutanata u sve ekosisteme. Polutantom se smatra bilo koja neželjena supstanca koja je uvedena u datu životnu sredinu, a neki od najčešćih primera su ugljovodonici petrohemijskog porekla, pre svega aromatični ugljovodonici i njihovi halogen- i nitro- suspsituisani derivati.

### 1.1. Kontaminacija životne sredine aromatičnim jedinjenjima

Aromatična jedinjenja su veoma pogodna za upotrebu u brojnim industrijama zbog toga što omogućavaju proizvodnju dugotrajnih i laganih materijala. Na primer, polistiren je po čvrstoći sličan čistom aluminijumu, ali se odlikuje znatno većom fleksibilnošću i nižom masom. Aromatična jedinjenja se koriste za pravljenje proizvoda kao što su odeća, farmaceutski proizvodi, kozmetika, kompjuteri, boje, komponente prevoznih sredstava, koji su svakodnevnoj širokoj upotrebi (APA, 2005). Najveći broj ovih jedinjenja se za industrijsku upotrebu dobija iz sirove nafte, dok se manji deo dobija preradom uglja. Korišćenje aromatičnih ugljovodonika u avio- i industriji automobila, kao i u industriji građevinskih i izolacionih materijala predstavlja energetski efikasan proces (APA, 2005).

Usled širokog spektra korišćenja, ali i neodgovornog ponašanja prema nastalom otpadu i nepoštovanja zakonskih regulativa, aromatična jedinjenja su veoma rasprostranjena u prirodi. Njihova široka rasprostranjenost u životnoj sredini predstavlja veliku ekološku opasnost s obzirom da je pokazano da se dugo zadržavaju u datoj sredini i da imaju toksična, mutagena i kancerogena svojstva (EPA, 2001; Haritash i Kaushik, 2009). Kontaminacija aromatičnim jedinjenjima se javlja u naseljenim mestima, poljoprivrednim površinama, u blizini važnih saobraćajnih puteva i u oblastima oko industrijskih objekata i rafinerija. Glavni izvori ovih toksičnih jedinjenja su rafinerije nafte, petrohemijske i farmaceutske industrije (Mrozik i Piotrowska-Seget, 2010; Seo *et al.*, 2009), a nalaze se i u brojnim potrošačkim proizvodima poput farbi i rastvarača



(APA, 2005; C&EN, 2005). U Srbiji je detektovana koncentracija aromatičnih jedinjenja viša od prosečne, ali se i dalje nalazi u okvirima propisanim od strane Evropske unije (Dugalic *et al.*, 2010; Pucarevic i Sekulic, 2004).

U grupu najčešćih zagađivača zemljišta i sedimenata spadaju monociklični (monoaromatični) i policiklični (poliaromatični) ugljovodonici.

### **1.1.1. Monoaromatični ugljovodonici**

Među monoaromatičnim ugljovodicima najčešći zagađivači su benzen, etil-benzen, toluen i *p*-, *o*-, i *m*-ksileni (BTEX, od *eng.* Benzene, Ethylbenzene, Toluene, Xylene; Slika 1) (Anderson i Lovley, 1997). Ova organska jedinjenja čine visok procenat sadržaja nafte i odlikuju se veoma velikom isparljivošću (Coates *et al.*, 2002). Smatraju se ozbiljnim zagađivačima zemljišta i voda, s obzirom da spadaju u grupu najbolje rastvornih aromatičnih jedinjenja, te se lako transportuju vodom (Chang *et al.*, 2001). S obzirom na znatan toksični i kancerogeni potencijal benzenovog prstena klasifikovani su kao polutanti od prioriteta (EPA, 2001). Benzen i toluen u spoljašnju sredinu primarno dospevaju procesima vezanim za proizvodnju i transport benzina. Značajna emisija ovih jedinjenja je takođe posledica ispuštanja efluenta metalne, tekstilne i drvne industrije. Pored izvora u industrijskim procesima, kontaminacije spoljašnje sredine ksilenima i etil-benzenom su povezane sa proizvodnjom pesticida, hemikalija, deterdženata i boja (Chakraborty i Coates, 2004).

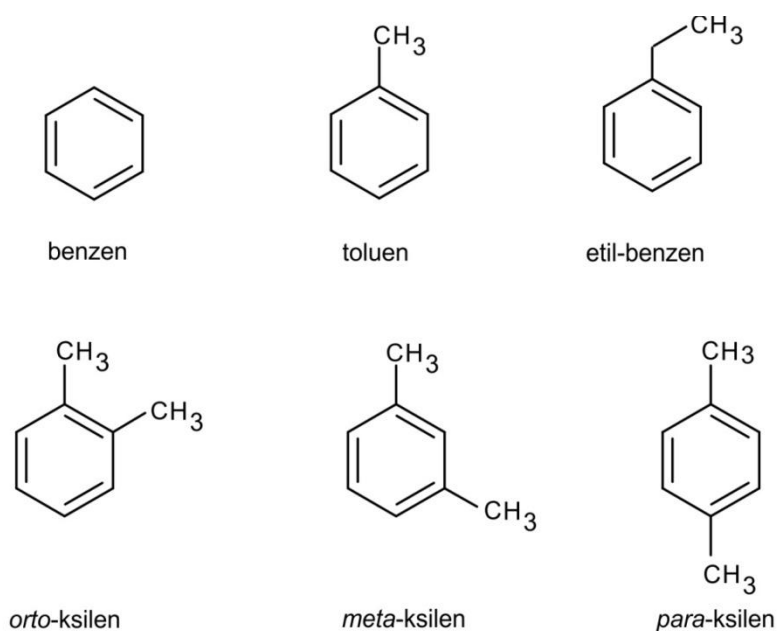
Benzen je najmanji i najstabilniji od svih aromatičnih jedinjenja. Toksičan postaje kada se prevede u neki od reaktivnih intermedijera, i kao takav izaziva aplastičnu anemiju, može dovesti do hromozomalnih aberacija i pojave kancera (Snyder *et al.*, 1993).

Etil-benzen se koristi kao razređivač i intermedijer u produkciji stirena u industriji plastike, gume i nafte. Dugotrajna izloženost etil-benzenu može dovesti do problema sa respiratornim sistemom, pojavom nesvestice i iritacije očiju, ali povezanost sa pojavom kancera do sada nije pokazana (EPA, 2012).

Toluen ili metil-benzen se nalazi u sastavu nafte i koristi se u proizvodnji trinitrotoluena (TNT-a) i drugim industrijama u kojima se najčešće koristi kao

razređivač. Toluen je vrlo isparljiv i podleže lako procesima biodegradacije od strane mikroorganizama tako da ne postoji tendencija da se njegova koncentracija u životnoj sredini povećava tokom vremena. Toluen je manje toksičan od benzena, ali izloženost velikim količinama može imati različite posledice na centralni nervni sistem poput umora, pospanosti, gubitka svesti (EPA, 2012).

Kada se govori o ksilenu uvek se misli na grupu od tri strukturalna izomera dimetilbenzena: *o*-ksilen, *m*-ksilen i *p*-ksilen. Često se koristi u industriji kao razređivač i to kao zamena benzenu koji je toksičniji. Izlaganje većim količinama ksilena ima štetne efekte na nervni sistem i dovodi do pojave glavobolja, nesvestica, poremećaja u ravnoteži (EPA, 2012).



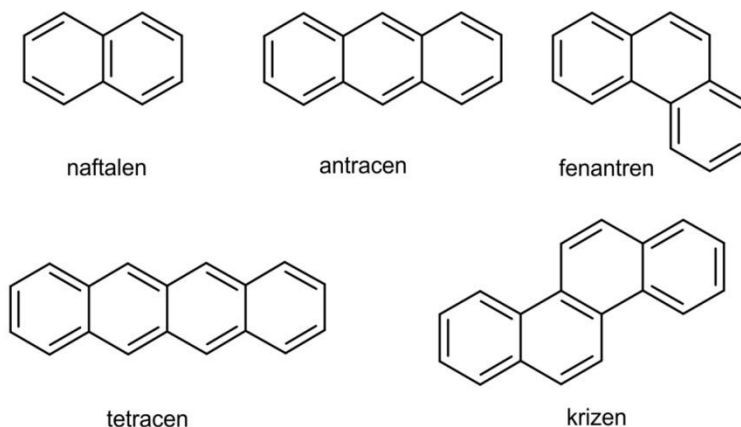
**Slika 1.** Prikaz strukturnih formula BTEX jedinjenja, najčešćih monoaromatičnih polutanata.

Pored BTEX grupe jedinjenja, stiren se veoma često javlja kao polutant. Koristi se u hemijskoj industriji kao polazni materijal za sintezu polimera, ali i kao rastvarač prilikom proizvodnje drugih polimera, te je prisutan u industrijskim efluentima. Takođe se smatra da ima kancerogeni potencijal (EPA, 2012).

U hemijskoj industriji se intenzivno koriste i bifenil, koji ima umereno toksično dejstvo i halogen-supstituvisani monoaromatični ugljovodonici, poput hlorobenzena i nitrobenzena, koji takođe ispoljavaju toksičan efekat (EPA, 2012).

### 1.1.2. Poliaromatični ugljovodonici

Poseban ekološki problem predstavljaju poliaromatični ugljovodonici s obzirom na to da su hidrofobni, slabo isparljivi i imaju visok afinitet za zemljište i rečni sediment (McElroy *et al.*, 1989). Karakteristika strukture poliaromata jeste negativna energija rezonancije što ih čini termodinamički veoma stabilnim molekulima (Slika 2). Imaju visoke tačke topljenja i ključanja i veoma slabu rastvorljivost u vodi (WHO, 1998). Dugotrajan opstanak poliaromatičnih jedinjenja u životnoj sredini je posledica njihove nepolarosti, slabe rastvorljivosti u vodi i čvrste interakcije sa česticama zemljišta. Sa povećanjem broja prstenova rastu i hidrofobnost, toksičnost i otpornost ovih jedinjenja. Prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 1998) neki od poliaromata imaju različite štetne efekte na ljudsko zdravlje: mogu uticati na eritropoezu i pokazano je da naftalen izaziva anemiju; benzo[a]piren i fluoranten imaju imunotoksični potencijal; za mnoge poliaromate je pokazan mutageni efekat i jedini koji sigurno nisu mutageni su naftalen, fluoren i antracen. Takođe, za 17 poliaromatičnih jedinjenja je pokazan kancerogeni efekat, 8 je potencijalno kancerogeno, dok se nekancerogenim smatraju fluoren, antracen, piren, 1-metilfenantren, trifenilen, perilen, antantren i benzo[ghi]perilen.



**Slika 2.** Prikaz strukturnih formula najčešćih poliaromatičnih zagađivača.

Izvori poliaromata u prirodi mogu biti prirodni (biosintetski i geohemijski) i antropogeni (Blumer, 1976; Mueller *et al.*, 1996). S obzirom na to da je doprinos biosintetskih i geohemijskih procesa relativno konstantan i ne tako veliki, ovi procesi se ne smatraju ekološki opasnim. Sa druge strane, antropogeni uticaj na povećanje

koncentracije poliaromata u životnoj sredini je veoma zabrinjavajuć. Poliaromati predstavljaju sastavni deo sirove nafte, uglja, čađi i u životnu sredinu dospevaju sagorevanjem fosilnih goriva, automobilskim izduvnim gasovima, spaljivanjem otpada itd. (Peng *et al.*, 2008).

Naftalen predstavlja najčešći mikrozagađivač vode za piće. Brojni eksperimenti su pokazali toksičnost ovog jedinjenja. Kovalentno se vezuje za molekule u jetri, bubrezima i plućima koji pospešuju njegovu toksičnost. Takođe je inhibitor mitohondrijalnog procesa disanja. Akutno trovanje naftalenom kod čoveka može dovesti do razvoja anemije (EPA, 2012).

Fenantren je poznat kao blagi alergen i mutagen za bakterije u specijalnim uslovima. Slab je inducer razmene sestrinskih hromatida i potencijalni inhibitor interćelijske komunikacije. Krizen spada u grupu policikličnih ugljovodonika visoke molekulske mase, sadrži četiri fuzionisana benzenova prstena i nalazi se na spisku prioriternih polutanata sa kancerogenim dejstvom (EPA, 2001).

### **1.1.3. Kompleksna zagađenja**

Zemljište i rečni sedimenti predstavljaju najčešće depoe kompleksnih kontaminacija. Negativni i ireverzibilni efekat kompleksnog zagađenja se ogleda u izmeni fizičkih i hemijskih osobina zemljišta, odnosno sedimenta što neminovno vodi poremećaju funkcije ovih ekosistema (Andreoni i Gianfreda, 2007). Petrohemijski efluenti, kao primer kompleksnog zagađivača, pored aromatičnih ugljovodonika sadrže i alifatične ugljovodonike, visoke količine fosfora, azota, sumpora, i metala (Botalova, 2010). Istraživanja su pokazala da čak 40% mesta za odlaganje hazardnog otpada u SAD su ko-kontaminirana organskim materijalom i metalima (Sandrin i Maier, 2003). Najčešće vrste teških metala koje se mogu naći u ovakvim staništima su arsen, barijum, kadmijum, hrom, olovo, živa, nikl i cink (Ahmed *et al.*, 2011; Conrad *et al.*, 2007; Sandrin i Maier, 2003). Metali mogu biti prisutni u različitim fizičkim i hemijskim formama: mogu predstavljati zasebnu čvrstu fazu, mogu biti adsorbovani za čestice zemlje ili se mogu nalaziti u formi jonskih rastvora. Takođe, fizička i hemijska svojstva samog zemljišta, odnosno sedimenta, kao što su pH, jonska jačina vodene faze,

kao i sadržaj organske materije i gline utiču na fizička i hemijska svojstva datog metala (Sandrin i Maier, 2003).

Mnoge sredine zagađene ugljovodonicima se karakterišu i povišenim ili niskim temperaturama, pH vrednošću pomerenom ka kiselim ili alkalnim uslovima i visokim koncentracijama soli (Margesin i Schinner, 2001a). Promena temperature utiče na povećanje, odnosno smanjenje rastvorljivosti alifatičnih i poliaromatičnih ugljovodonika, a samim tim i na distribuciju i stopu difuzije ovih jedinjenja (Whitehouse, 1984). Neutralna do blago kisela sredina (pH 5-7) pomaže mobilnost aromatičnih jedinjenja, dok pomeranje ka kiselijim i alkalnim pH vrednostima dovodi do smanjenja dostupnosti ovih jedinjenja za degradaciju. Povišene koncentracije soli u zagađenim sredinama dovode do smanjenja rastvorljivosti aromatičnih ugljovodonika (Whitehouse, 1984), pa samim tim i do povećanja perzistentnosti ovih jedinjenja.

## **1.2. Bioremedijacija**

Kao odgovor na sve duži spisak polutanata koji narušavaju prirodne ekosisteme razvijene su brojne fizičke i hemijske metode za uklanjanje ksenobiotika iz životne sredine. Ove brojne metode se obično moraju kombinovano koristiti da bi bile što efikasnije (Farhadian *et al.*, 2008). Pored toga što su fizičko-hemijske tehnike remedijacije veoma skupe, veliki problem predstavlja i to što njihova upotreba često dovodi do stvaranja intermedijernih jedinjenja sa potencijalno toksičnijim efektom od polaznih polutanata. Upotreba sposobnosti mikroorganizama da koriste širok spektar jedinjenja kao izvor ugljenika i energije u svrhu prečišćavanja polutanata se označava kao bioremedijacija i predstavlja obećavajuću, relativno efikasnu i veoma isplativu tehnologiju (Megharaj *et al.*, 2011). S obzirom na dugačku listu različitih zagađivača, ali i u skladu sa postojanjem velikog broja mikroorganizama i njihov diverzitet (Curtis *et al.*, 2002), postoji stalna potreba za izolacijom novih mikroorganizama sa sposobnošću degradacije polutanata, kao razumevanjem genetike i biohemije procesa biodegradacije. Takođe, pored potrage za samim organizmima koji bi se mogli koristiti u bioremedijaciji, napredak u oblasti metagenomike i nastojanje da se sekvencira

što veći broj genoma, otvorili su vrata potrazi za samim genima čiji produkti imaju ulogu u degradaciji polutanata (Golyshin *et al.*, 2003; Zhao i Poh, 2008).

Bioremedijacija, čija definicija pored mikroorganizama podrazumeva i upotrebu biljaka ili njihovih enzima za tretiranje zagađenih staništa ima pored velikog potencijala i neke ograničavajuće faktore. Naime, iako najveći broj ugljovodonika podleže biodegradaciji, postoje brojni faktori koji utiču na efikasnost degradacije od strane neke mikrobiološke populacije. Jedan od tih faktora je dostupnost datog polutanta. Po ulasku u zemljište, ugljovodonici interaguju sa česticama zemljišta, sa mineralnim i organskim komponentama i što se dato jedinjenje odlikuje većim stepenom hidrofobnosti to je interakcija čvršća. Stoga, potencijal desorpcije, odnosno otpuštanja polutanta utiče na njegovu podložnost biodegradaciji (Megharaj *et al.*, 2011). Takođe, pored karakteristika samog polutanta, efikasnost procesa bioremedijacije zavisi i od prisutne mikrobiološke zajednice i uslova koji vladaju u datoj sredini, kao što su zasićenost kiseonikom, temperatura i vlažnost. Dostupnost nutrijenata, pre svega azota i fosfora ima veliki značaj za efikasnost bioremedijacije (Van Hamme *et al.*, 2003). Problemi u vezi sa efikasnošću bioremedijacije se mogu prevazići odabirom odgovarajuće strategije (Andreoni i Gianfreda, 2007; Farhadian *et al.*, 2008). Naime, ukoliko u datoj sredini vladaju povoljni uslovi za bioremedijaciju dolazi do *prirodne atenuacije*, odnosno procesa bioremedijacije bez spoljašnje intervencije koji se oslanja na prirodne uslove i sposobnosti zemljišnih mikroorganizama koji ga naseljavaju. Ukoliko u datoj sredini vladaju uslovi ograničenosti nutrijenata može se koristiti *biostimulacija* koja podrazumeva upotrebu autohtonih populacija mikroorganizama uz dodavanje nutrijenata kako bi se pospešio rast mikroorganizama. Treći tip bioremedijacije podrazumeva uvođenje egzogenih mikroorganizama, koji nisu karakteristični za datu sredinu, ali sa sposobnošću detoksikacije određenog zagađivača. Ovaj proces se označava kao *bioaugmentacija* i ponekada podrazumeva upotrebu genetički modifikivanih mikroorganizama.

S obzirom na brojne faktore koji utiču na uspešnost bioremedijacije, prirodna atenuacija ima ograničene kapacitete. Zato se češće pribegava bioaugmentaciji i biostimulaciji. Da bi se povećala dostupnost nutrijenata i na taj način omogućio

bolji rast razgrađivačima u zagađenim sredinama mogu se dodavati fertilizatori (Atlas i Cerniglia, 1995).

Kao jedna od strategija za povećanje biodostupnosti aromatičnih ugljovodonika koristi se i dodavanje surfaktanata u kontaminirane sredine. Surfaktant deluje tako što smanjuje površinsku tenziju, vrši solubilizaciju hidrofobnog aromatičnog jedinjenja i prevodi jedinjenje iz forme vezane za čestice zemljišta u pseudo-rastvorenu fazu (Laha *et al.*, 2009).

Kao što je već pomenuto, u zagađenim sredinama je obično prisutan veći broj različitih polutanata (odjeljak 1.1.3.). Metali, soli, temperatura i pH sredine su faktori koji imaju značajan efekat na efikasnost bioremedijacije. Prisustvo teških metala može inhibirati rast bakterija preko interakcije sa brojnim metaboličkim procesima (Sandrin i Maier, 2003). Toksični efekat se najčešće ispoljava kroz interakciju metala sa enzimima bilo putem kompeticije sa esencijalnim dvovalentnim katjonima koji imaju ulogu kofaktora ili reakcijom sa sulfhidrilnim grupama iz proteina. Problem inhibitornog efekta metala na proces bioremedijacije se može prevazići upotrebom helatirajućih agenasa, poput EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina) ili korišćenjem organizama koji su tolerantni, odnosno rezistentni na date metale. Iako je pokazano da je bioremedijacija favorizovana u uslovima neutralnog pH, ona se može odigravati i u kiselim pH uslovima. Acidofilne bakterije su posebno važne za proces bioremedijacije u kiselim sredinama jer su veoma često rezistentne na teške metale (Norris i Johnson, 1998). Upotrebom mikroorganizama sa sposobnošću rasta u prisustvu povišenih koncentracija soli je uspešno transformisan i mineralizovan veliki broj organskih zagađivača (Margesin i Schinner, 2001b).

### **1.2.1. Biodiverzitet bakterija u sredinama kontaminiranim aromatičnim ugljovodonicima**

S obzirom na broj i rasprostranjenost bakterija, odnosno njihovu biomasu u odnosu na druge organizme, bakterije predstavljaju dominantne organizme u zagađenim ekosistemima (Curtis *et al.*, 2002). Stoga nije iznenađujuća intenzivna potraga za novim pojedinačnim bakterijama, odnosno bakterijskim populacijama upravo u

kontaminiranim sredinama, koje bi mogle biti korišćene u bioremedijaciji. Pokazano je da u zagađenim sredinama dolazi do smanjenja diverziteta bakterijskih populacija, a istovremeno se dešava „obogaćivanje“ date sredine specifičnim populacijama (Juck *et al.*, 2000; Roling *et al.*, 2002). Brojne studije bakterijskog diverziteta u zagađenim i nezagađenim staništima su pokazale da u nezagađenim ekosistemima organizmi sa sposobnošću degradacije petrohemijskih ugljovodonika, poput pripadnika roda *Pseudomonas* čine manje od 0.1% populacije bakterija koje se mogu kultivisati, dok u kontaminiranim staništima pseudomonade mogu činiti i do 100% vijabilne populacije bakterija (Atlas, 1981). Bakterije koje se na prisustvo polutanata prilagođavaju intenzivnom proliferacijom, kao što je slučaj sa pseudomonadama označavaju se kao organizmi sa r-strategijom (povećana reprodukcija). Nasuprot njima se nalaze organizmi čija je strategija iskorišćavanje prisutnog polutanta, poput pripadnika rodova *Rhodococcus* i *Mycobacterium* i oni predstavljaju stabilniju populaciju bakterija u zagađenoj sredini (Atlas i Bartha, 1998).

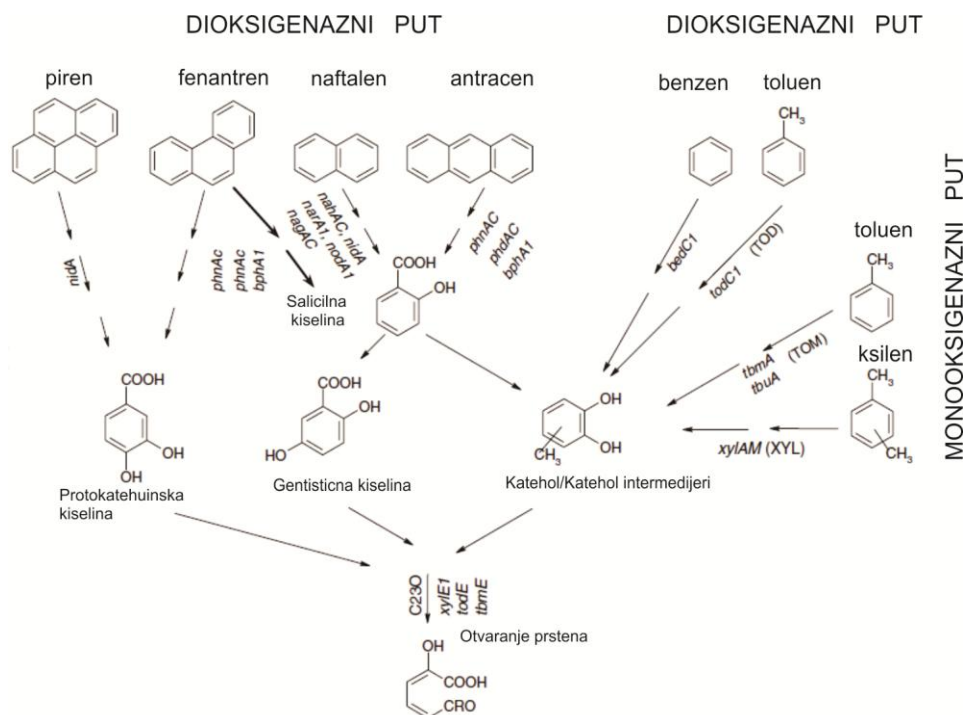
Bakterije sa sposobnošću degradacije petrohemijskih ugljovodonika su po prvi put izolovane pre gotovo jednog veka, i do danas je izolovan i opisan veliki broj razgrađivača aromatičnih ugljovodonika koji uglavnom pripadaju rodu *Pseudomonas* i njemu sličnim rodovima (Seo *et al.*, 2009). U zemljištima kontaminiranim monoaromatičnim ugljovodonicima, pre svega BTEX grupom jedinjenja, većinu bakterija koje se mogu kultivisati čine *Proteobacteria*, najvećim delom *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* i *Sphingomonas* i *Actinobacteria* (pre svega *Rhodococcus* i *Arthrobacter*) (Cavalca *et al.*, 2004; Hendrickx *et al.*, 2006; Stapleton *et al.*, 2000). Izgleda da je proliferacija bakterija sa sposobnošću degradacije jedinjenja iz BTEX grupe glavna karakteristika adaptacije bakterija u zemljištu kontaminiranom ovim jedinjenjima. U zemljištima kontaminiranim poliaromatičnim ugljovodonicima pored dominantne populacije bakterija iz roda *Pseudomonas*, selektivno su stimulisane i Gram-pozitivne *Mycobacterium*, *Arthrobacter* i *Nocardia* (Daane *et al.*, 2001; Kanaly i Harayama, 2000). *Mycobacteria* predstavljaju odlične kandidate za bioremedijaciju zemljišta kontaminiranog poliaromatičnim ugljovodonicima s obzirom na to da se odlikuju lipofilnim površinama pogodnim za desorpciju poliaromatičnog jedinjenja sa čestica zemljišta i pokazale su se kao potentni razgrađivači poliaromata sa pet benzenovih prstenova (Bogan *et al.*, 2003).



Na osnovu metoda direktne kultivacije bakterija iz uzoraka zagađenih staništa stiče se uvid da je diverzitet bakterija prilično ograničen. Međutim, zahvaljujući upotrebi metagenomske analize ovakvih uzoraka došlo se do indikacije da je u njima prisutan veći bakterijski diverzitet i da predstavljaju bogat izvor organizama sa sposobnošću degradacije polutanata (de Vasconcellos *et al.*, 2010), posebno u pogledu prisustva Gram-pozitivnih bakterija koje su zbog svojih fizioloških karakteristika dobri kandidati za upotrebu u procesu bioremedijacije (Edlund i Jansson, 2006; Gontang *et al.*, 2007).

### **1.2.2. Katabolizam mono- i poliaromatičnih ugljovodonika**

Bakterijska degradacija mono- i poliaromatičnih jedinjenja se može odvijati i pod aerobnim i pod anaerobnim uslovima (Chakraborty i Coates, 2004; Gibson i Parales, 2000). U aerobnim uslovima se koristi molekularni kiseonik kako za aktivaciju aromatičnog prstena i njegovo otvaranje, tako i kao terminalni akceptor elektrona u procesu biodegradacije (Andreoni i Gianfreda, 2007). Pri aerobnoj degradaciji strukturno različita jedinjenja se razgrađuju kroz različite kataboličke puteve koji konvergiraju ka svega nekoliko centralnih intermedijera, poput katehola, protokatehuata, gentisata, homoprotokatehuata, homogentisata, hidrokvinona, ili hidroksikvinola koji se dalje kanališu u centralne metaboličke puteve ćelije (Slika 3). Nije redak slučaj da u zagađenim sredinama vladaju anoksični uslovi. Tada biodegradaciju vrše striktni ili fakultativni anaerobi, koji koriste alternativne akceptore elektrona poput nitrata, sulfata, feri soli, ili CO<sub>2</sub> (Diaz, 2004). Smatra se da je aerobni proces degradacije aromatičnih jedinjenja efikasniji (Andreoni i Gianfreda, 2007).



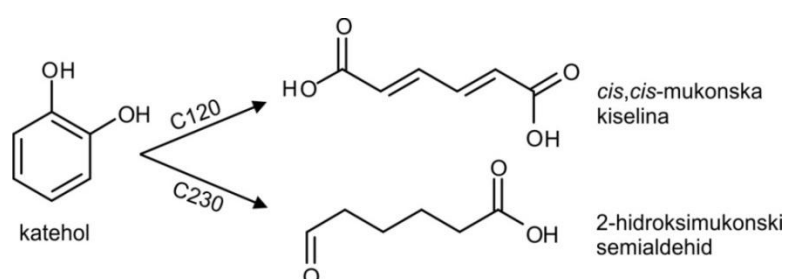
**Slika 3.** Shematski prikaz puteva biodegradacije aromatičnih ugljovodonika (Andreoni i Gianfreda, 2007).

### 1.2.2.1. Biodegradacija monoaromatičnih jedinjenja

Monoaromatična jedinjenja, poput BTEX grupe grupe jedinjenja podležu direktnom napadu na aromatični prsten uz učešće enzima mono- ili dioksigenaza (Slika 3). Okarakterisan je veliki broj oksigenaza koje učestvuju u inicijalnoj oksidaciji monoaromatičnih jedinjenja i pokazano je da ovi enzimi predstavljaju pravu paradigmu metaboličkog diverziteta. Na primer, toluen 4-monooksigenaza iz *Pseudomonas mendocina* KR1 koja dovodi do konverzije toluena u *p*-krezol takođe katalizuje epoksidaciju alkena (McClay *et al.*, 2000). Toluen dioksigenaza iz *P. putida* F1 pored oksidacije toluena svoje dejstvo ispoljava i na trihloretlen (TCE), veoma perzistentan i toksičan polutant (Liu *et al.*, 2012), dok ksilen monooksigenaza iz *P. putida* mt-2 pored oksidacije jedne metil grupe toluena i ksilena vrši oksidaciju pseudokumena i odgovarajućih alkohola i aldehida (Buhler *et al.*, 2000).

Delovanjem inicijalnih oksigenaza u slučaju monoaromatičnih jedinjenja nastaju katehol ili njegovi derivati. Ova intermedijerna jedinjenja su supstrati za enzime koji vrše otvaranje aromatičnog prstena uz upotrebu molekularnog kiseonika. Aromatični

prsten se može otvarati između dve hidroksilne grupe (*orto* put degradacije katalizovan intradiolnim dioksigenazama, odnosno katehol 1,2-dioksigenazom) ili proksimalno u odnosu na jednu od hidroksilnih grupa (*meta* put degradacije katalizovan ekstradiolnim dioksigenazama, odnosno katehol 2,3-dioksigenazom). Katehol dioksigenaze predstavljaju bakterijske enzime koji sadrže Fe u svom katalitičkom centru i njihova aktivnost u potpunosti zavisi od prisustva ovog metalnog jona (Broderick, 1999). Intradiolne dioksigenaze u katalitičkom centru sadrže  $\text{Fe}^{3+}$  jon, dok je aktivnost ekstradiolnih dioksigenaza bazirana na prisustvu  $\text{Fe}^{2+}$  jona. Ova razlika u građi katalitičkog centra katehol dioksigenaza je odgovorna za različitu regioselektivnost reakcija katalizovanih C12O i C23O enzimima (Broderick, 1999).



**Slika 4.** Shematski prikaz aktivnosti enzima katehol 1,2-dioksigenaze (C12O, *orto* put degradacije) i katehol 2,3-dioksigenaze (C23O, *meta* put degradacije).

U *orto* putu degradacije nastaje *cis,cis*-mukonska kiselina, koja se dalje razlaže do acetil koenzima A (Ac CoA) i sukcinata koji ulaze u Krebsov ciklus (Dagley *et al.*, 1960). U *meta* putu degradacije delovanjem katehol 2,3-dioksigenaza nastaje 2-hidroksimukonski semialdehid koji se konvertuje do piruvata i acetaldehida (Slika 4). Nastali Ac CoA, odnosno piruvat i acetaldehid se dalje uključuju u Krebsov ciklus.

#### 1.2.2.2. Biodegradacija poliaromatičnih jedinjenja

Kada se razmatra biodegradacija poliaromatičnih jedinjenja moraju se u obzir uzeti izrazito hidrofobna priroda ovih jedinjenja kao i visok sorpcioni kapacitet. Efikasnost biodegradacije poliaromatičnih jedinjenja zavisi i od broja kondenzovanih benzenovih prstenova. Generalno, poliaromatična jedinjenja manje molekulske mase se brže degraduju od slabije rastvorljivih poliaromata sa preko pet prstenova u svojoj strukturi (Andreoni i Gianfreda, 2007). Bakterijski izolati najčešće pokazuju sposobnost degradacije veoma uskog opsega poliaromatičnih jedinjenja (Habe i Omori, 2003), i

kao i kod monoaromatičnih jedinjenja u slučaju prisustva smeše poliaromatičnih ugljovodonika neophodno je prisustvo čitavog bakterijskog konzorcijuma, odnosno sojeva sa komplementarnim kapacitetima za degradaciju aromatičnih jedinjenja (Bouchez *et al.*, 1995). Bakterijski katabolizam poliaromatičnih jedinjenja započinje obično inicijalnom ugradnjom molekularnog kiseonika procesom katalizovanim trokomponentnim dioksidogenaznim sistemom, pri čemu nastaje *cis*-dihidrodiol. Ovaj inicijalni korak karakterističan je za sva poliaromatična jedinjenja. Nastali dihidrodiol podleže procesu rearomatizacije, formiraju se dihidroksilovani intermedijeri poput katehola, gentisata i protokatehuata (Slika 3) na koje deluju dioksidogenaze, dolazi do otvaranja prstena i formiranja intermedijera koji ulaze u ciklus trikarbonskih kiselina (Sudip *et al.*, 2002).

Najveći deo informacija vezanih za aerobni metabolizam poliaromatičnih ugljovodonika je došao iz analiza kataboličkog plazmida NAH7 iz *P. putida* G7 (Dunn i Gunsalus, 1973). U ovom dobro okarakterisanom sistemu postoje dva operona koja kodiraju enzime gornjeg puta (za konverziju naftalena u salicilat) i enzime donjeg puta (konverzija salicilata u katehol) degradacije naftalena. Regulacija aktivnosti oba operona je pod kontrolom gena smeštenih u trećem operonu koji je indukovano salicilatom. Prvi enzim koji učestvuje u degradaciji naftalena je naftalen dioksidogenaza, koja ima sposobnost oksidacije i drugih supstrata, poput fenantrena i antracena (Menn *et al.*, 1993). Takođe, metabolizam naftalena se ne vrši uvek preko katehola, već može ići i preko gentisata, kao što je to slučaj kod *Rhodococcus* sp. B4 (Grund *et al.*, 1992). Kod Gram-negativnih bakterija su relativno skoro otkriveni putevi degradacije poliaromatičnih ugljovodonika koji uključuju nove intermedijerne metabolite (Nayak *et al.*, 2011; Samanta *et al.*, 1999).

Interesantan podatak je proizašao iz analize metabolizma aromatičnih ugljovodonika kod *Sphingomonas aromaticivorans* F199. Naime, pokazano je da se mineralizacija naftalena i toluena povećava ukoliko su oba supstrata istovremeno prisutna (Romine *et al.*, 1999).

### **1.2.2.3. Geni koji kodiraju enzime katabolizma aromatičnih ugljovodonika i njihova primena u praćenju bioremedijacije**

O genima koji kodiraju centralne enzime katabolizma aromatičnih jedinjenja se dosta zna. Filogenetske analize kako aminokiselinskih sekvenci ovih enzima, tako i odgovarajućih nukleotidnih sekvenci su pokazale da mono- i dioksidaze čine dve velike grupe različitih familija gena (Eltis i Bolin, 1996). S obzirom na to da je veliki broj gena za aromatične oksidaze lociran na plazmidima, njihov stepen konzervisanosti, odnosno evolucija su pod jakim uticajem selektivnog pritiska, odnosno prisustva datog polutanta u životnoj sredini (Williams *et al.*, 2002). Velike subjediniice aromatičnih dioksidaza sa istom supstratnom specifičnošću generalno pokazuju srodnost, ali je evidentno postojanje različitih tipova i u ovakvim grupama. Na primer, poređenje sekvenci konzervisanih regiona gena za toluen monooksidaze pokazalo je postojanje barem dva tipa enzima koji se razlikuju prema svojoj aktivnosti: R tip kom pripadaju monooksidaze koje vrše hidroksilaciju aromatičnog prstena, i T tip kom pripadaju monooksidaze koje vrše hidroksilaciju alkil grupe (Baldwin *et al.*, 2003). U okviru R tipa toluen monooksidaza postoje bar tri familije enzima. Katehol dioksidaze (C12O, C23O) takođe pokazuju veliku međusobnu raznovrsnost. Generalno, filogenija gena za C23O je bolje okarakterisana. Poređenjem 35 sekvenci C23O enzima pokazano je da konzervisani redioni uključuju mesto vezivanja metalnog jona i nekoliko katalitički esencijalnih rezidua aktivnog mesta (Eltis i Bolin, 1996a). Evolutivne analize ukazuju na to da je od jednog gena za ekstradiol dioksidazu kroz proces duplikacije i rekombinacije nastalo nekoliko familija C23O enzima, od kojih su neke bazirane na supstratnoj specifičnosti (Eltis i Bolin, 1996). Kod nekih C23O enzima domeni pokazuju različite filogenetske odnose, što je indikacija postojanja rekombinacija gena koji su kodirali različite dioksidaze (Eltis i Bolin, 1996). Geni za katehol dioksidaze mogu biti locirani na hromozomu i na plazmidima, pri čemu je pokazano da se hromozomalno kodirane katehol dioksidaze mogu naći kod nekih sojeva roda *Pseudomonas* sa sposobnošću degradacije benzoata i hidroksibenzoata, dok katehol dioksidaze kodirane plazmidnim genima učestvuju u degradaciji halogen supstituisanih aromatičnih jedinjenja (Broderick, 1999).

Sa porastom broja dostupnih sekvenci gena za aromatične dioksidaze omogućeno je dizajniranje prajmera pomoću kojih bi se mogla vršiti procena biodegradacije polutanata, proširiti ekološke studije kontaminiranih sredina i olakšati procena upotrebljenih tehnologija remedijacije na autohtone mikrobiološke populacije (Baldwin *et al.*, 2003). Naime, pokazano je da postoji korelacija između prisustva polutanta i većeg broja kopija gena čiji produkti učestvuju u razgradnji datog polutanta (Mesarch *et al.*, 2000). Pored mogućnosti praćenja efikasnosti bioremedijacije upotreba tehnika poput qPCR (Real Time PCR) može pružiti uvid u uloge trenutno poznatih kataboličkih puteva u procesu bioremedijacije na samom mestu dešavanja (Baldwin *et al.*, 2003).

### **1.3. Mikrobiološki polimeri**

S obzirom na to da se u zagađenim sredinama nalaze mešoviti polutanti, bakterije koje ih naseljavaju su se adaptirale na teške uslove života kroz ispoljavanje različitih metaboličkih osobina. Proces bioremedijacije mešovito zagađenih sredina je jedna od potencijalnih aplikacija bakterija izolovanih iz ovih staništa. U uslovima stresa može doći do akumulacije biopolimera čija je jedna od uloga adaptacija na stres. S druge strane, neki od biopolimera mogu imati i važnu industrijsku primenu, te se na ovaj način dolazi do nove mogućnosti za iskorišćavanje i uklanjanje polutanata.

