

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Olga S. Radulović

Sistem za bioremedijaciju voda zagađenih fenolom  
upotrebom sočivice (*Lemna minor* L.) i bakterija  
njene rizosfere

doktorska disertacija

Beograd, 2020

University of Belgrade

Faculty of Biology

Olga S. Radulović

System for bioremediation of phenol-polluted waters  
based on the application of the common duckweed  
(*Lemna minor* L.) and the bacteria of its rhizosphere

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

---

Dr Slaviša Stanković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet – mentor

---

Dr Marija Marković, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – mentor

---

Dr Jelena Lozo, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet - član komisije

---

Dr Zoran Vujčić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet - član komisije

---

Dr Ivan Nikolić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet - član komisije

Datum odbrane:

---

## Rezime

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivano je uklanjanje fenola iz tečne hranljive podloge pomoću sočivice (*Lemna minor* L.) i bakterija njene rizosfere. Od ukupnog broja bakterijskih izolata rizosfere, izolovano je 6 sojeva kao najbolji kandidati za uklanjanje fenola: *Lelliottia sp.* 11, *Klebsiella oxytoca* 14, *Serratia marcescens* 27, *Hafnia alvei* 37, *H. paralvei* 43, i *S. nematodiphila* 51. Sočivice inokulisane bilo kojim od ovih sojeva efikasnije u uklanjanju fenol od površinski sterilisanih sočivica kao i od bilo kog od ovih sojeva u obliku slobodne suspenzije (bez sočivica). Soj *H. paralvei* 43, u kombinaciji sa sočivicom, bio je najefikasniji u uklanjanju fenola. Ovaj bakterijski soj utiče i na antioksidativni odgovor sočivice što se ogleda u povećanim enzimskim (GPX) i neenzimskim (ukupni solubilni proteini biljnog tkiva, MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) parametrima oksidativnog stresa. Zimogramskom detekcijom GPX utvrđeno je prisustvo pet različitih izoformi u tkivu sočivice gajenoj u prisustvu fenola, dok su četiri izoforme detektovane kada su na korenu bile prisutne bakterije bez fenola. Fluorescentom mikroskopijom pokazano je da je *K. oxytoca* 14 endofit sa najizraženijim efektom na multiplikaciju sočivica sa ili bez fenola. Iz hranljive podloge bez fenola u kojoj su gajene sočivice i *K. oxytoca* 14 izolovano je 6 fenolnih jedinjenja: luteolin 6,8-di-*C*-heksozid, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, kafeinska kiselina, apigenin 6-*C*-(2"-pentozil)heksozid i *p*-kumarinska kiselina. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su odabrani bakterijski sojevi u kombinaciji sa biljkama sočivice potencijalno rešenje za bioremedijaciju vode zagađene fenolom.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Mikrobiologija

**UDK broj:**

**Ključne reči:** bakterije; sočivica; bioremedijacija; fenol

## Abstract

In this dissertation, the possibility of phenol removal by the common duckweed (*Lemna minor* L.) and by the bacteria of its rhizosphere, was investigated. Six bacterial strains, selected according to their ability of growth on the minimal nutrient medium with phenol, high phenol-resistance, sensitivity to typical antibiotics, biofilm formation, positive effect on the multiplication rates of the plants and bacteria-plant interactions on the root surface were: *Lelliottia* sp. 11, *Klebsiella oxytoca* 14, *Serratia marcescens* 27, *Hafnia alvei* 37, *H. paralvei* 43, and *S. nematodiphila* 51. Duckweed inoculated with any of the aforementioned strains were more efficient in phenol removal than the surface-sterilized duckweed or the bacterial suspensions. The most efficient bacterial strain/duckweed system is the one based on *H. paralvei* 43 and plants. This bacterial strain also modulates the antioxidant response of the plant, indicated by the non-enzymatic (total AsA, soluble proteins, MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the enzymatic parameters. The zymogram detection of GPX in the plants showed 5 phenol-induced GPX isoforms, whereas the bacteria alone induced 4 different GPX isoforms. Bacteria showed a tendency to lower the intensity of GPX expression in plants. *K. oxytoca* 14 is an endophyte which induced a rapid multiplication of the duckweed. Six phenolic compounds were identified in the nutrient medium used to co-culture *K. oxytoca* 14 and the duckweed: luteolin 6,8-di-*C*-hexoside, p-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, apigenin 6-*C*-(2"-pentosyl) hexoside and p-coumaric acid. The results of this dissertation show that the selected bacteria /duckweed systems present an efficient solution for the bioremediation of the phenol-polluted wastewaters.

**Sci field:** Biology

**Specific Sci field:** Microbiology

**UDC number:**

**Key words:** bacteria; duckweed; bioremediation; phenol

## SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
1.1 Konvencionalni tretmani otpadnih voda u postrojenjima za prečišćavanje	2
1.2 Fenol i zagađenje voda	3
1.3 Fenol: hemijska svojstva i biološki efekti	6
1.4 Načini uklanjanja fenola iz zagađenih voda	9
1.4.1 Uklanjanje fenola i njegovih derivata iz vodene sredine rizoremedijacijom	13
1.4.2 Bakterijski metabolizam fenola	16
1.4.3 Genetička regulacija metabolizma fenola kod bakterija	17
1.4.4 Bakterijska rezistencija na fenol	18
1.4.5 Aklimatizacija bakterijskih sojeva na fenol	19
1.5 Sočivice ( <i>Lemnaceae</i> )	21
1.5.1 Gajenje sočivice <i>in vitro</i>	23
1.5.2 Sočivica ( <i>Lemna minor</i> L.)	25
1.5.3 Fitoremedijacija fenola i srodnih jedinjenja pomoću sočivica	26
1.5.4 Fenol i oksidativni status sočivice	28
<b>2. Ciljevi rada</b>	<b>30</b>
<b>3. Materijal i metode</b>	<b>31</b>
3.1 Hranljive podloge	31
3.2 Biljni materijal	31
3.3 Nesterilni biljni materijal	32
3.4 Izolacija bakterijskih vrsta iz rizosfere sočivice	33
3.5 Ekstrakcija genomske dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) bakterijskih sojeva rizosfere sočivice	34
3.6 Lančana reakcija polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) i identifikacija bakterijskih sojeva pomoću sekvenciranja gena za 16S rRNK i gyrB	35
3.7 Bioinformatička analiza i filogenetska stabla	35
3.8 Test rezistencije na fenol	35
3.9 Mogućnost rasta bakterija u tečnoj hranljivoj podlozi sa fenolom kao jedinim izvorom ugljenika	35
3.10 Biohemijska identifikacija bakterija pomoću Vitek 2 sistema	36
3.11 Stopa multiplikacije sočivica	37

3.12	Fluorescentna mikroskopija izabranih bakterijskih sojeva na korenu sočivica	37
3.13	Test formiranja biofilma	37
3.14	Bakterijska rezistencija na antibiotike	38
3.15	Salkowski test formiranja IAA u MS hranljivoj podlozi	38
3.16	Test uklanjanja fenola iz hranljive podloge	38
3.17	Određivanje sastava MS hranljive podloge sa sočivicama i monokulturom <i>K. oxytoca</i> , soj 14, pomoću tečne hromatografije i masene spektrometrije (LC-MS)	39
3.18	Određivanje antioksidativnih enzima i nekih neenzimskih komponentni antioksidativne zaštite sočivice	39
3.18.1	Zimogramska detekcija peroksidaza sočivice <i>in vitro</i>	39
3.18.2	Zimogramska detekcija polifenol oksidaze	40
3.18.3	Detekcija vodonik-peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	40
3.18.4	Detekcija malondialdehida (MDA)	40
3.18.5	Merenje ukupne askorbinske kiseline (AsA)	40
3.18.6	Ekstrakcija i kvantifikacija ukupnih proteina	41
3.18.7	Procena broja bakterija na površini sočivica	41
3.19	Statistička analiza i grafička analiza	41
<b>4.</b>	<b>Rezultati</b>	<b>42</b>
4.1	Gajenje sočivica na H i MS hranljivoj podlozi	42
4.2	Relativna stopa rasta (RGR) sočivica u hranljivoj podlozi sa fenolom	42
4.3	Tolerancija sočivica na prisustvo fenola u hranljivoj podlozi	43
4.4	Genetičke i metaboličke karakteristike izolata	49
4.4.1	Biohemijska karakterizacija odabranih sojeva	49
4.4.2	Ekološki diverzitet izolovanih bakterijskih sojeva	50
4.4.3	Formiranje biofilma <i>in vitro</i>	50
4.4.4	Minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika (MIC)	51
4.5	Stopa multiplikacije sočivica i makroskopski efekti fenola i bakterija na sočivice	53
4.6	Fluorescentne mikrografije i interakcije sočivica i bakterija	55
4.7	Uklanjanje fenola iz MS tečne hranljive podloge	58
4.8	Test IAA produkcije sa Salkowski reagensom u MS hranljivoj podlozi	61
4.9	Zimogramska detekcija polifenol-oksidaze (PPO)	62
4.10	Zimogramska detekcija gvajakol-peroksidaze (GPX)	62
4.11	Detekcija H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA, ukupne AsA i ukupnih proteina	63

4.12	Procena bakterijske biomase na površini korena sočivica	65
4.13	LC-MS analiza MS hranljive podloge sa sočivicama i bakterijskim sojem <i>K. oxytoca</i>	14 65
<b>5.</b>	<b>Diskusija</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>Zaključci</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Literatura</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Prilog 1</b>	<b>88</b>
<b>9.</b>	<b>Biografija</b>	<b>90</b>



## 1. Uvod

Zagađenje životne sredine je gorući problem modernog, globalizovanog sveta u XXI veku. Vodeni ekosistemi su posebno osetljivi na zagađenje zbog specifičnosti tih staništa i njihove složene povezanosti. Kada zagađenje, bilo da je biološkog ili hemijskog porekla dospe u vodeni ekosistem, njegovi delovi se rasejavaju vodotokovima na velike daljine, a dekontaminacija zagađenog staništa postaje skupa, dugotrajna i sa neizvesnim krajnjim ishodom (Tilley i sar. 2014).

Zbog velikih, globalnih klimatskih promena koje ugrožavaju vodene ekosisteme i dostupnost vode za ljudsku upotrebu, pristup pijaćoj vodi je prepoznat kao ljudsko pravo izvedeno iz prava na adekvatan životni standard tako da je Generalna skupština Ujedinjenih Nacija usvojila istorijsku rezoluciju o „pravu na bezbednu i čistu pijaću vodu i sanitarne uslove kao ljudskom pravu koje je neophodno za puno uživanje svih ostalih ljudskih prava“ (Hall i sar. 2014).

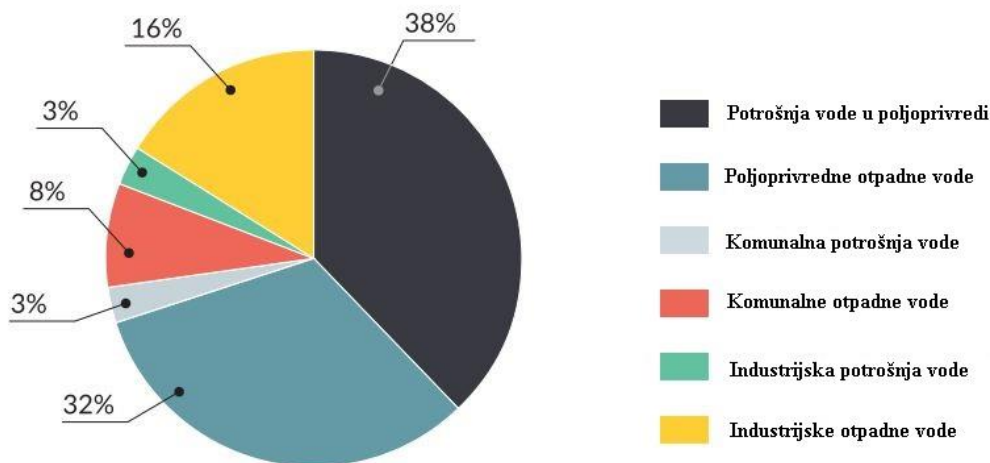
Globalno, za ljudske aktivnosti upotrebe se ogromne zapremine vode. Tokom jedne godine, prema izveštajima UN („The United Nations World Water Development Report 2017“), utroši se oko 4000 km<sup>3</sup> vode, od čega se samo manji deo, tj. oko 44% iskoristi kao pijaća voda i za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta. Poseban problem za životnu sredinu predstavlja činjenica da veći deo upotrebene vode (oko 56% ili više od 2000 km<sup>3</sup> godišnje) završava u otpadnim vodama poreklom iz urbanih naselja, poljoprivrede i industrije (Slika 1).



Slika 1. Industrijske otpadne vode (efluenti) u akumulaciji nastaloj eksploatacijom ruda. U toku je nebiološki tretman otpadne vode adsorpcijom na aktivnom uglju (Preuzeto sa: [www.csiro.au](http://www.csiro.au))

Otpadna voda ili efluenti su, u najširem smislu, definisani kao bilo koja voda na koje uticaj ima ljudska aktivnost (Tilley i sar. 2014). Po svom sastavu, otpadna voda je složeni vodeni rastvor sa različitim udelom materija biološkog i hemijskog porekla, kao i čvrstog otpada koji potiče iz urbanih sredina, industrije, poljoprivrede, ali i plavnih voda koje su se izlile iz reka, jezera, mora ili okeana i u kojima se nalazi različiti otpad iz prirode i iz ljudskih naselja (Rashid-Sally i Jayakody, 2008).

Na svetskom nivou, najveći potrošač vode i izvor otpadne vode je poljoprivreda (70%), dok je na drugom mestu industrija (ukupno 19%, Slika 2). U industriji se koristi mali procenat ukupne vode u toku same proizvodnje (3%), ali se otpušta nesrazmerno visok procenat otpadne vode (16%) koja po pravilu sadrži visoke koncentracije toksičnih supstanci. Samim tim je industrijsku otpadnu vodu teže tretirati i detoksifikovati u odnosu na druge tipove otpadne vode (Mateo-Sagasta i sar. 2015).



Slika 2. Raspodela utrošenih i otpadne vode u različitim oblastima (Preuzeto i modifikovano iz Mateo-Sagasta i sar. 2015)

Tretiranje otpadne vode drastično zavisi od ekonomskog statusa zemlje. Razvijene zemlje tretiraju oko 80% otpadne vode. Zemlje sa višim srednjim prihodom po glavi stanovnika, kojima pripada i Srbija, tretiraju u proseku 38% otpadne vode, dok zemlje sa nižim srednjim prihodima i siromašne zemlje tretiraju 28 odnosno 8% otpadne vode (Sato i sar. 2013).

Ovi podaci dovode do alarmantnog zaključka da se i dalje oko 80% ukupne otpadne vode širom sveta ispušta u vodotokove bez ikakvog prethodnog tretmana, izazivajući nesagledive posledice po ekosistem i zdravlje ljudi. Po poslednjim procenama, godišnje širom sveta umire oko 1.8 miliona dece zbog neadekvatnog tretmana i odlaganja otpadne vode (Corcoran i sar. 2010). Mnogi vodeni ekosistemi nepovratno su izmenjeni ili uništeni antropogenim faktorima, a pogotovo ispuštanjem netretirane otpadne vode u reke (Malmquist i Rundle, 2002). Negativan efekat otpadne vode je jedan od najvažnijih problema u svetskoj javnosti, tako da je mnogo pažnje usmereno ka donošenju efikasnih zakona za kontrolu kvaliteta voda, usavršavanje postojećih tehnologija i pronalaženje novih, alternativnih pristupa za tretman otpadne vode (Gu i sar. 2017).

### 1.1 Konvencionalni tretmani otpadne vode u postrojenjima za prečišćavanje

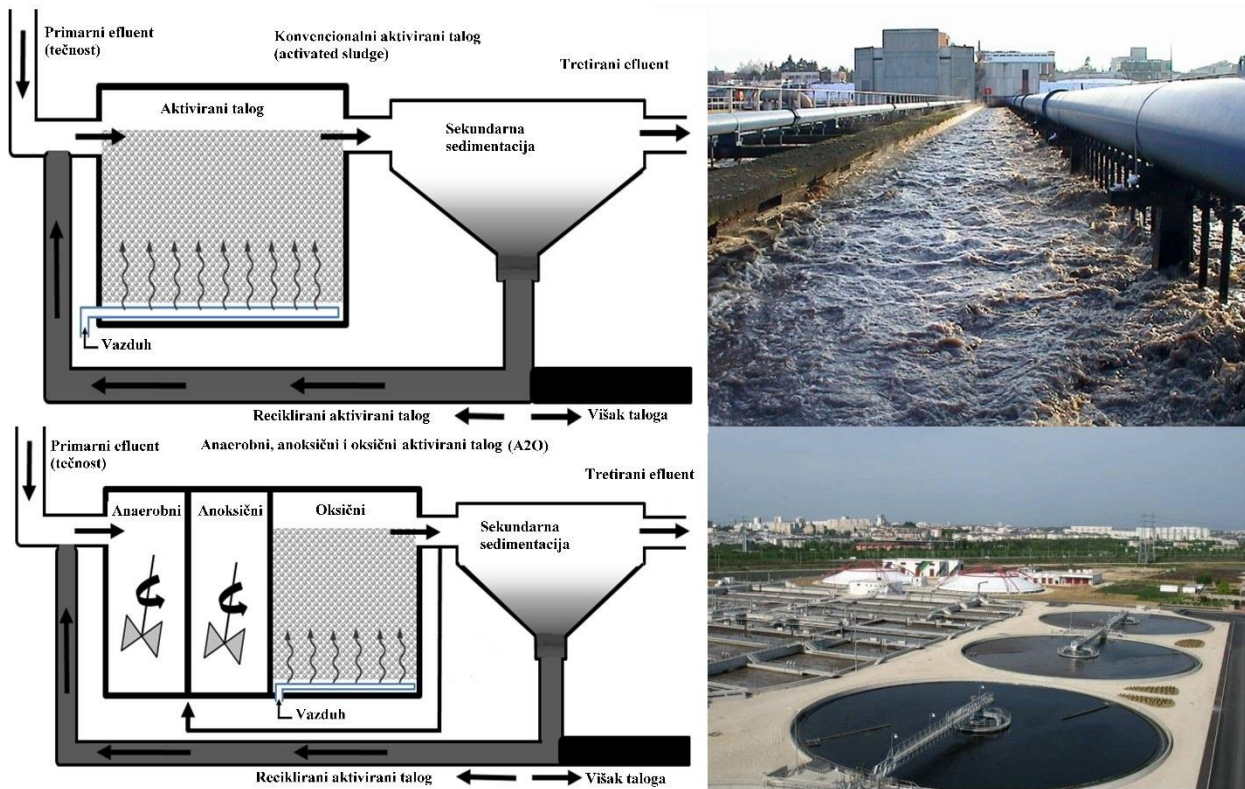
Tretman otpadne vode se definiše kao skup svih metoda za fazno prečišćavanje otpadne vode i smanjenje koncentracije polutanata na dozvoljene nivoe za date supstance. Optimalno, odvija se u postrojenjima za prečišćavanje vode i uključuje pet faza (Tilley i sar. 2014). Minimalna obrada otpadne vode neophodna pred otpuštanje u otvorene vodene površine uključuje primarnu i sekundarnu obradu vode (Slika 3).



