

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Marija B. Lješević

**Mikrobna degradacija složenih aromatičnih
zagađujućih supstanci i analiza proizvoda
biodegradacije sveobuhvatnom
dvodimenzionalnom gasnom hromatografijom sa
masenom spektrometrijom**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Marija B. Lješević

**Microbial degradation of complex aromatic
mixtures and analysis of biodegradation products
using comprehensive two-dimensional gas
chromatography-mass spectrometry**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

dr Vladimir P. Beškoski, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Milić, naučni saradnik
IHTM-Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Vladimir P. Beškoski, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Milić, naučni saradnik
IHTM-Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Ljubodrag Vujusić, docent
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Trifković, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Gojgić-Cvijović, naučni savetnik
IHTM-Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Grupe za mikrobiološku hemiju i biotehnologiju Katedre za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju (IHTM-a), Univerziteta u Beogradu.

Veoma sam zahvalna mentoru, dr Vladimiru Beškoskom, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji je rukovodio izradom ovog rada i pružio veliku pomoć pri izradi i pisanju teze, kao i na poverenju koje mi je ukazao tokom svih godina saradnje. Posebnu zahvalnost dugujem mentorki, dr Jeleni Milić, naučnom saradniku IHTM-a, na podršci koju mi je pružila tokom izrade ove disertacije, kao i brojnim savetima o praktičnoj primeni naučnih saznanja. Neizmernu zahvalnost dugujem dr Gordani Gojgić-Cvijović, naučnom savetniku IHTM-a, koja me je vodila kroz ogroman deo praktičnog rada i nesebično i strpljivo pomagala korisnim sugestijama prilikom tumačenja rezultata i izrade ove teze. Zahvaljujem se dr Jeleni Trifković, vanrednom profesoru Hemijskog fakultet, i dr Ljubodragu Vujisiću, docentu Hemijskog fakulteta, na divnoj saradnji i korisnim sugestijama prilikom pisanja ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem dr Miroslavu Vrviću, profesoru u penziji Hemijskog fakulteta za višegodišnju podršku i saradnju. Zahvalnost dugujem dr Bobanu Anđelkoviću, iz Centra za instrumentalnu analizu IHTM-a, na pomoći sa FTIR analizom. Svim kolegama iz Grupe za mikrobiološku hemiju i biotehnologiju sam izuzetno zahvalna, jer su ukazivali pomoć kad god je bila zatražena. Koleginici Branki Lončarević sa IHTM-a neizmerno sam zahvalna na dragocenoj podršci tokom svih faza izrade ove teze.

I would like to thank Prof. Dr. Takeshi Nakano, Prof. Dr. Shunji Hashimoto and Teryo Ieda for GCxGC-(HR)TOFMS analysis and the immense help with software analysis and interpretation of results. I'm grateful to Prof. Dr. Mario Sapparot and his lab for providing grape pomace samples, together with valuable help with experiments and interpretation of results.

Zahvaljujem se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja na trogodišnjem stipendiranju i uključivanju u naučnoistraživačke projekte, kao studenta doktorskih studija.

Svojim roditeljima, sestri i dragim prijateljima dugujem najveću zahvalnost za neprocenjivu ljubav, podršku i razumevanje.

Marija B. Lješević

Mikrobna degradacija složenih aromatičnih zagađujućih supstanci i analiza proizvoda biodegradacije sveobuhvatnom dvodimenzionalnom gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom

SAŽETAK

Ugljovodonici nafte i poljoprivredni lignocelulozni otpad neke su od najčešćih zagađujućih supstanci u životnoj sredini, a zajednički im je složen hemijski sastav i prisustvo velikog broja aromatičnih jedinjenja koja ispoljavaju toksične efekte. Cilj ove disertacije bio je proučavanje razgradnje složenih smeša aromatičnih supstanci i to aromatične frakcija dizel goriva D2 (AFD) i komine grožđa koja nastaje u procesu proizvodnje vina. Za ispitivanje biodegradacije korišćena je sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GCxGC-MS). Za razliku od konvencionalne gasne hromatografije, ovom tehnikom se sa većom rezolucijom razdvajaju analiti, pa je pogodnija za analizu složenih smeša.

Prvi deo rada ispituje razgradnju AFD tokom 30 dana. Šest bakterijskih sojeva izolovanih iz zemljišta kontaminiranog naftom je okarakterisano i identifikovano. Ispitivanjem rasta na različitim izvorima ugljovodonika, u prisustvu teških metala i respirometrijskim testom pokazano je da sojevi *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 i *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 uspešno koriste AFD. U cilju lakše analize efikasnosti degradacije upotrebom GCxGC-(HR)TOFMS, razvijena je jednačina za vizuelizaciju isključivo degradovanih jedinjenja, umesto svih koja preostaju nakon degradacije. Pokazano je da nakon 30 dana soj CHP-ZH25 najefikasnije razgrađuje derivate dibenzotiofena (97,9 %), a soj CHP-NR31 derivate naftalena (75,8 %).

U drugom delu eksperimenata, parom tretirana komina grožđa (PTK) je degradovana tokom 90 dana pomoću šest različitih čistih kultura gljiva. Tretman sojem *U. Botrytis* LPSC 813 doveo je do najvećeg gubitka mase PTK. Takođe, pH i sadržaj obojenih supstanci je bio značajno povećan. Na osnovu GCxGC-qMS analize, utvrđeno je da ovaj soj dovodi do najvećeg smanjenja količine monoaromatičnih jedinjenja. Pored toga, tretman PTK pomenutim sojem dovodi do najvećeg smanjenja fitotoksičnosti na semenu paradajza i zelene salate.

Ključne reči: aromatična jedinjenja dizel goriva, aromatična jedinjenja komete grožđa, biodegradacija, sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Microbial degradation of complex aromatic mixtures and analysis of biodegradation products using comprehensive two- dimensional gas chromatography-mass spectrometry

ABSTRACT

Petroleum hydrocarbons and agricultural lignocellulosic waste are some of the most common environmental pollutants. They have a very complex structure and are composed of a large number of different aromatic compounds that have toxic effects. The aim of this dissertation was to study the degradation of complex aromatic mixtures, namely diesel fuel D2 aromatic fraction (AFD) and grape pomace obtained from the winemaking process. For the biodegradation analysis, comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry was used (GCxGC-MS). Compared with conventional gas chromatography, this technique has a greater separation resolution, thus, it is more successful in the analysis of complex mixtures.

The first part of this work examined the degradation of AFD for 30 days. Six bacterial strains, isolated from petroleum contaminated soil, were characterized and identified. Respirometric test, growth on different carbon sources and in the presence of heavy metals has shown that strains *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 and *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 could successfully grow on AFD. In order to facilitate the biodegradation analysis using GCxGC-(HR)TOFMS, a software equation was developed to allow the visualization of degraded compounds only, instead of all the ones that remain after biodegradation. It was shown that, after 30 days, strain CHP-ZH25 degraded dibenzothiophene derivatives most efficiently (97.9 %), and strain CHP-NR31 naphthalene derivatives (75.8 %).

In the second part, steam treated grape pomace (PTK) was degraded for 90 days using six different fungal strains. Treatment with strain *U. Botrytis* LPSC 813 resulted in the highest mass loss of PTK. Additionally, pH and level of colored substances were elevated significantly. Analysis using GCxGC-qMS showed a decrease of monoaromatic compounds content. This strain caused the highest reduction of PTK toxicity toward tomato and lettuce seeds.

Keywords: diesel fuel aromatic compounds, grape pomace aromatic compounds, biodegradation, comprehensive two-dimensional gas chromatography

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Spisak skraćenica i simbola

- μECD - mikro detektor sa zahvatom elektrona
- $1D$ - jednodimenzionalne tehnike
- $2D$ - dvodimenzionalne tehnike
- $2D TIC$ - dvodimenzionalni ukupni jonski hromatogram
- AFD - aromatična frakcija dizela
- ATR - prigušena totalna refleksija
- $BSTFA + TMCS$ - bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamid sa trimetilhlorosilanom
- DBT - dibenzotiofen
- ECD - detektor sa zahvatom elektrona
- EI - elektronska jonizacija
- $EOMA$ - elementarna organska mikroanaliza
- FID - plameno-jonizacioni detektor
- $FTIR$ - Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
- $GC \times GC-(HR)TOFMS$ - sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija masena spektrometrija sa analizatorom koji razdvaja na osnovu vremena preleta
- GC - gasna hromatografija
- $GC-GC$ - multidimenzionalna gasna hromatografija
- $GC-MS$ - gasno masena hromatografija
- $GC \times GC$ - sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija
- $GC \times GC-qMS$ - sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija- masena spektrometrija sa kvadrupolnim analizatorom
- $HFBT$ - 3-hidroksi-2-formil benzotiofen
- LC - tečna hromatografija

<i>NH₄⁺-N</i>	sadržaj amonijačnog azota
<i>nPTK₀</i>	neinokulisana parom tretirana komina
<i>nPTK₉₀</i>	neinokulisana parom tretirana komina nakon 90 dana inkubacije
<i>PAH</i>	- policiklični aromatični ugljovodonici
<i>PCR</i>	- lančana reakcija polimeraze
<i>PTK</i>	- parom tretirana komina
<i>qMS</i>	- maseni spektrometar sa kvadrupolnim analizatorom
<i>qqqMS</i>	- maseni spektrometar sa trostrukim kvadrupolom
<i>SIC</i>	- selektivni jonski hromatogrami
<i>SIM</i>	- single Ion Monitoring
<i>TMS</i>	- trimetil silil
<i>TOF</i>	- analizator sa vremenom preleta
<i>TRSC</i>	- sadržaj ukupnih redukujućih šećera
<i>TSS</i>	- Rastvor elemenata u tragovima
<i>UCM</i>	- nerazdvojena kompleksna smeša
<i>VOC</i>	- lako isparljiva organska jedinjenja
<i>VRF</i>	- frakcija rastvorna u vodi
<i>VRFs</i>	- frakcija rastvorna u vodi nakon sušenja na 60 °C

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled literature	4
2.1. Mikroorganizmi u zaštiti životne sredine	5
2.2. Ugljovodonici	6
2.2.1. Mikrobna degradacija aromatičnih ugljovodonika	10
2.2.2. Bioremedijacija	13
2.3. Komina grožđa	14
2.3.1. Sastav komine.....	14
2.3.2. Primena komine grožđa.....	16
2.3.3. Biohemijska konverzija lignoceluloznog materijala.....	18
2.4. Dvodimenzionalna gasna hromatografija za analizu složenih smeša	20
2.4.1. Sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija-principi.....	21
2.4.2. Ortogonalnost i izbor kolona	23
2.4.3. Modulatori	25
2.4.3.1. Modulatori na bazi ventila	26
2.4.3.2. Termalni modulatori.....	28
2.4.4. Detektori.....	29

2.4.4.1. Plameno-jonizacioni i element-selektivni detektori	30
2.4.4.2. Maseni spektrometri.....	30
2.4.5. Primena sveobuhvatne masene hromatografije	32
3. Materijal i metode.....	34
<i>3.1. Mikroorganizmi, izolacija i karakterizacija.....</i>	<i>35</i>
3.1.1. Mikroorganizmi	35
3.1.2. Podloge.....	35
3.1.2.1. Hranljivi agar	35
3.1.2.2. Sladni agar.....	35
3.1.2.3. M3 podloga	36
3.1.2.4. Miler-Hintonov agar.....	36
3.1.2.5. Tripton soja bujon.....	36
3.1.2.6. Mineralna podloga po Loser-u	37
3.1.3. Rast na različitim izvorima ugljenika	38
3.1.4. Osetljivost na teške metale.....	38
3.1.5. Identifikacija bakterijskih sojeva.....	38
3.1.5.1. API testovi	38
3.1.5.2. Određivanje masnih kiselina	38
3.1.5.3. 16s rRNA analiza	39

3.2. Priprema supstrata za biodegradaciju	39
3.2.1. Aromatična frakcija dizela	39
3.2.2. Komina grožđa	40
3.3. Biodegradacioni eksperimenti	40
3.3.1. Test respiracije	40
3.3.2. Biodegradacija aromatične frakcije	41
3.3.3. Biodegradacija komine grožđa (fermentacija na čvrstoj fazi)	41
3.4. Strukturne instrumentalne metode	42
3.4.1. Elementalna analiza	42
3.4.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	42
3.4.3. Hromatografska analiza	42
3.4.3.1. GC-MS	42
3.4.3.2. GCxGC-(HR)TOFMS	43
3.4.3.3. GCxGC-qMS	43
3.5. Testovi za ispitivanje fitotoksičnosti	44
4. Rezultati i diskusija	45
4.1. Biodegradacija aromatične frakcije dizela	46
4.1.1. Izolacija i karakterizacija mikroorganizama	46
4.1.1.1. <i>Oerskovia</i> sp. CHP-ZH25	50

4.1.1.2. <i>Rhodococcus</i> sp. CHP-NR31	51
4.1.2. Test respiracije.....	52
4.1.3. Analiza biodegradacije AFD sveobuhvatnom dvodimenzionalnom gasnom hromatografijom sa masenim spektrometrom visoke rezolucije GCxGC-(HR)TOFMS	54
4.2. <i>Biodegradacija komine grožđa</i>	69
4.2.1. Fizičko-hemijska svojstva parom tretirane komine grožđa	70
4.2.2. Instrumentalna analiza metanolnih ekstrakata PTK.....	72
4.2.3. Smanjenje fitotoksičnosti.....	79
5. Zaključak.....	82
6. Literatura.....	86

1. Uvod

Usled ubrzanog razvoja ekonomije i društva, problemi u životnoj sredini su u porastu. Povećana potrošnja fosilnih goriva, ispuštanje hemikalija, čvrstog i tečnog otpada u vodotokove i odlaganje na deponijama dovodi do zagađenja zemljišta, vode i vazduha, što ima negativne posledice po životnu sredinu i zdravlje ljudi. Zagađenje ugljovodonicima, pesticidima, teškim metalima, plastikom, farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima, povećana emisija gasova staklene bašte, nagomilavanje poljoprivrednog otpada samo su neki od problema sa kojima se svet svakodnevno susreće. Zagađenje životne sredine ugljovodonicima poreklom iz nafte i njenih derivata je kontinualno s obzirom na to da se oni svakodnevno upotrebljavaju. Policiklični aromatični i heterociklični ugljovodonici predstavljaju posebnu opasnost jer imaju toksična, karcinogena i mutagena svojstva. Sa druge strane, povećana poljoprivredna proizvodnja dovodi do stvaranja ogromnih količina lignoceluloznog otpada koji ima fitotoksično dejstvo i može da naruši kvalitet zemljišta.

Mikroorganizmi i njihove mnogobrojne metaboličke aktivnosti nude rešenje za većinu izazova sa kojima se čovečanstvo susreće. Bioremedijacija je metoda koja koristi mikrobne metaboličke putanje za razgradnju organskih zagađujućih supstanci u cilju eliminacije zagađenja životne sredine i već dugo je prepoznata kao ekonomski isplativa, ekološka i pouzdana. Kako bi se procesi bioremedijacije unapredili, važno je usmeriti istraživanja u identifikaciju novih sojeva i metaboličkih putanja, koji će doprineti povećanju efikasnosti razgradnje postojećih zagađujućih supstanci i ubrzati formiranje metoda za sanaciju zagađenja nastalih kao posledica novih, emergentnih supstanci.

Veliki procenat zagađenja životne sredine nije posledica prisustva samo jedne zagađujuće supstance već izrazito složenih smeša. U ovim slučajevima, neophodno je poznavanje hemijskog sastava smeše, kao i razumevanje svih promena u hemijskom sastavu do koji dolazi dejstvom mikroorganizama. Sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija se sve više koristi za detaljno ispitivanje sastava složenih smeša, zbog znatno boljeg razdvajanja i kapaciteta pikova u odnosu na klasičnu metodu gasne hromatografije. Primena ove metode za analizu procesa bioremedijacije bi

mногоstruko poboljšala razumevanje svih procesa koji se odvijaju tokom mikrobiološke razgradnje zagađujućih supstanci. Dobijeni podaci omogućili bi stvaranje efikasnijih metoda za tretman složenih smeša zagađujućih supstanci, kako bi se umanjili negativni efekti koje izazivaju.

Cilj ovog rada bio je da se ispita mogućnost mikrobne degradacije aromatične frakcije dizela i komine grožđa, odnosno različitih složenih smeša aromatičnih jedinjenja koja mogu da dovedu do zagađenja životne sredine, takođe i primeniti sveobuhvatnu dvodimenzionalnu gasnu hromatografiju, kao novu tehniku za analizu biodegradacionog procesa. Kako bi cilj rada bio ostvaren, formulisani su sledeći zadaci:

- Biohemijska, mikrobiološka i molekularna karakterizacija i identifikacija mikroorganizama koji degraduju aromatičnu frakciju dizela;
- Ispitivanje degradacije aromatične frakcije dizel goriva;
- Softverska analiza pojedinačnih biodegradiranih klasa aromatičnih jedinjenja, uz razvijanje i primenu jednačine za vizuelizaciju biodegradiranih jedinjenja;
- Ispitivanje degradacije komine grožđa izabranim kulturama gljiva;
- Uporedna softverska analiza biodegradacije komine grožđa;
- Ispitivanje fitotoksičnog efekta komine grožđa pre i nakon degradacije mikroorganizmima.

2. Pregled literature

2.1. Mikroorganizmi u zaštiti životne sredine

Mikroorganizmi su najzastupljeniji oblik života u biosferi. Esencijalni su za funkcionisanje ekosistema zbog raznovrsnosti metaboličkih procesa koje mogu da obavljaju. Njihova uloga je neophodna u procesima kruženja hranljivih supstanci, razgradnje organske supstance, recikliranja biološkog materijala i otpada, proizvodnji i potrošnji gasova staklene bašte. Zbog toga ne čudi da se upravo mikroorganizmi smatraju idealnim rešenjem za različite probleme u životnoj sredini koji su rezultat ubrzanog razvoja ekonomije i društva, kao i intenzivne poljoprivrede. Međutim, iako je poznato da mikroorganizmi mogu da razgrađuju brojna organska jedinjenja, pomenuti procesi nisu uvek brzi, pa ukoliko je produkcija i oslobađanje zagađujućih supstanci u životnu sredinu brže od sposobnosti mikroorganizama da ih razgrade, dolazi do akumulacije ovih jedinjenja i zagađenja životne sredine (1–3).

Trenutno najveći izazovi u životnoj sredini su zagađenje okeana plastikom, povećana emisija ugljen-dioksida i drugih gasova koji doprinose efektu staklene bašte, zagađenje supstancama koje ometaju rad endokrinog sistema (određene supstance iz grupa bisfenola, alkilfenola, polihlorovanih bifenila, ftalata, polibromovanih difenil etara, perfluorooktanska kiselina) i farmaceutski proizvodi (antibiotici, hormoni, lekovi). Zagađenje životne sredine naftnim ugljovodonicima, iako prisutno već dugi niz godina, i dalje je jedno od najčešćih zagađenja životne sredine do kog dolazi usled prekomerne potrošnje naftnih derivata (4–6).

Savremena poljoprivreda je još jedan izvor zagađenja životne sredine. Pesticidi koji se koriste mogu negativno da utiču na zdravlje ljudi, životinja, a posebno polinatora, što značajno narušava funkcionisanje ekosistema. Takođe, upotreba azotnih i fosfornih đubriva izaziva luženje ovih elemenata u obližnje vodotokove što dovodi do eutrofikacije. Dodatno, intenziviranjem poljoprivredne proizvodnje, stvaraju se ogromne količine lignoceluloznog otpada koji se spaljuje ili nagomilava na deponijama (6,7).

Kako bi se prevazišla ograničenja mikroorganizama u degradaciji zagađujućih supstanci, neophodno je dobro poznavati njihove degradacione sposobnosti i osmisliti strategije zapovećanje njihove efikasnosti. Takođe, dobrim

poznavanjem metaboličkih putanja mikroorganizama omogućava se brzo pronalaženje strategije za tretman novih zagađujućih supstanci koje se tek pojavljuju u životnoj sredini (5,6).

2.2. Ugljovodonici

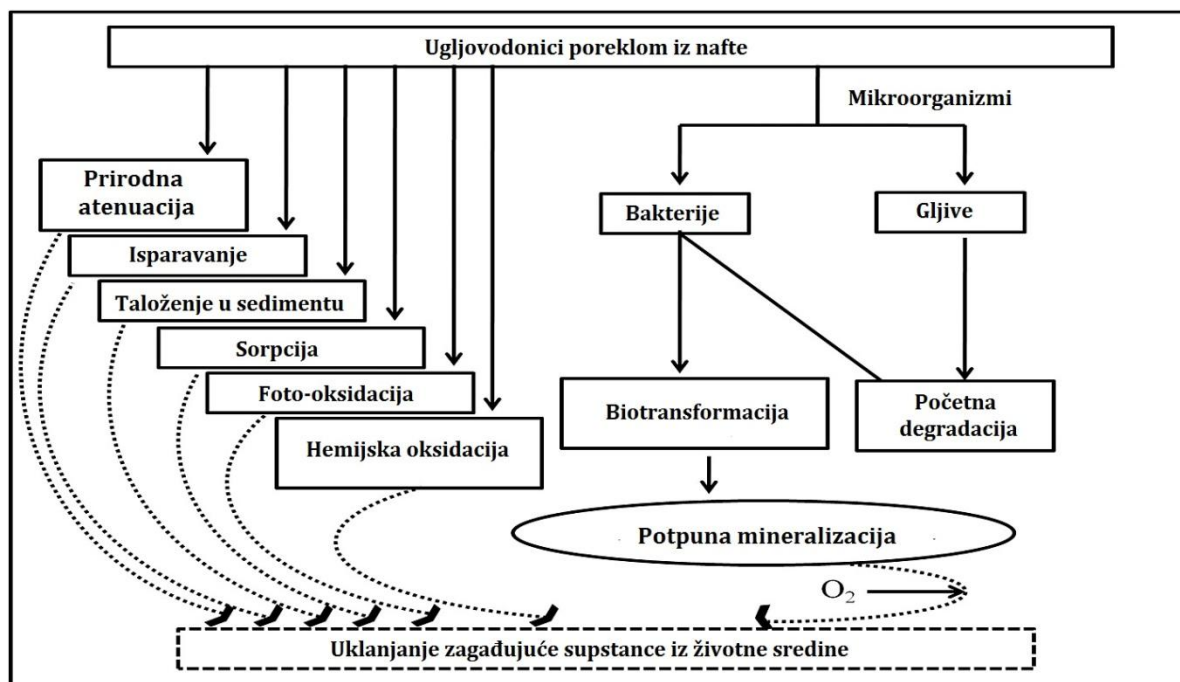
Ugljovodonici su organska jedinjenja izgrađena od atoma ugljenika i vodonika. Neki derivati ugljovodonika sadrže u manjoj meri i kiseonik, azot i sumpor. Iako postoji mnoštvo jedinjenja koja pripadaju ovoj klasi, a imaju različite fizičko-hemijske osobine, mogu da se svrstaju u dve grupe: alifatične i aromatične ugljovodonike. Alifatični ugljovodonici mogu biti zasićeni ili nezasićeni i ovu grupu čine alkani, alkeni i cikloalkani. Aromatični ugljovodonici (areni) sadrže jedan ili više benzenovih prstenova i ovoj grupi pripadaju monociklični (benzen), biciklični (naftalena, bifenila) i policiklični aromatični ugljovodonici (hrizen, fenantren, pirena). Heterocikli azota, sumpora i kiseonika su jedinjenja koja sadrže azot, sumpor ili kiseonik u petočlanom ili šestočlanom prstenu (8–10).

Do zagađenja životne sredine ugljovodonicima dovodi upotreba fosilnih goriva, odnosno sirove nafte i njenih derivata kao što su bitumen, benzin, kerozin, motorno ulje, mašinsko ulje i dizel. Derivati se znatno razlikuju po svom sastavu, a od sastava zavisi dalje rasprostiranje ovih jedinjenja u životnoj sredini, njihova biodostupnost i toksičnost (4,8,9).

Ukoliko dođe do izlivanja nafte i njenih derivata, važno je poznavati ponašanje ugljovodonika u životnoj sredini, kako bi se obezbedilo pravilno upravljanje zagađenjem. Takođe, u zavisnosti od distribucije ugljovodonika zavisice i biodostupnost. Biodostupnost predstavlja meru u kojoj zagađujuća supstanca iz životne sredine može da uđe u neki organizam. Ona pokazuje stepen u kom je zagađujuća supstanca dostupna za transformaciju biološkim procesima, odnosno predstavlja deo zagađujuće supstance u životnoj sredini koji neki organizam može da koristi ili transformiše (11).

Nakon dospevanja u vodenu sredinu, niskomolekulski ugljovodonici plutaju po površini, pri čemu se formira tanak film, dok se teže frakcije akumuliraju u

sedimentu (11). Kada se nađu u zemljištu, dolazi do razdvajanja jedinjenja iz smeše na osnovu fizičko-hemijskih osobina i migracije kroz zemljište do izjednačavanja pritiska, kapilarnih sila i gravitacije. U zemljištu mogu da se definišu dve frakcije ugljovodonika. Prva frakcija se reverzibilno vezuje za čestice zemljišta, lako se desorbuje i zatim difunduje do vodene faze, odnosno podzemnih voda. Druga frakcija ostaje ireverzibilno adsorbovana na česticama zemljišta i smatra se netoksičnom i slabo degradabilnom pošto nije lako biodostupna. Pripadnost jedinjenja prvoj ili drugoj frakciji ugljovodonika zavisi od njihovih fizičko-hemijskih osobina, prvenstveno od polarnosti, odnosno oktanol-voda particionog koeficijenta, ali i karakteristika zemljišta. Polarnija jedinjenja su mobilnija i lakše dospevaju do podzemnih voda, dok jako hidrofobna interaguju sa česticama zemljišta i sedimenta. Takođe, ukoliko je zemljište bogato organskim ugljenikom, kao što su huminske kiseline koje sadrže aromatične prstenove sa fenolnim i karboksilnim površinskim grupama, peptidima i šećerima za koje se vezuju ugljovodonici, veća je interakcija ugljovodonika sa česticama zemljišta. Usled sorpcije zagađujućih supstanci (adsorpcije i apsorpcije) dolazi do frakcionisanja zagađujućih supstanci između vodene faze i organskog matriksa. Za razliku od niskomolekulskih ugljovodonika koji su mobilniji, jedinjenja koja u visokom stepenu interaguju sa česticama zemljišta ili sedimenta nisu lako biodostupna (11,12).



Slika 2. 1. Kretanje ugljovodonika u životnoj sredini (13)

Na ugljovodonike prisutne u životnoj sredini utiču različiti abiotički i biotički faktori, usled čega dolazi do prirodne atenuacije, odnosno do smanjenja mobilnosti, mase, toksičnosti ili koncentracije ugljovodonika u životnoj sredini. Isparavanje je jedan od abiotičkih faktora, koje dovodi do brzog uklanjanja lako isparljivih ugljovodonika (propan, butan) iz zemljišta i vode. Fotolitička degradacija je zaslužna za uklanjanje dela aromatičnih ugljovodonika, pošto nakon apsorpcije svetlosne energije, policiklični aromatični ugljovodonici (eng. polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH) prelaze u ekscitovani oblik što olakšava njihovu degradaciju. Međutim, ovaj proces je ograničen samo na površinski sloj kontaminiranog zemljišta ili vode koji je izložen svetlosti. Što se tiče biotičkih procesa, mikrobiološka degradacija se smatra primarnim mehanizmom za eliminaciju ugljovodonika iz životne sredine. U ovom procesu mikroorganizmi koriste zagađujuće supstance kao izvor ugljenika i energije. Svim pomenutim procesima dolazi do promene distribucije i smanjenja koncentracije ugljovodonika na kontaminiranim lokacijama. Međutim, sva jedinjenja koja preostanu nakon abiotičkih i biotičkih procesa su izrazito otporna na degradaciju. Zagađujuće supstance koje se zadržavaju u životnoj sredini, najčešće su fizički zarobljene ili

adsorbovane/apsorbovane u zemljištu i zajedno formiraju rezidualnu fazu koja predstavlja kontinuirani izvor zagađujuće supstance u zemljištu ili podzemnoj vodi. Stoga, kada se razmatraju opcije za sanaciju zagađenja, posebna pažnja se mora obratiti na ove rezervoare dugotrajnih zagađujućih supstanci (11,14).

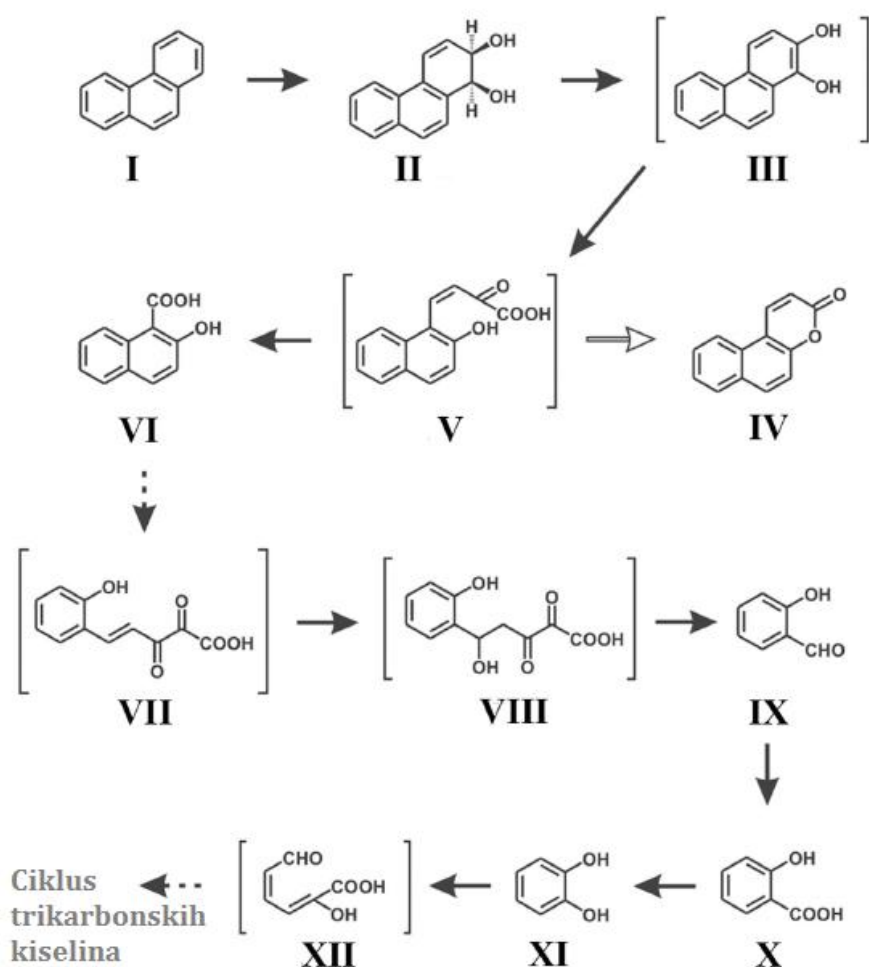
Na toksičnost ugljovodonika utiče njihova koncentracija, kao i struktura, odnosno frakcija kojoj pripadaju. Dizel gorivo sadrži približno 75 % zasićenih ugljovodonika i 25 % aromatičnih jedinjenja. Aromatična frakcija se uglavnom sastoji iz naftalena i alkil-benzena, ali može da sadrži i do 11 % (w/w) PAH jedinjenja. Ispuštanjem dizela, u životnu sredinu dospevaju alkani, monociklična i policiklična aromatična jedinjenja. Prisustvo aromatičnih i heterocikličnih jedinjenja predstavlja posebnu opasnost, zato što ova jedinjenja pripadaju grupi koja često ispoljava karcinogena, mutagena i toksična svojstva u životnoj sredini. Osim toga, aromatična jedinjenja su izrazito lipofilna i teško se degraduju, a neka od njih pripadaju grupi dugotrajnih organskih zagađujućih supstanci (4,10,13). Zbog biodostupnosti, niskomolekulski ugljovodonici (monociklični i biciklični), za razliku od visokomolekulskih, ispoljavaju izraženu akutnu toksičnost. Visokomolekulski ugljovodonici (tri ili više aromatična prstena) su slabo biodostupni, pa kao takvi nisu veoma toksični, ali su propisane njihove maksimalne koncentracije u životnoj sredini usled mutagenog i karcinogenog efekta koji ispoljavaju. Međutim, pod uticajem biotičkih i abiotičkih faktora može da dođe do promena u toksičnosti. Niskomolekulski ugljovodonici se lakše razgrađuju i transformišu, što može smanjiti njihov negativan efekat, dok biodostupnost visokomolekulskih ugljovodonika može da se poveća dejstvom enzima ili biosurfaktanata koje proizvode mikroorganizmi. Takođe, u procesima transformacije ugljovodonika mogu da nastanu intermedijeri koji pokazuju veću toksičnost. U ovakvim slučajevima, toksičnost će zavisi od koncentracije, pošto mikroorganizmi koji razgrađuju ugljovodonike u prisustvu visokih koncentracija imaju produženu lag fazu, pa je proces degradacije usporen ili potpuno inhibiran (9).