#### **1.3.1. Polifosfati**

Polifosfati su veoma rasprostranjeni bakterijski polimeri koji su izgrađeni od linearnih lanaca fosfatnih ostataka međusobno povezanih visokoenergetskim fosfoanhidridnim vezama (Dawes i Senior, 1973). Prva izolovana bakterija sa sposobnošću akumulacije polifosfata bila je *Acinetobacter* (Fuhs i Chen, 1975), a danas se zna da sve ćelije sadrže polifosfate što ukazuje na njihovu esencijalnu ulogu (Kornberg *et al.*, 1999). Međutim, uprkos tome što veliki broj bakterija ima sposobnost akumulacije ovog biopolimera, njegova tačna uloga nije poznata. Pokazane su brojne fiziološke uloge polifosfata, poput skladištenja energije i fosfata neophodnih za veliki broj metaboličkih procesa, uloga helatirajućeg agensa dvovalentnih katjona, pufertisanje alkalne sredine, inhibicija degradacije RNK molekula (Mullan *et al.*, 2002). Veoma je važna uloga

polifosfata u fiziološkoj adaptaciji bakterijskih ćelija tokom rasta i razvića, kao i u odgovoru na stres prouzrokovan disbalansom nutrijenata, kao i druge sredinske stresove (Kornberg *et al.*, 1999).

Sojevi sa sposobnošću akumulacije polifosfata imaju biotehnološku aplikaciju u uklanjanju fosfata pre svega iz prerađenih otpadnih voda (Seviour *et al.*, 2003). Fabrike za preradu otpadnih voda su glavni izvor drastično povećanih koncentracija fosfora (P) i azota (N) u vodenim ekosistemima. Poslednjih 30 godina se radi na implementaciji i poboljšanju procesa uklanjanja P iz vodenih sredina upotrebom bakterija sa sposobnošću akumulacije polifosfata. Podsticanje akumulacije polifosfata u znatno većoj meri od količine potrebne za održavanje normalnih metaboličkih procesa se označava kao pojačano biološko uklanjanje P (EBPR, *eng.* Enhanced Biological Phosphorus Removal) (Seviour *et al.*, 2003). Iako je već dugo poznat, i dalje se radi na rasvetljavanju metaboličkih osnova ovog procesa kako bi se mogao efikasnije koristiti.

### **1.3.2. Egzopolisaharidi**

Egzopolisaharidi (EPS) su ekstracelularni bakterijski polimeri izgrađeni prvenstveno od polisaharida, a u određenom procentu i proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Osnovne funkcije ovih biopolimera su formiranje biofilmova i zaštita ćelija od sredinskog stresa i isušivanja (Vu *et al.*, 2009). Formiranje biofilmova je karakteristično za veliki broj bakterija i veoma je važno za preživljavanje bakterijskih populacija. Često je ova sposobnost asocirana sa patogenim mikroorganizmima i pokazano je da iako sposobnost formiranja biofilma nije indikator virulentnosti sam po sebi, biofilmovi pospešuju preživljavanje patogena u spoljašnjoj sredini i u domaćinu (Hall-Stoodley i Stoodley, 2005). Zajednička osobina biofilmova, bez obzira da li se radi o patogenim ili nepatogenim bakterijama jeste visok sadržaj EPS-a, koji mogu činiti čak 50-90% organske materije biofilmova (Vu *et al.*, 2009).

Sve veća pažnja je usmerena ka izučavanju i proizvodnji EPS-a s obzirom na njihovu bioaktivnu ulogu i širok opseg potencijalnih komercijalnih aplikacija kao što su upotreba EPS-a kao aditiva hrani (ksantan, alginat, dekstran), zatim kontrola

viskoznosti, flokulacija (Sutherland, 1982). Potencijalna biotehnoška aplikacija bakterija sa sposobnošću proizvodnje biofilmova je i bioremedijacija. Naime, pokazano je da je bioremedijacija posredovana organizmima sa sposobnošću formiranja biofilmova efikasnija u odnosu na bioremedijaciju sa planktonskim bakterijama (Vu *et al.*, 2009). Kao što je već rečeno, biofilmovi omogućavaju bolju adaptaciju na različite životne sredine, samim tim i bolje preživljavanje organizama. U okviru biofilmova se održavaju optimalni pH, koncentracije soli i nutrijenata, redoks potencijal, što sve omogućava bolji proces mineralizacije polutanata (Singh *et al.*, 2006). Veoma važna uloga EPS-a je i sposobnost vezivanja metalnih jona iz rastvora, zbog čega su organizmi sa sposobnošću proizvodnje ovih biopolimera veoma značajni za bioremedijaciju sredina kontaminiranih petrohemijskim efluentima.

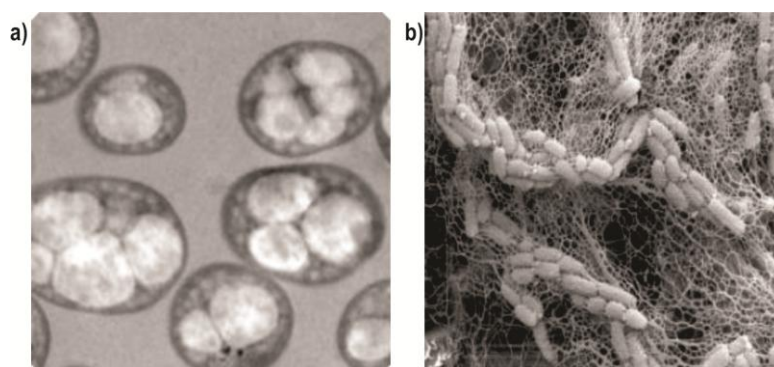
### **1.3.3. Polihidroksialkanoati**

Polihidroksialkanoati (PHA) su grupa prirodnih poliestara koje bakterije obično akumuliraju u uslovima nutritivnog stresa kao što je suvišak ugljenika (C) i ograničenost azota (N) (Chen, 2009). I Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije imaju sposobnost akumulacije PHA u vidu diskretnih intracelularnih granula (Slika 5a) (Anderson i Doves, 1990) ili ekstracelularnih struktura nalik mrežama (Slika 5b) (Sabirova *et al.*, 2006). Polihidroksialkanoati mogu činiti i do 80% suve ćelijske mase bakterija, a njihova glavna funkcija je očuvanje rezervi energije i ugljenika (Madison i Huisman, 1999). Po ponovnom uspostavljanju normalnih uslova za rast dolazi do mobilizacije, odnosno degradacije PHA (Anderson i Doves, 1990; Madison i Huisman, 1999). Granularna forma PHA (Slika 5a) podrazmeva postojanje diskretnih granula veličine 0.2-0.5  $\mu\text{m}$ , sa jednoslojnom fosfolipidnom membranom na kojoj se nalaze proteini uključeni u metabolizam PHA (Madison i Huisman, 1999; Zinn i Hany, 2005).

Poslednje dve decenije vlada veliko interesovanje industrije za proizvodnju PHA s obzirom na to da su po svojim karakteristikama slični petrohemijskoj plastici, ali da za razliku od nje poseduju svojstvo biorazgradivosti. Najbolje izučena grupa PHA su polihidroksibutirati (PHB, odeljak 1.4.2.1.) i za sada jedino ovaj polimer ima komercijalnu upotrebu u vidu kopolimera (polihidroksibutirat-ko-polihidroksivalerat, PHBcoPHV) pod nazivom „Biopol“ (Philip *et al.*, 2007). Međutim, druge grupe PHA,



poput mcl-PHA iako poseduju veoma interesantna svojstva, još uvek nisu dobila komercijalnu upotrebu. Danas, količine proizvedenog mcl-PHA su male a cene duplo više u odnosu na drugu bioplastiku (Frost i Sullivan, 2007), odnosno znatno više u poređenju sa konvencionalnom petrohemijskom plastikom (Sun *et al.*, 2007). S obzirom na brojne dobre osobine mcl-PHA polimera, trenutno se ulažu znatni naponi u smislu smanjenja cene proizvodnje, posebno u pogledu korišćenja jeftinih i obnovljivih supstrata.



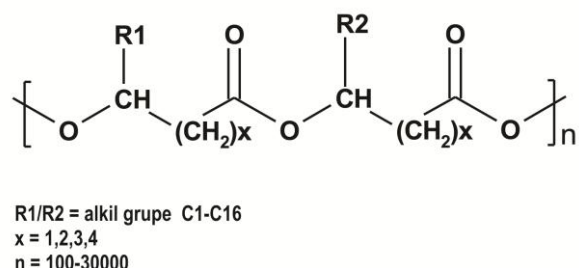
**Slika 5.** PHA akumulacija: a) TEM bakterijskih ćelija sa intracelularno akumuliranim PHA granulama; b) PHA akumulitani kao ekstracelularni materijal (Sabirova *et al.*, 2006).

## **1.4. Biotehnološka konverzija aromatičnih ugljovodonika u vrednu termoplastiku**

### **1.4.1. Polihidroksialkanoati (PHA) - svojstva i aplikacije**

PHA produkcija i akumulacija u vidu granula je primećena i opisana još 1926. godine (Lemoigne, homopolimer polihidroksibutirata), a tek 60 godina kasnije je De Smet po prvi put izolovao i okarakterisao PHA poreklom iz *Pseudomonas oleovorans* (De Smet *et al.*, 1983). Prema hemijskoj strukturi, molekuli PHA su linearni estri kod kojih je estarska veza formirana između karboksilne grupe jedne i hidroksilne grupe druge monomerne jedinice (Slika 6) (Madison i Huisman, 1999). Sve monomerne jedinice

koje ulaze u sastav PHA su enantiomerno čiste i u *R*-kofiguraciji, što je posledica stereospecifičnosti enzima uključenih u biosintezu PHA (Ren *et al.*, 2005).



**Slika 6.** Hemijska struktura PHA.

PHA se na osnovu veličine monomernih jedinica koje ulaze u njihov sastav mogu svrstati u tri grupe:

1. PHA izgrađeni od kratkih, alifatičnih monomera sa 3 – 5 atoma ugljenika se označavaju kao scl-PHA (*eng.* Short Chain Length);
2. PHA izgrađeni od monomera sa 6 – 14 ugljenikovih atoma se označavaju kao mcl-PHA (*eng.* Medium Chain Length);
3. hibridni polimeri, odnosno kopolimeri koji sadrže i scl i mcl monomerne jedinice, poput kopolimera 3-hidroksibutirata i 3-hidroksiheksanoata (Lu *et al.*, 2003; Noda *et al.*, 2005).

Fizička i hemijska svojstva polimera su utvrđena brojem i tipom monomernih jedinica koje ulaze u njihov sastav (Steinbuchel i Lutke-Eversloh, 2003; Van Der Walle *et al.*, 2001). Koji će monomeri činiti PHA zavisi kako od bakterijskog soja koji ga akumulira, tako i od izvora ugljenika koji bakterija koristi za rast i akumulaciju PHA (Rehm i Steinbuchel, 1999; Steinbuchel i Fuchtenbusch, 1998). R grupe monomera (Slika 6) mogu sadržati različite funkcionalne grupe (amino-, nitro-, fenil-, nitrozo-, karboksilne-), što takođe utiče na fizička svojstva polimera (Steinbuchel i Valentin, 1995; Sudesh *et al.*, 2000).

Polihidroksialkanoati poseduju brojne dobre karakteristike, poput netoksičnosti, biorazgradivosti, biokompatibilnosti, termoplastičnosti, nepropusnosti za vodu, koje omogućavaju njihovu aplikaciju u medicini, farmaceutskoj industriji, kao materijal za pakovanje (Tabela 1) (Chen, 2009). Raspon karakteristika kao što su rigidnost ili fleksibilnost, termoplastičnost i/ili elastomernost, hidrofobnost, netoksičnost,

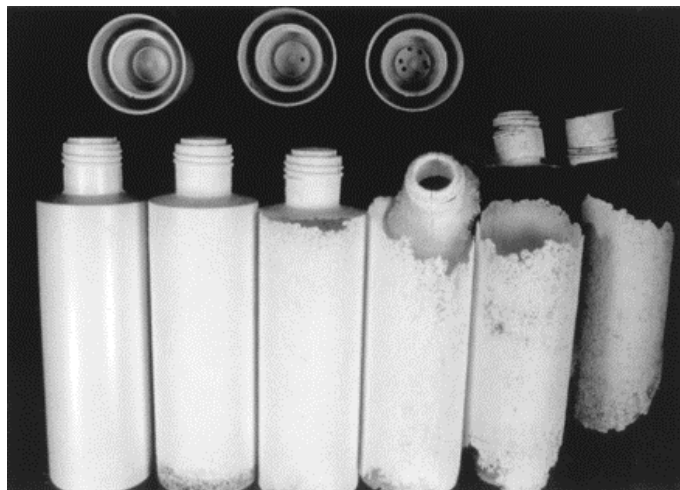
biokompatibilnost određen je, dakle sastavom monomera, pozicijom hidroksilne grupe u odnosu na karboksilnu grupu, i u nekim slučajevima prisustvom supstituenata (Steinbuchel i Lukte-Eversloh, 2003). Generalno, scl-PHA imaju strukturu nalik kristalima i liče na konvencionalnu plastiku, dok su mcl-PHA elastomeri (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

**Tabela 1.** Različite aplikacije PHA.

<b>Aplikacija</b>	<b>Polimer</b>	<b>Referenca</b>
Folije za pakovanje	P3HB, P3HV, P4HB, P4HV, P6HD	(van der Walle <i>et al.</i> , 2001)
Kese, pakovanja za hranu	PHB	(Reddy <i>et al.</i> , 2003)
Biodegradabilna smola	P(3HB-co-3HH)	(van der Walle <i>et al.</i> , 2001)
Potporna za tkiva	P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx)	(Kai <i>et al.</i> , 2003; Tesema <i>et al.</i> , 2005)
Administracija lekova	P(3HB-co-3HV)	(Sendil <i>et al.</i> , 1999)
Kardiovaskularna medicina	P(4HB), PHO	(Sodian <i>et al.</i> , 2000)
Ortopedska medicina	P(3HB)/hydroxyapatite P(3HB-co-3HHx)/hydroxyapatite	(Zinn <i>et al.</i> , 2001)

#### **1.4.1.1. Biodegradabilnost**

Jedno od veoma važnih svojstava PHA je biodegradabilnost (Lee, 1996), što polihidroksialkanoate čini odličnom alternativom za petrohemijsku plastiku (Philip *et al.*, 2007). PHA mogu biti degradovani i u aerobnim i u anaerobnim uslovima, što ima daje prednost u odnosu na druge biodegradabilne polimere. Biodegradacija podrazumeva set hemijskih reakcija kroz koje se makromolekuli razgrađuju do manjih molekula, uz učešće različitih mikroorganizama. Biološka razgradnja PHA je zavisna od hemijske strukture polimera, a posebno od prisustva funkcionalnih grupa i njihovog odnosa hidrofилnosti i hidrofobnosti, morfoloških karakteristika i kristalnosti (Mochizuki i Hiramii, 1997; Philip *et al.*, 2007). Biodegradabilnosti PHA doprinose i bakterijska populacija prisutna u datoj sredini i njena temperatura (Tokiwa i Calabria, 2004). Stopa degradacije PHB u anaerobnim uslovima traje nekoliko meseci do par godina (Slika 7) (Madison i Huisman, 1999).



**Slika 7.** Degradacija (PHB/HV) polimera u kanalizacionom mulju u anaerobnim uslovima. Bočice napravljene od biopolimera (3HB-co-3HV) su u ovim uslovima inkubirane tokom leta (prosečna temperatura 20°C). Progres procesa biodegradacije je demonstriran bočicama koje su bile podvrgnute degradaciji 0, 2, 4, 6, 8 i 10 nedelja (gledano s leva na desno) (Madison i Huisman, 1999).

UV svetlost ubrzava proces biodegradacije (Shangguan *et al.*, 2006). U prvom koraku biodegradacije enzimi depolimeraze preferencijalno deluju na amorfni region PHA, oslobađaju se monomeri, dimeri i oligomeri, kao i smeše ovih jedinica, u zavisnosti od tipa depolimeraze. U sledećem koraku se di- i oligomeri dalje razlažu pod dejstvom enzima oligomerhidrolaze (Delafield *et al.*, 1965). Nastale monomerne jedinice usvajaju i metabolišu bakterije koje proliferišu na površini polimera (Delafield *et al.*, 1965). Na kraju procesa PHA su konvertovani u ekološki pogodne proizvode kao što su CO<sub>2</sub> i voda pri aerobnoj degradaciji, odnosno metan, voda i CO<sub>2</sub> pri anaerobnoj degradaciji. PHA se takođe mogu razlagati i termičkom obradom ili putem enzimske hidrolize (Philip *et al.*, 2007).

#### **1.4.1.2. Biokompatibilnost**

PHA su odlični biokompatibilni materijali s obzirom na to da ne pokazuju toksične efekte na humano tkivo (Verlinden *et al.*, 2007). *In vivo* testovi su pokazali da su ovi polimeri biokompatibilni sa osteoblastima i epitelijalnim ćelijama (Nebe *et al.*, 2001). S obzirom na to da je PHA polimer proizvod ćelijskog metabolizma i da je proizvod degradacije PHA, 3-hidroksibutirinska kiselina normalno prisutna u krvi u koncentracijama između 0.3 i 1.3 mmol l<sup>-1</sup> postoji mogućnost primene PHA u lečenju

rana, kao implanata za inženjering tkiva i administraciju lekova (Chen i Wu, 2005; Verlinden *et al.*, 2007; Zinn *et al.*, 2001). Piezoelektrična svojstva PHB-a su slična svojstvima kostiju, što ovom tipu biopolimera daje mogućnost upotrebe u cilju stimulacije rasta kostiju (van der Walle *et al.*, 2001). PHA, posebno poli(3-hidroksibutirat) P(3HB), poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) P(3HB-co-3HV), poli(4-hidroksibutirat) P(4HB), poli(3-hidroksioktanoat) P(3HO) i poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) P(3HB-co-3HHx) se već koriste u inženjeringu tkiva, kao koštane ploče, osteosintetički materijali i kao hirurški konac (Philip *et al.*, 2007).

PHA se može primeniti u administraciji lekova, jer se izmenom sastava PHA može kontrolisati stopa biodegradacije (Chen i Wu, 2005), što daje mogućnost primene PHA u situacijama kada je potrebna spora dostava datog leka (van der Walle *et al.*, 2001; Zinn *et al.*, 2001). Takođe, hiralni aromatični i alifatični monomeri koji ulaze u sastav PHA imaju potencijalnu upotrebu kao sintoni za sintezu određenih bioaktivnih supstanci (de Roo *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 1999). (*R*)-3-hidroksialkanske ((*R*)-3-hidroksikarboksilne) kiseline su izvor sintona za sintezu farmaceutskih proizvoda, vitamina, feromona i antibiotika (Lee *et al.*, 1999; Ohashi i Hasegawa, 1992). (*R*)-3-hidroksibutirat je korišćen u sintezi antibiotika tienamicina i leka „captopril“ koji je korišćen za lečenje povišenog krvnog pritiska (Dandagi *et al.*, 2006).

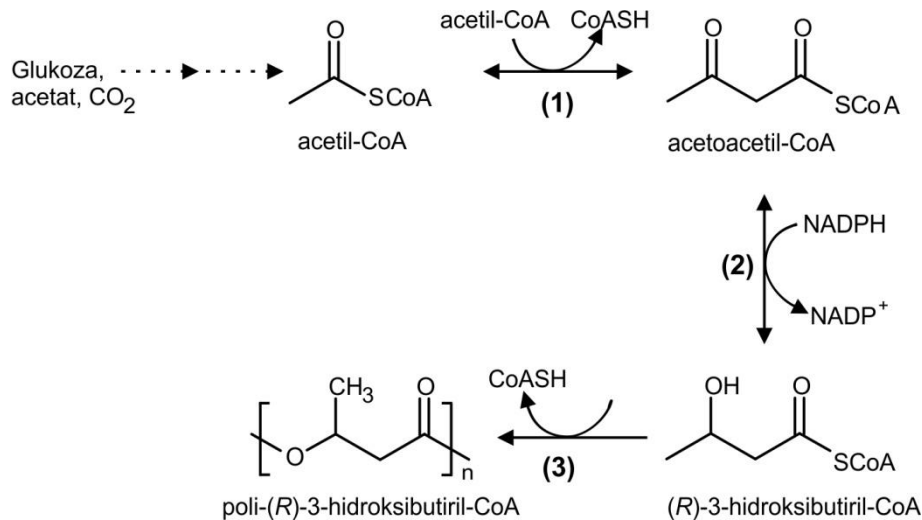
## **1.4.2. Biosinteza PHA**

### **1.4.2.1. Biosinteza scl-PHA**

Najviše proučavan proizvođač PHA je *Ralstonia eutropha* H16, koja ima sposobnost akumulacije visokih procenata PHB (i do 90% suve ćelijske mase) od izvora ugljenika kao što su fruktoza i glukonat. Biosinteza PHB obično uključuje tri enzimske reakcije katalizovane sa tri različita enzima (Slika 8).

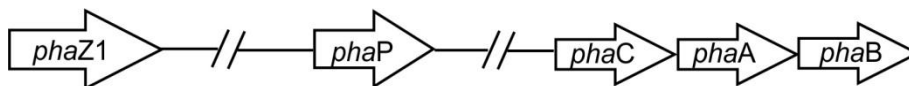
U prvoj reakciji dolazi do kondenzovanja dva molekula Ac CoA i nastanka acetoacetil CoA. Ova reakcija je katalizovana enzimom 3-ketotiolazom (kodirana genom *phaA*). Druga reakcija podrazumeva redukciju acetoacetil CoA do (*R*)-3-hidroksibutiril-CoA uz učešće NADPH zavisne acetoacetil CoA dehidrogenaze (kodirane genom *phaB*).

Poslednji korak podrazumeva učešće PHA polimeraze (kodirane genom *phaC*) koja katalizuje polimerizaciju (*R*)-3-hidroksibutiril CoA i nastanak polihidroksibutirata (Sudesh *et al.*, 2000).



**Slika 8.** Metabolički put biosinteze i degradacije PHB kod *Ralstonia eutropha* H16. (1) 3-ketotiolaza (PhaA); (2) NADPH zavisna acetoacetyl-CoA reduktaza (PhaB); (3) PHA polimeraza (PhaC).

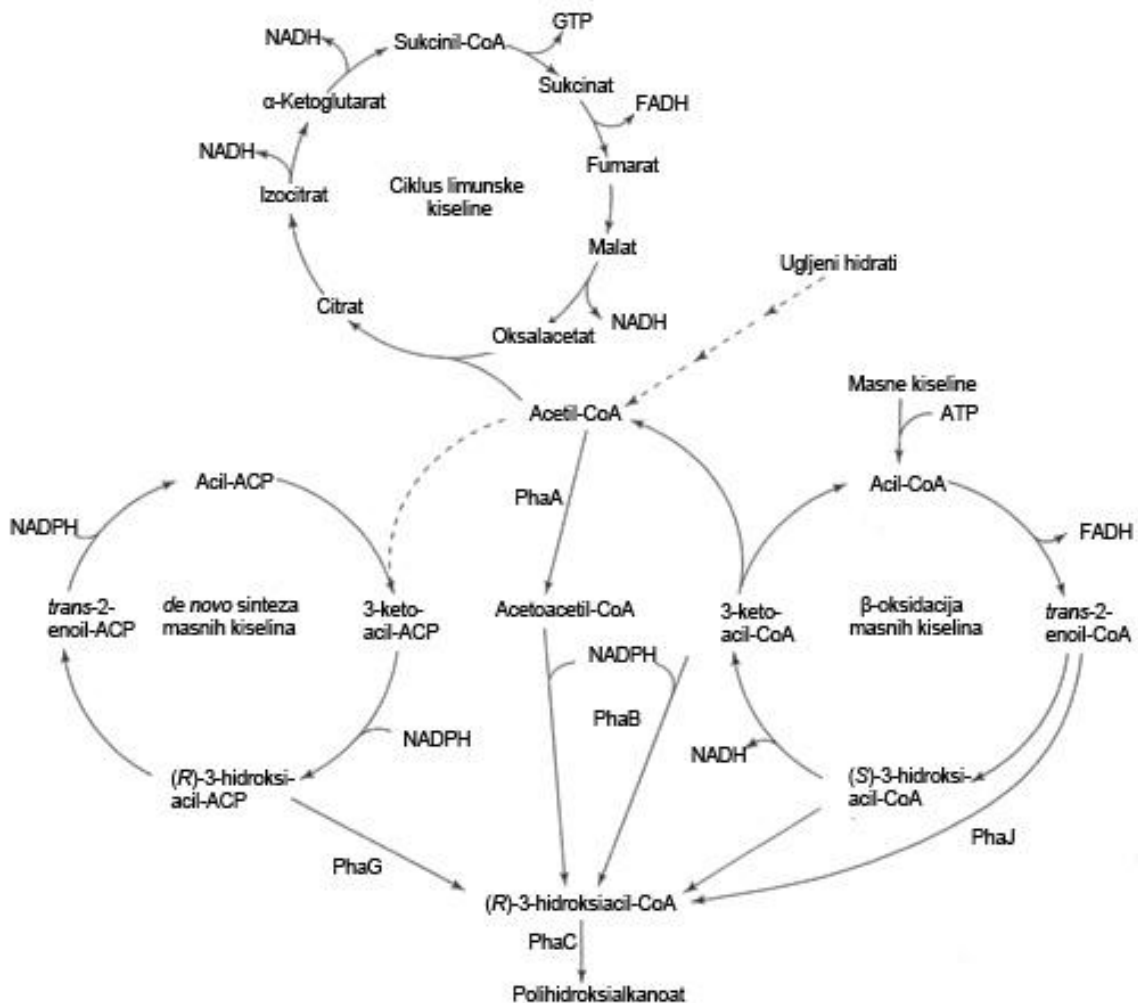
Geni koji kodiraju enzime uključene u biosintezu PHB, *phaA*, *phaB* i *phaC* su organizovani u jedan operon, *phaCAB* (Slika 9) (Madison i Huisman, 1999). Analizom genoma *R. eutropha* H16 utvrđeno je postojanje još jednog gena za PHB sintazu, *phaC2*, lociranog udaljeno od *phaCAB* operona, 37 izologa *phaA* gena koji kodiraju 3-ketotiolaze sa različitom supstratnom specifičnošću i 15 *phaB* izologa. Međutim, kakav je doprinos ovih gena na PHB akumulaciju nije pokazano (Pohlman *et al.*, 2006; Reinecke i Steinbuechel, 2009).



**Slika 9.** Organizacija gena uključenih u biosintezu PHB kod *R. eutropha* H16. Strukturni geni *phaC*, *phaA* i *phaB* su organizovani u jedan operon. Drugi geni uključeni u PHB metabolizam, kao što su *phaZ1* (PHA depolimeraza) i *phaP* su udaljeni od *phaCAB* operona.

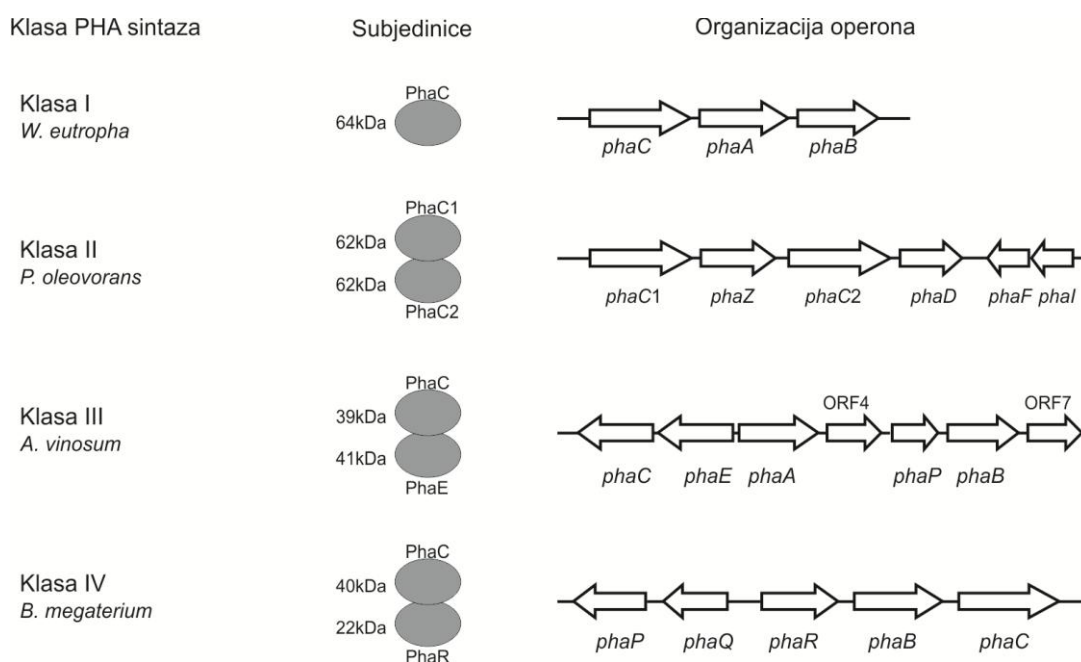
### 1.4.2.2. Biosinteza mcl-PHA

Pojava mcl-PHA je po prvi put primećena kod *Pseudomonas oleovorans* GP01 (De Smet *et al.*, 1983). *P. oleovorans* GP01 je soj koji ima sposobnost korišćenja alkana poput oktana za biosintezu mcl-PHA zahvaljujući prisustvu OCT plazmida (Huisman *et al.*, 1989). Gram-negativne fluorescentne pseudomonade su glavni proizvođači mcl-PHA (Witholt i Kessler, 1999). Na to koji tip PHA će biti sintetisan, pored PHA sintaze i izvora ugljenika koji se koristi za rast bakterije, utiče i metabolički put. Sinteza mcl-PHA se oslanja na centralne metaboličke puteve, Krebsov ciklus,  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina i *de novo* sintezu masnih kiselina, pa samim tim postoji i kompeticija za prekursore ovih puteva (Slika 10).



**Slika 10.** Glavni metabolički putevi uključeni u sintezu mcl-PHA kod bakterija iz roda *Pseudomonas* (Aldor i Keasling, 2003).

Ključni enzimi u sintezi PHA su PHA sintaze koje katalizuju polimerizaciju 3-hidroksiacil-CoA monomera. Ovi enzimi su stereospecifični i mogu da koriste 3-hidroksiacil-CoA samo u *R*-konfiguraciji. U odnosu na supstratnu specifičnost, veličinu i strukturu, PHA sintaze se mogu grupisati u četiri klase (Rehm, 2003b; Solaiman i Ashby, 2005). Sintaze iz klase I i II se sastoje od jednog tipa subjedinica (PhaC). Operon klase I sadrži jedan *phaC* gen, dok operon klase II sadrži dva gena, *phaC1* i *phaC2*. Ove dve klase sintaza se razlikuju i po supstratnoj specifičnosti. PhaC (klasa I) ima afinitet za (*R*)-3-hidroksiacil-CoA kratkog lanca, dok PhaC1 i PhaC2 pokazuju afinitet za (*R*)-3-hidroksiacil-CoA srednje dužine lanca.



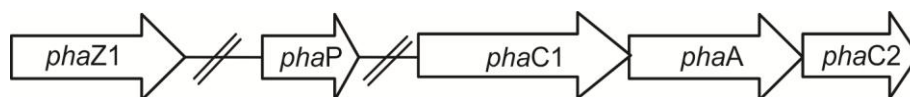
**Slika 11.** Četiri klase PHA sintaza i organizacija gena kod tipičnih predstavnika. *phaC*, PHA sintaza; *phaA*, 3-ketotiolaza; *phaB*, (*R*)-3-ketoacil-CoA reduktaza; *phaZ*, PHA depolimeraza; (Rehm, 2003a; Solaiman i Ashby, 2005).

Sintaze klase I se mogu naći kod purpurnih ne sumpornih fototrofnih bakterija i kod većine heterotrofnih bakterija, osim kod pseudomonada koje pripadaju rRNK homolognoj grupi I, sa tipičnim predstavnikom *Wautersia eutropha* (Steinbuchel i Hein, 2001). Sintaze koje pripadaju klasi II se mogu naći samo kod pseudomonada iz rRNK homologne grupe I, čiji je tipičan predstavnik *P. oleovorans* (Madison i



Huisman, 1999). Treću klasu čine sintaze sastavljene od dva tipa subjedinica, PhaC i PhaE. PhaC iz klase III pokazuje srodnost sa PhaC klasa I i II, dok PhaE ne pokazuje sličnost ni sa jednim poznatim proteinom. Ovakve sintaze se sreću kod fototrofnih sumpornih bakterija i kod nekih cijanobakterija, a pokazuju specifičnost ka (*R*)-3-hidroksiacil-CoA kratkog lanca. Četvrta klasa sintaza se može naći kod predstavnika roda *Bacillus* i takođe pokazuje specifičnost ka (*R*)-3-hidroksiacil-CoA kratkog lanca. Organizacija PHA biosintetskih gena je prikazana na slici 11 (Rehm, 2003a; Solaiman i Ashby, 2005).

Geni za sintezu mcl-PHA su kodirani *pha* klasterom koji je evolutivno konzervisan kod svih proizvođača mcl-PHA (De Eugenio *et al.*, 2008). Tip organizacije gena koji se najčešće javlja kod roda *Pseudomonas* prikazan je na slici 12. Čine ga dve sintaze (PhaC1 i PhaC2) uključene u polimerizaciju monomera (Huisman *et al.*, 1991), depolimeraze (*phaZ*) odgovorne za mobilizaciju polimera (De Eugenio *et al.*, 2007) i *phaD* gena koji kodira transkripcioni regulator (PhaD protein) (Klinke *et al.*, 2000). PhaC1 i PhaC2, koje su međusobno odvojene *phaZ* genom imaju neznatno drugačiju supstratnu specifičnost (Arias *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009). Proizvodi *phaI* i *phaF* gena su verovatno uključeni u formiranje struktura PHA granula (Prieto *et al.*, 1999). Smatra se da PhaF ima i ulogu negativnog regulatora *phaC1ZC2D* operona i *phaI* gena (Kessler i Witholt, 2001a; Prieto *et al.*, 1999).



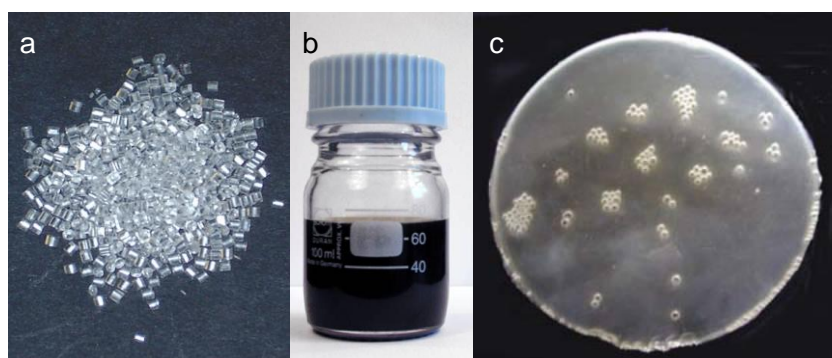
**Slika 12.** Organizacija mcl-PHA biosintetskih gena kod *P. oleovorans* Gpo1.

### 1.4.3. Biotehnoška konverzija monoaromatičnih ugljovodonika u mcl-PHA

Kao što je već pomenuto, proizvodnja bioplastike je znatno skuplja u odnosu na proizvodnju petrohemijske plastike. Do najefikasnije akumulacije mcl-PHA dolazi kada se kao izvor ugljenika i energije koriste supstrati strukturno slični 3-hidrokslialkanskim kiselinama, poput oktana, oktanoata i nonanoata (Madison i Huisman, 1999; Sun *et al.*, 2007). Međutim, problem sa korišćenjem ovih supstrata je

u tome što su skupi i moraju se koristiti u nižim koncentracijama s obzirom na to da ispoljavaju toksični efekat na bakterije. Rađena su brojna istraživanja u cilju pronalazjenja jeftinijih supstrata, poput oleinske kiseline (Huijberts i Eggink, 1996), ili strukturno različitog glukonata (Huijberts *et al.*, 1992), ali su u svakom slučaju količine akumuliranog mcl-PHA bile znatno niže u odnosu na prinos postignut gajenjem na alkanima, odnosno alifatičnim karboksilnim kiselinama.

Da bi se što više smanjila cena procesa proizvodnje mcl-PHA, pored poboljšanja strategije fermentacije (Madison i Huisman, 1999; Steinbuchel i Hein, 2001b), upotreba jeftinih početnih materijala kao što su otpadni materijali industrije hrane, poljoprivredni materijali i industrijski otpad je takođe analizirana (Du i Yu, 2002; Koller *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2005). Već je pokazana konverzija plastičnog otpada, kao što su polistiren i polietilenteraftalat (PET) u biodegradabilnu plastiku (Kenny *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2006). U oba slučaja je sirovina za gajenje bakterija korišćen materija dobijen pirolizom plastičnog otpada (Slike 13 i 14).

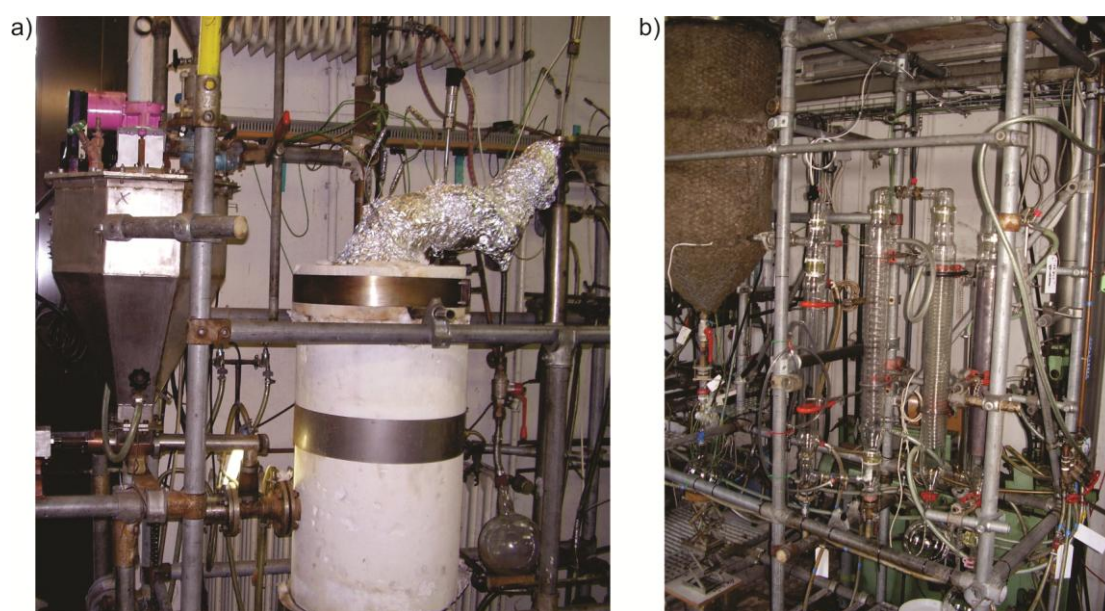


**Slika 13.** Konverzija plastike u mcl-PHA. (a) zrna plastike; (b) ulje dobijeno pirolizom plastičnog materijala; (c) PHA polimer dobijem biokonverzijom plastike.

Piroliza, termička obrada materijala u odsustvu vazduha, se naširoko koristi u industriji kao način za pripremanje početnih materijala za hemijsku, metaluršku i industriju plastike. To je važan industrijski proces koji se koristi za dobijanje monomera iz polimera u reciklaži plastike, proizvodnju keramičkih materijala, proizvodnju materijala visoke termičke otpornosti. Pored toga što se recikliraju materijali, piroliza

je pogodna i zbog oslobađanja velike količine toplotne energije (Kaminsky i Kim, 1999).