Slika 3. Pojednostavljeni shematski prikaz tretmana otpadne vode (preuzeto i modificirano prema [www.watercorporation.com.au/](http://www.watercorporation.com.au/))

Sekundarna faza je centralni deo tretmana otpadne vode koji se najvećim delom zasniva na aerobnoj biodegradaciji, odnosno na korišćenju mešovitih bakterijskih populacija poreklom iz otpadne vode. Ove bakterije, koje nastanjuju sekundarne bazene u obliku bakterijske suspenzije, predstavljaju tzv. aktivirani talog (*activated sludge*) (Carducci i Verani, 2013). Mnoga naučna istraživanja koja se bave bioremedijacijom koriste upravo aktivirani talog kao izvor bakterijskih sojeva za biodegradaciju (Cyzdik-Kwiatkowska i Zielińska, 2016).

U tercijarnoj fazi, procesi iz sekundarne faze se usložnjavaju i rafiniraju (Slika 4, dole). Ovo je ekonomski najskuplja faza tretmana otpadne vode, jer zahteva skupu infrastrukturu i specifične uslove u bioreaktorima (Naughton i Rousselot, 2017). Ovo je takođe faza u kojoj se uvodi dezinfekcija (hlorinacijom), i faza u kojoj se biološkim procesima izdvaja najveći procenat fosfata i nitrata iz otpadne vode, koji kasnije mogu biti iskorišćeni za sintezu mineralnih đubriva (Ward, 2013).



Slika 4. Shematski prikaz konvencionalnog sistema zasnovanog na aktiviranom talogu (gore levo) sa primerom ovog sistema u dva postrojenja za prečišćavanje vode u Francuskoj; bazen sa aktiviranim talogom (gore desno) i tercijarna faza sa anoksično/oksičnim sistemom bioreaktora (A2O) (desno dole). Shematski prikaz A2O sistema: dole levo (preuzeto i modifikovano iz Naughton i Rousselot, 2017)

Dok postoji trend povećanja prečišćavanja otpadne vode u jugoistočnoj Evropi od 2005. godine, u Srbiji je procenat pokrivenosti pogonima za prečišćavanje otpadne vode i dalje vrlo nizak i iznosi oko 10%, kao i 2005. godine. Tada je Srbija imala 37 pogona za prečišćavanje komunalne otpadne vode i 130 pogona za prečišćavanje industrijske otpadne vode (Veljković i sar. 2018). U Srbiji se primenjuje primarna i sekundarna obrada vode – tercijarno prečišćavanje postoji jedino u Subotici. Direktive Evropske Unije (EU) za Srbiju, definisane Poglavljem 27, predviđaju 359 komunalnih postrojenja za prečišćavanje vode u Srbiji, tj. da svako naseljeno mesto sa više od 2000 stanovnika ima sopstveno postrojenje za adekvatan tretman otpadne vode (Todić, 2015; Veljković i sar. 2018).

Prema izveštaju nadležnog Ministarstva iz 2001. godine („Vodoprivredna osnova Republike Srbije“), u centralnoj Srbiji se dnevno oslobodi čak 1 630 000 m<sup>3</sup> industrijske otpadne vode. Najveće opterećenje poticalo je od prehrambene industrije i na drugom mestu, od hemijske industrije.

Dakle, vodotokovi u Srbiji su pod velikim uticajem otpadne vode, kako komunalnog, tako i industrijskog porekla, od kojih skoro 90% nije tretirano pre otpuštanja u vodotokove. Po svom odnosu prema problemu otpadne vode, Srbija se približava rangu najsiromašnijih zemalja sveta koje tretiraju manje od 10% svojih otpadnih voda iako je formalno zemlja sa višim srednjim prihodima po podacima Svetske Banke (Sato i sar. 2013). Ovakva situacija predstavlja ogroman socioekonomski i ekološki problem Srbije i celog Balkana.

## 1.2 Fenol i zagađenje vode

Fenol je jedan od glavnih zagađivača vodenih ekosistema u celom svetu, a pogotovo u zemljama u razvoju (Santana i sar. 2009). Zagađenje voda fenolom je, prvenstveno, posledica masovne upotrebe fenola, njegove toksičnosti, korozivnosti, rastvorljivosti i relativne stabilnosti (Crawford i sar. 2008). Ogromne količine fenola – oko 11 miliona tona godišnje – sintetišu se kao prekursor za dalju upotrebu

u industriji i privredi (tekstilnoj, hemijskoj, petrohemijskoj, metalurškoj, štamparskoj, drvnoprerađivačkoj, kozmetičkoj, farmaceutske i medicinske), a fenol se koristi i u domaćinstvima. Kao nusproizvod fenol nastaje u proizvodnji plastike (fenol-formaldehidne smole), lekova, eksploziva, pesticida i deterdženata (Lurascu i sar. 2009). Kao prekursor, fenol ima ogromnu komercijalnu primenu u sintezi epoksidnih smola, adheziva, boja, farbi i pesticida, kao i u izradi plastike, guma, kao i u obradi drveta (Pilato i sar. 2010).

Kao sporedni, ali nezanemarljivi, izvori fenola su i procesi sagorevanja (sagorevanje fosilnih goriva, šumski požari, spaljivanje čvrstog otpada, termička obrada hrane u mesnoj industriji i domaćinstvima, sagorevanje cigareta), kao i metabolička aktivnost nekih živih organizama (Mihalowicz i Duda, 2007).

Zbog svoje toksičnosti i masovne proizvodnje i upotrebe, sve zemlje sveta imaju stroge zakone koji regulišu upotrebu i transport fenola. U EU, fenol se tretira kao opasan otpad (Alders, 1991). Evropska direktiva 2455/2001/EC određuje maksimum ukupne koncentracije fenola od  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  u pijaćoj vodi i ne više od  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  pojedinih fenolnih derivata (Fontaine i Neyts-Uyttebroeck, 2001).

Američka agencija za zaštitu životne sredine (Environmental Protection Agency of USA, EPA) klasifikuje fenol, zajedno sa mnogim njegovim derivatima, kao jedan od 129 prioriternih polutanata (Santana i sar. 2009). Prema preporukama iste agencije (EPA), dozvoljena koncentracija fenola za slatkovodne ekosisteme ne sme prelaziti  $600 \mu\text{g L}^{-1}$ , dok je maksimalna dozvoljena koncentracija fenola u pijaćoj vodi  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Babich i Davies, 1981).

Dozvoljene gornje granice fenola u vodi za piće u velikoj većini zemalja nisu više od  $1 - 2 \mu\text{g L}^{-1}$  zbog rizika da nedetektovane količine fenola, koje ulaze sa otpadnim vodama u postrojenja za prečišćavanje, budu podvrgnute hlorinaciji, u kojoj nastaju karcinogeni hlorofenoli (Paisio i sar. 2016). U Srbiji se koncentracija fenola iznad  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  u vodi za piće smatra visokom (Marinović i sar. 2016). Uprkos strogoj kontroli kvaliteta vode, kontaminacija pijaćih voda hlorofenolima, koji su nastali slučajnom hlorinacijom fenola, se javlja i dalje, čak i u zemljama tzv. prvog sveta (Barry i sar. 2007).

Iako su regulative koje se tiču rukovanja, transporta i korišćenja fenola rigorozne u EU, i dalje se periodično prijavljuju veća izlivanja fenola, uglavnom pri transportu u severnoevropskim lukama i u vezi sa petrohemijskom industrijom (Haakkinen i Posti, 2014).

Najpoznatiji slučaj izlivanja fenola zabeležen je u Južnoj Koreji 1991. godine kada je, zbog pucanja cevi u hemijskoj fabrici, preko 30 tona čistog fenola iscurilo u obližnju reku Nakdong, što je izazvalo ogromno zagađenje životne sredine i na desetine hiljade slučajeva akutnog trovanja fenolom (Kim i sar. 1994). Drugi slučaj dogodio se u Vijetnamu, 2016. godine, kada je izlivanje nepoznate količine fenola, gvožđe-hidroksida i cijanida iz fabrika za proizvodnju plastike i obradu gvožđa izazvalo masovni pomor ribe i vodenih beskičmenjaka, među kojima i mnogih zaštićenih vrsta (Nguyen, 2016). Nekoliko meseci posle izlivanja, preko 10% uzoraka mekušaca i zglavkara iz dubokog mora bilo je i dalje kontaminirano fenolom (Hoang i sar. 2018).

Uz navedena akcidentna izlivanja, ogromnu opasnost po životnu sredinu, a posebno po vodene ekosisteme, predstavlja konstantno, nepropisno dreniranje kanalizacije i industrijskih otpadne vode. Smatra se da industrijska otpadna voda sadrži fenol u veoma visokoj koncentraciji od 50 do  $600 \text{mg L}^{-1}$  (Paisio i sar. 2009). Kada se sumiraju podaci na svetskom nivou, dolazi se do zabrinjavajuće procene da se oko tri miliona tona fenola godišnje ispusti kroz industrijsku otpadnu vodu u otvorene vode (Paisio i sar. 2016). Oksidacija fenola u vodi je usko povezana sa velikom potrošnjom rastvorenog kiseonika što je još jedan indirektan, negativan uticaj koji zagađenje fenolom ima na živi svet (Davidenko i sar. 2004).

U Srbiji, prema podacima Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije (SEPA), kao najugroženiji vodotokovi i izvori pijaće vode kad je reč o zagađenju fenolom su sledeći: Ibar (zbog

rada TE „Obilić“ i naglog rasta drvno-prerađivačke i tekstilne industrija u novopazarskom okrugu), Drina (usled aktivnosti drvnoprerađivačke industrije na obe obale reke), površinske vode u okolini Bora (usled višedecenijske eksploatacije u Rudarsko-topioničarskom kompleksu „Bor“, Slika 5), Dunav i Tamiš u okolini Pančeva (zbog rada Naftne Industrije Srbije, NIS) (Veljković, 2018).



Slika 5. Otpadna voda rudnika pored flotacijske deponije u rudarsko-topioničarskom basenu „Bor“ (preuzeto sa: [www.eco-vest.com](http://www.eco-vest.com))

### 1.3 Fenol: hemijska svojstva i biološki efekti

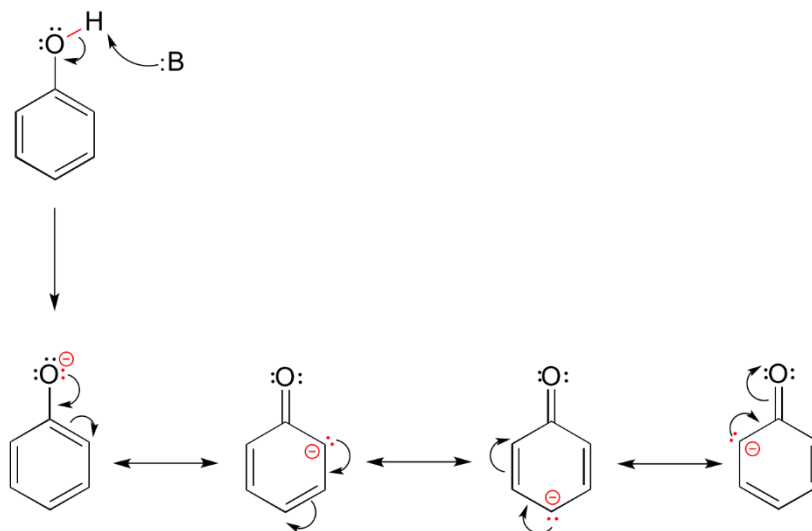
Fenol (hidroksibenzen, karbolna kiselina) je aromatično jedinjenje, molekulske formule  $C_6H_5OH$ . To je kristalno, higroskopsko jedinjenje bez boje u čistom stanju. Može biti bledoroze boje usled prisustva primesa (Slika 6).

Prag mirisa u vazduhu je 0,04 ppm i, ako je rastvoren u vodi, u opsegu između 1 ppm i 7,9 ppm. Relativno visok prag mirisa fenola u vodi predstavlja bezbedonosni problem, jer ovaj visok prag znači da fenol može proći nedetektovano u toku tretmana otpadne vode ili posle direktnog izlivanja u vodeni ekosistem (Amoore i Hautala, 1983).



Slika 6. Kristali čistog (>99.5%) fenola

Fenol ima slabo kiselu reakciju ( $pK_a = 10$ ) i delimično disosuje u rezonantno stabilisani, reaktivni benzoksi-anjon (Slika 7). Tačka topljenja fenola je  $43^\circ\text{C}$ . Ima karakteristični neprijatni miris koji se često opisuje kao antiseptički miris. Relativno je lako rastvorljiv u vodi i velikoj većini organskih rastvarača kao što su aromatični ugljovodonici, alkoholi, ketoni, etri, kiseline i halogenovani ugljovodonici (Haynes, 2016).



Slika 7. Reakcija disocijacije fenola na fenolati anjon koji prelazi u rezonantno stabilisani benzoksi-anjon (preuzeto sa: [www.chem.libretexts.org/](http://www.chem.libretexts.org/))

Fenol je prvi put, pod arhaičnim nazivom „karbolna kiselina“, izolovan 1834. godine iz katrana, za potrebe industrije. Od 1843, počinje da se koristi i današnji naziv - fenol, izveden iz reči „phéne“ koja se odnosi na aromatični prsten (Schorlemmer, 1884).

Od sredine 19. veka, osim u industriji, fenol je korišćen i kao prvo snažno baktericidno sredstvo i smatra se da je značajno doprineo suzbijanju većine zaraznih bolesti (Worboys, 2013). Njegova upotreba kao dezinficijensa nastavila se do sedamdesetih godina 20. veka, tako da su i domaćinstva, do skoro u istoriji, bila ogroman izvor zagađenja fenolom. Iako je postepeno zamenjivan bezbednijim sredstvima, fenol se još uvek koristi za sterilizaciju instrumenata u nekim sredstvima za ispiranje grla (kao što je „Lysterine“), oralnim lozengama, dermatologiji (za hemijsku ablaciju nekih kožnih promena) ili kao lokalni anestetik (Crawford i sar. 2008).

U prirodi, fenol relativno brzo podleže biodegradaciji i nema visok potencijal bioakumulacije u živim sistemima. Međutim, na njegovo vreme poluraspada u životnoj sredini snažno utiču mnogi faktori, tako da se u životnoj sredini fenol može zadržati od <1 dana (u vazduhu) do >14 dana u veoma zagađenim, anoksičnim zemljištima i vodama (Crawford i sar. 2008).

Važno je naglasiti da toksični efekti fenola nisu posledica inhibicije specifičnih metaboličkih procesa, već neselektivnih, strukturnih oštećenja ćelija (Berger i Wyss, 1952). Fenol je izrazito nukleofilno jedinjenje koje lako reaguje sa pozitivno naelektrisanim supstratima, poput amino-grupa u proteinima. Njegova toksičnost potiče i od hidrofobnosti i od slobodnih fenoksil-radikala, koji nastaju delovanjem ćelijskih antioksidativnih enzima (Hansch i sar. 2000). Sve organele, tkiva ili organi sa većom koncentracijom proteina su zato posebno osetljivi na izlaganje fenolu. Kod biljaka su najosetljivije mitohondrije i hloroplasti, a kod sisara su posebno su osetljivi koža, pluća, bubrezi, jetra, slezina i centralni nervni sistem. Iako fenol ima izrazito baktericidno delovanje, Gram-negativne bakterije su po pravilu rezistentnije na fenol od Gram-pozitivnih, zbog zaštitnog efekta

lipopolisaharida u ćelijskom zidu i manjeg prisustva peptidoglikana u odnosu na koje je fenol posebno reaktivan (Ručka i sar. 2015; Ebbensgard i sar. 2018).

Fenol dovodi do akutne i hronične toksičnosti. Svako dugotrajno izlaganje fenolu, čak i u vrlo malim količinama, izrazito je štetno za živi svet, a pogotovo za vodena staništa.

Fatalna trovanja fenolom kod čoveka su zabeležena u veoma širokom opsegu koncentracija, već od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  do  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  (Crawford i sar. 2008). Posebno su osetljiva deca, a postoje i velike individualne razlike u osetljivosti kod odraslih, određene pre svega zdravstvenim stanjem i telesnom masom (Babich i Davies, 1981). Najčešći oblici akutnog trovanja fenolom su povezani sa profesionalnim izlaganjem u fabrikama i laboratorijama, i to najčešće udisanjem isparenja ili slučajnim izlivanjima fenola na nezaštićenu kožu. Usled anestetičkih svojstava fenola, koja potiču od neurolyze tj. lokalne demijelinizacije nerava, često se kontakt sa fenolom u početku oseća, što odlaže blagovremenu dekontaminaciju (D'Souza i Warner, 2019).

Fenol je i neuro-, kardio-, nefro- i hepatotoksičan (Wang i sar. 2011). Fenolna isparenja su opasna već iznad koncentracije od  $0.001 \text{ mg dm}^{-3}$ , a u plućima se zadržava skoro 90% udahnutog fenola (Davidenko i sar. 2004). Čak i razblaženi rastvori fenola (1-2%) mogu izazvati sistemsko trovanje kod ljudi ako je izlaganje dugotrajno ili ako je izložena veća površina tela, jer fenol brzo prodire kroz sve slojeve kože. Slični efekti utvrđeni su i za druge sisare (Monteiro-Riviere i sar. 2001).

Tokom tzv. „Nakdong incidenta“, nekoliko dana izlaganja niskoj koncentraciji fenola i hlorofenola (po zvaničnoj proceni,  $0.005 \text{ ppm}$  fenola i  $0.00084 \text{ ppm}$  hlorofenola) bilo je dovoljno da se na hiljade korisnika vode iz Nakdonga javi sa tipičnim simptomima akutnog trovanja: iritacijom ždrela, suvim kašljem, konjunktivitisom, gastrointestinalnim tegobama (dijarejom, mučninom, bolom u stomaku), aritmijom i kardiomiopatijom, iritacijom lica i ruku (Kim i sar. 1994).