2.2.1. Mikrobnna degradacija aromatičnih ugljovodonika

Mikroorganizmi prisutni u životnoj sredini koji imaju sposobnost da razgrađuju ugljovodonike su bakterije, gljive i alge (15).

Tokom godina identifikovano je mnoštvo bakterija koje mogu da degraduju različite ugljovodonike, a neke od njih su pripadnici rodova *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*. Iako sve one koriste različite metaboličke putanje za degradaciju, mogu se izdvojiti dva glavna načina: aerobni i anaerobni (16).

Mehanizmi aerobne degradacije su dobro poznati, jer se istražuju duži vremenski period. U aerobnim uslovima, kiseonik je terminalni akceptor elektrona, ali se koristi i u početnim reakcijama za aktivaciju aromatičnih jedinjenja. Atomi kiseonika se inkorporiraju u aromatična jedinjenja dejstvom mono- i dioksigenaza, čime se destabilizuje njihova rezonantna struktura i omogućava raskidanje prstena. Nakon raskidanja prstena formiraju se intermedijeri kao što je katehol, koji se dalje koriste u ciklusu trikarbonskih kiselina. Primer aerobne degradacije fenantrena prikazan je na slici 2.2 (13,16).

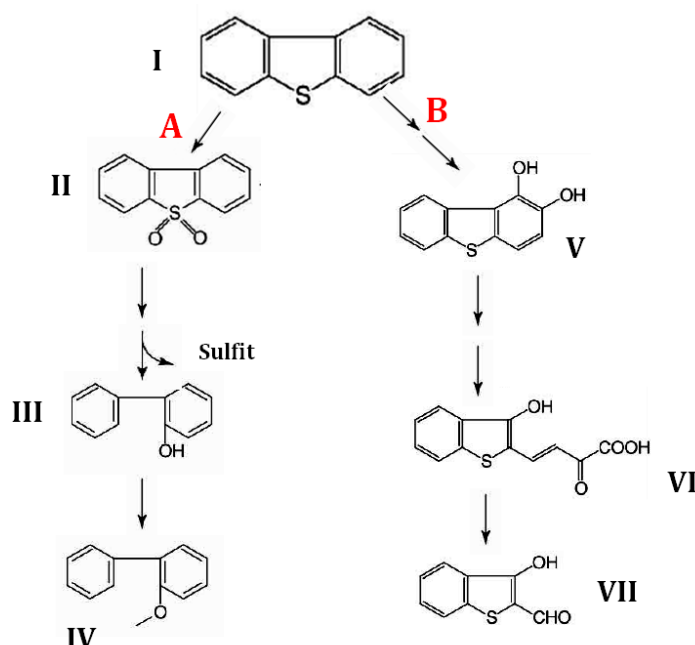


Slika 2. 2. Aerobna degradacija fenantrena. U zagradama su prikazani prelazni intermedijeri. Pune strelice označavaju proces mineralizacije, prazne nastanak krajnjih proizvoda, a isprekidane označavaju više koraka. I- fenantren, II- *cis*-1,2-fenantrendihidrodiol, III- 1,2-dihidroksi-fenantren, IV- 5,6- benzokumarin, V- *cis*-2-okso-4-(20-hidroksinaftil)-but-3-enska kiselina, VI- 2-hidroksi-1-naftenska kiselina, VII- *trans*-2,3-dioakso-5-(20-hidroksifenil)-pent-4-enska kiselina, VIII-2,3-dioakso-5-hidroksi-5-(20-hidroksifenil)-pentanska kiselina, IX- salicilaldehid, X-salicilna kiselina, XI- katehol, XII- 2,-hidroksi-mukonaldehid (16)

Anaerobna degradacija se odvija potpuno drugačijim mehanizmom. Četiri reakcije su ključne u ovom procesu: adicija fumarata, metilacija nesupstituisanih aromata, hidroksilacija alkil supstituenta i direktna karboksilacija. Na ovaj način se aromatični prsten aktivira, pa se jedinjenja dalje konvertuju do centralnog intermedijera benzoil-koenzim A, koji se dalje kompletno oksiduje ili inkorporira u biomasu (13).

Brojni mikroorganizmi kao što su *Rhodococcus* sp, *Mycobacterium* sp i *Pseudomans* sp. mogu da degraduju i heterociklična aromatična jedinjenja kao što je dibenzotiofen (DBT). Do degradacije može doći usled raskidanja C-C veze

(Kodama metabolički put) ili oslobađanja atoma sumpora (4S metabolički put). Kodama metabolički put obuhvata tri glavna koraka: hidrosilacije, raskidanja prstena i hidrolize usled čega nastaje 3-hidroksi-2-formil benzotiofen (HFBT). Neke bakterijske kulture mogu dalje da razgrade HFBT do benzotiofen-2,3-diona. U 4S metaboličkoj putanji DBT se konvertuje u sulfoksid, potom sulfon i sulfinat pri čemu nastaje hidroksibifenil i oslobađa se sulfit ili sulfat. Hidroksibifenil je toksičan i može da inhibira rast nekih mikroorganizma, međutim pokazano je da neki sojevi roda *Mycobacterium* mogu da konvertuju hidroksibifenil u 2-metoksibifenil. Oba puta degradacije prakazana su na slici 2.3 (10,17).



Slika 2. 3. A) 4S i B) Kodama metabolički put degradacije dibenzotiofena. I-DBT, II- dibenzotiofen sulfon, III- 2-hidroksibifenil, IV-2-metoksi-bifenil, V-1,2-dihidroksidibenzotiofen, VI-4-[2-(3-hidroksi)-tionaftenil]-2-okso-3-butenska kiselina, VII- 3-hidroksi-2-formilbenzotiofen (10)

Gljive mogu da degraduju aromatične ugljovodonike zahvaljujući brojnim ekstracelularnim enzimskim kompleksima i sistemu hifa pomoću kojih kolonizuju različite susprate. Međutim, degradacija PAH jedinjenja gljivama nije potpuna, već se oni posredstvom fungalnih enzima transformišu i postaju polarniji i biodostupniji. Postoje dve grupe gljiva koje mogu da degraduju PAH-ove: lignolitičke i ne-lignolitičke. Lignolitičke gljive koriste lignin-peroksidaze, mangan-peroksidaze i lakaze, koje učestvuju u degradaciju lignoceluloze za kometaboličku

degradaciju PAH jedinjenja i heterocikličnih aromatičnih jedinjenja sumpora. Nelignolitičke gljive koriste oksidativni put koji uključuje citohrom P450 monooksigenazu (10,15,16).

Pokazano je da degradaciju PAH jedinjenja u vodenoj sredini mogu da izazovu i različite cijanobakterije i alge. Mehanizmi degradacije još uvek nisu detaljno poznati, ali se pretpostavlja da koriste slične mehanizme kao i gljive (15,16).

Vrlo često jedan mikroorganizam nema sve neophodne enzime potrebne za potpunu mineralizaciju neke zagađujuće supstance. U takvim slučajevima do degradacije dolazi dejstvom konzorcijuma mikroorganizama, gde svaki mikroorganizam ponaosob ima neke od enzima neophodnih za degradaciju, pri čemu nastaju intermedijeri koje mogu da koriste ostali članovi konzorcijuma (16).

2.2.2. Bioremedijacija

Procesi prirodne atenuacije (abiotički i biotički) su izrazito spori i nisu uvek efikasni u otklanjanju zagađujućih supstanci. Zbog toga je potrebno pronaći adekvatno rešenje za sanaciju životne sredine, ukoliko dođe do zagađenja. Postoji nekoliko opcija za tretman kontaminirane životne sredine fizičkim, hemijskim i biološkim metodama. Postojeće fizičko hemijske metode (spaljivanje, UV oksidacija, ekstrakcija rastvaračima) imaju brojne mane, kao što su mala efikasnost i visoki troškovi, pri čemu ne dolazi do potpunog uklanjanja zagađujuće supstance, već samo do njihove transformacije iz jednog oblika u drugi.

Bioremedijacija koristi mikroorganizme da konvertuje opasne zagađujuće supstance u bezopasne proizvode, ili da ih potpuno mineralizuje do ugljen-dioksida i vode. U odnosu na fizičko-hemijske metode, bioremedijacija se smatra ekološkom, bezbednom i održivom tehnikom, koja može u potpunosti da ukloni zagađujuće supstance. Kako bi se prirodni procesi degradacije ubrzali i učinili efikasnijim, koriste se različite strategije bioremedijacije, kao što su bioventilacija, biostimulacija i bioaugmentacija (13,16).

Bioventilacija podrazumeva dodatak kiseonika, kako bi se pospešio rast aerobnih mikroorganizama. Biostimulacija uključuje podešavanje različitih faktora u životnoj sredini koji ograničavaju brzinu degradacije zagađujuće supstance. Radi

ubrzavanja degradacije dodaju se hranljive supstance, biosurfaktanti i biopolimeri (18).

U procesima bioaugmentacije dodaju se spoljni izvori mikroorganizama već prisutnim mikrobima u kontaminiranoj sredini. Najčešće se koriste mikroorganizmi koji su već prisutni u kontaminiranoj sredini, pošto su već adaptirani na život u prisustvu zagađujućih supstanci. Proces se sastoji od izolovanja mikroorganizama iz kontaminirane sredine i njihovog umnožavanja, nakon čega se upotrebljavaju za degradacije (18).

Kako bi procesi bioremedijacije bili uspešni i da bi se obezbedio maksimalni procenat degradacije, koriste se različiti konzorcijumi mikroorganizama i do sada je opisan njihov veliki broj. Međutim, kako bi se osigurao uspeh bioremedijacionog procesa, važno je identifikovati nove zimogene zajednice i sojeve koji će efikasnije sanirati zagađene lokalitete (19).

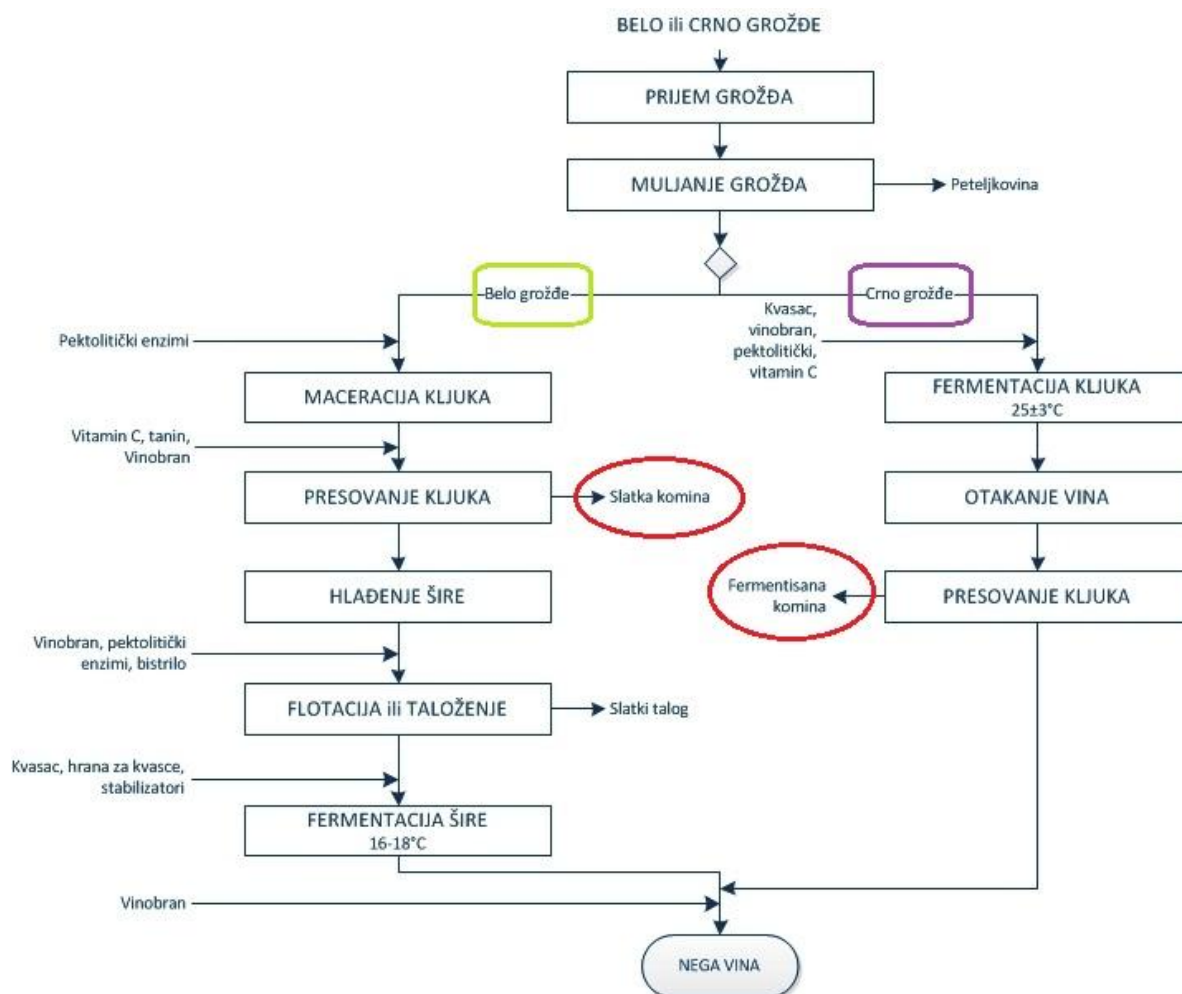
2.3. Komina grožđa

Grožđe je voće čija je proizvodnja najrasprostranjenija na svetu, a godišnje se proizvede više od 74 miliona tona, od čega skoro 35 % u Evropi, a 0,22 % u Srbiji (20). Najveći deo (75 %) koristi se u proizvodnji vina (21,22). U svetu godišnja produkcija vina dostiže skoro 25 milijardi litara, od čega se preko 60 % proizvodi u Evropi, a 0,4 % u Srbiji (23).

Komina je otpadni materijal koji nastaje u proizvodnji vina nakon presovanja kljuka, a čini do 20 % originalne količine grožđa. Generalno, predstavlja lignocelulozni otpad koga čine ostaci kožice, semenki i pulpe grožđa (21,24). Brojna su istraživanja koja ispituju konverziju komine grožđa u industrijski vredne proizvode, što je u skladu sa evropskom i domaćom regulativom o cirkularnoj ekonomiji i održivom razvoju (24).

2.3.1. Sastav komine

Tačan sastav komine zavisi od klimatskih uslova, sorte grožđa i načina gajenja, ali i od vrste vina koje se proizvodi, odnosno u kom trenutku postupka dolazi do presovanja kljuka (slika 2.4), pre (belo vino) ili nakon fermentacije (crno vino)(25,26).



Slika 2. 4. Razlike u proizvodnji belog i crnog vina (27)

Tokom početne faze proizvodnje vina, grožđe se mulja i presuje, pri čemu se ne menja značajno njegov hemijski sastav, što se odražava i na kominu. Fermentacija kod proizvodnje crnog vina je jedini proces koji može da izmeni sastav komine, ali ni to ne dovodi do velikih hemijskih promena (25).

U zavisnosti od intenziteta presovanja, komina može da sadrži između 55 % i 75 % vode. Tako visok sadržaj vode može da izazove mikrobnu i enzimsku degradaciju komine, što ograničava njenu dalju upotrebu (22). Dijetetska vlakna su najzastupljenija komponenta u komini (43-75 %), a izgrađena su od polisaharida ćelijskog zida (pektin, hemiceluloza i celuloza) i lignina, mada su u ovoj frakciji prisutni i tanini i proteini (22,28). Sadržaj proteina varira između 6-15 % od suve supstance, a aminokiselinski profil je sličan žitaricama. Komina je bogata

glutaminskom i asparaginskom kiselinom, a u manjoj količini su prisutni triptofan i aminokiseline koje sadrže sumpor. Lipidi potiču iz semenki grožđa, a njihov sadržaj je u opsegu od 14-17 %. Lipidi su bogati polinezasićenim i mononezasićenim masnim kiselinama, a dominantne masne kiseline su linoleinska, oleinska i palmitinska (22).

U zavisnosti od toga da li je komina dobijena pre ili nakon fermentacije grožđa, najveća varijacija u sastavu zavisi od zastupljenosti ukupnih rastvornih šećera. Kod komine koja nastaje u proizvodnji belog vina sadržaj rastvornih šećera iznosi 78,1 %, a crnog 26,0 %. Ova razlika je očekivana pošto se pri proizvodnji crnog vina šećeri troše fermentacijom, nakon čega se odvaja komina, dok je kod belog vina proces suprotan (25).

Komina je bogata fenolima, ali vrsta i sadržaj zavisi od sorte grožđa od koje nastaje. Fenoli prisutni u grožđu i vinu se klasifikuju u tri glavne grupe: fenolne kiseline (uglavnom benzoeva i hidroksi-cinaminska), prosti flavonoidi (katehini, flavonoli i antocijanini) i tanini i proantocijanidini (29,30). Većina ovih jedinjenja je identifikovana i u komini, a najzastupljeniji su: antocijanini, hidroksi-benzoeva i hidroksi-cinaminska kiselina, flavan-3-oli, flavonoli i stilbeni (30).

2.3.2. Primena komine grožđa

Nepropisno odlaganje komine grožđa može da izazove ozbiljnije posledice po životnu sredinu i zdravlje ljudi. Zbog velikog sadržaja vode, podložna je kvarenju i odličan je supstrat za razvoj patogenih mikroorganizama. Rast gljiva roda *Aspergillus* može da izazove stvaranje buđi i ohrotoksina A (22,31). Takođe, fenoli koji su prisutni u visokim koncentracijama snižavaju pH zemljišta i povećavaju rezistenciju komine ka degradaciji (26). Fenoli imaju i fitotoksično dejstvo, a njihov uticaj na životinje i ljude zavisi od koncentracije. Oni pokazuju antioksidativna svojstva, ali u visokim koncentracijama mogu da imaju i kancerogeno dejstvo. Pošto su količine komine koje se nakon berbe grožđa odlažu na deponije velike, luženje bioaktivnih jedinjenja u podzemne vode i potoke može da izazove ozbiljne dugoročne posledice po životnu sredinu (29). Na Novom Zelandu, nakon berbe 2016. godine, komina, koja je trebalo da se iskoristi u

proizvodnji stočne hrane, nepropisno je uskladištena, pa je došlo do velikog zagađenja vodotokova nizvodno od mesta odlaganja (32).

Zbog sve veće produkcije vina i stvaranja većih količina komine, kao i implementaciji tehnologija koje su u skladu sa ciljevima održivog razvoja, nastale su brojne ideje o iskorišćenju komine, odnosno njenoj revalorizaciji (26). Ideja o revalorizaciji komine nije nova. Ona se odavno koristi za dobijanje „drugog vina” ponovnom fermentacijom ili se destiluje pri čemu nastaje rakija komovica. Nažalost, i nakon ovoga ostaju velike količine otpadnog materijala, „džibre” (33).

Ekstrakcijom komine mogu da se dobiju različiti industrijski važni proizvodi: ulje od semenki grožđa, enocijanin koji se koristi kao boja u prehrambenoj industriji i vinska kiselina koja se dodaje prehrambenim proizvodima kao antioksidans, regulator kiselosti i konzervans (22). Polifenoli prisutni u komini imaju antioksidativno, anti-inflamatorno, antimikrobno i antitumorsko dejstvo, pa su razvijene različite metode za njihovu ekstrakciju kako bi se primenjivali u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (21,22). Pošto je bogata vlaknima i fenolima može da se koristi kao suplement u ishrani ili za fortifikaciju namirnica (25). Koristi se i kao supstrat za proizvodnju gljiva za ishranu ljudi, ili za dobijanje enzima (24).

Veliki sadržaj lignoceluloze u komini čini je odličnim supstratom za proizvodnju druge generacije biogoriva. Ugljene hidrate iz lignoceluloze je potrebno konvertovati u prostije šećere, koji se potom koriste u fermentaciji za dobijanje bioetanola, metana i vodonika (28).

Pošto ima optimalan odnos ugljenika i azota neophodan za kompostiranje, velika količina komine se koristi za stvaranje komposta. Međutim, iako se na ovaj način povećava sadržaj azota u zemljištu, potrebno je pored komine koristiti i druga đubriva kako bi se obezbedili dodatni izvori fosfora, kalijuma i magnezijuma, kojih nema u dovoljnim količinama. Takođe, zbog velikog sadržaja polifenola, komina može da ima fitotoksičan i antimikrobni efekat, što otežava njenu upotrebu u kompostiranju. Zbog toga je ekonomičnije kominu iskoristiti na neki drugi način (25,28).

Zbog velike količine dijetetskih vlakana, posebno glikana, celuloze i pektina, komina može da se koristi kao aditiv u stočnoj hrani. Pokazano je da korišćenje komine u stočnoj hrani krava i svinja povećava sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, kao i da ima blagotvorno dejstvo na zdravlje životinja (21,30). Zbog antimikrobnog dejstva fenola, smatra se da upotreba komine u stočnoj hrani može da doprinese smanjenju potrebe za korišćenjem antibiotika. (34). Međutim, svarljivost komine je izuzetno niska zbog prisustva velike količine lignina, koji inhibira celulolitičke i proteolitičke enzime kao i rast bakterija rumena (30).

2.3.3. Biohemijska konverzija lignoceluloznog materijala

Komina, kao i druga biljna biomasa, ima složenu strukturu koja se sastoji iz celuloze i hemiceluloze okružene ligninom, zbog čega je ovakvu biomasu veoma teško degradovati (35). Osim toga, većina bioaktivnih jedinjenja koja su prisutna u komini nalaze se u konjugovanom obliku sa šećerima, što smanjuje njihovu biodostupnost (36). Iz tog razloga, da bi se komina uspešno revalorizovala, neophodan je pretretman biomase. Metode za pretretman mogu biti fizičke, hemijske ili biološke, a najčešće se koriste u kombinaciji (37).

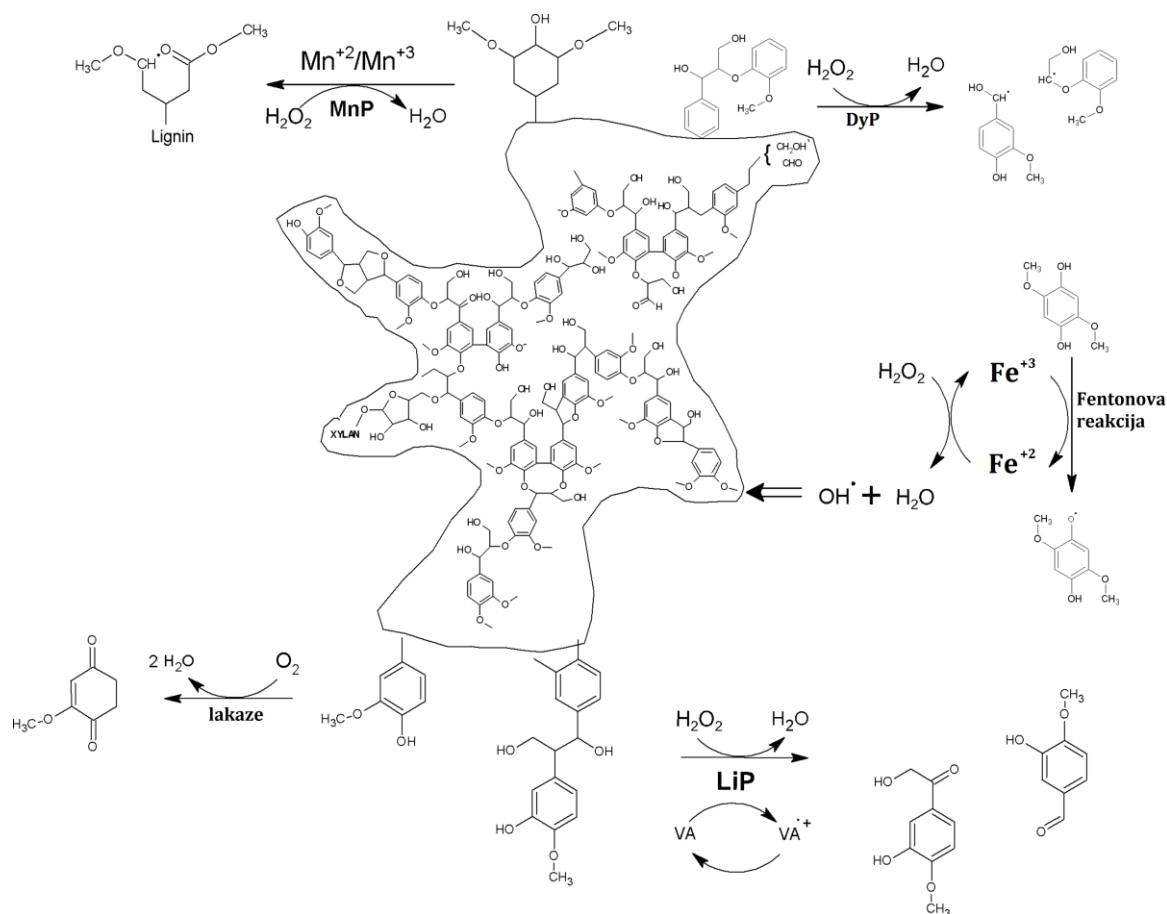
Termohemijska konverzija podrazumeva direktno sagorevanje, pirolizu, gasifikaciju i likvefakciju. Energija koja se nalazi u biomasi se oslobađa direktno kao toplota ili struja, ili može da se pretvori u čvrsta ili tečna goriva (38).

Biohemijska konverzija podrazumeva fizički ili hemijski pretretman u vidu toplote, mikrotalasa, ultrazvuka, nakon čega sledi enzimski ili tretman mikroorganizmima (38). Različiti mikroorganizmi kao što su askomicete, bazidiomicete i bakterije imaju mogućnost degradacije lignoceluloze, pri čemu su gljive bele i braon truleži koje pripadaju bazidiomicetama najefikasnije (39).

Smatra se da su gljive bele truleži jedini mikroorganizmi sposobni da kompletno mineralizuju lignin. One izlučuju lakaze, mangan-peroksidaze, lignin-peroksidaze i druge peroksidaze (peroksidaze koje obezbojavaju boje) koje omogućavaju depolimerizaciju lignina (slika 2.5). Međutim, smatra se da su ovi enzimi suviše veliki i ne mogu da prođu kroz lignocelulozni matriks kako bi degradovali lignin. Pored njih, postoje i pomoćni enzimi (kinon-reduktaze, aril-

alkohol dehidrogenaze, celobioza-dehidrogenaze, aril-alkohol-oksidade i glioksal-oksidade), koji pomažu stvaranje radikala i time olakšavaju depolimerizaciju lignina. Fentonova reakcija je neenzimski mehanizam koji stvaranjem radikala takođe olakšava degradaciju lignina (40). Osim lignina, gljive bele truleži, kao što je *Phanerochaete chrysosporium*, mogu da degraduju hemicelulozu iz lignoceluloznog matriksa pomoću ksilanaza i esteraza, čime se raskida veza između polisaharida i lignina. Na ovaj način one simultano razgrađuju i lignin i polisaharide u biomasi. Drugi sojevi su selektivni degraderi lignina, proizvode manje enzima koji degraduju polisaharide, pa se njihovim korišćenjem u tretmanu zadržava veći procenat polisaharida, što može da bude korisno u daljim postupcima valorizacije komine (41).

Biohemijskom konverzijom komine dolazi do depolimerizacije lignina i razgradnje celuloznog-hemiceluloznog matriksa, pa bioaktivna jedinjenja postaju dostupnija i lakše se ekstrahuju. Na ovaj način se takođe povećava svarljivost komine, što olakšava njenu upotrebu za stočnu ishranu (41,42).



Slika 2. 5. Različiti načini degradacije lignina (MnP- mangan-peroksidaze, DyP- peroksidaze koje obezbojavaju boje, LiP- lignin-peroksidaze, ox-oksalat, VA- veratril-alkohol)(43)

2.4. Dvodimenzionalna gasna hromatografija za analizu složenih smeša

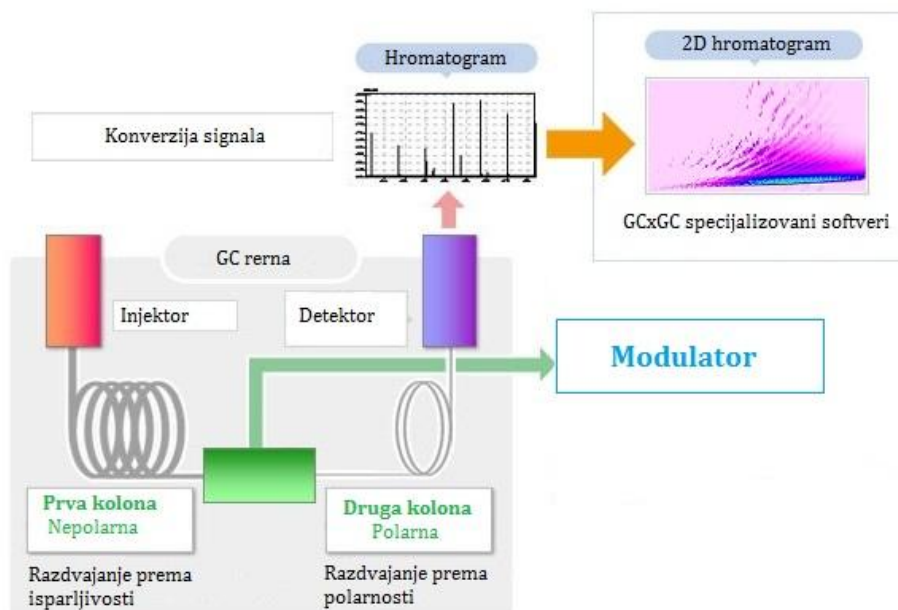
Instrumentalne tehnike koje se koriste za analizu zagađujućih supstanci su brojne, a izbor zavisi od vrste i karakteristika analita, kao i od matriksa u kome se oni nalaze (zemlja, sediment, voda, vazduh, tkiva). Najčešće se upotrebljavaju gasna (GC) i tečna hromatografija (LC) u kombinaciji sa različitim detektorima (44,45). Međutim, kada se analiziraju smeše sa velikim brojem jedinjenja, klasične instrumentalne metode ne pružaju dovoljno informacija o strukturi, jer vrlo često pomoću njih nije moguće razdvojiti sve komponente neke smeše.

Dvodimenzionalne (2D) tehnike razdvajanja predstavljaju tehnike u kojima se uzorak razdvaja pomoću dva komplementarna i potpuno nezavisna mehanizma (46). Neke od ovih tehnika, kao što su 2D tankoslojna hromatografija,

hromatografija nakon koje sledi elektroforeza i 2D elektroforeza su odavno u upotrebi (47–49). Međutim, razvojem GC i LC, neke od ovih tehnika su zanemarene, iako jednodimenzionalne (1D) metode nisu bile dovoljne za razdvajanje složenih smeša (50). Simmons i Snyder su 1958. godine opisali aparaturu za gasnu i tečnu hromatografiju koja se odvija u dva nivoa. U ovoj proceduri, nakon prolaska uzorka kroz prvu kolonu, samo željene frakcije su analizirane na drugoj koloni (51). Ova ideja je dalje unapređivana, pa tako danas postoji multidimenzionalna gasna hromatografija (GC-GC). U multidimenzionalnoj gasnoj hromatografiji uzorci se razdvajaju na prvoj koloni, a potom se određene manje frakcije injektuju na drugu kolonu gde se dalje razdvajaju, zbog čega se ova tehnika naziva i „heartcuting” 2D gasna hromatografija. Primenom ove tehnike uspešno se mogu razdvojiti jedinjenja u smešama koja upotrebom klasične jednodimenzionalne gasne hromatografije koeluiraju (52–54). Međutim, postoje smeše izrazito složenog sastava, koje kada se analiziraju klasičnom jednodimenzionalnom GC tehnikom, daju ogroman broj preklopljenih pikova. Jedan od najčešćih primera kompleksnih smeša je nafta i njeni derivati, koja se ne može razdvojiti GC analizom u jednoj dimenziji, već se na hromatogramu uočava karakterističan UCM (eng. unresolved complex mixture), koji se sastoji iz velikog broja preklopljenih pikova (55). Analiza ovakvog uzorka GC-GC će razdvojiti samo odabrane frakcije i dati informacije o sastavu tih frakcija, ali nikako celog uzorka (52). U ovu svrhu, Liu i Phillips su 1991. godine razvili novu tehniku sveobuhvatne dvodimenzionalne gasne hromatografije (GCxGC) u kojoj se uzorak razdvaja na prvoj koloni u manje frakcije, a potom se svaka frakcija analizira na drugoj koloni (56).