Pirolizom polistirena nastaje pirolitičko ulje koje sadrži oko 90% stirena (slika 13b), dok pirolizom PET materijala kao glavni proizvod nastaje tereftalična kiselina. Ovo jedinjenje je testirano kao potencijalna sirovina za gajenje bakterija (izolati iz roda *Pseudomonas*) sa ciljem konverzije u mcl-PHA biopolimer (Kenny *et al.*, 2008). U laboratorijskim eksperimentima je pokazana sposobnost tri izolata iz roda *Pseudomonas* da akumuliraju mcl-PHA kada je tereftalična kiselina korišćena kao jedini izvor ugljenika i energije.



**Slika 14.** Piroliza plastičnog materijala. a) Laboratorijsko postrojenje za pirolizu plastičnog materijala; b) Postrojenje za laboratorijsku destilaciju pirolitičkog ulja.

Takođe je uspešno pokazana mogućnost konverzije BTEX grupe monoaromatičnih ugljovodonika u mcl-PHA (Nikodinovic *et al.*, 2008). Iako je poznat veliki broj bakterija, pre svega iz roda *Pseudomonas* sa sposobnošću rasta na aromatičnim supstratima, samo mali broj može da ih konvertuje u polihidroksialkanoate (Abraham *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2005; Ward i O'Connor, 2005). Biosinteza mcl-PHA iz monoaromatičnih ugljovodonika je primećena kod *P. putida* F1 (benzene, toluen, etilbenzen), *P. putida* mt-2 (toluen, *p*-ksilen) i *P. putida* CA-3 (Nikodinovic *et al.*, 2008). Ovo je verovatno posledica specifičnih metaboličkih puteva razgradnje

monoaromatičnih supstrata, kao i supstratne specifičnosti PHA polimeraze (Garcia *et al.*, 1999; Kessler i Witholt, 2001b).

Već je pomenuto da BTEX jedinjenja imaju veoma široku upotrebu i sintetičkoj hemiji kao jeftine petrohemikalije (APA, 2005). Međutim, s obzirom na tako veliku upotrebu ona predstavljaju i veliki deo otpadnog materijala. Ova petrohemijska jedinjenja takođe čine i značajan deo pirolitičkog ulja nastalog pirolizom mešovitog plastičnog otpada (Kaminsky i Kim, 1999). Stoga je mogućnost konvertovanja smeše petrohemijskog otpada u ekološki podoban proizvod veoma značajna.

Pirolitička ulja kompleksnijih otpadnih materijala, kao i sam petrohemijski materijal sadrže značajnu količinu poliaromatičnih jedinjenja (odjeljak 1.1.). Do danas nije pokazano da neki bakterijski soj ima sposobnost konverzije poliaromatičnih ugljovodonika u mcl-PHA.

## 2. CILJEVI

Aromatični ugljovodonici predstavljaju rasprostranjene i perzistentne zagađivače životne sredine, pre svega zemljišta i sedimenata. Veliki broj ovih jedinjenja se nalazi na listi Agencije za zaštitu životne sredine (EPA) kao prioritetni polutanti sa toksičnim i kancerogenim dejstvom. Razvijen je veliki broj fizičkih i hemijskih metoda za njihovo uklanjanje iz zagađene sredine, ali je veliki nedostatak ovih metoda to što su ekonomski neisplative i često ovakvim pokušajima prečišćavanja nastaju još toksičniji intermedijerni proizvodi. Bioremedijacija, biološka metoda koja podrazumeva upotrebu mikroorganizama u svrhu uklanjanja zagađivača, mogla bi predstavljati metodu izbora i sa ekonomskog, kao i sa stanovišta da se najveći broj polutanata na ovaj način kompletno razgrađuje.

Sveobuhvatni cilj ovog rada je izolacija, identifikacija i analiza aplikativnog potencijala novih bakterijskih sojeva sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih jedinjenja iz rečnih sedimenata izloženih uticaju petrohemijske industrije.

Kako je do danas izolovan i okarakterisan veliki broj, uglavnom Gram-negativnih bakterija sa sposobnošću degradacije aromatičnih jedinjenja, cilj ovog rada je da se primene se tehnike koje omogućuju izolaciju pre svega Gram-pozitivnih izolata. S obzirom na to da su ovakve sredine obično zagađene mešovitim polutantima, bioremedijacioni potencijal izolata zavisi i od njihove sposobnosti da tolerišu prisustvo teških metala, povišenih koncentracija soli i pre svega niske temperature, što će biti analizirano tokom ove studije. Pored analize bioremedijacione sposobnosti izolata, cilj je i proširivanje aplikativnog potencijala izolata na analizu njihove sposobnosti da akumuliraju industrijski važne biopolimere, polifosfate i polihidroksialkanoate.

## 2.1. Specifični ciljevi rada

- uzorkovanje i analiza sedimenata kanala za ispuštanje prerađenih otpadnih voda iz petrohemijske industrije i sedimenata reka Dunav i Tamiš u blizini petrohemijske industrije;
- izolovanje bakterija sa sposobnošću degradacije poliaromatičnih jedinjenja iz rečnih sedimenata primenom metode preselekcije za izolaciju Gram-pozitivnih bakterija i predobogaćivanja naftalenom za izolaciju Gram-negativnih bakterija;
- selekcija bakterijskih izolata sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih jedinjenja;
- analiza metaboličke raznovrsnosti Gram-pozitivnih i Gram-negativnih izolata u pogledu sposobnosti rasta u prisustvu povišenih koncentracija metala, rezistencije na antibiotike, akumulacije polifosfata, akumulacije egzopolisaharida i akumulacije polihidroksialkanoata;
- selekcija izolata sa sposobnošću konverzije poliaromatičnih ugljovodonika u industrijski vrednu termoplastiku – polihidroksialkanoate;
- detaljnija karakterizacija i optimizacija biotehnološke proizvodnje polihidroksialkanoata srednje dužine niza (mcl-PHA) iz poliaromatičnih ugljovodonika

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Uzorkovanje i hemijska analiza rečnog sedimenta**

U ovom radu su korišćeni uzorci sedimenta kanala za ispuštanje preraređenih otpadnih voda iz postrojenja petrohemijske industrije (S1), zatim uzorci sedimenta Dunava 300 m uzvodno (S2) i 300 m nizvodno (S3) od kanala za ispuštanje prerađenih otpadnih voda, kao i sediment reke Tamiš (S4) 500 m od mesta ulivanja u Dunav udaljen 10 km od mesta uzorkovanja S1. Uzorci su uzimani sa 1-10 cm dubine sedimenta (100 g) i čuvani na 4°C do hemijske analize sedimenta i izolacije bakterija.

##### **3.1.1. Mikroanaliza uzoraka rečnog sedimenta**

Od ukupne količine svakog uzorka alikvot od 5 g je u potpunosti osušen (100°C, 60 min) i urađena je standardna mikroanaliza (Vario EL III; C,H,N,S/O Elemental Analyzer, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau-Germany; Fakultet za hemiju, Univerzitet u Beogradu). Mikroanaliza se zasniva na modifikaciji klasičnog Pregl – Dumas metoda (Patterson, 1973). Alikvot osušenog uzorka (1 mg) je automatizovanim procesom ubacivan u kapsulu koja je potom prenošena u vertikalnu kvarcnu tubu za sagorevanje, pri čemu je sistem održavan na temperaturi od 1020°C, sa konstantnim protokom helijuma. Po ubacivanju uzorka u vertikalnu kvarcnu tubu helijum je povremeno obogaćivan čistim kiseonikom. U prisustvu kiseonika i reagenasa za sagorevanje uzorak je u potpunosti sagorevan i redukovao do osnovnih gasova: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> i SO<sub>2</sub>. Proizvodi sagorevanja su potom propuštani kroz takozvanu zonu kontrole gasa u kojoj je dolazilo do njihovog mešanja. Odnos gasova je održavan pri konstantnom pritisku, zapremini i temperaturi. Nakon ove homogenizacije gasovi su razdvajani frontalnom hromatografijom, eluirani i mereni uz pomoć detektora termalne provodljivosti. Sva merenja su rađena u duplikatu.

### 3.1.2. Određivanje prisustva teških metala u uzorcima sedimenta

Za utvrđivanje koncentracije metala osušeni uzorci rečnog sedimenta (1 g) su digerirani u Milestone Ethos One (Bergamo, Italija; Fakultet za hemiju, Univerzitet u Beogradu) mikrotalasnoj pećnici, u zatvorenim PTFE sudovima. Za ekstrakciju metala je korišćena smeša azotne (HNO<sub>3</sub>) i hlorovodonične (HCl) kiseline u odnosu 1:3 (v/v), pri čemu je za alikvot uzorka (500 mg) korišćeno 12 ml ove kiselinske smeše. Zatim su uzorci tretirani toplotom korišćenjem sledećeg programa pečenja: 165°C 10 min, podizanje temperature do 175°C u trajanju od 3 min, 175°C 10 min. Nakon toga su uzorci ohlađeni, razblaženi do zapremine od 100 ml i prebačeni u volumetrijske sudove. Determinacija koncentracije metala (Zn, Hg, Ni, Pb i Cd) je rađena uz pomoć indukujućeg kuplovanog plazma/optičkog emisionog spektrometra (*eng. inductively coupled plasma/optical emission spectrometer - ICP/OES*). Kao eksterni standardi su korišćeni rastvori metala (koncentracija rastvora je 1000 mg l<sup>-1</sup>). Da bi se smanjio efekat interference različitih metala, pripreman je kalibracioni standard koji je sadržao smešu metala u odnosu koji odgovara odnosu metala u uzorku. I standardi i blank su pripremani u istom matriksu u kom je vršena ekstrakcija metala, čime se umanjuje efekat matriksa i omogućava korekcija pozadinskog šuma. Sva merenja su rađena u duplikatu.

## 3.2. Izolovanje i gajenje bakterija iz uzoraka rečnog sedimenta

### 3.2.1. Reagensi

Benzene, toluen, fenol, bifetil, stiren, naftalen i druga aromatična jedinjenja koja su korišćena u ovom radu bila su analitičke čistoće i kupljene su od kompanije „Sigma-Aldrich“ (St Louis, MO, USA). Soli, kao što su CdSO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> i FeCl<sub>3</sub>, kao i antibiotici (ampicilin, nalidiksinska kiselina, eritromicin, kanamicin, rifampicin i tetraciklin), boje „Congo Red“, „Comassie Brilliant Blue“, „Malachite Green“ i cikloheksimid su bili najviše čistoće i takođe su kupljeni od kompanije „Sigma-Aldrich“ (St Louis, MO, USA). „Tryptone soy broth“, skrob, kazein, bakteriološki agar i druge komponente za medijume su kupljeni od kompanije „Becton Dickinson“ (Sparks, MD, USA). „KAPA Robust 2G Hotstart Ready Mix“ je kupljen od



„KAPA Biosystems“ (Woburn, Massachusetts, USA). Oligonukleotidi (prajmeri) su kupljeni od kompanije „Invitrogen“ (Darmstadt, Germany). „QIAEX II gel purification“ i „QIAquick PCR purification“ kitovi su kupljeni od kompanije „QIAGEN“ (Hilden, Germany). Restrikcioni enzimi korišćeni u ovom radu su kupljeni od kompanije „Fermentas“ (Burlington, Kanada)

### 3.2.2. Podloge za gajenje bakterija

Za izolaciju bakterija metodom direktne kultivacije (odjeljak 3.2.3.) korišćen je **SCA** medijum (od *eng.* Starch Casein Agar); 1 l medijuma sadržao je 10 g skroba, 1 g kazeina, 0.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g  $\text{MgSO}_4$  i 3 g  $\text{NaCl}$ .

Za održavanje kultura na Petri šoljama i pripremanje stokova za dugoročno čuvanje, kao i za testiranje rasta u prisustvu soli (odjeljak 3.5.2.) korišćen je **TSB** medijum (*engl.* Tryptic Soy Broth; Becton, Dickinson and Company, USA); 30 g TSB i 1 l vode. TSB agar je sadržao i 15 g agara na 1 l vode. Sojevi su pripremani za dugoročno čuvanje tako što su prekonoćne kulture bakterija gajenih u tečnom TSB medijumu (600  $\mu\text{l}$ ) mešane sa sterilnim glicerolom (400  $\mu\text{l}$ ). Stokovi su čuvani na  $-80^\circ\text{C}$ .

Minimalni medijum **MSM** (od *eng.* Mineral Salts Medium) je korišćen za izolaciju bakterija iz rečnog sedimenta metodom pretretmana uzoraka naftalenom (odjeljak 3.2.2.); za testiranje rasta izolata na aromatičnim ugljovodonicima (odjeljak 3.3.1.), za analizu akumulacije biopolimera (odjelci 3.3.5. i 3.3.7.), kao i za testiranje proizvodnje egzopolisaharida (odjeljak 3.3.6). MSM je na 1 l sadržao: 9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.002 g  $\text{CaCl}_2$ ; 1 ml Trace element solution (Schlegel *et al.*, 1961) i 1.5 g bakteriološkog agara. Čvrsta MSM podloga je pravljena dodavanjem 15 g agara na 1 l podloge.

**MTM** (*eng.* Metal Toxicity Medium,) je korišćen za ispitivanje tolerancije izolata na prisustvo teških metala (odjeljak 3.3.3.) (Sani *et al.*, 2001). Ovaj medijum je na 1 l sadržao 5.1 g Na-laktata, 2.13 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.06 g anhidrovanog  $\text{CaCl}_2$ , 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g  $\text{MgSO}_4$ , 0.05 g ekstrakta kvasca, 0.5 g triptona i 10.93 g 1,4-piperazindietansulfonska kiselina (PIPES).

Za identifikaciju izolata sa sposobnošću proizvodnje egzopolisaharida korišćen je **tripton-agar (TA)** medijum: 10 g triptona i 10 g agara na 1 l podloge.

Hranljivi medijum **NB** (od eng. Nutrient Broth) je korišćen za kvantifikaciju egzopolisaharida (odjeljak 3.3.6.); 1 l je sadržao 2 g mesnog ekstrakta, 2 g ekstrakta kvasca, 5 g bakto-peptona i 4 g NaCl.

**LB** (eng. Luria Broth) hranljiva podloga je korišćena za gajenje *E. coli* DH5 $\alpha$  i transformanata; sadržala 10 g bakto-triptona, 10 g NaCl, 5 g kvašćevog ekstrakta na 1 l destilovane vode. Za čvrste podloge (eng. Luria Agar, **LA**) dodavano je 15 g agara na litar podloge. Selekcija transformanata je vršena dodavanjem ampicilina (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), X-gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid, 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) i IPTG (izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid).

### 3.2.3. Podloge za biohemijske testove

Biohemijski testovi za identifikaciju izolata (odjeljak 3.5.2.) su rađeni na sledećim podlogama:

Podloga za **lipaza test**: 10 g peptona, 5 g NaCl, 0,1 g CaCl<sub>2</sub>, 20 g agara i 0.5 g Tween 80 na 1 l destilovane vode. Podloga se sterilise u autoklavu u trajanju od 30 minuta na 110°C;

Podloga za testiranje **redukcije nitrata**: 0.2 g KNO<sub>3</sub>, 5 g peptona na 1 l destilovane vode;

Podloga za testiranje **korišćenja citrata** izolati su gajeni na Simonsovom citratnom agaru; 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g natrijum citrata, 5 g NaCl, 0.08 g "Bromothymol blue" boje i 15 g agara na 1 l destilovane vode;

Podloga za **proizvodnja indola**: 20 g peptona i 5 g NaCl na 1 l destilovane vode.

### **3.2.4. Izolovanje bakterija iz uzoraka rečnog sedimenta metodom direktne kultivacije i metodom predobogaćivanja uzorka naftalenom**

Uzorci sedimenta su čuvani na 4°C 48 h. Bakterije su iz uzoraka izolovane na dva načina: upotrebom toplotnog pretretmana (odjeljak 3.2.3.1.) i predobogaćivanjem uzorka naftalenom (odjeljak 3.2.3.2.). Za procenu broja vijabilnih bakterija u uzorcima sedimenta bakterije su zasejavane i direktno na LA medijum i nakon 48 h rasta na 30°C prebrojane su izrasle kolonije. Broj bakterijskih ćelija po gramu zemljišta je određivan na sledeći način:

$$\text{br. ćel. g zemljišta}^{-1} = \text{br. poraslih kolonija} \times \text{razblaženje}^{-1} \times 100$$

#### **3.2.4.1. Selektivna izolacija Gram-pozitivnih bakterija**

Deo uzorka rečnog sedimenta (10 g) je sušen sedam dana u prisustvu CaCO<sub>3</sub> (10%, w/w) na 40°C, a zatim, pod aseptičnim uslovima, prosejan kroz sito do čestica veličine otprilike 3 mm. Osušenom uzorku je dodavan sterilni fosfatni pufer (1 g uzorka se meša sa 9 ml 50 mM fosfatnog pufera pH 7.4) i suspenzija je mešana vorteksovanjem 5 min. Pravljeni su serijska razblaženja suspenzije (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>) i zasejavana (po 300 µl) na SCA medijum u koji je prethodno dodato 75 mg l<sup>-1</sup> cikloheksimida. Ovako propremljene Petri šolje su inkubirane 7 dana na 30°C.

#### **3.2.4.2. Selektivna izolacija Gram-negativnih bakterija**

Za izolaciju brzo rastućih Gram-negativnih bakterija sa sposobnošću degradacije naftalena korišćena je metoda predobogaćivanja uzorka. Deo svakog od uzoraka (1 g) je u erlenmajeru od 250 ml pomešan sa 50 ml MSM medijuma i suspenziji je dodat fungicid cikloheksimid (75 mg l<sup>-1</sup>), kao i par kristala naftalena (1-2 mg). Nakon 5 dana inkubacije na 30°C uz aeraciju od 150 obrt min<sup>-1</sup> pravljeni su serijska razblaženja (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>) i suspenzija (100 µl) je zasejavana na MSM agar sa ~5 mg naftalena kao jedinog izvora ugljenika i energije smeštenog na poklopac Petri šolje. Petri šolje su inkubirane 72 h na 30°C. Bakterije koje su najbrže rasle u toku ovog perioda su odabrane za dalju analizu.

### **3.3. Karakterizacija bakterija izolovanih iz uzoraka rečnog sedimenta**

#### **3.3.1. Sposobnost degradacije aromatičnih jedinjenja**

Da bi ispitili sposobnost izolata da koriste različite aromatične ugljovodonike kao jedine izvore ugljenika i energije, sojevi su presejani na MSM medijum. Aromatična jedinjenja kao izvor ugljenika su dodavana kroz gasovitu fazu dodavanjem sterilnog „Eppendorf“ nastavka sa 75 µl jedinjenja u poklopac Petri šolje. U slučaju jedinjenja koja su u čvrstom stanju (poput naftalena, bifenila i sl.) par kristala (do 5 mg) je dodavano na poklopac Petri šolje. Izolati su sa aromatičnim jedinjenjima inkubirani na 30°C 5 dana. Rast je upoređivan sa kontrolnim kulturama koje su inkubirane bez supstrata, odnosno sa kulturama kojima je izvor ugljenika bila glukoza (20 mM).

#### **3.3.2. Rast bakterija na različitim temperaturama**

Da bi utvrdili opseg temperatura rasta, izolati su gajeni na bogatom LB medijumu (odeljak 3.2.2.) na sledećim temperaturama: 5°C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 24 °C, 28 °C, 30 °C, 32 °C, 37 °C i 42°C.

#### **3.3.3. Rast bakterija u prisustvu teških metala**

Da bi se ispitala sposobnost rasta izolata u prisustvu teških metala korišćen je medijum za utvrđivanje toksičnosti metala (MTM, odeljak 3.2.2.). Ispitivana je toksičnost sledećih metalnih jona:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . Korišćene koncentracije su preračunate u odnosu na koncentracije dozvoljene Pravilnikom Ministarstva za zaštitu životne sredine (EPA/Serbia, 1994) i bile su 20 puta veće od dozvoljenih: ( $\text{CdSO}_4$ , 111.3 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{NiCl}_2$ , 2.3 g l<sup>-1</sup>;  $\text{HgCl}_2$ , 73 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{CuSO}_4$ , 5 mg l<sup>-1</sup>;  $\text{FeCl}_3$ , 114 mg l<sup>-1</sup> i  $\text{ZnCl}_2$ , 12.6 g l<sup>-1</sup>). Takođe, testiran je rast u prisustvu viših koncentracija istih soli, koje odgovaraju 100 mM koncentraciji odgovarajućih metalnih jona ( $\text{CdSO}_4$ , 20.9 g l<sup>-1</sup>;  $\text{NiCl}_2$ , 12.9 g l<sup>-1</sup>;  $\text{HgCl}_2$ , 27 g l<sup>-1</sup>;  $\text{CuSO}_4$ , 15.9 g l<sup>-1</sup> i  $\text{FeCl}_3$ , 16.2 g l<sup>-1</sup>). Kulture su inkubirane 48 h na 30°C.

Sposobnost rasta izolata u prisustvu teških metala i sposobnost degradacije aromata potvrđena je zamenom laktata u MTM medijumu toluenom, kao predstavnikom

monoaromatičnih ugljovodonika, odnosno naftalenom, predstavnikom poliaromatičnih ugljovodonika.

### **3.3.4. Rast bakterija u prisustvu antibiotika**

Rast bakterija u prisustvu antibiotika utvrđivan je zasejavanjem izolata sa LB agara na LB agar (odjeljak 3.2.2.) koji je sadržao antibiotik: ampicilin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), nalidiksinsku kiselinu ( $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), eritromicin ( $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), kanamicin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), rifampicin ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ili tetraciklin ( $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Kulture su gajene 48 h na  $30^\circ\text{C}$ .

### **3.3.5. Analiza akumulacije polifosfata**

Za analizu sposobnosti akumulacije polifosfata korišćena je modifikovana procedura opisana kod McGrath-a i Quinn-a (McGrath i Quinn, 2000). Izolati su gajeni pet dana na  $30^\circ\text{C}$  u tečnom MSM medijumu (50 ml) sa glukozom (20 mM) kao izvorom ugljenika i energije. Zatim su kulture centrifugirane (15 min,  $5000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , Eppendorf Centrifuge 5804R) i dva puta su oprane u puferu za pranje ćelija (4 ml; 1.5 M NaCl, 0.01 M EDTA, 1 mM KF). Ćelijski pelet je potom resuspendovan u puferu za pranje ćelija (4 ml) i sonifikovan na ledu (Soniprep 150 MSE; Beckenham, UK; dva pulsa od po 10 s na 20 kHz, sa intervalima od 2 minuta). Dobijeni homogenat je potom centrifugiran (1 min,  $20000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , Eppendorf Centrifuge 5417R). Polifosfati su precipitirani na sobnoj temperaturi iz dobijenog supernatanta dodavanjem jednake zapremine rastvora za precipitaciju (0.5 M Tris-HCl pH 8; 0.25 M EDTA pH 8; 2.5% CTAB; 0.25 M NaCl, i 50%  $\text{BaCl}_2$ ). Precipitirani polifosfat je sakupljen centrifugiranjem (10 min,  $20000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , Eppendorf Centrifuge 5417R). Dobijeni pelet je opran dva puta u puferu za pranje polifosfata (4 ml, 50 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  i 1 mM KF u  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ). Potom je pelet resuspendovan u 0.154 M NaCl (2 ml) i inkubiran 24 h na  $28^\circ\text{C}$ . Da bi se utvrdila koncentracija izolovanih polifosfata u ekstrakt je dodatvana koncentrovana HCl (200  $\mu\text{l}$ ), nakon čega je smeša inkubirana 45 min na  $100^\circ\text{C}$ . Dalje je koncentracija polifosfata utvrđivana prema već opisanom protokolu (Carter i Karl, 1982). Nakon hidrolize polifosfata u 1 ml uzorka je dodata smeša HCl i Na-molibdata (0.7 ml; 2N HCl : 0.1M  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 = 4\text{V} : 3\text{V}$ ) i rastvor boje "Malachite Green" u polivinil alkoholu (0.3 ml; 0.042% (w/v) boje "Malachite Green" u

1% (w/v) polivinil alkoholu). Smeša je homogenizovana invertovanjem i inkubirana 2 min na sobnoj temperaturi. Potom je dodavana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 ml; 7.8% (v/v)) i smeša je inkubirana 1h na sobnoj temperaturi, nakon čega je merena apsorbanca na 625 nm (A<sub>625</sub>; Ultrospec 3300, Amersham Biosciences). Koncentracija polifosfata je utvrđivana na osnovu standardne krive koja sadrži A<sub>625</sub> za različite koncentracije KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i izražavana kao nmol neorganskog fosfata (Pi) mg<sup>-1</sup> ukupne koncentracije proteina u ćeliji.

### **3.3.6. Analiza proizvodnje egzopolisaharida**

Da bi se utvrdilo da li izolati imaju sposobnost proizvodnje egzopolisaharida bakterije su gajene na TA medijumu (odjeljak 3.2.2.) suplementiranom bojama „Congo red“ (40 mg ml<sup>-1</sup>) i „Coomassie brilliant blue“ (20 mg ml<sup>-1</sup>), kao što je ranije opisano (Arciola *et al.*, 2005). Kulture su gajene 4-7 dana na 30°C.

Izolacija egzopolisaharida i njihova kvantifikacija je rađena prema prethodno opisanoj proceduri (Fett *et al.*, 1995). Sojevi su gajeni u MSM medijumu (25 ml) sa glukozom kao izvorom ugljenika i u NB medijumu (25 ml). Nakon 4 dana inkubacije na 30°C uz aeraciju od 200 obrt min<sup>-1</sup> ćelije su uklanjane centrifugiranjem (30 min, 9000 x g, 4°C, Sorvall SS34, RC-5B Super Speed Centrifuge; Du Pont Instruments). Egzopolisaharidi su precipitirani iz bistrog supernatanta dodavanjem rastvora KCl (25%; w/v) do finalne koncentracije od 1% (w/v) i tri zapremine metanola. Posle inkubacije od 16 h na 4°C egzopolisaharidi su prikupljeni centrifugiranjem (30 min, 10000 x g, 4°C, Sorvall SS34, RC-5B Super Speed Centrifuge; Du Pont Instruments) i pelet je resuspendovan u destilovanoj vodi (2 ml), osušen i meren na analitičkoj vagi.

### **3.3.7. Analiza akumulacije polihidroksialkanoata (PHA)**

Da bi se utvrdila sposobnost izolata da akumuliraju polihidroksialkanoate korišćen je MSM medijum (odjeljak 3.2.2.) sa smanjenom koncentracijom azota (0.25 g l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl). Kao izvor ugljenika su korišćeni glukoza (20 mM), monoaromatična ili poliaromatična jedinjenja. Kulture (50 ml) su gajene 48 h do 60 h u inkubatoru na 30°C, 200 obrt min<sup>-1</sup>. Ćelije su sakupljane centrifugiranjem (10 min , 5000 x g, 4°C, Eppendorf

Centrifuge 5804R), oprane dva puta u fosfatnom puferu (2 ml, 50 mM, pH 7.4) i potom zamrznute (-80°C) i osušene (FreeZone Plus 6 Liter Cascade Freeze Dry Systems, Labconco, Missouri, SAD).

### **3.3.7.1. Akumulacija PHA iz monoaromatičnih jedinjenja**

Monoaromatični ugljovodonici su uglavnom u tečnom stanju, hidrofobni su i slabo se mešaju sa vodom. Zbog toga su monoaromatični supstrati u MSM medijum dostavljani tako što je 350 µl supstrata sipano u centralni stakleni sud (prečnika 10 mm, visine 60 mm), kao što je prethodno opisano (Ward *et al.*, 2005). Iz centralnog suda zakačenog za grlo erlenmajera supstrat je isparavao i kroz paru dospevao do medijuma. Izolati su na monoaromatičnim supstratima gajeni 48 h.

U slučaju gajenja izolata na smešama (ksileni, benzen i njegovi derivati, ili benzen, toluen, etilbenzen i ksilen, *eng.* BTEX od Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene) korišćene su ekvimolarne količine monoaromatičnih jedinjenja takođe sipane u centralni stakleni sud u ukupnoj zapremini od 350 µl.

### **3.3.7.2. Akumulacija PHA iz poliaromatičnih jedinjenja**

Poliaromatični ugljovodonici pokazuju još veći stepen hidrofobnosti u odnosu na monoaromatične ugljovodonike i najčešće su u formi kristala. Ispitivan je uticaj različitih rastvarača (etanola, benzena, acetona i 1-pentanona) i sintetičkog surfaktanta Tween-a 80 na rastvorljivost poliaromatičnih supstrata u medijumu za rast izolata. Studije optimizacije dodavanja poliaromata u medijum su rađene sa naftalenom kao model supstratom. Korišćena je minimalna količina rastvarača u kojoj se moglo rastvoriti 96 mg naftalena (količina koja odgovara količini od 1.8 g ugljenika l<sup>-1</sup>): 1500 µl metanola, 250 µl benzena, 200 µl acetona i 200 µl 1-pentanona. Ovako rastvoren naftalen je dodavan u tri vremenske tačke: jedna četvrtina smeše je dodavana pri inokulaciji, polovina nakon 24 h kultivacije, i poslednja četvrtina nakon 48 h kultivacije. Za analizu efekta surfaktanta na rastvorljivost poliaromata Tween 80 (0.5 g l<sup>-1</sup>) je dodavan direktno u medijum pre inokulacije, dok su kristali naftalena (96 mg) dodavani u tri vremenske tačke (pri inokulaciji, nakon 24 h i 48 h kultivacije). Kulture su inkubirane ukupno 60 h.

Nakon utvrđivanja najbolje strategije za gajenje izolata u prisustvu poliaromata – MSM medijum sa smanjenom količinom azota u koji je dodavan Tween 80 ( $0.5 \text{ g l}^{-1}$ ), proveravana je akumulacija PHA iz ostalih poliaromatičnih jedinjenja. Osim naftalena, testirani su fenantren (11 mM, odnosno 95 mg na 50 ml medijuma), krizen (8.3 mM, odnosno 95 mg na 50 ml medijuma), 1-etilnaftalen (12.5 mM, odnosno 98 mg na 50 ml medijuma), 2-metilnaftalen (13.6 mM, odnosno 97 mg na 50 ml medijuma), i dimetilnaftalen (12.5 mM, odnosno 99 mg na 50 ml medijuma). Kada su izolati gajeni na smešama poliaromatičnih jedinjenja ukupna količina jedinjenja je bila tolika da odgovara količini od  $1.8 \text{ g ugljenika l}^{-1}$ . Smeša naftalena i fenantrena sadržala je 7.5 mM naftalen (48 mg na 50 ml medijuma) i 5.5 mM fenantren (48 mg na 50 ml medijuma); smeša naftalena i krizena je sadržala 7.5 mM naftalen (48 mg na 50 ml medijuma) i 4.2 mM krizen (48 mg na 50 ml medijuma); smeša fenantrena i krizena je sadržala 5.5 mM fenantren (48 mg na 50 ml medijuma) i 4.2 mM krizen (48 mg na 50 ml medijuma); smeša naftalena, fenantrena i krizena je sadržala 5 mM naftalen (32 mg na 50 ml medijuma), 3.6 mM fenantren (32 mg na 50 ml medijuma) i 2.8 mM krizen (32 mg na 50 ml medijuma).

### **3.4. Molekularno biološke metode**

#### **3.4.1. Izolovanje ukupne DNK iz bakterijskih izolata**

Za izolaciju ukupne DNK iz izolata korišćena je metoda razvijena najpre za bakterije roda *Streptomyces* (Nikodinovic *et al.*, 2003), ali se pokazala i kao veoma efikasna za izolaciju DNK iz drugih bakterija.

Ćelije su gajene u TSB medijumu (30 ml; odeljak 3.2.2.) preko noći na  $30^{\circ}\text{C}$  uz aeraciju od  $200 \text{ obrt min}^{-1}$ . Nakon inkubacije ćelije su sakupljane centrifugiranjem (5 min,  $4000 \times g$ , Eppendorf Centrifuge 5804R) i resuspendovane u rastvoru za lizu. Rastvor za lizu je sadržao 0.3 M saharozu, 25 mM EDTA i 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) i 2U RNaze A (Fermentas, Burlington, Kanada). Suspenziji je dodavan lizozim u koncentraciji od  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  i suspenzija je potom inkubirana 30 min na  $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$ . Potom je dodavana 1/10 zapremine 10% (w/v) SDS-a i  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  Proteinaze K i nastavljena je inkubacija 1.5 h na  $55^{\circ}\text{C}$  uz povremeno mešanje inverzijom. Na kraju je dodavana



1/3 zapremine 5M NaCl i 1 zapremina hloroforma nakon čega je uzorak inkubiran 30 min na 25°C uz čestu inverziju. Nakon centrifugiranja (20 min, 5000 x g, Eppendorf Centrifuge 5804R) gornja, vodena faza je prebacivana pipetom sa širokim vrhom u čistu epruvetu i dodavana je jednaka zapremina izopropanola. DNK je namotavana na zatopljenu Pasterovu pipetu, prebacivana u čistu eppendorf epruvetu i prana 70% (v/v) etanolom. Nakon pranja i sušenja taloga, DNK je rastvarana u 10% TE puferu (10 mM Tris-HCl pH 7.5 i 1 mM EDTA).

Kvalitet i kvantitet izolovane DNK utvrđivani su spektroskopski očitavanjem  $A_{260/280}$  (NanoVue, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

### **3.4.2. Sinteza DNK u reakciji lančane polimerizacije**

Reakcija lančane polimerizacije (*eng.* Polymerase Chain Reaction, **PCR**) zasniva se na tri procesa koji se sukcesivno ponavljaju: *in vitro* denaturacija dvolančane DNK matrice, hibridizacija (aniling od *eng.* annealing) prajmera sa matricom na osnovu komplementarnosti baza i ekstenzija prajmera DNK polimerazom (White, 1997).

Tokom ove studije za sintezu DNK u reakciji lančane polimerizacije korišćen je GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, USA), sledeći prajmeri (Tabela 2) i programi (Tabela 3).

**Tabela 2.** Sekvence prajmera korišćenih u ovom radu.

<b>Naziv</b>	<b>Sekvenca (5' – 3')</b>	<b>Referenca</b>
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Lane, 1991)
1492r	CGGCTACCTTGTTACGACTT	(Lane, 1991)
C12Of	GARTGGCCNYTNTTTYTNGAYGTN	(An <i>et al.</i> , 2001)
C12Or	NARRTGNARRTGNGCNGGNCCCA	(An <i>et al.</i> , 2001)
C23Of	AAGAGGCATGGGGGCGCACCGGTTTCGATCA	(Sei <i>et al.</i> , 1999)
C23Or	CCAGCAAACACCTCGTTGCGGTTGCC	(Sei <i>et al.</i> , 1999)
phaG_EcoRI	CTCTTAGGAGAATTCAGGCCAGAAATCGCTGTA	ovaj rad
phaG_NotI	TTATTATTAGCGGCCGCTCAGATGGCCAATGC	ovaj rad
phaA_BamHI	ACTTACGGATCCGAGTAACAAGAACAACGATGA	ovaj rad
phaA_HindIII	ACTTACAAGCTTTCAACGCTCGTGAACGTAGG	ovaj rad
phaC_BamHI	ACTTACGGATCCGACAGACAAACCGCCCAAAGG	ovaj rad
phaC_HindIII	ACTTACAAGCTTTCATCGGGTCAGCACGTAGG	ovaj rad
M13 forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAGTG	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)

**Tabela 3.** Programi korišćeni za PCR.

	<b>Temperatura</b>	<b>Vreme</b>	<b>Faza reakcije</b>	<b>Broj ciklusa</b>
Amplifikacija gena za 16S rRNK	95°C	5 min	Denaturacija DNK	1
	95°C	15 s		
	60°C	15 s	*Umnožavanje DNK	35
	72°C	15 s		
	72°C	10 min	Finalna elongacija	1
Amplifikacija gena za katehol 1,2-dioksigenazu	95°C	5 min	Denaturacija DNK	1
	95°C	1 min		
	61°C	30 s	Umnožavanje DNK	10
	72°C	30 s		
	95°C	1 min		15
	59°C	30 s	Umnožavanje DNK	
	72°C	30 s		
	95°C	1 min		
	57°C	30 s	Umnožavanje DNK	15
	72°C	30 s		
Amplifikacija gena za katehol 2,3-dioksigenazu	95°C	5 min	Denaturacija DNK	1
	95°C	1 min	Umnožavanje DNK	
	59°C	30 s		10
	72°C	30 s		
	95°C	1 min	Umnožavanje DNK	15
	57°C	30 s		
	72°C	30 s		
	95°C	1 min	Umnožavanje DNK	
	55°C	30 s		15
	72°C	30 s		
72°C	10 min	Finalna elongacija	1	

\* Pod umnožavanjem DNK se podrazumeva denaturacija DNK, aniling prajmera i elongacija.

**Tabela 3.** Programi korišćeni za PCR, nastavak.

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije	Broj ciklusa
Amplifikacija <i>phaG</i> gena	95°C	5 min	Denaturacija DNK	1
	95°C	40 s		
	62°C	1 min	*Umnožavanje DNK	35
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	Finalna elongacija	1
Amplifikacija <i>phaA</i> gena	95°C	5 min	Denaturacija DNK	1
	95°C	40 s		
	60°C	1 min	Umnožavanje DNK	35
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	Finalna elongacija	1
Amplifikacija <i>phaC</i> gena	95°C	5 min	Denaturacija DNK	1
	95°C	40 s		
	62°C	1 min	Umnožavanje DNK	35
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	Finalna elongacija	1

\*Pod umnožavanjem DNK se podrazumeva denaturacija DNK, aniling prajmera i elongacija.

#### 3.4.2.1. Umnožavanje gena za 16S rRNK

U cilju identifikacije izolata rađen je „colony“ PCR uz pomoć KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, Boston, SAD) po uputstvu proizvođača. Ovaj kit je specifično dizajniran za umnožavanje fragmenata dužih od 1000 bp i sa različitim GC sastavom (25-85%). Za umnožavanje 16S rDNK fragmenta korišćeni su univerzalni bakterijski prajmeri 27f i 1492r (Lane, 1991) prikazani u tabeli 1 i program prikazan u tabeli 3.

#### 3.4.2.2. Umnožavanje gena za katehol dioksigenaze

Upotrebom degenerisanih prajmera C12Of/C12Or i C23Of/C23Or (Tabela 2) umnožavan je centralni konzervisani region gena za katehol 1,2-dioksigenazu, odnosno gena za katehol 2,3-dioksigenazu. Reakcije su pripremane na sledeći način: svaki od prajmera bio je u koncentraciji od 1 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ . PCR reakciona smeša sadržala je još i 1.25 U IMMOLASE polimeraze (Bioline, UK), 1 x IMMOLASE pufer, dNTP smešu (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD) u finalnoj koncentraciji od 2 mM,

2.5 mM MgCl<sub>2</sub> i 3% DMSO. S obzirom da su korišćeni prajmeri sa visokim stepenom izrođenosti korišćen je „step down“ PCR program (Tabela 3) (Roux i Hecker, 1997).

#### **3.4.2.3. Umnožavanje gena za PHA ketotiolazu (*phaA*), polimerazu (*phaC*) i transacilazu (*phaG*)**

Upotrebom prajmera navedenih u tabeli 1 umnožavani su geni za PHA 3-ketotiolazu (*phaA*, 1800 bp), PHA polimerazu (*phaC*, 1700 bp) i PHA transacilazu (*phaG*, 900 bp). Reakcije su pripremane na isti način kao i reakcije za umnožavanje katehol dioksigenaza (odjeljak 3.4.2.3.), a programi korišćeni za umnožavanje ovih gena su prikazani u tabeli 2.