Iako su hronična izlaganja fenolu danas retka, poznato je da je udisanje 5% fenolnih para korišćenih u dezinfekciji u bolnicama u 19. veku izazivalo hronično trovanje osoblja koje se manifestovalo anoreksijom i gastrointestinalnim tegobama, hepatitisom, neuromišićnim ispadima, iritacijom ždrela i poremećajem bubrežnog rada (Gardner i sar. 2009).

Vodene životinjske vrste su posebno osetljive na prisustvo fenola. Stabilnost rastvorenog fenola u vodenim ekosistemima, pogotovo pri hroničnom izlaganju niskim koncentracijama, dovodi do smanjenog fekunditeta i usporenog rasta, kao i do češće pojave infekcija zbog oštećenja integumenta kod riba i vodenih beskičmenjaka (Babich i Davis, 1981). Za ribe, akutna letalna koncentracija pri kojoj polovina populacije umire posle 96h ( $LC_{50, 96h}$ ) iznosi između  $8.9$  i  $24.9 \text{ mg L}^{-1}$  (mada je za neke gajene vrste utvrđena i još veća osetljivost, već pri koncentracijama  $<2 \text{ mg L}^{-1}$ ). Za akvatične beskičmenjake, srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) za akutnu toksičnost iznosi oko  $3.1 \text{ mg L}^{-1}$ , dok za alge ona iznosi  $61.1 \text{ mg L}^{-1}$  što pokazuje da su čak i relativno niske koncentracije fenola pri kratkom vremenu izlaganja dovoljne da indukuju ozbiljne negativne posledice na živi svet vodenih ekosistema (Duan i sar. 2018). Kod algi, subletalne koncentracije fenola izazivaju smanjenje biomase, usporeni rast i smanjenu koncentraciju hlorofila a i b (Shigeoka, 1988; Tišler i Zagorc-Končan, 1995; Erturk i sar. 2012). U hloroplastima i mitohondrijama, fenol i njegovi derivati izazivaju slične efekte: fizička oštećenja tilakoidnih membrana, smanjenu sintezu ATP-a i poremećaj elektron-transportnog lanca. Kao posledica nabrojanog, smanjena je geneza  $O_2$  zavisna od  $CO_2$  u hloroplastima (Moreland i Novitzky, 1987). Reaktivnost fenola sa unutrašnjim strukturama mitohondrija i hloroplasta i esencijalnim procesima fotosinteze i ćelijske respiracije iskorišćena je za sintezu različitih herbicida, strukturno izvedenih iz fenola (Oettmeier i sar. 1987). Ovakvi herbicidi izazivaju ultrastrukturna oštećenja u vidu deformisanih grana hloroplasta i krista mitohondrija već pri niskoj inicijalnoj koncentraciji od  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  (Tigre i sar. 2015).

Što se tiče karcinogenosti fenola, prema klasifikaciji EPA, fenol pripada kategoriji D, tj. grupi jedinjenja koja nije moguće klasifikovati po karcinogenosti zbog nedostatka dokaza na osnovu



postojećih animalnih i humanih studija (Crawford i sar. 2008). Slično, u EU, fenol se klasifikuje kao mutagen druge kategorije, tj. supstanca koja može imati mutageni (genotoksični) efekat, ali čija heritabilnost nije dokazana na dovoljnom broju studija (Moeller i sar. 2014). Fenol nije genotoksičan (ne reaguje sa DNK), ali posredno, preko svog nespecifičnog delovanja sa proteinima, može inhibirati sintezu DNK (Painter i Howard, 1981). Mehanizmi toksičnosti fenola se dodatno komplikuju time što fenol može da deluje kao tzv. ko-karcinogen ili tumor-promotor, odnosno faktor koji pojačava genotoksični efekat drugih, dokazano karcinogenih, faktora (Weisburger, 1992).

Dakle, bez obzira na dugu upotrebu fenola, svi oblici njegove interakcije sa živim organizmima, kao i njegove zdravstvene posledice nisu potpuno rasvetljeni. Poseban rizik predstavljaju hlorofenoli koji relativno lako nastaju hlorovanjem fenola u postrojenjima za prečišćavanje vode, i koji, za razliku od fenola, podležu bioakumulaciji, biokoncentraciji i poznati su kao karcinogeni (Ge i sar. 2017). Zbog masovne proizvodnje i upotrebe, kao i relativne stabilnosti (pogotovo u anaerobnim uslovima u zagađenim, posebno anoksičnim vodama, ali i u postrojenjima za prečišćavanje vode tokom tercijarne faze tretmana otpadne vode), fenol se često opisuje i kao rekalcičirajući (doslovno „uporni“, stabilni) polutant, za čije je potpuno uklanjanje iz vodene sredine potrebna posebna remedijaciona strategija koja uključuje i konvencionalne, i nekonvencionalne metode (Gupta i Thakur, 2017).

#### 1.4 Načini uklanjanja fenola iz zagađenih voda

Za uklanjanje fenola iz zagađenih voda, dostupno je više konvencionalnih fizičko-hemijskih i hemijskih metoda, čiji su tipični primeri hemijska oksidacija, adsorpcija, ekstrakcija rastvaračem, koagulacija i flokulacija, reverzna osmoza, fotokataliza i elektroliza, i napredni oksidacioni procesi - NOP (Benhebal i sar. 2013; Cordova Villegas i sar. 2016; Thomas i sar. 2017; Dawidar i sar. 2017; Piotrowska i Pierozynski, 2017). Iako se ovi procesi efikasni, često su u praksi ograničeni nastankom hemijskog taloga, toksičnih intermedijera, skupom infrastrukturuom, inicijalnom koncentracijom fenola i drugim karakteristikama otpadne vode (pH, temperatura, hemijski sastav) (Sridevi i Pradesh, 2009). Takođe, mnogi od ovih procesa su potencijalni rizik po životnu sredinu (Tabela 1).

Pored fizičkih i hemijskih metoda, u širokoj upotrebi su i biološke metode uklanjanja fenola iz svih zagađenih voda, uključujući i otpadne (Pradeep i sar. 2015). Zapravo, kada se procenjuje efikasnost ne-bioloških metoda u uklanjanju fenola, biološke metode često služe kao osnovna referenca u odnosu na koju se porede svi parametri efikasnosti: ekološka škodljivost, nastanak hemijskog taloga i toksičnih intermedijera, kao i ekonomska isplativost (Cordova Villegas i sar. 2016). U najvećem broju slučajeva, biološke metode su po svim navedenim parametrima superiorne u odnosu na ne-biološke (Pradeep i sar. 2015; Cordova Villegas i sar. 2016). Biološke metode, u najširem smislu, predstavljaju sve metode koje se oslanjaju na sposobnost živog sveta da detoksifikuje životnu sredinu uklanjanjem toksičnih i štetnih faktora. Sve biološke metode za uklanjanje polutanata se označavaju zajedničkim terminom **bioremedijacija** (od grčke reči za život, *bios*, i latinske imenice za lek, *remedium*).

Bioremedijacija je relativno mlada grana biotehnologije. Koncept bioremedijacije je bio poznat naučnoj javnosti od prve polovine 20. veka (Tausz i Donath, 1930), a kao formalni početak bioremedijacije smatra se 1975. godina kada je pokazano da dodavanje nutrijenata zemljištu, zagađenim naftnim derivatima, ubrzava eliminaciju zagađenja putem stimulacije rasta nativnih bakterijskih populacija (Raymond i sar. 1975). Ovo je ujedno bio i prvi primer primene bioremedijacije *in situ*, tj. biološkog tretmana na mestu zagađenja. Bioremedijacija i tretman otpadne vode su se razvijali uporedo – 1967. godine bakterije, izolovane iz zemljišta zagađenog naftom, testirane su uspešno u tretmanu otpadne vode u postrojenjima za prečišćavanje u SAD (Litchfield, 2005).

Tabela 1. Pregled konvencionalnih fizičko-hemijskih metoda za uklanjanje fenola iz vode

Naziv metode	Princip	Prednosti	Nedostaci
Adsorpcija	Vezivanje na adsorbentu, najčešće aktivnom uglju.	Ekonomski isplativ, relativno neškodljiv po okolinu. Proces je reverzibilan.	Efikasan samo za niže koncentracije fenola. Ostavlja toksičan ugalj.
Ekstrakcija rastvaračem	Rastvorljivost fenola u velikom broju različitih rastvarača.	Efikasan proces.	Inicijalna koncentracija fenola ne sme da bude viša od 2 g L <sup>-1</sup> . Skup, zbog utroška velike količine rastvarača i njegovog odlaganja.
Koagulacija i flokulacija	Fenol se koncentruje u agregate: prvo koagulum, pa flokulume, pomoću jona metala (Ti, Fe, Zr, Al) i industrijskog anjonskog flokulanta.	Efikasan proces, relativno neškodljiv po životnu sredinu.	Skup zbog reagensa i mehaničkog izdvajanja flokula.
Reverzna osmoza	Pumpe pokreću vodu nasuprot osmotskog pritiska te se rastvorena jedinjenja i fenol zadržavaju na ultrafiltracionim membranama.	Efikasan proces.	Začepljenja membrana (čestice, rast algi i gljiva) često dovode do kolapsa procesa. Voda kojom se ispira membrana sadrži koncentrovani fenol i zahteva posebno odlaganje.
Fotokataliza (fotokatalitička oksidacija)	Odvija se u prisustvu katalizatora (uglavnom cink(II)oksida, ZnO) i UV zračenja, koji započinju radikalnu reakciju degradacije fenola.	Ekonomski isplativ za zemlje u razvoju, efikasan.	Hemijski talog, potreba za izdvajanjem katalizatora na kraju reakcije.
Elektroliza (elektrolitička oksidacija)	Otpadne vode cirkulišu oko specijalnih elektroda, dok spoljašnji izvor električne energije katalizuje degradaciju fenola.	Visokoefikasan, neškodljiv po životnu sredinu.	Skupa infrastruktura, potrebni specifični uslovi i posebna konstrukcija elektroda.
Hemijska oksidacija	Hemijski oksidanti (Cl <sub>2</sub> , Cl <sub>2</sub> O, hloramini, ferati, permanganati, O <sub>3</sub> ).	Blagi uslovi reakcije (pH, temperatura), jeftin proces.	Neefikasan, pod nekim uslovima može proizvesti toksične aminobenzene ili hlorofenole kao nusproizvod.
NOP	Upotreba ozona, UV zračenja, i vodonik-peroksida, često kombinovano (O <sub>3</sub> /UV, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV); ili Fentonovog reagensa.	Ne stvara hemijski talog, efikasan proces.	Visoka cena reagensa i izvora UV zračenja.

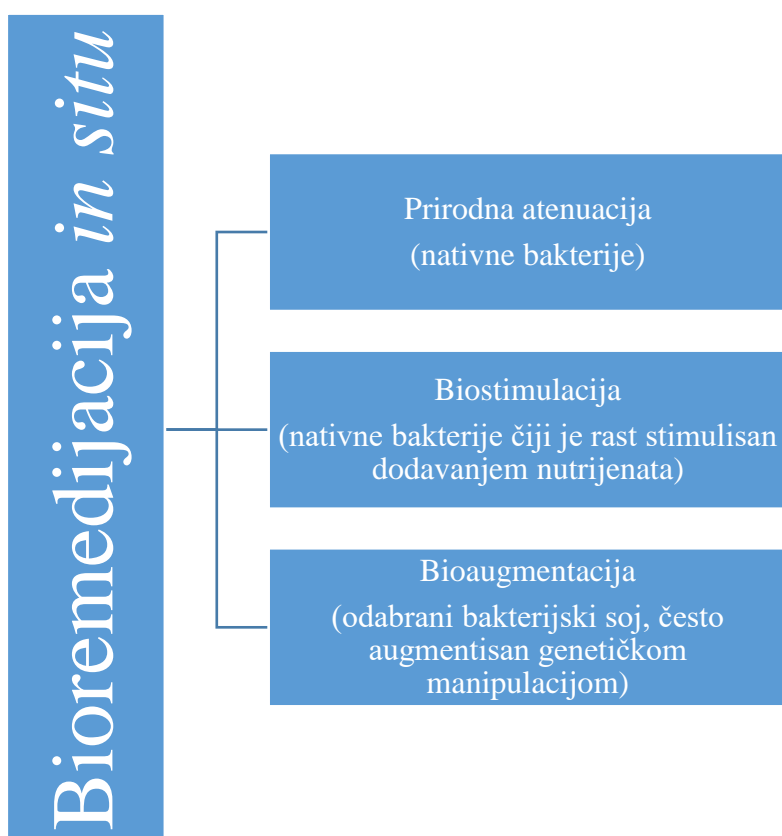
Bioremedijacija zasnovana na gljivama i bakterijama se označava kao mikrobijalna bioremedijacija. Drugi tip bioremedijacije je fitoremedijacija, zasnovana na upotrebi biljaka. Treći tip bioremedijacije se zasniva na upotrebi prečišćenih enzima, u slobodnom rastvoru ili čestice, imobilizovanim za različite materijale (Pradeep i sar. 2015).

Bez obzira o kom tipu bioremedijacije je reč, bioremedijacija je po pravilu ekološki neškodljiva, neinvazivna, i jeftinija od većine ne-bioloških metoda. Na kraju, bioremedijacija nudi trajno rešenje za zagađenje životne sredine jer transformiše toksične supstance do potpuno neškodljivih jedinjenja, što uglavnom nije slučaj sa ne-biološkim metodama (Dzionek i sar. 2016).

Bioremedijacija se najčešće odvija *in situ*, tj. na mestu koje je zahvaćeno zagađenjem. Ovo je najčešće praktično primenjen oblik bioremedijacije (Perelo, 2010). Alternativno, bioremedijacija se može

izvesti i na posebno pripremljenoj lokaciji, udaljenoj od mesta zagađenja, tj. *ex situ* (Perelo, 2010; Angellucci i Tomei, 2016).

Bioremedijacija *in situ* uglavnom podrazumeva mikrobijalnu bioremedijaciju, i može da se dalje podeli na prirodnu atenuaciju, biostimulaciju i bioaugmentaciju. Prirodna atenuacija se oslanja na native mikroorganizme rizosfere, pre svega bakterije, uz monitoring kao jedini oblik ljudske intervencije. Međutim, kako mikroorganizmi koji degraduju toksična jedinjenja često ne čine više od 10% ukupne populacije, ovaj prirodni proces je spor i neefikasan (Dzionek i sar. 2015). Biostimulacija podrazumeva dodavanje spoljašnjeg izvora nutrijenata, u mnogim slučajevima kada atenuacija nije dovoljna. Ovo je ujedno i prvi uspešno primenjen oblik bioremedijacije koji je objavljen u naučnoj literaturi (Raymond i sar. 1975). Bioaugmentacija se najčešće primenjuje, jer podrazumeva uvođenje čistih bakterijskih kultura za koje je dokazano da uspešno eliminišu tačno određene polutante, a često su ovi sojevi i genetički poboljšani (augmentisani) kako bi im se povećala efikasnost (Slika 8). Pri bioaugmentaciji, bakterijski soj koji se koristi nije nativan za dato područje što ima pozitivne i negativne efekte. Pozitivni efekti se svode na činjenicu da introdukovani bakterijski soj može slobodno da razmenjuje genetički materijal sa nativnim bakterijama i time da poboljša njihovu efikasnost biodegradacije. Negativni efekti su češći i podrazumevaju postepeno odumiranje introdukovane bakterijske populacije zbog kompeticije sa nativnim bakterijama (Pimmata i sar. 2013). Dakle, svaki oblik bioremedijacije *in situ* ima svoje prednosti, ali i ograničenja. Koji će se tip bioremedijacije primeniti, zavisi od tipa toksičnog jedinjenja i zagađenog staništa.



Slika 8. Podela mikrobijalne bioremedijacije *in situ* prema načinu upotrebe bakterijskih populacija

Iako je bioremedijacija *in situ* češća, jednostavnija i jeftinija strategija, *ex situ* metode omogućavaju veću kontrolu uslova i veći uspeh bioremedijacije. *Ex situ* bioremedijacija podrazumeva ekstrakciju zagađenog zemljišta ili ispumpavanje zagađene vode, kako bi se oni tretirali na drugom mestu. Ova efikasna, ali skupa i zahtevna tehnika se oslanja na razne pristupe, od kojih je najuspešniji primena čitavih veštačkih ekosistema po tipu močvara, u kojima se ravnopravno koriste mikrobijalna bioremedijacija i fitoremedijacija (Rawe i sar. 2006).

Fitoremedijacija je relativno nov ekološki bezbedan i ekonomski višestruko isplativ pristup za bioremedijaciju zagađenog zemljišta, vazduha i voda, koji je u svetu prisutan skoro dvadeset godina (Cunningham i Ow, 1996; Litchfield, 2005). Zasniva se na specifičnostima biljnih tkiva koja mogu da transformišu i koncentrišu različite polutante, pre svega metale i organske kontaminante, ali i na brzini povećanja biljne biomase i sposobnosti biljaka da uspevaju i u vrlo nepogodnim staništima (Salt i sar. 1998).

Fitoremedijacija se može podeliti na rizofiltraciju - koren uklanja rastvorene polutante, fitoekstrakciju - biljke akumuliraju ili hiperakumuliraju polutante, a zatim se oni uklanjaju zajedno sa celim biljkama, kroz tzv. žetvu, fitostabilizaciju ili fitosekvestraciju (lat. sequestrare - „odvojiti, deponovati“) - biljke smanjuju toksičnost polutanta bez aktivne transformacije, absorpcijom i vezivanjem, čime sprečavaju njegovo širenje kroz vodu ili zemljište, i fitovolatilizaciju - polutanti se oslobađaju preko listova u isparljivoj formi (Vasavi i sar. 2010; Lee i sar. 2013). Neki autori fitoremedijaciji dodaju i rizodegradaciju, sinergistički proces u kome učestvuju i koren biljke i bakterije rizosfere, a čiji je krajnji efekat potpuna degradacija polutanta (Rao i sar. 2010) (Slika 9). Svi oblici fito- i uopšte, bioremedijacije koji se odigravaju preko korena označavaju se i kao rizoremedijacija (Kuiper i sar. 2004), dok se bioremedijacija preko listova zove filoremedijacija (Wei i sar. 2017).