2.4.1. Sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija-principi

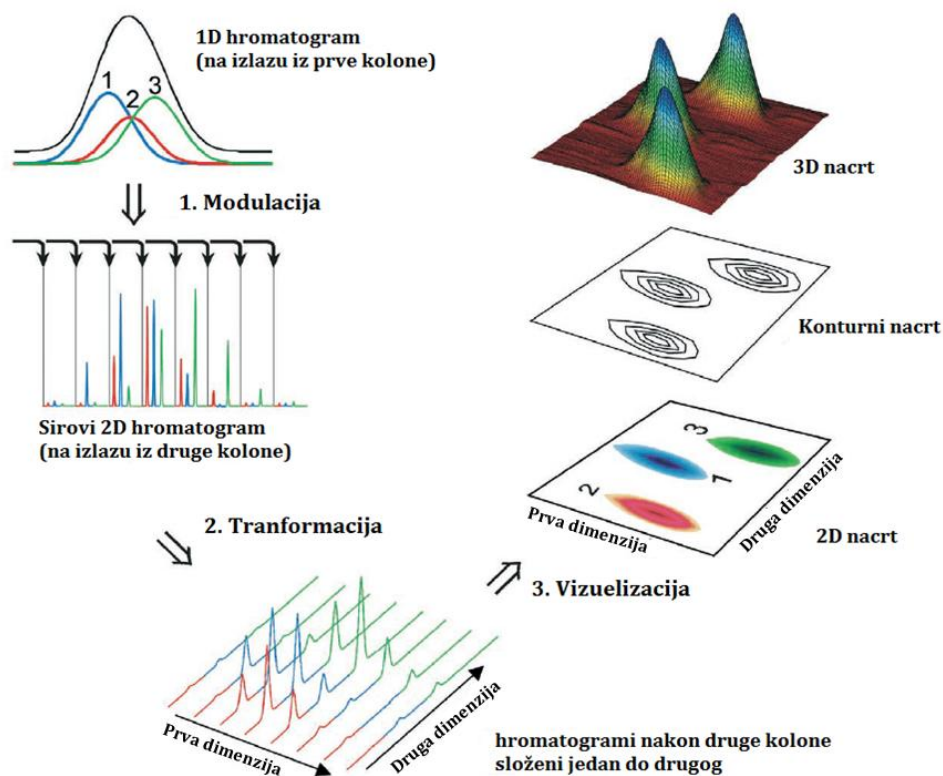
Na slici 2.6. je prikazana shema rada jednog GCxGC uređaja. On se sastoji iz dve serijski povezane kolone, tako da svaki deo uzorka koji silazi sa prve kolone ulazi u drugu gde se dalje razdvaja, nakon čega ide do detektora (57).



Slika 2. 6. Osnovi princip rada GCxGC sistema (58)

Kolone mogu da se nalaze u istoj ili u dve odvojene rerne. Interfejs između prve i druge kolone se naziva modulator. On je zadužen za transfer uzoraka sa prve na drugu kolonu u konstantnim vremenskim intervalima. U GCxGC tehnici, prva kolona je uglavnom dužine od 15 m do 30 m i razdvajanje traje relativno dugo (20-120 min), a nakon modulacije, frakcije ulaze u dosta užu i kraću kolonu (0,5-2 m) gde je razdvajanje kratko (2-8 s). S obzirom na to što je brzina razdvajanja na drugoj koloni velika, pikovi na drugoj koloni su širine 50-600 ms, pa je neophodno da detektor ima veliku brzinu akvizicije (minimum 100 Hz) (52,59).

Signali koji stižu sa detektora se specijalizovanim softverima konvertuju u 1D i 2D hromatograme. Rezultat GCxGC analize nakon razdvajanja na drugoj koloni je ogroman broj hromatograma, a softverski se oni slažu jedan pored drugog u procesu transformacije (slika 2.7.). Dalje, u zavisnosti od potreba, mogu da se vizuelizuju kao 2D ili 3D mape u boji, pri čemu boja zavisi od intenziteta signala, i kao konturni nacrt (60).



Slika 2. 7. Stvaranje i vizuelizacija GCxGC hromatograma (60)

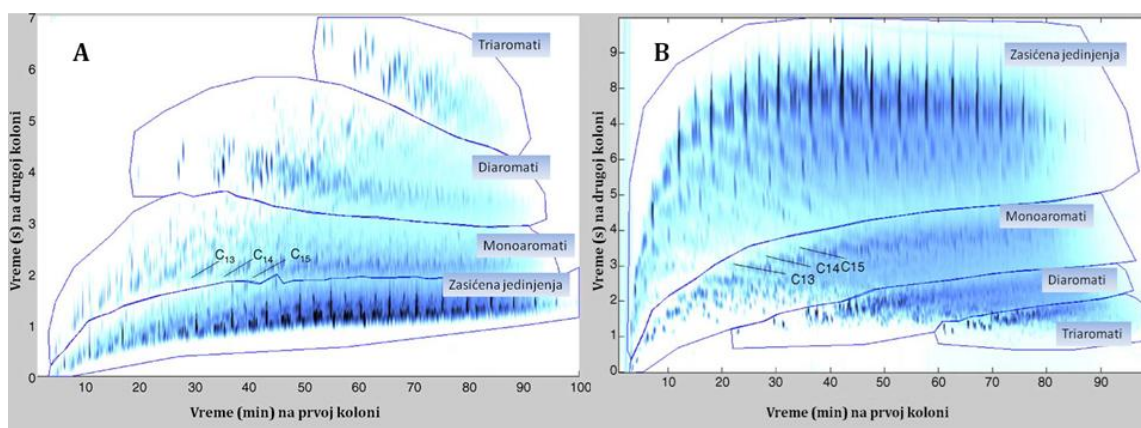
2.4.2. Ortogonalnost i izbor kolona

Za dve dimenzije razdvajanja kaže se da su ortogonalne, kada su mehanizmi razdvajanja potpuno nezavisni (59). Za druge tehnike, kao što je GC-MS, se pretpostavlja da su ortogonalne zato što su dve dimenzije toliko različite da su, u suštini, nezavisne. Za razliku od toga, prva i druga dimenzija razdvajanja kod GCxGC se odvija prema sličnom principu. Ortogonalnost kod GCxGC se postiže variranjem retencionog vremena na drugoj koloni kao funkcije razdvajanja na prvoj koloni (57).

Kako bi se postigla ortogonalnost, uglavnom se za razdvajanje koriste kombinacije gde je prva kolona nepolarna, a druga srednje-polarna ili polarna. Ovakva kombinacija se još naziva i normalno-fazna (61). U ovom slučaju razdvajanje analita u prvoj dimenziji zavisice od isparljivosti. Zbog velike brzine razdvajanja na drugoj koloni, iako u GCxGC postoji temperaturni program, razdvajanje u drugoj dimenziji će biti izotermalno, pa u ovoj dimenziji razdvajanje

zavisi isključivo od polarnosti uzorka, a ne i od isparljivosti. Na ovaj način, retenciono vreme u drugoj koloni je nezavisno od onog u prvoj i te dve dimenzije su ortogonalne (57,59). Glavna korist ortogonalnosti kod GCxGC jeste stvaranje uređenih, strukturiranih hromatograma, gde su strukturno srodna jedinjenja (izomeri ili homologa jedinjenja) lokalizovana u specifičnim regionima hromatograma što olakšava njihovu identifikaciju (59–61). Naravno, nije dovoljno da kombinacija kolona bude ortogonalna kako bi nastali strukturirani hromatogrami, već je neophodno prisustvo strukturno sličnih jedinjenja (izomera, homologa ili kongenera) i druga kolona treba da bude odabrana na osnovu fizičko-hemijskih osobina analita (60).

Iako je kombinacija nepolarne i polarne kolone najčešće upotrebljavana, u zavisnosti od potreba, koristi se i reverzno-fazna (polarna x nepolarna ili polarna x srednje polarna) kombinacija. U reverzno faznoj kombinaciji, razdvajanje u prvoj dimenziji zavisi i od isparljivosti i od polarnosti, a na drugoj samo od isparljivosti, pa u ovom slučaju nisu ispunjeni kriterijumi ortogonalnosti. Međutim, upotrebom ovakvih kombinacija moguće je dobiti strukturirane hromatograme iz čega sledi da ortogonalnost i strukturiranost hromatograma nisu direktno povezane. Na slici 2.8 može se videti 2D hromatogram dizela dobijen upotrebom normalno-fazne i reverzno-fazne GCxGC.

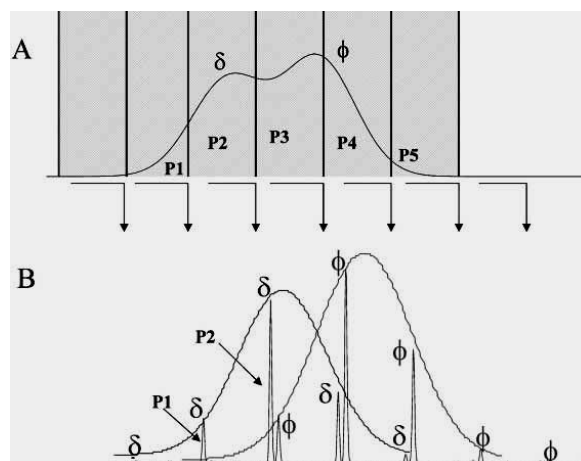


Slika 2. 8 A) normalno-fazna i B) reverzno-fazna GCxGC dizela (62)

Bez obzira na to koja se kombinacija kolona upotrebljava, jasno je da GCxGC ima ogromnu prednost u odnosu na klasičnu GC. Nastanak strukturiranih hromatograma dosta olakšava analizu i identifikaciju jedinjenja. Takođe, GCxGC ima znatno veći idealni kapacitet pikova, koji predstavlja proizvod kapaciteta pikova na prvoj i na drugoj koloni, što drastično poboljšava razdvajanje analita u uzorku. Zahvaljujući boljem razdvajanju, kao i refokusiranju koje omogućava modulator, kod GCxGC se povećava i detektabilnost (60,61).

2.4.3. Modulatori

Modulator je najznačajniji deo GCxGC sistema. On je zadužen za transfer uzoraka sa prve na drugu kolonu u konstantnim vremenskim intervalima. Vreme između dve uzastopne injekcije na kolonu predstavlja jedan ciklus modulacije i naziva se period modulacije (59). U okviru jednog perioda modulacije manje frakcije pikova eluirane sa prve kolone se u modulatoru kontinualno akumuliraju ili zarobljavaju, potom se u obliku uskih pulseva refokusiraju i injektuju na drugu kolonu. Pomenuti uski pulsevi se razdvajaju na sekundarnoj koloni i odlaze do detektora (60). Period modulacije je uvek manji od širine pika koji silazi sa prve kolone, što omogućava čuvanje redosleda razdvajanja na prvoj koloni. Naime, svaki modulacioni period uvodi deo primarnog efluenta u drugu kolonu u obliku pulsa. Dok se ovaj proces odvija, razdvajanje na prvoj koloni i dalje traje, pa bi razdvajanje frakcije na drugoj koloni trebalo da se završi pre nego što se injektuje sledeća frakcija, odnosno puls. Idealno bi bilo da period modulacije ne bude širi od četvrtine širine pika na prvoj koloni, tj. svaki pik koji silazi sa prve kolone bi trebalo da se modulatorom razdvoji na tri ili četiri manje frakcije. Na slici 2.9 prikazano je kako se u GCxGC razdvajaju pikovi koji su preklapljeni nakon razdvajanja na samo jednoj koloni. Pik sa prve kolone koji sadrži dve komponente, δ i φ , koje se koeluiraju se modulatorom, razdvaja se na više manjih pulseva (P1-P5). Svaki puls se injektuje na drugu kolonu i razdvaja pre nego što se injektuje sledeći puls, što omogućava razdvajanje koeluiranih komponenti u drugoj dimenziji (63).



Slika 2. 9. A) Izgled dva preklopljena pika koji se eluiraju sa prve kolone i B) razdvajanje preklopljenih pikova nakon prolaska kroz drugu kolonu. P1-P5 označava frakciju tj. puls koji se injektuje na drugu kolonu; δ i ϕ označavaju komponente koje se nalaze u piku koji se eluira sa prve kolone (63)

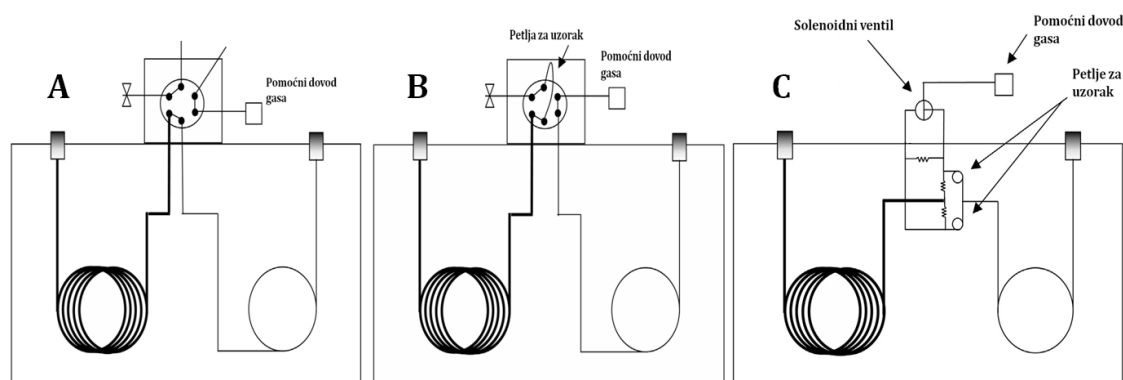
Modulatori mogu da se svrstaju u dve grupe: modulatori na bazi ventila i termalni modulatori. Modulatori na bazi ventila koriste protok gasa da kontrolišu i izoluju frakcije eluata sa prve kolone (¹D) i tu frakciju preusmeravaju da se injektuje u drugu kolonu (²D). Termalni modulatori koriste temperaturu da zarobe i potom oslobode analite sa ¹D (64).

2.4.3.1. Modulatori na bazi ventila

Modulatori na bazi ventila mogu biti sa diferencijalnim protokom ili sa preusmeravanjem protoka (64).

Prvi modulator na bazi ventila sa diferencijalnim protokom je koristio membranski ventil, koji je preusmeravao eluat sa prve na drugu kolonu. Sa ventilom su bile povezane prva i druga kolona, pomoćni dovod gasa, kao i otvor za višak eluata (Slika 2.10. A). U jednoj poziciji eluat sa prve kolone je prolazio kroz ventil i izlazio u atmosferu, dok je pomoćni dovod gasa obezbeđivao protok u drugoj koloni. Okretanjem ventila, eluent sa ¹D se nakratko preusmeravao na ²D. Ventil se potom ponovo okretao i eluent je opet izbacivan u atmosferu pri čemu se eluent razdvajao na koloni. Ovaj metod ima malu osetljivost pošto se samo 10-20% eluenta razdvaja na drugoj koloni, a zbog mehaničkih ograničenja ventil nije mogao

da radi na temperaturama većim od 175 °C (64,65). Modulator sa sistemom ventila sa diferencijalnim protokom je kasnije unapređen tako što je napravljena petlja za uzorak koja sakuplja eluat sa ¹D (Slika 2.10.B). Kada se ventil okretao, gas u petlji se kompresovao i injektovao na ²D kao uzak puls. Na ovaj način se obezbeđivalo da veći procenat eluenta (80%) prođe kroz drugu kolonu (64–66). Naredna tehnika sa solenoidnim ventilom prikazana na slici 2.5. C omogućila je da se celokupna količina eluenta sa prve kolone injektuje u drugu. Sistem je imao dve petlje za uzorke i pneumatski sistem za prebacivanje koji je omogućavao da eluent sa ¹D bude u jednoj petlji, dok se materijal iz druge petlje injektovao u ²D pomoću dodatnog dovoda gasa. Osim što omogućava injektovanje celokupne količine eluenta, u ovom sistemu solenoidni ventil se nalazio van GC rerne, pa nije postojalo ni ograničenje u temperaturi (65). U poslednje vreme ventili se prave od termostabilnih materijala, pa nije neophodno da se ventil nalazi van rerne (64).



Slika 2. 10. Modulatori sa diferencijalnim protokom A) bez i B) sa petljom za uzorak (65)

Modulatori sa preusmeravanjem protoka se zasnivaju na prikupljanju sa ¹D u ²D promenom smeru protoka pomoćnog dovoda gasa. Za preusmeravanje protoka koristi se Dinov prekidač, a sistem može i ne mora da sadrži kolektorsku petlju u koju se eluent sa ¹D sakuplja, a potom u narednom ciklusu prenosi u ²D (53,64).

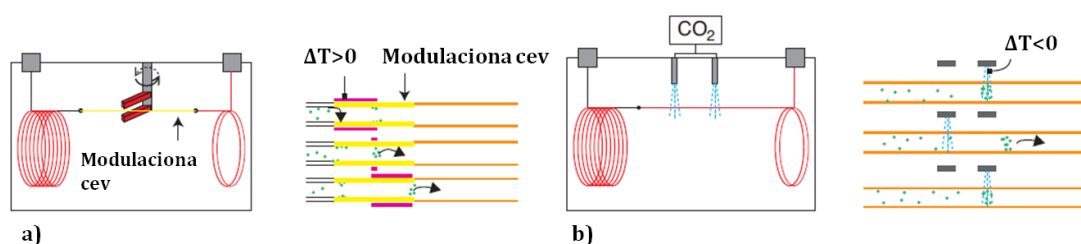
Prednost modulatora sa ventilima u odnosu na termalne modulatore je u tome što su efikasniji u analizi lako isparljivih jedinjenja, koja često izlaze iz sistema sa termalnom modulacijom, osim toga ekonomičniji su pošto ne zahtevaju mehanizam za grejanje/hlađenje (tečni azot ili ugljen-dioksid). Nedostatak su

velike brzine protoka na drugoj koloni koje, iako postoje mehanizmi za smanjenje brzina, nisu kompatibilne sa nekim masenim detektorima (53,64,65).

2.4.3.2. Termalni modulatori

Termalna modulacija je najčešće korišćen vid modulacije. Zasniva se na niskim temperaturama koje zarobljavaju i fokusiraju analite kako se oni eluiraju sa ¹D, a brzim zagrevanjem ih potom uvode u ²D. Postoji više različitih sistema za termalnu modulaciju: modulatori sa grejačima, kriogeni i nekriogeni modulatori (64).

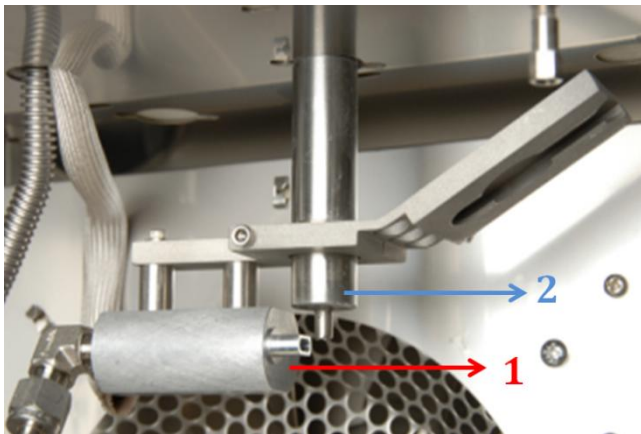
Kod modulatora sa grejačima postoji cev sa stacionarnom fazom debljeg sloja na koju se eluirani analiti ¹D adsorbuju, a desorpcija se vrši lokalnim zagrevanjem, pri čemu se koristi temperatura koja je minimum 100 °C viša u poređenju sa temperaturom rerne (61). Ilustracija ovog procesa prikazana je na slici 2.11.A.



Slika 2. 11. Termalni modulatori: a) sa grejačima i b) kriogeni (61)

Kriogeni modulatori zarobljavaju eluent sa ¹D smanjenjem temperature (oko -100 °C), što se postiže endotermnom ekspanzijom kriogena kao što su ugljen-dioksid ili tečni azot. Do desorpcije dolazi kada se eluent ponovo izloži temperaturi rerne. U ovom slučaju nije potrebno da postoji dodatna cev kao modulator, već se mlaz kriogena usmerava ka koloni (61). Postoji više varijacija u dizajnu ovog sistema modulacije. Najčešće su u upotrebi sistemi sa četiri ili dva mlaza. Sistem sa četiri mlaza ima dva hladna mlaza koja zarobljavaju analite i dva vrela mlaza koja ih oslobađaju u drugu kolonu. U ovom slučaju proces zarobljavanja/otpuštanja analita se vrši dva puta, kako bi se smanjila mogućnost bekstva lako isparljivih

analita. U sistemu sa dva mlaza, analit se zarobljava/otpušta samo jednom, radi smanjenja potrošnje kriogenih tečnosti (64). Ilustracija ovog procesa prikazana je na slici 2.11.B.



Slika 2. 12. ZX2 modulator: 1) topli i 2) hladni mlaz (67)

kompanije ZOEX (slika 2.12). On takođe ima dva mlaza, hladni i topli, ali ne koristi kriogene, već zatvoreni sistem koji proizvodi hladni mlaz. Temperatura hladnog mlaza može da bude do $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, za razliku od korišćenja kriogenih tečnosti koje stvaraju mlaz temperature i do $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zbog ove razlike u temperaturi, ZX2 se ne može koristiti za modulaciju analita manjih od C7, dok kriogeni modulatori mogu da zarobe i C3. U razvoju je i modulator koji koristi kapilaru od nerđajućeg čelika za zarobljavanje analita i ne zahteva nikakav potrošni materijal. Zarobljavanje se postiže upotrebom dve ohlađene keramičke podloge, a desorpcija kapacitivnim pražnjenjem kako bi došlo do zagrevanja i oslobađanja analita.

2.4.4. Detektori

Izbor detektora za GCxGC je sličan kao i za klasičnu jednodimenzionalnu gasnu hromatografiju. Jedini dodatni uslov koji postoji jeste da detektor ima veliku brzinu odgovora i malu unutrašnju zapreminu, pošto pikovi koji silaze sa ^2D imaju širinu od 150-400 ms. Da bi se ovi uski pikovi pravilno rekonstruisali u drugoj dimenziji, detektor bi trebalo da ima brzinu uzorkovanja od minimum 50 Hz (52,65).

Iako su kriogeni modulatori široko rasprostranjeni i veoma pouzdani, dalji razvoj modulatora ide u pravcu stvaranja nekriogenih termalnih modulatora koji su jednostavniji i ekonomičniji. Jedan od primera je ZX2 termalni modulator

2.4.4.1. Plameno-jonizacioni i element-selektivni detektori

Plameno-jonizacioni detektor (FID) je u početku bio dominantni izbor za GCxGC, pošto može da prikuplja podatke brzinama od 50-300 Hz i ima zanemarljivu unutrašnju zapreminu. Iako je FID stabilan tokom vremena i lako se kalibriše, ne daje nikakve strukturne informacije o analitima (55,66).

Detektor sa zahvatom elektrona (ECD) je veoma selektivna i osetljiva tehnika za detekciju jedinjenja koja sadrže elektronegativne grupe. Zbog veće unutrašnje zapremine ovog detektora, u GCxGC se primenjuje samo mikro-ECD (μ ECD) koji ima unutrašnju zapreminu od 150 μ L, ali i tako dovodi do širenja pikova u poređenju sa FID-om. Koristi se za detekciju polihlorovanih bifenila, pesticida i hlorovanih parafina (55,66).

Osim ECD, drugi element-selektivni detektori kao što su sumporni i azotni hemiluminiscentni detektor i azot-fosfor detektor, uspešno su korišćeni u GCxGC, međutim njihova upotreba nije veoma rasprostranjena (55).

2.4.4.2. Maseni spektrometri

Plameno-jonizacioni i element-selektivni detektori ne pružaju nikakve strukturne informacije o jedinjenjima koja se analiziraju, pa je zbog toga upotreba masenih spektrometara kao detektora za GCxGC brzo postala dominantna. Kombinacija dvodimenzionalne gasne hromatografije i masene spektrometrije pruža tri analitičke dimenzije, što drastično poboljšava analizu (66,68).

U konvencionalnoj jednodimenzionalnoj GC koriste se različiti maseni analizatori: jonska klopka, kvadrupolni, analizator sa električnim sektorom i analizator koji razdvaja na osnovu vremena preleta (eng. time of flight, TOF) (66). Među njima, jedino TOF ima dovoljnu brzinu akvizicije jer može da prikupi 50 ili više spektara u sekundi. U početku se za GCxGC koristio TOF male rezolucije (LRTOF), koji ima velike velike frekvencije spektara kao i mogućnost dekonvolucije. Takođe, ima veliku osetljivost u „full-spectrum” načinu snimanja. Negativne strane upotrebe LRTOF su to što daje niske procenete preklapanja sa bibliotekama spektara, jer su pothranjene spektrima nastalim uglavnom upotrebom kvadrupola (68). Osim LRTOF u upotrebi je i TOF visoke rezolucije (HRTOF). HRTOF omogućava osetljivost u „full-spectrum” načinu snimanja tako

što pruža visoku rezoluciju i tačnost masa. Zahvaljujući upotrebi selektivnih jonskih hromatograma sa uskim opsegom masa, omogućena je selekcija određenih jedinjenja, čime se povećava efikasnost analize (68).

U poređenju sa TOF sistemima, kvadrupol-maseni spektrometri (qMS) su mnogo ekonomičniji, pa je uloženo mnogo truda u njihovo unapređenje i prilagođavanje za korišćenje u GCxGC. Naime, kvadrupol nema dovoljnu brzinu akvizicije spektara, kako bi mogao da analizira uske pikove koji se dobijaju GCxGC. U početnim eksperimentima brzina skeniranja je bila 2,43 skena/s, pa je bilo neophodno da širina pikova bude 1 s (66). Daljim razvojem metode nastali su qMS brzine akvizicije od 20 Hz, ali pri užem opsegu masa (41-228,5 m/z) što je bilo dovoljno samo za kvalitativnu analizu, ali ne i za kvantitativnu (66,69). Za kvantitativnu analizu često se koristila kombinacija qMS i FID, pošto FID ima veću brzinu akvizicije (53). Uspešna kvantifikacija postignuta je samo u SIM modu (eng. Single ion monitoring), a u tom slučaju brzina akvizicije je bila 30,7 Hz. Kako se tehnika qMS unapređivala, postizale su se sve veće brzine akvizicije, ali je opseg analiziranih masa bio manji u poređenju sa TOFMS. Za razliku od TOFMS, za opseg od 40-400 m/z , qMS je imao brzine akvizicije između 20-30 Hz. Danas postoje novi, brzo skenirajući qMS instrumenti, koji postižu brzinu od 50 Hz pri normalnom opsegu masa (m/z 40-330) (68,69).

Bez obzira na povećane brzine akvizicije, TOFMS i dalje ima prednost u odnosu na qMS, zbog toga što generiše spektre koji imaju konstantan odnos jona u datom piku, što omogućava dekonvoluciju preklapajućih pikova (68).

Maseni spektrometri sa trostrukim kvadrupolom (qqqMS) su veoma selektivni i osetljivi, a osim što rade u klasičnom „full scan” i SIM modu, omogućavaju MRM analizu (eng. multiple reaction monitoring), gde prvi (Q1) i treći (Q3) kvadrupol rade u SIM modu, a reakcija disocijacije usled sudara se odvija u ćeliji između dva kvadrupola. Moguće su i kombinacije Q1 SIM-Q3 sken, Q1 sken-Q3 sken, Q1 sken-Q3 SIM. Ovaj analizator ima dovoljnu brzinu akvizicije za GCxGC i može se koristiti u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi. GCxGC-qqqMS imaju jedinstvenu prednost, kod simultanog korišćenja target i non-target analize, pošto istovremeno daju full sken i MRM podatke. Upotreba ovog sistema još uvek nije rasprostranjena, pa će se njegovi potencijali videti tek u budućnosti (68).

U masenim detektorima koji se koriste u GCxGC, najčešći jonski izvor je elektronska jonizacija (EI), međutim ona dovodi do velike fragmentacije i ne daje previše strukturnih podataka. Zbog toga se sve više upotrebljavaju meke metode jonizacije, kao što su hemijska jonizacija i jonizacija u polju. Negativna jonizacija sa zahvatom elektrona (ECNI) primenjuje se za analizu diastereoizomera polihlorovanih alkana (55).

2.4.5. Primena sveobuhvatne masene hromatografije

Nafta i njeni derivati su prema sastavu među najsloženijim uzorcima, a broj jedinjenja u uzorku raste sa tačkom ključanja uzorka. U slučaju parafina, za jedinjenja sa 10 C-atoma može da postoji 75 izomera, dok za jedinjenja sa 20 C-atoma taj broj raste na 4347. Iako u datom uzorku neće biti prisutni svi mogući izomeri, procenjuje se da u uzorcima ovakvog tipa može da bude prisutno i preko milion jedinjenja (70). Zbog toga nije iznenađujuć podatak da su naftni derivati prvi analizirani GCxGC i dugo vremena su to bili jedini uzorci koji su analizirani ovom metodom (56,70). Upotrebom GCxGC moguća je karakterizacija grupa jedinjenja, kvantifikacija određenih analita, kao i „fingerprinting”- određivanje ukupnog sastava goriva i poređenje sa uzorcima u životnoj sredini kako bi se utvrdilo odakle potiče kontaminacija (forenzika životne sredine). Uspešno se analiziraju jedinjenja koja sadrže heteroatome, a takođe, ukoliko dođe do izlivanja nafte, moguće je pratiti bioremedijaciju u realnim uslovima. Do sada je u literaturi opisano nekoliko primera praćenja bioremedijacije naftnih derivata u životnoj sredini, pri čemu su uglavnom analizirane promene u strukturi tokom vremena koje nastaju usled vremenskih prilika i prirodnog procesa degradacije. Malobrojna su ispitivanja biodegradacije u procesima bioaugmentacije, kao i ispitivanja efikasnosti mikroorganizama da degraduju ovakva jedinjenja (70–75).

Tokom godina pomoću GCxGC analizirane su različite zagađujuće supstance (PAH, PCB, pesticidi) u različitim uzorcima zemljišta, sedimenta, vode, vazduha (70,76,77). Takođe, ispitivano je prisustvo zagađujućih supstanci u voću, povrću, čajevima, insektima (78–80).

Pored analize petrohemijskih proizvoda, GCxGC ima najveću primenu u analizi biljnih ekstrakata i etarskih ulja. Ovi proizvodi su u svakodnevnoj upotrebi

usled velike popularnosti tradicionalnih i prirodnih lekova. Neki od njih su dokazano korisni, mađutim usled prisustva velikog broja jedinjenja u niskim koncentracijama, teško se identifikuju aktivna jedinjenja. Razvojem GCxGC metoda za analizu, olakšana je identifikacija aktivnih komponenti etarskih ulja (81). Moguća je i hemijska klasifikacija biljaka na osnovu hromatograma u GCxGC, a dos Santos i saradnici su klasifikovali etarska ulja na osnovu dela biljke iz kog su dobijena (81–83). Upotrebom „fingerprinting” analize moguće je utvrditi i geografsko poreklo hrane, kao i njen kvalitet (79).

Značajna je i primena GCxGC u biomedicinskim istraživanjima. Naime, u ispitivanju metabolomiksa nekog uzorka neophodna je non-target analiza, pošto nije poznato koja su jedinjenja prisutna u uzorku. Takođe, u biološkim uzorcima prisutan je veliki broj različitih malih molekula, pa je sveobuhvatno razdvajanje i analiza masenom spektrometrijom postalo važan metod u studijama metabolomiksa. GCxGC se koristila za ispitivanje biomarkera kod pacijenta sa tuberkulozom, za fingerprinting ćelijskih kultura zaraženih virusima ili bakterijama. Poređenjem uzoraka seruma zdravih osoba i osoba sa hroničnim neurodegenerativnim poremećajem, pronađena su 34 potencijalna biomarkera. Moguća je i analiza nedozvoljenih supstanci u urinu, što može da olakša detekciju novih steroida u testovima koje sprovode anti-doping agencije (81,84).