#### **3.4.3. Agarozna gel elektroforeza**

Rezultati izolacije DNK, reakcije lančane polimerizacije i sečenja restrikcionim enzimima analizirani su horizontalnom elektroforezom na 1% (w/v) agaroznim gelovima pripremanim u TBE puferu (TBE od Tris, Borna kiselina, EDTA; 10.9 g TRIS-a, 5.56 g borne kiseline i 0.93 g EDTA na 1 l destilovane vode). Etidijum bromid je dodavan u gel za elektroforezu u finalnoj koncentraciji od 0.5 µg ml<sup>-1</sup>. Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 8 V po dužnom centimetru gela.

Veličina DNK fragmenata je određivana poređenjem njihove elektroforetske pokretljivosti sa pokretljivošću standarda poznate molekulske mase. Kao marker molekulskih veličina korišćen su λ DNA – *EcoRI/HindIII* (564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3503, 4268, 4973, 5248, 21226 bp), O'RangeRuler™ 100 bp DNK marker (100-1500 bp; Fermentas, Burlington, Kanada) i O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker (100 – 3000 bp; Fermentas UAB, Lithuania).

Razdvajanje uzoraka praćeno je kretanjem fronta indikatorske boje (bromfenol plavo ili oranž G), a detekcija uzoraka na gelu vršena je osvetljavanjem gela ultraljubičastom svetlošću talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Germany).

#### 3.4.4. Ligiranje DNK fragmenata

Za ligiranje DNK molekula korišćen je pGEM-T Easy vektor sistem (Promega, SAD) prilagođen za direktno kloniranje PCR proizvoda dobijenih upotrebom polimeraza koje nemaju egzonukleaznu aktivnost, te ostavljaju A repiće na krajevima PCR proizvoda (White, 1997). Ligaciona smeša je pripremana prema uputstvu proizvođača i inkubirana je sat vremena na sobnoj temperaturi, a potom preko noći na 4°C. Rekombinantni plazmidi generisani na ovaj način su proveravani restrikcijom analizom i sekvenciranjem (Tabela 4).

**Tabela 4.** Izvor i relevantne karakteristike plazmida korišćenih u ovom radu.

Plazmid	Relevantne karakteristike	Referenca
pGEM-T Easy	Vektor za kloniranje PCR proizvoda, Amp <sup>r</sup>	Promega, SAD
pGEM-phaA	1800 bp <i>phaA</i> kloniran u pGEM-T Easy	Ovaj rad
pGEM-phaC	1700 bp <i>phaC</i> kloniran u pGEM-T Easy	Ovaj rad
pGEM-phaG	900 bp <i>phaG</i> kloniran u pGEM-T Easy	Ovaj rad

#### 3.4.5. Priprema i transformacija *E. coli* kompetentnih ćelija

Kompetentne *E. coli* DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>,  $\Delta$ *lac*, U169 ( $\Phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15), *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *gyrA96*, *endA1*, *thi-1*, *relA1*) ćelije su pripremane tako što su gajene u LB medijumu na 37°C uz snažnu aeraciju, do optičke gustine kulture od 0.5 na 600 nm (Hanahan, 1983). Nakon toga ćelijski rast je zaustavljen hlađenjem kulture (10 min, 4°C). Ohlađena kultura je taložena (10 min, 3000 x g, 4°C, Sorvall SS34, RC-5B Super Speed Centrifuge; Du Pont Instruments), ćelije iz taloga su resuspendovane u istoj zapremini hladnog 0.1 M CaCl<sub>2</sub> i inkubirane 15 minuta na ledu. Nakon inkubacije, ćelije su centrifugirane (10 min, 6 000 3000 x g, 4°C, Sorvall SS34, RC-5B Super Speed Centrifuge; Du Pont Instruments), resuspendovane u 12.5 puta manjoj zapremini hladnog RF2 pufera (10 mM MOPS, pH 6.8; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glicerol) i inkubirane 15 min, 4°C. Po završenoj inkubaciji, suspenzija ćelija je podeljena u alikvote od po 0.2 ml koji su trenutno zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na - 80°C do korišćenja.

Za proces transformacije zamrznute kompetentne ćelije su otapane na 4°C. Suspenziji kompetentnih ćelija dodavana je ligaciona smeša (1-2 µl, odeljak 3.4.4.) i suspenzija je inkubirana 15 min, 4°C. Nakon inkubacije ćelije su izlagane termičkom stresu: 2 min na 42°C i 5 min na 4°C. Ćelije su posttransformaciono oživljavane dodavanjem 0.8 ml neselektivnog bogatog medijuma i inkubiranjem uz intenzivnu aeraciju od 60 minuta. Ćelije su zatim zasejavane na selektivne podloge (LB agar, ampicilin (100 µg ml<sup>-1</sup>), IPTG (1 mM), X-gal (40 µg ml<sup>-1</sup>)) i inkubirane na 37°C do pojave transformanata. Efikasnost transformacije bila je od 10<sup>5</sup> - 10<sup>7</sup> transformanata po µg DNK.

#### **3.4.6. Izolacija i restrikciona analiza plazmida**

Kolonije dobijene nakon transformacije su gajene preko noći (37°C, 180 obrt min<sup>-1</sup>) u hranljivom LB medijumu sa dodatkom ampicilina (100 µg ml<sup>-1</sup>). Izolacija plazmida je rađena pomoću QIAprep Spin Miniprep kita (QIAGEN) prema uputstvu proizvođača. Za restrikcionu analizu su korišćeni komercijalni enzimi i odgovarajući puferi, a količina enzima, pufera i temperatura inkubacije su određivani prema savetu proizvođača.

#### **3.4.7. Sekvenciranje DNK**

PCR proizvodi ili restrikciono provereni plazmidi su sekvencirani na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Foster City, SAD), uz upotrebu komercijalnog kita za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA).

Reakciona smeša za sekvenciranje (8 µl) sadržala je: „Ready Reaction Mix“ (3 µl), prajmer kojim je vršeno sekvenciranje (3.2 pmol) i DNK koja se sekvencira (1-2 ng na 100 bp ukoliko se sekvencira PCR proizvod, odnosno 150 - 300 ng plazmida). Prvi korak sekvenciranja rađen je na PCR aparatu (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA ) korišćenjem sledećeg programa: (1) jedan ciklus inicijalne denaturacije (1 min na 96°C), (2) 25 ciklusa denaturacije (96°C, 10 s), anilinga prajmera (55°C, 5 s) i elongacija (60°C, 4 min).

Nevezani obeleženi nukleotidi su uklanjani dodavanjem 40 µl rastvora A (1.2 ml 3M CH<sub>3</sub>COONa, pH 5.2; 25 ml etanola; 5.8 ml destilovane vode) i centrifugiranjem

(10 min, 10000 x g, Eppendorf Centrifuge 5415 D). Nakon odlivanja supernatanta talog je ispiran 70% etanolom (200 µl) i centrifugiran (10 min, 10000 x g). Po odlivanju supernatanta korak ispiranja ponovljen je još jednom. Talog je osušen i rastvoren u HiDi formamidu (25 µl).

Analiza sekvenci rađena je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer programom SeqAnalyzer.

### **3.5. Taksonomska identifikacija bakterija**

#### **3.5.1. Bojenje po Gramu**

Bojenje bakterija rađeno je po proceduri koju je opisao Gram i zasniva se na razlikama u građi ćelijskog zida Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Bartholomew i Finkelstein, 1958). Kap bakterijske prekonoćne kulture je razmazana na mikroskopsku pločicu i nakon sušenja na vazduhu razmaz je fiksiran na plamenu. Preparat je bojen „Crystal violet“ bojom (inkubacija 2 min; stoka boje 20% w/v „Crystal violet“ boje u etanolu, radni rastvor: 1 ml stoka boje je mešan sa 10 ml vode i 40 ml rastvora oksalata (1% w/v)), nakon čega je boja ispirana vodom. Potom je preparat inkubiran 2 min sa Lugolovim rastvorom (0.3% w/v J<sub>2</sub>, 0.7% w/v KJ, 1% w/v NaHCO<sub>3</sub>). Višak lugola je odlivan, a preparat je inkubiran sa rastvorom etanola i acetona (30 s; aceton:96% etanol=v:v). Nakon odbojavanja preparata rastvorom etanola i acetona dodavana je boja „Safranin“ (inkubacija 30 s; stoka rastvora boje 2.5% „Safranin“ u etanolu, radni rastvor je pripreman mešanjem 1 ml stoka boje i 5 ml vode). Po isteku inkubacije preparat je ispiran vodom i sušen uz pomoć filter papira. Preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom (Olympus, U-RFLT-T, GmbH, Germany).

#### **3.5.2. Standardni biohemijski testovi za identifikaciju bakterija**

Za fenotipsku karakterizaciju bakterijskih sojeva koristi se set standardnih biohemijskih testova opisanih u knjizi „Methods for general and molecular microbiology“ (Tindall *et al.*, 2007).



**Lipaza test:** Prisustvo lipaze može se utvrđivati testiranjem sposobnost bakterija da hidrolizuju Tween 80 na oleinsku kiselinu i sorbitol. Bakterije se zasejavaju na specifičnu podlogu sa Tween-om 80, inkubiraju 24 h na 30°C i ukoliko je reakcija pozitivna oko kolonija se stvaraju zone prosvetljenja.

**Redukcija nitrata.** Ovim biohemijskim testom dokazuje se sposobnost mikroorganizama da redukuju nitrate u nitrite. Nakon zasejavanja, ispitivane kulture su inkubirane 96 h na 30°C. Nakon inkubacionog perioda u epruvete je dodat rastvor A (100 µl; 0.8% w/v sulfanilna kiselina u glacijalnoj sirćetnoj kiselini), potom i rastvor B (100 µl; 0.5% w/v alfa-naftilamin u glacijalnoj sirćetnoj kiselini). Pojava crvene boje je znak pozitivne reakcije.

**Korišćenje različitih izvora ugljenika.** Sposobnost bakterija da koriste različite izvore ugljenika (fruktoza, glukoza, ksiloza, saharoza, maltoza, glicerol i manitol) testirana je u MSM tečnom medijumu uz dodatak supstrata (1% w/v) kao jedinog izvora ugljenika. Kulture su gajene 48 h na 30°C uz aeraciju od 200 obrt min<sup>-1</sup>.

**Rast na različitim koncentracijama NaCl.** Ispitivani sojevi su zasejavani u 10 ml TSB medijuma sa rastućim koncentracijama NaCl, od 1% - 10% (w/v) i inkubirani na 30°C (250 obrt min<sup>-1</sup>, šejker sa horizontalnom platformom). Rast mikroorganizama praćen je 7 dana.

**Hidroliza eskulina.** Izolati su gajeni u 5 ml eskulin bujona (Torlak, Srbija) 48 h na 30°C. Detekcija je vršena dodavanjem nekoliko kapi 10% (w/v) FeCl<sub>3</sub>. Crna boja predstavlja indikaciju da soj razlaže eskulin.

**Korišćenje citrata.** Ispitivani mikroorganizmi su zasejavani na „Simson citrate agar“ (Torlak, Srbija) podloge i inkubirani 48 h na 30°C. Promene boje podloge iz zelene u plavu ukazuje da ispitivani soj koristi citrate kao izvor energije.

**Ispitivanje prisustva katalaze.** Ezom je zahvatana velika količina ćelija sa čvrste podloge koje su potom nanošene na sterilnu Petri šolju. Na ćelije je sipano 1-2 kapi 3% (w/v) vodonik peroksida. Ukoliko ispitivani soj poseduje enzim katalazu dolazi do burne reakcije uz oslobađanje mehurića kiseonika.

**Hidroliza uree.** „Christensen urea agar“ (Torlak, Srbija) je nakon sterilizacije razlivan u iskošene epruvete. Podloga razlivena u epruvete je ostavljena da se stegne, nakon čega je podloga postala žute boje. Zasejavanje je vršeno po kosini, a zasejana podloga je inkubirana 24-72 h na 30°C. Ukoliko mikroorganizam razlaže ureu pojavljuje se crvena boja.

**Proizvodnja indola.** Bakterije su zasejavane u bujon (odjeljak 3.2.2.) i inkubirane 24 h na 30°C, nakon čega je dodavan reagens po Ehrlich-u (1 ml; 8 g *p*-dimetilaminobenzaldehida, 760 ml 96% etanola i 160 ml koncentrovane HCl). Pojava crvenog prstena označava da mikroorganizam proizvodi indol.

**Hemoliza.** Za ispitivanje hemolitičke sposobnosti izolata korišćena je komercijalna podloga “Columbia blood agar” (Neogen Corporation, Scotland, UK) koja je suplementirana ovčijom krvlju. Izolati su na ovom medijumu gajeni preko noći na 37°C. Ukoliko bakterije stvaraju hemolizine, oko bakterijskih kolonija se pojavljuju prosvetljenja tj. zone hemolize u kojima je došlo do liziranja eritrocita. Na osnovu izgleda zone hemolize razlikuju se  $\alpha$  i  $\beta$ -hemoliza.  $\beta$ -hemoliza se odlikuje kompletnom lizom eritrocita i dekolorizacijom hemoglobina zbog čega je zona hemolize potpuno svetla, dok  $\alpha$ -hemoliza podrazumeva delimičnu lizu eritrocita i redukciju hemoglobina u methemoglobin zbog čega je zona zelenkaste boje.

### 3.5.3. Umnožavanje i sekvenciranje gena za 16S rRNK

Upotrebom univerzalnih bakterijskih prajmera (odjeljak 3.4.2., Tabela 2) umnožavani su geni za 16S rRNK. Dobijeni proizvodi su sekvencirani (odjeljak 3.4.7.), a dobijene sekvence su analizirane i preklapane u DNA Star SeqMan Pro softveru (DNASTAR Inc., USA) i identifikovane pomoću BLASTN algoritma (Altschul *et al.*, 1997). Za pretraživanje sličnih sekvenci deponovanih u GenBank bazi podataka korišćen je BLASTN program na NCBI serveru.

Sekvence 16S rDNK fragmenata bakterija izolovanih u ovoj studiji su deponovane u GenBank bazi podataka sa pristupnim brojevima: JN800323-JN800358, JN118576 i JN118577.

### 3.5.4. Filogenetska analiza bakterija

Dobijene sekvence 16S rRNK gena izolata su korišćene za pronalaženje sličnih sekvenci u okviru Ribosomal Database Project-II Release 10 (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>; (Cole *et al.*, 2009)). Nakon skraćivanja svih sekvenci do jednake dužine rađeno je poređenje sekvenci izolata sa sekvencama tipskih sojeva preuzetih iz RDP baze uz pomoć CLUSTALW algoritma (Thompson *et al.*, 1994). Filogenetska stabla su konstruisana korišćenjem „maximum-likelihood“ (ML) algoritma sa Jukes-Cantor korekcijom udaljenosti (oba algoritma su uključena u PHYLIP programski paket: <http://bioweb2.pasteur.fr/>; (Felsenstein, 1989)).

Filogenetsko stablo Gram-pozitivnih izolata je ukorenjeno korišćenjem sekvence gena za 16S rRNK *Pseudomonas putida* DSM 291<sup>T</sup>, a filogenetsko stablo Gram-negativnih izolata je ukorenjeno korišćenjem sekvence gena za 16S rRNK *Geobacter toluenoxydans* TMJ<sup>T</sup>.

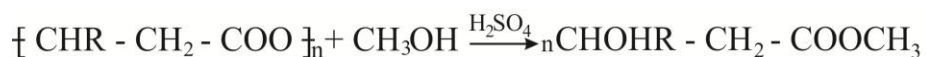
## 3.6. Analitičke metode

### 3.6.1. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je metodom po Bradford-u (Bradford, 1976), koja se zasniva na upotrebi bojenog reagensa tj. kiselog rastvora boje CBB G-250 (BioRad Protein Assay, BioRad Laboratories, USA). Za određivanje koncentracije proteina u rastvor proteina nepoznate koncentracije (0.8 ml) dodavano je 0.2 ml bojenog reagensa. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi merena je apsorbanacija na 595 nm ( $A_{595}$ , Ultrospec 3300, Amersham Biosciences). Koncentracija proteina je određivana na osnovu standardne krive koja predstavlja odnos poznatih koncentracija proteinskog standarda (BSA, *eng.* Bovin Serum Albumine) i odgovarajućih  $A_{595nm}$  vrednosti.

### 3.6.2. PHA esej

Utvrđivanje sadržaja i količine polimera se zasniva na metanolizi PHA iz ćelija (Brandl *et al.*, 1988; Lageveen *et al.*, 1988), prema sledećoj reakciji:



Ova reakcija se odigrava u prisustvu hloroforma koji omogućava solubilizaciju PHA i dobijenih proizvoda. Veoma bitan korak je potpuno uklanjanje vode iz uzoraka kako ne bi bilo kompeticije između reakcija hidrolize i metanolize. Nakon sušenja ćelija (odeljak 3.3.7.), 5 – 10 mg suve ćelijske mase (CDW od *eng.* Cell Dry Weight) materijala je prebacivano u „Pyrex“ epruvete (zapremina 20 ml) i dodavana je smeša sumporne kiseline i metanola (2 ml; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 15% : 85%). Potom je dodavan unutrašnji standard (2 ml; 10 mM metilbenzoat u hloroformu). Rastvor je mešan invertovanjem i inkubiran 2 h u uljanom kupatilu na 100°C. Potom je rastvor hlađen (5 min, 4°C), nakon čega je dodavan 1 ml dH<sub>2</sub>O. Smeša je centrifugirana (5 min, 4000 x g, Eppendorf Centrifuge 5804R). Ovim korakom je uklanjan veći deo ćelijskog materijala. Nakon centrifugiranja sakupljana je donja, hloroformska faza i filtrirana kroz kolonice sa pamučnom vatom. Dobijeni 3-hidroksialkanski metil estri su analizirani na gasnom hromatografu (Hewlett Packard HP6890 hromatograf opremljen BP-20 kapilarnom kolonom; 30 m X 0.25 mm, 0.25 mm debljine filma; J & W Scientific i detektorom sa jonizacionim plamenom („flame-ionization“ detector, FID)). Korišćen je sledeći temperaturni program: 60°C 3 min; povećanje temperature do 200°C u inkrementima od 5°C min<sup>-1</sup>, 200°C 1 min. Gasni hromatograf omogućava razdvajanje 3-hidroksialkanskih metil estara. Rezultujući hromatogram omogućava determinaciju kako ukupnog sadržaja PHA (izražava se kao procenat CDW) tako i sastava PHA. Količina i odnos monomera je utvrđivan na osnovu relativnih visina pikova u odnosu na unutrašnji standard i PHA standard. Površine ispod pikova predstavljale su ukupnu detektovanu količinu PHA. U kombinaciji sa podatkom o količini CDW računat je PHA sadržaj ćelije.

### 3.6.3. Esej za utvrđivanje koncentracije azota

Koncentracija azota u medijumu je utvrđivana metodom koja se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji NH<sub>3</sub> ili NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (nastaju biohemijskom razgradnjom jedinjenja sa azotom) sa fenolom i alkalnim hipohloritnim reagensom, usled čega se razvija plava boja (Scheiner, 1976). Za spektrofotometrijsko utvrđivanje koncentracije azota korišćeno je serijsko razblaženje (10<sup>-2</sup>) supernatanta bakterijske kulture (1 ml).

Razblaženju supernatanta je dodat fenol-nitroprusidni pufer (400  $\mu$ l; 1.3%  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 3% trobaznog Na-citrata, 0.3% EDTA, 6% fenol, 0.02% Na-nitroprusid, pH 12) i sadržaj je mešan. Nakon fenol-nitroprusid pufera dodat je alkalni hipohloritni reagens (600  $\mu$ l; 40 ml 1M NaOH dodavano 2.5 ml rastvora Na-hipohlorita (sadrži 4% raspoloživog hlora) i dopunjavano Millipore  $\text{dH}_2\text{O}$  do 100 ml) i sadržaj je mešan invertovanjem kivete.

Po dodavanju oba reagensa reakcija se inkubira 45 min na sobnoj temperaturi, u mraku da bi se razvila plava boja. Po isteku inkubacije očitana je apsorbancna na 635 nm ( $A_{635}$ , Ultrospec 3300, Amersham Biosciences), a koncentracija azota je utvrđivana na osnovu standardne krive koja je sadržala  $A_{635}$  za različite poznate koncentracije  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka rečnog sedimenta

Petrohemijska industrija predstavlja jedan od glavnih izvora zagađenja zemljišta i rečnog sedimenta aromatičnim ugljovodonicima. Ovakvi uslovi životne sredine su veoma nepovoljni s obzirom na to da narušavaju osnovne procese u zemljištu, a samim tim i funkcionisanje zemljišnog ekosistema. Sa druge strane, očekuje se da se u ovako zagađenoj sredini mogu naći bakterije koje su prilagođene životu u prisustvu polutanata, kao i bakterije sa sposobnošću korišćenja polutanata kao jedinog izvora hrane. Zato su uzorci korišćeni u ovoj studiji uzimani u neposrednoj blizini petrohemijske industrije. Uzorci rečnih sedimenta su uzeti sa četiri lokacije, kao što je opisano u odeljku 3.1. Uzorak označen sa S1 je sediment kanala za ispuštanje prerađenih otpadnih voda iz petrohemijske industrije. Uzorci S2 i S3 su sedimenti reke Dunav uzeti u relativnoj blizini mesta ulivanja kanala u Dunav, pa je očekivano da postoji izvestan uticaj efluenata petrohemijske industrije kako na fizičko-hemijski sastav ovih uzoraka tako i na prisutnu mikrobiološku zajednicu. Mesto uzimanja četvrtog uzorka (sediment Tamiša, S4) oko 5 km uzvodno od ulivanja reke Tamiš u Dunav, a u krugu od 10 km udaljenosti od mesta uzorkovanja S1.

Najpre je urađena hemijska analiza uzoraka koja je podrazumevala merenje pH, elementalnu analizu i analizu prisustva teških metala. pH vrednost svih uzoraka je bila u opsegu 6.5 do 7.2.

Sastav osnovnih elemenata uzoraka, odnosno ukupne količine ugljenika, azota, vodonika i sumpora su određivane prema protokolu opisanom u odeljku 3.1.1. Pokazano je da je u uzorku S1 (sediment kanala za ispuštanje prerađenih otpadnih voda) bilo 6.3 do 9.5 puta više ukupnog ugljenika nego u preostala tri uzorka (Tabela 5). U ovom uzorku su takođe značajno bile povišene količine azota (od 6.2 do 9 puta) i vodonika (od 2.7 do 4.4 puta) u odnosu na druge uzorke. Sumpor je detektovan jedino u uzorku S1 (Tabela 5).

Metodom opisanom u odeljku 3.1.2 rađena je kvalitativna i kvantitativna procena teških metala u uzorcima rečnog sedimenta. U sva četiri uzorka su detektovani Cd, Hg, Ni, Pb i Zn, s tim što je u uzorku S1 bilo od 20 do 56.3 puta više Hg, od 2.3 do 4.2 puta više Ni i od 4.4 do 6.1 puta Zn u odnosu na ostala tri uzorka (Tabela 5). U uzorku S1 je nađena i povišena koncentracija Cd od 2.4 puta u odnosu na S2, odnosno 2.1 put u odnosu na S3 uzorak. Najveća koncentracija Pb je detektovana u u zorku S4, i bila je od 1.2 do 2.3 puta viša u odnosu na ostale uzorke (Tabela 5).

**Tabela 5.** Mikro- i analiza prisustva teških metala u uzorcima sedimenata kanala za ispušt prerađenih otpadnih voda (S1), Dunava uzvodno od mesta ulivanja kanala (S2), Dunava nizvodno od mesta ulivanja kanala (S3) i Tamiša (S4).

		Uzorak rečnog sedimenta			
		S1	S2	S3	S4
<b>Mikroanaliza</b> (g kg <sup>-1</sup> )	<b>C</b>	190.1	20.6	30.2	20.9
	<b>N</b>	9.4	<1	1.4	1.5
	<b>H</b>	20.3	4.6	5.3	7.6
	<b>S</b>	5.9	nd*	nd	nd
<b>Metali (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cd</b>	1.7	0.7	0.8	1.3
	<b>Hg</b>	90.1	1.6	2.0	4.5
	<b>Ni</b>	40.7	9.6	11.5	17.5
	<b>Pb</b>	3.1	1.6	1.9	3.8
	<b>Zn</b>	302.8	49.3	58.5	68.4

\* nd – nije detektovano

## 4.2. Izolacija bakterija iz rečnog sedimenta

Jedan od ciljeva ove teze bio je izolacija robustnih bakterija iz uzoraka potencijalno kontaminiranih petrohemijskim efluentima. Da bi se procenio broj vijabilnih bakterija u uzorcima sedimenta uzorci su prvo zasejeni na LA medijum (odjeljak 3.2.2.) i nakon 48 h rasta prebrojan je broj kolonija. Na osnovu formule za izračunavanje broja ćelija po gramu uzorka (CFU, eng. Colony Forming Unit; odeljak 3.2.4.) vidi se da je u sva četiri uzorka broj vijabilnih bakterija istog reda veličine, s tim što je u uzorku S1 bilo od 1.1 do 1.4 puta više bakterija u odnosu na ostala tri uzorka (Tabela 6.).

**Tabela 6.** Procena broja ćelija u uzorcima sedimenta kanala za ispuštanje prerađenih otpadnih voda (S1), reke Dunav (S2 i S3) i reke Tamiš (S4).

		Uzorak rečnog sedimenta				
		medijum	S1	S2	S3	S4
CFU br.ćel.g <sup>-1</sup>	LA		$3.4 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$
	SCA		$2.4 \times 10^6$	$9 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$
	MSM*		$1.6 \times 10^5$	$7 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$

\*strategija predobogaćivanja uzorka uz korišćenje naftalena kao jedinog izvora ugljenika.

Za izolaciju bakterija iz uzoraka sedimenta korišćene su dve strategije: za selekciju Gram-pozitivnih bakterija i selekciju Gram-negativnih izolata sa sposobnošću degradacije poliaromatičnih ugljovodonika, opisane u poglavlju 3.2.4.

### 4.2.1. Selektivna izolacija Gram-pozitivnih bakterija

Prva strategija selektivne kultivacije je podrazumevala upotrebu toplotnog pretretmana uzorka (isušivanje) i medijuma koji stimuliše rast i sporulaciju Gram-pozitivnih *Actinobacteria* (Hopwood *et al.*, 1985). Nakon 7 dana inkubacije prebrojane su kolonije i izračunate su CFU vrednosti (Tabela 6). U uzorku S1 je dobijen najveći broj bakterija kultivisanih ovim pristupom: 2.7 puta više nego u uzorku S2, 2 puta više nego u S3 i 1.7 put više nego u S4. Selektujući karakteristike kolonija, kao što su sporulacija, koričasta morfologija za dalji rad je odabrano 218 morfološki različitih bakterija izolovanih na SCA medijumu.



#### **4.2.2. Selektivna izolacija bakterija korišćenjem pretretmana naftalenom**

Druga strategija izolovanja je podrazumevala upotrebu naftalena kao selektivnog pritiska za izolaciju bakterija sa sposobnošću korišćenja ovog poliaromatičnog jedinjenja kao jedinog izvora ugljenika (Long *et al.*, 2009). Nakon 96 h rasta prebrojane su pojedinačne kolonije i određen je CFU za svaki uzorak (Tabela 6). I ovim pristupom je dobijena najviša CFU vrednost za uzorak S1 i bila je 2.3, 1.5, odnosno 1.2 puta viša u odnosu na CFU vrednosti za uzorke S2, S3, odnosno S4.

Da bi se obezbedila što veća raznovrsnost izolata, nakon kultivacije bakterija ovim pristupom odabrano je 7 morfološki različitih sojeva koji su najbrže rasli u toku 24 h na MSM medijumu sa naftalenom kao jedinim izvorom ugljenika i energije (odjeljak 3.2.4.).

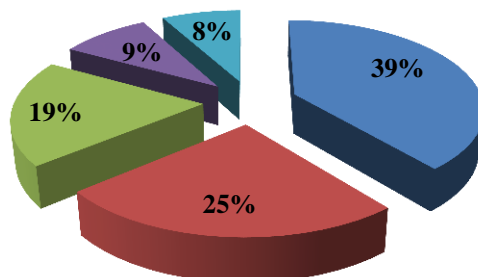
Za dalji rad je odabrano ukupno 225 morfološki različitih izolata poreklom iz sva četiri uzorka i dobijenih korišćenjem obe strategije izolacije.

### **4.3. Katabolički potencijal za razgradnju aromatičnih ugljovodonika i identifikacija izolovanih bakterija**

#### **4.3.1. Sposobnost izolata da degraduju aromatična jedinjenja**

Svi izolati su testirani za sposobnost rasta na 15 različitih aromatičnih ugljovodonika koji su često prisutni u industrijskim efluentima (Slika 16). Inicijalno testiranje je rađeno na minimalnim čvrstim podlogama sa dodatkom aromatičnog jedinjenja kao jedinog izvora ugljenika i energije. Od ukupno 225 izolata 88 (39%) nije moglo da koristi ni jedan od testiranih jedinjenja kao jedini izvor ugljenika, dok je 61% izolata moglo da koristi barem jedan od ponuđenih supstrata. Najveći broj izolata (56) je mogao da koristi do tri aromatična supstrata, 43 izolata su imala sposobnost korišćenja od 4 do 8 različitih jedinjenja, 20 je koristilo 9-14, dok je 18 izolata imalo sposobnost korišćenja svih 15 testiranih jedinjenja (Slika 15). Poslednje dve grupe izolata sa sposobnošću rasta na više od 9 aromatičnih jedinjenja, ukupno njih 38 predstavljale su

bakterije sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih jedinjenja i odabrane su za dalje analize (Slika 16).

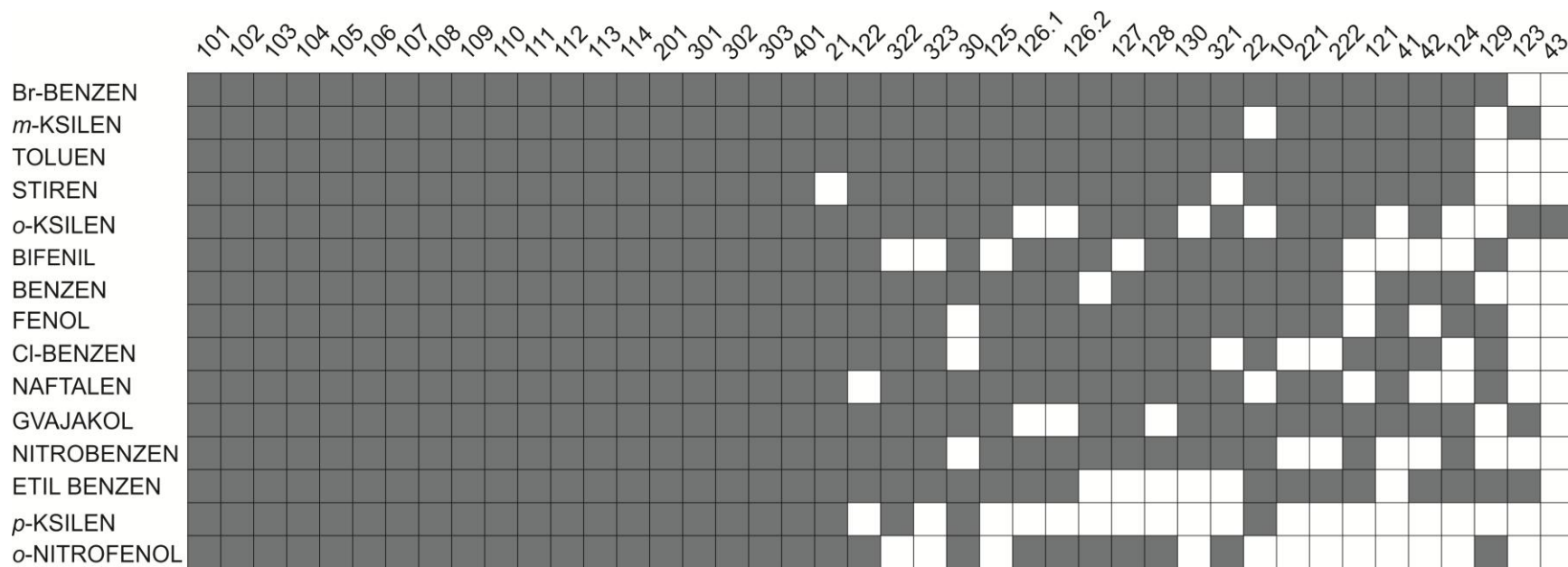


**Slika 15.** Sposobnost izolata da degraduju aromatična jedinjenja (■ - 0 jedinjenja; ■ - 1-3 jedinjenja;

■ - 4-8 jedinjenja; ■ - 9-14 jedinjenja, ■ - 15 jedinjenja).

Od 38 izolata sa sposobnošću rasta na 9 i više aromatičnih jedinjenja čak 61% je bilo poreklom iz sedimenta kanala za ispuštanje prerađenih otpadnih voda (S1). Među izolatima sa sposobnošću rasta na svih 15 jedinjenja (18 izolata) čak 13 je bilo poreklom iz uzorka S1 (Slika 16). Među izolatima sa sposobnošću degradacije 9 i više aromatičnih jedinjenja 13% je bilo poreklom iz sedimenta Dunava uzvodno od mesta ulivanja kanala (S2), 18% iz sedimenta Dunava nizvodno od mesta ulivanja kanala i 8% poreklom iz sedimenta Tamiša (S4).

Svih 38 izolata je imalo sposobnost korišćenja toluena i Br-benzena kao jedinih izvora ugljenika i energije. Sa druge strane, najslabije korišćeni supstrati bili su *o*-nitrofenol (moglo je da ga koristiti 25 izolata) i *p*-ksilen (supstrat za 22 izolata) (Slika 16).

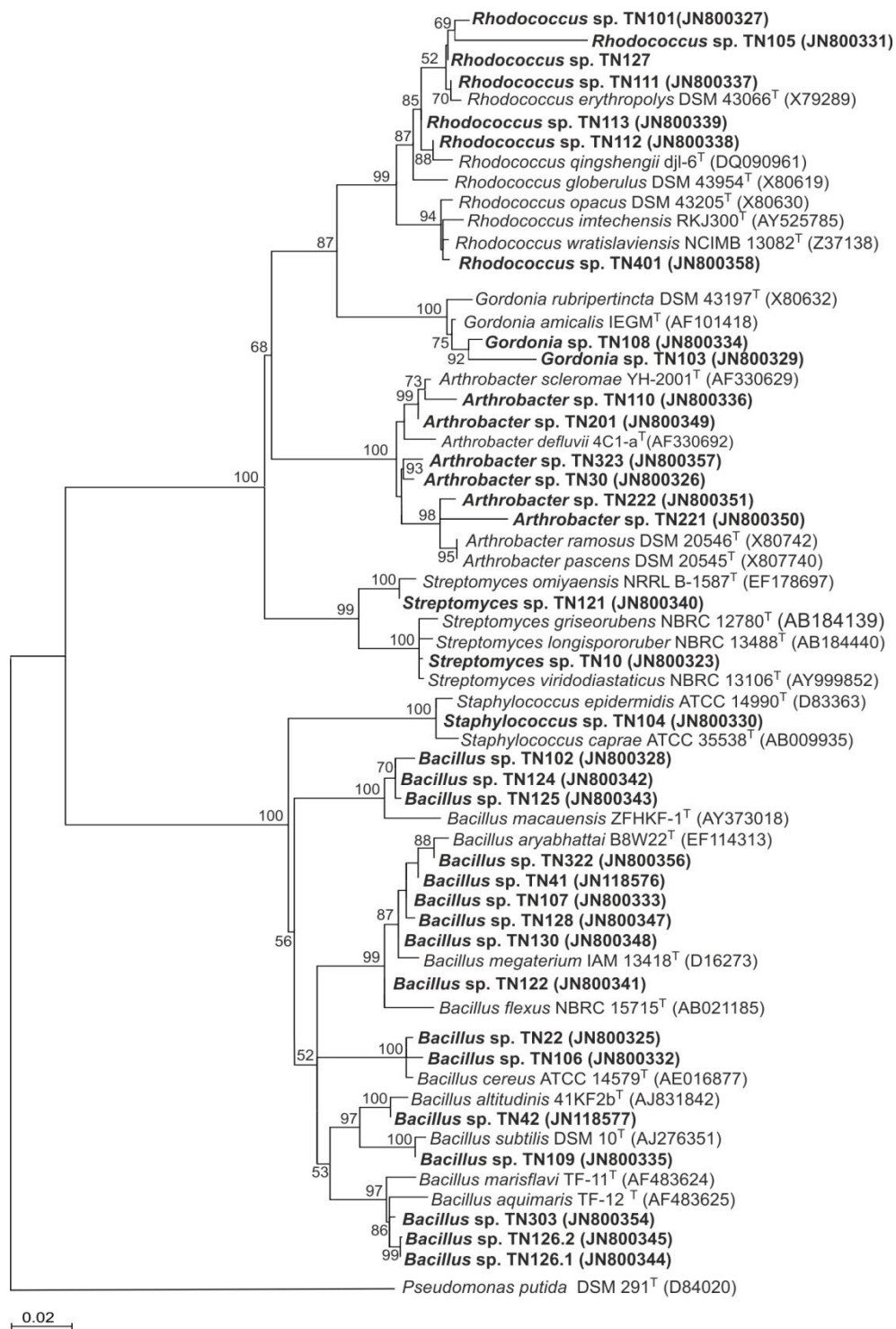


**Slika 16.** Rast bakterija izolovanih iz zagađenog površinskog rečnog sedimenta na aromatičnim ugljovodonicima. Izolati su gajeni na čvrstom MSM medijumu sa aromatičnim jedinjenjem kao jedinim izvorom ugljenika i energije (■ - rast i □ - odsustvo rasta u prisustvu datog supstrata).

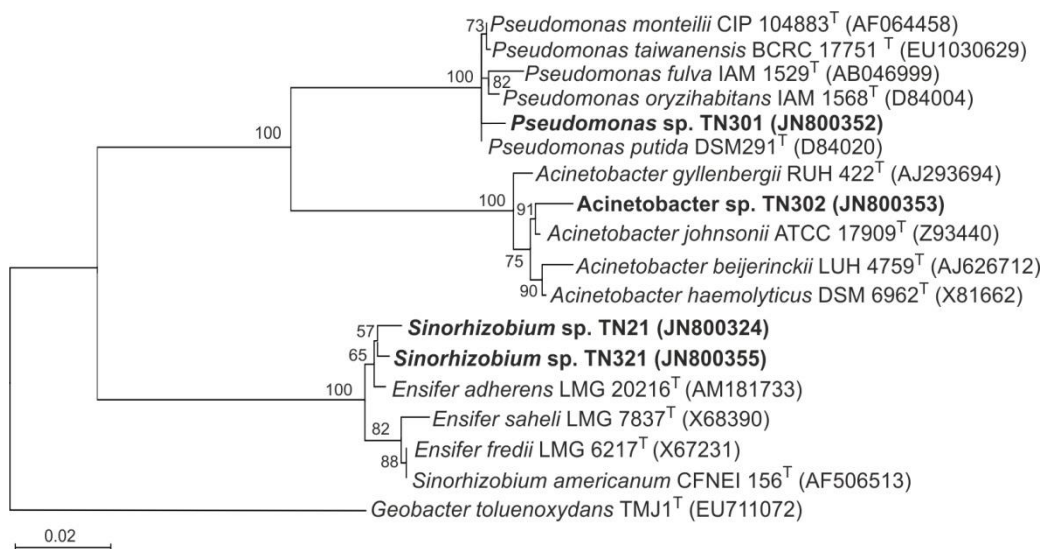
#### 4.3.2. Identifikacija izolata na osnovu sekvence gena za 16S rRNK i filogenetska analiza

Svih 38 izolata sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih jedinjenja je identifikovano na osnovu sekvenciranja gena za 16S rRNK. Čak 34 izolata je pripadalo grupi Gram-pozitivnih bakterija: 16 bakterija je na osnovu 16S rDNK sekvence svrstano u rod *Bacillus*, 7 u rod *Rhodococcus*, 6 u rod *Arthrobacter*, dve bakterije pripadaju rodu *Streptomyces* (TN10 i TN121), dve rodu *Gordonia* (TN103 i TN108) i jedna bakterija rodu *Staphylococcus* (TN104). Preostala četiri izolata bili su Gram-negativni *Sinorhizobium* sp. (TN21 i TN321), *Acinetobacter* sp. (TN302) i *Pseudomonas* sp. (TN301). Pristupni brojevi sekvenci u NCBI bazi podataka su JN800323-JN800358, JN118576 i JN118577.