Slika 9. Najčešća podela fitoremedijacije prema mehanizmu uklanjanja polutanta

Biljke nisu sposobne za potpunu biodegradaciju ili tzv. potpunu mineralizaciju organskih polutanata (potpunu transformaciju do nivoa CO<sub>2</sub>), ali efikasnost biljaka u fitoremedijaciji, kao i kod bakterija, može se poboljšati ubacivanjem poželjnih gena (Vasavi i sar. 2010). Iako pojedine biljke imaju sposobnost akumulacije toksičnih jedinjenja, hiperakumulaciju, tj. sposobnost koncentrisanja toksičnih jedinjenja (uglavnom metala) u vrlo visokim količinama, koje bi inače prouzrokovale fitotoksični efekat kod većine biljaka, ona prirodno postoji samo kod malog broja biljnih vrsta. Geni hiperakumulatora mogu se koristiti za stvaranje transgenih sorti (Kramer, 2010).

Bitno je napomenuti da su iz biljaka izolovani i mnogi enzimi koji su uspešno primenjeni u degradaciji nekih polutanata, a od značaja za ovu tezu su studije koje pokazuju da fenolna jedinjenja mogu biti uspešno transformisana peroksidazama rena (HRP) i krompira (Bilal i sar. 2017; Kurnik i sar. 2015) ili polifenol oksidazama (PPO) krompira i jabuka (Mukherjee i sar. 2013; Šalić i sar. 2018). Yadav i sar. (2017) testirali su peroksidaze iz egipatskog krastavca (*Luffa aegyptiaca*) i postigli oksidaciju toksičnih fenolnih jedinjenja iz industrijskih otpadne vode u netoksične proizvode.

Ovakva primena enzima za neutralizaciju ili degradaciju toksičnih jedinjenja je treći oblik bioremedijacije, uz fitoremedijaciju i mikrobijalnu bioredemedijaciju. Kao izvor enzima mogu poslužiti različiti organizmi kao što su biljke, gljive i bakterije, a kao najčešći tip enzima koriste se peroksidaze, pre svega za bioremedijaciju zagađenja organskim aromatičnim jedinjenjima (Bansal i Kanwar 2013). U ove svrhe često se primenjuju i lakaze, poreklom iz gljiva, sa specifičnošću prema raznim aromatičnim polimerima (Yang i sar. 2017).

Primena izolovanih i prečišćenih enzima bez živih organizama ili njihovih delova ima niz prednosti: enzimi nisu podložni inhibiciji u prisustvu mnogih toksina koji su letalni za žive organizme već pri niskoj koncentraciji, ne zavise od sezonskih ciklusa i od količine nutrijenata, ne zahtevaju posebne uslove skladištenja i transporta kao živi organizmi (Nicell, 2000). Ipak, njihova praktična primena je i dalje često ograničena opštim faktorima koji utiču na aktivnost i stabilnost enzima, poput pH i temperature, nedostatka kofaktora ili ko-supstrata, ili prisustva hemijskih inhibitora (Cordova Villegas i sar. 2016).

Zagađenje fenolom i srodnim jedinjenjima predstavlja poseban izazov za bioremedijaciju zbog svoje raširenosti i učestalosti, kao i zbog toga što najteže pogađa vodena staništa. Za ovakav tip zagađenja, najčešće se primenjuju rizoremedijacija i bioaugmentacija.

#### **1.4.1 Uklanjanje fenola i njegovih derivata iz vodene sredine bioremedijacijom rizosfere**

Bioremedijacija rizosfere se često opisuje kao sinergija fitoremedijacije i bakterijske bioremedijacije, pri čemu se koriste prirodne interakcije rizosfere i njenih bakterija (Kuijper i sar. 2004).

Rizosfera (od grčkih reči: *rhiza* – koren i *sphera* – oblast) definisana je još 1904. od strane biljnog fiziologa Lorenca Hiltnera kao prostor oko korena oblikovan metaboličkom aktivnošću biljke i prisustvom bakterija koje koriste metabolite biljke (Hiltner 1904; Hartmann i sar. 2009). Koren biljke je metabolički vrlo aktivan i sintetiše ugljene hidrate, aminokiseline, peptide, organske kiseline, proteine, fenolna jedinjenja, kao i ugljenu kiselinu: Oko 10 – 40% ukupne metaboličke aktivnosti biljke odigrava se u korenu (Jones i sar. 2004). Male količine ovih primarnih i sekundarnih metabolita, koji se označavaju kao eksudati korena, difunduju u spoljašnju sredinu i deluju kao izvor hranljivih materija, ali i kao signalni molekuli za mikroorganizme, a pogotovo bakterije. Osim toga, i mukoza korena i odbačene vršne ćelije korena predstavljaju hranu mikrofauni rizosfere, ali mogu da deluju i kao „mamac“ za patogene i da apsorbuju neke teške metale (Hawes i sar. 1998).

Kao svaki prostor koji sadrži hranjive materije i mikroorganizme, rizosfera je i mesto horizontalnog genskog transfera (HGT) (Aminov, 2011). Sticanje rezistencije na antibiotike, odnosno patogenizacija nepatogenih i oportunističkih sojeva bakterija, takođe se može dogoditi u rizosferi (Berg i sar. 2005). Sličnim mehanizmom se razmenjuju i geni za metabolizam fenolnih jedinjenja. (Wang i sar. 2014).

U odnosu na čisto bakterijsku bioremedijaciju, bioremedijacija pomoću rizosfere ima nekoliko prednosti. Pre svega, metabolički spektri bakterija i biljaka se često dopunjuju (Gkorezis i sar. 2016). Dobar primer su hlorofenoli (aktivna jedinjenja mnogih biocida) koji su suviše toksični za direktnu bakterijsku degradaciju, dok ih biljke (sočivice) mogu transformisati u manje toksične intermedijere koji zatim mogu podleći potpunoj biodegradaciji od strane bakterija (Mkandawire i Dudel, 2007). Biosorpcija je još jedan mehanizam bioremedijacije, čiji se značaj tek poslednjih godina posebno prepoznaje, pogotovo za uklanjanje polutanata iz vodene sredine (Agostini i sar. 2011). Biosorpcija

je pasivni, neenzimski proces adsorpcije na površini živih organizama, koji se ponašaju onda kao biosorbenti. Kao biosorbenti deluju i biljke i bakterije i gljive, ali i bakterijski biofilmovi. Međutim, biljke u ovom smislu imaju prednost zbog mnogo veće ukupne površine ćelijskih zidova koji adsorbuju različita jedinjenja. Na kraju, i biljke i mikroorganizmi proizvode i jedinjenja označena kao biosurfaktanti, koji dodatno povećavaju rastvorljivost mnogih aromatičnih jedinjenja u vodi i time olakšavaju aktivnost degradativnih enzima (Gkorezis i sar. 2016).

Iako je bioaugmentacija i dalje najčešći i najuspešniji oblik bakterijske bioremedijacije *in situ*, sa brojnim prednostima u odnosu na korišćenje nativnih mikroorganizama (prirodnu atenuaciju) i biostimulaciju, jedan od glavnih problema je nepredvidljivo ponašanje izabranih bakterijskih sojeva koji se unose u zagađenu životnu sredinu. Na ponašanje introdukovanih bakterijskih sojeva mogu uticati: protozoe koje se hrane bakterijama, kompeticija sa nativnim mikroorganizmima, nedostatak nutrijenata ili preferencija prema drugom supstratu, a ne fenolu u konkretnom slučaju (Kuiper i sar. 2004). Ova ograničenja se velikim delom uspešno rešavaju bioremedijacijom rizosfere, jer koren biljke predstavlja bogat izvor različitih nutrijenata i predstavlja biološku i fizičku zaštitu za unesene bakterijske sojeve. Najveći uspeh bioremedijacije se postiže kada su biljke vrlo rano (stadijum semena) inokulisane izabranim bakterijskim sojevima (Ma i sar. 2011). Rano izlaganje semena poželjnim bakterijskim sojevima se naziva „biopriming“ i prvu primenu je imao u agrokulturi (O’Callaghan, 2016). Poznato je da mnogi bakterijski sojevi povezani sa rizosferom imaju pozitivan efekat na rast biljke (plant growth promoting bacteria, PGPB). Takođe je uočena specifičnost genetičke strukture bakterija u rizosferi određene biljke, jer biljka aktivno selektuje specifične bakterijske sojeve koji je naseljavaju (Berg i Smalla, 2009; Backer i sar. 2018). Odličan primer ovoga su dali Toyama i sar. (2009) koji pokazuju da rizosfera vodene biljke *Spirodela polyrhiza*, putem sopstvenih fenolnih jedinjenja u eksudatu korena, privlači bakterije sa genima za katehol-dioksigenazu.

U vodenim ekosistemima su hranljive materije prisutne u veoma razblaženom stanju za razliku od zemljišta. U rizosferi vodenih biljaka koncentrisanije su hranljive materije i opstanak mikrofaune u rizosferi je zbog toga poboljšan. Značaj interakcija u rizosferi vodenih biljaka prepoznat je u naučnoj javnosti poslednjih godina, ali mnogi aspekti ovih interakcija su još nedovoljno poznati (Backer i sar. 2018).

Bakterije su vrlo retko slobodnoživeći organizmi u prirodi. One pokazuju tendenciju formiranja biofilmova (složenih egzopolisahardnih struktura) na svim dostupnim nepokretnim površinama poput kamenja ili površine biljaka (epifitni biofilm) (Neagu i sar. 2017). Epifitni biofilmovi povećavaju verovatnoću preživljavanja populacije tako što olakšavaju komunikaciju, razmenu nutrijenata i genetičkog materijala između bakterijskih ćelija (Kurzbaum i sar. 2016).

Biofilmovi pružaju fizičku zaštitu bakterijama, ali i biljkama, a poseduju i kapacitet za adsorpciju i koncentrisanje nekih toksičnih jedinjenja koja bi inače ostala u razblaženom stanju u vodenim ekosistemima, pa samim tim i nedostupna za biodegradaciju (Backer i sar. 2018). Dodatno, biofilm omogućuje da se bakterije, zajedno sa biološkim ili nebiološkim nosačem, odstrane iz vode posle završene bioremedijacije (Yamaga i sar. 2010).

Pored biofilmova, pažnja istraživanja je usmerena i ka izučavanju bakterija koje imaju pozitivnu hemotaksiju za određeno toksično jedinjenje.

Primećen je veliki broj bakterijskih vrsta koje pokazuju pozitivnu hemotaksiju, naročito za monociklične aromatične ugljovodonike, koje mogu i da degradiraju (Pandey i Jain, 2002). Hemotaksija je bitna i za inicijalnu kolonizaciju površine korena, jer biljke aktivno privlače bakterije sa poželjnim metaboličkim osobinama (Hartmann i sar. 2009). Biljke oslobađaju i druge vrste organskih jedinjenja sa aromatičnom strukturom – terpene, flavonoide i neke derivate lignina koji su po strukturi slični poliaromatičnim jedinjenjima, tako da je moguće da biljke mogu da indukuju istovremenu ekspresiju bakterijskih gena za degradaciju više različitih vrsta aromatičnih jedinjenja

(Gkorezis i sar. 2016). Sve više studija pokazuje da eksudati korena čak i direktno stimulišu biodegradaciju određenih jedinjenja, kao npr. fenola u prisustvu ugljenih hidrata iz eksudata korena kukuruza (Jin i sar. 2019), ili benzo[a]pirena u prisustvu fenolnih eksudata barske leće (Toyama i sar. 2011).

Najveći broj radova koji se bave bioremedijacijom rizosfere i dalje se tiču rizosfere zemljišnih biljaka (često sa industrijskim značajem) i sojeva *Pseudomonas sp.* kao bioremedijatora (Kuiper i sar. 2004). Vrste *Pseudomonas sp.* uklanjaju razne fenolne derivate iz rizosfere šećerne trske (polihlorovana bifenilna jedinjenja (PCB)), pšenice (2,4 – fenoksisirćetnu kiselinu i fenol) i kukuruza (3-metilbenzoat) (Brazil i sar. 1995; Kingsley i sar. 1994; Ronchel i sar. 2001).

Tabela 2. Pregled bakterijskih monokultura koje degradiraju fenol *in vitro*

Bakterijski soj	Reference
<i>Acinetobacter sp.</i> W-17	Tibbles i Baecker, 1989; Oliver i sar. 2002; Usama Beshay i sar. 2002, Desouky Abd-El-Haleem i sar. 2003.
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> AH, P23	Nakamura i Sawada, 2000; Yamaga i sar. 2010.
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Heilbuth i sar. 2003.
<i>Achromobacter sp.</i> E1	Watanabe i sar. 1996a
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Kowanlska i sar. 1998.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Bastos i sar. 2000a.
<i>Alcaligenes sp.</i> E2, R5, P5	Baek i sar. 2001.
<i>Arthrobacter sp.</i>	Shinoda i sar. 2000.
<i>Azoarcus sp.</i>	Arutchevian i sar. 2005.
<i>Azospirillum brasilense</i>	Arutchevian i sar. 2006.
<i>Bacillus brevis</i>	Mutzel i sar. 1996.
<i>Bacillus thermoleovorans</i> A2	Moustafa El-Sayed, 2003.
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Salmeron- Alcocer i sar. 2007.
<i>Comamonas testosteroni</i> P15, E23	Yap i sar. 1999.
<i>Desulfatiglans anilini</i>	Xie i Mueller, 2018.
<i>Halomonas sp.</i>	Hinteregger i Streichsbier, 1997.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Heesche-Wagner, 1999; Shawabkeh i sar. 2007.
<i>Magnetospirillum sp.</i>	Shinoda i sar. 2000.
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	Salmeron-Alcocer i sar. 2007.
<i>Micrococcus sp.</i>	Tibbles i Baecker, 1989.
<i>Nocardia sp.</i>	Vijaygopal i Viruthagiri, 2005.
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Arutchevian i sar. 2005.
<i>Pseudomonas putida</i>	Tibbles i Baecker, 1989; Monterio i sar. 2000; Reardon i sar. 2000; Mahadevaswamy i sar. 2004; Tsuey-Ping Chung, 2005; Gurusamy Annadurai i sar. 2007.
<i>Pseudomonas pictorum</i> NCIM 2077	Sheeja i Murugesan, 2002.
<i>Pseudomonas stutzeri</i> SPC2, P7	Ahamad i Kunhi, 1996.
<i>Pseudomonas testosteroni</i> CPW301	Kim i sar. 2002.
<i>Pseudomonas sp.</i> STI, NBM11	Safia Ahmed, 2001; Mohanty i Jena, 2016.
<i>Ralstonia eutropha</i>	Ozlem Tepe i Arju, 2007.
<i>Rhodococcus sp.</i> DCB-p0610	Pai i sar. 1995.
<i>Rhodococcus erthropolis</i> UPV-I	Prieto i sar. 2002.
<i>Serratia sp.</i>	Pradhan i Ingle, 2007; Sahin i sar. 2017.
<i>Sphingomonas bisphenolicum</i> AO1	Ko-Ichi Oshiman i sar. 2007.

Ukupan broj bakterijskih sojeva koji degradiraju fenol se neprekidno povećava (Tabela 2). Nisu svi bakterijski sojevi podjednako kompetentni da nasele rizosferu, pa samim tim nisu ni svi podjednako primenljivi u bioremedijaciji rizosfere. Bakterijska kompetencija za rizosferu određene biljke zavisi od sposobnosti hemotaksije, molekuskog prepoznavanja bakterije i biljke, adherencije bakterija za površinu, efikasnosti korišćenja eksudata korena biljke i uspeha kolonizacije (Berg i Smalla, 2009).

Svi navedeni procesi su genetički determinisani, što dodatno pokazuje da su odnosi između rizosfere i bakterija složeni i specifični (Kuiper i sar. 2004).

Većina istraživanja, vezanih za rizoremedijaciju ili bioremedijaciju uopšte, izvedena je sa bakterijskom monokulturom (Yamaga i sar. 2010). Mešovite bakterijske kulture se ređe primenjuju (Tabela 3). Smatra se da su konzorcijumi bakterija bolji izbor kada zagađenje izaziva više od jednog tipa zagađujućeg jedinjenja.

Mnoga istraživanja vezana za uklanjanje fenola zasnivala su se na hipotezi da su autohtone bakterijske vrste bolji izbor od alohtonih, zbog održavanja prirodne ravnoteže koja je već ozbiljno narušena zagađenjem (Kuiper i sar. 2004; Toyama i sar. 2009; Hoang i sar. 2010; Toyama i sar. 2011).

Tabela 3. Pregled mešovitih bakterijskih kultura i konzorcijuma koji degraduju fenol *in vitro*

Mešovite bakterijske kulture i konzorcijumi	Reference
Mešovite bakterijske populacije rizosfere <i>S. polyrhiza</i>	Hoang i sar. 2010.
Mešovite bakterijske populacije izolovane iz filtera za prečišćavanje vode (dominantna vrsta <i>Bacillus sp.</i> )	Gu i sar. 2018.
<i>Corynebacterium sp.</i> i <i>Bacillus sp.</i> konzorcijum	Li i sar. 2018.
<i>Clostridium ghonii</i> , <i>C. hastiforme</i> , <i>C. glycolicum</i> (konzorcijum)	Letonneau, 1995.
<i>P. putida</i> F1 i <i>Bacillus sp.</i> soj JS150	Rogers i Reardon, 2000.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> i <i>P. stutzeri</i>	Jin i sar. 2019.

U prirodi su konzorcijumi i prostorno organizovani u složenim biofilmovima. Za efikasnost konzorcijuma u eksperimentalnim uslovima, neophodni su i pogodni nosači koji će podržati ovakvu organizaciju biofilma (Gu i sar. 2016; Bridier i sar. 2017).

Nosači, organski i neorganski, dobijeni reciklažom sirovina ili složenim tehnološkim postupcima, povećavaju efikasnost bakterijske remedijacije u svim slučajevima, omogućujući formiranje biofilмова. Korišćenjem kompozitnog adsorbenta za *P. putida*, Li i sar. (2015) su eliminisali ukupnu količinu fenola čak i kada je inicijalna koncentracija fenola iznosila 5 g L<sup>-1</sup>.

#### 1.4.2 Bakterijski metabolizam fenola

Bakterije razgrađuju širok spektar aromatičnih ugljovodonika. Veliki broj sojeva je sposoban za potpunu biodegradaciju toksičnih fenolnih jedinjenja, odnosno tzv. mineralizaciju do nivoa CO<sub>2</sub> i molekula vode (Agostini i sar. 2011). Mnogi bakterijski sojevi, naročito u grupi Gram-negativnih bakterija, kao što su *Pseudomonas sp.* i *Acinetobacter sp.* mogu da rastu na minimalnoj hranljivoj podlozi sa fenolom kao jedinim izvorom ugljenika (Tibbles i Baecker, 1989; Munoz i sar. 2001; Liu i sar. 2016).