Analiza lako isparljivih organskih jedinjenja (VOC) GCxGC-om je posebno zanimljiva, jer se dobijaju značajne informacije o senzornim svojstvima različitih uzoraka. Na ovaj način ispitivana su isparljiva jedinjenja kod pečenih lešnika različitog geografskog porekla, poređene dve vrste kafe (Arabika i Robusta), ispitivana organska jedinjenja koja daju aromu pivu. Određivan je i kvalitet maslinovog ulja (devičansko, ekstra devičansko) na osnovu profila VOC. Na ovaj način GCxGC se uspešno koristi u flavoromiksu (sva jedinjenja koja doprinose percepciji ukusa nekog uzorka) (79,85–88).

Osim u flavoromiksu, ispitivana su isparljiva jedinjenja ljudske kože. Pasivni uzorkivači su postavljeni na zglobu ruke ili noge, a jedinjenja su analizirana pomoću GCxGC-TOFMS. Na ovaj način ispitivana je veza između ljudske kože i ujeda komaraca (89). Dubois i saradnici ispitivali su VOC koja nastaju raspadanjem humanih tkiva GCxGC, što je od značaja za forenziku (90).

3. Materijal i metode

3.1. Mikroorganizmi, izolacija i karakterizacija

3.1.1. Mikroorganizmi

Za eksperimente biodegradacije aromatične frakcije dizela korišćeni su bakterijski sojevi CHP-ZH25, CHP-NR31, CHP-315, CHP-A35, CHP-Y37 i CHP-YG38 koji su izolovani iz zemljišta zagađenog ugljovodonicima nafte uzorkovanog na teritoriji Republike Srbije (91). Sojevi su izolovani višestrukim presevima na M3 podlogu (deo 3.1.2.3), kao i na mineralnu podlogu sa 2000 ppm dizela (deo 3.1.2.6), gde je dizel bio jedini izvor ugljenika (92,93).

Za eksperimente biodegradacije komine grožđa korišćene su gljive koje su u prethodnim radovima izolovane sa trulog drveta, opalog lišća i zemljišta. Korišćene su gljive bele truleži *Coriolopsis rigida* LPSC 232 (94), *Peniophora albobadia* LPSC 285 (95) i *Pycnoporus sanguineus* LPSC 163 (96); gljiva braon truleži *Gloeophyllum sepiarium* LPSC 735 (97); gljiva iz zemljišta *Trichoderma harzianum* FALH 18 (98) i *Ulocladium botrytis* LPSC 813 koja degraduje opalo lišće (95). Sve pomenute gljive su prethodno izolovane i identifikovane molekularnim tehnikama, a odabrane su zbog njihove sposobnosti da rastu na različitim lignoceluloznim materijalima. Kulture su čuvane na kosom sladnom agaru na 4 °C.

3.1.2. Podloge

Za izolovanje, gajenje i čuvanje mikroorganizma, kao i eksperimente biodegradacije korišćene su podloge različitog sastava. Sve podloge su pre upotrebe autoklavirane na 121 °C tokom 20 min.

3.1.2.1. Hranljivi agar

Hranljivi agar (Torlak) korišćen je za održavanje bakterijskih sojeva i pripreman je prema uputstvu proizvođača.

3.1.2.2. Sladni agar

Sladni agar (Torlak) korišćen je za održavanje sojeva gljiva i pripreman je prema uputstvu proizvođača.

3.1.2.3. M3 podloga

M3 podloga korišćena je za izolovanje rodova *Nocardia* i *Rhodococcus* i imala je sledeći sastav:

KH_2PO_4	0,466 g/L
Na_2HPO_4	0,732 g/L
KNO_3	0,01 g/L
NaCl	0,29 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
CaCO_3	0,02 g/L
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	200 $\mu\text{g/L}$
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	180 $\mu\text{g/L}$
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	20 $\mu\text{g/L}$
Natrijum-propionat	0,2 g/L

Bilo je potrebno da pH vrednost M3 podloge bude oko 7 i podešavana je pomoću 1 mol/L NaOH. Nakon podešavanja pH, dodato je još 18 g/L agara. U podlogu je nakon sterilizacije dodavano 50 mg/L aktidiona i 4 mg/L tiamin-HCl, koji je prethodno rastvoren u vodi i sterilisan hladnim ceđenjem.

3.1.2.4. Miler-Hintonov agar

Miler-Hintonov agar (Torlak) korišćen je za ispitivanje osetljivosti bakterijskih sojeva na teške metale i pripreman je prema uputstvu proizvođača.

3.1.2.5. Tripton soja bujon

Tripton soja bujon (Torlak) korišćen je za umnožavanje bakterijskih sojeva pre eksperimenata izolovanja masnih kiselina i ekstrakciju genomske DNA. Bujon je pripreman prema uputstvu proizvođača.

3.1.2.6. Mineralna podloga po Loser-u

Mineralna podloga (92) korišćena je za ispitivanje rasta bakterijskih sojeva na različitim izvorima ugljenika, kao i za eksperimente biodegradacije aromatične frakcije. Podloga je imala sledeći sastav:

NH ₄ Cl	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,55 g/L
Na ₂ HPO ₄	0,25 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25 g/L
TSS	5 mL/L

Bilo je potrebno da pH vrednost mineralne podloge bude između 6 i 8 i podešavana je pomoću 1 M KOH. Kada je korišćena čvrsta mineralna podloga bilo je potrebno dodati još 16 g/L agara.

Rastvor elemenata u tragovima (eng. Trace element solution, TSS) bio je sledećeg sastava:

Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	500 mg/L
FeSO ₄ x 7H ₂ O	200 mg/L
H ₃ BO ₃	30 mg/L
CoCl ₂ x 6H ₂ O	20 mg/L
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ x H ₂ O	3 mg/L
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	3 mg/L
NiSO ₄ x 7H ₂ O	2 mg/L

$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
10 M HCl	1 mL/L

3.1.3. Rast na različitim izvorima ugljenika

Kako bi se procenila mogućnost rasta mikroorganizama na različitim pojedinačnim izvorima ugljenika, svi sojevi su zasejani na čvrstu mineralnu podlogu po Loseru (92) kojoj su dodata različita aromatična jedinjenja: 0,5 g/L 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (Merck, Nemačka), 1 g/L 4-hidroksibenzojeve kiseline (Merck, Nemačka), 0,5 g/L natrijum-benzoata (Alkaloid, Makedonija), 0,2 g/L fenola (NRK inženjering, Srbija), 0,2 g/L fenantrena (Aldrich Chemicals, Velika Britanija), 2 g/L dizela (Srbija) i 0,2 g/L motorno ulje (SAE 15W-40, API SF/CD, Srbija). Nakon toga, bakterijski sojevi su inkubirani tri dana na 28 °C.

3.1.4. Osetljivost na teške metale

Osetljivost mikroorganizama na teške metale ispitivana je metodom difuzije na Miler-Hintonovom agaru. U ovim testovima korišćene su rastuće koncentracije (2,5-50 mmol/L) sledećih soli: $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Merck, Nemačka), NiCl_2 (Kemika, Hrvatska), $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Lachema, Češka), $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Zorka, Srbija) i $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Merck, Nemačka) (99).

3.1.5. Identifikacija bakterijskih sojeva

3.1.5.1. API testovi

Za preliminarnu identifikaciju bakterijskih sojeva korišćeni su API Coryne, API Zym i API CH50 testovi (BioMerieux) prema uputstvu proizvođača.

3.1.5.2. Određivanje masnih kiselina

Za određivanje estara masnih kiselina korišćena je metoda koju su prethodno opisali Đurić i saradnici (100). Ukratko, sojevi su zasejani na tripton soja bujon, a nakon 24 h sata inkubacije na 28 °C, kultura je centrifugirana (Centrifuga 5804 R, Eppendorf, Nemačka) 10 min na 8000 rpm. Vlažna biomasa (0,2 g) je potom refluktovana 3 h sa smešom toluen: metanol: sumporna kiselina

(5:5:0,2 V/V/V). Nakon hlađenja, dodato je 10 mL zasićenog NaCl i ceo rastvor je dva puta ekstrahovan sa po 10 mL smeše hloroform:heksan (1:4 V/V). Nakon uparavanja ekstrakti su analizirani gasnom hromatografijom (vidi 3.4.3.1).

3.1.5.3. 16s rRNA analiza

Za analizu 16s rRNA, genomska DNA je ekstrahovana pomoću Dneasy Blood & Tissue kita (Qiagen). Ekstrakti su umnoženi PCR-om i u tom procesu korišćeni su sledeći prajmeri: 27F (AgAgTTTgA TCM Tgg CTC Ag) i 1492R (Cgg CTA CCT TgT TAC gAC TT). Uzorci su potom komercijalno sekvencirani u Holandiji (Macrogen Inc.). Na osnovu sekvenciranja, sojevi CHP-ZH25, CHP-NR31, CHP-315, CHP-A35, CHP-Y37 i CHP-YG38 su identifikovani kao *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 (JX430000), *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 (JX965395), *Gordonia* sp. CHP-315 (JX429999), *Micrococcus* sp. CHP-A35 (JX965396), *Sphingobacterium* sp. CHP-Y37 (JX965397) and *Cupriavidus* sp. CHP-YG38 (JX965398). Dobijene sekvence su upoređene sa NCBI GenBank bazom podataka koristeći BLAST program. Na osnovu dobijenih rezultata i uz pomoć MEGA 7.0.21 softvera konstruisano je filogenetsko stablo. Sve vrste su deponovane u kolekciji kultura ISS WDCM375 Instituta za zemljište u Beogradu pod pristupnim brojevima *Oerskovia* sp. HPZH25 - ISS 621; *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 - ISS 622; *Gordonia* sp. CHP-315 - ISS 623; *Micrococcus* sp. CHP-A35 - ISS 620; *Sphingobacterium* sp. CHP-Y37 - ISS 624 and *Cupriavidus* sp. CHP-YG38 - ISS 625.

3.2. Priprema supstrata za biodegradaciju

3.2.1. Aromatična frakcija dizela

Dizel gorivo D2 je kupljeno na lokalnoj benzinskoj stanici u Srbiji. U cilju izdvajanja aromatične frakcije, dizel (5 mL) je propušten kroz kolonu (30 x 1,5 cm) koja je bila napunjena sa 10 g silika gela (veličina čestica 70-230 meša, Merck KgaA, Nemačka). Prva frakcija, alkanska, eluirana je sa kolone sa 30 mL heksana i potom sa još 10 mL heksana. Druga, aromatična frakcija eluirana je sa 30 mL smeše heksan:toluen (3:1, V/V). Kako bi se dobilo dovoljno aromatične frakcije za sve eksperimente, ovaj postupak je ponovljen više puta (101). Procenat aromatične frakcije u dizelu određen je gravimetrijski. Naime, dobijeni ekstrakti su upareni do

suva, nakon čega im je izmerena masa.

3.2.2. Komina grožđa

Sveža komina, odnosno smeša kože i semenki bobica grožđa vrste *Vitis Labrusca* sorte Izabela nastala nakon ceđenja fermentisanog kljuka tokom proizvodnje vina, dobijena je od proizvođača iz poljoprivredne zadruge Cooperativa de la Costa de Berisso, Berisso, Argentina (102). Komina je dobijena metodom slučajnog uzorkovanja tokom berbe 15. marta 2015. godine, a prikupljeni materijal je objedinjen u jedan kompozitni uzorak. Komina je sušena u sušnici sa cirkulacijom vazduha na 60 °C tokom 48 h, razdeljena u kese, zatim autoklavirana 30 min na 121 °C i čuvana na sobnoj temperaturi i tamnom mestu do upotrebe.

Parom tretirana komina (PTK) je ekstrahovana vodom na Soksletovom aparatu tokom 16 h u odnosu 1:10 (w/V) kako bi se dobila frakcija rastvorna u vodi, VRF (103). Ova frakcija korišćena je za određivanje fizičko-hemijskih svojstva. Određivani su pH, kao i sadržaj amonijačnog azota ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) (104), ukupnih fenola prema Folin-Ciocalteu-ovoj metodi (103), obojenih supstanci, odnosno optičke gustine na 395 nm (105), i ukupnih redukujućih šećera (TRSC) po metodi koju je opisao Somogyi (106).

3.3. Biodegradacioni eksperimenti

3.3.1. Test respiracije

Respiracija sojeva *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 i *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 praćena je tokom sedam dana biodegradacije pomoću dvanaestokanalnog Micro-Oxymax respirometra (Columbus Instruments, SAD) povezanim sa računarnom. Uzorci su pripremani u Duran-ovim bocama zapremine 250 mL u kojima je bilo 100 mL podloge. Korišćena je mineralna podloga sa 300 ppm aromatične frakcije izolovane iz dizela kao izvor ugljenika. Podloge su zasejavane sa 3 mL inokuluma gustine 10^5 CFU/mL. Koncentracija kiseonika i ugljendioksida praćena je u intervalima od 5 h pomoću O_2 paramagnetnog i CO_2 infra-crvenog senzora, a sistem je bio zatvoren. Eksperiment je trajao 7 dana.

3.3.2. Biodegradacija aromatične frakcije

Sojevi CHP-ZH25 i CHP-NR31 su zasejani na čvrstu mineralnu podlogu (92) sa 200 ppm aromatične frakcije dizela kao jedinim izvorom ugljenika i inkubirani 7 dana na 28 °C. Nakon trostrukog preseva na ovoj podlozi, sojevi su prebačeni na tečnu mineralnu podlogu sa 300 ppm aromatične frakcije dizela i inkubirani 7 dana 28 °C. Kultura je centrifugirana na 4500 rpm, a biomasa resuspendovana u fiziološkom rastvoru. Alikvot (1 mL) je potom zasejan na 100 mL tečne mineralne podloge sa 300 ppm aromatične frakcije. Uzorak je inkubiran na mućkalici (150 rpm) na 28 °C. Abiotička kontrola je pripremljena na isti način i sadržala je sve komponente osim bakterijske kulture. Svi uzorci su pripremljeni u triplikatu.

Biodegradacija je praćena na svakih 10 dana tokom 30 dana, tako što je po jedan erlenmajer svakog uzorka skidan sa mućkalice, uziman alikvot (1 mL) za određivanje broja mikroorganizama metodom serijskog razblaženja razblaženja (107). Potom je degradacija prekidana dodatkom 2% HgCl₂, a preostala aromatična frakcija je ekstrahovana sa tri zapremine heksana. Ekstrakti su upareni do suva, a količina preostale aromatične frakcije određena je gravimetrijski. Kod uzoraka nakon 30 dana degradacije ekstrakti su rastvoreni u 8 mL heksana i propušteni kroz „clean-up” kolonu (8 x 0,5 cm) napunjenu Florisil® (veličina čestica 60-100 meša ASTM, Merck KgaA, Nemačka). Uzorci su dalje analizirani pomoću GC x GC-(HR)TOFMS.

3.3.3. Biodegradacija komine grožđa (fermentacija na čvrstoj fazi)

Odmereno je 30 g parom tretirane komine i prebačeno u kese koje mogu da se autoklaviraju, a potom je podešena vlažnost na 70 %. U vlažnu parom tretiranu kominu dodavane su kulture gljiva, koje su prethodno rasle 7 dana na 2 % sladnom agaru. Svaka kesa je inokulisana sa 6 mL 0,15 % micelijalne suspenzije. Inokulisane kese su inkubirane na 28 °C u mraku tokom 90 dana u vlažnoj komori. Kao abiotička kontrola korišćena je sterilna PTK, koja nije inokulisana mikroorganizmima, a inkubirana je na isti način kao i inokulisani uzorci. Svi uzorci su pripremljeni u triplikatu.

Nakon 90 dana, od alikvota svakog uzorka pripremljena je VRF iz koje su određivani pH, sadržaj fenola, hromofore tj. optička gustina na 395 nm, NH₄⁺-N i

redukujući šećeri kao što je opisano u delu 3.2.2. Ostatak uzorka je osušen na 60 °C do konstantne mase. Degradacija je određena kao procenat smanjenja mase PTK (procenat smanjenja inokulisanih uzoraka u odnosu na abiotičku kontrolu). Osušeni uzorci PTK (SF) su samleveni u ahatnom avanu i prosejani kroz sito (<1 mm). Potom je odmeravano po 30 mg prosejanih uzoraka (SF) i ekstrahovano sa po 150 µL metanola na ultrazvučnom kupatilu tokom 20 min. Dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz Whatman-ov filter papir br. 4, a filtrati upareni do suva pod strujom azota. Ekstrakti su čuvani na sobnoj temperaturi do dalje analize FTIR-om i GCxGC-qMS (108).

3.4. Strukturne instrumentalne metode

3.4.1. Elementalna analiza

Sadržaj ugljenika, vodonika, azota i sumpora određen je elementarnom organskom analizom (EOMA) koristeći Vario EL III CHNS/O automatski analizator (Elementar, Hanau, Nemačka).

3.4.2 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

Infracrveni spektri su snimani na instrumentu Nicolet 6700 (Thermo Scientific, SAD) metodom prigušene totalne refleksije (eng. attenuated total reflectance, ATR) u oblasti od 1800 do 600 cm⁻¹ sa 64 skena i rezolucijom od 4 cm⁻¹ (109). Snimljeni su spektri sledećih uzoraka: neinokulisana PTK pre inkubacije (0 dan), neinokulisana PTK nakon inkubacije (90 dana) i inokulisani uzorci PTK nakon 90 dana inkubacije. Metanolni ekstrakti su naneti na ATR kristal kapilarom, a kako bi se dobili tanki filmovi rastvarač je uparen u struji azota. Spektri su snimani i obrađivani u Omnic 7.0 programu. Vibracione trake su upoređevine sa literaturnim podacima (110).

3.4.3. Hromatografska analiza

3.4.3.1. GC-MS

Ekstrakti koji su dobijeni nakon refluktovanja i ekstrakcije za analizu masnih kiselina analizirani su pomoću uređaja Agilent 7890 A-5975C GC-MS sa HP-5 ms kolonom (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Nosač je bio helijum, a temperatura

kolone je bila linearno programirana od 50 °C (0 min) do 285 °C sa brzinom promene temperature od 4,3 °C/min. Za identifikaciju estara masnih kiselina korišćen je BAME standard metil estara bakterijskih masnih kiselina (Supelco) kao i poređenje sa NIST5a.L bazom podataka. Sadržaj je određen kao odnos površine pika i zbiru zapremina svih pikova izražen u procentima.

3.4.3.2. GCxGC-(HR)TOFMS

Prečišćeni ekstrakti aromatične frakcije dobijeni ekstrakcijom uzoraka nakon biodegradacionog eksperimenta su upareni do konstantne mase, rastvoreni u 1 mL heksana i analizirani GC x GC-(HR)TOFMS. Korišćen je Agilent 7890 A gasni hromatograf (Agilent, Wilmington, SAD) sa međusobno povezanim InertCap 5MS/Sil (45 m x 0,25 mm i.d., 0,10 µm) i BPX50 (0,9 m x 0,1 mm i.d., 0,10 µm) kolonama, „loop jet” modulatorom (Zoex KT2006, Zoex Corp) i TOF masenim spektrometrom visoke rezolucije (JeolAccuTOFGCv 4G). Uzorci su injektovani u splitless modu pri temperaturi od 280 °C. Helijum je korišćen kao noseći gas, a brzina protoka je bila 1,8 mL/min. Temperatura rerne je bila 50 °C tokom 2 min, a potom je podignuta do 300 °C brzinom od 3 °C/min. Period modulacije je bio 4 s. Temperatura transferne linije je bila 300 °C, a jonskog izvora 280 °C. Opseg skeniranja m/z je bio od 33-850. Podaci su analizirani GCImage softverom za HRMS (v.2.8 GCImage LLC).

3.4.3.3. GCxGC-q MS

Metanolni ekstrakti uzoraka komine grožđa nakon inkubacije od 90 dana su derivatizovani sa bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamidom sa trimetilhlorosilanom (BSTFA + TMCS, 99:1) tokom 45 min na 60 °C i analizirani GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japan) sveobuhvatnim dvodimenzionalnim gasnim hromatogramom sa masenim spektrometrom (GCxGC-qMS) sa ZX2 termalnim sistemom modulacije (Zoex Corp) koji povezuje dve kolone: nepolarna RtxR-1 (Restek, CrossbondR 100% dimetil polisiloksan, 30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 µm) i srednje polarna BPX50 (SGE analytical Science, 1 m, 0,1 mm i.d., 0,1 µm). Rerna je bila programirana na sledeći način: 40 °C tokom 5 min, zatim je podignuta do 300 °C brzinom od 5,2 °C/min. Period modulacije je bio 9 s. Temperatura tranferne linije je bila 300 °C, a

jonskog izvora 220 °C. Opseg skeniranja m/z je bio od 70-500. Podaci su analizirani GCImage (GCImage LLC) 2.8 softverom. Za identifikaciju jedinjenja na osnovu poređenja sa masenim spektrima korišćena je biblioteka masenih spektara NIST17.

3.5. Testovi za ispitivanje fitotoksičnosti

Iz uzoraka PTK nakon inkubacije od 90 dana (kontrola i inokulisani uzorci) je uzet alikvot od kog je pripremljena VRF iz koje su određene fizičko-hemijske osobine uzoraka. Ostatak je osušen na 60 °C kao što je opisano u delu 3.2.2. Iz ovog suvog ostataka takođe je pripremljena frakcija rastvorena u vodi- VRFs po istom protokolu (111). Ovako dobijena VRFs je filtrirana kroz membranu veličine pora 0,2 μm i korišćena za test germinacije. Ispitivan je efekat VRFs na germinaciju semena salate (*Lactuca sativa*) i paradajza (*Lycopersicon esculentum*) prema metodi koju su predložili Zucconi i saradnici (112). Semena su tokom jednog minuta površinski sterilisana 1 % natrijum hipohloritom, a potom isprana 6-7 puta sterilnom destilovanom vodom. U sterilnim Petri šoljama se nalazio sterilan filter papir natopljen VRFs i po 20 semenki salate ili 15 semenki paradajza. U kontrolnim uzorcima filter papir je bio natopljen sterilnom destilovanom vodom. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu a ispitivan je uticaj nerazblažene i razblažene VRFs (1:2, 1:4, 1:8 u vodi). Eksperimenti su rađeni u mraku na 25 °C. Nakon 7 dana, meren je broj semena kod kojih je došlo do germinacije kao i radijalni rast. Germinacioni indeks (GI) je izračunat prema sledećoj formuli:

$$GI = \frac{G}{G_0} \times \frac{L}{L_0} \times 100 \quad (3.1)$$

gde su G i G_0 broj izraslih semenki u uzorku i kontroli redom, a L i L_0 su prosečna vrednost zbira dužina korena u uzorku i kontroli.

4. Rezultati i diskusija

U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je degradacija složenih smeša organskih aromatičnih zagađujućih supstanci pomoću različitih čistih kultura mikroorganizama. Kao model supstrati izabrani su **aromatična frakcija dizel goriva D2** (AFD) koja predstavlja složenu smešu organskih aromatičnih zagađujućih supstanci poreklom iz nafte i **komina grožđa**, otpadni materijal izuzetno bogat aromatičnim jedinjenjima, koji nastaje u procesu pravljenja vina.

U prvom delu eksperimenata, koji su se odnosili na degradaciju aromatične frakcije dizela, okarakterisani su i identifikovani bakterijski sojevi prethodno izolovani iz zemljišta kontaminiranog naftom. Među njima, sojevi CHP-ZH25 i CHP-NR31 su pokazali najveću sposobnost da degraduju aromatičnu frakciju dizela, pa su oni korišćeni za ispitivanje njene degradacije. Degradacija različitih klasa jedinjenja prisutnih u AFD je praćena upotrebom GCxGC- (HR)TOFMS i u cilju lakše analize degradacije razvijena je posebna jednačina za vizuelizaciju samo degradovanih jedinjenja, koja su se zatim obrađivala u GCImage softveru.

Drugi deo eksperimenata posvećen je degradaciji komine grožđa. Ona sadrži veliku količinu lignolitičkih vlakana, a u zavisnosti od načina dobijanja može da sadrži i šećere, fenole, etanol, antocijane, tanine i dr. Zbog svog sastava, komina predstavlja rizik po životnu sredinu, ali i izvor industrijski važnih jedinjenja, pa je osim degradacije komine u ovom radu ispitivana i transformacija pomoću šest različitih čistih kultura gljiva u cilju pronalaženja optimalnih uslova za smanjenje fitotoksičnosti komine grožđa.

4.1. Biodegradacija aromatične frakcije dizela

4.1.1. Izolacija i karakterizacija mikroorganizama

Bakterijski sojevi CHP-ZH25, CHP-NR31, CHP-315, CHP-A35, CHP-Y37 i CHP-YG38 su prethodno izolovani iz zemljišta zagađenog ugljovodonicima nafte uzorkovanog na teritoriji Srbije. Sojevi su iz zemljišta izolovani višestrukim presevima na M3 podlogu kao i na mineralnu podlogu sa 2000 ppm dizela kao jedinim izvorom ugljenika (91).

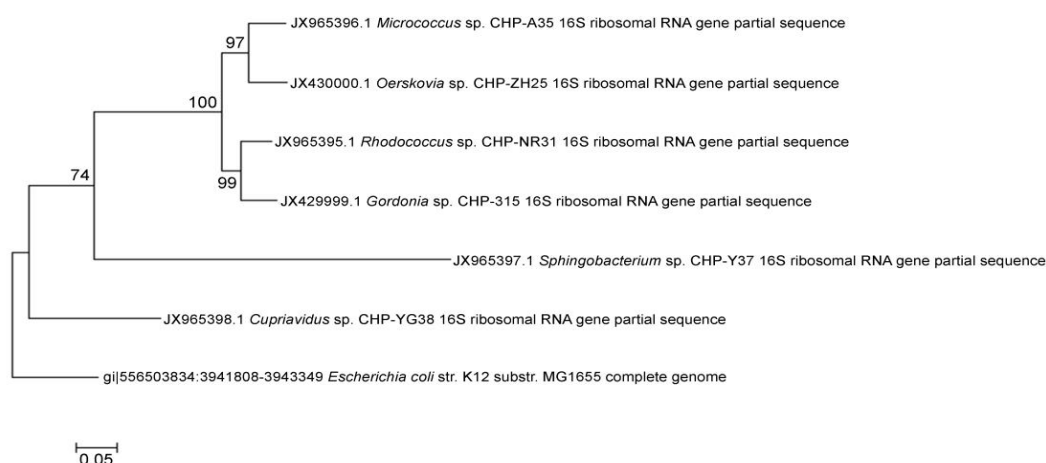
Na osnovu sekvenciranja gena za 16s rRNA i analizom dobijenih sekvenci pomoću BLAST algoritma dostupnog u okviru NCBI GenBank baze podataka, utvrđeno je koje su prethodno deponovane sekvence najbližije našim. Na taj način

sojevi CHP-ZH25, CHP-NR31, CHP-315, CHP-A35, CHP-Y37 i CHP-YG38 su identifikovani, a sekvence deponovane u NCBI GenBank bazi podataka kao *Oerskovia* sp. CHP-ZH25, *Rhodococcus* sp. CHP-NR31, *Gordonia* sp. CHP-315, *Micrococcus* sp. CHP-A35, *Sphingobacterium* sp. CHP-Y37 and *Cupriavidus* sp. CHP-YG38 (Tabela 4.1.). Kulture svih identifikovanih sojeva su deponovane u kolekciji kultura ISS WDCM375 Instituta za zemljište u Beogradu pod pristupnim brojevima koji se nalaze u tabeli 4.1.

Tabela 4. 1. Pregled molekularne identifikacije bakterijskih sojeva na osnovu sekvenciranja 16s rRNA gena, kao i njihovi pristupni brojevi u NCBI Genbank bazi podataka i kolekciji kultura ISS WDCM375

Soj	Identifikacija	Pristupni broj u kolekciji kultura ISS WDCM375	Pristupni broj u NCBI GenBank bazi podataka	Najsličniji sojevi (Blast pretraga)
CHP-ZH25	<i>Oerskovia</i> sp. CHP-ZH25	ISS 621	JX430000	<i>Oerskovia enterophila</i> DSM strain 43852 (NR_026239)
CHP-NR31	<i>Rhodococcus</i> sp. CHP-NR31	ISS 622	JX965395	<i>Rhodococcus cerastii</i> strain C5 (NR_117103)
CHP-315	<i>Gordonia</i> sp. CHP-315	ISS 623	JX429999	<i>Gordonia amicalis</i> strain IEGM (NR_028735)
CHP-A35	<i>Micrococcus</i> sp. CHP-A35	ISS 620	JX965396	<i>Micrococcus yunnanensis</i> strain YIM 65004 (NR_116578)
CHP-Y37	<i>Sphingobacterium</i> sp. CHP-Y37	ISS 624	JX965397	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain DSM 50071 (NR_117678)
CHP-YG38	<i>Cupriavidus</i> sp. CHP-YG38	ISS 625	JX965398	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain DSM 50071 (NR_117678)

Radi dobijanja uvida u međusobne odnose između izolovanih sojeva, urađena je filogenetska analiza sa sekvencama svih sojeva izolovanih i okarakterisanih u ovom radu. Filogenetsko stablo je konstruisano „neighbor-joining metodom” u programu Mega 5.01. (Slika 4.1).



Slika 4. 1. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu sekvenci sojeva izolovanih iz zemljišta zagađenog naftom. *E. coli* K12 predstavlja spoljašnju grupu

Mikroorganizmi mogu da koriste različita jedinjenja kao izvor ugljenika i energije (113). Kako bi se utvrdilo koji od izolovanih sojeva mogu da koriste AFD, prvo je ispitana mogućnost rasta svih šest sojeva na različitim izvorima ugljenika. Pošto je kontaminacija ugljovodonicima često praćena kontaminacijom teškim metalima (114,115), osim mogućnosti rasta na različitim aromatičnim ugljovodonicima ispitivana je i osetljivost svih sojeva na teške metale. Rezultati su prikazani u tabeli 4.2.

Tabela 4. 2. Rast na različitim izvorima ugljenika i osetljivost na teške metale

	<i>Oerskovia</i> sp. CHP-ZH25	<i>Rhodococcus</i> sp. CHP-NR31	<i>Gordonia</i> sp. CHP-315	<i>Micrococcus</i> sp. CHP-A35	<i>Sphingobacterium</i> sp. CHP-Y37	<i>Cupriavidus</i> sp. CHP-YG38
Rast na različitim izvorima ugljenika¹						
Fenol	+	+	+	-	+	-
Fenantren	+	+	-	-	+	-
3,4- dihidroksibenzoeva kiselina	-	-	-	-	-	-
4- hidroksibenzoeva kiselina	+	+	+	+	+	+
Natrijum-benzoat	-	+	-	-	+	-
Motorno ulje	+++	+++	+++	+	+	+
Dizel	+++	+++	++	+	+++	+
Osetljivost na teške metale²						
Cd	2.5	<1	10	2.5	10	10
Ni	50	>50	10	50	10	10
Cu	10	5	25	10	10	10
Zn	10	2.5	10	10	10	2.5
Cr	10	2.5	2.5	10	>10	5

¹Prisustvo i odsustvo rasta su obeleženi kao - i +. Za motorno ulje i dizel, intenzitet rasta je označen kao + (minimalni rast), ++ (srednji rast), +++ (najbolji rast)

²Osetljivost je izražena kao minimalna inhibitorna koncentracija (mmol/L)

Svi ispitivani sojevi su uspešno koristili 4-hidroksibenzoevu kiselinu, dizel i motorno ulje kao izvor ugljenika. Suprotno, nijedan soj nije mogao da koristi 3,4-dihidroksibenzoevu kiselinu. Među ispitivanim sojevima, *Sphingobacterium* sp. CHP-Y37, *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 i *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 su uspešno koristili najveći broj različitih aromatičnih ugljovodonika, posebno dizel i motorno ulje. Dodatno, u poređenju sa ostalima, *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 i *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 su pokazali dosta visoku rezistenciju na teške metale, posebno na nikl. Zbog pomenutih osobina, sojevi *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 i *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 su odabrani za dalje ispitivanje biodegradacije AFD.