Da bi se utvrdio filogenetski odnos izolovanih sojeva sa već opisanim bakterijskim vrstama konstruisana su filogenetska stable za Gram-pozitivne (Slika 17) i Gram-negativne izolate (Slika 18). Filogenetsko stablo Gram-pozitivnih izolata sastavljeno je od dve nezavisne klade: *Actinomycetales* (*Gordonia*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* i *Streptomyces*) i *Bacillales* (*Bacillus* i *Staphylococcus*) (Slika 17). Svi izolati su pokazivali od 93% do 100% homologije sekvenci sa najsvrodnijim sekvencama deponovanim u GenBank. Izolati TN105, TN221 i TN103 identifikovani kao *Rhodococcus* sp. TN105, *Arthrobacter* sp. TN221 i *Gordonia* sp. TN103 su u filogenetskoj analizi pokazali 93%, 94% i 95% sličnosti u sekvenci sa najsvrodnijim vrstama. Na filogenetskom stablu ovi izolati su smešteni na dužim granama u odnosu na najsvrodnije vrste što ukazuje na veću gensku distancu. Nizak procenat sličnosti u 16S rDNK sekvenci kao i pozicija ovih sojeva na filogenetskom stablu u odnosu na najsvrodnije vrste ukazuje da su *Rhodococcus* sp. TN105, *Arthrobacter* sp. TN221 i *Gordonia* sp. TN103 novi bakterijski sojevi. Na filogenetskom stablu Gram-negativnih bakterija se mogu uočiti dve nezavisne klade: *Rhizobiales* (*Sinorhizobium* TN21 i TN321) i *Pseudomonadales* (*Pseudomonas* sp. TN301 i *Acinetobacter* sp. TN302). Svi Gram-negativni izolati su pokazivali 99% sličnosti u sekvenci gena za 16S rRNK sa najsvrodnijim GenBank sekvencama (Slika 18).



**Slika 17.** Filogenetsko stablo Gram-pozitivnih izolata konstruisano na osnovu sekvenci gena za 16S rRNK. Bakterije izolovane u ovom radu su prikazane podebljanim slovima.



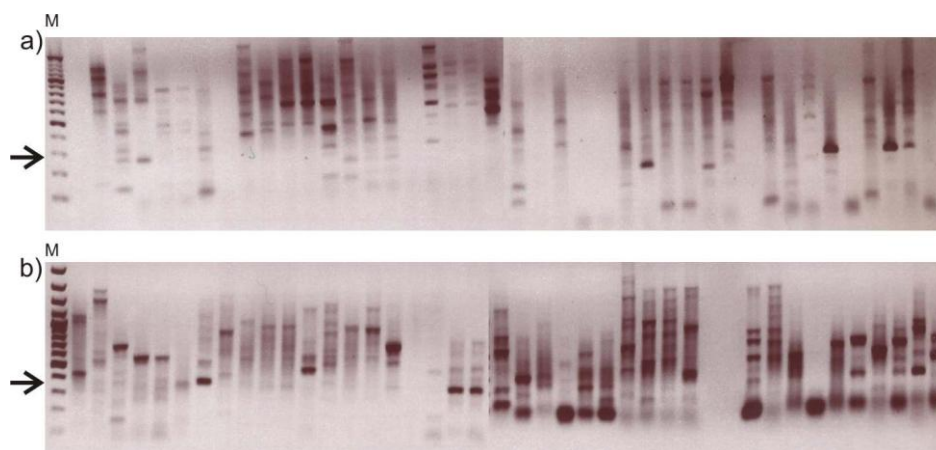
**Slika 18.** Filogenetsko stablo Gram-negativnih izolata konstrisano na osnovu sekvenci gena za 16S rRNK. Gram-negativne bakterije izolovane u ovom radu su prikazane podebljanim slovima.

Među Gram-pozitivnim bakterijama njih 16 je imalo sposobnost rasta na svih 15 testiranih jedinjenja. U ovoj grupi izolata sa mogućnošću degradacije širokog spektra aromatičnih jedinjenja nalaze se 6 sojeva koji pripadaju rodu *Rhodococcus* (TN101, TN105, TN111, TN112, TN113 i TN401), 5 *Bacillus*-a (TN102, TN106, TN107, TN109 i TN301), dva izolata koja pripadaju rodu *Gordonia* (TN103 i TN108), *Arthrobacter* sp. TN110 i TN201, kao i *Staphylococcus* sp. TN104. Izolati *Pseudomonas* sp. TN301 i *Acinetobacter* sp. TN302 su takođe mogli da koriste svih 15 aromatičnih supstrata.

#### 4.3.3. Prisustvo gena za katehol 1,2- i katehol 2,3-dioksidenu kod izabranih izolata

Aerobna degradacija najvećeg broja aromatičnih jedinjenja se vrši preko katehola ili njegovih derivata. Katehol 1,2- i katehol 2,3-dioksidenu su enzimi koji učestvuju u otvaranju aromatičnog prstena katehola i predstavljaju centralne enzime katabolizma najvećeg broja aromatičnih jedinjenja (Hendrickx *et al.*, 2006).

Upotrebom degenerisanih prajmera (odjeljak 3.4.2.2.) umnoženi su centralni konzervisani regioni gena za katehol 1,2-dioksidenu i katehol 2,3-dioksidenu (Slika 19). Kod 8 izolata je umnožen fragment gena za katehol 1,2-dioksidenu (C12O) očekivane dužine od 280 bp (Slika 19a), ali je nakon sekvenciranja PCR proizvoda potvrđeno prisustvo gena za C12O samo kod izolata *Pseudomonas* sp. TN301 (Prilog 1). Najveću sličnost i na nukleotidnom (95%) i na aminokiselinskom nivou (98%) sekvenca centralnog konzervisanog regiona C12O gena ovog izolata pokazivala je sa *catA* genom *P. putida* F1.



**Slika 19.** Analiza PCR proizvoda dobijenih umnožavanjem konzervisanog regiona gena za a) katehol 1,2-dioksidenu (C12O, 280 bp) i b) katehol 2,3-dioksidenu (C23O, 380 bp). M- Gene Ruler (Fermentas); strelice pokazuju na očekivanu veličinu fragmenta.

Od ukupno 10 izolata kod kojih je umnožen fragment odgovarajuće dužine (380 bp; Slika 19b), nakon sekvenciranja je potvrđeno prisustvo gena za katehol 2,3-dioksidenu (C23O) kod tri izolata *Bacillus* sp. TN124, *Bacillus* sp. TN125 i *Bacillus* sp. TN126.2 (Prilog 2). Sekvenca centralnog regiona C23O gena sva tri izolata je pokazivao 100% sličnosti sa deponovanim parcijalnim sekvencama C23O gena nekultivisanih bakterija u NCBI bazi podataka. Ova tri izolata su pokazivala različit katabolički potencijal: izolati TN125 i TN126.2 su mogli da rastu na po 13 testiranih jedinjenja, ali su se razlikovali po tome što TN125 nije imao sposobnost degradacije *o*-nitrofenola i bifenila, dok TN126.2 nije imao sposobnost degradacije *o*-ksilena i gvajakola. Izolat TN124 je imao sposobnost rasta na svega 9 testiranih jedinjenja (Slika 16). Međutim, konzervisani regioni gena njihovih centralnih kataboličkih enzima međusobno su pokazivali 99% sličnosti u nukleotidnoj sekvenci.

#### **4.4. Metabolička raznovrsnost Gram-pozitivnih izolata**

S obzirom na to da su Gram-pozitivne bakterije relativno malo izučavane u pogledu njihove sposobnosti da degraduju aromatična jedinjenja kao jedan od ciljeva ovog rada postavljena je izolacija i identifikacija Gram-pozitivnih bakterija koje mogu da opstaju u sredini zagađenoj mešovitim polutantima i koje bi mogle imati primenu u bioremedijaciji.

##### **4.4.1. Rast Gram-pozitivnih izolata na različitim temperaturama i pri povišenim koncentracijama soli**

Ispitivana je sposobnost Gram-pozitivnih izolata da rastu u opsegu temperatura od 5°C do 42°C. Od 34 Gram-pozitivna izolata polovina je mogla da raste optimalno na temperaturama od 28°C do 32°C u laboratorijskim uslovima. *Bacillus* sp. TN42, *Rhodococcus* sp. TN401 su pokazali sposobnost rasta na bogatom medijumu u širokom opsegu temperatura (5°C-42°C), dok izolati TN30 i TN113 nisu mogli da rastu na temperaturama preko 32°C. Ukupno 13 izolata je moglo da raste na višim temperaturama, uključujući 42°C (TN10, TN22, TN41, TN105, TN106, TN107, TN109, TN122, TN125, TN128, TN130, TN222, TN322), ali ne i na temperaturama ispod 15°C. Izolat *Rhodococcus* sp. TN401 je dakle imao sposobnost rasta na svim testiranim jedinjenjima i u širokom opsegu temperatura.

Takođe je ispitivana sposobnost izolata da tolerišu povišene koncentracije soli. Od svih Gram-pozitivnih izolata samo dva su pokazivala dobar rast na bogatom medijumu u prisustvu 10% NaCl na 30°C i to su bili *Bacillus* sp. TN122 i *Bacillus* sp. TN128.

##### **4.4.2. Rast Gram-pozitivnih izolata u prisustvu povišenih koncentracija teških metala**

S obzirom na to da je kombinovano zagađenje životne sredine aromatičnim ugljovodonicima i metalima veoma često (Deeb i Altalhi, 2009; Pepi *et al.*, 2009), kao i da je opisan inhibitorski efekat teških metala na aktivnost bakterijskih enzima uključenih



u katabolizam aromatičnih jedinjenja (Pepi *et al.*, 2008) testirana je tolerancija Gram-pozitivnih izolata na prisustvo visokih koncentracija teških metala (odjeljak 3.3.3).

Za testiranje su odabrani sledeći metali:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . Kada su upotrebljene koncentracije metala 20 puta veće u odnosu na maksimalne koncentracije dozvoljene Pravilnikom o štetnim materijama Ministarstva životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja 31 soj je pokazao rast u prisustvu  $17 \mu\text{M Ni}^{2+}$ , 16 u prisustvu  $535 \mu\text{M Cd}^{2+}$ , pet u prisustvu  $270 \mu\text{M Hg}^{2+}$ , tri u prisustvu  $892 \mu\text{M Fe}^{3+}$  i 6 u prisustvu  $31.5 \text{ mM Cu}^{2+}$ . Nijedan od sojeva nije rastao u prisustvu  $92.5 \text{ mM Zn}^{2+}$ . Kada su upotrebljene koncentracije koje odgovaraju  $100 \text{ mM}$  koncentraciji metalnog jona broj sojeva koji su mogli tolerisati ove metale je značajno redukovan. Svega dva soja su mogla da rastu u prisustvu  $100 \text{ mM Ni}^{2+}$ , jedan u prisustvu  $\text{Cd}^{2+}$ , tri u prisustvu  $\text{Hg}^{2+}$ , dva u prisustvu  $\text{Fe}^{3+}$  i pet izolata u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$  (Tabela 7). Među svim bakterijama izdvojio se izolat *Bacillus* sp. TN303 koji je pokazivao rast u prisustvu izuzetno visoke koncentracije tri teška metala ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ).

Da bi se ispitao potencijalni efekat teških metala na rast sojeva u prisustvu aromatičnih jedinjenja kao jedinih izvora ugljenika i energije testirana je sposobnost korišćenja toluena, odnosno naftalena kao supstrata a u prisustvu metala. Pokazano je da su sojevi koji su ispoljili toleranciju na visoke koncentracije teških metala u prisustvu laktata kao izvora ugljenika zadržali tu sposobnost kada je laktat zamenjen toluenom, odnosno naftalenom. Dakle, sposobnost degradacije aromatičnih jedinjenja kod ovih izolata nije narušena prisustvom teških metala.

#### **4.4.3. Rast Gram-pozitivnih izolata u prisustvu antibiotika**

Takođe je ispitivan rast izolata u prisustvu šest različitih antibiotika (Tabela 7). Najrasprostranjenija je bila rezistencija na ampicilin (13 sojeva), dok je rezistenciju na tetraciklin pokazao samo *Bacillus* sp. TN107. Interesantno je da *Bacillus* sp. TN303 koji je imao sposobnost degradacije svih 15 testiranih aromatičnih jedinjenja, tolerisao  $100 \text{ mM}$  koncentracije tri metala takođe ispoljavao rezistenciju na četiri od šest testiranih antibiotika (ampicilin, nalidiksinska kiselina, eritromicin i kanamicin).

**Tabela 7.** Izolati sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih ugljovodonika i njihov rast na teškim metalima i antibioticima

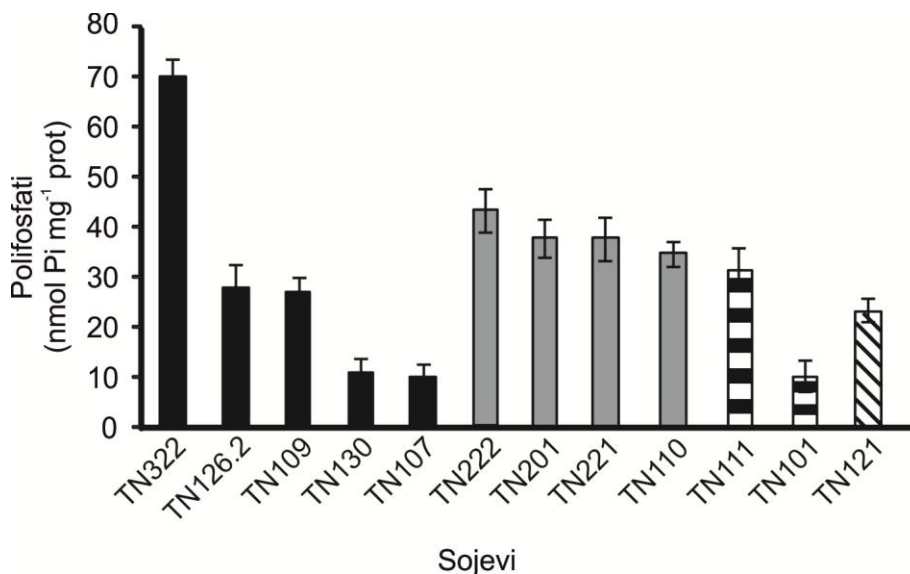
Izolat	Metal <sup>a</sup> (100 mM)	Antibiotik <sup>b</sup>					
		Am <sup>c</sup>	NA	Er	Km	Rf	Te
TN303	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	+	+	+	+		
TN112	Cd <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>				+		
TN221	Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>						
TN113	Cu <sup>2+</sup>	+	+	+			
TN101	Hg <sup>2+</sup>				+		
TN102	Cu <sup>2+</sup>	+					
TN127	Ni <sup>2+</sup>	+					
TN401	Cu <sup>2+</sup>						
TN107		+		+			+
TN125		+	+				
TN104		+		+			
TN105		+					
TN106		+					
TN201			+				
TN30			+				
TN41						+	
TN42						+	
TN10		+					
TN111					+		
TN122				+			

<sup>a</sup> Izolati su gajeni na čvrstom MT medijumu sa laktatom kao izvorom ugljenika i solima metala (NiCl<sub>2</sub>, CdSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> and CuSO<sub>4</sub>) u koncentracijama koje odgovaraju 100 mM metalnom jonu. <sup>b</sup> Am – ampicilin, 100 µg ml<sup>-1</sup>; NA – nalidiksinska kiselina, 40 µg ml<sup>-1</sup>; Er – eritromicin, 30 µg ml<sup>-1</sup>; Km – kanamicin, 100 µg ml<sup>-1</sup>; Rf – rifampicin, 20 µg ml<sup>-1</sup>; Te – tetraciklin 30 µg ml<sup>-1</sup>.

#### 4.4.4. Analiza akumulacije polifosfata kod Gram-pozitivnih izolata

Polifosfati se nalaze među najčešće akumuliranim biopolimerima i pokazano je da stres poput neuravnoteženosti nutrijenata u životnoj sredini može pokrenuti akumulaciju polifosfata kod bakterija (Rao *et al.*, 1998). S obzirom na to da su sedimenti iz kojih su izolovane bakterije izloženi uticaju petrohemijskih efluenata i da postoji neuravnoteženi odnos nutrijenata (Tabela 5), izolati su analizirani za sposobnost akumulacije polifosfata.

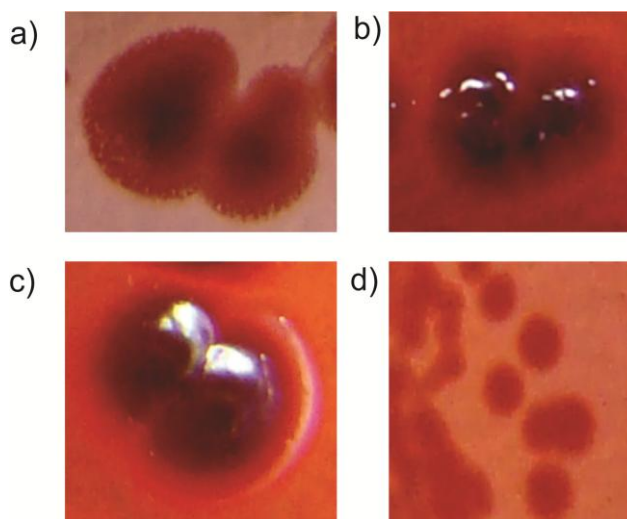
Neorganski polifosfat (polyPi) je detektovan kod 12 od 34 Gram-pozitivnih izolata: pet izolata iz roda *Bacillus*, četiri izolata iz roda *Arthrobacter*, *Rhodococcus* sp. TN101 i TN111 i *Streptomyces* sp. TN21 (Slika 20). Najveća količina polifosfata detektovana je kod *Bacillus* sp. TN322 i iznosila je 70 nmol Pi po mg ukupnih proteina što je 2.4 do 5.6 puta više u odnosu na detektovane količine polifosfata kod ostalih *Bacillus*-a. Sva četiri soja koja pripadaju rodu *Arthrobacter* su akumulirala ujednačen nivo ovog polimera (od 35 do 43 nmol Pi po mg ukupnih proteina). Najniži nivo akumulacije polyPi uočen je kod *Rhodococcus* sp. TN101



**Slika 20.** Akumulacija neorganskog fosfata (PolyPi) kod bakterija izolovanih u ovom radu. Bakterije su gajene pet dana u MSM medijumu sa glukozom (0.1% w/v) kao izvorom ugljenika. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna eksperimenta. (■ *Bacillus*, ■ *Arthrobacter*, ▨ *Rhodococcus*, ▩ *Streptomyces*).

#### 4.4.5. Analiza proizvodnje egzopolisaharida kod Gram-pozitivnih izolata

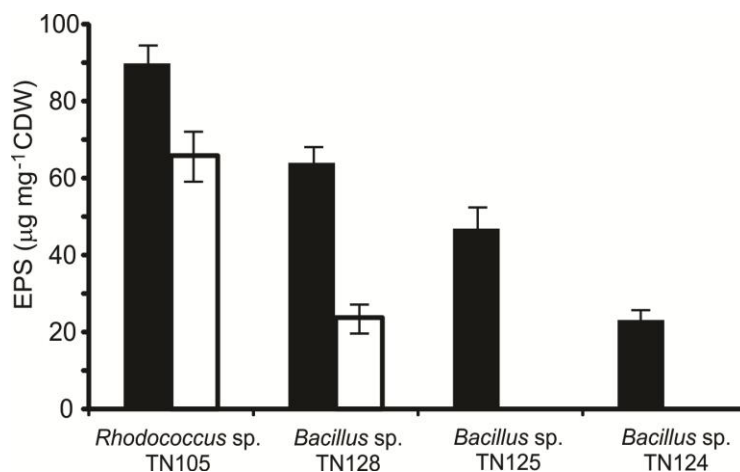
Egzopolisaharidi su još jedan važan biopolimer koji je uključen u zaštitu mikroorganizama od sredinskog stresa i dehidracije (Vu *et al.*, 2009). Za detekciju egzopolisaharida je korišćena boja “Congo red” (odeljak 3.3.6) za koju je pokazano da se vezuje za ekstracelularne polisaharide (Arciola *et al.*, 2005). Na ovaj način su detektovani egzopolisaharidi kod pet Gram-pozitivnih izolata: *Bacillus* sp. TN43, TN124, TN125, and TN128, i *Rhodococcus* TN105 (Slika 21). Sojevi koji su imali sposobnost proizvodnje egzopolisaharida su se bojili tamnije crveno u odnosu na ostale izolate. Takođe, u slučaju sojeva koji su proizvodili egzopolisaharide boja se ravnomerno raspoređivala po kolonijama, dok je u slučaju sojeva koji nisu imali tu sposobnost boja bila ograničena na centar kolonije (Slika 21).



**Slika 21.** Proizvodnja egzopolisaharida. a) *Bacillus* sp. TN124, b) *Bacillus* sp. TN125, c) *Bacillus* sp. TN128, d) *Rhodococcus* sp. TN105 nakon bojenja “Congo red” bojom.

Kvantifikacija egzopolisaharida je urađena kod četiri soja kod kojih je gajenjem na medijumu sa „Congo red“ bojom detektovana produkcija egzopolisaharida (odeljak 3.3.6., slika 22). S obzirom na to da se i egzopolisaharidi proizvode u odgovoru na stres praćena je produkcija ovih bioloških polimera u minimalnom medijumu (MSM) i u hranljivom medijumu. Svi izolati su ujednačeno rasli u oba medijuma, ali je postojala razlika u količini sintetisanog polimera kako između izolata, tako i u zavisnosti od medijuma u kom su izolati gajeni. Egzopolisaharidi su tokom gajenja u hranljivom medijumu detektovani samo kod *Rhodococcus* sp. TN105 i *Bacillus* sp. TN128,

pri čemu je proizvodnja egzopolisaharida bila 2.6 puta veća kod *Rhodococcus* sp. TN105. Kada su izolati gajeni u MSM medijumu egzopolisaharidi su detektovani kod sva četiri izolata. Međutim, najveća količina egzopolisaharida je detektovana kod *Rhodococcus* sp. TN105 i bila je 3.9, 1.9, odnosno 1.4 puta viša u odnosu na nivo egzopolisaharida proizvedenih od strane *Bacillus* sp. TN124, *Bacillus* sp. TN125 i *Bacillus* sp. TN128 (Slika 22).



**Slika 22.** Količina egzopolisaharida akumulirana kada su izolati gajeni u MSM medijumu sa glukozom kao izvorom ugljenika (■) i bogatom NB medijumu (□).

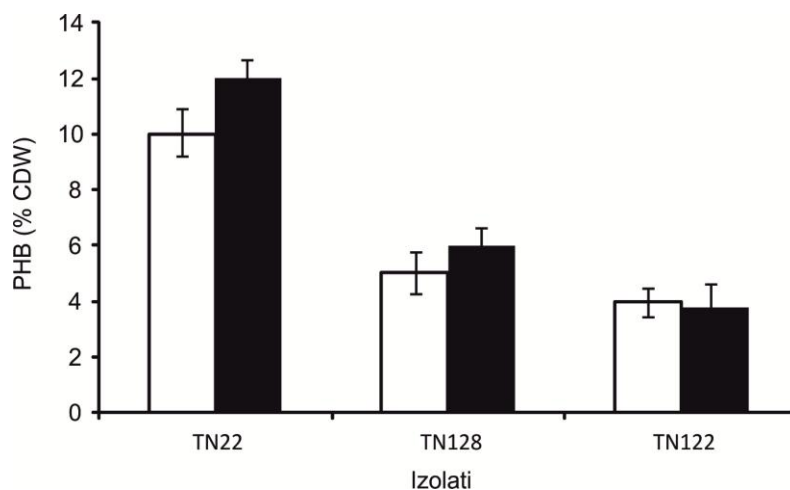
Ni jedan od sojeva koji su imali sposobnost proizvodnje egzopolisaharida nije mogao da raste na MTM medijumu sa 100 mM koncentracijama testiranih metala (odjeljak 4.4.2.). Međutim, *Bacillus* sp. TN128 i *Rhodococcus* sp. TN105 su mogli da rastu u prisustvu 20 puta povišenih koncentracija Ni<sup>2+</sup> (17 µM) i Cd<sup>2+</sup> (535 µM). Takođe, *Rhodococcus* sp. TN105 je mogao da razgrađuje svih petnaest jedinjenja, dok je *Bacillus* sp. TN128 rastao na 12 od 15 testiranih aromatičnih ugljovodonika (Slika 16). Oba izolata su pokazala rezistenciju na ampicilin i nisu akumulirali polifosfate (Tabela 7 i slika 20).

#### 4.4.6. Akumulacija polihidroksialkanoata kod Gram-pozitivnih izolata

Polihidroksialkanoati su još jedan tip biopolimera koji se obično akumuliraju u uslovima stresa, kao što je limitiranost nekog od esencijalnih nutrijenata poput azota, a u suvišku ugljenika (Chen, 2009). S obzirom na to da je prilikom elementalne analize uzoraka sedimenata pokazano da postoji visok odnos ukupnog ugljenika i azota

(C/N odnos), Gram-pozitivni izolati su testirani i za proizvodnju ovog biopolimera, i to kada su glukoza ili toluen korišćeni kao izvor ugljenika.

Od 34 Gram-pozitivna izolata sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih ugljovodonika tri izolata iz roda *Bacillus* (TN22, TN128 i TN122) su akumulirala polihidroksialkanoate kada je glukoza korišćena kao izvor ugljenika. Sva tri izolata su akumulirala polihidroksialkanoate sa monomernim jedinicama kratkih lanaca, scl-PHA (odeljak 1.4.1.), sastavljene od 3-hidroksibutirata kao monomerne jedinice (polihidroksibutirat, PHB), pri čemu je najveća količina PHB bila detektovana kod *Bacillus* sp. TN22 i bila je 2.5, odnosno 2.1 puta viša u odnosu na nivo PHB kod *Bacillus* sp. TN122 i TN128 (Slika 23). Sva tri izolata su akumulirala PHB i kada su gajena na toluenu kao jedinom izvoru ugljenika i energije. Nivo akumuliranog polimera je bio sličan kada su sojevi gajeni na glukozu i toluenu (Slika 23). Ponovo je najviši nivo polimera detektovan kod izolata TN22 (12%). *Bacillus* sp. TN122 i *Bacillus* sp. TN128 su akumulirali oko 2.5 i 2 puta manju količinu PHB u odnosu na soj TN22.



**Slika 23.** Akumulacija polihidroksibutirata (PHB) kod Gram-pozitivnih izolata kada su izolati gajeni na glukozu (20 mM, □) i toluenu (150 µl, ■).

## 4.5. Metabolička raznovrsnost Gram-negativnih izolata

Nakon pretretmana uzoraka naftalenom za dalji rad je odabrano 7 morfološki različitih izolata koji su najbrže rasli nakon 24 h inkubacije. Na osnovu analize sekvenci gena za 16S rRNK četiri od sedam izolata su identifikovani kao Gram-negativni *Sinhorizobium* sp. TN21, *Pseudomonas* sp. TN301, *Acinetobacter* sp. TN302 i *Sinhorizobium* sp. TN321. U daljem radu su analizirane njihove metaboličke sposobnosti.

### 4.5.1. Sposobnost rasta Gram-negativnih izolata na poli- i monoaromatičnim ugljovodonicima

Proveravan je rast Gram-negativnih izolata na 11 monoaromatičnih i 9 poliaromatičnih jedinjenja u tečnom MSM medijumu. Način gajenja u tečnom medijumu sa monoaromatičnim supstratima je opisan u odeljku 3.3.7.1. Kristalna poliaromatična jedinjenja su dodavana direktno u medijum (oko 10 mg), dok je su tečna poliaromatična jedinjenja dodavana na isti način kao i monoaromatična. Jedino je *Pseudomonas* sp. TN301 mogao da raste na svim testiranim monoaromatičnim supstratima u tečnoj kulturi, dok ni jedan soj nije mogao da degraduje sva testirana poliaromatična jedinjenja (Tabela 8).

Generalno, svi izolati su bolje rasli na monoaromatičnim jedinjenjima u poređenju sa rastom na poliaromatičnim jedinjenjima. Od 11 testiranih monoaromatičnih supstrata svi izolati su mogli da koriste 6, uključujući benzen, toluen, *m*-ksilen, metil- i butilbenzen i bifenil (Tabela 8). Najslabije korišćen supstrat bio je *p*-ksilen koji su mogla da koriste dva izolata. Od poliaromatičnih jedinjenja samo naftalen su mogla da koriste sva četiri Gram-negativna izolata, dok acenaften, fluoranten i piren ni jedan izolat nije mogao da koristi kao jedini izvor ugljenika i energije. *Pseudomonas* sp. TN301 se pokazao kao metabolički najraznovrsniji s obzirom da je mogao da koristi 17 testiranih aromatičnih supstrata.

**Tabela 8.** Sposobnost sojeva izolovanih strategijom predobogaćivanja uzorka naftalenom da degraduju aromatična jedinjenja.

Supstrat		Rast izolata <sup>a</sup>			
		TN21	TN301	TN302	TN321
Monoaromatični ugljovodoni	Benzen	+ <sup>b</sup>	+	++	+
	Toluen	++	++	+	+
	Etilbenzen	+	+	++	++
	<i>p</i> -ksilen	++	+	-	-
	<i>o</i> -ksilen	+	+	+	-
	<i>m</i> -ksilen	+	++	+	+
	Stiren	-	+	+	+
	Metilstiren	-	+	+	+
	Metilbenzen	+	+	+	+
	Butilbenzen	+	++	+	+
	Bifenil	++	++	+	+
Poliaromatični ugljovodoni	Naftalen	++	++	++	++
	1-Metilnaftalen	+	+	-	+
	2-Methylnaphthalene	+	+	-	+
	Dimetilnaftalen	-	+	-	+
	Acenaften	-	-	-	-
	Fluoranten	-	-	-	-
	Piren	-	-	-	-
	Fenantren	+	+	+	-
Krizen	-	+	+	-	

<sup>a</sup> Rast je praćen u tečnom MSM medijumu

<sup>b</sup> += rast nakon 48 h inkubacije; ++ = rast nakon 24 h inkubacije; - = odsustvo rasta

#### 4.5.2. Rast Gram-negativnih izolata u nepovoljnim sredinskim uslovima

Kao i kod Gram-pozitivnih, proveravana je sposobnost Gram-negativnih izolata da rastu u opsegu temperatura od 5°C do 42°C, u prisustvu visokih koncentracija soli, teških metala i antibiotika.

Od četiri Gram-negativna izolata samo *Sinorhizobium* sp. TN21 je mogao da raste u čitavom testiranom opsegu temperatura, dok su izolati *Pseudomonas* sp. TN301 i *Acinetobacter* sp. TN302 pokazivali rast na niskim temperaturama (do 5°C), dok nisu mogli da rastu na temperaturama iznad 37°C.



Samo jedan izolat, *Pseudomonas* sp. TN301 je tolerisao visoke koncentracije soli (10% NaCl), a preostala tri soja su rasla u prisustvu 3% NaCl.

Svi Gram-negativni izolati su rasli u prisustvu 20 puta viših koncentracija metala od koncentracija propisanih pravilnikom (17  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ , 535  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , 270  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ , 892  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  i 31.5 mM  $\text{Cu}^{2+}$ ) (EPA/Serbia, 1994). Ni jedan od Gram-negativnih izolata nije rastao na 92.5 mM koncentraciji  $\text{Zn}^{2+}$ . Samo *Pseudomonas* sp. TN301 i *Acinetobacter* sp. TN302 su rasli na 100 mM koncentraciji  $\text{Cd}^{2+}$ , odnosno  $\text{Hg}^{2+}$ .

Dva od četiri Gram-negativna izolata su pokazala rezistenciju na neke od testiranih antibiotika. *Sinorhizobium* sp. TN21 je bio rezistentan na ampicilin i rifampicin, a *Pseudomonas* sp. TN301 na ampicilin, nalidiksinsku kiselinu i eritromicin.

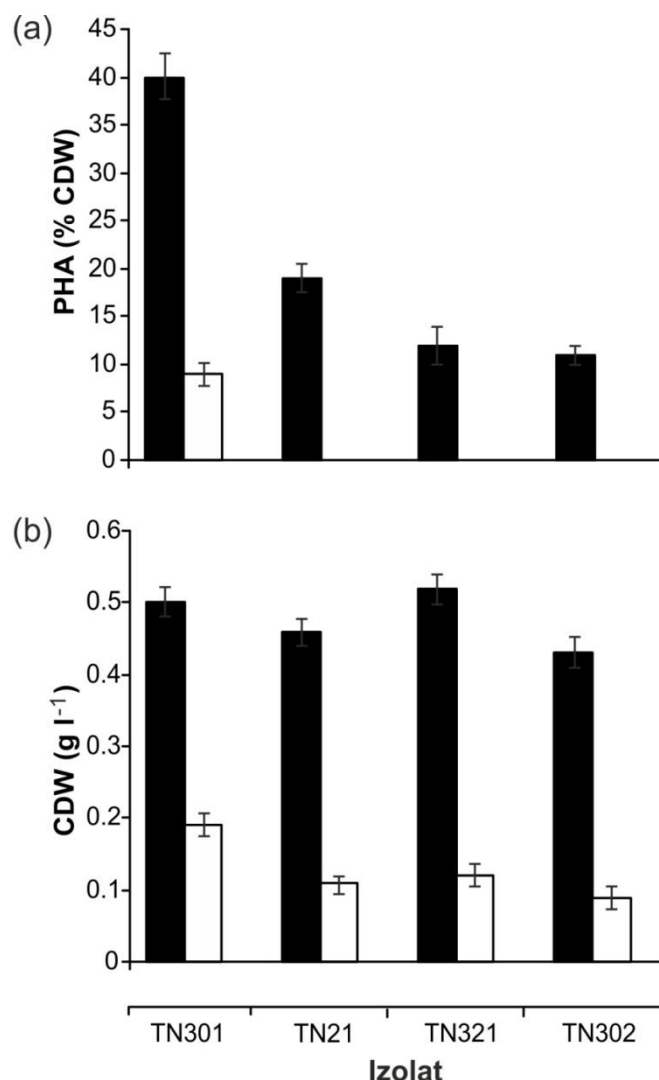
#### **4.5.3. Akumulacija polifosfata kod Gram-negativnih izolata**

Od Gram-negativnih izolata samo kod dva izolata, *Pseudomonas* sp. TN301 i *Sinorhizobium* sp. TN21 je tokom gajenja u MSM medijumu sa 35 mM koncentracijom neorganskih fosfata detektovana i kvantifikovana akumulacija polifosfata. *P. putida* TN301 je akumulirao 60 nmol Pi po mg proteina, što je bilo svega oko 1.2 puta manje od *Bacillus* sp. TN322 koji je bio najproduktivniji u pogledu akumulacije biopolimera u grupi Gram-pozitivnih izolata. *Sinorhizobium* sp. TN21 je akumulirao 6.7 puta manju količinu polifosfata od *Pseudomonas* sp. TN301.

#### **4.5.4. Akumulacija polihidroksialkanoata kod Gram-negativnih izolata**

Sva četiri Gram-negativna izolata su analizirana za sposobnost akumulacije polihidroksialkanoata kada su glukoza ili naftalen korišćeni kao supstrati (Slika 24). U svrhu ove analize korišćena je 10 mM glukoza, dok su kristali naftalena (12 mg) dodavani direktno u medijum. S obzirom na nizak stepen rastvorljivosti naftalena u vodi i toksičnost ovog supstrata (Pumphrey i Madsen, 2007) za ovaj eksperiment je korišćena količina naftalena koja odgovara 2 mM koncentraciji ukoliko bi supstrat u potpunosti bio rastvoren. Tri Gram-negativna izolata, *Sinorhizobium* sp. TN21 i TN321 i *Acinetobacter* sp. TN302 su imala sposobnost akumulacije polihidroksialkanoata kada je glukoza korišćena kao supstrat, dok ovaj biopolimer nije

detektovan tokom njihovog gajenja na naftalenu (Slika 24). Jedino je *Pseudomonas* sp. TN301 mogao da akumulira polihidroksialkanoate u slučaju oba korišćena supstrata, i to 40% CDW kada je korišćena glukoza i 10% kada je korišćen naftalen kao izvor ugljenika i energije (Slika 24).



**Slika 24.** Akumulacija PHA (a) i rast izolata (b) kada su kao supstrati korišćeni glukoza (■) i naftalen (□).

Kada je kao supstrat korišćena glukoza sva četiri izolata su rasla ujednačeno i dostizali su biomasu od 0.42 do 0.51 g l<sup>-1</sup> (Slika 24b), dok je nivo akumuliranih polihidroksialkanoata varirao od 12% (kod izolata TN302) do 40% (izolat TN301) suve ćelijske mase. GC-MS analiza akumuliranog polihidroksialkanoata kod izolata *Pseudomonas* sp. TN301 pokazala je da se ovaj biopolimer sastoji od monomera

3-hidroksiheksanoata (C6), 3-hidroksioktanoata (C8), 3-hidroksidekanoata (C10) i 3-hidroksidodekanoata (C12) u sledećem odnosu C6:C8:C10:C12= 2 : 19 : 72 : 7, dok je polimer ostalih izolata (TN21, TN321 i TN302) bio polihidroksibutirat (PHB) koji se sastojao samo iz 3-hidroksibutirat monomera (C4). Najviši nivo akumuliranog PHB detektovan je kod *Sinorhizobium* sp. TN21 i bio je 1.5 i 1.7 puta veći u odnosu na količine polimera akumuliranih kod *Sinorhizobium* sp. TN321 i *Acinetobacter* sp. TN302 (Slika 24a). Takođe, nivo PHB polimera kod ova tri Gram-negativna izolata je bio od 1.2 do 5 puta viši nego kod Gram-pozitivnih izolata (Slike 23 i 24).

Kada je kao izvor ugljenika i energije korišćen naftalen najbolji rast je pokazao izolat *Pseudomonas* sp. TN301. Biomasa koju je postigao izolat TN301 bila je od 1.6 do 2 puta veća u odnosu na biomasu koju su dostigli drugi sojevi tokom rasta u minimalnom medijumu sa naftalenom kao supstratom. Takođe, jedino u slučaju izolata TN301 je detektovana akumulacija polihidroksialkanoata tokom rasta na naftalenu. Sastav polimera akumuliranog tokom rasta na naftalenu bio je C6:C8:C10:C12 = 4 : 27 : 60 : 9. Predominantan monomer bio je C10 kako tokom rasta na naftalenu tako i tokom rasta na glukozi. Kada je izolat TN301 gajen na glukozi bilo je 1.2 puta više C10 monomera u sastavu biopolimera nego kada je izolat gajen na naftalenu. Međutim, kada je izolat gajen na naftalenu sadržaj ostalih monomera, C6, C8 i C12 bio je 2, 1.4 i 1.3 puta viši u odnosu na polimer dobijen gajenjem na glukozi.

#### **4.6. *Pseudomonas* sp. TN301 – karakterizacija i potencijal u biotehnološkoj primeni proizvodnje biopolimera**

S obzirom na to da je u prethodnim analizama izolat *Pseudomonas* sp. TN301 pokazao sposobnost rasta na širokom spektru monoaromatičnih jedinjenja (Slika 16), rast na poliaromatičnim ugljovodonicima (Tabela 8), zatim sposobnost akumulacije mcl-PHA kada je gajen na glukozi, kao i sposobnost konverzije naftalena u mcl-PHA urađena je njegova detaljnija karakterizacija.