Metabolizam fenolnih jedinjenja, kod predaka današnjih bakterija, najverovatnije je nastao iz metaboličkih puteva za biodegradaciju lignina i njegovih derivata (Masai i sar. 2014). Najveći broj bakterijskih vrsta koje mogu da degradiraju fenol su Gram-negativne bakterije, a najčešći predstavnici su *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Comamonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Ralstonia* i *Cupriavidus sp.* Znatno je manji broj Gram-pozitivnih bakterija koje mogu da degradiraju fenol, poput vrsta iz rodova *Bacillus*, *Rhodococcus* i *Arthrobacter sp.*



Iako u prirodi postoje i aerobna i anaerobna bakterijska degradacija monoaromatičnih jedinjenja, anaerobna je znatno ređa jer zahteva znatno više energije od aerobne, i stoga je bez šireg značaja za bioremedijaciju. Anaerobna degradacija se odvija preko benzoil-CoA intermedijera koji se postepeno transformiše u acetyl-CoA serijom redukcija i hidratacija, posle čega se acetyl-CoA uključuje u sintezu masnih kiselina (Ručka i sar. 2015).

Sa druge strane, u aerobnoj biodegradaciji aromatičnih jedinjenja, osnovni princip je uvek isti: složeni tok sporednih reakcija se „uliva“ u nekoliko centralnih intermedijera, koji zatim podležu isecanju prstena i postepeno se transformišu dioksigenazama do intermedijera za ciklus limunske kiseline. Ključni enzimi ovog procesa su oksigenaze, koje uvode hidroksilnu grupu ili grupe i zatim isecaju aromatični prsten između dve hidroksilne grupe. Raznovrsne monooksigenaze i dioksigenaze uključene u hidroksilaciju imaju tzv. relaksiranu specifičnost prema supstratu. Ova osobina, uz veliki broj sporednih transformacija bočnih lanaca, omogućava istom setu enzima da transformiše veliki broj srodnih aromatičnih jedinjenja (Perez-Pantoja i sar. 2010).

Prvi korak u aerobnoj degradaciji fenolnih jedinjenja je skoro uvek hidroksilacija, katalizovana fenol – hidroksilazama (fenol – monooksigenazama) koje pokazuju veliku genetičku konzerviranost (Nordlund i sar. 1993; Peng i sar. 2015). Hidroksilacijom fenola (i mnogih derivata fenola) nastaje katehol (hidroksihinon). Katehol je supstrat za dioksigenaze koje raskidaju prsten na meta – ili orto – položaju. Isecanje aromatičnog prstena na meta – položaju (meta – isecanje) je najčešći oblik obrade benzenovog prstena i dovodi do nastanka 2-hidroksi-2-oksovalerata od koga će nastati piruvat i acetaldehid (Perez-Pantoja i sar. 2012).

Fenol – hidroksilaze (EC 1.14.13.7) većeg broja Gram-negativnih proteobakterija koje degradiraju fenol su multikomponentni enzimi. Tri glavne subjedinice –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  - formiraju heksamernu monooksigenazu, dok preostale subjedinice čine gvožđe(II)sulfid ( $F_2S_2$ ) reduktazu, regulator i pomoćni protein. Nonhem di-gvožđe centri sa karboksilatnim mostovima bakterijskih multikomponentnih monooksigenaza reaguju sa protonima, elektronima, molekulskim kiseonikom i ugljovodoničnim skeletom (Murray i Lippard, 2007). Reduktaza prima elektrone redukovanog nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata (NAD(P)H) i prenosi ih preko flavinskog i 2Fe-S centra do katalitičkog centra monooksigenaze (Mason i Cammack, 1992). Mala regulatorna subjedinica vezuje se za monooksigenazu i najverovatnije povezuje potrošnju elektrona sa oksidacijom ugljovodoničnog skeleta (Sazinsky i sar. 2006). Pomoćni protein može biti uključen u ugradnju gvožđa u aktivno mesto monooksigenaze (Tinberg i sar. 2011).

### 1.4.3 Genetička regulacija metabolizma fenola kod bakterija

Zbog jednostavnosti uzgajanja i mogućnosti za genetičku manipulaciju, bakterije su idealni kandidati za bioremedijaciju. Ovome doprinosi organizacija gena koji kontrolišu degradativni metabolizam fenola, koji se nalaze na ekstrahromozomskoj DNK, ili su inkorporirani u genomsku DNK bakterije. Plazmidni sa genima za degradaciju fenola se mogu razmenjivati među bakterijskom populacijom u rizosferi i na taj način se može povećati efikasnost remedijacije na nivou populacije (Wang i sar. 2014). Iako se većina podataka o genima za bakterijski katabolizam fenolnih jedinjenja odnosi na zemljišne bakterije i rizosferu kopnenih biljaka, može se pretpostaviti da se slični biološki procesi dešavaju i u rizosferi vodenih biljaka.

Geni odgovorni za katabolizam fenola i srodnih jedinjenja u genomskoj DNK nalaze se u zajedničkim klasterima ili vrlo blizu jedni drugih. U najvećem broju slučajeva, geni za multikomponentnu fenol-hidroksilazu i meta-katabolički put nalaze se uz regulatorne gene koji kodiraju XylR/DmpR-tip aktivatora i GntR-tip represora. Ovakva organizacija postoji kod vrsta *Burkholderia sp.*, *Acinetobacter sp.* i *Pseudomonas putida* (Takeo i sar. 2006; Tuan i sar. 2013). Česta pojava je i redundantnost gena, tj. klasteri gena mogu da se nalaze u duplikatima na hromozomima i/ili na plazmidima (kao plazmid pJP4 kod *Cupriavidus necator*) i da se po potrebi aktiviraju, zavisno od tipa

aromatičnog jedinjenja. Ovo omogućuje finu regulaciju genske ekspresije zavisnu od promenljivih uslova spoljašnje sredine (Ručka i sar. 2015).

Najefikasniji biodegradatori fenola i srodnih jedinjenja upravo imaju veći broj kopija gena za katabolizam fenola, pored dodatnih gena za katabolizam poliaromatičnih jedinjenja i teško razgradivih monocikličnih jedinjenja kao što su benzen, toluen i ksilen. Mnogi od ovih gena diseminovani su pomoću HGT, o čemu svedoče njihove paraloge kopije kod srodnih vrsta.

Degradativni plazmidi su najčešći vektori za prenos ovih gena. Poboljšanje efikasnosti biodegradacije aromatičnih jedinjenja moguće je postići transferom pomenutog plazmida pJP4 poreklom iz odabranih sojeva *E. coli* i *C. necator* u mikropopulacije zemljišnih bakterija, čime se postiže bolja degradacija hlor-supstituisanih fenola (Garbisu i sar. 2017). Jussila i sar. (2007) preneli su uspešno TOL plazmid (često označen kao PWW0), koji nosi gene za degradaciju toluena, sa izabranih sojeva *P. putida* (donor) u *P. oryzaehabitans* (recipijent) tako da i recipijent onda može da degraduje toluen i srodna aromatična jedinjenja. TOL plazmid je dobro okarakterisan plazmid koji se prirodno nalazi kod različitih sojeva *P. putida* i može se uspešno preneti na mnoge druge recipijente (Franklin i sar. 1981; Benson i Shapiro, 1978).

Osim za biodegradaciju, bakterije mogu biti genetički modifikovane da služe kao senzori koji detektuju ranu pojavu određenih toksičnih jedinjenja. Na taj način su razvijeni *Pseudomonas sp.* biosenzori za p-nitrofenol i *Rhodococcus sp.* biosenzori za hlorovane fenole i nitrofenole sa *lux* operonima koji omogućavaju aktiviranje bioluminiscencije u prisustvu fenola (Banik i sar. 2008; Riedel i sar. 1993; Emelyanova i Reshetilov, 2002).

#### 1.4.4 Bakterijska rezistencija na fenol

Rezistencija na fenol i kapacitet degradacije fenola mogu se posmatrati kao dva zasebna fenomena, iako je jasno da svi sojevi koji efikasno degradiraju fenol pri visokim inicijalnim koncentracijama moraju biti i rezistentni na isti. Međutim, iako su praktično sve bakterije sposobne da degradiraju fenol i srodna jedinjenja u niskim inicijalnim koncentracijama, znatno manji broj je sposoban da preživi visoke inicijalne koncentracije fenola i da pritom održi isti nivo metaboličke aktivnosti. Razlog razdvajanja mehanizama biodegradacije fenola i rezistencije na fenol potiče od činjenice da je katabolizam fenolnih jedinjenja nastao veoma rano u istoriji živog sveta (najverovatnije iz katabolizma lignina). Nasuprot tome, rezistencija na fenol je evolutivno vrlo mlada pojava, koja se javila tek sa industrijskom revolucijom sredinom 18. veka i oslobađanjem ogromne količine fenola i drugih srodnih ksenobiotskih jedinjenja u životnu sredinu. Bakterije su se brzo prilagodile nagloj promeni uslova životne sredine pa su tokom ranog 20. veka identifikovani prvi sojevi bakterija rezistentni na fenol (Harde i Jackson, 1918). Pokazano je da je bakterijsku rezistenciju na fenol moguće indukovati *in vitro*, izlaganjem bakterijskih populacija rastućim koncentracijama fenola (Berger i Wyss, 1952).

Berger i Wyss (1952) prvi primećuju da je rezistencija na fenol mnogo rasprostranjenija kod Gram-negativnih nego kod Gram-pozitivnih bakterija, a razlog tome je struktura ćelijskog zida. Izaki i sar. (1981) pokazuju da rezistencija na pentahlorofenol (PCP) pojedinih Gram-negativnih bakterijskih sojeva ne mora nužno biti praćena i efikasnom biodegradacijom. Analiza rezistencije čestih bolničkih bakterijskih sojeva na uobičajene fenolne dezinficijense potvrđuje da je rezistencija Gram-negativnih bakterija pre urođena (zavisna od same strukture ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija), nego što je zavisna od plazmidne regulacije i drugih specifičnih mehanizama rezistencije (Guimaraes i sar. 2000).

Ipak, iako je struktura ćelijskog zida odlučujući faktor za rezistenciju na fenol, postoje i neki retki visokospecifični mehanizmi rezistencije. Efluks pumpe odgovorne za multirezistentnost (multi-drug resistance, MDR) služe i za izbacivanje PCP kod multirezistentnih sojeva *P. aeruginosa*. PCP će kod nekih sojeva ove bakterije izazvati prolaznu rezistenciju i na neke antibiotike, upravo zbog aktivacije

pumpe preko vezivanja za njen genski aktivator (Zhang i sar. 2018). *P. aeruginosa* je u ovom smislu izuzetak koji potvrđuje pravilo. Fenolna jedinjenja, prirodnog i veštačkog porekla, kod većine bakterija indukuju i veću osetljivost na antibiotike (Miklasinka-Majdanik i sar. 2018). Takođe, mnogi fenol-rezistentni, Gram-negativni sojevi izolovani iz bolnica nisu istovremeno rezistentni na više antibiotika (Guimaraes i sar. 2000).

U jednoj od retkih studija koje se bave genetičkom osnovom rezistencije na fenol Ajaz i sar. (2004) tvrde da se geni za rezistenciju na fenol nalaze na plazmidnoj DNK, jer se rezistencija na fenol gubi posle degradacije plazmidne DNK akridin-narandžastim (acridine orange, AO), tokom tzv. „plasmid curing“ metode. „Cured“ bakterijske ćelije, naknadno transformisane plazmidnom DNK, ponovo ispoljavaju rezistenciju na fenol.

Postoje primeri Gram-pozitivnih bakterija koje imaju visok nivo rezistencije na fenol i degradacije fenola i izolovane su uglavnom iz aktiviranog taloga industrijskih postrojenja za prečišćavanje otpadne vode (Banerjee i Gohshai 2010; Hasan i Jabeen 2014; Erekat i sar. 2017). Vrlo redak primer Gram-pozitivnih bakterija izolovanih iz prirodnog, nezagađenog staništa su sojevi *Bacillus sp.* i *Streptomyces sp.* iz rizosfere ramondi (*Ramonda serbica* L. i *R. nathaliae* L.). Ovi sojevi su preživljavali i efikasno eliminisali visoku inicijalnu koncentraciju fenola ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) za samo 6 dana u laboratorijskim uslovima. Fiziologija ovih bakterijskih sojeva nastala je evolucijom u ovoj vrlo specifičnoj, uzanoj ekološkoj niši kakva je rizosfera ramondi, u kojoj biljke sintetišu i akumuliraju veliku količinu fenolnih jedinjenja pred ulazak u period mirovanja (Đokić i sar. 2011).

Iako je rezistencija na fenol prisutna kod većina Gram negativnih sojeva, njihova degradativna sposobnost je ograničena inicijalnom koncentracijom fenola. Samo pojedini sojevi ovih bakterija su sposobni da eliminišu fenol na ovako visokoj inicijalnoj koncentraciji fenola. Za većinu sojeva, koncentracija koju mogu eliminisati ne prelazi  $1200 \text{ mg L}^{-1}$  (Pradhan i Ingle, 2007). Vrlo retko, bakterije ostaju metabolički aktivne na višim koncentracijama ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) i degradiraju fenol (Jabeen i Hasan, 2014).

Iako je rezistencija na fenol dugo poznat fenomen u naučnoj javnosti, malo pažnje je posvećeno potpunom rasvetljavanju svih njenih mehanizama. Bez obzira na mali broj studija koje se bave ovom temom, očigledno je da, osim nespecifične, urođene rezistencije koju pruža lipopolisaharidni omotač Gram-negativnih bakterija, postoje i razni drugi, specifični mehanizmi rezistencije.

#### **1.4.5 Aklimatizacija bakterijskih sojeva na fenol**

Inhibicija metaboličke aktivnosti pri visokim inicijalnim koncentracijama fenola je osnovno ograničenje mnogih bakterijskih sojeva koji bi mogli biti upotrebljeni u bioremedijaciji zagađenja fenolom. Ovo ograničenje može da se prevaziđe aklimatizacijom *in vitro*.

Aklimatizacija ili aklimacija se definiše kao progresivno prilagođavanje organizma na promenu uslova spoljašnje sredine koje izaziva fiziološki stres. Aklimatizacija se može podeliti na metaboličku (biohemijску) i strukturnu (odnosno, morfološku). Metabolička aklimatizacija se uglavnom objašnjava promenama koncentracije i/ili aktivnosti esencijalnih enzima. Strukturna aklimatizacija podrazumeva promene u sastavu membranskih lipida, pogotovo u pogledu udela zasićenih hemijskih veza u odnosu na nezasićene, ili sintezu zaštitnih faktora (najpoznatiji primer su molekularni šaperoni). Aklimatizacija u laboratorijskim uslovima se često naziva aklimacija, mada mnogi autori ova dva pojma koriste podjednako (Gu i sar. 2016).

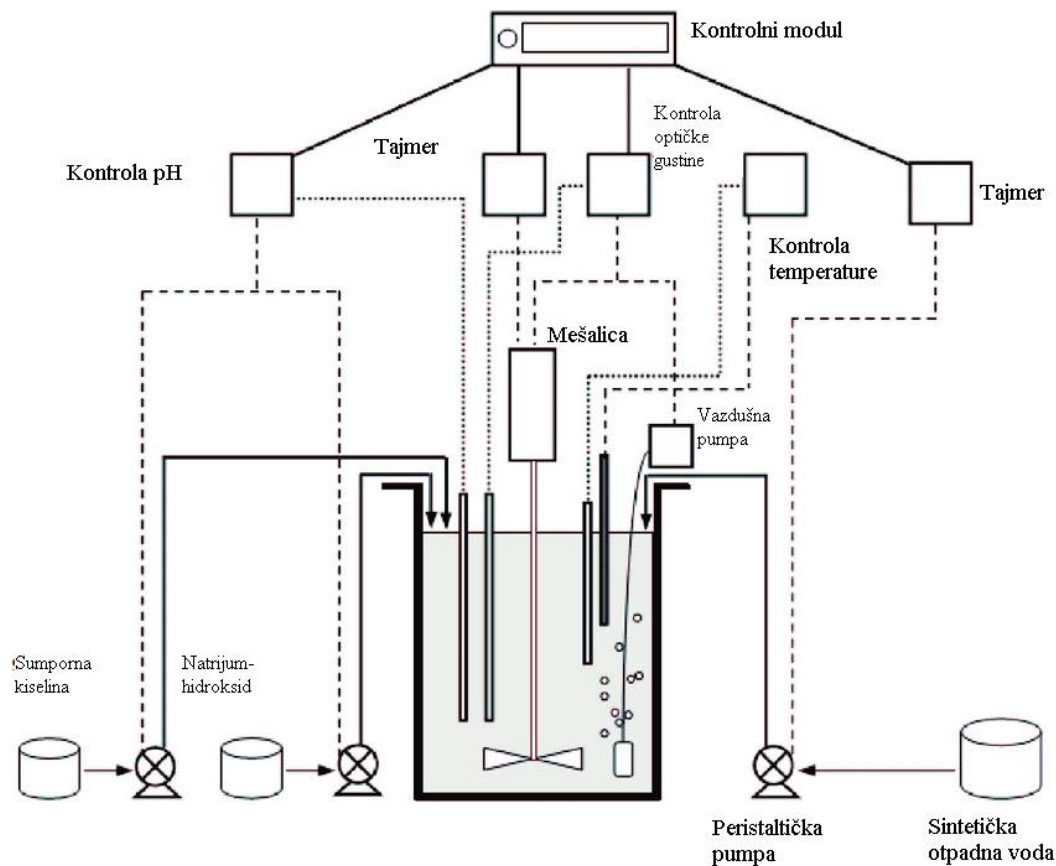
Aklimatizacija se spontano odvija u aktiviranom talogu u postrojenjima za prečišćavanje vode. Ovaj fenomen je odavno prepoznat i koristi se i za optimizaciju procesa prečišćavanja voda, namernom aklimacijom aktiviranog taloga (Young i Rivera, 1985; Colvin i Rozich, 1986; Shimp i Pfaender, 1987; Wiggins i Alexander, 1988; Tibbles i Baecker, 1989).

Iako je aklimatizacija odavno poznat fenomen, tačni mehanizmi često nisu dovoljno poznati. Aklimatizacija odražava fenotipsku plastičnost pojedinačnog organizma ili bakterijske populacije izložene istom stresnom faktoru, te je genetički ograničena (Dewitt i sar. 1998).

Aklimatizacija, za razliku od adaptacije, koja je trajna i nasledna, traje samo dok je prisutan stresni faktor spoljašnje sredine i utiče samo na ograničeni broj organizama. Po prestanku delovanja stresnog faktora, aklimatizacija se postepeno gubi u procesu koji se naziva deaklimatizacija (Moreno-Andrade i Buitrón, 2004).