4.1.1.1. *Oerskovia* sp. CHP-ZH25

Sekvenciranjem gena za 16s rRNA utvrđeno je da soj CHP-ZH25 pripada rodu *Oerskovia*. Ovaj rod pripada familiji *Cellulomonadaceae* i redu *Micrococcales*, klase *Actinobacteria* (116). Kako bi se detaljnije analizirale biohemijske karakteristike ovog soja, ispitivana je produkcija ekstracelularnih i respiratornih enzima Api Coryne testom. Pokazano je da soj CHP-ZH25 daje pozitivnu reakciju na oksidazu, katalazu, redukciju nitrata do nitrita, pirazimidazu, α -glukozidazu, β -galaktozidazu, ureazu, β -glukozidazu, hidrolizu želatina i fermentaciju glukoze, riboze, ksiloze, maltoze, laktoze, saharoze i glikogena. Negativne reakcije bile su na pirolidonil-arilamidazu, N-acetil- β -glukozidazu, alkalnu fosfatazu, β -glukuronidazu, pirazinamidazu i fermentaciju manitola. U poređenju sa DSM sojem 43852 tipske vrste *Oerskovia enterophila*, kojoj je ispitivani soj CHP-ZH25 najbliži, uočava se razlika u samo dve reakcije: pirazinamidazi i hidrolizi želatina.

Analiza metil estara masnih kiselina prikazana je u tabeli 4.3. Dominantne masne kiseline su *anteizo*-pentadekanska, *izo*-pentadekanska i *n*-heksadekanska, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (116). U odnosu na tipski soj *Oerskovia enterophila* DSM 43852, soj *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 ima veći procenat *izo*-pentadekanske, a manji *anteizo*-heptadekanske kiseline (117).

Tabela 4. 3. Sadržaj ćelijskih masnih kiselina soja *Oerskovia* sp CHP-ZH25, % od ukupno detektovanih. Masne kiseline su obeležene kao ukupan broj C-atoma: broj dvostrukih veza. Prefiksi *n*-, *i*-, *ai*- označavaju kiseline normalnog lanca, *izo*- i *anteizo*- račvanje.

Masne kiseline	Zastupljenost, %	Masne kiseline	Zastupljenost, %
<i>i</i> 14:0	0,62	<i>i</i> 16:0	3,27
<i>n</i> 14:0	4,49	<i>n</i> 16:0	10,6
<i>i</i> 15:0	10,24	<i>i</i> 17:0	5,48
<i>ai</i> 15:0	62,32	<i>ai</i> 17:0	0,21
<i>n</i> 15:0	1,65	<i>n</i> 17:0	1,13

4.1.1.2. *Rhodococcus* sp. CHP-NR31

Sekvenciranjem gena za 16s rRNA utvrđeno je da soj CHP-NR31 pripada rodu *Rhodococcus*. Ovaj rod je član porodice *Nocardiaceae* i reda *Corynebacteriales*, klase *Actinobacteria* (116). Detaljnija biohemijska karakterizacija ovog soja je rađena Api Zym i Api CH50 testovima. Soj CHP-NR31 je pokazao pozitivnu reakciju na esterazu C4, esterazu lipazu C8, lipazu C14, leucin i cistein arilamidazu, kiselu fosfatazu, α -galaktozidazu, β -galaktozidazu i α -glukozidazu. Negativne reakcije bile su na alkalnu fosfatazu, valin arilamidazu, tripsin, α -himotripsin, β -glukuronidazu, β -glukozidazu, N-acetil- β -glukozaminidazu, α -manozidazu i α -fukozidazu. Takođe, test je pokazao da soj može da asimiluje sledeća jedinjenja: glicerol, eritritol, D-arabinozu, L-arabinozu, ribozu, D-ksilozu, adonitol, metil-D-ksilopiranozid, galaktozu, glukozu, fruktozu, manozu, L-sorbozu, L-ramnozu, dulcitol, inozitol, manitol, sorbitol, metil-D-manopiranozid, metil-D-glukopiranozid, N-acetil-glukozamin, amigdalin, arbutin, salicin, celobiozu, maltozu, D-laktozu, melobiozu, saharozu, trehalozu, inulin, melezitozu, rafinozu, ksilitol i D-arabitol. Reakcije za asimilaciju eskulina, skroba, glikogena, genitiobioze, turanoze, liksoze, tagatoze, D-fukoze, L-fukoze, L-arabitol, glukonata, 2-ketoglukonata i 5-ketoglukonata su bile negativne. Od tipske vrste *Rhodococcus cerastii* C5, ispitivani soj se razlikovao po sposobnosti da asimiluje eskulin, odnosno po negativnoj reakciji na β -glukozidazu.

Rezultati analize metil estara masnih kiselina prikazani su u tabeli 4.4. Dominantne masne kiseline su *n*-heksadekanska, oktadecenske, *n*-tetradekanska i 10-metil-oktadekanska što je bilo u skladu sa prethodno opisanim sojevima ove

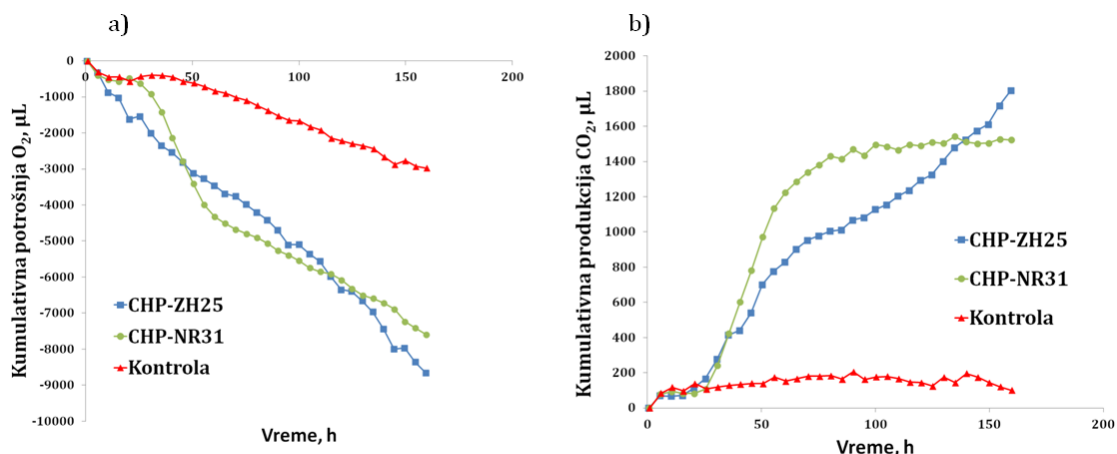
vrste (116,118). Soj CHP-NR31 se od tipske vrste *Rhodococcus cerastii* C5 kojoj je najbližiji, razlikovao po manjoj količini račvastih masnih kiselina izuzev 10-metil-oktadekanske kiseline (118).

Tabela 4. 4. Sadržaj ćelijskih masnih kiselina soja *Rhodococcus* sp CHP-NR31, % od ukupno detektovanih. Masne kiseline su obeležene kao ukupan broj C-atoma: broj dvostrukih veza. Prefiksi *n*-, *i*-, *ai*- označavaju kiseline normalnog lanca, *izo*- i *anteizo*- račvanje.

Masne kiseline	Zastupljenost, %	Masne kiseline	Zastupljenost, %
<i>n</i> 12:0	0,51	<i>n</i> 17:0	1,14
<i>n</i> 14:0	6,73	<i>cis</i> Δ ⁹ -18:1	7,58
<i>i</i> 15:0	1,34	<i>trans</i> -Δ ⁹ 18:1 i <i>cis</i> - Δ ⁹ 18:1	26,85
<i>n</i> 15:0	3,24	<i>n</i> 18:0	1,30
16:1	5,93	10-metil-18:0	6,33
<i>n</i> 16:0	39,07		

4.1.2. Test respiracije

Na osnovu ispitivanja rasta bakterija na različitim izvorima ugljenika i osetljivosti na teške metale, sojevi CHP-ZH25 i CHP-NR31 su odabrani za dalje eksperimente biodegradacije AFD. Kako bi se potvrdilo da odabrani sojevi mogu da koriste AFD, u ovom radu, upotrebom Micro Oxyman respirometra, praćena je potrošnja kiseonika i produkcija ugljen-dioksida kod sojeva *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 i *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 tokom sedam dana biodegradacije AFD. Dobijeni rezultati su obrađeni Micro Oxyman softverom, a potrošnja i produkcija gasova izražene su μL i opisane kao kumulativna potrošnja/produkcija. Rezultati su prikazani na slici 4.2.



Slika 4. 2. Kumulativna a) potrošnja kiseonika i b) produkcija ugljen-dioksida tokom 7 dana degradacije AFD sojevima *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 i *Rhodococcus* sp. CHP-NR31

Iz respirometrijskih rezultata uočava se da tokom prvih 20 h nema razlike između uzorka kontrole i uzorka inokulisanih bakterijama. Ovaj period odgovara fazi prilagođavanja mikroorganizma uslovima sistema. Nakon toga razlike u potrošnji kiseonika i produkciji ugljen-dioksida u odnosu na abiotičku kontrolu rastu, pri čemu je najveća razlika na kraju eksperimenta.

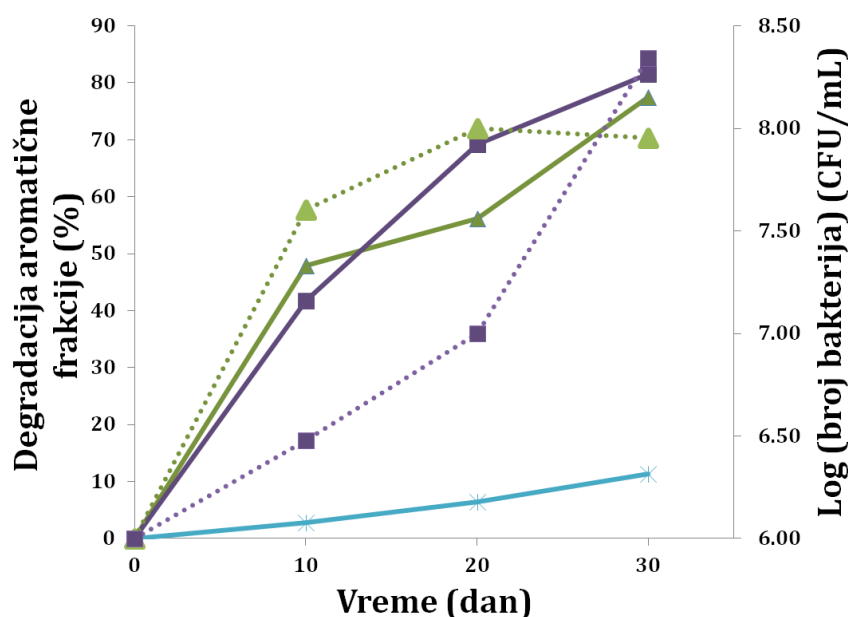
Velike razlike u potrošnji i produkciji gasova između kontrolnog i uzoraka inokulisanih bakterijama dovodi do zaključka da su metabolički procesi intenzivni u oba inokulisana uzorka, i da oba soja mogu da koriste AFD kao izvor ugljenika. Takođe, primetne su i razlike u produkciji ugljendioksida između inokulisanih uzoraka. Najizraženija razlika u produkciji ugljen-dioksida ispitivanih sojeva bila je između 60-120 h, pri čemu je produkcija od strane soja *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 bila izraženija i dostigla plato nakon 120 h (1510 μL). Međutim, produkcija gasa u uzorku sa *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 je i dalje nastavila da raste i nakon 159 h iznosila je 1802 μL. Razlike u potrošnji kiseonika između dva inokulisana uzorka nisu bile toliko izražene.

4.1.3. Analiza biodegradacije AFD sveobuhvatnom dvodimenzionalnom gasnom hromatografijom sa masenim spektrometrom visoke rezolucije GCxGC-(HR)TOFMS

Dizel gorivo u najvećoj meri čine zasićeni ugljovodonici, a pored njih prisutna su i aromatična jedinjenja kao što su naftaleni, alikil-benzeni i visokomolekulski PAH-ovi. Prisustvo PAH-ova predstavlja posebnu opasnost, pošto ova jedinjenja pripadaju grupi koja često ispoljava karcinogena, mutagena i toksična svojstva u životnoj sredini (4). Kako bi se ispitala mogućnost biodegradacije PAH-ova iz dizela, u okviru ovog rada aromatična frakcija je odvojena iz dizel goriva D2.

Aromatična frakcija (AFD) je u više ponavljanja odvojena iz dizel D2 goriva hromatografijom na koloni i uparena do konstantne mase. Dobijene mase su bile između 88,0 - 116,7 mg, što predstavlja 1,76 - 2,3 % od ukupne mase dizela. Elementalna analiza je pokazala da AFD sadrži 86,9 % ugljenika, 11,0 % vodonika, 0,4 % azota i 1,7 % sumpora. Sve dobijene frakcije su spojene u jedan, kompozitni uzorak koji je korišćen za dalje eksperimente.

Potencijal sojeva *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 i *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 da degraduju AFD je određen gravimetrijski nakon 10, 20 i 30 dana. Rezultati gravimetrije izraženi kao procenat degradacije AFD u abiotičkoj kontroli kao i u inokulisanom uzorku prikazani su na slici 4.3 zajedno sa brojem mikroorganizama posle 10, 20 i 30 dana. Prosečna brzina degradacije izračunata iz gravimetrijskih rezultata, iznosila je 14,4 mg/L/dan (od 0-10 dana), 10,5 mg/L/dan (10-20 dan) i 4,0 mg/L/dan (20-30 dan) u uzorku inokulisanom sojem *Oerskovia* sp. CHP-ZH25. Kod uzorka inokulisanog sojem *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 prosečne brzine degradacije bile su 12,5 mg/L/dan (od 0-10 dana), 10,8 mg/L/dan (10-20 dan) i 4,2 mg/L/dan (20-30 dan). Gubitak u abiotičkoj kontroli do kog dolazi usled nepotpune ekstrakcije nije bio veliki i u saglasnosti je sa dosadašnjim rezultatima sličnih eksperimenata (119,120).

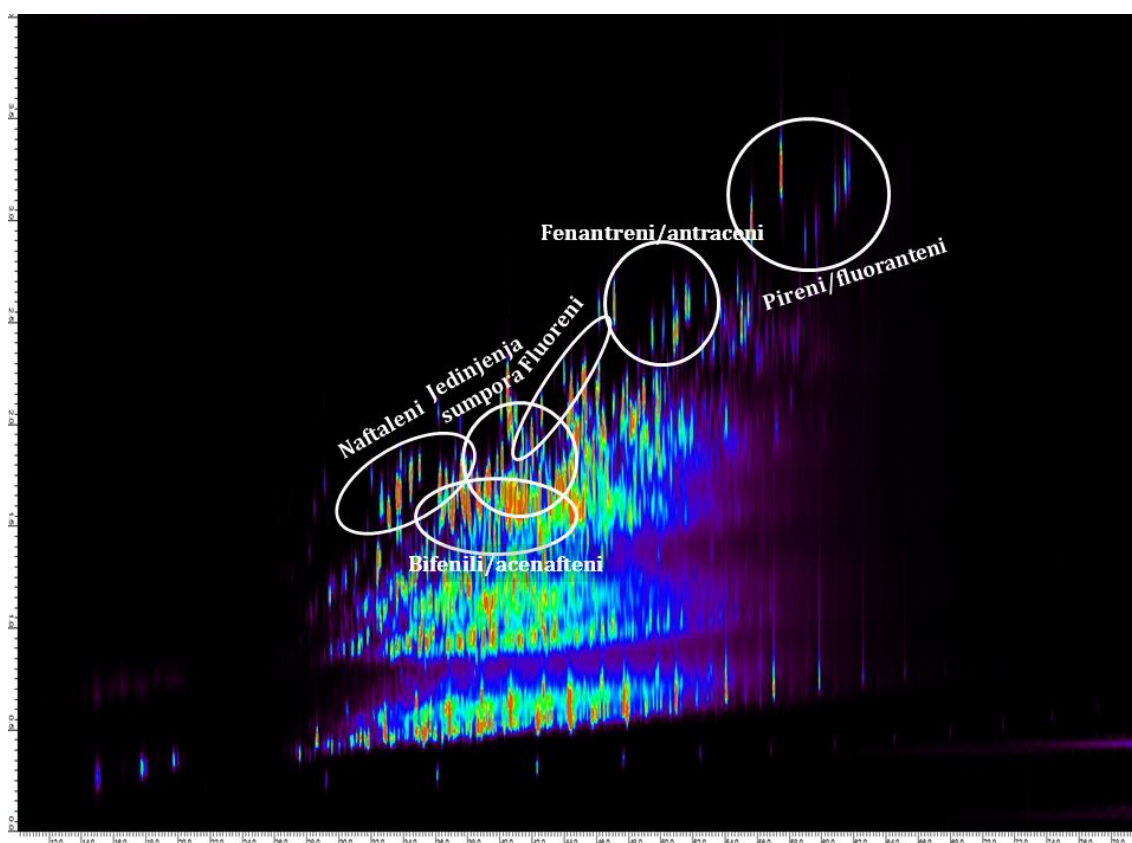


Slika 4. 3. Broj mikroorganizama i procenat degradacije AFD tokom 30 dana degradacije. Kvadrati, trouglovi i zvezdice na punim linijama označavaju procenat degradacije u uzorku inokulisanom sojem *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 (ljubičasto), *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 (zeleno) i abiotičkom kontrolom (plavo) redom. Iste oznake na isprekidanoj liniji predstavljaju broj mikroorganizama. Svi rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja

Brojne studije su pokazale da su konzorcijumi mikroorganizama efikasniji u degradaciji u poređenju sa čistim kulturama, posebno kada su u pitanju kompleksne smeše zagađujućih supstanci (121–123). Međutim, za uspešnu selekciju vrsta koje će se koristiti u procesima bioaugmentacije, neophodno je ispitati degradacione sposobnosti pojedinačnih vrsta. Većina ispitivanja degradacije različitih PAH-ova je rađena koristeći pripadnike klase *Actinobacteria*, kao što su *Rhodococcus*, *Micrococcus* i *Mycobacteria* (121,124–126). Odavno je poznato da rod *Rhodococcus* odlikuje ogromna katabolička raznovrstnost i prisustvo brojnih enzima, koji omogućavaju degradaciju različitih organskih i perzistentnih zagađujućih supstanci među kojima su i PAH-ovi (127). Nedavno je potvrđeno da soj *Oerskovia* sp. može da koristi različite PAH-ove kao jedini izvor ugljenika (128), međutim nema podataka o tome da li ovaj soj može da degraduje smeše PAH-ova.

Kako bi se ispitala degradacija aromatične frakcije dizela, uzorci nakon degradacije su ekstrahovani heksanom, upareni do suva, prečišćeni na koloni sa anhidrovanim natrijum-sulfatom i Florisil-om, pa potom analizirani pomoću GCxGC-(HR)TOFMS.

Na slici 4.4 prikazan je dvodimenzionalni ukupni jonski hromatogram (2D TIC, total ion chromatogram) nakon 30 dana inkubacije abiotičke kontrole, odnosno uzorka AFD koji nije bio inokulisan bakterijama. Sa hromatograma se vidi da su u abiotičkoj kontroli prisutne različite klase jedinjenja u ovom uzorku: naftaleni, acenafteni/bifenili, acenaftileni, fluoreni, fenantreni/antraceni, benzo[*b*]tiofeni i dibenzotiofeni.



Slika 4. 4. GC x GC- (HR)TOFMS hromatogram abiotičke kontrole aromatične frakcije dizela nakon 30 dana inkubacije

Kako bi se detaljnije ispitala jedinjenja koja *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 i *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 degraduju, analizirane su promene u masenim spektrima tokom degradacije. Svi hromatogrami su prvo obrađeni u softeru GCImage, na

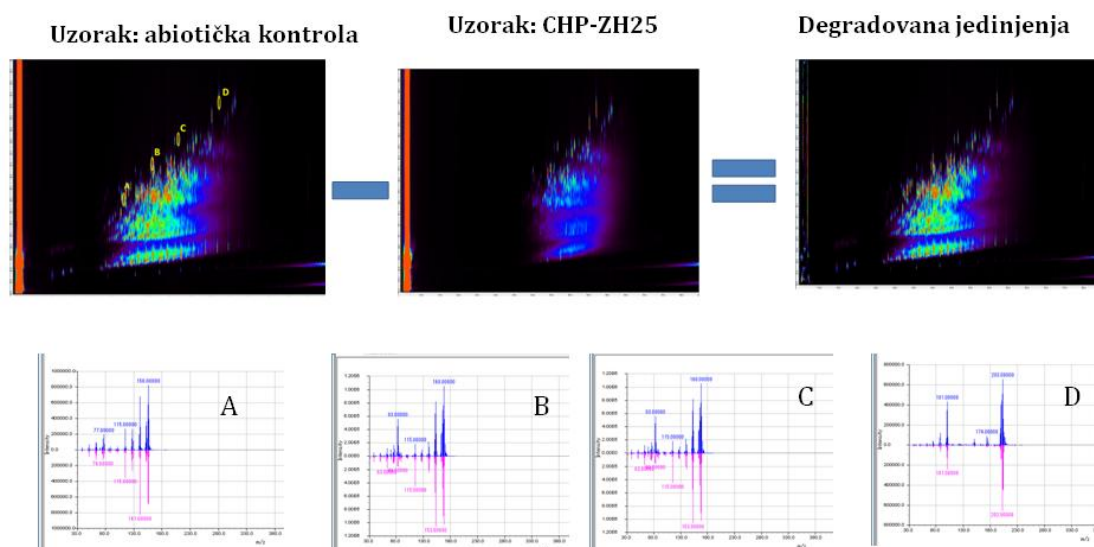
sledeći način:

- 1) automatski je ispravljena bazna linija,
- 2) podešen je intenzitet boje tako da bude jednak kod svih (korišćena konfiguracija: RGB Rainbow, parametric: min 0, max 3000000),
- 3) automatski su detektovane tačke na hromatogramu (parametri integracije: minimalna površina 15, minimalna zapremina 0, minimalna visina pika 10),
- 4) sve detektovane tačke su upoređene sa NIST 17 bibliotekom masenih spektara.

Nakon ovakve obrade u GCImage softveru, u uzorku abiotičke kontrole pronađeno je 1624 tačke, u uzorku sa CHP-ZH25 1326 tačaka, a u uzorku CHP-NR31 1062 tačke.

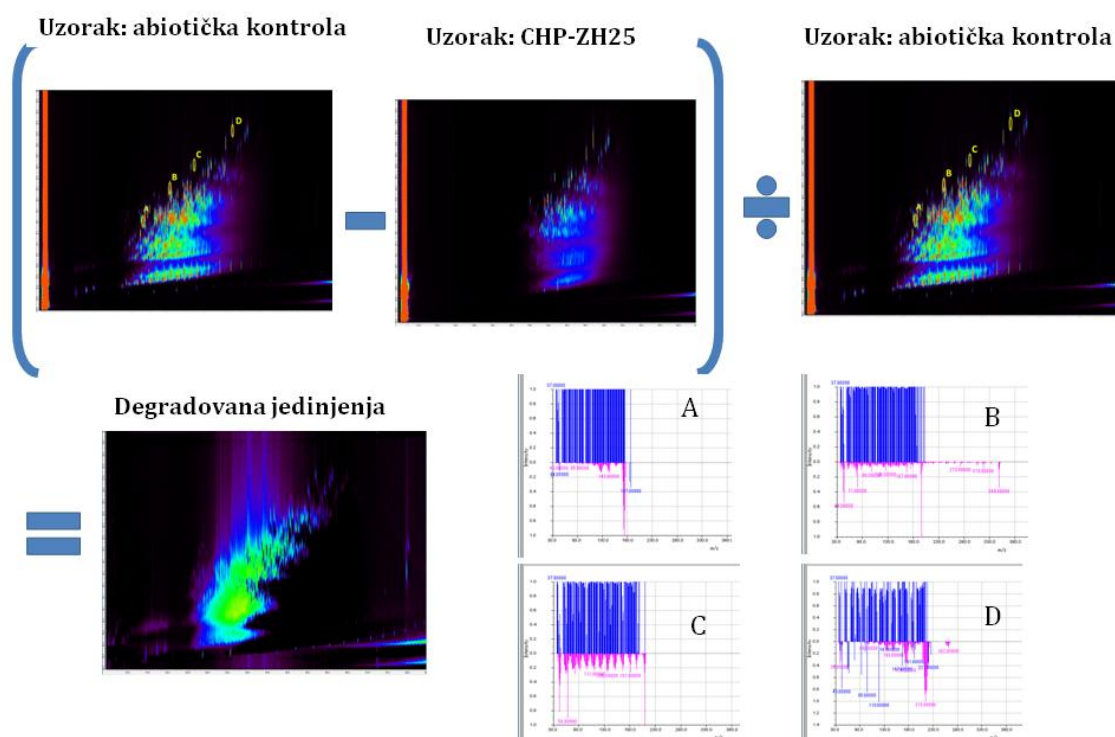
Za poređenje podataka dobijenih GCxGC-(HR)TOFMS korišćene su tri metode obrade hromatograma.

U prvoj metodi, radi poređenja uzorka abiotičke kontrole sa inokulisanim uzorcima, od hromatograma abiotičke kontrole su oduzeti hromatogrami uzoraka inokulisanih bakterijama. Četiri tačke (A, B, C, D) su odabrane kako bi se koristile kao markeri, pošto uzorci nisu sadržali interni standard. Međutim, oduzimanjem ova dva hromatograma dolazi do preuveličavanja intenziteta tačaka degradovanih jedinjenja kao i do delimične promene u masenim spektrima četiri jedinjenja odabrana za poređenje (slika 4.5).



Slika 4. 5. Metod I za vizuelizaciju degradovanih jedinjenja, kao i maseni spektri jedinjenja A, B,C i D nakon primene metode I

Kako bi se vizuelizovala degradovana jedinjenja, ali i izbeglo precenjivanje intenziteta tačaka, korišćena je metoda II (slika 4.6). U ovom slučaju ponovo je od uzorka abiotičke kontrole oduzet hromatogram inokulisanog uzorka, ali je potom ova razlika podeljena hromatogramom abiotičke kontrole. Međutim, usled karakteristika instrumenta, došlo je do fluktuacije intenziteta i preciznih masa spektara pri svakom merenju, što je dovelo do stvaranja artificalnih masenih spektara koji ne postoje u stvarnosti.



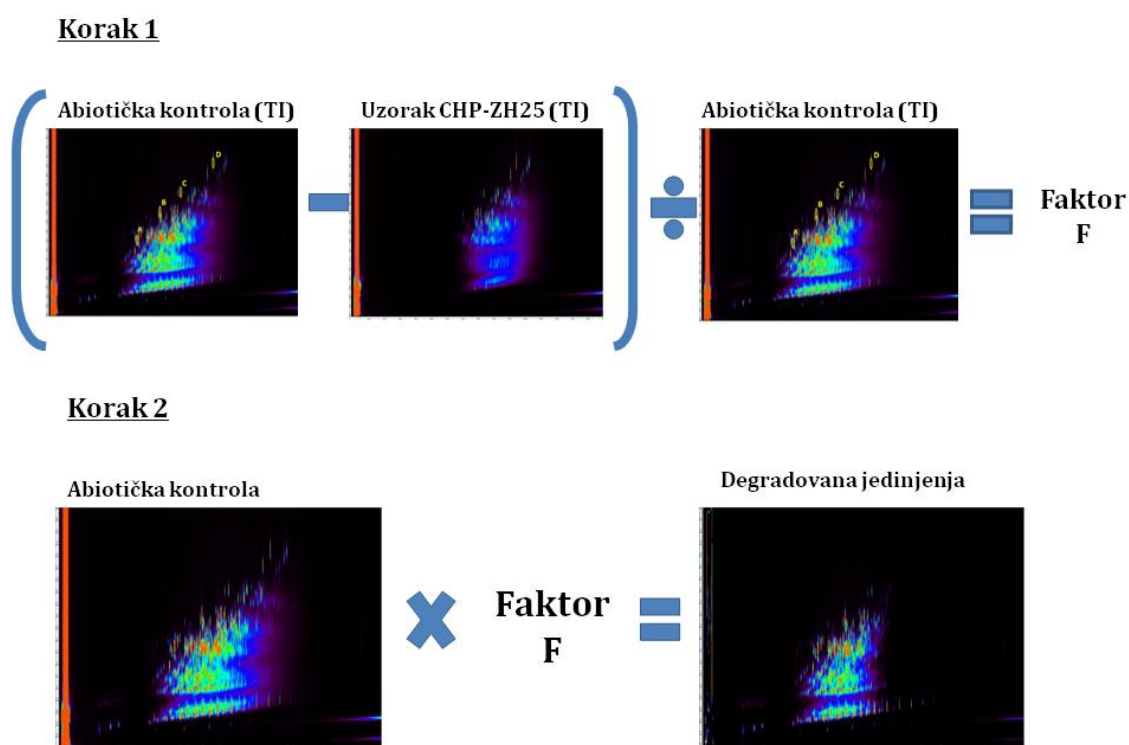
Slika 4. 6. Metod II za vizuelizaciju degradovanih jedinjenja i maseni spektri jedinjenja A, B, C i D nakon primene metode II

Na kraju, trećom metodom za vizuelizaciju (slika 4.7) prvo je izračunat faktor koji predstavlja promenu svakog jedinjenja, odnosno svake tačke na hromatogramu. Ovaj faktor dobija se kada se razlika hromatograma abiotičke kontrole i inokulisanog uzorka podeli abiotičkom kontrolom. Za razliku od metode II, u ovom slučaju su umesto hromatograma koji sadrže podatke o masenim spektrima, korišćeni „total intensity (TI)” hromatogrami. TI hromatogrami se dobijaju tako što se sirovi hromatogrami sačuvaju kao fajlovi sa .csv ekstenzijom i potom otvore i sačuvaju sa ekstenzijom koju imaju klasični hromatogrami (.gci). Upotrebom TI hromatograma sprečava se stvaranje lažnih masenih spektara koji nastaju usled aritmetičkih operacija sa hromatogramima koji sadrže podatke o masenim spektrima. Računanje ovog faktora može da se predstavi i sledećom jednačinom:

$$F(i) = \frac{(T_{AC}(i) - T_{mo}(i))}{T_{AC}(i)} \quad (4.1)$$

gde su $T_{AC}(i)$ i $T_{mo}(i)$ ukupni intenziteti svakog jedinjenja tj. tačke (i) abiotičke kontrole i uzorka inokulisanog bakterijama nakon 30 dana degradacije.

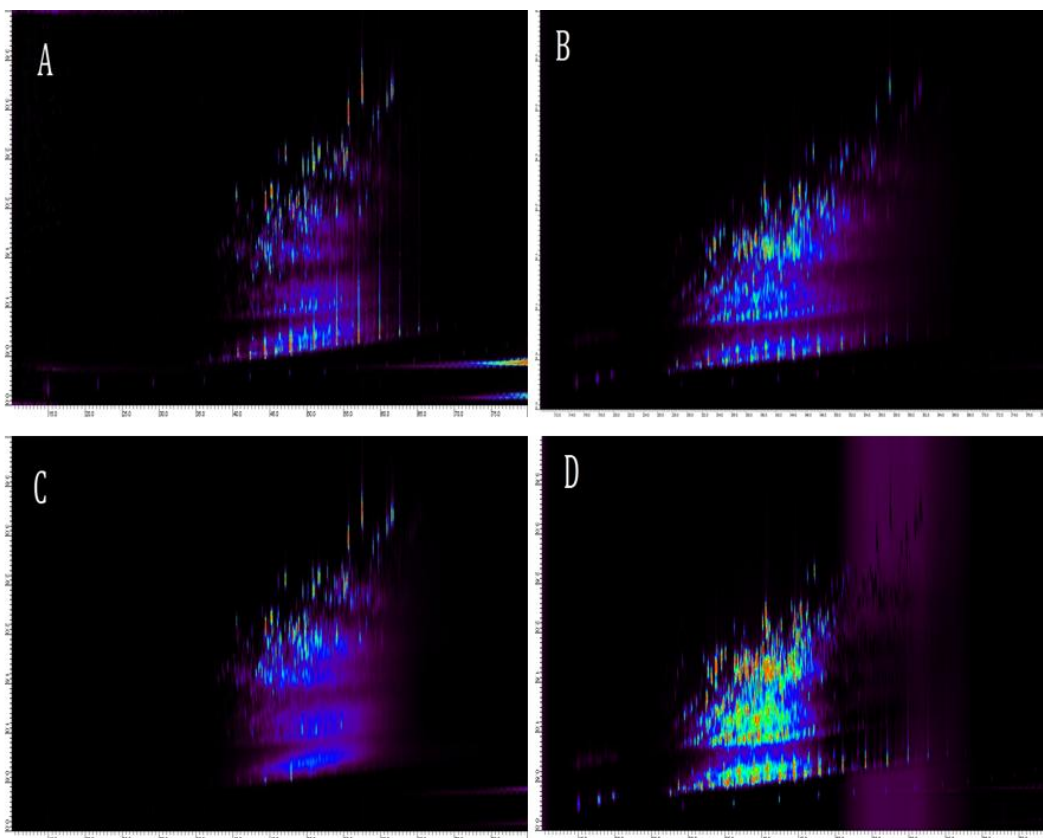
Računanjem faktora dobijaju se hromatogrami koji prikazuju degradovana jedinjenja i njihove intenzitete. Kako bi se identifikovala degradovana jedinjenja, tj. analizirale i promene svih masenih spektara, faktor $F(i)$ je pomnožen sa svakom tačkom (tj. svakim jedinjenjem) u hromatogramu abiotičke kontrole koji sadrži informacije o masenim spektrima (slika 4.7).