##### **4.6.1. Osnovne biohemijske karakteristike izolata *Pseudomonas* sp. TN301**

Pored toga što je pokazano je izolat TN301 Gram-negativna aerobna bakterija (odjeljak 4.3.2.) sa sposobnošću rasta na temperaturama u opsegu od 5°C to 37°C, da toleriše prisustvo 10% NaCl tokom rasta u bogatom medijumu, kao i prisustvo jona Cd<sup>2+</sup> u koncentracijama do 100 mM (odjeljak 4.5.2.), urađen je i standardni set biohemijskih testova za identifikaciju bakterija. *Pseudomonas* sp. TN301 je mogao da koristi glukozu, glicerol, i citrat, ali ne i laktozu kao izvor ugljenika (Tabela 9). Ovaj izolat je bio katalaza pozitivan, dok nije pokazivao sposobnost hidrolize eskulina i uree.

Sekvenca gena za 16S rRNK izolata *Pseudomonas* sp. TN301 dužine 1405 bp je u BLAST analizi pokazala najveći stepen sličnosti sa *Pseudomonas putida* F1 (99% homologije sa 99% pokrivenosti) i *P. putida* GB-1 (99% homologije sa 99% pokrivenosti). Prilikom konstrukcije filogenetskog stabla za Gram-negativne izolate *Pseudomonas* sp. TN301 se grupisao sa *Pseudomonas putida* DSM291<sup>T</sup> (Slika 18).

**Tabela 9.** Biohemijske karakteristike izolata *Pseudomonas* sp. TN301.

Biohemijski test		Prisustvo karakteristike
Korišćenje izvora ugljenika	Fruktoza	-*
	Glukoza	+
	Ksiloz	-
	Saharoza	-
	Maltoza	+
	Glicerol	+
	Na-citrat	+
Prisustvo enzima	Ureaza	-
	Lipaza	-
	Katalaza	+
	Hemolitički enzimi	-
	Hidroliza eskulina	-
Rast u prisustvu NaCl	1%	+
	3%	+
	6%	+
	10%	+
	Produkcija indola	-
	Redukcija nitrata	-

\* += rast; - = odsustvo rasta

#### 4.6.2. Analiza sekvenci gena za akumulaciju mcl-PHA kod *Pseudomonas* sp. TN301

Da bi se što bolje okarakterisao izolat sa sposobnošću konverzije poliaromatičnog jedinjenja naftalena u mcl-PHA urađeno je kloniranje gena *Pseudomonas* sp. TN301 čiji proizvodi učestvuju u akumulaciji mcl-PHA. Klonirani su geni za ketotiolazu (*phaA*) koja učestvuje u kondenzaciji dva acetil-koenzim A molekula u acetoacil-koenzim A, polihidroksialkanoat polimerazu (*phaC*) koja učestvuje u polimerizaciji R-(3)-hidroksibutiril-koenzim A monomernih jedinica i transacilazu (*phaG*). Nakon restriktione provere klonova ovi geni su sekvencirani i analizirani pomoću BLASTN algoritma (Prilog 2).

Na nukleotidnom nivou *phaA* i *phaC* su pokazivali visok stepen sličnosti (99% - 100% sa 99% pokrivenosti) sa deponovanim sekvencama ovih gena poreklom iz

*Pseudomonas putida* F1 i *P. putida* KT2440. Gen za transacilazu je pokazivao 98% sličnosti sa *phaG* genima iz *P. putida* F1 i *P. putida* CA-3.

#### **4.6.3. Sposobnost *Pseudomonas* sp. TN301 da akumulira mcl-PHA iz monoaromatičnih ugljovodonika**

*Pseudomonas* sp. TN301 je testiran za konverziju monoaromatičnih ugljovodonika, za koje je prethodno pokazano da su supstrati za rast ovog izolata, u mcl-PHA. Analizirana je akumulacija mcl-PHA kada su korišćena pojedinačna monoaromatična jedinjenja i njihove smeše kao izvor ugljenika i energije. Najniži nivo akumuliranog biopolimera detektovan je kada je stiren korišćen kao supstrat (5% CDW), dok je najveća količina mcl-PHA akumulirana kada je korišćena smeša ekvimolarnih količina benzena, toluena, etilbenzena i *o*-ksilena (BTEX) i dostizala je 25% CDW.

*Pseudomonas* sp. TN301 je tokom rasta na različitim monoaromatičnim ugljovodonicima postizao ujednačenu biomasu, ali se nivo akumuliranog biopolimera značajno razlikovao (Tabela 10). Najveća količina mcl-PHA je akumulirana kada je izolat rastao na *o*-ksilenu (19.2%), odnosno na 3-metilbenzenu (19.2%), i bila je 38.4 puta viša od količine polimera akumulirane tokom rasta na stirenu (0.5%). Takođe, sam rast *Pseudomonas* sp. TN301 je bio najslabiji na stirenu, sa postignutom biomasom od svega 0.2 g l<sup>-1</sup> (Tabela 10).

Ukupno gledano, najbolji rast *Pseudomonas* sp. TN301 je bio kada je korišćena smeša ksilena (ekvimolarne količine *o*-ksilena, *m*-ksilena i *p*-ksilena) kao izvor ugljenika. Postignuta biomasa je bila 1.2 do 1.9 puta veća u odnosu na biomasu dobijenu rastom na drugim pojedinačnim supstratima i smešama. Produktivnost akumulacije PHA je bila slična kada su korišćene smeše ksilena i smeše benzena i njegovih derivata (ekvimolarne količine benzena, etilbenzena, 3-metilbenzena i butilbenzena) i bila je 2.4 puta niža u odnosu na produktivnost akumulacije PHA iz BTEX smeše (Tabela 10).

**Tabela 10.** Rast izolata *Pseudomonas* sp. TN301 na monoaromatičnim ugljovodicima i akumulacija mcl-PHA.

Supstrat	CDW (g l <sup>-1</sup> )	PHA (g l <sup>-1</sup> )	PHA produktivnost (mg gCDW <sup>-1</sup> )	% monomera C6:C8:C10:C12
Benzen	0.26±0.05	0.02±0.001	76±0.5	0 : 16 : 65 : 19
Toluen	0.27±0.05	0.04±0.002	148±3	3 : 19 : 72 : 6
Etilbenzen	0.24±0.01	0.02±0.005	83±0.9	2 : 16 : 72 : 10
<i>p</i> -ksilen	0.24±0.04	0.02±0.003	83±0.9	2 : 15 : 72 : 11
<i>o</i> -ksilen	0.26±0.02	0.05±0.004	192±5	2 : 15 : 73 : 10
Stiren	0.20±0.05	0.01±0.001	5±0.2	0 : 9 : 63 : 28
Metilbenzen	0.26±0.05	0.05±0.003	192±6	2 : 18 : 72 : 8
Butilbenzen	0.32±0.07	0.06±0.002	188±4	2 : 18 : 72 : 8
Bifenil	0.27±0.02	0.04±0.001	173±3	2 : 18 : 72 : 8
BTEX	0.28±0.03	0.07±0.003	250±6	0 : 16 : 76 : 8
Ksileni	0.38±0.01	0.04±0.004	105±4	0 : 16 : 75 : 9
Benzeni	0.34±0.01	0.04±0.006	105±5	0 : 16 : 70 : 14

Predominantni monomer u mcl-PHA akumuliranom iz svih testiranih supstrata bio je C10 sa molarnim procentom od 63% kada je supstrat bio stiren do 76% kada je supstrat bila BTEX smeša (Tabela 10). Udeo ostalih monomera je varirao od 0% do 3% za C6, 9% do 19% za C8 i 6% do 28% za C12. Najviši udeo C12 monomera u mcl-PHA polimeru postignut je tokom rasta izolata TN301 na stirenu (Tabela 10).

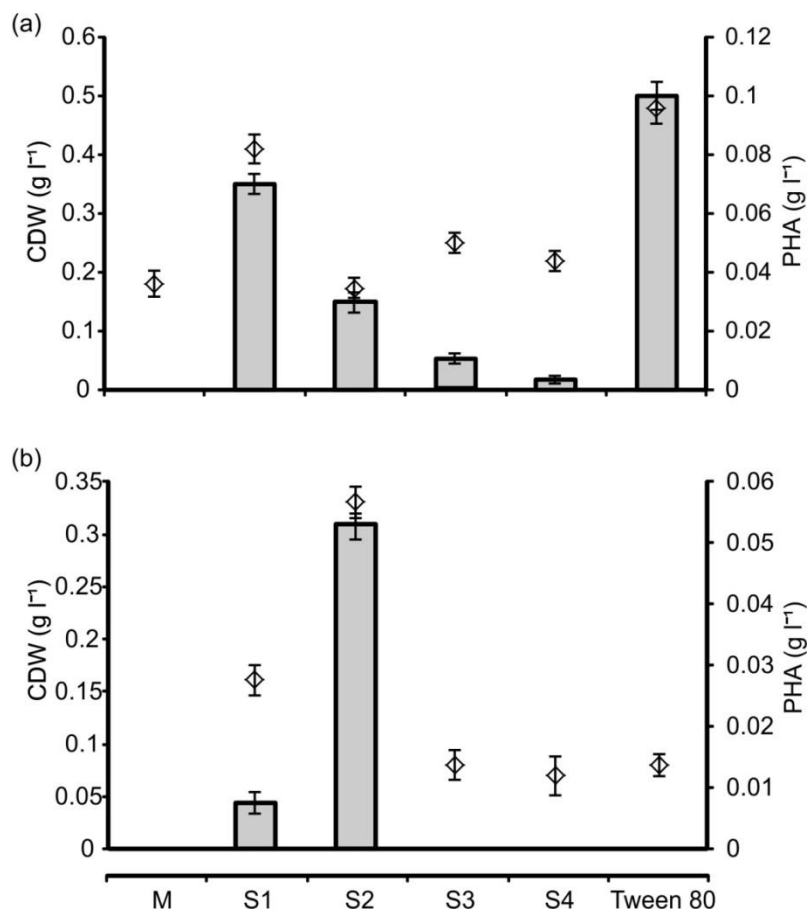
#### 4.6.4. Sposobnost *Pseudomonas* sp. TN301 da akumulira mcl-PHA iz poliaromatičnih ugljovodonika

Tokom inicijalnih eksperimenata utvrđivanja sposobnosti akumulacije polihidroksialkanoata iz naftalena (odjeljak 4.5.4.) primećena je slaba biodostupnost i rastvorljivost naftalena u medijumu. Stoga su urađene analize sa ciljem poboljšanja biodostupnosti poliaromatičnih supstrata, a samim tim i povećanja produktivnosti akumulacije mcl-PHA.

#### **4.6.4.1. Uticaj različitih rastvarača i surfaktanta Tween-a 80 na rast *Pseudomonas* sp. TN301 i akumulaciju mcl-PHA na naftalenu kao model supstratu**

Poliaromatični ugljovodonici su izuzetno hidrofobni, te je bilo neophodno pronaći odgovarajući metod dostavljanja ovih supstrata u tečni medijum za gajenje *Pseudomonas* sp. TN301. Naftalen je korišćen kao model jedinjenje za testiranje uticaja različitih organskih rastvarača na rastvorljivost poliaromata u MSM medijumu (Slika 25). Praćeni su rast i akumulacija mcl-PHA izolata TN301 kada su korišćeni metanol, benzen, aceton i 1-pentanon kao rastvarači za koje je prethodno pokazano da povećavaju rastvorljivost poliaromatičnih jedinjenja u vodi (Dickhut *et al.*, 1989). Takođe je analiziran efekat sintetičkog surfaktanta Tween-a 80, s obzirom da je u ranijim istraživanjima predloženo da bi mogao imati pozitivan uticaj na biodostupnost poliaromatičnih jedinjenja (Hickey *et al.*, 2007). U eksperiment su uključene i odgovarajuće kontrole: naftalen bez rastvarača, odnosno surfaktanta, i rastvarači i surfaktanti kao supstrati bez naftalena (Slika 25b). Za inicijalno testiranje produkcije biopolimera iz naftalena korišćena je 2 mM koncentracija supstrata (Slika 24), dok je za optimizaciju gajenja i akumulacije mcl-PHA *Pseudomonas* sp. TN301 korišćen 15 mM naftalen kako bi se postigla koncentracija ugljenika u suvišku, koja odgovara koncentraciji ugljenika od 1.8 g l<sup>-1</sup> (Slika 25). Primećeno je da se sa obe korišćene koncentracije supstrata dostižu slične biomase, dok je mcl-PHA detektovan samo u prvom slučaju (Slika 24). Ovaj rezultat ukazuje na toksičnost viših inicijalnih koncentracija naftalena.





**Slika 25.** Rast ( $\diamond$ ) i akumulacija mcl-PHA ( $\blacksquare$ ) izolata *Pseudomonas* sp. TN301 u tečnom MSM medijumu sa različitim rastvaračima. Rast i akumulacija mcl-PHA kada je (a) naftalen dodavan rastvoren u različitim rastvaračima ili sa Tween-om 80, (b) izolat gajen sa rastvaračima, odnosno Tween-om 80 kao jedinim izvorom ugljenika i energije. (S1 – metanol, S2 – benzen, S3 – aceton, S4 – 1-pentanon, M – kristali naftalena dodavani direktno u medijum).

Najbolji rast izolata *Pseudomonas* sp. TN301 je primećen kada je naftalen dodavan u medijum zajedno sa Tween-om 80. Nakon 60 h inkubacije izolat je postigao biomasu koja je bila od 1.2 do 2.8 puta veća od biomasa postignutih kada su primenjivane druge metode gajenja (Slika 25a). Izolat *Pseudomonas* sp. TN301 je rastao u mineralnom medijumu kada je Tween 80 dodavan kao jedini izvor ugljenika i enegije, međutim biomasa postignuta na ovaj način bila je 5.8 puta manja u odnosu na rast kada je korišćena kombinacija naftalena i surfaktanta. Takođe, tokom gajenja izolata samo u prisustvu Tween-a 80 nije detektovana akumulacija mcl-PHA (Slika 25b), pa se može

zaključiti da je dodavanjem sintetičkog surfaktanta Tween-a 80 kulturi postignut bolji rast izolata (2.6 puta veća biomasa) i akumulacija  $0.1 \text{ g l}^{-1}$  mcl-PHA.

Kada je naftalen rastvaran u metanolu, acetonu i 1-pentanonu primećen je poboljšani rast izolata, odnosno postignuta biomasa je bila 2.3, 1.4 i 1.2 puta veća kada je korišćen svaki od navedenih rastvarača u odnosu na biomasu postignutu kada su kristali naftalena dodavani direktno u medijum (Slika 25). Međutim, *Pseudomonas* sp. TN301 je mogao da raste na metanolu kao jedinom izvoru ugljenika i energije sa biomasom 2.5 puta manjom u odnosu na biomasu postignutu kada je korišćena kombinacija metanola i naftalena, tako da je ukupno povećanje iskorišćenosti naftalena kada je metanol upotrebljavan kao rastvarač bilo je samo 1.4 puta. Takođe, *Pseudomonas* sp. TN301 je akumulirao niske nivoe mcl-PHA kada je metanol korišćen kao jedini izvor ugljenika i energije (Slika 25b).

*Pseudomonas* sp. TN301 je slabo rastao na acetonu i 1-pentanonu kao jedinim izvorima ugljenika i energije, i ni u jednom slučaju nije detektovan mcl-PHA. Kada je korišćen naftalen rastvoren u acetonu, odnosno 1-pentanonu detektovane su niske količine mcl-PHA uz slabo poboljšanje rasta u odnosu na rast na samom naftalenu (Slika 25). U slučaju kada je ukupna količina benzena od 200  $\mu\text{l}$  dodavana u tri vremenska intervala direktno u medijum primećeno je da izolat TN301 akumulira 2.5 puta više mcl-PHA nego kada je benzen tokom gajenja isparavao iz centralne kolone (Tabela 10), dok je postignuta biomasa bila slična. Kada je kao supstrat korišćen naftalen rastvoren u benzenu došlo je do smanjenja i biomase i akumuliranog biopolimera u odnosu na to kada je sam benzen korišćen iz centralne kolone (Tabela 10), dok je biomasa u slučaju korišćenja smeše naftalena i benzena bila slična biomasi postignutoj kada je izolat gajen samo na naftalenu (Slika 25).

#### **4.6.4.2. Rast *Pseudomonas* sp. TN301 na drugim poliaromatičnim jedinjenjima i njihovim smešama i akumulacija mcl-PHA**

S obzirom na to da se metoda dodavanja naftalena u medijum u prisustvu Tween-a 80 pokazala kao najefikasnija, dalje su praćeni rast i akumulacija mcl-PHA kada su ostala poliaromatična jedinjenja na kojima je *Pseudomonas* sp. TN301 rastao pri inicijalnom

testiranju, kao i njihove ekvimolarne smeše korišćeni kao supstrat uz dodatak Tween-a 80 (Tabela 11). Izolat je rastao na svim testiranim poliaromatičnim jedinjenjima u tečnom MSM medijumu, pri čemu je najbolji rast bio kada je naftalen korišćen kao supstrat sa biomasom od 2.4 do 1.5 put većom u odnosu na biomasu postignutu rastom na drugim supstratima. U ovim eksperimentalnim uslovima mcl-PHA nije detektovan kada je izolat gajen na 1-etilnaftalenu, 2-metilnaftalenu, dimetilnaftalenu i na smeši naftalena i fenantrena (Tabela 11). U slučaju 1-etilnaftalena, 2-metilnaftalena i dimetilnaftalena postignuta biomasa je bila od 0.2-0.3 g l<sup>-1</sup>, što je slično biomasi postignutoj tokom gajenja na monoaromatičnim ugljovodonicima (Tabele 10 i 11).

Kada je izolat gajen na naftalenu, fenantrenu ili krizenu detektovano je 22.9%, 3.5%, odnosno 5% mcl-PHA u odnosu na suhu ćelijsku masu. Iako je biomasa postignuta gajenjem na naftalenu bila 1.5 i 2 puta niža u odnosu na fenantren i krizen produktivnost akumulacije mcl-PHA na ovim supstratima je bila 6.5 i 4.6 puta niža u odnosu na naftalen (Tabela 10). U slučaju sva tri supstrata dominantni monomer u akumuliranom polimeru je bio C10, dok je C6 monomer detektovan samo u slučaju gajenja na naftalenu (Tabela 11).

**Tabela 11.** Rast i akumulacija mcl-PHA kod *Pseudomonas* sp. TN301 kada su poliaromatični ugljovodonici dodavani u MSM medijum sa Tween-om 80 (0.5 g l<sup>-1</sup>).

Supstrat	CDW (g l <sup>-1</sup> )	PHA (% CDW)	PHA produktivnost (mg gCDW <sup>-1</sup> )	% sadržaj monomera C6:C8:C10:C12
Naftalen	0.48±0.04	23±3	229±5	4 : 27 : 60 : 9
Fenantren	0.31±0.03	3.5±0.3	35±3	0 : 14 : 70 : 16
Krizen	0.26±0.05	5.1±0.6	50±4	0 : 18 : 74 : 5
1-etilnaftalen	0.29±0.03	ND		
2-metilnaftalen	0.20±0.03	ND		
Dimetilnaftalen	0.22±0.04	ND		
Naftalen /fenantren	0.27±0.04	ND		
Naftalen / krizen	0.23±0.05	1.3±0.1	13±5	0 : 10 : 72 : 18
Fenantren / krizen	0.25±0.03	4.8±0.3	48±5	0 : 14 : 72 : 14
Naftalen /fenantren/ krizen	0.27±0.04	1.2±0.1	11±2	0 : 16 : 70 : 14

Biomasa postignuta kada su smeše poliaromatičnih jedinjenja korišćene kao izvor ugljenika bila je od 1.8 do 2.1 put manja nego kada je samo naftalen bio izvor ugljenika i energije. U slučaju smeše naftalena i fenantrena biopolimer uopšte nije detektovan, dok je za druge kombinacije nivo polimera bio 4.8 do 20.8 puta niži u odnosu na polimer akumuliran kada je kao supstrat korišćen samo naftalen (Tabela 11). Sastav i količina monomernih jedinica u polimeru akumuliranom iz smeša poliaromatičnih ugljovodonika bio je sličan sadržaju monomera kada su korišćeni pojedinačni aromatični supstrati.

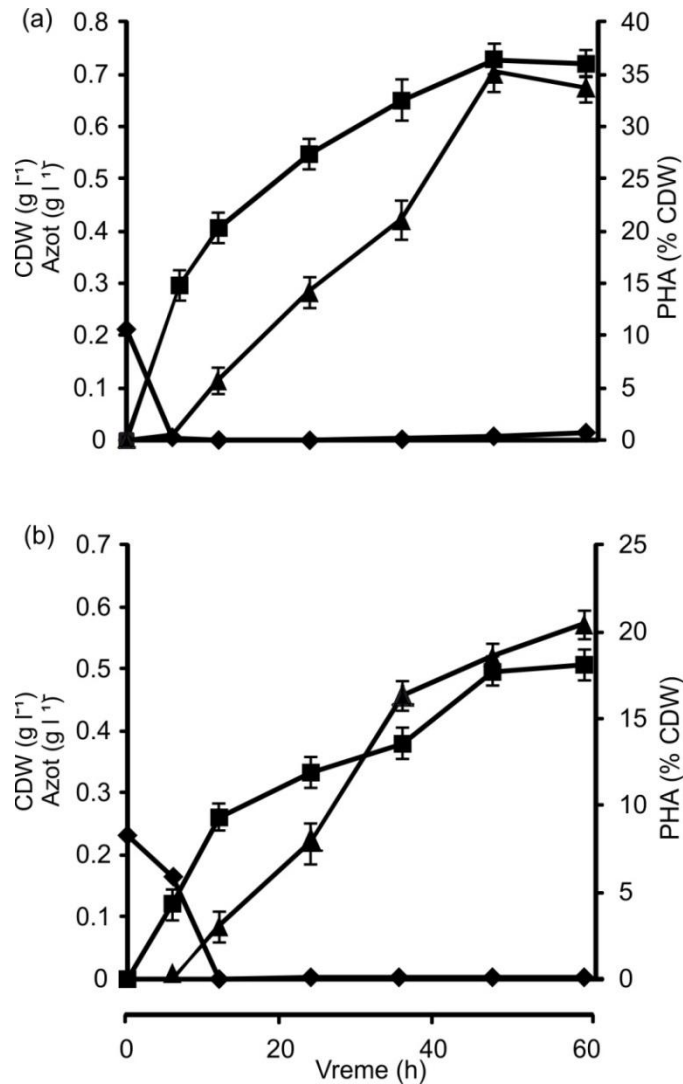
#### **4.6.5. Poređenje dinamike akumulacije mcl-PHA iz glukoze i naftalena kod**

##### ***Pseudomonas* sp. TN301**

Da bi se detaljnije proučile karakteristike akumulacije mcl-PHA iz naftalena i glukoze kod izolata *Pseudomonas* sp. TN301 praćeni su povećanje biomase, akumulacija PHA i smanjenje azota u medijumu tokom perioda od 60 h (Slika 26). Nije primećeno da postoji bitna razlika u rastu izolata TN301 kada su kao supstrat korišćeni glukoza, odnosno naftalen. Kulture gajene na glukozi su ostvarile 1.4 puta veću krajnju biomasu nego kulture gajene na naftalenu (Slika 26). Oba supstrata su korišćena u količinama koje odgovaraju 1.8 g ugljenika l<sup>-1</sup>.

Tokom eksponencijalne faze rasta izolat *Pseudomonas* sp. TN301 je imao stopu rasta 0.013 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, što je bilo dvostruko veća stopa rasta od one dostignute gajenjem na naftalenu. Mala količina mcl-PHA (5% CDW) je izmerena nakon 12 h rasta u medijumu sa glukozom, što je koincidiralo sa smanjenjem koncentracije azota u medijumu (Slika 26a). U slučaju ćelija koje su rasle u medijumu sa glukozom biopolimer se linearno akumulirao tokom perioda od 12-48 h inkubacije sa finalnom količinom od 35% CDW. U poređenju sa ćelijama raslim na glukozi, ćelije rasle na naftalenu su akumulirale niži nivo mcl-PHA tokom perioda rasta od 60 h i finalni nivo akumuliranog polimera bio je 20% (Slika 26b). Bez obzira na razlike u količini akumuliranog polimera patern akumulacije je bio sličan tokom gajenja na oba supstrata, sa početkom akumulacije po smanjenju koncentracije azota u medijumu (limitiranost esencijalnog nutrijenta) i linearnom akumulacijom polimera u periodu od 6-36 h inkubacije. S obzirom na to da su ćelije gajene na glukozi postigle višu biomasu i

akumulirale više polimera, ukupna produktivnost akumulacije mcl-PHA kod ćelija gajenih na naftalenu ( $0.004 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) bila je 1.3 puta niža od produktivnosti akumulacije mcl-PHA iz glukoze.



**Slika 26.** Rast (■) i akumulacija mcl-PHA (▲) izolata *Pseudomonas* sp. TN301 na (a) 20 mM glukozi i (b) 15 mM naftalenu dodavanom sa Tween-om 80 ( $0.5 \text{ g l}^{-1}$ ). Koncentracija azota (◆) praćena tokom perioda od 60 h.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Izolacija bakterija iz zagađenog rečnog sedimenta

Aromatična jedinjenja su najrasprostranjeniji polutanti i s obzirom na njihovu perzistentnost u životnoj sredini i toksičnost predstavljaju opasnost po zdravlje. Petrohemijski efluenti koji sadrže visoke količine fosfora, azota, sumpora, alifatičnih i mono- i poliromatičnih ugljovodonika i metala se vrlo često nekontrolisano ispuštaju u spoljašnju vodenu sredinu stvarajući kompleksno zagađenu životnu sredinu (Botalova, 2010). Poseban problem predstavljaju poliaromatični ugljovodonici s obzirom na to da su hidrofobni, slabo isparljivi i imaju visok afinitet za rečni sediment (McElroy *et al.*, 1989). Poznato je da se najveći deo ukupnog metabolizma ugljenika u tekućim vodama odvija u sedimentu (Winterbourn, 1986). Bakterije koje naseljavaju sedimente imaju veoma važnu ulogu u kruženju ugljenika i samim tim utiču na sve aspekte hemije i biologije rečnih ekosistema (Pusch *et al.*, 1998). Bakterijska transformacija mono- i poliaromatičnih ugljovodonika se smatra jednim od najznačajnijih procesa za uklanjanje ovih polutanata iz akvatičnih sredina i sedimenata (Andreoni i Gianfreda, 2007). Očekivano je da zagađeni rečni sedimenti, iako predstavljaju izuzetno nepovoljnu životnu sredinu predstavljaju bogat izvor bakterija sa sposobnošću korišćenja polutanata kao hrane.

#### 5.1.1. Mikroanaliza rečnog sedimenta i prisustvo teških metala

U ovoj studiji su za izolaciju bakterija sa specifičnim karakteristikama korišćena četiri uzorka rečnog sedimenta sakupljena na lokacijama u blizini petrohemijske industrije (odjeljak 4.1.). Fizičko-hemijske analize ovih uzoraka su obuhvatale elementalnu analizu i analizu prisustva teških metala (Tabela 5). Mikroanaliza je pokazala da se u uzorku S1 nalazilo 190.1 g ugljenika  $\text{kg}^{-1}$ , što je od 6.3 do 9.5 puta više u odnosu na preostala tri uzorka. Ukupni ugljenik u uzorku sedimenta čine tri osnovne forme: elementalni ugljenik (grafit, ugalj, čađ), neorganski ugljenik (rastvoreni  $\text{CO}_2$  i soli  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) i organski ugljenik (nastao dekompozicijom materijala biljnog i životinjskog porekla). Organsku komponentu totalnog ugljenika može činiti i ugljenik poreklom iz

organskih polutanata čijim nekontrolisanim izlivanjem u spoljašnju sredinu dolazi do drastičnog povećanja ukupne količine ugljenika (Schumacher, 2004). Odnos ugljenika prema azotu (C/N) u sva četiri analizirana uzoraka je bio veoma visok. U uzorcima S1, S2 i S4 je bio 20/1, dok je u zorku S3 detektovana čak 30 puta veća količina ugljenika u odnosu na azot. Visoka količina ugljenika, pre svega u uzorku S1, kao i visok C/N odnos bi mogli ukazivati na postojanje kontaminacije ugljovodonicima. Detektovana količina ukupnog ugljenika u uzorku S1 bila je do 2 puta manja u odnosu na količinu ugljenika u sedimentu reke Haihe (Qi *et al.*, 2011). Ova reka prima 33 400 miliona tona otpadnih voda na godišnjem nivou, te se smatra sredinom visoko zagađenom poliaromatičnim ugljovodonicima. Analizama različitih zemljišta i sedimenata kontaminiranih petrohemijskim efluentima pokazano je da doprinos aromatičnih ugljovodonika ukupnoj količini ugljenika u ovim sredinama iznosi oko 4 mg kg<sup>-1</sup> za poliaromatična i 10 mg kg<sup>-1</sup> za monoaromatična jedinjenja (Bradley *et al.*, 1994; Farhadian *et al.*, 2008; Megharaj *et al.*, 2000). S obzirom na to da su u uzorcima sedimenata uočene povišene količine ukupnog ugljenika, izražene u jedinicama za tri reda veličina većim od koncentracija aromatičnih ugljovodonika označenim kao zagađujuće, kao i na neposrednu blizinu petrohemijske industrije, može se pretpostaviti da postoji kontaminacija analiziranih uzoraka aromatičnim jedinjenjima.

S obzirom na to da je kokontaminacija aromatičnim ugljovodonicima i teškim metalima veoma česta (Pepi *et al.*, 2009; Sandrin i Maier, 2003) uzorci sedimenta su analizirani za prisustvo teških metala. U svim uzorcima je detektovano prisustvo Cd, Pb, Hg, Ni i Zn, ali osim Hg koja je bila značajno povišena u uzorcima S1 i S4 svi ostali metali su bili u koncentracijama ispod maksimalnih koncentracija dozvoljenih Pravilnikom o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi (EPA/Serbia, 1994). Međutim, i blago povišene koncentracije metala u sedimentima mogu imati štetne posledice po ekosistem (NRC, 1989). Nivo Hg u uzorku S1 bio čak 20 do 56.3 puta viši u odnosu na ostale uzorke i 45 puta povišen u odnosu na maksimalnu koncentraciju dozvoljenu Pravilnikom. U rečnim sedimentima reke Idrije koja protiče pored rudnika Hg detektovano je prosečno 87 mg Hg po kg uzorka (Gosar, 2008), te se koncentracija ovog metala u uzorku S1 ipak može smatrati prilično visokom. Koncentracija Zn u uzorku S1 je takođe bila značajno povišena, na gornjoj granici dozvoljene koncentracije i čak 10 puta viša od količine Zn detektovane u sedimentu

reke Shinji, koju su Ahmed i saradnici označili kao umereno zagađujuću (Ahmed *et al.*, 2011). Međutim, iako koncentracije nekih metala u analiziranim uzorcima nisu bile značajno povišene, postoji osnovana pretpostavka da samo njihovo prisustvo može imati negativan efekat na datu sredinu. Naime, neki metali koji se mogu naći u prirodi i esencijalni su za mikroorganizme, poput Zn, smatraju se toksičnim za druge životne forme u akvatičnim sredinama, kao i za čoveka, čak i u veoma niskim koncentracijama (Esen *et al.*, 2010).

### 5.1.2. Strategija izolovanja bakterija

Već je pokazano da su kontaminirane sredine, iako predstavljaju teške uslove za život, bogat izvor mikroorganizama sa specifičnim karakteristikama (Andreoni i Gianfreda, 2007). Upotrebom direktne kultivacije, odnosno izolacije bakterija bez prethodnih tretmana uzoraka, izolovan je veliki broj bakterija sa sposobnošću degradacije polutanata, i to najpre iz roda *Pseudomonas* i njemu srodnih rodova (Cavalca *et al.*, 2004; Zhuang *et al.*, 2003). Ovo je u korelaciji sa podatkom da u nezagađenim ekosistemima organizmi sa sposobnošću degradacije ugljovodonika, poput pripadnika roda *Pseudomonas* čine manje od 0.1% populacije bakterija koje mogu biti kultivisane u laboratorijskim uslovima, dok u kontaminiranim staništima pseudomonade mogu činiti i do 100% vijabilne populacije bakterija (Atlas, 1981). Međutim, indikacije o prisutnosti drugih, u prvom redu Gram-pozitivnih bakterija u ovako kontaminiranim staništima postoje i uglavnom dolaze iz metagenomskih analiza (Edlund i Jansson, 2006). Sa izuzetkom bakterija iz roda *Rhodococcus* (Martinkova *et al.*, 2009), sposobnost Gram-pozitivnih bakterije da degraduju aromatične ugljovodonike je relativno slabo analizirana. Pokazano je da je rast populacija bakterijskih vrsta koje pripadaju rodovima *Mycobacterium*, *Arthrobacter* i *Nocardia* stimulisan u zemljištima kontaminiranim poliaromatičnim ugljovodonicima (Daane *et al.*, 2001; Kanaly *et al.*, 2000), ali njihov bioremedijacioni potencijal je slabo izučavan.

Upotrebom strategije za izolaciju Gram-pozitivnih bakterija dobijeno je između  $9 \times 10^5$  CFU i  $2.4 \times 10^6$  CFU (Tabela 6), što je bilo za čitav red (uzorci S1, S3 i S4), odnosno dva reda (uzorak S2) veličina manje od procenjenog broja vijabilnih ćelija u ovim uzorcima o čemu svedoče CFU vrednosti za sve uzorke dobijene zasejavanjem na LA



medijumu. Prosečan broj bakterija u zagađenim zemljištima i sedimentima je od  $1.5 \times 10^6$  do  $2.4 \times 10^7$  ćelija po g uzorka (Diaz, 2004). U uzorcima S1, S3 i S4 je bilo 1.2 do 1.4 puta više ćelija o odnosu na prosečan broj, dok je procenjeni broj ćelija u uzorku S2 upadao u prosečan opseg. Visok broj bakterijskih ćelija u ovim uzorcima ne svedoči o njihovoj aktivnosti u datoj sredini, ali može pružiti uvid u njihov potencijal za bioremedijaciju. Naime, može se pretpostaviti da fizičko-hemijske karakteristike uzorkovanih sedimenata podržavaju rast određenih bakterijskih populacija. Ukoliko je zagađenje prisutno duži vremenski period dolazi do adaptacije bakterijske populacije kroz indukciju ili represiju specifičnih enzima, genetske promene koje rezultuju sticanjem novih metaboličkih sposobnosti i selekcijom organizama sa sposobnošću degradacije datog polutanta (Leahy i Colwell, 1990).

Strategija predobogaćivanja uzoraka se veoma često koristi za izolaciju bakterija sa specifičnim karakteristikama, posebno ukoliko je cilj izolacija teško kultivabilnih bakterija sa sposobnošću degradacije aromatičnih jedinjenja (Daane *et al.*, 2001; Hilyard *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2009). Kao selektivni pritisak u ovom radu korišćen je naftalen (odjeljak 4.2.2.) kao najjednostavniji i najbolje rastvoran predstavnik poliaromatičnih ugljovodonika, ali i koji se veoma često nalazi u zagađenim sredinama (Peters *et al.*, 1999).

Nakon testiranja sposobnosti 225 izolata, odabranih na osnovu morfološke diferencijacije da degraduju širok spektar aromatičnih jedinjenja, u daljim analizama je korišćeno 38 izolata sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih jedinjenja (Slika 16). Sekvenciranje gena za 16S rRNK je pokazalo da najveći broj izolata (42%) pripada rodu *Bacillus* čiji su predstavnici veoma zastupljeni u svim sredinama zagađenim naftom i njenim derivatima (Cybulski *et al.*, 2003).

Nakon konstrukcije filogenetskih stabala za Gram-pozitivne i Gram-negativne izolate (Slike R3 i R4), a u kombinaciji sa sposobnošću izolata da degraduju testirana aromatična jedinjenja i sa drugim fiziološkim karakteristikama, potvrđeno je da najmanje tri izolata predstavljaju nove bakterijske sojeve: *Rhodococcus* sp. TN105, *Arthrobacter* sp. TN221 i *Gordonia* sp. TN103. Od svih sojeva koji su korišćeni za konstrukciju filogenetskog stabla Gram-pozitivnih izolata *Rhodococcus imtechensis* RKJ300<sup>T</sup>, *Rhodococcus quingshengii* djl-6<sup>T</sup> i *Arthrobacter defluvii* 4C1-a<sup>T</sup> imaju

spodobnost degradacije aromatičnih jedinjenja (Ghosh *et al.*, 2006). Iako je izolat *Rhodococcus* sp. TN401 je pokazao visok stepen sličnosti (98%) u sekvenci gena za 16S rRNK sa *R. imtechensis* koji ima sposobnost degradacije *p*-nitrofenola i 2,4-dinitrofenola (Ghosh *et al.*, 2006), TN401 je imao sposobnost degradacije šireg spektra aromatičnih jedinjenja (Slika 16). Takođe, izolati TN201 i TN110, koji su pokazali 98% i 97% sličnosti sa *A. defluvii*, imaju sposobnost degradacije šireg spektra aromatičnih jedinjenja i pokazuju rezistenciju na metalne jone (Slika 16, Tabela 8).

U grupi Gram-negativnih izolata svi sojevi su pokazivali visok stepen sličnosti sa srodnim bakterijskim vrstama (Slika 18). Izolat *Acinetobacter* sp. TN302 se grupisao sa *Acinetobacter johnsonii*, bakterijom dominantnom u populacijama roda *Acinetobacter* u sredinskim uzorcima kontaminiranim ugljovodonicima (Vanbroekhoven *et al.*, 2004). Takođe je pokazano da *A. johnsonii* poseduje rezistenciju na relativno niske koncentracije Cd<sup>2+</sup> (Boswell *et al.*, 1999) dok je soj TN302 imao sposobnost tolerancije 100 mM koncentracije jona Hg<sup>2+</sup>. Izolati *Sinorhizobium* sp. TN21 i TN321 su izolovani iz različitih uzoraka sedimenta (S2 i S3) i pokazali su različit potencijal za degradaciju aromatičnih jedinjenja (Slika 16). Međutim, sekvence njihovih gena za 16S rRNK su međusobno pokazivale veću sličnost nego sa najrodnijom vrstom, *Ensifer adhaerens* LMG 20216<sup>T</sup> za koju je pokazano da ima sposobnost degradacije *p*-toluensulfonata (Tralau *et al.*, 2011). Iako je izolat TN301 je pokazivao najveću sličnost u sekvenci gena za 16S rRNK sa *Pseudomonas plecoglossicida* L21, nefluorescentnom pseudomonadom izolovanom iz ribe (Izumi *et al.*, 2007) ovaj soj se na filogenetskom stablu grupisao sa *P. putida* DSM291 za koji je pokazano da degraduje *p*-hidroksibenzoat (Romero-Steiner *et al.*, 1994). Po svojim fenotipskim karakteristikama TN301 je bio izuzetno sličan vrstama *P. putida* F1 i *P. putida* GB-1, sa kojima je delio i visok stepen homologije sekvenci gena za 16S rRNK (99% identičnosti sa pokrivenošću od 99%). *P. putida* F1 je izolovan strategijom predobogaćivanja zagađenog zatona etilbenzenom i ima sposobnost degradacije širokog spektra aromatičnih ugljovodonika, ali ne poseduje dioksidaze koje učestvuju u degradaciji poliaromatičnih ugljovodonika (Zylstra i Gibson, 1989), dok je soj *P. putida* GB-1 izolovan iz slatke vode i poznat je po svojstvu snažne oksidacije Mn<sup>2+</sup> (Wu *et al.*, 2011).