Wiggings i sar. (1987) sugerišu da vreme aklimatizacije mešovite mikrobijalne populacije u laboratoriji određuju selekcija, umnožavanje specijalizovanih mikroorganizama, fiziološka transformacija tj. promene u nivou aktivnosti enzima, regulacija i sinteza proteina, regulacija genske aktivnosti, mutacije, itd. U aerobnim mikrobijalnim populacijama, periodi aklimacije traju od nekoliko sati do nekoliko dana. U vreme aklimacije ulazi i vreme potrebno da dođe do zamene glavnog metaboličkog puta alternativnim – npr., prelaz sa korišćenja acetata na korišćenje 4-hlorofenola (Moreno-Andrade i Buitrón, 2004). Na vreme aklimacije na višim koncentracijama 4-nitrofenola ( $1 - 10 \text{ mg L}^{-1}$ ) više utiče inicijalna koncentracija 4-nitrofenola, od veličine inokuluma tj. inicijalne koncentracije bakterija (Zaidi i sar. 1996). U degradaciji smeše fenolnih derivata, uključujući i fenol, efikasniji je aklimatizovani aktivirani talog (mešovite bakterijske populacije) od pojedinačnih bakterijskih monokultura (Moreno-Andrade i Buitrón, 2004).

Aklimacija se često izvodi na sekvencnim šaržnim reaktorima (sequence batch reactors, SBR) (Didanović i Sekulić, 2011). To su složeni, automatizovani sistemi koji se koriste u postrojenjima za prečišćavanje otpadne vode, ali mogu biti prilagođeni i laboratorijskoj upotrebi (Slika 10).



Slika 10. Shema SBR za laboratorijsku upotrebu (prema Alzate Marin i sar. 2015)

Kako SBR nisu dostupni mnogim laboratorijama, aklimacija može da se izvede i na konvencionalnim tečnim i čvrstim podlogama (Wang i sar. 2018).

Prema literaturnim podacima, optimalna aklimacija se postiže skokovitim povećavanjem koncentracije, gde je svaka naredna koncentracija najmanje nekoliko puta veća od prethodne (El Bestawy i sar. 2011; Wang i sar. 2016; Wang i sar. 2018). Često se, tokom aklimacije, bakterije izlažu koncentracijama fenola koje su 10 do 100 puta veće od inicijalne. Važno je naglasiti da sojevi koji već na početku eksperimenta imaju visoke stope biodegradacije fenola ne mogu da postignu značajno veću efikasnost aklimacijom. Sojevi koji su na početku aklimacije bili relativno neefikasni, na kraju aklimacije višestruko povećavaju stopu biodegradacije, što potvrđuje činjenicu da je odgovor na fenol ograničen genetičkim faktorima i da preko ovih zadatah ograničenja nije moguće povećati efikasnost biodegradacije (Mailin i Firdausi, 2006).

Fenol može da bude i jedini izvor ugljenika tokom aklimacije u definisanoj hranljivoj podlozi (Wang i sar. 2018), ili to mogu biti fenol i glukoza pri čemu se koncentracija fenola povećava, a glukoze smanjuje tokom eksperimenta (Mailin i Firdausi, 2006). Na kraju, izvor C-atoma može da bude i složeni izvor poput peptona, ekstrakta kvasca, etanola, skroba, ili drugih aromatičnih jedinjenja osim fenola, kao u slučaju sintetičkih otpadne vode koje imitiraju realne otpadne vode industrijskog ili komunalnog porekla (Janzen i sar. 2009).

Bakterije su veoma pogodne za bioremedijaciju iz više razloga: jednostavne su za manipulaciju, imaju male nutritivne zahteve i ekološki su neškodljive (ako su u pitanju autohtoni sojevi). Njihove performanse se dodatno mogu poboljšati genetičkim inženjeringom i aklimatizacijom. Ipak, biološki tretman uklanjanja fenola različitim izabranim sojevima bakterija ima izvesna ograničenja koja su vezana za bakterijsku aklimatizaciju na zagađenje kao što su usporen rast u zavisnosti od koncentracije fenola i potencijalna inhibicija rasta ukoliko je fenol prisutan u velikoj koncentraciji (Mailin i Firdausi, 2006). Rizoremedijacija umanjuje ili eliminiše ova ograničenja koja postoje kod same bakterijske bioremedijacije. Dobar primer efikasne sinergije biljaka i bakterija u procesu rizoremedijacije su vrste porodice sočivica i bakterije njihove rizosfere (Mkandawire i Dudel, 2007).

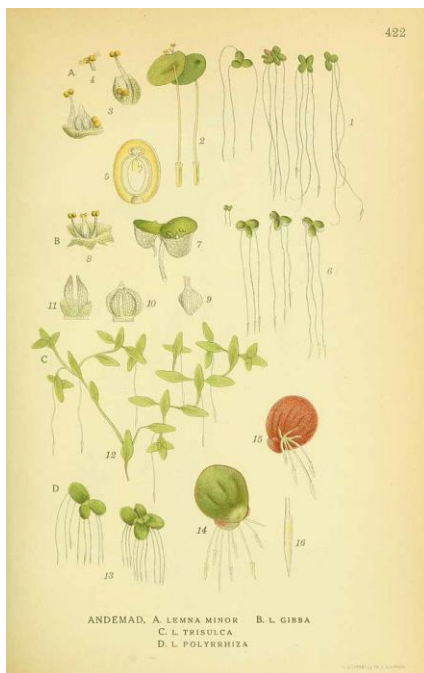
## 1.5 Sočivice (*Lemnaceae*)

Sočivice (*Lemnaceae*) predstavljaju porodicu viših vodenih biljaka i najmanjih poznatih cvetnica, sa kosmopolitskom distribucijom. Porodica se sastoji iz 37 vrsta raspoređenih u pet rodova – *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia*, *Wolffiella* i *Landoltia* (Sree i sar. 2016). U Srbiji su autohtone vrste mala sočivica ili sočivica (*Lemna minor* L), trouglasta sočivica (*Lemna trisulca* L) i grbava sočivica (*Lemna gibba* L). Barska leća (*Spirodela polyrhiza* L) i volfija (*Wolffia arhiza* L) ređe se nalaze u Srbiji.

Cela porodica je primer regresivne evolucije koja je dovela do nastanka izuzetno uprošćene morfologije i izmenjene fiziologije. Najbliži predačkom stanju je rod *Spirodela*, dok je najdalji *Wolffia* (Lemon i Posluszny, 2000). Smatra se da je regresivna evolucija bila odgovor na velike fluktuacije u količini dostupnih nutrijenata predačkih sočivica, koja im je na taj način obezbedila osvajanje staništa, nepovoljnih za većinu biljnih vrsta. U modernoj istoriji, uprošćeni plan građe i specifična fiziologija omogućila je sočivicama opstanak i bujanje u staništima zagađenim industrijskom aktivnošću (Leng, 1999).

Telo sočivica se označava kao talus ili fronda i predstavlja hibridno tkivo nastalo fuzijom embrionalnih prekursora korena i stabla. Korenov sistem je takođe pojednostavljen, bez korenskih dlačica i, zavisno od roda, sastoji se iz jednog ili više linearnih korenova (Slika 11). Ponekad koren potpuno izostaje kao kod nekih vrsta iz roda *Wolffia* (Lemon i Posluszny, 2000).

Iako su cvetnice, cvetanje je kod sočivica izuzetak, a ne pravilo. Reprodukција se odvija gotovo isključivo vegetativnim pupljenjem odnosno brзом deobom fronde. „Majčinska“ fronda može proizvesti 10 generacija „kćerki“ frondi za 10 dana. Ukupna biomasa sočivica može da se duplira za



Slika 11. Predstavnici familije sočivica – *Lemnaceae* (Lindman, 1922)

1 – 3 dana pod optimalnim uslovima. Ova izuzetno brza vegetativna reprodukcija može biti uspešno iskorišćena u industriji prirodnih goriva (bioetanola i biobutanola), prirodnog đubriva, hrane za stoku i hrane za ljudsku upotrebu, ali i u prečišćavanju otpadne vode zagađenih ljudskom aktivnošću (Escobar i Escobar, 2017).

Sočivice preživljavaju zimske mesece u obliku specijalizovanih germinativnih tvorevina, tzv. *turiona*, koji su bogati skrobom i tonu na dno vodenog staništa (Slika 12). Turioni se metabolički aktiviraju i iz njih pupi nova generacija sočivica sledećeg proleća.



Slika 12. Zreli turion sočivice (preuzeto sa: [www.palomar.edu/](http://www.palomar.edu/))

Sočivice poseduju mali procenat mehaničkih elemenata i lignina (<5%), što im omogućava plutanje na površini vode i istovremeno smanjuje količinu otpadnog lignina koji nastaje njihovim odumiranjem. Osim u industriji, ovakve karakteristike ih čine i pogodnim model-sistemom za laboratorijska istraživanja zbog lake genetičke manipulacije (manjak mehaničkih elemenata olakšava

manipulisanje, pogotovo genetičku transformaciju), pojednostavljene građe i brze reprodukcije uz male zahteve za nutrijentima i uslovima rasta (Fu i sar. 2017).

Sočivice reaguju brzo na sve promene životne sredine, tako da mogu biti i bioindikatori zagađenja na osnovu promene određenih fizioloških parametara kao što su inhibicija rasta i sadržaj fotosintetičkih pigmenata (Forni, 2014).

Za primenu u bioremedijaciji, bitno je napomenuti da su sočivice poznate i po svojoj sposobnosti da akumuliraju teške metale iz spoljašnje sredine (Stout i sar. 2010). *L. minor* je veoma dobar akumulator kadmijuma, koji se zadržava u tkivu biljke. Akumulacija kadmijuma može biti poboljšana povećanjem produkcije biomase uz prisustvo tzv. PGPB (plant-growth promoting) bakterijskih sojeva (Stout i sar. 2010; Bianconi i sar. 2013).

### 1.5.1 Gajenje sočivice *in vitro*

Visoka produkcija biomase, niski zahtevi za nutrijentima i mogućnost rasta u hranljivoj podlozi sa toksičnim supstancama, čine sočivicu veoma pogodnom za gajenje *in vitro* i odličnim model-sistemom za eksperimente vezane za bioremedijaciju. Zbog toga je sve više pažnje posvećeno optimizaciji uslova za uzgajanje sočivica *in vitro* (Yan i sar. 2013; Chakrabarti i sar. 2018).

Za razliku od mnogih drugih makrofita, sočivice ne zahtevaju specifične uslove za uzgajanje, izuzetno su tolerantne na velike varijacije u dostupnim nutrijentima, kiselost hranljive podloge, temperaturu, osvetljenost i elektroprovodljivost. Ipak, optimalno dupliranje biomase je zabeleženo u hranljivoj podlozi sa dovoljnom količinom amonijumovih i fosfatnih soli, pH vrednostima oko neutralne i više, optimalnoj temperaturi i uobičajenom količinom svetlosti (Chakrabarti i sar. 2018).

Istraživanja pokazuju da je za gajenje sočivica *in vitro* pogodnija Hoagland (H) hranljiva podloga (Ziegler i sar. 2016; Toyama i sar. 2006; Yamaga i sar. 2010; Ishizawa i sar. 2017a; Hoang i sar. 2010; Kristanti i sar. 2012; Wang i sar. 2015; Fu i sar. 2017), dok je za gajenje *ex vitro* bolji izbor rastvor sličan MS hranljivoj podlozi (Kittiwongwattana i Vuttipongchaikij, 2013).

Za kvantifikaciju rasta sočivica i procenu optimalne hranljive podloge za uzgajanje, koriste se sledeće veličine: relativna stopa rasta (relative growth rate, RGR), stopa multiplikacije (MR), vreme dupliranja biomase (doubling time, DT), nedeljni prinos (weekly yield, WY) ili godišnji prinos (yearly yield, YY).

Osnovni parametri koji se mere su: sveža masa (fresh weight, FW), suva masa (dry weight, DW) ili jednostavno prebrojavanje ukupnog broja jedinki (frond number, FN). Pošto broj frondi može biti ogroman, prebrojavanje se najčešće vrši pomoću odgovarajućih programa (npr. *ImageJ* ili *Medea*).

Rast sočivica je eksponencijalan, te će se broj potomaka jedne fronde uvećavati na sledeći način (Nauman, 2007):

$$x_t = x_{t_0} * e^{RGR*t}$$

Vrednost  $x$  može biti FW, DW, FN u odgovarajućem trenutku ( $t_0$  – na početku uzgajanja,  $t$  – u kasnijem vremenskom intervalu).

Ukoliko se merenje odvija u dve poznate, fiksirane vremenske tačke, onda se prethodna jednačina svodi na:

$$RGR = \frac{(\ln x_2 - \ln x_1)}{(T_2 - T_1)}$$

RGR se izražava kao inkrement parametra  $x$  po danu.

U ovim izračunavanjima, FW se češće koristi od FN, tako da je RGR najčešće izražen kao g dan<sup>-1</sup>.

RGR je genetički determinisan i najveći je kod *L. aequinoctalis*, a najmanji kod *Wolffia spp.* Kod *L. minor*, iznosi oko 0.4 g dan<sup>-1</sup> (Ziegler i sar. 2015).

Ako hranljiva podloga sadrži supstancu koja negativno utiče na rast biljaka, važno je odrediti i indeks tolerancije (Ti) biljke prema datoj supstanci.

Najčešća jednačina za izračunavanje Ti je (Wilkins, 1978):

$$\frac{\text{Suva biljna masa (gajena u suplementovanom medijumu)}}{\text{Suva biljna masa (kontrola)}}$$

Ti (bezdimenziona veličina ili procenti) ukazuje na gubitak biomase izazvan toksičnom supstancom. Smatra se da su biljke sa Ti > 50% tolerantne na prisustvo zagađujuće supstance.

Primećeno je da je koren svake sledeće generacije sočivica sve kraći, ako su uslovi gajenja optimalni (Yamaga i sar. 2010). Svaki faktor koji utiče na skraćenje korena kod svake sledeće generacije ima pozitivan efekat na rast, tako da se i prosečna dužina korena cele populacije može iskoristiti kao parametar rasta.

### 1.5.2 Sočivica (*Lemna minor* L.)

Sočivica (*L. minor*) se može naći na skoro svim kontinentima, izuzev Severnog i Južnog Pola. Takođe, ovo je najčešća vrsta sočivice u Evropi i Severnoj Americi. Sočivica je tipičan predstavnik porodice, sa minijaturnom frondom (3 – 5 mm u prečniku), brзом vegetativnom reprodukcijom, kratkim vremenom dupliranja biomase i jednim linearnim korenom dužine 2 – 5 cm u prirodi. U optimalnim uslovima koji jedino mogu da se postignu *in vitro* (redovno pasažiranje odnosno supkultivisanje sa prethodne hranljive podloge na sledeću, svežu podlogu) koren je izrazito kratak (Slika 13).



Slika 13. Makroskopski izgled sočivica gajenih pod optimalnim uslovima u MS hranljivoj podlozi. Dužina korena je < 0.5 cm

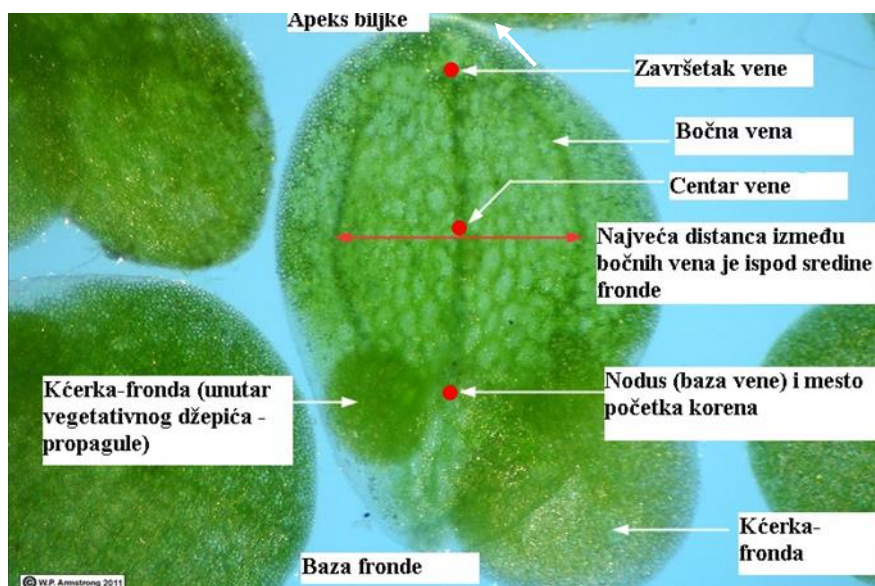
U uslovima nedostatka nutrijenata *in vitro*, kao i u prirodnoj sredini, uočavaju se dugi korenovi (Slika 14).





Slika 14. Makroskopski izgled sočivica gajenih pod suboptimalnim uslovima. Korenovi su izduženi. Dužina korena je >2 cm

Sočivica raste u stajaćim vodama poput jezera, bara i privremenih vodenih akumulacija i značajan je izvor hrane za ribe, ptice, insekte i njihove larve. Tokom vegetativnog razmnožavanja regeneriše dve lateralne vegetativne tvorevine – „džepiće“ – u odnosu na centar majčinske fronde (Slika 15). U ovim džepićima razvijaju se vegetativne propagule, začeci ćerki-frondi. Ćerke-fronde se ne odvajaju odmah po sazrevanju, tako da se sočivice nalaze povezane u nizu od 3-4 fronde oko majčinske biljke (Landolt 1986).



Slika 15. Mikroskopski snimak sočivice, sa osnovnim anatomskim karakteristikama. Vidljive su ćerke-fronde: zrelija desno dole, i novoformirana u propaguli tj. vegetativnom džepiću, levo. (Preuzeto i modifikovano sa [www.palomar.edu/](http://www.palomar.edu/))

U odnosu na druge predstavnike familije, sočivica češće formira cvetove (Slika 16) i semena, te stoga cela populacija ima veću genetičku raznovrsnost, tj. više genotipova koji su se prilagodili specifičnim uslovima svog staništa (Ho i sar. 2018).



Slika 16. Cvetovi sočivice (preuzeto sa [www.gobotany.nativeplanttrust.org/](http://www.gobotany.nativeplanttrust.org/))

Kao i drugi predstavnici porodice, i sočivica ima nizak sadržaj lignina i vrlo visok sadržaj skroba (>40%). Zbog visokog sadržaja skroba i brzog dupliranja biomase, sočivice su i osnova za brzu produkciju bioetanola (Iatrou i sar. 2018). Godišnji prinos bioetanola (izražen kao kg/ha po godini) kod sočivica može biti čak do 50% veći u odnosu na kukuruz (Xu i sar. 2011).