Slika 4. 7. Metod III za vizuelizaciju degradovanih jedinjenja

Korišćenjem treće metode omogućava se vizuelizacija jedinjenja koja su degradovana umesto onih koja su preostala u uzorku nakon degradacije, uz mogućnost analize intenziteta i masenih spektara svake tačke na hromatogramu.

Rezultati ovog pristupa su prikazani na slici 4.8 gde se vide hromatogrami uzoraka nakon 30 dana inkubacije inokulisanih sojevima CHP-NR31 i CHP-ZH25 i hromatogrami ovih uzoraka dobijeni upotrebom metode III.



Slika 4. 8. Poređenje hromatograma uzoraka dobijenih nakon 30 dana inkubacije A) *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 i C) *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 sa hromatogramima jedinjenja koja degraduju sojevi B) CHP-NR31 i D) CHP-ZH25 dobijenim korišćenjem metode III za vizuelizaciju

Sa slike 4.8 A-D se vidi da nakon 30 dana inkubacije uzoraka inokulisanih i CHP-ZH25 i CHP-NR31 dolazi do promene u broju aromatičnih jedinjenja koja su vidljiva na hromatogramu u odnosu na uzorak abiotičke kontrole. Takođe, primećuje se da dolazi i do degradacije alifatičnih alkana, koji su u uzorku AFD prisutni zbog nepotpunog odvajanja aromatične frakcije od preostalih komponenti dizela D2. Jedinjenja koja izlaze sa kolone do četrdesetog minuta su primetno manje zastupljena na hromatogramima u poređenju sa kontrolom. Dobijeni

rezultati su očekivani s obzirom na to da su ova jedinjenja podložnija mikrobnj degradaciji (129,130).

Kako bi se ispitala degradacija različitih klasa aromatičnih jedinjenja kreirani su selektivni jonski hromatogrami (SIC) koristeći $\pm 0,1$ teorijske mase (Tabela 4.5).

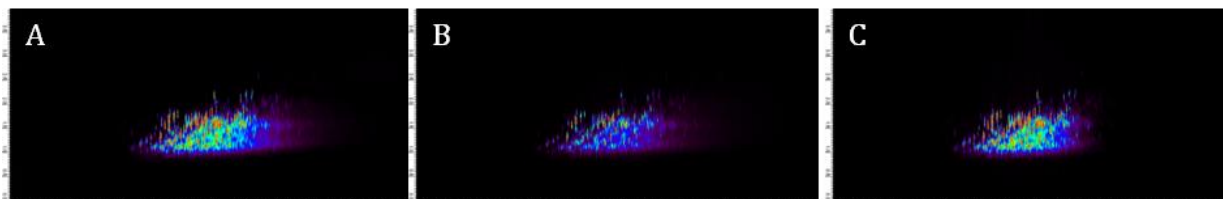
Tabela 4. 5. Aromatična jedinjenja odabrana za detaljniju analizu i njihove mase

Jedinjenje	Broj metil grupa	Formula	Nominalna masa	Tačna masa
Naftaleni	0	C10H8	128	128,0626
	1	C11H10	142	142,0782
	2	C12H12	156	156,0939
	3	C13H14	170	170,1095
	4	C14H16	184	184,1252
	5	C15H18	198	198,1408
	6	C16H20	212	212,1565
	7	C17H22	226	226,1722
	8	C18H24	240	240,1878
Acenafteni/bifenili	0	C12H10	154	154,0782
	1	C13H12	168	168,0939
	2	C14H14	182	182,1095
	3	C15H16	196	196,1252
	4	C16H18	210	210,1408
	5	C17H20	224	224,1565
	6	C18H22	238	238,1721
	7	C19H24	252	252,1878
	8	C20H26	266	266,2034
	9	C21H28	280	280,2191
	10	C22H30	294	294,2348
Fenantreni/Antraceni	0	C14H10	178	178,0782
	1	C15H12	192	192,0939
	2	C16H14	206	206,1095
	3	C17H16	220	220,1252
	4	C18H18	234	234,1409
	5	C19H20	248	248,1565
	6	C20H22	262	262,1722
	7	C21H24	276	276,1878
	8	C22H26	290	290,2034
	9	C23H28	304	304,2191
	10	C24H30	318	318,2348
Acenaftileni	0	C12H8	152	152,0626
	1	C13H10	166	166,0782
	2	C14H12	180	180,0939
	3	C15H14	194	194,1095
	4	C16H16	208	208,1252
	5	C17H18	222	222,1409
	6	C18H20	236	236,1565
	7	C19H22	250	250,1721
	8	C20H24	264	264,1878

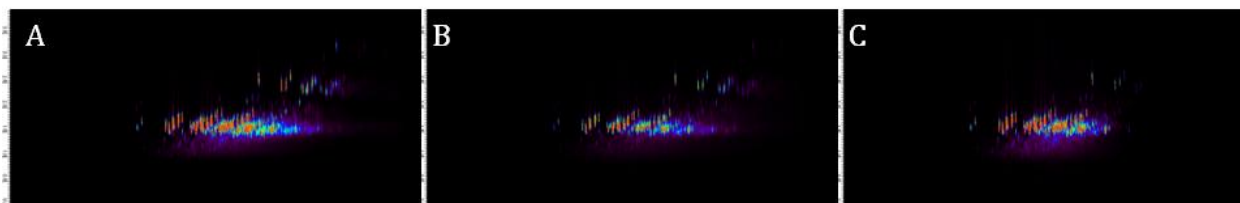
Jedinjenje	Broj metil grupa	Formula	Nominalna masa	Tačna masa
Fluoreni	0	C13H10	166	166,0782
	1	C14H12	180	180,0939
	2	C15H14	194	194,1095
	3	C16H16	208	208,1252
	4	C17H18	222	222,1409
	5	C18H20	236	236,1565
	6	C19H22	250	250,1722
	7	C20H24	264	264,1878
	8	C21H26	278	278,2035
	9	C22H28	292	292,2191
Benzo[b]tiofeni	10	C23H30	306	306,2348
	0	C8H6S	134	134,0190
	1	C9H8S	148	148,0347
	2	C10H10S	162	162,0503
	3	C11H12S	176	176,0660
	4	C12H14S	190	190,0816
	5	C13H16S	204	204,0973
Dibenzotiofeni	6	C14H18S	218	218,1129
	0	C12H8S	184	184,0347
	1	C13H10S	198	198,0503
	2	C14H12S	212	212,0660
	3	C15H14S	226	226,0816
	4	C16H16S	240	240,0973
	5	C17H18S	254	254,1129
	6	C18H20S	268	268,1286
	7	C19H22S	282	282,1442
8	C20H24S	296	296,1599	

Za detaljniju analizu odabrane su sledeće klase jedinjenja: naftaleni, acenaftileni, acenafteni/bifenili, fluoreni, fenantreni/antraceni, benzo[b]tiofen i dibenzotiofeni. Ova jedinjenja su odabrana zbog relativno velike zastupljenosti u uzorku aromatične frakcije dizela, kao i zbog svog štetnog uticaja na životnu sredinu i ljude.

Dvodimenzionalni selektivni jonski hromatogrami (SIC) koji predstavljaju degradaciju različitih klasa jedinjenja prikazani su na slikama 4.9-4.22.



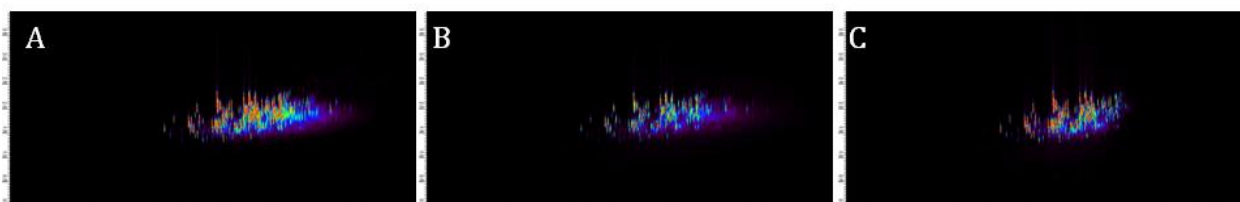
Slika 4. 9. Selektivni jonski hromatogram za m/z 128,0626 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



Slika 4. 10. Selektivni jonski hromatogram za m/z 142,0783; 156,0939; 170,1096; 184,1252; 198,1409; 212,1565; 226,1722; 240,1878 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



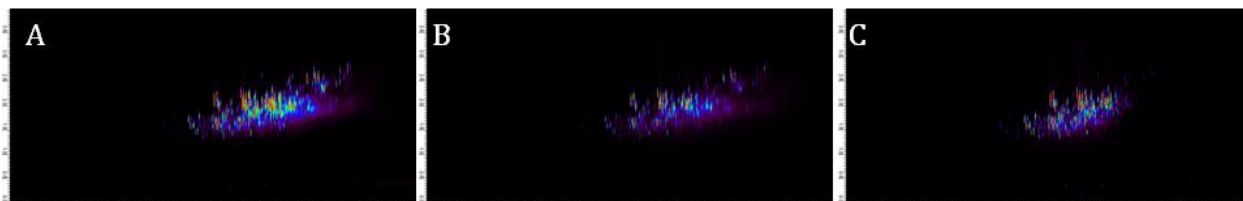
Slika 4. 11. Selektivni jonski hromatogram za m/z 154,0783 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



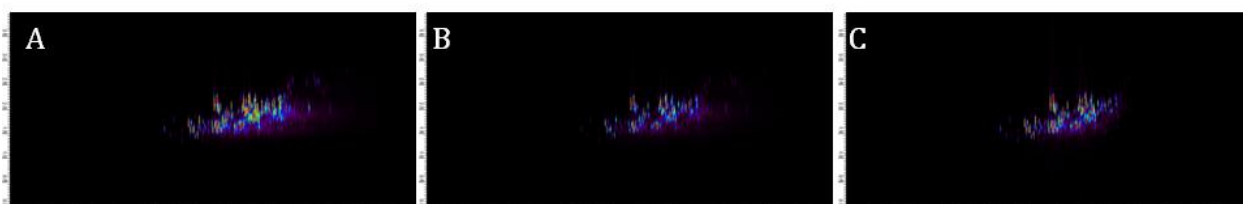
Slika 4. 12. Selektivni jonski hromatogram za m/z 168,0939; 182,1096; 196,1252; 210,1409; 224,1565; 238,1722; 252,1878; 266,2035; 280,2192; 294,2349 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



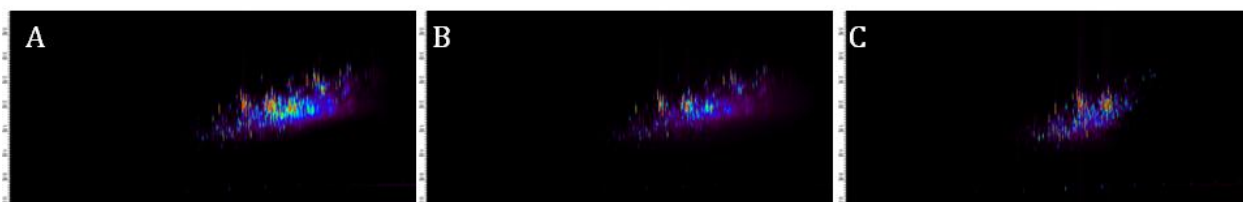
Slika 4. 13. Selektivni jonski hromatogram za m/z 152,0626 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



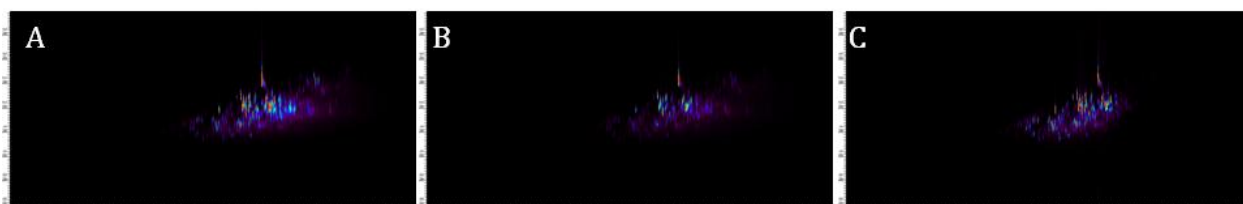
Slika 4. 14. Selektivni jonski hromatogram za m/z 166,0783; 180,0939; 194,1096; 208,1252; 222,1409; 236,1565; 250,1722; 264,1878 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



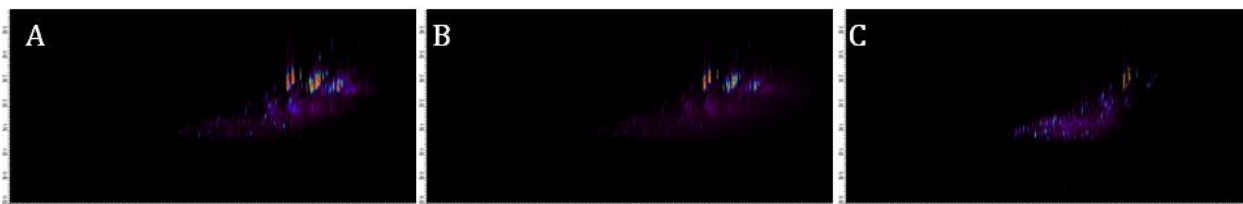
Slika 4. 15. Selektivni jonski hromatogram za m/z 166,0783 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



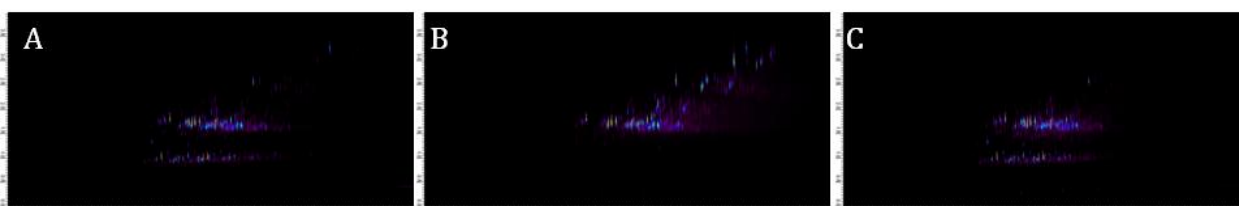
Slika 4. 16. Selektivni jonski hromatogram za m/z 180,0939; 194,1096; 208,1252; 222,1409; 236,1565; 250,1722; 264,1878; 278,2035; 292,2192; 306,2349 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



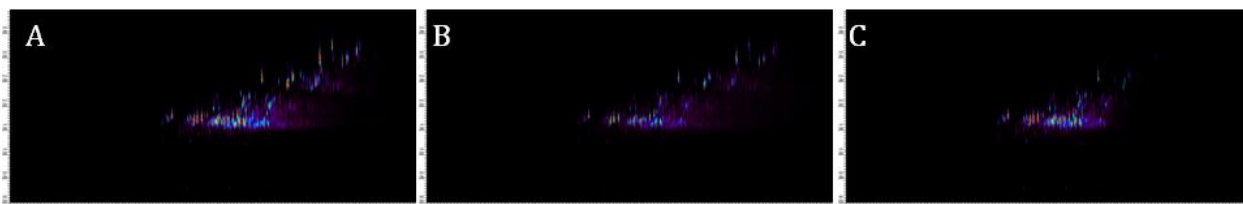
Slika 4. 17. Selektivni jonski hromatogram za m/z 178,0783 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



Slika 4. 18. Selektivni jonski hromatogram za m/z 192,0939; 206,1096; 220,1252; 234,1409; 248,1565; 262,1722; 276,1878; 290,2035; 304,2191; 318,2349 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



Slika 4. 19. Selektivni jonski hromatogram za m/z 134,0190 nakon 30 dana A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



Slika 4. 20. Selektivni jonski hromatogram za m/z 148,0347; 162,0503; 176,0660; 190,0816; 204,0973; 218,1129 nakon 30 dana A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



Slika 4. 21. Selektivni jonski hromatogram za m/z 184,0347 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja



Slika 4. 22. Selektivni jonski hromatogram za m/z 198,0503; 212,066; 226,0816; 240,0973; 254,1129; 268,1286; 282,1442; 296,1599 nakon 30 dana (A) Abiotička kontrola; (B) CHP-ZH25 degradovana jedinjenja; (C) CHP-NR31 degradovana jedinjenja

Na osnovu dobijenih hromatograma jasno je da su više degradovana jedinjenja nižih molekulskih masa. Relativni procenat degradacije odabranih PAH-ova dobijen na osnovu smanjenja ukupne zapremine svake tačke prikazan je u tabeli 4.6.

Kod soja *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 redosled degradacije je sledeći: derivati dibenzotiofena > derivati benzo[*b*]tiofena > derivati naftalena > derivati acenaftena/bifenila > derivati acenaftilena > alkil naftaleni > derivati fluorena > alkil acenafteni/alkil bifenili > alkil benzo[*b*]tiofeni > alkil dibenzotiofeni > derivati fenantrena/antracena > alkil acenaftileni > alkil fluoreni > alkil fenantreni/antraceni.

Redosled degradacije kod soja *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 je sledeći: derivati naftalena > derivati acenaftena/bifenila > derivati acenaftilena > derivati benzo[*b*]tiofena > alkil naftaleni > derivati dibenzotiofena > derivati fluorena > alkil acenafteni/alkil bifenili > alkil benzo[*b*]tiofeni > alkil dibenzotiofeni > derivati fenantrena/antracena > alkil acenaftileni > alkil fenantreni/antraceni > alkil fluoreni.

Tabela 4. 6. Procenti degradacije odabranih PAH jedinjenja dobijeni na osnovu vrednosti ukupne zapremine pikova

PAH derivati	Zapremina pikova			Procenat degradacije (%)	
	Abiotička kontrola	Test sa sojem CHP-ZH25	Test sa sojem CHP-NR31	Test sa sojem CHP-ZH25	Test sa sojem CHP-NR31
Ukupni jonski hromatogram	26826654956	13292252155	18786706466	50,40	29,97
Derivati naftalena	347895815	108714773	84295156	68,80	75,80
Alkil- naftaleni	781660154	349919820	306488946	55,20	60,80
Derivati acenaftilena	281387830	119977763	103356094	57,40	63,20
Alkil-acenaftileni	599884088	485650151	466628333	19,00	22,20
Derivati acenaftena/bifenila	129873835	45544167	38091996	64,90	70,70
Alkil-acenafteni/ alkil-bifenili	849874364	552383524	531086490	35,00	37,50
Derivati fluorena	212986435	113697899	108952723	46,60	48,80
Alkil-fluoreni	393500004	372191256	369461694	5,40	6,10
Derivati fenantrena/antracena	213028732	164704559	158509214	22,70	25,60
Alkil-fenantreni/alkil-antraceni	197588730	196675322	176485722	0,50	10,70
Derivati benzo[b]tiofena	8201017	2242315	3130328	72,70	61,80
Alkil- benzo[b]tiofeni	275631217	193953150	180510884	29,60	34,50
Derivati dibenzotiofena	3825050	82068	1795478	97,90	53,10
Alkil-dibenzotiofeni	71739479	55039479	53352651	23,30	25,60

Na osnovu dobijenih rezultata, vidi se da *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 u najvećoj meri degraduje derivate dibenzotiofena (m/z 184,0347; 97,9 %) i benzo[*b*]tiofena (m/z 134,0190; 72,7 %) koji su skoro potpuno degradovani, a najslabije alkil fenantrene/antracene (0,5%). *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 u najvećoj meri degraduje derivate naftalena (m/z 128,0626; 75,8 %) i acenaftena/bifenila (m/z 154,07825; 63,2 %), a u najmanjoj meri alkil fluorene (6,1 %). Poznato je da su PAH-ovi niže molekulske mase bolji izvor ugljenika za mikroorganizme (130–132). Visokomolekulski PAH-ovi se degraduju tek nakon što se oni sa manjim masa potroše ili ko-metabolizuju sa drugim supstratima (133,134). Degradacija alkilovanih PAH-ova je zavisila od stepena alkilovanja, pri čemu su jedinjenja sa visokim stepenom alkilacije slabo degradovana (131). Međutim, ponekad prisustvo fenantrena inhibira degradaciju pirena, a fluoranten inhibira degradaciju antracena i pirena (135,136).

Veoma je interesantno da oba soja mogu da degraduju dibenzotiofen i benzo[*b*]tiofen, pri čemu je *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 značajno efikasnija u ovom procesu. Ovi sojevi pripadaju klasi *Actinobacteria*, a ranije je pokazano da neki pripadnici ove klase mogu da ukone sumpor iz dibenzotiofena (137). Iz ovoga sledi da, osim što mogu da koriste PAH kao jedini izvor ugljenika, pomenuti sojevi mogu da koriste i PAH jedinjenja koja imaju heteroatom.

4.2. Biodegradacija komine grožđa

Među mikroorganizmima koji se koriste za revalorizaciju organskog otpada, gljive imaju posebno važnu ulogu zbog sposobnosti da degraduju teško razgradive biljne polimere i druga toksična jedinjenja, kao i da recikliraju azot (138,139). Komina je otpadni materijal koji nastaje u procesu proizvodnje vina. Sastav komine može da varira, a zavisi od načina gajenja i sorte grožđa kao i procesa proizvodnje vina. Dominantna komponenta komine su lignocelulozna vlakna (43-75 %), zbog čega je ovaj materijal slabo degradabilan (22). Od značaja je i prisustvo fenolnih jedinjenja koja, iako imaju potencijalno značajnu industrijsku primenu, doprinose toksičnosti komine (30). U okviru ovog rada, šest gljiva, među kojima su gljive bele i braon truleži, inokulisane su na PTK, kako bi se ispitaio uticaj kombinovanog termalnog i biološkog tretmana na sastav komine grožđa.

4.2.1. Fizičko-hemijska svojstva parom tretirane komine grožđa

Ispitivana su različita fizičko-hemijska svojstva neinokulisane PTK (nPTK₀), neinokulisane PTK nakon 90 dana inkubacije (nPTK₉₀) i PTK inokulisane gljivama nakon 90 dana inkubacije, kao i odgovarajućih VRF. Rezultati su prikazani u tabeli 4.7.

Tabela 4. 7. Parom tretirana komina (PTK) grožđa inokulisana mikroorganizmima i neinokulisana PTK nakon 90 dana inkubacije: gubitak mase i fizičko-hemijske osobine njihovih VRF¹

	PTK gubitak mase (%)	pH	NH ₄ ⁺ -N (mg/100 mL)	Fenoli (mg/100 mL)	TRSC (mM)	Abs. 395 nm
nPTK ₀	nd	3,55 ± 0,02	4,09 ± 0,1	12,62 ± 0,96	0,96 ± 0,05	0,27 ± 0,02
nPTK ₉₀	nd	3,63 ± 0,05 ^e	6,97 ± 0,40 ^d	11,91 ± 0,40 ^b	0,95 ± 0,02 ^b	0,15 ± 0,02 ^c
LPSC 232	18,04 ± 2,84 ^d	4,87 ± 0,12 ^b	15,24 ± 1,01 ^a	2,56 ± 0,54 ^e	0,58 ± 0,06 ^d	0,22 ± 0,04 ^{bc}
LPSC 285	20,03 ± 1,57 ^{cd}	4,01 ± 0,02 ^d	14,23 ± 1,39 ^a	1,04 ± 0,06 ^f	0,38 ± 0,03 ^e	0,15 ± 0,01 ^c
LPSC 163	21,75 ± 1,32 ^c	4,17 ± 0,12 ^{cd}	15,10 ± 1,50 ^a	4,30 ± 0,81 ^d	1,08 ± 0,03 ^a	0,17 ± 0,01 ^c
LPSC 735	25,63 ± 2,83 ^b	4,37 ± 0,07 ^c	12,34 ± 1,77 ^b	13,44 ± 1,01 ^a	1,09 ± 0,10 ^a	0,47 ± 0,06 ^b
FALH 18	22,42 ± 1,93 ^c	4,25 ± 0,49 ^{cd}	9,44 ± 0,96 ^c	6,93 ± 0,75 ^c	0,75 ± 0,03 ^c	0,19 ± 0,03 ^{bc}
LPSC 813	32,05 ± 1,72 ^a	8,41 ± 0,09 ^a	2,76 ± 0,75 ^e	7,77 ± 0,10 ^c	0,90 ± 0,10 ^b	1,67 ± 0,52 ^a

¹Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost i standardne devijacije tri ponavljanja, između podataka obeleženih različitim slovom (a-f) postoji statistički značajna razlika (Tukey test, p < 0,05), nd-nije određivano

Između VRF uzoraka nPTK₀ i nPTK₉₀ primetne su manje razlike u sadržaju amonijačnog azota i fenola, ostale vrednosti su slične, što ukazuje da se PTK nije previše izmenila tokom inkubacije.

Rezultati iz tabele 4.7 ukazuju da je svih šest inokulisanih gljiva moglo da raste na PTK. Pošto su mogle da koriste PTK kao jedini izvor energije, došlo je do smanjenja mase kao i promene u fizičko-hemijskim osobinama. Najveći gubitak mase bio je u uzorku inokulisanom sojem *U. botrytis* (32 % nakon 90 dana). Kod ostalih sojeva gubitak mase je bio između 18 i 26 %, ali nisu sve promene bile statistički značajne. Najmanji gubitak mase bio je u uzorku inokulisanom sojem *C. rigida* LPSC 232. Sojevi koji pripadaju gljivama bele i braon truleži *C. rigida*, *Pe. albobadia*, *Py. sanguineus* i *G. sepiarium* poseduju različite lignolitičke enzime (43),

pa bi bilo očekivano da upravo ovi sojevi pokažu najveći procenat degradacije komine, što nije bio slučaj. *U. botrytis* LPSC 813 ima veoma slabu lignolitičku aktivnost (95), što ukazuje da postoji dodatni mehanizam kolonizacije komine, što bi objasnilo najveći procenat degradacije PTK u odnosu na sve druge ispitivane sojeve.

Sadržaj redukovanih šećera (TRSC) je smanjen kod uzoraka inokulisanih sojevima *Pe. albobadia*, *C. rigida*, *U. botrytis* LPSC 813 i *T. harzianum* FALH 18, a povećan kod *G. sepiarium* LPSC 735 i *Py. sanguineus* LPSC 163. Varijacije u sadržaju šećera u VRF mogu da budu posledica odnosa između aktivnosti depolimerizacionih enzima i sposobnosti gljiva da apsorbuju nastale rastvorne šećere.

Sadržaj fenola je smanjen u svim uzorcima u poređenju sa kontrolom, osim u uzorku inokulisanom *G. sepiarium*. Najveće smanjenje u sadržaju fenola je kod uzorka sa *Pe. albobadia* LPSC 285.

Sadržaj obojenih supstanci je sličan u svim uzorcima osim u uzorku inokulisanom sa *U. botrytis* LPSC 813 gde je došlo do povećanja u poređenju sa nPTK₉₀. Intenzitet boje u ovom uzorku je značajno veći, što može da bude posledica fungalne transformacije monoaromata i fenolnih jedinjenja kojima je komina bogata, a od kojih nastaju pigmenti hromofore (140).

Sadržaj amonijačnog azota (NH₄⁺-N) kod svih inokulisanih uzoraka je povećan u odnosu na nPTK₉₀, osim kod uzorka tretiranog sa *U. botrytis* LPSC 813. Pošto se azot u komini grožđa nalazi vezan za proteine (141), povećanje sadržaja amonijačnog azota može da bude posledica mineralizacije organskog azota gljivama.

Acidifikacija zemljišta na kom se komina odlaže dovodi do luženja minerala i opadanja dostupnosti nutrijenata, čime opada kvalitet zemljišta (142). U svim uzorcima PTK inokulisanim gljivama dolazi do blagog povećanja pH vrednosti. Kod uzorka inokulisanog sojem *U. botrytis* LPSC 813 ovaj efekat je posebno izražen, pošto je pH značajno povećan. Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno kako dolazi do alkalizacije kod gljiva, ali se smatra da metabolizam azota ima važnu ulogu (143). Međutim, u uzorku sa *U. botrytis*, gde je došlo do alkalizacije, sadržaj NH₄⁺-N nije povećan, dok u ostalim uzorcima sadržaj NH₄⁺-N je povećan ali je kod njih

povećanje pH vrednosti manje. Ovo pokazuje da je kod soja *U. botrytis* LPSC 813 mehanizam alkalizacije nezavisan od metabolizma azota ili da je kombinacija više različitih procesa. Neki od njih mogu da uključuju korišćenje organskih kiselina kao izvora energije kao i povećanje dostupnosti Ca^{2+} koji je u komini imobilizovan pektinima (144).

4.2.2. Instrumentalna analiza metanolnih ekstrakata PTK

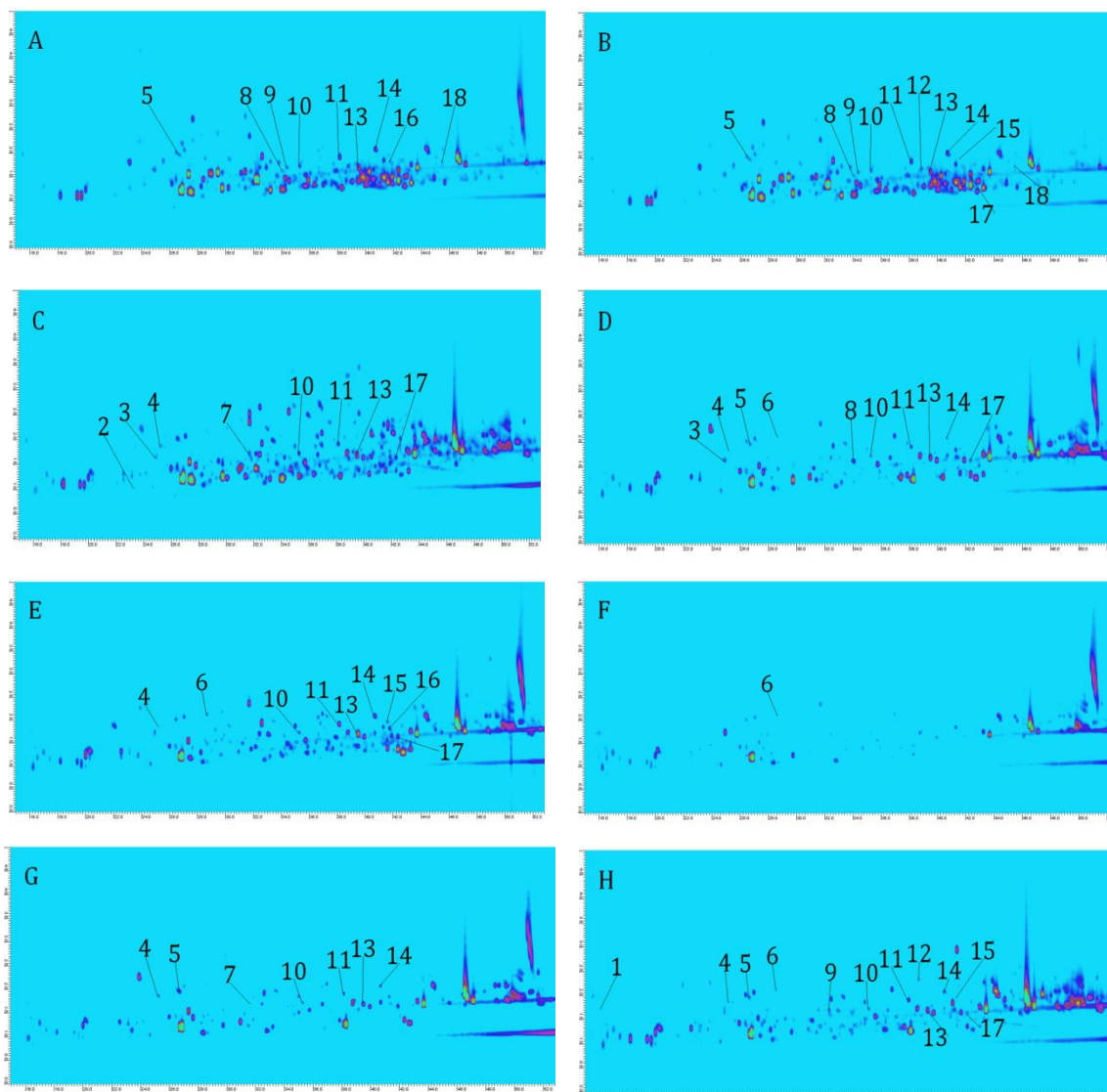
Rezultati elementalne mikroanalize (Tabela 4.8) pokazuju da nPTK₀ i nPTK₉₀ imaju sličan sastav što ukazuje da nema većih promena u kontrolnim uzorcima pre i nakon inkubacije. Najveći procenat svih elemenata je u uzorku inokulisanom sojem *U. botrytis* LPSC 813, što može da bude posledica najvišeg fungalnog rasta. Sumpor je u svim uzorcima ispod granice detekcije (granica detekcije je između 0,031-6 mg).