## 5.2. Metabolička raznovrsnost TN izolata

Iako je do danas opisan veliki broj bakterija sa sposobnošću degradacije različitih aromatičnih ugljovodonika, potreba za novim sojevima koji bi se mogli koristiti u bioremedijaciji konstantno raste s obzirom na porast ljudskih aktivnosti koje svakodnevno dovode do ispuštanja hazardnih materijala u spoljašnju sredinu. Veoma je značajno to što je u ovom radu opisan veliki broj izolata koji pojedinačno pokazuju sposobnost degradacije širokog spektra aromatičnih jedinjenja, prevalentnih zagađivača životne sredine (Slika 16). Među jedinjenjima koje su mogle degradovati bakterije izolovane u ovom radu su bili halogeni i nitro derivati aromatičnih jedinjenja, kao i poliaromatična jedinjenja (Slike 1 i 2). Značaj sposobnosti degradacije širokog spektra jedinjenja leži u činjenici da neka sredina obično nije zagađena isključivo jednim zagađivačem, već je češći slučaj kompleksnih mešovutih zagađenja. Do sada je objavljen manji broj radova u kojima je pokazana široka supstratna specifičnost izolata sa potencijalnom upotrebom u bioremedijaciji (Djokic *et al.*, 2011; Stapleton *et al.*, 2000). Veći deo podataka vezanih za bioremedijaciju odnosi se na Gram-negativne izolate kao što su predstavnici roda *Pseudomonas* i njemu srodnih rodova *Burkholderia*, *Acinetobacter* i *Sphingomonas* (Seo *et al.*, 2009). Gram-pozitivne bakterije, poput pripadnika rodova *Mycobacterium*, *Arthrobacter* i *Nocardia* su izolovane iz zemljišta kontaminiranih aromatičnim ugljovodonicima (Daane *et al.*, 2001; Kanaly *et al.*, 2000), ali u znatno manjoj meri i manje pažnje je posvećeno analizi njihovog bioremedijacionog potencijala. Do danas nije prijavljen veliki broj Gram-pozitivnih izolata sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih jedinjenja.

Kontaminacija aromatičnim ugljovodonicima je često praćena kontaminacijom teškim metalima (Pepi *et al.*, 2009; Sandrin i Maier, 2003), što može predstavljati problem za bioremedijaciju ovakvih staništa (Pepi *et al.*, 2008). Stoga su bakterijski izolati koji imaju sposobnost da istovremeno interaguju sa više različitih tipova kontaminanata veoma interesantni. S obzirom na to da je hemijska analiza uzoraka sedimenta pokazala prisustvo teških metala izolati su testirani na sposobnost rasta u prisustvu visokih koncentracija teških metala, i to 20 puta viših od dozvoljenih koncentracija propisanih Pravilnikom o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija (EPA/Serbia, 1994). Među Gram-pozitivnim bakterijama, 8 izolata je bilo tolerantno

na 100 mM koncentracije teških metala (Tabela 7), pri čemu 50% ovih izolata pripada rodu *Rhodococcus*. Dva Gram-negativna soja su pokazala sposobnost rasta u prisustvu 100 mM koncentracija  $\text{Cd}^{2+}$  (TN301), odnosno  $\text{Hg}^{2+}$  (TN302). Iako su rudnici i jalovišta najčešća mesta izolacije bakterija tolerantnih na visoke koncentracije metala (Watkin *et al.*, 2009), uzorci sedimenta pod uticajem petrohemijskih efluenta su se takođe pokazali kao bogat izvor ovakvih izolata s obzirom na to da je čak 84% izolata raslo u prisustvu 20 puta povišenih koncentracija  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  u odnosu na koncentracije propisane Pravilnikom. Nedavno je objavljena opsežna studija u kojoj je analizirano 24 izolata poreklom iz morskih sedimenata koji su pokazivali rezistenciju na nekoliko teških metala, uključujući As, Hg, Co, Cd, Pb i Se (Nithya *et al.*, 2011). Autori su smatrali sojeve rezistentnim ukoliko su pokazivali više od 50% rasta u prisustvu 25 mM koncentracija metala, što je četiri puta niže od koncentracije jona metala korišćenih u ovom radu. Sa druge strane, Nithya i saradnici su izolovali tri soja *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. i *Planococcus maritimus* koji su bili rezistentni na 300 mM koncentracije  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  (Nithya *et al.*, 2011).

Geni čiji proizvodi učestvuju u ostvarivanju rezistencije na teške metale su najčešće locirani na plazmidima (Deeb i Altalhi, 2009; Rojas *et al.*, 2011). Rezistencija na teške metale je veoma često praćena rezistencijom na antibiotike (Malik i Aleem, 2011), i pokazano je da je rezistencija na antibiotike veoma rasprostranjena među bakterijama izolovanim iz uzoraka kontaminiranih ugljovodonicima (Stapleton *et al.*, 2000). I u ovom radu je pokazano da veliki broj izolata (60%) pokazuje rezistenciju na bar jedan antibiotik (odjelci 4.4.3. i 4.5.2.), pri čemu je 15 izolata (40%) pokazivalo rezistenciju na ampicilin. Sedam izolata sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih ugljovodonika je pokazivalo rezistenciju na teške metale i antibiotike (Tabela 7). Međutim, nije primećena visoka incidenca multirezistencije na antibiotike, što je povoljna karakteristika za sojeve koji bi se upotrebljavali za bioremedijaciju. Među izolatima koji su pokazivali rezistenciju na teške metale (100 mM koncentracija) samo *Rhodococcus* sp. TN401 je imao sposobnost degradacije svih 15 testiranih jedinjenja i bio je senzitivn na sve testirane antibiotike, što ga čini veoma dobrim kandidatom za testiranje sposobnosti bioremedijacije mešovito zagađenih sredina.

### **5.3. Aplikativni potencijal TN izolata**

I Gram-pozitivni i Gram-negativni izolati analizirani u ovom radu se mogu okarakterisati kao robustne bakterije sa mogućnošću preživljavanja u različito kontaminiranim staništima i u prisustvu mešovite kontaminacije aromatičnim ugljovodonicima i teškim metalima, koje ne poseduju multirezistenciju na antibiotike. S obzirom na morfološke i fiziološke karakteristike koje im omogućavaju da opstaju u teškim uslovima životne sredine kolekcija Gram-pozitivnih bakterija izolovanih u ovom radu predstavlja značajan izvor izolata koji bi mogli biti primenjeni u bioremedijaciji. Takođe, ovi izolati predstavljaju bogat izvor potencijalno novih oksigenaza koje su uključene u biodegradaciju aromatičnih jedinjenja, a koje bi mogle biti upotrebljene u drugim oblastima biotehnologije, kao što je biokataliza (Li *et al.*, 2002).

#### **5.3.1. Bioremedijacija**

Kao što je već napomenuto, petrohemijski efluenti i nafta kao izvori zagađenja sadrže kompleksnu smešu ugljovodonika i metala (Atlas, 1981; Botalova, 2010). Dosadašnje studije bioremedijacionog potencijala mikroorganizama su uglavnom bile fokusirane na individualne organizme sa sposobnošću degradacije malog broja ugljovodoničnih jedinjenja. U ovom radu su izolovane 34 Gram-pozitivne i 4 Gram-negativne bakterije sa velikim potencijalom aplikacije u studijama bioremedijacije mešovito kontaminiranih staništa. Da bi se procenila mogućnost bioremedijacije neke sredine neophodno je uspostaviti dobru strategiju detoksikacije mikroorganizmima i predvideti način praćenja procesa remedijacije (Andreoni i Gianfreda, 2007). Zbog toga je neophodno izvršiti detaljnu analizu metaboličkih i genetičkih karakteristika organizama kako bi se predvideli i potencijalni problemi. S obzirom na to da je pokazano da metali, pored toksičnog efekta na rast mikroorganizama mogu imati i inhibitorni efekat na enzime koji učestvuju u degradaciji (Amor *et al.*, 2001; Pepi *et al.*, 2008; Sandrin i Maier, 2003), utvrđena je sposobnost TN izolata da degraduju i mono- i poliaromatična jedinjenja u prisustvu teških metala. Da bi se mogla proceniti efikasnost procesa bioremedijacije neophodno je ustanoviti molekularne tehnike za praćenje bakterijskih

populacija koje u njemu učestvuju (Andreoni i Gianfreda, 2007; Cavalca *et al.*, 2000). Obično se u tu svrhu koriste geni koji kodiraju enzime koji učestvuju u katabolizmu specifičnih polutanata poput *nid* gena koji kodiraju dioksidenu uključenu u degradaciju poliaromatičnih jedinjenja (Hall *et al.*, 2005). Konzervisani regioni katehol dioksidaze, centralnih enzima u metabolizmu najvećeg broja aromatičnih jedinjenja (Hendrickx *et al.*, 2006) se takođe mogu koristiti za procenu aktivnosti populacije u kontaminiranoj sredini (Mesarch *et al.*, 2000). Upotrebom degenerisanih prajmera za amplifikaciju konzervisanih regiona gena za katehol 1,2- (C12O) i katehol 2,3-dioksidenu (C23O) (An *et al.*, 2001; Sei *et al.*, 1999) umnoženi su fragmenti C12O kod *Pseudomonas* sp. TN301 i C23O kod *Bacillus* sp. TN124, *Bacillus* sp. TN125 i *Bacillus* sp. TN126.2. S obzirom da pripadaju velikoj porodici raznovrsnih gena nije iznenađujuće što je detektovan ovako mali broj C12O i C23O kod TN izolata (Eltis i Bolin, 1996; Hendrickx *et al.*, 2006).

### 5.3.2. Biokataliza

Bakterije izolovane u ovoj studiji predstavljaju izvor brojnih enzima koji bi mogli naći primenu u biokatalizi i biotransformaciji. Dioksidaze, enzimi koji učestvuju u katabolizmu aromatičnih jedinjenja i koje katalizuju regioselektivnu i stereoselektivnu oksidaciju mogu imati primenu u procesima oksidativne biotransformacije (Li *et al.*, 2002). Na primer, pokazano je da toluen 4-monooksidaza prečišćena iz *Pseudomonas mendocina* KR1 može da se koristi za *in vitro* hidroksilaciju aromatičnih ugljenikovih atoma i da u dvofaznim sistemima (organski rastvarač/pufer) pokazuje širu supstratnu specifičnost (Oppenheim *et al.*, 2001). U ovom radu su pomoću već objavljenih degenerisanih prajmera detektovani i sekvencirani geni za centralne enzime katabolizma aromatičnih ugljovodonika, katehol dioksidaze. Sekvence ovih gena bi se mogle primeniti za redizajn postojećih prajmera, ali i sami enzimi mogu naći primenu u procesima oksidativne biotransformacije.

Pripadnici rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* su poznati po proizvodnji lipaza, enzima sa širokom primenom u industriji hrane, deterdženata i farmaceutskoj industriji (Gupta *et al.*, 2004). Lipaze su najčešće korišćeni enzimi u sintetičkoj hemiji koji katalizuju hidrolizu estara karboksilnih kiselina u vodenoj sredini, odnosno reverznu reakciju u

organskim rastvaračima (Reetz, 2002). Iako prisustvo lipaza nije testirano u ovom radu, kolekcija bakterije izolovanih u ovom radu bi mogla poslužiti i kao izvor potencijalno novih formi ovih industrijski značajnih enzima (Bassegoda *et al.*, 2012).

### 5.3.3. Proizvodnja biopolimera

S obzirom na visok sadržaj ugljenika pre svega u uzorku S1 (Tabela 5) kao i visok odnos ugljenika prema azotu (C/N odnos) analizirane su sposobnosti izolata da akumuliraju biološke polimere (polifosfate, egzopolisaharide i polihidroksialkanoate) čime je proširena mogućnost upotrebe izolovanih bakterija u bioremedijaciji na upotrebu izolata i u industrijske svrhe. Sva tri biopolimera se akumuliraju u odgovoru na sredinski stres, ali takođe mogu imati industrijsku primenu (Chen, 2009; Rao *et al.*, 1998; Vu *et al.*, 2009).

#### 5.3.3.1. Polifosfati

Polifosfati su linearni lanci fosfatnih jedinica koje su međusobno povezane visoko energetske fosfoanhidridnim vezama i predstavljaju najrasprostranjenije biopolimere (Kornberg *et al.*, 1999). Potvrđene su različite uloge polifosfata kao što suočavanje energije, sakupljanje dvovalentnih katjona, ali i u fiziološkoj adaptaciji bakterija tokom rasta i razvića i odgovoru na stres izazvan nedostatkom nutrijenata i drugim sredinskim stresovima (Kornberg *et al.*, 1999). Slično, i *Escherichia coli* može da akumulira polifosfate u uslovima osmotskog ili nutritivnog stresa (Rao *et al.*, 1998). Od 38 bakterija izolovanih u ovom radu, 34% je pokazalo sposobnost akumulacije polifosfata (Slika 20 i odeljak 4.5.3.), od čega je polovina izolata koja je pokazala ovu sposobnost istovremeno imala sposobnost degradacije svih testiranih aromatičnih jedinjenja. Nivo akumulacije polifosfata zavisi od koncentracije neorganskog fosfata (Pi) u medijumu. Dva izolata, *Bacillus* sp. TN322 i *Pseudomonas* sp. TN301 su imali sposobnost akumulacije 68, odnosno 60 nmol Pi po mg ukupnih proteina u medijumu koji je sadržao 35 mM koncentraciju Pi. Prethodno prijavljene vrednosti za *Bacillus cereus* su 2 nmol Pi po mg ukupnih proteina (Shi *et al.*, 2004), dok je u medijumu sa 35 mM koncentracijom Pi *Pseudomonas putida* KT2440 akumulirao manje od 50 nmol Pi po mg ukupnih proteina (Tobin *et al.*, 2007).

Eutrofikacija, odnosno povećanje organske produkcije u vodenim ekosistemima je posledica drastično povišenih koncentracija azota i fosfora u ovim sredinama. Efluenti fabrika za preradu otpadnih voda su veoma bogati azotom i fosforom (Arvin, 1985) i glavni su izvor povećanja koncentracije ovih elemenata u rekama i jezerima. U proteklih 30 godina se intenzivno radi na razvijanju metoda za uklanjanje organskog ugljenika, azota i fosfora baziranim na upotrebi mikroorganizama (Seviour *et al.*, 2003). Izolati sa sposobnošću akumulacije polifosfata mogli bi naći primenu u procesu pojačanog biološkog uklanjanja fosfora iz voda (EPBR, *eng.* Enanced Biological Phosphorus Removal). Ovaj proces podrazumeva usvajanje neorganskog fosfora iz spoljašnje sredine i njegovo skladištenje u vidu polifosfata u kontrolisanim uslovima, nakon čega se ćelije uklanjaju, a samim tim i fosfor (Seviour *et al.*, 2003).

#### **5.3.3.2. Egzopolisaharidi (EPS)**

Egzopolisaharidi (EPS) predstavljaju još jedan važan biopolimer koji je zbog svojih osobina (stabilizacija, učvršćavanje, formiranje biofilмова, zadržavanje vode) veoma značajan u različitim industrijskim sektorima (industrija deterdženata, adheziva, farmaceutska i tekstilna industrija) (Moppert *et al.*, 2009). Ovaj biopolimer je uključen u formiranje biofilмова i ima ulogu u protekciji bakterija od različitih stresova i dehidratacije (Vu *et al.*, 2009). S obzirom na ulogu biofilмова u adaptaciji i preživljavanju mikroorganizama pretpostavlja se da je bioremedijacija posredovana mikroorganizmima koji formiraju biofilmove efikasnija od bioremedijacije sa planktonskim bakterijama (Vu *et al.*, 2009). Od svih izolata analiziranih u ovom radu četiri Gram-pozitive bakterije (*Bacillus* sp. TN124, *Bacillus* sp. TN125, *Bacillus* sp. TN128 i *Rhodococcus* sp. TN105) su imale sposobnost formiranja EPS-a (Slika 21). Wei i saradnici su pokazali da *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas putida* sa sposobnošću proizvodnje EPS-a imaju povišenu efikasnost adsorpcije  $Cd^{2+}$  u odnosu na sojeve kod kojih je sposobnost proizvodnje EPS-a narušena (Wei *et al.*, 2011). Takođe je pokazano da su EPS Gram-pozitivnih ćelija *B. subtilis* efikasniji u adsorpciji  $Cd^{2+}$  u odnosu na EPS-om podstaknutu adsorpciju  $Cd^{2+}$  kog *P. putida* (Wei *et al.*, 2011). Iako izolati sa sposobnošću produkcije EPS-a nisu tolerisali 100 mM koncentracije metalnih jona, mogli su rasti u prisustvu 20 puta povišenih koncentracija, što ih čini dobrim kandidatima kako za testiranje bioremedijacionih sposobnosti, tako i za uklanjanje



metala iz kontaminiranih sredina. Važno je napomenuti i da je multirezistentnost na antibiotike češća kod sojeva sa sposobnošću proizvodnje EPS-a (Arciola *et al.*, 2005). Međutim, izolati *Bacillus* sp. TN125 i *Rhodococcus* sp. TN105 koji su proizvodili značajnu količinu EPS-a nisu pokazivali multirezistenciju u odnosu na testirane antibiotike, već su bili rezistentni samo na ampicilin (Tabela 7).

### 5.3.3.3. Polihidroksialkanoati (PHA)

Polihidroksialkanoati su industrijski vredni biopolimeri koje bakterije obično akumuliraju u uslovima nutritivnog stresa kao što je suvišak ugljenika (C) i ograničenost azota (N) (Chen, 2009). S obzirom na visok C/N odnos u uzorcima sedimenta (20/1 u uzorcima S1, S2 i S4 i čak 30/1 u S3) pretpostavljeno je da bi se među izolatima mogao naći veliki broj proizvođača polihidroksialkanoata. Međutim, svega 16% izolata, tri iz roda *Bacillus* (TN22, TN122 i TN128, slika 23) i Gram-negativni izolati (Slika 24) su imali sposobnost akumulacije ovog biopolimera. Nivoi akumuliranog polihidroksibutirata kod *Bacillus subtilis* (Singh *et al.*, 2009) i *Sinorhizobium melioli* (Lakshman i Shamala, 2006) bili su od 2 do 8 puta viši u odnosu na nivo akumulacije PHB kod izolata u ovom radu. Sa druge strane, kod TN izolata iz roda *Bacillus* je po prvi put pokazana konverzija toluena u PHB. Do sada je opisana akumulacija sličnog polimera poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerata) do 10% CDW kod *Rhodococcus aetheriovorans* IAR1 (Hori *et al.*, 2009).

Vrste roda *Pseudomonas* su poznate po svojoj sposobnosti da akumuliraju polihidroksialkanoate iz različitih supstrata, uključujući i monoaromatične ugljovodonike (Huijberts *et al.*, 1992; Nikodinovic *et al.*, 2008; Rojas-Rosas *et al.*, 2007). *Pseudomonas* sp. TN301 je akumulirao 4.3 i 2.5 puta više mcl-PHA u odnosu na *P. aeruginosa* i *P. putida* KT2442 kada je glukoza korišćena kao izvor ugljenika i energije (Huijberts *et al.*, 1992; Rojas-Rosas *et al.*, 2007). Međutim, *P. stutzeri* je pod istim uslovima gajenja akumulirao 1.2 puta više polimera u odnosu na izolat TN301 (He *et al.*, 1998).

Sposobnost konverzije monoaromatičnih jedinjenja (BTEX, stiren) u mcl-PHA je već opisana kod sojeva vrste *P. putida* (Nikodinovic *et al.*, 2008; Tobin i O'Connor, 2005; Ward *et al.*, 2005). Stoga je izolat *Pseudomonas* sp. TN301 analiziran za sposobnost

konverzije širokog spektra monoaromatičnih ugljovodonika u mcl-PHA (Tabela 11). Produktivnost akumulacije mcl-PHA kod *Pseudomonas* sp. TN301 bila je 2 (benzen), 1.5 (toluen), odnosno 1.7 (etilbenzen) puta niža u odnosu na produktivnost *P. putida* F1 gajenom na istim supstratima (Nikodinovic *et al.*, 2008). Međutim, produktivnost akumulacije mcl-PHA bila je jednaka produktivnosti kada su *P. putida* F1, *P. putida* mt-2 i *P. putida* CA-3 korišćeni kao konzorcijum (Nikodinovic *et al.*, 2008). Sposobnost izolata *Pseudomonas* sp. TN301 da degraduje širi opseg monoaromatičnih ugljovodonika i konvertuje ih u mcl-PHA omogućava njegovu potencijalnu biotehnološku aplikaciju.

#### **5.4. Biotehnološka konverzija poliaromatičnih ugljovodonika u PHA**

Bakterijski sojevi sa sposobnošću degradacije monoaromatičnih ugljovodonika i njihove konverzije u mcl-PHA su uspešno upotrebljeni u hemo-biotehnološkom procesu konverzije plastičnog otpada kao što su polistiren i polietilenteraftalat (PET) u biodegradabilnu plastiku (Kenny *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2006). U ovom procesu se kao izvor ugljenika za rast bakterija i akumulaciju PHA koristi materijal dobijen pirolizom plastičnog otpada. Pirolitička ulja kompleksnijih otpadnih materijala, kao što su istrošene gume sadrže značajne količine poliaromatičnih ugljovodonika (Cunliffe i Williams, 1998; Kaminsky i Kim, 1999). Da bi se ovakav materijal mogao koristiti za konverziju u mcl-PHA od velikog je značaja izolovati sojeve sa sposobnošću konverzije poliaromatičnih ugljovodonika u mcl-PHA.

Pokazano je da *Pseudomonas* sp. TN301 ima sposobnost konverzije poliaromatičnih ugljenika u mcl-PHA. Do sada je samo analizom metaboloma *Sinorhizubium* sp. C4 gajenog na fenantrenu ukazala na sposobnost ovog soja da akumulira PHB (Keum *et al.*, 2008), međutim ni za jedan soj do sada nije pokazana sposobnost konverzije poliaromatičnih jedinjenja u mcl-PHA.

Tokom analize sposobnosti izolata *Pseudomonas* sp. TN301 da konvertuje naftalen u mcl-PHA primećen je problem biodostupnosti ovog poliaromatičnog jedinjenja. Slaba biodostupnost mono- i poliaromatičnih supstrata je često prijavljivana u literaturi (Atlas i Cerniglia, 1995; Van Hamme *et al.*, 2003). Zbog toga je ispitivan efekat različitih

rastvarača (metanola, acetona, 1-pentanona) za koje je ranije pokazano da povećavaju rastvorljivost naftalena u vodi (Dickhut *et al.*, 1989). Efekat surfaktanata na biodostupnost poliaromatičnih supstrata je ranije analiziran i pokazano je da oni mogu imati pozitivan uticaj (Hickey *et al.*, 2007), u nekim studijama nisu imali nikakvog efekta (Laha i Luthy, 1992), dok su neki autori pokazali inhibiciju biodegradacije pri upotrebi surfaktanata (Bramwell i Laha, 2000; Doong i Lei, 2003). U ovom radu je analiziran efekat različitih rastvarača na povećanje rastvorljivosti naftalena u MSM medijumu, kao i efekat sintetičkog surfaktanta Tween-a 80 na biodostupnost poliaromatičnih supstrata. U slučaju *Pseudomonas* sp. TN301 dodatak Tween-a 80 je imao najbolji efekat kako na rast izolata, tako i na akumulaciju mcl-PHA (Slika 25).

Evidentno je da je sposobnost konverzije aromatičnih supstrata u mcl-PHA zavisna od izvora ugljenika (Tabele R6 i R7). Naime, biomasa koju je *Pseudomonas* sp. TN301 postizao tokom rasta na mono- i poliaromatičnim supstratima je bila ujednačena, ali su se poliaromatična jedinjenja pokazala kao slabiju supstrati za akumulaciju mcl-PHA. Uzrok ovom fenomenu može biti slabija biodostupnost poliaromatičnih jedinjenja, ali i različita efikasnost njihovog korišćenja. Poređenjem produktivnosti akumulacije mcl-PHA iz glukoze i naftalena, pri čemu je korišćena ista količina ugljenika u oba slučaja ( $1.8 \text{ g l}^{-1}$ ) pokazano je da se postižu dvostruko manja biomasa i količina akumuliranog mcl-PHA kada je izolat gajen na naftalenu (Slika 26). S obzirom na to da se polihidroksialkanoati akumuliraju u odgovoru na stres izazvan disbalansom nutrijenata (Chen, 2009; Hoffmann i Rehm, 2004), kao i na toksičnost naftalena kao supstrata (Pumphrey i Madsen, 2007) slabiji rast i manja količina akumuliranog biopolimera nisu iznenađujući. Toksični efekat aromatičnog supstrata pri ograničenoj dostupnosti azota je demonstriran kod *P. putida* G7 gajenom na naftalenu (Ahn *et al.*, 1998), kao i kod *P. putida* CA-3 gajenom na stirenu (Nikodinovic-Runic *et al.*, 2009). Prisustvo većeg broja kondenzovanih prstenova u slučaju fenantrena i krizena dovelo je do značajnog smanjenja količine akumuliranog polimera (Tabela 11), dok kada su metilnaftaleni i dimetilnaftalen korišćeni kao supstrati mcl-PHA nije detektovan.

Sposobnost *Pseudomonas* sp. TN301 da degraduje širok spektar aromatičnih supstrata i da ih konvertuje u mcl-PHA, kao i njegoa tolerancija na teške metale ga čine

kandidatom za upotrebu u hemo-biotehnološkoj konverziji petrohemijskog otpada u industrijski vrednu termoplastiku.

## 6. ZAKLJUČCI

- Mikroanaliza četiri uzorka sedimenta uzorkovanih u blizini petrohemijske industrije pokazala je znatno povišenu količinu ukupnog ugljenika u odnosu na azot, što je indikator prisutnosti zagađenja organskim jedinjenjima. Kao što je i bilo očekivano, najveća količina ukupnog ugljenika detektovana je u sedimentu kanala za ispuštanje prerađenih otpadnih voda. U ovom uzorku je konstatovana i najviša koncentracija metala  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  u odnosu na preostala tri uzorka.
- Sedimenti uzorkovani u blizini petrohemijske industrije su dobar izvor metabolički raznovrsnih bakterija koje imaju potencijal da se primene u bioremedijaciji:
  - Primenom selektivne metode za izolaciju Gram-pozitivnih bakterija i odabirom izolata sa specifičnim osobinama karakterističnim za Gram-pozitivne bakterije, iz sva četiri uzorka je izolovano ukupno 218 bakterija. Metodom predobogaćivanja uzoraka naftalenom u kombinaciji sa selekcijom najbrže rastućih bakterija selektovano je 7 bakterija.
  - Testiranjem sposobnosti rasta odabranih 225 izolata na aromatičnim jedinjenjima pokazano je da čak 61% izolata ima sposobnost korišćenja barem jednog aromatičnog jedinjenja kao jedinog izvora ugljenika i energije. Sposobnost degradacije više od 9 testiranih aromatičnih jedinjenja je imalo 38 izolata, od kojih je 61% bio poreklom iz sedimenta kanala za ispuštanje prerađenih otpadnih voda.
  - Među 10 izolata (8 Gram-pozitivnih i 2 Gram-negativna) sa sposobnošću rasta u prisustvu 100 mM koncentracija teških metala izdvojio se *Bacillus* sp. TN303 koji je tolerisao 100 mM koncentracije tri metala ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ).
  - Iako je čak 60% izolata pokazalo rezistenciju na neki od testiranih antibiotika, nije primećena pojava multirezistentnosti, osim kod

*Bacillus* sp. TN303 koji je bio rezistentan na 4 antibiotika. Najveći broj sojeva (40%) je bio rezistentan na ampicilin.

- Metabolička raznovrsnost izolovanih bakterija ima genetičku potporu u prisustvu ključnih enzima uključenih u katabolizam aromatičnih jedinjenja (katehol 1,2- i katehol 2,3-dioksidogenaza)
- Metabolički raznovrsne bakterije izolovane iz sedimenata uzorkovanih u blizini petrohemijske industrije su pokazale i taksonomsku raznovrsnost:
  - Izolati sa sposobnošću degradacije širokog spektra aromatičnih jedinjenja su identifikovani na osnovu 16S rDNK sekvence i pokazano je da 34 izolata pripada grupi Gram-pozitivnih bakterija. Čak 47% Gram-pozitivnih izolata je svrstano u rod *Bacillus*, dok su ostali izolati pripadali rodovima *Rhodococcus* (7 izolata), *Arthrobacter* (6 izolata), *Streptomyces* (2 izolata), *Gordonia* (2 izolata) i *Staphylococcus* (1 izolat). Gram-negativni izolati su pripadali rodu *Sinorhizobium* (2 izolata) i po jedan izolat iz rodova *Acinetobacter* i *Pseudomonas*.
  - Izolati *Rhodococcus* sp. TN105, *Arthrobacter* sp. TN221 i *Gordonia* sp. TN103 su na osnovu filogenetske analize označeni kao novi bakterijski sojevi.
- Veliki broj izolovanih sojeva je imao sposobnost proizvodnje bar jednog od biopolimera (polifosfati, egzopolisaharadi i polihidroksialkanoati):
  - Od 37% izolata sa sposobnošću akumulacije polifosfata najviši nivoi ovog biopolimera su detektovani kod *Bacillus* sp. TN323 i *Pseudomonas* sp. TN301. Detektovani nivoi polifosfata kod ovih izolata su bili viši od količina prijavljenih u literaturi.
  - Proizvodnja egzopolisaharida je utvrđena kod 4 Gram-pozitivna soja, pri čemu je *Rhodococcus* sp. TN105, novi soj, imao sposobnost degradacije svih 15 testiranih jedinjenja i proizvodnje egzopolisaharida.
  - *Bacillus* sp. TN22, *Bacillus* sp. TN122 i *Bacillus* sp. TN128 su imali sposobnost akumulacije relativno niskih nivoa polihidroksibutirata kada su glukoza ili toluen korišćeni kao izvori ugljenika i energije, ali je po

prvi put pokazana sposobnost Gram-pozitivnih bakterija da konvertuju aromatično jedinjenje u ovaj biopolimer.

- Velika metabolička raznovrsnost Gram-pozitivnih bakterija izolovanih u ovom radu, u kombinaciji sa dobrim fiziološkim karakteristikama ove grupe bakterija koje im omogućavaju preživljavanje u teškim uslovima životne sredine daje im širok aplikativni potencijal u: bioremedijaciji, uklanjanju fosfata iz industrijskih otpadnih voda procesom pojačanog biološkog uklanjanja (EBPR), industrijskoj proizvodnji egzopolisaharida i polihidroksibutirata.
- Među Gram-negativnim izolatima izdvojio se *Pseudomonas* sp. TN301, sa sposobnošću rasta na svim testiranim monoaromatičnim i velikom broju poliaromatičnih jedinjenja, tolerancije 100 mM Cd<sup>2+</sup> i sposobnošću akumulacije polifosfata i polihidroksialkanoata srednje dužine lanca (mcl-PHA).
- Po prvi put je pokazana sposobnost jedne bakterije (izolat *Pseudomonas* sp. TN301) da konvertuje poliaromatične ugljovodonike (naftalen, fenantren i krizen, kao i smeše ovih jedinjenja) u mcl-PHA. *Pseudomonas* sp. TN301 je takođe mogao da konvertuje veliki broj aromatičnih jedinjenja i njihove smeše u mcl-PHA.
- Sposobnost *Pseudomonas* sp. TN301 da degraduje širok spektar aromatičnih supstrata i da ih konvertuje u mcl-PHA, kao i njegova tolerancija na teške metale ga čine kandidatom za upotrebu kako u bioremedijaciji tako i u hemobiotehnološkoj konverziji petrohemijskog otpada u industrijski vrednu termoplastiku.

## LITERATURA

- Abraham, G.A., Gallardo, A., San Roman, J., Olivera, E.R., Jodra, R., Garcia, B., Minambres, B., Garcia, J.L., Luengo, J.M. (2001) Microbial Synthesis of Poly(B-hydroxyalkanoates) Bearing Phenyl Groups from *Pseudomonas putida*: Chemical Structure and Characterization. *Biomacromolecules*, **2**, 562-567.
- Ahmed, F., Bibi, M.H., Fukushima, T., Seto, K., Ishiga, H. (2011) Recent sedimentary environment of coastal lagoon in southwestern Japan: evidence from major and trace elements. *Environ Monit Assess*, **173**, 167-80.
- Ahn, I.S., Ghiorse, W.C., Lion, L.W., Shuler, M.L. (1998) Growth kinetics of *Pseudomonas putida* G7 on naphthalene and occurrence of naphthalene toxicity during nutrient deprivation. *Biotechnol Bioeng*, **59**, 587-94.
- Aldor, I.S., Keasling, J.D. (2003) Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol*, **14**, 475-83.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Amor, L., Kennes, C., Veiga, M.C. (2001) Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. *Bioresour Technol*, **78**, 181-5.
- An, H.R., Park, H.H., Kim, E.S. (2001) Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (*catA*) from *Streptomyces setonii*. *FEMS Microbiol Lett*, **195**, 17-22.
- Anderson, A.J., Dowes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Mol Biol Rev*, **54**, 450-472.
- Anderson, R.T., Lovley, D.R. (1997) Ecology and biogeochemistry of *in situ* groundwater bioremediation. in *Advances in Microbial Ecology*, (Ed.) Jones, J. G., Plenum Press, New York, 289-350.
- Andreoni, V., Gianfreda, L. (2007) Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Appl Microbiol Biotechnol*, **76**, 287-308.
- APA. 2005. Aromatics: Improving the quality of your life. Aromatics Producers Association - Cefic.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Donati, M.E., Pirini, V., Visai, L., Speziale, P., Montanaro, L. (2005) Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*, **26**, 6530-6535.
- Arias, S., Sandoval, A., Arcos, M., Cañedo, L.M., Maestro, B., Sanz, J.M., Naharro, G., Luengo, J.M. (2008) Poly-3-hydroxyalkanoate synthases from *Pseudomonas putida* U: substrate specificity and ultrastructural studies. *Microb Biotechnol*, **1**, 170-176.
- Arvin, E. (1985) Biological removal of phosphorus from wastewaters. *Crit Rev Env Contr*, **15**, 25-64.
- Atlas, R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev*, **45**, 180-209.



- Atlas, R.M., Bartha, R. 1998. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4th edn. ed. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.
- Atlas, R.M., Cerniglia, C.E. (1995) Bioremediation of petroleum pollutants. *Bioscience*, **45**, 332-338.
- Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., Nies, L. (2003) Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 3350-8.
- Bartholomew, J.W., Finkelstein, H. (1958) Relationship of cell wall staining to gram differentiation. *J Bacteriol*, **75**, 77-84.
- Bassegoda, A., Pastor, F.I., Diaz, P. (2012) *Rhodococcus* sp. strain CR-53 LipR, the first member of a new bacterial lipase family (family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* lipase clan. *Appl Environ Microbiol*, **78**, 1724-32.
- Blumer, M. (1976) Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific American*, **234**, 35-45.
- Bogan, B.W., Lahner, L.M., Sullivan, W.R., Paterek, J.R. (2003) Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *J Appl Microbiol*, **94**, 230-9.
- Boswell, C.D., Dick, R.E., Macaskie, L.E. (1999) The effect of heavy metals and other environmental conditions on the anaerobic phosphate metabolism of *Acinetobacter johnsonii*. *Microbiology*, **145**, 1711-20.
- Botalova, O. (2010) Characterization of organic contaminants in industrial wastewaters from direct discharges and their behavior in fluvial systems of North Rhine-Westphalia in: *Faculty of Georesources and Materials Engineering RWTH Aachen University*.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.P. (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, **43**, 156-64.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bradley, L.J.N., Magee, B.H., Allen, S.L. (1994) Background Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) and Selected Metals in New England Urban Soils. *J Soil Contam*, **3**, 1-13.
- Bramwell, D.A., Laha, S. (2000) Effects of surfactant addition on the biomineralization and microbial toxicity of phenanthrene. *Biodegradation*, **11**, 263-277.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., Fuller, R.C. (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl Environ Microbiol*, **54**, 1977-82.
- Broderick, J.B. (1999) Catechol dioxygenases. *Essays Biochem*, **34**, 173-89.
- Buhler, B., Schmid, A., Hauer, B., Witholt, B. (2000) Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehydes, and acids in *Escherichia coli* JM101. *J Biol Chem*, **275**, 10085-92.
- C&EN. (2005) Production: Growth in most regions. *Chemical & Engineering News*, **83**, 67-76.