Sočivica akumulira i azot, fosfor i teške metale iz zagađenih i otpadne vode, tako da se njena bioremedijaciona aktivnost može istovremeno koristiti sa potencijalom za proizvodnju biogoriva (Stout i Nuesslein, 2010).

### 1.5.3 Fitoremedijacija fenola i srodnih jedinjenja pomoću sočivica

Kada je reč o fitoremedijaciji voda zagađenih fenolom, važno je naglasiti da je potpuna biodegradacija fenola do ugljen-dioksida (CO<sub>2</sub>) i vode (tzv. „duboka oksidacija“) od strane biljaka ekstremno retka u prirodi. Jedino bakterije poseduju mogućnost potpune degradacije fenolnih jedinjenja (Burken i Ma, 2003; Agostini i sar. 2011).

Ogata i sar. (2012) pokazali su da skoro celokupna eliminacija 4-terc-butilfenola (4-t-BP) barskom lećom (*Spirodela polyrhiza*) zavisi samo od jedne bakterijske vrste u njenoj rizosferi - *Shingobium fuliginis*. Pošto su dezinfikovane (sterilisane), ove biljke potpuno gube sposobnost uklanjanja 4-t-BP. Prethodno, Hoang i sar. (2010) pokazali su da je efikasnost eliminacije različitih aromatičnih jedinjenja stimulirana u prisustvu mešovite mikrobijalne populacije rizosfere barske leće.

Poznato je da sočivice eliminišu niz fenolnih derivata iz vodene sredine, ali tačan mehanizam i krajnji proizvodi nisu potpuno rasvetljeni. Peroksidaze sa vanćelijskim delovanjem igraju glavnu ulogu u odgovoru na prisustvo fenolnih jedinjenja kod sočivica, kao i biljaka uopšte (Ziegler i sar. 2016). Tipični predstavnici porodice, *S. polyrhiza*, *Lemna aoukikusa* i *L. gibba* eliminišu različite endokrine disruptore, koji su po strukturi svi aromatična jedinjenja, skoro isključivo peroksidazama vezanim za ćelijski zid, ali i vodonik-peroksidom u propratnom procesu koji se naziva bio-Fentonova reakcija i koji nije direktno kontrolisan enzimima, već je posledica nakupljanja vodonik-peroksida tokom oksidativnog stresa (Reis i sar. 2014). Ovo je velika prednost peroksidaza, jer istovremeno deluju direktno i indirektno na aromatična jedinjenja, često inicirajući i neenzimsku polimerizaciju u kojima nastaju polifenolni precipitati (Adler i sar. 1994; Pradeep i sar. 2012; Kurnik i sar. 2015). Na kraju, Yamaga i sar. (2010) pokazali su da čak i sterilna *L. aoukikusa* uspešno eliminiše fenol iz hranljive podloge tokom 2 nedelje gajenja, mada se autori nisu bavili dubljom analizom njenih metaboličkih puteva.

Mkandawire i Dudel (2007) ističu i drugi način neutralizacije fenolnih jedinjenja, a to je glikozilovanje. Naime, biljne glikozilaze vezane za ćelijski zid transformišu fenol u manje toksična jedinjenja koja mogu da se preuzmu membranskim transportom i ugrade u ćelijski zid ili vakuolu. Ovaj proces je upravo primer prethodno pominjane fitosekvestracije. Uz sve navedeno, inicijalna

koncentracija fenola može da se umanjuje za kratko vreme i pasivnim procesom vezivanja fenola od strane sočivica tokom biosorpcije, a ne samo metaboličkom transformacijom (Younis i sar. 2016).

Hlor-supstituisani derivati fenola su vrlo toksični, stabilni i karcinogeni molekuli koji mogu nastati tokom tretiranja otpadne vode hlorom i koji su u osnovi mnogih biocidnih sredstava, uključujući i dezinficijense koji se koriste u bolnicama i pesticide, a protiv kojih je mikrobiom uglavnom neefikasan. Ovo je jedan od razloga zašto je dihlordifeniltrihloretan (DDT) veoma štetan i postojan polutant, koji se nalazi u nedozvoljeno visokim koncentracijama u životnoj sredini čak i posle više od 20 godina od zabrane upotrebe u Evropskoj Uniji (Silva i sar. 2018). Međutim, *L. gibba* i *L. minor* hlor-supstituisane fenole i nesupstituisani fenol uspešno odstranjuju glikozilacijom iz vodenih sredina, pretvarajući ih u  $\beta$ -glikopiranozide. *L. minor* je čak efikasno i postepeno dehlorisala supstituisane fenole (Ensley, 1996). Dalja istraživanja Lorber-Pascal i sar. (2004) pokazala su da  $\beta$ -glikopiranozidi nisu završni, nego intermedijerni metaboliti u transformaciji 2,4-dihlorofenola (2,4-DCP) i fenola kod male sočivice. Transformacija 2,4-DCP i fenola kod male sočivice se nastavlja u smeru nastajanja malonil- ili acetil-estara, a završava retkim glikozil-pentoznim konjugatima. Takođe, *S. oligorhiza* izuzetno efikasno uklanja DDT u poređenju sa drugim vodenim biljkama (Gao i sar. 2000). U ovom slučaju, aktiviraju se nespecifične biljne dehalogenaze i redukuju supstrat do jedinjenja koja se stabilno vezuju za biljne strukture. *S. oligorhiza* ispoljava još jednu osobinu sočivica, a to je visoka tolerancija na polutante, a akumulira netransformisani deo DDT u vakuolama.

Kao potencijalno važni enzimi za uklanjanje fenola pominjuse i polifenol-oksidade (PPO), ali literaturni podaci o ovoj aktivnosti PPO su relativno ograničeni (Mukherjee i sar. 2013). PPO deluju na različite supstrate, mogu biti uključeni i u vrlo specifične metaboličke puteve (Araji i sar. 2014; Sullivan i sar. 2015). Lončar i sar. (2011) pokazuju da PPO mogu ukloniti 4-hlorofenol, 5-bromofenol i fenol iz vodenog rastvora. Tadić i sar. (2014) pokazuju da aktivnost PPO zelene salate raste tokom gajenja u hranljivoj podlozi sa fenolom ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ). Aktivnost PPO kod sočivica su proučavali Forni i sar. (2011) da bi istražili njihovu ulogu u prisustvu toksične supstance (natrijum dodecil-sulfata, SDS) i utvrdili da aktivnost PPO raste sa porastom koncentracije SDS. Jedna od poznatih uloga PPO je i signalna. Enzimi „alarmiraju“ biljku o prisustvu toksičnih koncentracija fenola (Bais i sar. 2004). PPO su heterogena grupa enzima čije sve biološke uloge nisu potpuno rasvetljene (Meyer i sar. 2006; Holzapfel i sar. 2010).

Svi do sada opisani biljni metabolički putevi koji služe za biotransformaciju fenolnih jedinjenja počinju peroksidazama, a završavaju se glikozilovanim i hidroksilnim jedinjenjima, ugljovodoničnim konjugatima, alkilovanim fenolima i različitim polimerima (Reis i sar. 2014). Međutim, mnogi detalji o ovim metaboličkim putevima i dalje izostaju.

#### 1.5.4 Fenol i oksidativni status sočivice

Većina biljaka ima mogućnost da odgovori i da se prilagodi na različite uslove sredine i promene koje se u njoj događaju. Promene u spoljašnjoj sredini mogu biti veće ili manje, ali u svakom slučaju predstavljaju stres za biljku, koja usled sesilnog načina života, mora da se prilagodi različitim vrstama stresa. Stoga su biljke, tokom miliona godina evolucije, razvile veoma dobre mehanizme kojima preživljavaju promene u spoljašnjoj sredini. Biljke mogu tolerisati ili neutralisati veliki broj toksičnih jedinjenja koja se nađu u njihovoj neposrednoj okolini i zato se veoma često koriste kao remedijatori zagađenih područja (Martí i sar. 2009). Međutim, usled nedostatka univerzalne vrste koja bi mogla da raste na svim postojećim zagađenim područjima, pažnja je usmerena ka pronalaženju novih vrsta. Izučavanje novih vrsta (remedijatora) koje mogu podneti rast na različitim zagađenim područjima, a uporedo ih prečišćavati, predstavlja novu strategiju u ekologiji u celom svetu.

Oksidativni status biljaka menja se u odgovoru na spoljašnje faktore sredine. Oksidativni stres, do koga dovode zagađivači i ostali spoljašnji faktori, smatra se veoma važnim činiocem, kako za kopnene, tako i za vodene biljke, koji određuje toleranciju biljke (Basiglini i sar. 2018). Kao posledica

stresa, u biljnim ćelijama gomilaju se nusproizvodi aerobnog metabolizma, tzv. reaktivne oksidativne vrste (ROS). Svi ćelijski delovi proizvode ROS kao prirodan nusproizvod, a pogotovo organele sa visokim stepenom oksidativnog metabolizma kao što su mitohondrije i hloroplasti. U ROS spadaju superoksidni anjon, hidroksilni radikal, vodonik-peroksid i singlet kiseonik. ROS su delimično redukovane forme atmosferskog kiseonika i veoma su reaktivne u prirodi jer mogu reagovati sa velikim brojem drugih molekula i metabolita kao što su: DNK, pigmenti, proteini, lipidi i drugi važni ćelijski molekuli (Seckin i sar. 2010). Iako je akumulacija ROS toksična i ponekad letalna po ćeliju, ROS imaju i signalnu ulogu u različitim fiziološkim procesima (npr. odbrana od patogena), a i u samoj aktivaciji antioksidativne zaštite biljke. Biljke se brane od stresa enzimskim i neenzimskim sistemom antioksidativne zaštite (Ashraf 2009; Ibanez i sar. 2012). U enzimski sistem antioksidativne zaštite spadaju enzimi: superoksid dizmutaza (SOD), katalaze (CAT), peroksidaze (POX), glutation reduktaze (GR), monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaze (DHAR). Askorbinska kiselina, glutation, tokoferol, karotenoidi, flavonoidi, prolin i polifenolna jedinjenja spadaju u neenzimski sistem antioksidativne zaštite. Zavisno od tipa spoljašnjeg faktora (hipersalinitet, suša, infekcija, zagađenje teškim metalima ili organskim jedinjenjima) antioksidativni sistem biljke odgovoriće na različite načine. Problem kod procesa fitoremedijacije je upravo promena oksidativnog statusa, odnosno oksidativni stres, koji inhibira rast i razvije biljke. Biljka pod stresom će imati limitirane mogućnosti za fitoremedijaciju (Gerhardt i sar. 2009).

Od svih navedenih enzima, peroksidaze (POX) su prva i najvažnija enzimska odbrana od zagađenja aromatičnim jedinjenjima.

Peroksidaze (POX, EC 2.5.1.18) se nalaze u svim živim organizmima. Biljne peroksidaze su lokalizovane u ćelijskom zidu i vakuolama i poznate su kao klasa III peroksidaza. Uključene su u veliki broj fizioloških procesa kao što su: metabolizam auksina, formiranje lignina, povezivanje elemenata ćelijskog zida, odbrana od patogena i izduživanje ćelijskog zida. Korenovi biljaka izbacuju velike količine POX u slučaju stresa izazvanog nekim zagađivačem (Rodriguez-Dorantes i sar. 2012). POX regulišu koncentraciju vodonik peroksida jer kontrolišu njegovu redukciju uzimanjem elektrona od različitih donorskih molekula kao što su: fenolna jedinjenja, prekursori lignina, auksin ili sekundarni metaboliti (Hiraga i sar. 2001). One utiču na smanjenje ROS katalizujući reakciju u kojoj je fenolni supstrat oksidovan, dok je ROS redukovan u manje opasnu formu.

Postoji veliki broj različitih izoformi POX koje su zaslužne za različite fiziološke procese i taj podatak može objasniti veliki broj radova koji se tiču njihove regulacije različitih procesa (Passardi i sar. 2005). Ovi enzimi su posebno aktivni u korenu jer je ovaj organ zaslužan za kontakt sa vodom i u njoj rastvorenim zagađivačima (Tamas i sar. 2007).

Peroksidaze se pojavljuju u dva osnovna oblika: askorbat-peroksidaze (APX) i gvajakol-peroksidaze (GPX). APX (E.C.1.1.11.1) redukuju vodonik-peroksid do molekula vode i dehidroaskorbata (DHA), koristeći askorbinsku kiselinu (AsA) kao redukujući agens. Pojavljuju se u pet izoformi, i glavni su enzim za smanjenje nivoa vodonik-peroksida, pogotovo u stresnim uslovima. GPX (E.C.1.11.1.7) su enzimi sa hem-grupom koji eliminišu višak vodonik-peroksida i u normalnom, kao i u stresnom stanju ćelije. GPX su uključene u biosintezu lignina i u odgovor na biotički stres, uključujući i infekcije. Imaju visok afinitet prema organskim donorima elektrona (gvajakol, piragalol), pa su stoga uključeni i u odgovor na aromatična ksenobiontska jedinjenja. GPX su aktivne unutar ćelije (citosol, vakuole), u apoplastu i van ćelije, tako da se smatra da imaju širok odgovor na različite oblike stresa (Das i Roychoudhury, 2014).

Zahvaljujući svojim osobinama, POX su kao grupa vrlo aktivne u odgovoru na prisustvo fenola, kako u direktnoj degradaciji fenola, tako i u smanjenju oksidativnog stresa koji fenol izaziva.. Kao što je već pomenuto, tipični predstavnici sočivica (*L. minor*, *L. gibba* i *S. polyrhiza*) upravo aktivnošću POX direktno eliminišu različita toksična fenolna jedinjenja (Ensley i sar. 1996; Gao i sar. 2000; Pascal-Lorber i sar. 2004; Reis i sar. 2014; Ziegler i sar. 2016). Međutim, POX ublažuju i negativne efekte oksidativnog stresa izazvanog fenolom i na taj način dodatno štite biljku.

Poznato je da pojedini sojevi rizosfere sočivica imaju pozitivan efekat na oksidativni status biljke, ali je nejasno da li se taj uticaj zadržava i u prisustvu fenola (Ishizawa i sar. 2017b). Zato su sve nove studije o interakcijama sočivica i bakterija u prisustvu fenola veoma važne, kako sa naučne, tako i sa ekološke i ekonomske tačke gledišta. Za iznalaženje novih i efikasnijih načina bioremedijacije fenola iz vode neophodna su dalja naučna istraživanja koja će biti osnov za buduće modele koji će se primenjivati u praksi.

## 2. Ciljevi rada

Imajući u vidu da je do sada je bilo vrlo malo istraživanja autohtonih populacija mikroorganizama izolovanih iz rizosfere sočivice (*Lemna minor* L.), u cilju njihove upotrebe u uklanjanju fenola u toku bioremedijacije, kao i da njena rizosfera može biti izvor bakterija koje razgrađuju fenol postavili smo da cilj ovog rada bude mogućnost uklanjanja fenola iz vodene sredine pomoću sočivice i bakterija njene rizosfere. Specifični ciljevi rada su:

Ispitivanja koja se tiču primarno bakterija rizosfere sočivice:

- Identifikacija i karakterizacija bakterijskih sojeva rizosfere sočivice (*Lemna minor* L.).
- Ispitivanje bakterijske rezistencije na visoke koncentracije fenola.
- Odabir bakterijskih sojeva iz rizosfere sočivice koji mogu metabolisati fenol, kao i odabir bakterijskih sojeva koji najefikasnije uklanjaju fenol iz tečne hranjive podloge.

Ispitivanja koja se primarno odnose na rast i umnožavanje sočivica:

- Odabir optimalnog protokola za uzgajanje sočivice *in vitro*.
- Ispitivanje rasta sočivica u sterilnoj tečnoj hranljivoj podlozi sa fenolom i bez fenola.
- Ispitivanje rasta sočivica sa odabranim bakterijskim monokulturama sa ili bez fenola u hranljivoj tečnoj podlozi i ispitivanje uticaja odabranih bakterija rizosfere sočivice na umnožavanje biljke.
- Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fenola 4-aminoantipirinom (4-AAP) u uzorcima sa sočivicama, sočivicama i bakterijama, i slobodnim bakterijama u suspenziji.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1 Hranljive podloge

U ovom radu korišćene su različite hranljive podloge za uzgajanje biljaka, kultivaciju i identifikaciju bakterija.

Za uzgajanje biljaka sočivice, korišćene su:

Murashige-Skoog (MS) hranljiva podloga, sastava ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650,  $\text{KNO}_3$  1900,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  440,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  370,  $\text{H}_2\text{PO}_4$  170,  $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  22.3,  $\text{ZnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$  8.6,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2, KJ 0.83,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0.25,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  0.025,  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  0.025,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  37.2,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  27.8, vitamin B1 0.1, vitamin B6 0.5, nikotinska kiselina 0.5, glicin 0.5.

Hoagland (H) hranljiva podloga, sastava ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $\text{KNO}_3$  195,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  200,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  39,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  48,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.5,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0.01, helatno gvožđe (Na-EDDHA) 2.8.

Za kultivaciju bakterija, osim tečne MS hranljive podloge sa ili bez fenola i čvrstih MS hranljivih podloga sa 14% (w/v) agara sa ili bez fenola, korišćene su i mikrobiološke podloge:

Luria-Bertani (LB) hranljive podloge ( $\text{g L}^{-1}$ ): pepton 10, ekstrakt kvasca 5, NaCl 10.

MacConkey (MAC) agar, gotova podloga za identifikaciju Enterobacteriaceae, proizvođača BioMérieux, Francuska.

Komponente svih podloga koje su pripremane u laboratoriji su rastvorene u destilovanoj vodi i autoklavirane 15 minuta na  $+121^\circ\text{C}$ .

#### 3.2 Biljni materijal

Zrele fronde sočivice (*Lemna minor* L.) prikupljene su sa vodene površine u bašti Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu. Biljke su ispirane tekućom vodom tokom 60 min da bi se odstranile krupnije nečistoće. Posle toga su površinski sterilisane u rastvoru komercijalnog izbeljivača (varikine) sa 5% (v/v) natrijum-hipohlorita, i to 2 puta po 5 minuta (Slika 17).



Slika 17. Površinski sterilisane sočivice pre zasejavanja u hranljivu podlogu

Na kraju, biljke su ispirane sterilnom destilovanom vodom tri puta. Po nekoliko frondi je postavljano na dve različite hranljive podloge *in vitro*: MS (Murashige i Skoog, 1962) i H (Hoagland i Arnon, 1950) hranljivu podlogu (Slika 18).