Tabela 4. 8. Elementalni sastav neinokulisane i inokulisane PTK nakon 90 dana inkubacije

	N	C	H	S	O*
	%				
nPTK0	1.9	39.4	5.0	nd	53.8
nPTK90	1.9	39.2	4.9	nd	54.0
LPSC 232	3.1	43.9	5.7	nd	47.3
LPSC 285	2.5	37.4	4.6	nd	55.5
LPSC 163	2.8	38.2	4.8	nd	54.2
LPSC 735	3.4	43.6	5.4	nd	47.7
FALH 18	2.5	36.5	4.7	nd	56.3
LPSC 813	3.8	44.1	5.8	nd	46.3

*sadržaj O je izračunat na osnovu ostalih rezultata

Posebna pažnja je posvećena analizi monoaromatičnih jedinjenja u komini, zbog njihovog toksičnog efekta. Prisustvo monoaromatičnih jedinjenja u uzorcima je ispitivano sveobuhvatnom dvodimenzionalnom gasnom hromatografijom. Rezultati su prikazani na slikama 4.23 A-H i pokazuju da ova jedinjenja postoje i u početnom uzorku (nPTK₀). U kontroli nakon inkubacije (nPTK₉₀) identifikovane su dve monoaromatične strukture više u odnosu na nPTK₀, pa se u ovom uzorku mogu pronaći galna i tereftalna kiselina, pored ostalih monoaromatičnih struktura. Ovo je verovatno posledica toplote i spontane oksidacije molekulskim kiseonikom i njegovim reaktivnim vrstama (145). U svim uzorcima PTK inokulisanih gljivama prisutna su i mnoga druga monoaromatična jedinjenja koja se ne detektuju u nPTK₀ i nPTK₉₀, a spisak svih pronađenih monoaromata u uzorcima je dat u tabeli 4.9, kao i njihova relativna zastupljenost koja je određena kao procenat zapremine određene tačke u odnosu na zapreminu svih tačaka na hromatogramu.



Slika 4. 23. GCxGC-qMS hromatogrami metanolnih ekstrakata: (A) Neinokulisana PTK na početku eksperimenta (nPTK₀), i nakon 90 dana inkubacije (B) Neinokulisana PTK (nPTK₉₀), (C) PTK inokulisana sojem *Pe. albobadia* LPSC 285 (D) PTK inokulisana sojem *Py. sanguineus* LPSC 163 (E) PTK inokulisana sojem *T. harzianum* FALH 18 (F) PTK inokulisana sojem *U. botrytis* LPSC 813 (G) PTK inokulisana sojem *C. rigida* LPSC 232 nakon (H) PTK inokulisana sojem *G. sepiarium* LPSC 735. Brojevi na hromatogramima odgovaraju onima u tabeli 4.8.

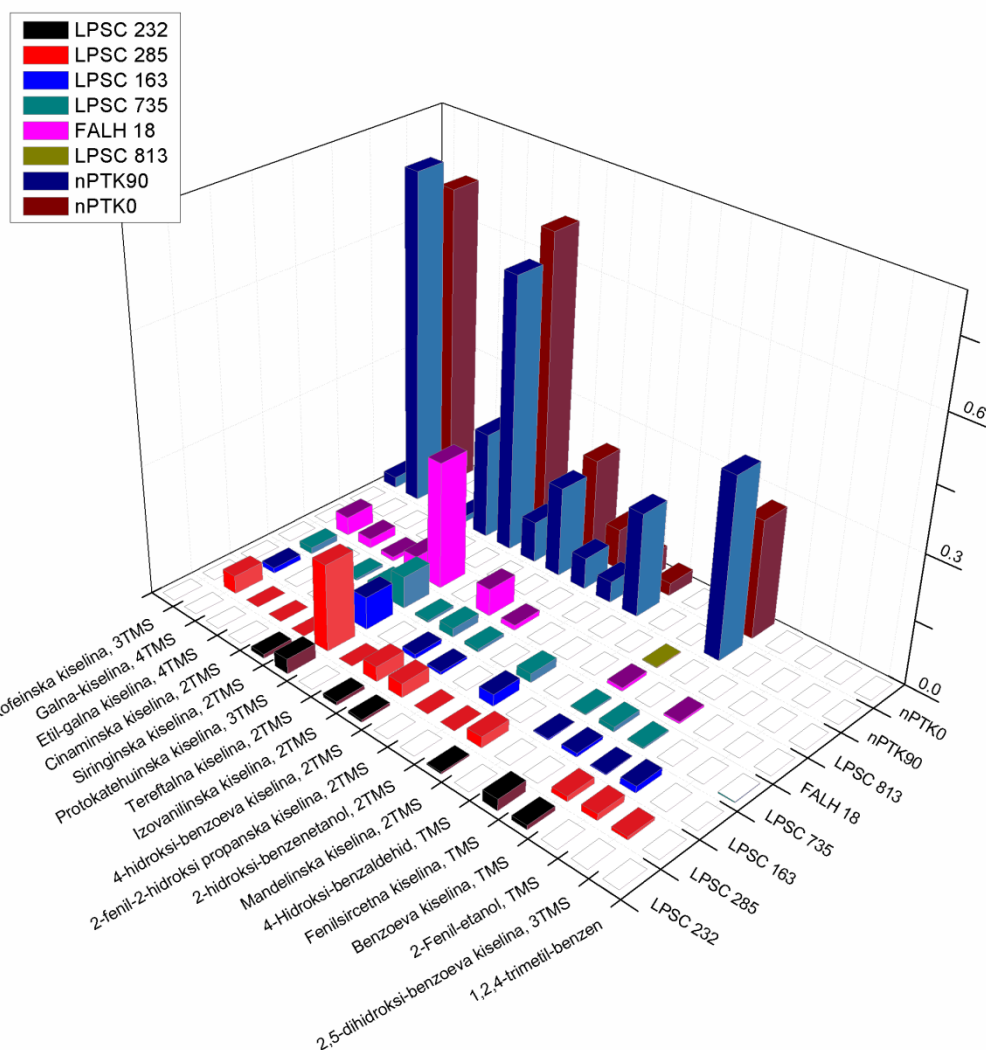
Tabela 4. 9. Relativni procenti zastupljenosti aromatičnih jedinjenja identifikovanih GCxqGC-MS analizom u inokulisanim i neinokulisanim uzorcima PTK, gde nd označava nije detektovano

	Jedinjenje	tR	2tR	0 dana		90 dana					
				nPTK ₀	nPTK ₉₀	LPSC 232	LPSC 285	LPSC 163	LPSC 735	FALH 18	LPSC 813
1	1,2,4-trimetil-benzen	16,00	1,71	nd	nd	nd	nd	nd	0,0032	nd	nd
2	2,5-dihidroksi-benzoeva kiselina, 3TMS	23,20	1,02	nd	nd	nd	0,0071	nd	nd	nd	nd
3	2-Fenil-etanol, TMS	24,85	1,62	nd	nd		0,0152	0,0155	nd	nd	nd
4	Benzoeva kiselina, TMS	25,15	1,83	nd	nd	0,0094	0,0122	0,0025	0,0037	0,0047	nd
5	Fenilsirćetna kiselina, TMS	26,65	1,95	0,2760	0,4220	0,0257	nd	0,0087	0,0105	nd	nd
6	4-Hidroksi-benzaldehid, TMS	28,60	2,10	nd	nd	nd	nd	0,0021	0,0030	0,0083	0,0024
7	Hidroksi-fenilsirćetna kiselina, 2TMS (bademova kiselina)	31,60	1,68	nd	nd	0,0037	0,0256	nd	nd	nd	nd
8	2-hidroksi-benzenetanol, 2TMS	34,00	1,62	0,0297	0,2430	nd	nd	0,0275	0,0211	nd	nd
9	2-fenil-2-hidroksi propanska kiselina, 2TMS	34,30	1,68	0,0558	0,0486	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	4-hidroksi-benzoeva kiselina, 2TMS	35,20	1,71	0,0940	0,0729	0,0057	0,0333	0,0060	0,0072	0,0116	nd
11	3-hidroksi-4-metoksi-benzoeva kiselina (izovanilinska), 2TMS	38,05	1,89	0,2307	0,2081	0,0087	0,0354	0,0111	0,0204	0,0632	nd

	Jedinjenje	tR	2tR	0 dana		90 dana					
				nPTK ₀	nPTK ₉₀	LPSC 232	LPSC 285	LPSC 163	LPSC 735	FALH 18	LPSC 813
12	1,4-benzendikarboksilna kiselina, 2TMS (tereftalna)	38,80	1,77	nd	0,0962	nd	nd	nd	0,0052	nd	nd
13	3,4-dihidroksi-benzoeva kiselina (protokatehinska), 3TMS	39,40	1,68	0,7004	0,6395	0,0340	0,2019	0,0758	0,0752	0,2971	nd
14	4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzoeva kiselina, 2TMS (siringinska)	40,60	2,07	0,2600	0,2485	0,0093	nd	0,0059	0,0160	0,0424	nd
15	Benzenpropenska kiselina, 2TMS (cinaminska)	41,50	1,95	0,0152	0,0137	nd	nd	nd	0,0053	0,0099	nd
16	etil 3,4,5-trihidroksi-benzoeva kiselina, 4TMS (etil galna)	41,65	1,80	0,0607	nd	nd	nd	nd	nd	0,0220	nd
17	3,4,5-trihidroksi-benzoeva kiselina, 4TMS (galna)	42,25	1,62	0,7046	0,7747	nd	0,0416	0,0130	0,0151	0,0439	nd
18	3-(3,4-dihidroksifenilfenil)-2-propenska kiselina, 3TMS (kofeinska)	45,40	1,80	0,0364	0,0253	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Kako bi se lakše uporedile razlike u sadržaju monoaromatičnih struktura u uzorcima, podaci o relativnoj zastupljenosti iz tabele 4.9 prikazani su i grafički na slici 4.23. Sa grafika se može videti da je količina svih monoaromatičnih struktura manja s u svim uzorcima komine koji su inokulisani gljivama. U svim uzorcima inokulisanim gljivama 2-fenil-2-hidroksi propanska kiselina i kofeinska kiselina nestaju u potpunosti, odnosno njihova koncentracije je bila ispod limita detekcije GC x GC-MS, dok su prisutne u kontrolnim uzorcima (i početnom i nakon 90 dana). Takođe neka jedinjenja, kao što su benzoeva, dihidroksi-benzoeva, mandelinska i etil-galna kiselina, fenil-etanol, trimetil-benzen i 4-hidroksi-benzaldehid, prisutni su samo u uzorcima koji inokulisani gljivama, što ukazuje da verovatno nastaju transformacijom monoaromata koji su prisutni u kontrolnim uzorcima.

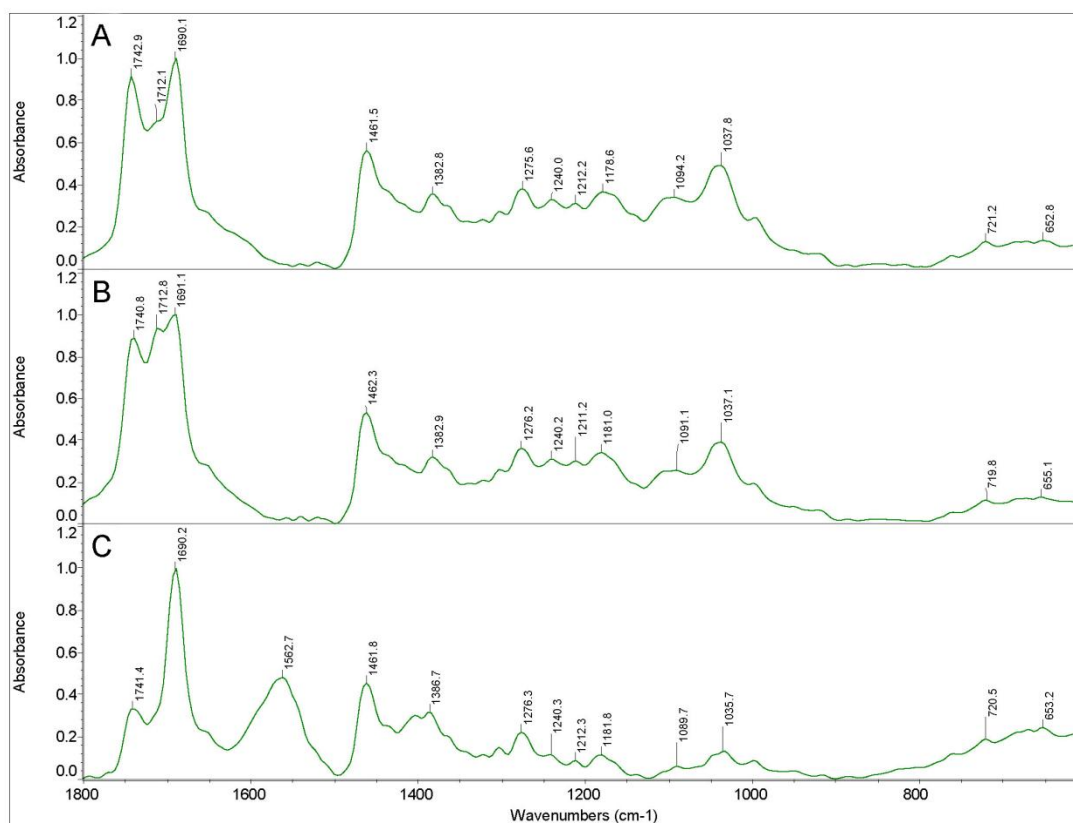
Sa grafika se primećuje da soj *U. botrytis* LPSC 813 degraduje sva monoaromatična jedinjenja osim 4-hidroksi-benzaldehida, pri čemu je i to jedinjenje prisutno u tragovima. Ovaj soj je mogao da iskoristi ova jedinjenja na dva moguća načina. Jedan način je da *U. botrytis* monoaromate koristi kao izvor energije i ugljenika (146). Povećan sadržaj obojenih supstanci u uzorku PTK inokulisanom ovom gljivom ukazuje da drugi način može da bude korišćenje monoaromata u produkciji pigmenata. Naime, *U. botrytis* produkuje melanin (147), pa verovatno dolazi do polimerizacije monoaromata uz pomoć ekstracelularnih oksidativnih enzima i imobilizacije u sopstvenom ćelijskom zidu.



Slika 4. 24. Relativna zastupljenost različitih monoaromatičnih jedinjenja u uzorcima neinokulisane i inokulisane komine

Osim GCxGC-qMS, metanolni ekstrakti su analizirani i FTIR spektroskopijom. Na slici 4.25 prikazani su spektri nPTK₀ i nPTK₉₀ i uzorka inokulisanog sojem *U. botryis* LPSC 813 gde se vidi da se inokulisan uzorak znatno razlikuje od kontrolnih. Apsorpcione trake na 1740 cm⁻¹ i 1712 cm⁻¹ potiču od valencionih vibracija kiselih karbonilnih grupa, a traka na 1690 cm⁻¹ pripada karbonilnim grupama masnih kiselina. Brojne trake, koje potiču od deformacionih vibracija u ravni aromatičnih C-H i O-H veza fenola, su prisutne u opsegu od 1460-1020 cm⁻¹. Dodatna široka traka na 1563 cm⁻¹ prisutna je samo u uzorku inokulisanom sa *U. botryis* LPSC 813 i potiče od amida I i amida II iz proteina gljive

rastvornih u metanolu (110,148,149). Sadržaj slobodnih fenola i apsorbancu na 395 nm, koja zavisi od prisustva aromatičnih grupa kao što su tirozin, triptofan, fenilalanin, bili su povećani u uzorku inokulisanom sojem *U. botrytis* LPSC 813 u odnosu na kontrole. Razlog ovome, kao i prisustvu trake na 1563 cm^{-1} , može da bude povećan sadržaj rastvornih proteina koji se javljaju usled povećanja mikrobnog rasta. Značajna smanjenja intenziteta trake na 1741 cm^{-1} i 1036 cm^{-1} u uzorku inokulisanom sojem LPSC 813, koje potiču od karbonilne grupe i anti-simetričnih valencionih vibracija C-O veze, mogu da budu posledica degradacije ovih jedinjenja ovim sojem.



Slika 4. 25. FTIR spektri: (A) Neinokulisana PTK na početku eksperimenta (nPTK₀), (B) Neinokulisana PTK nakon 90 dana inkubacije (nPTK₉₀), (C) PTK inokulisana sojem *Ulocladium botrytis* LPSC 813 nakon 90 dana inkubacije.

4.2.3. Smanjenje fitotoksičnosti

Kako bi se pokazalo da li dolazi do smanjenja fitotoksičnosti PTK nakon tretmana gljivama, ispitan je uticaj VRFs svih uzoraka na germinaciju semena zelene salate i paradajza. Iz tabele 4.1 vidi se da nPTK₉₀ (10%) i uzorak inokulisan sojem *G. sepiarium* LPSC 735 (10-5%) inhibira germinaciju salate. U poređenju sa kontrolom, inokulacija svim ostalim gljivama dovodi do smanjenja fitotoksičnosti PTK na zelenu salatu u poređenju sa kontrolom. Do najvećeg smanjenja fitotoksičnosti dovodi inokulacija sojem *U. botryis* LPSC 813 pri koncentraciji 1,25 %, a potom i *Pe. albobadia* (2,5 %). Testovi sa paradajzom pokazuju slične rezultate. Sve gljive osim *G. sepiarium* LPSC 735 smanjuju fitotoksični efekat PTK.

Tabela 4. 10. Germinacioni indeks (%) semena zelene salate i paradajza u prisustvu VRFs dobijene iz neinokulisanih i inokulisanih uzoraka PTK nakon 90 dana inkubacije

	VRFs (%, p/v)	nPTK ₉₀	<i>C. rigida</i> LPSC 232	<i>Pe. albobadia</i> LPSC 285	<i>Py. sanguineus</i> LPSC 163	<i>G. sepiarium</i> LPSC 735	<i>T. harzianum</i> FALH 18	<i>U. botrytis</i> LPSC 813
Zelena salata	10	0,0 ± 0,0 c	11,9 ± 3,4 a	18,1 ± 3,3 a	2,8 ± 0,9 b	0,0 ± 0,0 c	2,2 ± 1,4 b	5,6 ± 1,6 b
	5	9,4 ± 0,7 d	16,4 ± 1,9 c	33,8 ± 3,7 b	18,0 ± 4,7 c	0,0 ± 0,0 e	27,0 ± 1,3 b	56,5 ± 2,3 a
	2,5	25,3 ± 3,5 bc	31,3 ± 0,7 b	62,3 ± 6,6 a	25,9 ± 2,4 bc	16,7 ± 1,4 c	36,1 ± 8,8 b	69,1 ± 2,7 a
	1,5	45,8 ± 3,3 bc	53,4 ± 11,0 b	56,8 ± 9,6 ab	50,4 ± 20,5 bc	23,6 ± 2,9 c	50,4 ± 5,2 bc	83,1 ± 7,8 a
Paradajz	10	3,3 ± 0,9 ef	15,4 ± 2,3 ab	17,4 ± 4,9 a	10,3 ± 2,0 bc	0,9 ± 0,3 f	7,9 ± 1,8 cd	4,3 ± 0,2 de
	5	13,0 ± 2,1 b	20,6 ± 2,7 ab	32,5 ± 13,1 a	18,3 ± 0,5 ab	11,6 ± 1,1 b	25,2 ± 9,9 ab	33,3 ± 3,8 a
	2,5	34,3 ± 3,7 cd	44,3 ± 7,1 bc	54,1 ± 1,6 ab	46,8 ± 7,1 abc	26,3 ± 4,0 d	42,3 ± 6,5 bc	60,4 ± 5,3 a
	1,5	41,9 ± 1,2 cd	65,1 ± 7,0 bcd	76,3 ± 13,4 ab	69,2 ± 4,5 bc	36,8 ± 2,5 d	58,2 ± 7,0 bcd	90,1 ± 8,8 a

¹Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost i standardne devijacije tri ponavljanja, između podataka obeleženih različitim slovom (a-f) postoji statistički značajna razlika (Tukey test, p < 0,05)

Pokazano je da na fitotoksičnost utiče sadržaj fenola (150), a njihovo prisustvo je bilo najveće u uzorku inokulisanom sa *G. sepiarium*, stoga nije iznenađujuće što pomenuti uzorak, za razliku od tretmana sa ostalim sojevima gljiva, nije smanjio fitotoksični efekat PTK. Međutim, fenoli nisu jedini zaslužni za fitotoksični efekat, pošto uzorak inokulisan sojem *Py. sanguineus* ima najmanji sadržaj fenola, ali ne povećava germinaciju semena.

Transformacija monoaromata sojem *U. botrytis*, bez obzira na mehanizam kojim se ona odvija, sigurno je jedan od načina na koji soj *U. botrytis* LPSC 813 smanjuje fitotoksičnost PTK. Ova gljiva, osim što dovodi do najvećeg smanjenja fitotoksičnosti, dovodi i do najvećeg gubitka mase PTK. U prethodnim radovima je pokazano da ovaj soj nema lignolitičku aktivnost ali poseduje celulozolitički enzimski kompleks i ekstracelulozne enzime sa peroksidaznom aktivnošću, što mu verovatno omogućava da kolonizuje brojne supstrate bogate aromatičnim jedinjenjima (95,104). Kod nekih drugih sojeva gljiva pokazano je da ova peroksidazna aktivnost omogućava smanjenje toksičnosti fenola, pa je moguće da *U. botrytis* koristi sličan mehanizam (151).

5. Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je degradacija aromatične frakcije dizel goriva D2 i komine grožđa pomoću mikroorganizama. Oba odabrana supstrata za degradaciju su bogata raznovrsnim aromatičnim strukturama koje predstavljaju opasnost po životnu sredinu i zdravlje ljudi.

U prvoj seriji eksperimenata izolovane su i okarakterisane bakterije iz zemljišta kontaminiranog naftom, nakon čega su odabrani najbolji degraderi aromatične frakcije dizela i postavljen eksperiment biodegradacije. Biodegradacija aromatične frakcije je praćena gravimetrijski i upotrebom GCxGC-(HR)TOFMS.

U drugoj seriji eksperimenta ispitivana je degradacija komine grožđa pomoću čistih kultura gljiva. Biodegradacija je praćena na osnovu fizičko-hemijskih parametara (pH, gravimetrija, sadržaj azota, redukujućih šećera, fenola, obojenih supstanci) i upotrebom FTIR i GCxGC-qMS. Kako bi se procenilo da li je došlo do smanjenja toksičnosti komine nakon biodegradacije, ispitivan je fitotoksični efekat na semena zelene salate i paradajza.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- Sojevi CHP-ZH25 i CHP-NR31 najbolje rastu na podlozi sa aromatičnom frakcijom dizela D2 i rezistentni su na visoke koncentracije nikla (50 mmol/L), na osnovu čega su odabrani za detaljno ispitivanje biodegradacije aromatične frakcije dizela;
- Soj CHP-ZH25 je identifikovan kao *Oerskovia* sp CHP-ZH25 (JX430000) i najbliži je tipskoj vrsti *Oerskovia enterophila* DSM strain 43852;
- Soj CHP-NR31 je identifikovan kao *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 (JX965395) i najbliži je tipskoj vrsti *Rhodococcus cerastii* strain C5;
- Rezultati testa respiracije pokazali da dolazi do povećanja potrošnje O₂ i produkcije CO₂ kod oba soja u prisustvu aromatične frakcije dizela, što potvrđuje da mogu da koriste ovaj supstrat kao izvor ugljenika. Potrošnja O₂ nakon 7 dana je bila slična kod oba ispitivana bakterijska soja, ali je produkcija CO₂ kod CHP-ZH25 bila nešto viša;

- Soj *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 je degradovao aromatičnu frakciju prosečnom brzinom od 14,4 mg/L/dan (od 0-10 dana), 10,5 mg/L/dan (10-20 dan) i 4,0 mg/L/dan (20-30 dan).
- Soj *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 je degradovao aromatičnu frakciju prosečnom brzinom od 12,5 mg/L/dan (od 0-10 dana), 10,8 mg/L/dan (10-20 dan) i 4,2 mg/L/dan (20-30 dan).
- Jednačinom, koja je razvijena kako bi se poredila biodegradacija različitih klasa jedinjenja, uspešno su na dobijenim hromatogramima vizuelizovana samo degradovana jedinjenja umesto svih jedinjenja koja preostaju u uzorku nakon degradacije;
- Kod soja *Oerskovia* sp. CHP-ZH25 redosled degradacije prema efikasnosti je sledeći: derivati dibenzotiofena (97,9 %) > derivati benzo[*b*]tiofena (72,7 %) > derivati naftalena (68,8 %) > derivati acenaftena/bifenila (64,9 %) > derivati acenaftilena (57,4 %) > alkil naftaleni (55,2 %) > derivati fluorena (46,6 %) > alkil acenafteni/alkil bifenili (35,0 %) > alkil benzo[*b*]tiofeni (29,6 %) > alkil dibenzotiofeni (23,3 %) > derivati fenantrena/antracena (22,7 %) > alkil acenaftileni (19,0 %) > alkil fluoreni (5,4 %) > alkil fenantreni/antraceni (0,5 %);
- Redosled degradacije prema efikasnosti kod soja *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 je sledeći: derivati naftalena (75,8 %) > derivati acenaftena/bifenila (70,7 %) > derivati acenaftilena (63,2 %) > derivati benzo[*b*]tiofena (61,8 %) > alkil naftaleni (60,8 %) > derivati dibenzotiofena (53,1 %) > derivati fluorena (48,8 %) > alkil acenafteni/alkil bifenili (37,5 %) > alkil benzo[*b*]tiofeni (34,5 %) > alkil dibenzotiofeni (25,6 %) = derivati fenantrena/antracena (25,6 %) > alkil acenaftileni (22,2 %) > alkil fenantreni/antraceni (10,7 %) > alkil fluoreni (6,1 %);
- Na osnovu testova biodegradacije zaključuje se da sojevi *Oerskovia* sp. CHP-ZH31 i *Rhodococcus* sp. CHP-NR31 mogu uspešno da se koriste u procesima bioremedijacije sredina zagađenih policikličnim aromatičnim ugljovodonicima;

- Soj *Oerskovia* sp. CHP-ZH31 može da bude od posebne koristi za remedijaciju sredina zagađenih dibenzotiofenom, pošto je pokazano da može da skoro potpuno degraduje dibenzotiofen u laboratorijskim uslovima;
- Svi ispitivani sojevi gljiva mogu da rastu na parom tretiranoj komini pri čemu dolazi do redukcije mase komine i porasta pH vrednosti, što može dovesti do poboljšanja kvaliteta zemljišta na kome se komina odlaže;
- Sadržaj redukovanih šećera (TRSC) je smanjen kod uzoraka inokulisanih sojevima *Pe. albobadia* LPSC 285, *C. rigida* LPSC 232, *U. botrytis* LPSC 813 i *T. harzianum* FALH 18, a povećan kod *G. sepiarium* LPSC 735 i *Py. sanguineus* LPSC 163;
- Sadržaj amonijačnog azota svih inokulisanih uzoraka je povećan u odnosu na nPTK₉₀, osim kod uzorka tretiranog sa *U. botrytis* LPSC 813;
- Sadržaj fenola je smanjen u svim uzorcima u poređenju sa kontrolom, osim u uzorku inokulisanom *G. sepiarium*. Najveće smanjenje u sadržaju fenola bilo je u uzorku sa *Pe. albobadia* LPSC 285;
- Količina svih monoaromatičnih struktura je značajno smanjena u svim uzorcima komine koji su inokulisani gljivama, pri čemu do najvećeg smanjenja dolazi kod uzorka inokulisanog sojem *U. botrytis* LPSC 813;
- Sve gljive osim *G. sepiarium* LPSC 735 smanjuju fitotoksični efekat PTK na semena zelene salate i paradajza, a do najvećeg smanjenja dolazi nakon inokulacije sojem *U. botrytis* LPSC 813;
- Soj *U. botrytis* LPSC 813 u najvećoj meri transformiše PTK pošto dovodi do najvećeg gubitka mase komine, smanjenja sadržaja monoaromatičnih jedinjenja i alkalizacije komine. Takođe, tretman pomenutim sojem dovodi do najvećeg smanjenja fitotoksičnosti na biljke, pa bi se na osnovu toga moglo zaključiti da kombinacija termalnog tretmana komine i inokulacije gljivom *U. botrytis* LPSC 813 može da doprinese bezbednoj upotrebi komine kao suplementa u poljoprivrednom zemljištu.