- Carter, S.G., Karl, D.W. (1982) Inorganic phosphate assay with malachite green: an improvement and evaluation. *J Biochem Biophys Methods*, **7**, 7-13.
- Cavalca, L., Dell'Amico, E., Andreoni, V. (2004) Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 576-87.
- Cavalca, L., Di Gennaro, P., Colombo, M., Andreoni, V., Bernasconi, S., Ronco, I., Bestetti, G. (2000) Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. *Res Microbiol*, **151**, 877-87.
- Chakraborty, R., Coates, J.D. (2004) Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 437-46.
- Chang, S.W., La, H.J., Lee, S.J. (2001) Microbial degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) contaminated groundwater in Korea. *Water Sci Technol*, **44**, 165-171.
- Chen, G.-Q. (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev*, **38**, 2434-2446.
- Chen, G.-Q., Wu, Q. (2005) Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1-15.
- Coates, J.D., Chakraborty, R., McInerney, M.J. (2002) Anaerobic benzene biodegradation--a new era. *Res Microbiol*, **153**, 621-8.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. (2009) The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, **37**, 141-145.
- Conrad, C.F., Fugate, D., Daus, J., Chisholm-Brause, C.J., Kuehl, S.A. (2007) Assessment of the historical trace metal contamination of sediments in the Elizabeth River, Virginia. *Mar Pollut Bull*, **54**, 385-95.
- Cunliffe, A.M., Williams, P.T. (1998) Composition of oils derived from the batch pyrolysis of tyres. *J Anal Appl Pyrol*, **44**, 131-152.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., Scannell, J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10494-9.
- Cybulski, Z., Dziurla, E., Kaczorek, E., Olszanowski, A. (2003) The Influence of Emulsifiers on Hydrocarbon Biodegradation by Pseudomonadacea and Bacillaceae Strains. *Spill Sci Technol B*, **8**, 503-507.
- Daane, L.L., Harjono, I., Zylstra, G.J., Haggblom, M.M. (2001) Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 2683-91.
- Dagley, S., Evans, W.C., Ribbons, D.W. (1960) New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Nature*, **188**, 560-566.
- Dandagi, P.M., Mastiholimath, V.S., Patil, M.B., Gupta, M.K. (2006) Biodegradable microparticulate system of captopril. *Int J Pharm*, **307**, 83-8.
- Dawes, E.A., Senior, P.J. (1973) Energy reserve polymers in microorganisms. *Adv Microb Physiol*, **10**, 178-203.
- De Eugenio, L.I., Escapa, I.F., Gala'n, B., Garc'ía, J.L., Prieto, M.a.A. (2008) Expression profile of *pha* gene cluster of *Pseudomonas putida* KT2442. *Macromol. Symp.*, **269**, 8-10.
- De Eugenio, L.I., Garcia, P., Luengo, J.M., Sanz, J.M., Roman, J.S., Garc'ía, J.L., Prieto, M.a.A. (2007) Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific

- intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442 characterization of a paradigmatic enzyme. *J Biol Chem*, **282**, 4951-4962.
- de Roo, G., Kellerhals, M.B., Ren, Q., Witholt, B., Kessler, B. (2002) Production of chiral *R*-3-hydroxyalkanoic acids and *R*-3-hydroxyalkanoic acid methylesters via hydrolytic degradation of polyhydroxyalkanoate synthesized by *Pseudomonads*. *Biotechnol Bioeng*, **77**, 717-722.
- De Smet, H.L., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J., Wynberg, H. (1983) Characterization of Intracellular Inclusions Formed by *Pseudomonas oleovorans* During Growth on Octane. *J Bacteriol*, **154**, 870-878.
- de Vasconcellos, S.P., Angolini, C.F.F., García, I.N.S., Dellagnezze, B.M., da Silva, C.C., Marsaioli, A.J., dos Santos Neto, E.V., de Oliveira, V.M. (2010) Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Org Geochem*, **41**, 675–681.
- Deeb, B.E., Altalhi, A.D. (2009) Degradative plasmid and heavy metal resistance plasmid naturally coexist in phenol and cyanide assimilating bacteria. *Am J Biochem Biotech*, **5**, 84-93.
- Delafield, F.P., Cooksey, K.E., Doudoroff, M. (1965) Beta-hydroxybutyric dehydrogenase and dimer hydrolase of *Pseudomonas lemoignei*. *J Biol Chem*, **240**, 4023-4028.
- Diaz, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol*, **7**, 173-80.
- Dickhut, R.M., Andren, A.W., Armstrong, D.E. (1989) Naphthalene Solubility in Selected Organic Solvent/Water Mixtures *J. Chem. Eng. Data*, **34**, 438-434.
- Djokic, L., Narancic, T., Nikodinovic-Runic, J., Savic, M., Vasiljevic, B. (2011) Isolation and characterization of four novel Gram-positive bacteria associated with the rhizosphere of two endemorelict plants capable of degrading a broad range of aromatic substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*, **91**, 1227-38.
- Doong, R.A., Lei, W.G. (2003) Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. *J Hazard Mater*, **B96**, 15-27.
- Du, G., Yu, J. (2002) Green Technology for Conversion of Food Scraps to Biodegradable Thermoplastic Polyhydroxyalkanoates. *Environ Sci Technol*, **36**, 5511-5516.
- Dugalic, G., Krstic, D., Jelic, M., Nikezic, D., Milenkovic, B., Pucarevic, M., Zeremski-Skoric, T. (2010) Heavy metals, organics and radioactivity in soil of western Serbia. *J Hazard Mater*, **177**, 697-702.
- Dunn, N.W., Gunsalus, I.C. (1973) Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*, **114**, 974-9.
- Edlund, A., Jansson, J.K. (2006) Changes in active bacterial communities before and after dredging of highly polluted baltic sea sediments. *App Environ Microbiol*, **72**, 6800-6807.
- Eltis, L.D., Bolin, J.T. (1996) Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J Bacteriol*, **178**, 5930-7.
- EPA. (2012) <http://www.epa.gov/epahome/quickfinder.htm>.
- EPA. (2001) List of lists: Consolidated list of chemicals subject to the emergency planning and community right-to-know act (EPCRA) and Section 112(r) of the

- clean air act, Vol. EPA 550-B-01-003, United States Environmental Protection Agency.
- EPA/Serbia. (1994) Regulation on the content of hazardous materials in soil and fresh water - Pravilnik o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje (Ed.) M.a.S.P. Serbian Ministry of Environment, Vol. 23/94, Sluzbeni Glasnik.
- Esen, E., Kucuksezgin, F., Uluturhan, E. (2010) Assessment of trace metal pollution in surface sediments of Nemrut Bay, Aegean Sea. *Environ Monit Assess*, **160**, 257/266.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C. (2008) In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresour Technol*, **99**, 5296-308.
- Felsenstein, J. (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
- Fett, W.F., Wells, J.M., Cescutti, P., Wijey, C. (1995) Identification of exopolysaccharides produced by fluorescent pseudomonads associated with commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 513-517.
- Frost, J.A., Sullivan, S.A. (2007) European markets for bioplastics. *MI86-39*.
- Fuhs, G.W., Chen, M. (1975) Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microb Ecol*, **2**, 119-138.
- Garcia, B., Olivera, E.R., Minambres, B., Fernandez-Valverde, M., Canedo, L.M., Prieto, M.A., Garcia, J.L., Martinez, M., Luengo, J.M. (1999) Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. *J Biol Chem*, **274**, 29228-29241.
- Garcia, B., Olivera, E.R., Minambres, B., Fernandez-Valverde, M., Canedo, L.M., Prieto, M.A., Garcia, J.L., Martinez, M., Luengo, J.M. (1999) Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-CoA catabolon. *J Biol Chem*, **274**, 29228-29241.
- Ghosh, A., Paul, D., Prakash, D., Mayilraj, S., Jain, R.K. (2006) *Rhodococcus imtechensis* sp. nov., a nitrophenol-degrading actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol*, **56**, 1965-9.
- Gibson, D.T., Parales, R.E. (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, **11**, 236-43.
- Golyshin, P.N., Martins Dos Santos, V.A., Kaiser, O., Ferrer, M., Sabirova, Y.S., Lunsdorf, H., Chernikova, T.N., Golyshina, O.V., Yakimov, M.M., Puhler, A., Timmis, K.N. (2003) Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. *J Biotechnol*, **106**, 215-20.
- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R. (2007) Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 3272-3282.
- Gosar, M. (2008) Mercury in River Sediments, Floodplains and Plants Growing thereon in Drainage Area of Idrija Mine, Slovenia. *Polish J Environ Stud*, **17**, 227-236.

- Grund, E., Denecke, B., Eichenlaub, R. (1992) Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. *Appl Environ Microbiol*, **58**, 1874-7.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 763-81.
- Habe, H., Omori, T. (2003) Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 225-43.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol*, **13**, 7-10.
- Hall, K., Miller, C.D., Sorensen, D.L., Anderson, A.J., Sims, R.C. (2005) Development of a catabolically significant genetic probe for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading mycobacteria in soil. *Biodegradation*, **16**, 475-84.
- Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P. (2009) Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Haz Mat*, **169**, 1-15.
- He, W., Tian, W., Zhang, G., Chen, G.-Q., Z. Zhang, Z. (1998) Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. *FEMS Microbiol Lett*, **169**, 45-49.
- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Ruegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber, F., Egli, T., Mau, M., Schlomann, M., Brennerova, M., Brenner, V., Pieper, D.H., Top, E.M., Dejonghe, W., Bastiaens, L., Springael, D. (2006) Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J Microbiol Methods*, **64**, 250-65.
- Hickey, A.M., Gordon, L., Dobson, A.D., Kelly, C.T., Doyle, E.M. (2007) Effect of surfactants on fluoranthene degradation by *Pseudomonas alcaligenes* PA-10. *Appl Microbiol Biotechnol*, **74**, 851-6.
- Hilyard, E.J., Jones-Meehan, J.M., Spargo, B.J., Hill, R.T. (2008) Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 1176-82.
- Hoffmann, N., Rehm, B.H. (2004) Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, **237**, 1-7.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Wards, J.M., Shrempf, H. 1985. *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual. First ed.* John Innes Foundation, Norwich.
- Hori, K., Kobayashi, A., Ikeda, H., Unno, H. (2009) *Rhodococcus aetherivorans* IAR1, a new bacterial strain synthesizing poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from toluene. *J Biosci Bioeng*, **107**, 145-50.
- Huijberts, G.N., Eggink, G. (1996) Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2442 in continuous cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, **46**, 233-239.
- Huijberts, G.N., Eggink, G., de Waard, P., Huisman, G.W., Witholt, B. (1992) *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-

- hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl Environ Microbiol* **58**, 536-544.
- Huisman, G.W., De Leeuw, O., Eggink, G., Witholt, B. (1989) Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent *Pseudomonads*. *Appl Environ Microbiol*, **55**, 1949-1954.
- Huisman, G.W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., Witholt, B. (1991) Metabolism of Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans* Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J Biol Chem*, **266**, 2191-2198.
- Izumi, S., Yamamoto, M., Suzuki, K., Shimizu, A., Aranishi, F. (2007) Identification and detection of *Pseudomonas plecoglossicida* isolates with PCR primers targeting the gyrB region. *J Fish Dis*, **30**, 391-7.
- Juck, D., Charles, T., Whyte, L.G., Greer, C.W. (2000) Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol*, **33**, 241-249.
- Kai, Z., Ying, D., Chen, G.Q. (2003) Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates. *Biochem Engin J*, 115-124.
- Kaminsky, W., Kim, J.-S. (1999) Pyrolysis of mixed plastics into aromatics. *J Anal Appl Pyrol*, **51**, 127-134.
- Kanally, R.A., Bartha, R., Watanabe, K., Harayama, S. (2000) Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 4205-11.
- Kanally, R.A., Harayama, S. (2000) Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol*, **182**, 2059-67.
- Kenny, S.T., Nikodinovic-Runic, J., Kaminsky, W., Woods, T., Babu, R.P., Keely, C.M., Blau, W.J., O'Connor, K.E. (2008) Up-Cycling of PET (Polyethylene Terephthalate) to the Biodegradable Plastic PHA (Polyhydroxyalkanoate). *Environ Sci Technol*, **42**, 7696-7701.
- Kessler, B., Witholt, B. (2001a) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J Biotechnol* **86**, 97-104.
- Kessler, B., Witholt, B. (2001b) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J Biotechnol*, **86**, 97-104.
- Keum, Y.S., Seo, J.S., Li, Q.X., Kim, J.H. (2008) Comparative metabolomic analysis of *Sinorhizobium* sp. C4 during the degradation of phenanthrene. *Appl Microbiol Biotechnol*, **80**, 863-72.
- Klinke, S., De Roo, G., Witholt, B., Kessler, B. (2000) Role of *phaD* in accumulation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans*. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 3705-3710.
- Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., Varila, P. (2005) Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, **6**, 561-565.
- Kornberg, A., Rao, N.N., Ault-Riche, D. (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem*, **68**, 89-125.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B. (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl Environ Microbiol*, **54**, 2924-32.

- Laha, S., Luthy, R.G. (1992) Effects of non-ionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol Bioeng*, **40**, 1367-1380.
- Laha, S., Tansel, B., Ussawarujikulchai, A. (2009) Surfactant-soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: a review. *J Environ Manage*, **90**, 95-100.
- Lakshman, K., Shamala, T.R. (2006) Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora* sp. culture and its enzymes. *Enzyme Microb Tech*, **39**, 1471-1475.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. in: *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*, (Eds.) E. Stackebrandt, M.M. Goodfellow, John Wiley and Sons, Inc. Chichester, UK, pp. 115-175.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev*, **54**, 305-315.
- Lee, S.Y. (1996) Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng*, **49**, 1-14.
- Lee, S.Y., Lee, Y., Wang, F. (1999) Chiral compounds from bacterial polyesters: Sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnol Bioeng*, **65**, 363-368.
- Li, Z., van Beilen, J.B., Duetz, W.A., Schmid, A., de Raadt, A., Griengl, H., Witholt, B. (2002) Oxidative biotransformations using oxygenases. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 136-144.
- Liu, J., Amemiya, T., Chang, Q., Qian, Y., Itoh, K. (2012) Toluene dioxygenase expression correlates with trichloroethylene degradation capacity in *Pseudomonas putida* F1 cultures. *Biodegradation*.
- Long, R.M., Lappin-Scott, H.M., Stevens, J.R. (2009) Enrichment and identification of polycyclic aromatic compound-degrading bacteria enriched from sediment samples. *Biodegradation*, **20**, 521-31.
- Lu, X., Zhang, J., Wu, Q., Chen, G.Q. (2003) Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid beta-oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett*, **221**, 97-101.
- Madison, L.L., Huisman, G.W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 21-53.
- Malik, A., Aleem, A. (2011) Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ Monit Assess*, **178**, 293-308.
- Margesin, R., Schinner, F. (2001a) Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol*, **56**, 650-63.
- Margesin, R., Schinner, F. (2001b) Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 3127-33.
- Martinkova, L., Uhnakova, B., Patek, M., Nesvera, J., Kren, V. (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int*, **35**, 162-177.
- McClay, K., Fox, B.G., Steffan, R.J. (2000) Toluene monooxygenase-catalyzed epoxidation of alkenes. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1877-82.
- McElroy, A.E., Woodward, J.C., Teal, J.M. 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. in: *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, (Ed.) U. Varanasi, CRC Press. Boc Raton, FL, pp. 2-39.

- McGrath, J.W., Quinn, J.P. (2000) Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 4068-73.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R. (2011) Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ Int*, **37**, 1362–1375.
- Megharaj, M., Singleton, I., McClure, N.C., Naidu, R. (2000) Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Arch Environ Contam Toxicol*, **38**, 439-45.
- Menn, F.M., Applegate, B.M., Sayler, G.S. (1993) NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 1938-42.
- Mesarch, M.B., Nakatsu, C.H., Nies, L. (2000) Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 678–683.
- Mochizuki, M., Hiram, M. (1997) Structural effects on the biodegradation of aliphatic polyesters. *Polym Adv Tech*, **8**, 203-209.
- Moppert, X., Le Costaouec, T., Raguene, G., Courtois, A., Simon-Colin, C., Crassous, P., Costa, B., Guezennec, J. (2009) Investigations into the uptake of copper, iron and selenium by a highly sulphated bacterial exopolysaccharide isolated from microbial mats. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **36**, 599-604.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. (2010) Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol Res*, **165**, 363-75.
- Mueller, J.G., Cerniglia, C.E., Pritchard, P.H. 1996. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. in: *Bioremediation: principles and applications*, (Eds.) R.L. Crawford, D.L. Crawford, Cambridge University Press. Cambridge, UK, pp. 125-194.
- Mullan, A., Quinn, J.P., McGrath, J.W. (2002) Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH conditions. *Microb Ecol*, **44**, 69-77.
- Nayak, A.S., Sanjeev Kumar, S., Santosh Kumar, M., Anjaneya, O., Karegoudar, T.B. (2011) A catabolic pathway for the degradation of chrysene by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04. *FEMS Microbiol Lett*, **320**, 128-34.
- Nebe, B., Forster, C., Pommerenke, H., Fulda, G., Behrend, D., Bernewski, U., Schmitz, K.P., Rychly, J. (2001) Structural alterations of adhesion mediating components in cells cultured on poly-beta-hydroxy butyric acid. *Biomaterials*, **22**, 2425-2434.
- Nikodinovic-Runic, J., Flanagan, M., Hume, A.R., Cagney, G., O'Connor, K.E. (2009) Analysis of the *Pseudomonas putida* CA-3 proteome during growth on styrene under nitrogen-limiting and non-limiting conditions. *Microbiology*, **155**, 3348-61.
- Nikodinovic, J., Barrow, K.D., Chuck, J.A. (2003) High yield preparation of genomic DNA from *Streptomyces*. *BioTechniques*, **35**, 932-4, 936.
- Nikodinovic, J., Kenny, S.T., Babu, R.P., Woods, T., Blau, W.J., O'Connor, K.E. (2008) The conversion of BTEX compounds by single and defined mixed cultures to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Appl Microbiol Biotechnol*, **80**, 665-73.



- Nithya, C., Gnanalakshmi, B., Pandian, S.K. (2011) Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. *Mar Environ Res*, **71**, 283-94.
- Noda, I., Green, P.R., Satkowski, M.M., Schechtman, L.A. (2005) Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. *Biomacromolecules*, **6**, 580-6.
- Norris, P.R., Johnson, D.B. 1998. Acidophilic microorganisms. in: *Extremophiles: microbial life in extreme environments*, (Eds.) K. Horikoshi, W.D. Grant, Wiley-Liss. New York, pp. 133-153.
- NRC. (1989) Contaminated marine sediments: Assessment and remediation, NRC, National Academy of Sciences, National Academy Press. Washington, DC.
- Ohashi, T., Hasegawa, J. 1992. *Chirality in industry*. John Wiley & Sons, New York.
- Oppenheim, S.F., Studts, J.M., Fox, B.G., Dordick, J.S. (2001) Aromatic hydroxylation catalyzed by toluene 4-monooxygenase in organic solvent/aqueous buffer mixtures. *Appl Biochem Biotechnol*, **90**, 187-197.
- Patterson, R.K. (1973) Automated Pregl-Dumas technique for determining total carbon, hydrogen, and nitrogen in atmospheric aerosols. *Anal Chem*, **45**, 605-9.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., Yao, Q.H. (2008) Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev*, **32**, 927-55.
- Pepi, M., Heipieper, H.J., Fischer, J., Ruta, M., Volterrani, M., Focardi, S.E. (2008) Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus* sp. ORAs2 and *Pseudomonas* sp. ORAs5 strains. *Extremophiles*, **12**, 343-9.
- Pepi, M., Lobianco, A., Renzi, M., Perra, G., Bernardini, E., Marvasi, M., Gasperini, S., Volterrani, M., Franchi, E., Heipieper, H.J., Focardi, S.E. (2009) Two naphthalene degrading bacteria belonging to the genera *Paenibacillus* and *Pseudomonas* isolated from a highly polluted lagoon perform different sensitivities to the organic and heavy metal contaminants. *Extremophiles*, **13**, 839-48.
- Peters, C.A., Knightes, C.D., Brown, C.D. (1999) Long-term composition dynamics of PAH-containing NAPLs and implications for risk assessment. *Environ Sci Technol*, **33**, 4499-4507.
- Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I. (2007) Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J Chem Tech Biotechnol* **82**, 233-247.
- Pohlman, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Potter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Vosz, I., Gottschalk, G., Steinbuchel, A., Freidrich, B., Bowien, B. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing Knallgas bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnol*, **24**, 1257-1262.
- Prieto, M.A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B., Kessler, B. (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J Bacteriol*, **181**, 858-868.
- Pucarevic, M., Sekulic, P. (2004) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Pesticides in soil of Vojvodina. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, **107**, 93-100.

- Pumphrey, G.M., Madsen, E.L. (2007) Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2. *Microbiology*, **153**, 3730-8.
- Pusch, M., Fiebig, D., Brettar, I., Eisenmann, H., Ellis, B.K., Kaplan, L.A., Lock, M.A., Naegeli, M.W., Traunspurger, W. (1998) The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshw Bio*, **40**, 453-495.
- Qi, W., Liu, H., Qu, J., Ren, H., Xu, W. (2011) PAH desorption from sediments with different contents of organic carbon from wastewater receiving rivers. *Environ Sci Pollut Res Int*, **18**, 346-54.
- Rao, N.N., Liu, S., Kornberg, A. (1998) Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J Bacteriol*, **180**, 2186-93.
- RDP <http://rdp.cme.msu.edu>
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi & Kalia, V.C. (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Biores Tech*, **87**, 137-146.
- Reetz, M.T. (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 145-50.
- Rehm, B.H., Steinbuchel, A. (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *Int J Biol Macromol*, **25**, 3-19.
- Rehm, B.H.A. (2003a) Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **9**, 41-62.
- Rehm, B.H.A. (2003b) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J*, **376**, 15-33.
- Reinecke, F., Steinbuchel, A. (2009) *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **16**, 91-108.
- Ren, Q., De Roo, G., Ruth, K., Witholt, B., Zinn, M., Thony-Meyer, L. (2009) Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? *Biomacromolecules*, **10**, 916-922.
- Ren, Q., Grubelnik, A., Hoerler, M., Ruth, K., Hartmann, R., Felber, H., Zinn, M. (2005) Bacterial poly(hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules*, **6**, 2290-8.
- Rojas-Rosas, O., Villafana-Rojas, J., Lopez-Dellamary, F.A., Nungaray-Arellano, J., Gonzalez-Reynoso, O. (2007) Production and characterization of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 from glucose, an unrelated carbon source. *Can J Microbiol*, **53**, 840-851.
- Rojas, L.A., Yanez, C., Gonzalez, M., Lobos, S., Smalla, K., Seeger, M. (2011) Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 generated for mercury bioremediation. *PLoS One*, **6**, e17555.
- Roling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J., Head, I.M. (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 5537-48.
- Romero-Steiner, S., Parales, R.E., Harwood, C.S., Houghton, J.E. (1994) Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of *p*-hydroxybenzoate. *J Bacteriol*, **176**, 5771-9.

- Romine, M.F., Fredrickson, J.K., Li, S.-M.W. (1999) Induction of aromatic catabolic activity in *Sphingomonas aromaticivorans* strain F199. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **23**.
- Roux, K.H., Hecker, K.H. 1997. One-Step Optimization Using Touchdown and Stepdown PCR. in: *PCR Cloning Protocols*, (Ed.) B.A. White, Vol. 67, Humana Press INC. New Jersey, USA.
- Sabirova, J.S., Ferrer, M., Lunsdorf, H., Wray, V., Kalscheuer, R., Steinbuchel, A., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. (2006) Mutation in a “tesB-like” hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2. *J Bacteriol*, **188**, 8452-8459.
- Samanta, S.K., Chakraborti, A.K., Jain, R.K. (1999) Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Appl Microbiol Biotechnol*, **53**, 98-107.
- Sandrin, T.R., Maier, R.M. (2003) Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environ Health Perspect*, **111**, 1093-101.
- Sani, R.K., Peyton, B.M., Brown, L.T. (2001) Copper-induced inhibition of growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20: assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 4765-72.
- Scheiner, D. (1976) Determination of Ammonia and Kjeldahl Nitrogen by Indophenol Method. *Water Res*, **10**, 31-36.
- Schlegel, H.G., Kaltwasser, H., Gottschalk, G. (1961) [A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies]. *Arch Mikrobiol*, **38**, 209-22.
- Schumacher, B.A. (2004) Methods for the Determination of Total Organic Carbon (TOC) in Soils and Sediments in: *United States Environmental Protection Agency; Environmental Sciences Division National Exposure Research Laboratory*. Las Vegas, USA.
- Sei, K., Asano, K., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M., Fujita, M. (1999) Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J Biosci Bioeng*, **88**, 542-50.
- Sendil, D., Gürsel, I., Wise, D.L., Hasırcı, V. (1999) Antibiotic Release From Biodegradable PHBV Microparticles. *J Control Release*, **59**, 207-217.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Li, Q.X. (2009) Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res Pub Health*, **6**, 278-309.
- Seviour, R.J., Mino, T., Onuki, M. (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 99-127.
- Shangguan, Y.Y., Wang, Y.W., Wu, Q., Chen, G.Q. (2006) The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Biomaterials*, **27**, 2349-2357.
- Shi, X., Rao, N.N., Kornberg, A. (2004) Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: motility, biofilm formation, and sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17061-5.
- Singh, M., Patel, S.K., Kalia, V.C. (2009) *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microb Cell Fact* **8**, 38.
- Singh, R., Paul, D., Jain, R.K. (2006) Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol*, **14**, 389-397.

- Snyder, R., Witz, G., Goldstein, B.D. (1993) The toxicology of benzene. *Environ Health Perspect*, **100**, 293-306.
- Sodian, R., Hoerstrup, S.P., Sperling, J.S., Daebritz, S., Martin, D.P., Moran, A.M., Kim, B.S., Schoen, F.J., Vacanti, J.P., Mayer, J.E. (2000) Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation*, **102**, 111-122.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D. (2005) Rapid genetic characterization of poly(hydroxyalkanoate) synthase and its applications. *Biomacromolecules*, **6**, 532-537.
- Stapleton, R.D., Bright, N.G., Sayler, G.S. (2000) Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. *Microb Ecol*, **39**, 211-221.
- Steinbuechel, A., Fuchtenbusch, B. (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol*, **16**, 419-27.
- Steinbuechel, A., Hein, S. (2001) Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. *Adv Biochem Engin Biotechnol*, **71**, 81-123.
- Steinbuechel, A., Lukte-Eversloh, T. (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem Engin J*, **16**, 81-96.
- Steinbuechel, A., Valentin, H.E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett*, **128**, 219-228.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates:biological polyesters. *Progress Polym Sci* 1503-1555.
- Sudip, S., Om, S., Rakesh, J. (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol*, **20**, 243-248.
- Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., Ramsay, B.A. (2007) Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl Microbiol Biotechnol*, **75**, 475-485.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., Shah, S. (2007) Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnol Adv*, **25**, 148-75.
- Sutherland, I.W. 1982. Extracellular polysaccharides. in: *Biotechnology*, (Eds.) H.J. Rehm, G. Reed, Vol. 3, Verlag Chemie. Weinheim, Germany.
- Tesema, Y., Raghavan, D., Stubbs, J. (2005) Bone cell viability on methacrylic acid grafted and collagen immobilized porous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Journal of Appl Polym Sci*, **98**, 1916-1921.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Tindall, B.J., Sikorski, J., Smibert, R.A., Krieg, N.R. 2007. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. in: *Methods for general and molecular microbiology*, (Eds.) C.A. Reddy, T.J. Beveridge, J.A. Breznak, G.A. Marzluf, T.M. Schmidt, L.R. Snyder, ASM Press. Washington, D.C, pp. 330-393.
- Tobin, K.M., McGrath, J.W., Mullan, A., Quinn, J.P., O'Connor, K.E. (2007) Polyphosphate accumulation by *Pseudomonas putida* CA-3 and other medium-

- chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria under aerobic growth conditions. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 1383-7.
- Tobin, K.M., O'Connor, K.E. (2005) Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilising aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Lett*, **253**, 111-118.
- Tokiwa, Y., Calabia, B.P. (2004) Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol Lett*, **26**, 1181-1189.
- Tralau, T., Yang, E.C., Tralau, C., Cook, A.M., Kupper, F.C. (2011) Why two are not enough: degradation of p-toluenesulfonate by a bacterial community from a pristine site in Moorea, French Polynesia. *FEMS Microbiol Lett*, **316**, 123-9.
- van der Walle, G.A.M., De Koning, G.J.M., Weusthuis, R.A., Eggink, G. (2001) Properties, modifications and applications of biopolyesters. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **71**, 263-287.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 503-49.
- Vanbroekhoven, K., Ryngaert, A., Wattiau, P., Mot, R., Springael, D. (2004) Acinetobacter diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting. *FEMS Microbiol Ecol*, **50**, 37-50.
- Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Radecka, I. (2007) Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol*, **102**, 1437-1449.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P. (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, **14**, 2535-54.
- Ward, P.G., de Roo, G., O'Connor, K.E. (2005) Accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene and phenylacetic acid by *Pseudomonas putida* CA-3. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 2046-2052.
- Ward, P.G., Goff, M., Donner, M., Kaminsky, W., O'Connor, K. (2006) A two step chemo-biotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable plastic. *Environ Sci Technol*, **40**, 2433-2437.
- Ward, P.G., O'Connor, K.E. (2005) Bacterial synthesis of polyhydroxyalkanoates containing aromatic and aliphatic monomers by *Pseudomonas putida* CA-3. *Int J Biol Macromol*, **35**, 127-133.
- Watkin, E.L.J., Keeling, S.E., Perrot, F.A., Shiers, D.W., Palmer, M.-L., Watling, H.R. (2009) Metals tolerance in moderately thermophilic isolates from a spent copper sulfide heap, closely related to *Acidithiobacillus caldus*, *Acidimicrobium ferrooxidans* and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **36**, 461-465.
- Wei, X., Fang, L., Cai, P., Huang, Q., Chen, H., Liang, W., Rong, X. (2011) Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria. *Environ Pollut*, **159**, 1369-74.
- White, B.A. 1997. *PCR Cloning Protocols*. Humana Press INC, New Jersey, USA.
- Whitehouse, B.G. (1984) The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Chemistry*, **14**, 319-332.
- WHO. (1998) WHO Environmental Health Criteria **202**, Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. WHO, Geneva, Switzerland.

- Williams, P.A., Jones, R.M., Shaw, L.E. (2002) A third transposable element, ISPpu12, from the toluene-xylene catabolic plasmid PWWO of *Pseudomonas putida* mt-2. *J Bacteriol*, **184**, 6572–6580.
- Winterbourn, M.J. 1986. Recent advances in our understanding of stream ecosystems. in: *Ecosystem theory and application*, (Ed.) N. Polunin, Wiley and Sons. Chichester, United Kingdom, pp. 240-268.
- Witholt, B., Kessler, B. (1999) Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr Opin Biotechnol* **10**.
- Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., van der Lelie, D. (2011) Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev*, **35**, 299-323.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-19.
- Zhao, B., Poh, C.L. (2008) Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics*, **8**, 874-81.
- Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M., Krumholz, L.R., Tay, S.T. (2003) Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett Appl Microbiol*, **36**, 251-7.
- Zinn, M., Hany, R. (2005) Tailored material properties of polyhydroxyalkanoates through biosynthesis and chemical modification. *Adv Eng Mat*, **7**, 408-411.
- Zinn, M., Witholt, B., Egli, T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev*, **53**, 5-21.
- Zylstra, G.J., Gibson, D.T. (1989) Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* F1. *J Biol Chem*, **264**, 14940-14946.

## **PRILOZI**

## Prilog I: Sekvence konzervisanih regiona gena za katehol 1,2-dioksigenazu (C12O) i katehol 2,3-dioksigenazu (C23O)

>*Pseudomonas* sp. TN301 konzervisani region gena za C12O

```
CGTCCTTATTCTGTCTTCTATTTCGACACAGTCCGAGTTCACCTGCGTCGGCGTATCATTACCGATGCCGA  
GGGCCGTTATCGCGCGCGCTCGATCGTACCGTCGGGGTATGGCTGCGACCCGCAGGGGCCAACCCAGGAA  
TGCTCTGGACCTGCTCGGCCGCCATGGCCAGCGCCCGGCGCACGTGCACTTCTTCATCTCGGCACCGGGGC  
ACCGCCACCTGACCACGCAGATCAACTTTGAAGGCGATTCCAGCTACTATTGCTCTCGAATTCACCTGTC  
GGGTTATCAGTCCGATGCCAAAGGTCACAACCCGGGCTGTTTCCCGGGGGCATATACTGCGCCCTAAGGG  
TTCCCCCGGAAGTGCCCTACCCGGATTTCCGGGCGGTCCGGCCCCGATGAC
```

>*Bacillus* sp. TN124 konzervisani region gena za C23O

```
AAGAGGCATGGGGGCGCACCGGTTTCGATCATGCCTTGCTTTATGGTCCGCATGTGGATCAGGTGATGCAT  
TTCTTCGTGGAAGCGCTGGATTTTCAGCCTAGCGGAACAAGTGATGATGCCGGACGGTTTTGCTGGCGATCT  
GGTTGTCTGCGGCAACAAGGCGCACGATACCGCCTTCGTCAAGCACCCCGAGCCGGGCAAGCTGCATCA  
CATCTCCTTCTTCCTGGAGTCCCTGGCAGACGTCGGCCGCGCGGGAGAGCATCGCCCCGTACAACATC  
TCGCTGGATATCGGGCCGACTCGGCACGGCATCACTCGGGGCCAGGCCATCTACTTCTTCGATCCTTCCG
```

>*Bacillus* sp. TN125 konzervisani region gena za C23O

```
GAGGCATGGGGCCGCACCGGTTTCGATCATGCCTTGCTTTATGGTCCGCATGTGGATCAGGTGATGCATTT  
CTTCGTGGAAGCGCTGGATTTTCAGCCTAGCGGAACAAGTGATGATGCCGGACGGTTTTGCTGGCGATCTGG  
TTGTCTGCGGCAACGAGGCGCACGATACCGCCTTTGTCAAGCACCCCGAGCCGGGCAAGCTGCATCACA  
TCTCCTTCTTCCTGGAGTCCCTGGCAGACGTCGGCCGCGCGGGAGAGCATCGCCCCGTACAACATCTC  
GCTGGATATCGGGCCGACTCGGCACGGCAAGACTCGGGGCCAGGCCATCTACTTCTTCGATCCTTGGC
```

>*Bacillus* sp. TN126.2 konzervisani region gena za C23O

```
TCCGAGGCATGGGGCCGCACCGGTTTCGATCATGCCTTGCTTTATGGTCCGCATGTGGATCAGGTGATGCA  
TTTCTTCGTGGAAGCGCTGGATTTTCAGCCTAGCGGAACAAGTGATGATGCCGGACGGTTTTGCTGGCGATC  
TGGTTGTCTGCGGCAACGAGCAGATACCGCCTTTGCGGTCAAGCACCCCGAGCCGGGCAAGCTGCATC  
ACATCTCCTTCTTCCTGGAGTCCCTGGCAGACGTCGGCCGCGCGGGAGAGCATCGCCCCGTACAACAT  
CTCGCTGGATATCGGGCCGACTCGGCACGGCAAGACTCGGGGCCAGGCCATCTACTTCTTCGATCCTTT
```



## Prilog II: Sekvence fragmenata gena za sintezu polihidroksialkanoata (*phaA*, *phaC*, *phaG*)

>*Pseudomonas* sp. TN301 fragment *phaC1* gena

GTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAAAAAGAACTTACAAGCTTTCAACGCTCGTGAACG  
TAGGTGCCCTGGGGAGGCTTCGCCGGCCGCGTAGGCACGGTTGCCCAGGCGGGTCGGTGCCTTTTTTCAGCG  
CACCGGCACGCTCGCCCAGCCAACTTTGCCAGTGCAACCACCAGGAGTCTGCATGCTTGGTGGCGTTTTTC  
CTGCCAGGCCACCGGGTCCCCCGGGCGGTCCGGCACCAGTGCATGAAACGTGCCTTCGGGTTGCCCGGCGGG  
TTGAGGATGCTCTGGATATGCCCGCTGTTGGACAGTACGAATTCGATCTTGCCACCGAACAGATGTGCCG  
AGCGGTAGCATGACGGCCATGGGGTGATGTGGTCTGTTGGTCCGGCGAGGCTGTAGATGTGCATTTGAC  
CTGTTTCAGGTCGATCGCGGTGCCGCACACTTCCAGGGCATCGGGCGGGTCAGCGGGTTGCTTTTGAAC  
ATTTTCGATCAGGTCGCCGTGGAAGGCGCCGGCAGGCGCGTGGTGTGCTTGTTCAGAACAGGATGTCTGA  
ACACGGGGGGCTCATTGCCCAGCAGGTAGTTGTTAACCAGTAATTCCAGATCAGGTCGTTGGG

>*Pseudomonas* sp. TN301 fragment *phaA* gena

GGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTAGATTACTTACGGA  
TCCGACAGACAAACCGGCCAAAGGATCGACAACGCTCCCCGCCACCCGCATGAACGTGCAGAACGCCATC  
CTCGGCCCTGCGCGGCCGCGACCTGCTTTCCACGCTGCGCAACGTCCGGCCGCCACGGTCTGCGCCACCCGC  
TGATACCGCGCATCATCTGCTGGCGCTTGGCGGGCAGTTGGGGCGGGTGATGCTGGGGGACACGCCCTA  
CCAGCCGAACCCGCGTGACGCACGCTTCAGTGACCCGACCTGGAGCCAGAACCCGTTCTACCGCCGCGGC  
CTGCAGGCCTACCTGGCCTGGCAGAAGCAGACACGCCAGTGGATCGATGAAAGCCACTTGAACGACGATG  
ATCGAGCCCGCGCCCGCTTCCGTTC AACCTGATCAACGATGCGCTGGCGCCAGCAACTCACTGCTCAA  
TCCGCTGGCGGTCAAAGAGCTGTTCAACACCGGGCGCCAGAGCCTGGTGC GCGCGTGGTCCACCTGCTC  
GACGACCTGCGTCACAACGATGGGCTGCCGCGTCAGGTGGACGAGCGCGCTTCGAAGTAGGCGCCAACC  
TGGCGGGGACCCCTGGCGCAGT

>*Pseudomonas* sp. TN301 fragment *phaG* gena

TGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAAACGAGTTGTTATTAGCGGCCGCTC  
AGATGGCCAATGCATGCTGCCCCGTGTCACGGGTTGGTAACGTTGGCGGGTTACGCACGGTTGGCTT  
GAGGAACCCTAGCATGACACTGCGGGTGTCTCGCAGGCGGTCTTGTCTCCATGTCCAGGAAGTGGCCC  
GCATCGCGGATCACGCTGAACTGGCTTCTGCCACATGCTTGTGTAAGTCCGCGCATCTTCGACTGTGG  
TGTA CTGCTCGCGTTCGCCGTTGATGAACAGCACCGGGATGTTGATATTGCGCGCGCCTTGACGCGCACG  
TTCCAGGTCGTGCTCCAGCACCTGGTTGATGTGGAAGTGCATCTGTGCGTACTCGTGGCTGTCCAGGCTG  
CTCACATGGCGGTAGTTGAAGCGTTTGAACAGCGACGGCAAGTCTTCCGATGGTGTGATTGACCAGGT  
TGCCGACCTGATAACGGTTCGACAGGCGGCCAGGTAAGTGGCAGCCACGGTCCAGATAGTCGCGCATCGGCTC  
GTTGATCACTGGCGAGAACGAACTACCACCTGCCTTCTTACGTAACCGCGGCTGGTGCGCCAGCGC

## BIOGRAFIJA AUTORA

Tanja Narančić je rođena 1979. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu „Branislav Nušić“ i I beogradsku gimnaziju. Osnovne studije je upisala 1998. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Eksperimentalni deo diplomskog rada na temu „Ekspresija potencijalnih domena KgmB metiltransferaze“ uradila je pod mentorstvom dr Sandre Vojnović, u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Diplomirala je 2006. godine sa prosečnom ocenom 9.23. Dobitnik je nagrade Fondacije „Goran Ljubijankić“ za najbolji diplomski rad odbranjen u 2006. godini. Iste godine je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je najvećim delom u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, pod mentorstvom dr Jasmine Nikodinović-Runić. Deo istraživanja je uradila u laboratoriji dr Kevin O'Connor-a, „School of Biomolecular and Biomedical Science“, University College Dublin, Irska, kao stipendista FEMS-a. Tokom svog rada bila je uključena u dva nacionalna i jedan međunarodni projekat. Do sada je kao autor ili koautor objavila šest radova u časopisima od međunarodnog značaja, od čega su radovi: Narancic, T., Djokic, L., Kenny, S.T., O'Connor, K.E., Radulovic, V., Nikodinovic-Runic, J., Vasiljevic, B. **Metabolic versatility of Gram-positive microbial isolates from contaminated river sediments.** J. Hazard. Mater. 215-216 (2012) 243-51, i Narancic, T., Kenny, S. T., Djokic, L., Vasiljevic, B., O'Connor, K.E., Nikodinovic-Runic, J. **Medium chain length polyhydroxyalkanoate production by newly isolated *Pseudomonas* sp. TN301 from a wide range of poly- and monoaromatic hydrocarbons.** J Appl Microbiol, (2012), u štampi, radovi iz ove doktorske teze.

Učestvovala je u brojnim aktivnostima vezanim za projekat popularizacije nauke „Mala škola DNKlogije“ finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke, kao i FP7 projektu Noći istraživača. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Тања М. Наранчић

број уписа НО060163

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**“Метаболичка разноврсност бактерија изолованих из површинског речног седимента под утицајем петрохемијских ефлуената: *Pseudomonas* sp. TN301 као произвођач полихидроксиалканоата”**

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

Потпис докторанта

У Београду, 21.05.2012.

Тања Наранчић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Тања М. Наранчић \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ НО060163 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Молекуларна биологија, Модул: Прокариоти \_\_\_\_\_

Наслов рада “**Метаболичка разноврсност бактерија изолованих из површинског речног седимента под утицајем петрохемијских ефлуената: *Pseudomonas* sp. TN301 као произвођач полихидроксиалканоата**”

Ментор др Јасмина Никодиновић-Рунић и др Ђорђе Фира

Потписани \_\_\_\_\_ Тања М. Наранчић \_\_\_\_\_

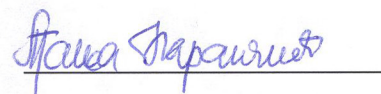
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанта

У Београду, 21.05.2012.

 \_\_\_\_\_



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**“Метаболичка разноврсност бактерија изолованих из површинског речног седимента под утицајем петрохемијских ефлуената: *Pseudomonas* sp. TN301 као произвођач полихидроксиалканоата”**

која је моје ауторско дело.

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

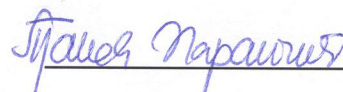
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 21.05.2012.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.