6. Literatura

1. Antwis RE, Griffiths SM, Harrison XA, Aranega-Bou P, Arce A, Bettridge AS, et al. Fifty important research questions in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2017; 93 (5): 1–10. DOI: 10.1093/femsec/fix044
2. Timmis K, de Vos WM, Ramos J, Vlaeminck S, Prieto A, Danchin A, et al. The contribution of microbial biotechnology to sustainable development goals. *Microb Biotechnol.* 2017; 10 (5): 984–7. DOI: 10.1111/1751-7915.12818
3. Timmis K, Cavicchioli R, Garcia JL, Nogales B, Chavarría M, Stein L, et al. The urgent need for microbiology literacy in society. *Environ Microbiol.* 2019;21(5):1513–28. DOI: 10.1111/1462-2920.14611
4. Czarny J, Staninska-Pięta J, Piotrowska-Cyplik A, Juzwa W, Wolniewicz A, Marecik R, et al. *Acinetobacter* sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals. *J Hazard Mater.* 2020; 383 (July 2019): 121168. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121168
5. Pullagurala VLR, Rawat S, Adisa IO, Hernandez-Viezcas JA, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Plant uptake and translocation of contaminants of emerging concern in soil. *Sci Total Environ.* 2018; 636: 1585–96. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.375
6. de Lorenzo V. Seven microbial bio-processes to help the planet. *Microb Biotechnol.* 2017; 10 (5): 995–8. DOI: 10.1111/1751-7915.12816
7. Costa EM, Araujo EL, Maia AVP, Silva FEL, Bezerra CES, Silva JG. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Apidologie.* 2014; 45 (1): 34–44. DOI: 10.1007/s13592-013-0226-5
8. Rajabi H, Sharifipour M. Geotechnical properties of hydrocarbon-contaminated soils: a comprehensive review. *Bull Eng Geol Environ.* 2019; 78 (5): 3685–717. DOI: 10.1007/s10064-018-1343-1
9. Khan MAI, Biswas B, Smith E, Naidu R, Megharaj M. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a

- review. *Chemosphere*. 2018; 212: 755–67. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.094
10. Xu P, Yu B, Li FL, Cai XF, Ma CQ. Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles. *Trends Microbiol*. 2006; 14 (9): 398–405. DOI: 10.1016/j.tim.2006.07.002
 11. Saini A, Bekele DN, Chadalavada S, Fang C, Naidu R. A review of electrokinetically enhanced bioremediation technologies for PHs. *J Environ Sci*. 2020; 88 (August 2019): 31–45. DOI: 10.1016/j.jes.2019.08.010
 12. dos Santos JJ, Maranhão LT. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. *J Environ Manage*. 2018; 210: 104–13. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.01.015
 13. Varjani SJ, Gnansounou E, Pandey A. Comprehensive review on toxicity of persistent organic pollutants from petroleum refinery waste and their degradation by microorganisms. *Chemosphere*. 2017; 188: 280–91. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.005
 14. Logeshwaran P, Megharaj M, Chadalavada S, Bowman M, Naidu R. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environ Technol Innov*. 2018; 10: 175–93. DOI: 10.1016/j.eti.2018.02.001
 15. Pandey P, Pathak H, Dave S. Microbial ecology of hydrocarbon degradation in the soil: A review. *Res J Environ Toxicol*. 2016; 10 (1): 1–15. DOI: 10.3923/rjet.2016.1.15
 16. Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1369. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01369
 17. Mishra S, Pradhan N, Panda S, Akcil A. Biodegradation of dibenzothiophene and its application in the production of clean coal. *Fuel Process Technol*. 2016; 152: 325–42. DOI: 10.1016/j.fuproc.2016.06.025

18. Lim MW, Lau E Von, Poh PE. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. *Mar Pollut Bull.* 2016; 109 (1): 14–45. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.04.023
19. Ganesh Kumar A, Nivedha Rajan N, Kirubakaran R, Dharani G. Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium. *Mar Pollut Bull.* 2019; 146: 741–50. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.07.006
20. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United nations [Internet]. 2017 [citirano 12. 10. 2019]. Dostupno na: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
21. Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti E. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresour Bioprocess.* 2018; 5 (1). DOI: 10.1186/s40643-018-0232-6
22. García-Lomillo J, González-SanJosé ML. Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017; 16 (1): 3–22. DOI: 10.1111/1541-4337.12238
23. IOV. International Organisation of Vine and Wine [Internet]. 2017 [citirano 2019 Oct 12]. Dostupno na: <http://www.oiv.int/en/statistiques/recherche>
24. Papadaki A, Kachrimanidou V, Papanikolaou S, Philippoussis A, Diamantopoulou P. Upgrading Grape Pomace through *Pleurotus* spp. Cultivation for the Production of Enzymes and Fruiting Bodies. *Microorganisms.* 2019; 7 (7): 207. DOI: 10.3390/microorganisms7070207
25. Dwyer K, Hosseinian F, Rod M. The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *J Food Res.* 2014; 3 (2): 91. DOI: 10.5539/jfr.v3n2p91
26. Beres C, Costa GNS, Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles ASC, Cruz APG, et al. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag.* 2017; 68: 581–94. DOI: 10.1016/j.wasman.2017.07.017

27. Tehnologija Hrane. Tehnologija proizvodnje vina [Internet]. [citirano 2019 Oct 19]. Dostupno na: <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/tehnologija-proizvodnje-vina>
28. Mateo JJ, Maicas S. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Res Int.* 2015; 73: 13–25. Available DOI: 10.1016/j.foodres.2015.03.007
29. Yu J, Ahmedna M. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Technol.* 2013; 48 (2): 221–37. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x
30. Fontana AR, Antonioli A, Bottini R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem.* 2013; 61 (38): 8987–9003. DOI: 10.1021/jf402586f
31. Yu J, Smith I, Karlton-Senaye B, Mikiashvili N, Williams L. Impacts of Different Drying Methods on Mold Viability and Ochratoxin A Content of Grape Pomace. *Int J Appl Agric Sci.* 2018; 4 (2): 35–42. DOI: 10.11648/j.ijaas.20180402.12
32. STUFF. Peter Yealands ordered to pay \$18,000 after polluting Marlborough stream with grape marc [Internet]. [citirano 13. 10. 2019]. Dostupn na: <https://www.stuff.co.nz/environment/112438538/peter-yealands-ordered-to-pay-18000-after-polluting-marlborough-stream-with-grape-marc>.
33. Radovanović VN, Andjelković M, Arsić B, Radovanović A, Gojković-Bukarica L. Cost-effective Ultrasonic Extraction of Bioactive Polyphenols from Vine and Wine Waste in Serbia. *South African J Enol Vitic.* 2019; 40 (2). DOI: 10.21548/40-2-3215

34. Hassan YI, Kosir V, Yin X, Ross K, Diarra MS. Grape Pomace as a Promising Antimicrobial Alternative in Feed: A Critical Review. *J Agric Food Chem.* 2019; 67 (35): 9705–18. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b02861
35. Karpe AV, Dhamale VV, Morrison PD, Beale DJ, Harding IH, Palombo EA. Winery biomass waste degradation by sequential sonication and mixed fungal enzyme treatments. *Fungal Genet Biol.* 2017; 102: 22–30. DOI: 10.1016/j.fgb.2016.08.008
36. Zambrano C, Kotogán A, Bencsik O, Papp T, Vágvölgyi C, Mondal KC, et al. Mobilization of phenolic antioxidants from grape, apple and pitahaya residues via solid state fungal fermentation and carbohydrase treatment. *LWT - Food Sci Technol.* 2018; 89: 457–65. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.11.025
37. Manara P, Zabaniotou A, Vanderghem C, Richel A. Lignin extraction from Mediterranean agro-wastes: Impact of pretreatment conditions on lignin chemical structure and thermal degradation behavior. *Catal Today.* 2014; 223: 25–34. DOI: 10.1016/j.cattod.2013.10.065
38. Li X, Zheng Y. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. *Biotechnol Adv.* 2017; 35 (4): 466–89. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.010
39. Ntougias S, Baldrian P, Ehaliotis C, Nerud F, Merhautová V, Zervakis GI. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi - Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. *Bioresour Technol.* 2015; 189: 121–30. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.149
40. Xie S, Syrenne R, Sun S, Yuan JS. Exploration of Natural Biomass Utilization Systems (NBUS) for advanced biofuel-from systems biology to synthetic design. *Curr Opin Biotechnol.* 2014; 27: 195–203. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.02.007

41. Sharma RK, Arora DS. Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality. *Crit Rev Microbiol.* 2015; 41 (1): 52–60. DOI: 10.3109/1040841X.2013.791247
42. Zerva A, Zervakis GI, Christakopoulos P, Topakas E. Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *J Environ Manage.* 2017; 203: 791–8. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.02.042
43. Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Świdorska-Burek U, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczyński A. Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41 (6): 941–62. DOI: 10.1093/femsre/fux049
44. de Boer J. Persistent Organic Pollutants - Are Our Methods Sensitive and Selective Enough? *Anal Lett.* 2012; 45 (5–6): 485–94. DOI: 10.1080/00032719.2011.649450
45. Luan H, Wang X, Cai Z. Mass spectrometry-based metabolomics: Targeting the crosstalk between gut microbiota and brain in neurodegenerative disorders. *Mass Spectrom Rev.* 2019; 38 (1): 22–33. DOI: 10.1002/mas.21553
46. Bertsch W. Two-dimensional gas chromatography. Concepts, instrumentation, and applications - Part 1: Fundamentals, conventional two-dimensional gas chromatography, selected applications. *HRC J High Resolut Chromatogr.* 1999; 22 (12): 647–65.
47. Consden R, Gordon AH, Martin AJP. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochem J.* 1944; 38 (3): 224–32.
48. O'Farrell PH. High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *J Biol Chem.* 1975; 250 (10): 4007–21.
49. Bull HB, Wilfrid Hahn J. The Acid Hydrolysis of Egg Albumin. II. Molecular Weight Distribution of Peptides. *J Am Chem Soc.* 1948; 70 (6): 2132–5.

50. Giddings JC. Two-dimensional Separations. Concept and promise. *Anal Chem.* 1984; 56 (12): 1258-70.
51. Simmons MC, Snyder LR. Two-Stage Gas-Liquid Chromatography. *Anal Chem.* 1958; 30 (1): 32-5.
52. Seeley J V. Multidimensional and Comprehensive Gas Chromatography. In: Poole CF. *Gas Chromatography*. Detroit, Michigan (USA): Elsevier; 2012. p. 161-185. DOI: 10.1016/B978-0-12-385540-4.00007-9
53. Lebanov L, Tedone L, Kaykhani M, Linford MR, Paull B. Multidimensional Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Part 1: Technical Developments. *Chromatographia*. 2019; 82 (1): 377-98. DOI: 10.1007/s10337-018-3649-3
54. Lebanov L, Tedone L, Kaykhani M, Linford MR, Paull B. Multidimensional Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Part 2: Application to Characterisation and Identification. *Chromatographia*. 2019; 82 (1): 399-414. DOI: 10.1007/s10337-018-3651-9
55. Alam MS, Harrison RM. Recent advances in the application of 2-dimensional gas chromatography with soft and hard ionisation time-of-flight mass spectrometry in environmental analysis. *Chem Sci.* 2016; 7 (7): 3968-77. DOI: 10.1039/c6sc00465b
56. Liu Z, Phillips JB. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography using an On-Column Thermal Modulator Interface. *J Chromatogr Sci.* 1991; 29 (6): 227-31. DOI: 10.1093/chromsci/29.6.227
57. Phillips JB, Beens J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: A hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. *J Chromatogr A.* 1999; 856 (1-2): 331-47. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00815-8
58. Shimadzu. Comprehensive GCxGC System [Internet]. [cited 13.10.2019]. Available from: <https://www.shimadzu.com/an/gcms/gcgc-2.html>
59. Adahchour M, Beens J, Vreuls RJJ, Brinkman UAT. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC). I.

- Introduction and instrumental set-up. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2006; 25 (5): 438–54. DOI: 10.1016/j.trac.2006.03.002
60. Dallüge J, Beens J, Brinkman UAT. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: A powerful and versatile analytical tool. *J Chromatogr A.* 2003; 1000 (1–2): 69–108. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00242-5
61. Vendevre C, Ruiz-Guerrero R, Bertoncini F, Duval L, Thiébaud D. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for detailed characterisation of petroleum products. *Oil Gas Sci Technol.* 2007; 62 (1): 43–55. DOI: 10.2516/ogst:2007004
62. Vendevre C, Ruiz-Guerrero R, Bertoncini F, Duval L, Thiébaud D, Hennion MC. Characterisation of middle-distillates by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC): A powerful alternative for performing various standard analysis of middle-distillates. *J Chromatogr A.* 2005; 1086 (1–2): 21–8. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.106
63. Marriott P, Shellie R. Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2002; 21 (9–10): 573–83. DOI: 10.1016/S0165-9936(02)00814-2
64. Bahaghighat HD, Freye CE, Synovec RE. Recent advances in modulator technology for comprehensive two dimensional gas chromatography. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019; 113: 379–91. DOI: 10.1016/j.trac.2018.04.016
65. Górecki T, Harynuk J, Panić O. The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC). *J Sep Sci.* 2004; 27 (5–6): 359–79. DOI: 10.1002/jssc.200301650
66. Adahchour M, Beens J, Vreuls RJJ, Brinkman UAT. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC). II. Modulation and detection. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2006; 25 (6): 540–53. DOI: 10.1016/j.trac.2006.04.004

67. Zoex Corporation. What is GCxGC? [Internet]. [citirano 13.10.2019]. Dostupno na: <https://zoex.com/wp-content/uploads/2012/07/About-GCxGC-PDF-FINAL.pdf>
68. Tranchida PQ, Franchina FA, Dugo P, Mondello L. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Recent Evolution And Current Trends. *Mass Spectrom Rev.* 2016; 35: 524–34. DOI: 10.1002/mas.21443
69. Mondello L, Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Mass Spectrometry: A Review. *Mass Spectrom Rev.* 2008; 27: 101–24. DOI: 10.1002/mas.20158
70. Adahchour M, Beens J, Vreuls RJJ, Brinkman UAT. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC). III. Applications for petrochemicals and organohalogenes. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2006; 25 (7): 726–41. DOI: 10.1016/j.trac.2006.03.005
71. Imam A, Suman SK, Ghosh D, Kanaujia PK. Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019;118:50–64. DOI: 10.1016/j.trac.2019.05.023
72. Vasilieva V, Scherr KE, Edelman E, Hasinger M, Loibner AP. Comprehensive GC2/MS for the monitoring of aromatic tar oil constituents during biodegradation in a historically contaminated soil. *J Biotechnol.* 2012; 157 (4): 460–6. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.08.006
73. Tran TC, Logan GA, Grosjean E, Ryan D, Marriott PJ. Use of comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the characterization of biodegradation and unresolved complex mixtures in petroleum. *Geochim Cosmochim Acta.* 2010; 74 (22): 6468–84. DOI: 10.1016/j.gca.2010.08.024

74. Machado ME. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of nitrogen-containing compounds in fossil fuels: A review. *Talanta*. 2019; 198: 263–76. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.02.031
75. Biedermann M, Grob K. Advantages of comprehensive two-dimensional gas chromatography for comprehensive analysis of potential migrants from food contact materials. *Anal Chim Acta*. 2019; 1057: 11–7. DOI: 10.1016/j.aca.2018.10.046
76. Hashimoto S, Zushi Y, Takazawa Y, Ieda T, Fushimi A, Tanabe K, et al. Selective and comprehensive analysis of organohalogen compounds by GC × GC–HRTofMS and MS/MS. *Environ Sci Pollut Res*. 2018; 25 (8): 7135–46. DOI: 10.1007/s11356-015-5059-5
77. Hashimoto S, Takazawa Y, Fushimi A, Tanabe K, Shibata Y, Ieda T, et al. Global and selective detection of organohalogens in environmental samples by comprehensive two-dimensional gas chromatography–tandem mass spectrometry and high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011; 1218 (24): 3799–810. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.042
78. Poma G, Cuykx M, Amato E, Calaprice C, Focant JF, Covaci A. Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based food intended for human consumption. *Food Chem Toxicol*. 2017; 100: 70–9. DOI: 10.1016/j.fct.2016.12.006
79. Tranchida PQ, Purcaro G, Maimone M, Mondello L. Impact of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry on food analysis. *J Sep Sci*. 2016; 39 (1): 149–61. DOI: 10.1002/jssc.201500379
80. Adahchour M, Beens J, Vreuls RJJ, Brinkman UAT. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). IV. Further applications, conclusions and perspectives. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2006; 25 (8): 821–40. DOI: 10.1016/j.trac.2006.03.003

81. Aspromonte J, Wolfs K, Adams E. Current application and potential use of GC × GC in the pharmaceutical and biomedical field. *J Pharm Biomed Anal.* 2019; 176: 112817. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.112817
82. Omar J, Olivares M, Amigo JM, Etxebarria N. Resolution of co-eluting compounds of Cannabis Sativa in comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry detection with Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares. *Talanta.* 2014; 121: 273–80. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.12.044
83. dos Santos AL, Polidoro A dos S, Schneider JK, da Cunha ME, Saucier C, Jacques RA, et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC×GC/TOFMS) for the analysis of volatile compounds in Piper regnellii (Miq.) C. DC. essential oils. *Microchem J.* 2015; 118: 242–51. DOI: 10.1016/j.microc.2014.07.007
84. Higgins Keppler EA, Jenkins CL, Davis TJ, Bean HD. Advances in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2018; 109: 275–86. DOI: 10.1016/j.trac.2018.10.015
85. Stilo F, Cordero C, Sgorbini B, Bicchi C, Liberto E. Highly Informative Fingerprinting of Extra-Virgin Olive Oil Volatiles: The Role of High Concentration-Capacity Sampling in Combination with Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. *Separations.* 2019; 6 (3): 34. DOI: 10.3390/separations6030034
86. Cordero C, Liberto E, Bicchi C, Rubiolo P, Schieberle P, Reichenbach SE, et al. Profiling food volatiles by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry: Advanced fingerprinting approaches for comparative analysis of the volatile fraction of roasted hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from different ori. *J Chromatogr A.* 2010; 1217 (37): 5848–58. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.07.006

87. Cordero C, Kiefl J, Reichenbach SE, Bicchi C. Characterization of odorant patterns by comprehensive two-dimensional gas chromatography: A challenge in omic studies. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019; 113: 364–78. DOI: 10.1016/j.trac.2018.06.005
88. Stefanuto PH, Perrault KA, Dubois LM, L'Homme B, Allen C, Loughnane C, et al. Advanced method optimization for volatile aroma profiling of beer using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2017; 1507: 45–52. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.05.064
89. Roodt AP, Naudé Y, Stoltz A, Rohwer E. Human skin volatiles: Passive sampling and GC × GC-ToFMS analysis as a tool to investigate the skin microbiome and interactions with anthropophilic mosquito disease vectors. *J Chromatogr B.* 2018; 1097–1098: 83–93. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.09.002
90. Dubois LM, Stefanuto PH, Perrault KA, Delporte G, Delvenne P, Focant JF. Comprehensive Approach for Monitoring Human Tissue Degradation. *Chromatographia.* 2019; 82 (5): 857–71. DOI: 10.1007/s10337-019-03710-3
91. Milić JS, Beškoski VP, Ilić M V, Ali SAM, Gojgić-Cvijović GĐ, Vrvić MM. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: Composition of the microbial consortium. *J Serbian Chem Soc.* 2009; 74 (4): 455–60. DOI: 10.2298/JSC0904455M
92. Löser C, Seidel H, Zehnsdorf A, Stottmeister U. Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998; 49 (5): 631–6. DOI: 10.1007/s002530051225
93. Goodfellow M, Maldonado LA. The Families Dietziaceae, Gordoniaceae, Nocardiaceae and Tsukamurellaceae. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes: Volume 3:*

Archaea Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. New York, NY: Springer New York; 2006. p. 843–88. Doi: 10.1007/0-387-30743-5_32

94. Saparrat MCN, Guillén F, Arambarri AM, Martínez AT, Martínez MJ. Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Corioloopsis rigida*. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68 (4): 1534–40. DOI: 10.1128/AEM.68.4.1534-1540.2002
95. Saparrat MCN, Rocca M, Aulicino M, Arambarri AM, Balatti PA. *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* leaf litter decomposition by selected fungi in relation to their physical and chemical properties and lignocellulolytic enzyme activity. *Eur J Soil Biol.* 2008; 44 (4): 400–7. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2008.05.005
96. Saparrat MCN, Bucsinszky AMM, Tournier HA, Cabello MN, Arambarri AM. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17 (2): 64–8.
97. Murace MA, Saparrat MCN, Maly L, Keil G. Evaluación del comportamiento de soluciones con potencialidad funguicida mediante ensayos de biodegradación en laboratorio y FT-IR. *Rev Cienc e Investig For CIFOR.* 2016; 45–61.
98. Stocco MC, Mansilla AY, Mónaco CI, Segarra C, Lampugnani G, Abramoff C, et al. Native isolates of *Trichoderma harzianum* inducing resistance to *Zymoseptoria tritici* on wheat plants. *Bol la Soc Argentina Bot.* 2015; 50 (3): 291–301.
99. Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO. Collins and Lyne's Microbiological Methods. 3rd ed. London: Arnold; 2004.
100. Djurić A, Gojgić-Cvijović G, Jakovljević D, Kekez B, Kojić JS, Mattinen M-L, et al. *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 isolated from an oil-polluted environment—a new producer of levan. *Int J Biol Macromol.* 2017; 104:311–21. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.034

101. Olson JJ, Mills GL, Herbert BE, Morris PJ. Biodegradation rates of separated diesel components. *Environ Toxicol Chem.* 1999; 18 (11): 2448–53. DOI: 10.1002/etc.5620181110
102. Velarde I, Muchnik J, Cittadini R. ¡Al gran Pueblo Argentino, salud! El retorno del vino de la costa de Berisso”. *Rev la Fac Agron La Plata.* 2013; 112: 45–61.
103. Saparrat MCN, Jurado M, Díaz R, Romera IG, Martínez MJ. Transformation of the water soluble fraction from “alpeorujo” by *Corioloropsis rigida*: The role of laccase in the process and its impact on *Azospirillum brasiliense* survival. *Chemosphere.* 2010; 78 (1): 72–6. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.09.050
104. Saparrat MCN, Estevez JM, Troncozo MI, Arambarri AM, Balatti PA. In-vitro depolymerization of *Scutia buxifolia* leaf-litter by a dominant Ascomycota *Ciliochorella* sp. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2010; 64 (3): 262–6. DOI: 10.1016/j.ibiod.2010.02.001
105. Aloui F, Abid N, Roussos S, Sayadi S. Decolorization of semisolid olive residues of “alperujo” during the solid state fermentation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Aspergillus niger*. *Biochem Eng J.* 2007; 35 (2): 120–5. DOI: 10.1016/j.bej.2007.01.005
106. Somogyi M. A new reagent for the determination of sugars. *J Biol Chem.* 1945; 160: 61–8.
107. Gojgic-Cvijovic GD, Milic JS, Solevic TM, Beskoski VP, Ilic M V., Djokic LS, et al. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: A laboratory study. *Biodegradation.* 2012; 23 (1): 1–14. Doi: 10.1007/s10532-011-9481-1
108. Devrnja N, Anđelković B, Arandelović S, Radulović S, Soković M, Krstić-Milošević D, et al. Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts. *South*

- African J Bot. 2017; 111: 212–21. Available from: 10.1016/j.sajb.2017.03.028
109. Anđelković B. Primena rezultata NMR i FTIR spektroskopskih tehnika u multivarijantnoj analizi za klasifikaciju propolisa [doktorska disertacija]. Hemijski Fakultet, Univerzitet u Beogradu. 2017.
 110. Pretsch E, Buhlmann P, Affolter C. Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2000.
 111. Inalbon MC, Mocchiutti P, Zanuttini MA, Balatti PA, Rajchenberg M, Saparrat MCN. Applying Ligninolytic Fungi on Eucalyptus grandis Wood for Pulping Pretreatment or Fractionation. *Procedia Mater Sci.* 2015; 8: 1099–107. DOI: 10.1016/j.mspro.2015.04.173
 112. Zucconi F, Pera A, Forte M, De Bertoldi M. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle.* 1981; 22 (2): 54–7.
 113. Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. *Brock Biology of Microorganisms.* 12th ed. San Francisco, USA: Pearson Benjamin Cummings; 2009.
 114. Ciarkowska K, Gambus F, Antonkiewicz J, Koliopoulos T. Polycyclic aromatic hydrocarbon and heavy metal contents in the urban soils in southern Poland. *Chemosphere.* 2019; 229: 214–26. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.209
 115. Ikhimiukor OO, Adelowo OO. Selective metal accumulation by metal-resistant bacteria growing on spent engine oil in single and ternary metal mixtures. *Int J Environ Sci Technol.* 2018; 16 (8): 4945–54. DOI: 10.1007/s13762-018-2137-5
 116. Whitman WB, Goodfellow M, Kampfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, et al. Part A, The Actinobacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd ed. New York, NY: Springer Science + Business Media LLC; 2012. p. 713–7.

117. Stackebrandt E, Breymann S, Steiner U, Prauser H, Weiss N, Schumann P. Re-evaluation of the status of the genus *Oerskovia*, reclassification of *Promicromonospora enterophila* (Jäger et al. 1983) as *Oerskovia enterophila* comb. nov. and description of *Oerskovia jenensis* sp. nov. and *Oerskovia paurometabola* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52 (4): 1105–11. DOI: 10.1099/ij.s.0.02084-0
118. Kämpfer P, Wellner S, Lohse K, Lodders N, Martin K. *Rhodococcus cerastii* sp. nov. and *Rhodococcus trifolii* sp. nov., two novel species isolated from leaf surfaces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; 63 (3): 1024–9. DOI: 10.1099/ij.s.0.044958-0
119. Owsianiak M, Szulc A, Chrzanowski Ł, Cyplik P, Bogacki M, Olejnik-Schmidt AK, et al. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 84 (3): 545–53. DOI: 10.1007/s00253-009-2040-6
120. Kalme S, Parshetti G, Gomare S, Govindwar S. Diesel and Kerosene Degradation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386. *Curr Microbiol.* 2008; 56 (6): 581–6. DOI: 10.1007/s00284-008-9128-6
121. Guo G, Tian F, Ding K, Wang L, Liu T, Yang F. Effect of a bacterial consortium on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and bacterial community composition in Chinese soils. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2017; 123: 56–62. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.04.022
122. Ganesh Kumar A, Vijayakumar L, Joshi G, Magesh Peter D, Dharani G, Kirubakaran R. Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresour Technol.* 2014; 170: 556–64. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.08.008
123. Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial

- consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol.* 2003; 90 (2): 159–68. DOI: 10.1016/S0960-8524(03)00114-7
124. García-Díaz C, Ponce-Noyola MT, Esparza-García F, Rivera-Orduña F, Barrera-Cortés J. PAH removal of high molecular weight by characterized bacterial strains from different organic sources. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2013; 85: 311–22. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.08.016
125. Deshpande RS, Sundaravadivelu D, Techtmann S, Conmy RN, Santo Domingo JW, Campo P. Microbial degradation of Cold Lake Blend and Western Canadian select dilbits by freshwater enrichments. *J Hazard Mater.* 2018; 352: 111–20. DOI: 10.1007/s10532-011-9481-1
126. Chen M, Xu P, Zeng G, Yang C, Huang D, Zhang J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnol Adv.* 2015; 33 (6): 745–55. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.05.003
127. Zampolli J, Zeaiter Z, Di Canito A, Di Gennaro P. Genome analysis and -omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103 (3): 1069–80. DOI: 10.1007/s00253-018-9539-7
128. Haleyur N, Shahsavari E, Taha M, Khudur LS, Koshlaf E, Osborn AM, et al. Assessing the degradation efficacy of native PAH-degrading bacteria from aged, weathered soils in an Australian former gasworks site. *Geoderma.* 2018; 321: 110–7. DOI: 10.1016/j.geoderma.2018.02.004
129. Rehman H, Mohan A, Tabassum H, Ahmad F, Rahman S, Parvez S, et al. Deltamethrin Increases *Candida albicans* Infection Susceptibility in Mice. *Scand J Immunol.* 2011; 73 (5): 459–64. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2011.02521.x
130. Biache C, Ouali S, Cébron A, Lorgeoux C, Colombano S, Faure P. Bioremediation of PAH-contaminated soils: Consequences on formation and

- degradation of polar-polycyclic aromatic compounds and microbial community abundance. *J Hazard Mater.* 2017; 329: 1–10. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.01.026
131. Forsythe JC, De Santo I, Martin R, Tyndall R, Arman K, Pye J, et al. Reservoir Implications of a Spill-Fill Sequence of Reservoir Charge Coupled with Viscosity and Asphaltene Gradients from a Combination of Water Washing and Biodegradation. In: *SPE Annual Technical Conference and Exhibition*. Society of Petroleum Engineers; 2017. DOI: 10.2118/187044-MS
 132. Varjani SJ, Upasani VN. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2017; 120: 71–83. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.02.006
 133. Couling NR, Towell MG, Semple KT. Biodegradation of PAHs in soil: Influence of chemical structure, concentration and multiple amendment. *Environ Pollut.* 2010; 158 (11): 3411–20. DOI: 10.1016/j.envpol.2010.07.034
 134. Stroud JL, Paton GI, Semple KT. Importance of chemical structure on the development of hydrocarbon catabolism in soil. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 272 (1): 120–6. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00750.x
 135. Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J Hazard Mater.* 2009; 169 (1): 1–15. DOI: 10.1007/s13762-019-02414-3
 136. Dean-Ross D, Moody J, Cerniglia CE. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiol Ecol.* 2002; 41 (1): 1–7. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00960.x
 137. Khedkar S, Shanker R. Isolation and classification of a soil actinomycete capable of sulphur-specific biotransformation of dibenzothiophene, benzothiophene and thianthrene. *J Appl Microbiol.* 2015; 118 (1): 62–74. DOI: 10.1111/jam.12665

138. Karpe A V, Dhamale V V, Morrison PD, Beale DJ, Harding IH, Palombo EA. Winery biomass waste degradation by sequential sonication and mixed fungal enzyme treatments. *Fungal Genet Biol.* 2017; 102: 22–30. DOI: 10.1016/j.fgb.2016.08.008
139. Hodge A, Robinson D, Fitter A. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends Plant Sci.* 2000; 5 (7): 304–8. DOI: 10.1016/S1360-1385(00)01656-3
140. Velíšek J, Cejpek K. Pigments of higher fungi: A review. *Czech J Food Sci.* 2011; 29 (2): 87–102.
141. Toaldo IM, Fogolari O, Pimentel GC, de Gois JS, Borges DLG, Caliari V, et al. Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. *LWT - Food Sci Technol.* 2013; 53 (1): 1–8. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.02.028
142. Wilander A, Mannio J. Reply: Is acidification still an ecological threat? *Nature.* 2000; 407 (6806): 827. DOI: 10.1038/35038161
143. Vylkova S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. *PLOS Pathog.* 2017; 13 (2): e1006149. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006149
144. Danhof HA, Vylkova S, Vesely EM, Ford AE, Gonzalez-Garay M, Lorenz MC. Robust Extracellular pH Modulation by *Candida albicans* during Growth in Carboxylic Acids. *MBio.* 2016; 7 (6): e01646-16. DOI: 10.1128/mBio.01646-16
145. Flores N, Thiam A, Rodríguez RM, Centellas F, Cabot PL, Garrido JA, et al. Electrochemical destruction of trans-cinnamic acid by advanced oxidation processes: kinetics, mineralization, and degradation route. *Environ Sci Pollut Res.* 2017; 24 (7): 6071–82. DOI: 10.1007/s11356-015-6035-9
146. Prenafeta-Boldú FX, Summerbell R, Sybren de Hoog G. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with

- biohazard? FEMS Microbiol Rev. 2006; 30 (1): 109–30. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x
147. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. Annu Rev Phytopathol. 1986; 24 (1): 411–51.
 148. Naumann A. A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. Analyst. 2009; 134 (6): 1215–23. DOI: 10.1039/B821286D
 149. Lecellier A, Gaydou V, Mounier J, Hermet A, Castrec L, Barbier G, et al. Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. Food Microbiol. 2015; 45: 126–34. DOI: 10.1016/j.fm.2014.01.002
 150. Papadaki E, Tsimidou MZ, Mantzouridou FT. Changes in Phenolic Compounds and Phytotoxicity of the Spanish-Style Green Olive Processing Wastewaters by *Aspergillus niger* B60. J Agric Food Chem. 2018; 66 (19): 4891–901. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00918
 151. Troncozo MI, Gómez RP, Arambarri AM, Balatti PA, Bucsinszky AMM, Saparrat MCN. Growth and oxidative enzymatic activity of in-vitro cultures of *Ciliochorella buxifolia*. Mycoscience. 2015; 56 (1): 58–65. DOI: 10.1016/j.myc.2014.03.003

PRILOZI

Marija B. Lješević

Biografski podaci

Marija (Branko) Lješević rođena je 10. decembra 1988. godine u Beogradu, Srbija. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Beogradu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2007. godine kao redovan student, a diplomirala u septembru 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,68 sa završnim radom pod naslovom „Biohemijska i molekularna karakterizacija bakterija koje razgrađuju aromatične ugljovodonike”. Master studije na istom fakultetu završila je u septembru 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,60 i odbranila master rad pod naslovom „Ispitivanje biohemijskih karakteristika i biodegradacionog potencijala bakterija izolovanih iz kontaminiranog zemljišta/sedimenta”. Iste godine upisala je doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program doktor biohemijskih nauka.

Od 2014. do 2017. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u oblasti Hemija. Od 2016. godine angažovana je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, kao saradnik u nastavi. Kao istraživač pripravnik zaposlena je od 2017. godine u Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju na projektu III43004 finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Bila je učesnik na međunarodnom projektu finansiranim od strane Japanske agencije za međunarodnu saradnju (JICA) i dobitnik je dve stipendije za učešće na konferencijama namenjene mladim istraživačima Federacije evropskih mikrobioloških udruženja (FEMS). Jedan je od članova istraživačke grupe dobitnika stipendije „Pokreni se za nauku” kompanije Filip Moris i Centra za razvoj liderstva.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Марија Љешевић
Број индекса: ДБ13/2013

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом:

„Микробна деградација сложених ароматичних загађујућих супстанци и анализа производа биодеградације свеобухватном дводимензионалном гасном хроматографијом са масеном спектрометријом”

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

Потпис аутора

У Београду, 12.11.2019. године



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марија Љешевић

Број индекса: ДБ13/2013

Студијски програм: Доктор биохемијских наука

Наслов рада: „Микробна деградација сложених ароматичних загађујућих супстанци и анализа производа биодеградације свеобухватном дводимензионалном гасном хроматографијом са масеном спектрометријом”

Ментор: др Владимир П. Бешкоски, ванредни професор

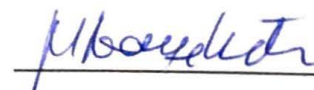
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 12.11.2019. године



Изјава о коришћењу

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

„Микробна деградација сложених ароматичних загађујућих супстанци и анализа производа биодеградације свеобухватном дводимензионалном гасном хроматографијом са масеном спектрометријом”

која је моје ауторско дело.

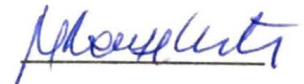
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство (CC BY)
 2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
 - 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
 4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
 5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
 6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)
- (Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 12.11.2019. године



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

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

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

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

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

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