Slika 18. Površinski sterilisane sočivice u hranljivoj tečnoj MS podlozi

Obe hranljive podloge su sadržale  $30 \text{ g L}^{-1}$  saharoze. Konačna pH vrednost hranljive podloge je bila podešena na 6.2.

Biljke su uzgajane na  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  (tokom svetlog fotoperioda koji traje 16h, biljke su primile količinu svetla od  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  posle čega je sledilo 8 h tamnog fotoperioda). Za eksperimente sa bakterijskim monokulturama, *in vitro* biljni materijal, dobijen na prethodno opisan način, inokulisan je određenim, pojedinačnim bakterijskim sojem.

### 3.3 Nesterilni biljni materijal

Za eksperimente sa nativnom mikrobijalnom populacijom, pod kojom se podrazumevaju svi mikrobijalni organizmi rizosfere koji su zatečeni na korenu sočivice prilikom početnog prikupljanja biljnog materijala, korak površinske sterilizacije biljnog materijala je preskočen. Intaktne fronde sa korenom su isprane tekućom vodom tokom 60 minuta, a zatim ispirane 2 puta sterilnom destilovanom vodom. Nije korišćen rastvor varikine. Na taj način su sačuvani mikroorganizmi koji su fizički blisko povezani sa rizosferom, dok su slobodnoplivajući organizmi isprani vodom. Posle ovog postupka, sočivice sa nativnom populacijom mikroorganizama su dalje gajene u tečnoj hranljivoj podlozi.

### 3.4 Izolacija bakterijskih vrsta iz rizosfere sočivice

Oko 10 nesterilnih frondi potopljeno je u 5 mL sterilne Luria-Bertani (LB) hranljive mikrobiološke podloge (Sezonov i sar. 2007). Iz prekonocnih kultura, uzeto je  $100 \mu\text{L}$  suspenzije i preneseno na LB hranljivu podlogu sa 14% (w/v) agara (Torlak, Srbija). Dobijene kolonije su subkultivisane više puta do postizanja čistih kultura. Čiste kulture su zatim analizirane pod mikroskopom ili presejane na MacConkey (MAC) ploče (Mossel i sar. 1962). Izvršena je preliminarna identifikacija na osnovu rasta na MAC agaru i na osnovu bojenja po Gramu.

Da bi se utvrdilo da li postoji razlika u genetičkoj strukturi bakterijskih sojeva u odnosu na njihov prostorni raspored, nesterilne biljke su pripremljene na različite načine i podeljene u četiri grupe: A (obrisane o sterilni filter papir), B (osušene na vazduhu u sterilnom okruženju), C (izolati su dobijeni iz okolnog rastvora oko nesterilnih frondi) i D (isprane u destilovanoj vodi 2 puta po 15 minuta). Uzorci bakterijske suspenzije ( $100 \mu\text{L}$ ) gajene u prekonocnoj kulturi u LB tečnoj hranljivoj mikrobiološkoj podlozi preneseni su na čvrstu LB hranljivu mikrobiološku podlogu sa 14% (w/v) agara. Ove čiste bakterijske kulture su zatim iskorišćene za dalju identifikaciju.



### 3.5 Ekstrakcija genomske dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) bakterijskih sojeva rizosfere sočivice

Ukupna genomska DNK bakterijskih izolata je izolovana prema modifikovanom protokolu Le Marrec i sar. (2000). Prekonoćne kulture zasejane su u tečnoj LB mikrobiološkoj podlozi (5 mL) i inkubirane tokom noći na +30°C na rotacionom šejkeru na brzini od 180 rpm. Uzorci prekonoćne kulture (1.5 mL) preneseni su u sterilne mikrotube koje su zatim centrifugirane tokom 5 min na 13000 rpm. Supernatant je odbačen, a ćelijski talog pažljivo resuspendovan u 500 µl sterilnog PP pufera za ćelijsku lizu:  $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$  3.08 g L<sup>-1</sup>,  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO})_2$  0.21 g L<sup>-1</sup>, saharoza 171.1 g L<sup>-1</sup>; pH 8.0. Za lizu Gram-pozitivnih bakterija, PP pufer je sadržao lizozim (Sigma, Saint Louis, USA) (konačna koncentracija: 200 µg mL<sup>-1</sup>). Za Gram-negativne bakterije, PP puferu je dodata proteinaza K (Sigma, Saint Louis, USA) (konačna koncentracija: 100 µg mL<sup>-1</sup>). Uzorci sa PP puferom i odgovarajućim proteolitičkim enzimima (lizozimom ili proteinazom K) su vorteksovani do potpunog rastvaranja taloga, a zatim inkubirani 30 minuta na +37°C i centrifugirani 5 minuta na 13000 rpm. Supernatant je odbačen, a talog resuspendovan u 500 µl sterilnog TEN pufera za ekstrakciju (50 mM TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol) 6.06 g L<sup>-1</sup>, 10 mM EDTA 3.72 g L<sup>-1</sup>, 50 mM NaCl 2.92 g L<sup>-1</sup>; pH 8.0) do pojave bistrog rastvora. Bistrom rastvoru sa TEN puferom zatim je dodato po 250 µl 2% rastvora natrijum-dodecil-sulfata (SDS).

Uzorci su dalje vorteksovani do pojave potpuno bistrog rastvora. Uzorcima je zatim dodato 250 µL donje faze neutralnog fenola iz hlороform/fenol reagensa (hlороform:fenol 1:1), da bi se kasnije svi uzorci vorteksovali do pojave ravnomerno bele boje rastvora. Uzorci su potom centrifugirani 10 minuta na 13000 rpm da bi se formirale gornja, inter- i donja faza. Gornja faza iz svakog uzorka je zatim prenesena u nove sterilne tubice od 1.5 mL. Nakon toga, prethodni korak ekstrakcije u fenolu je ponovljen. Ovim uzorcima je dodato 3M natrijum-acetata (pH 4.8) u odnosu 1:10 (v:v) tj. oko 75 µL. U sledećem koraku, dodat je izopropanol u odnosu 1:1 (v:v) tj. oko 750 µL izopropanola, do formiranja vidljivih, končastih struktura koje predstavljaju DNK. Uzorci su blago promešani i centrifugirani tokom 15 minuta na 13000 rpm. Supernatant je odliven, a talogu je dodat 1 mL hladnog 70% etanola. Centrifugiranje je ponovljeno (13000 rpm tokom 5 minuta). Pažljivo, etanol je odstranjen iz uzoraka, koji su zatim inkubirani 15 minuta na +37°C u otvorenim tubicama za centrifugiranje, kako bi se sušenjem odstranio višak etanola. Osušeni uzorci su potom rastvoreni u 30 µL rastvora RNAze (Sigma, Saint Louis, USA). Ovaj rastvor je pripremljen razblaženjem 1 µL štoka koncentracije 10 mg/mL u 100 µL sterilne destilovane vode. Precipitati su inkubirani u rastvoru RNAze tokom 15 minuta na +37°C.

### 3.6 Lančana reakcija polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) i identifikacija bakterijskih sojeva pomoću sekvenciranja gena za 16S rRNK i gyrB

Genomska DNK je iskorišćena kao matrica za sintezu delova gena koji kodiraju 16S rRNK. Prajmeri korišćeni za ovu reakciju su univerzalni prajmeri koje su dizajnirali Turner i sar. (1999). Za identifikaciju bakterijskih sojeva pomoću gena za žirazu B (gyrB) korišćeni su univerzalni prajmeri za Gram negativne bakterije (Tabela 4).

Tabela 4. Prajmeri za identifikaciju bakterijskih sojeva

Prajmeri za 16S rRNK	Sekvenca (5'-3')
UN1-16SF (forward primer)	GAGAGTTTGATCCTGGC
UN1-16SR (reverse primer)	AGGAGGTGATCCAGCCG
Prajmeri za gyrB	
UP-1S (forward primer)	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA
UP-2Sr (reverse primer)	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC

Za PCR je korišćena KAPA Taq DNK polimeraza i KAPA Taq PCR kit (KAPA Biosystems, Boston, USA). Reakciona smeša je sadržala: 19.95  $\mu$ L ultra-čiste vode za PCR, 3  $\mu$ L 10x KAPA Taq pufera, 2.4  $\mu$ L 25 mM magnezijum-hlorida ( $MgCl_2$ ), 0.6  $\mu$ L 10 mM mešavine dinukleotida (dNTP mix), po 1.2  $\mu$ L svakog od navedenih prajmera (UN1-16SF i UN1-16SR tj. UP-1S i UP-2Sr), 0.15  $\mu$ L 5U  $\mu$ KAPA Taq DNK polimeraze, i 1.5  $\mu$ L matrične DNK. Uslovi PCR reakcije su prilagođeni prema uputstvima proizvođača polimeraze (KAPA Biosystems, Boston, USA) (Tabela 5).

Tabela 5. Uslovi lančane reakcije polimeraze (PCR) za identifikaciju bakterijskih sojeva

Temperatura	Trajanje faze	Faza reakcije	Broj ciklusa
+94°C	5 minuta	Inicijalna denaturacija	1
+94°C	30 sekundi	Denaturacija	30
+50°C	30 sekundi	Hibridizacija	30
+72°C	90 sekundi	Elongacija	30
+72°C	7 minuta	Finalna elongacija	1
+4°C	Preko noći	Kraj reakcije	1

Osam mikrolitara PCR proizvoda naliveno je u 1% agarozni gel sa 1x Tris-acetat-etilendiamintetrasirćetnim (TAE) puferom (40 mM Tris, 20 mM sirćetne kiseline, 1 mM EDTA) na 90V tokom 1h, na gelu sa EtBr. Trake sa amplifikovanom DNK su vizuelizovane pod UV svetlom i pažljivo isečene sterilnim skalpelom iz gela.

Trake sa PCR proizvodima su zatim prečišćene pomoću kolona iz QIAquick Kit/250 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), prema uputstvima proizvođača. Prečišćeni proizvodi su dodatno analizirani pomoću elektroforeze na agaroznom gelu (na isti način kao i prethodno opisano), i fotografisani pod UV svetlom. Prečišćeni PCR proizvodi su poslani na sekvenciranje u MacroGen (Netherlands).

### 3.7 Bioinformatička analiza, filogenetska stabla i ekološka raznovrsnost bakterijskih sojeva

Dobijene DNK sekvence su vizuelno proverene u FinchTV programu, verzija 1.4.0, a zatim analizirane BLAST programom za pronalaženje srodnih nukleotidnih sekvencija iz dostupnih baza podataka (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Filogenetski odnosi među sojevima su prikazani filogenetskim stablima koja su konstruisana pomoću MEGA7 programa (MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, 2015) (Kumar i sar, 2015).

Ekološka raznovrsnost je predstavljena pomoću Shannonovog indeksa za računanje ekološkog diverziteta, koji predstavlja zastupljenost datog taksona u ukupnoj populaciji sastavljenoj iz više taksona:

$$H = - \sum_i^N \left( \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \right) \quad (1)$$

### 3.8 Test rezistencije na fenol

Da bi se utvrdio broj fenol-rezistentnih bakterijskih sojeva, pripremljene su ploče sa MS hranljivom podlogom, 14% agara (w/v) i saharozom (30%) kao osnovnim izvorom ugljenika. U hranljivu podlogu dodate su rastuće koncentracije fenola: 200, 500 i 1000 mg L<sup>-1</sup>. Iz prekonocnih kultura gajenih na LB tečnoj hranljivoj podlozi, uzeto je po 100 µL suspenzije koja je prenesena na MS čvrstu hranljivu podlogu sa fenolom. Svi sojevi su testirani na mogućnost rasta na 1000 mg L<sup>-1</sup> fenola bez prethodne aklimatizacije (direktnim zasejavanjem iz prekonocne kulture na MS agar sa 1000 mg L<sup>-1</sup> fenola), i na mogućnost rasta na 1000 mg L<sup>-1</sup> sa prethodnom aklimatizacijom. Aklimatizacija je podrazumevala direktno prenošenje kultura sa ploča sa nižom koncentracijom fenola, na više koncentracije fenola (sa 200 mg L<sup>-1</sup> na 500 mg L<sup>-1</sup> i zatim sa ove koncentracije, na najvišu koncentraciju od 1000 mg L<sup>-1</sup>).

### 3.9 Mogućnost rasta bakterija u tečnoj hranljivoj podlozi sa fenolom kao jedinim izvorom ugljenika

Da bi se utvrdio broj sojeva koji mogu da koriste fenol kao jedini izvor ugljenika, svi sojevi su zasejani u 50 mL tečne MS hranljive podloge bez saharoze, sa dodatkom 20 mg L<sup>-1</sup> fenola (minimalna hranljiva podloga). Ostale komponente hranljive podloge su ostale iste kao u originalnoj MS hranljivoj podlozi. Iz prekonocnih kultura svih bakterijskih sojeva za koje je utvrđeno da rastu na fenolu (42 soja), uzeto je po 1 mL suspenzije koja je kratko centrifugirana (13000 rpm, 5 minuta). Supernatant je odbačen, a ćelijski talog pažljivo ispran u 1 mL sterilne destilovane vode da bi se odstranili ostaci LB hranljive podloge. Ova suspenzija je ponovo kratko centrifugirana, a zatim resuspendovana (1 mL) u minimalnoj hranljivoj podlozi. Turbiditet (pojava замуćenja) uzeta je kao kriterijum rasta bakterija.

### 3.10 Biohemijska identifikacija bakterija pomoću Vitek 2 sistema

Bakterijski sojevi sa najuspešnijim rastom su prenošeni na LB hranljivu podlogu i njihov identitet je dodatno potvrđen Vitek 2 automatskim sistemom za biohemijsku identifikaciju bakterija (Biomerieux, Mercy, France) u Laboratoriji za mikrobiologiju GAK „Narodni Front“. Vitek 2 obavlja potpuno automatizovanu identifikaciju patogenih i nepatogenih Gram negativnih bakterija pomoću komercijalno dostupne VITEK 2 GN kartice koja sadrži 47 biohemijskih testova za ispitivanje korišćenja raznih izvora ugljenika, enzimske aktivnosti bakterija, O129 rezistencije i zone inhibicije (Crowley i sar. 2012). Spisak ovih reakcija predstavljen je tabelarno (Tabela 6).

Tabela 6. Spisak automatizovanih biohemijskih testova u Vitek 2 sistemu

Ala-Phe-Pro-arilamidaza	L-arabitol
H <sub>2</sub> S produkcija	D-glukoza
Beta-glukozidaza	D-manoza
L-Pro-arilamidaza	Tyr arilamidaza
Saharoza	Citrat
L-laktat alkalinizacija	Beta-N-acetil galaktozaminidaza
Glicin arilamidaza	L-histidin asimilacija
O129 rezistencija	ELLMAN
Adonitol	D-celobioza
Beta-N-acetil glukozaminidaza	Gamma-glutamil transferaza
D-maltoza	Beta-ksilozidaza
Lipaza	Ureaza
D-tagatoza	Malonat
Alfa-glukozidaza	Alfa-galaktozidaza
Ornitiin dekarboksilaza	Kumarat
Glu-Gly-Arg aminidaza	L-laktat asimilacija
L-pirolidonil arilamidaza	Beta-galaktozidaza
Glutamil arilamidaza pNA	Fermentacija glukoze
D-manitol	Beta-Ala arilamidaza
Palatinoza	D-Sorbitol
D-trehaloza	5-ketoglukonat
Alkalinizacija sukcinata	Fosfataza
Lys dekarboksilaza	Beta-glukuronidaza
L-malat asimilacija	

Pre Vitek 2 analize, bakterijska suspenzija (1 mL) je iz minimalne hranljive podloge sa fenolom kao jedinim izvorom ugljenika prenesena u 50 mL LB tečne hranljive podloge. Prekonoćne kulture (100 µL suspenzije) su prenesene na ploče LB agara. Na ovaj način, dobijene su izuzetno čiste kulture, pogodne za dalju Vitek 2 analizu.

### 3.11 Stopa multiplikacije sočivica

Sterilne fronde (150 ± 20 individualnih biljaka) zasejane su u staklene sudove sa ravnim dnom, koji su sadržali 100 mL tečne MS hranljive podloge sa 500, 750, i 1000 mg L<sup>-1</sup> fenola. Kontrolne biljke bile su gajene u MS tečnoj hranljivoj podlozi bez fenola. U hranljivu podlogu su zatim dodavani izabrani bakterijski sojevi (konačna koncentracija bakterijske populacije: 0.5×10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>),

selektovani na osnovu prethodno navedenih kriterijuma (3.10). Kontrolni uzorak je bio potpuno sterilan. Kulture frondi su uzgajane 14 dana i fotografisane. Kulture u hranljivoj podlozi sa fenolom su fotografisane 1., 3., 5., 7., 9., 11. i 14. dana kultivacije. Kulture u hranljivoj podlozi bez fenola su fotografisane 1., 4., 7., 11. i 14. dana.

Broj frondi je određen pomoću programa za obradu slike *ImageJ* ([www.imageJ.net/](http://www.imageJ.net/)).

Stopa multiplikacije (MR) je izražena kao:

$$MR = \frac{\text{Inicijalni broj frondi}}{\text{Ukupni broj kćerki frondi}} \quad (3)$$

Rezultati su predstavljeni grafički. Srednja vrednost i standardna greška izračunati su na osnovu najmanje tri ponavljanja.

### 3.12 Fluorescentna mikroskopija izabranih bakterijskih sojeva na korenu sočivica

Fronde su prikupljane posle 5 dana kultivacije sa izabranim sojevima bakterija u tečnoj MS hranljivoj podlozi sa 200 mg L<sup>-1</sup> fenola. Sočivice su takođe gajene sa istim sojevima bakterija, ali u hranljivoj podlozi bez fenola. Konačna koncentracija od 200 mg L<sup>-1</sup> odabrana je zbog toga što je rast na ovoj koncentraciji bio moguć za većinu prethodno testiranih sojeva (42 od ukupno 60 sojeva su rasli na ovoj koncentraciji). Izabrani sojevi su isti kao i u prethodnom odeljku, tj. selektovani su na osnovu kriterijuma opisanih u podnaslovu 3.10.

Cele fronde su obojene fluorescentnom bojom Acridine Orange (AO), prema Kronvall i Myhre (1977). Vodeni rastvor AO (0.01% w/v) podešen je na pH vrednost 3.0 pomoću glacijalne sirćetne kiseline. Pojedinačne, cele fronde su uronjene u rastvor AO. Nakon 2 minuta, višak boje je ispran dva puta destilovanom vodom. Korenovi su zatim pažljivo odvojeni od frondi isecanjem skalpelom, postavljeni na mikroskopsku ploču, fiksirani u mešavini vode i glicerola i pokriveni pokrovnim staklom. Predmetno staklo je pažljivo pritisnuto da bi se tkivo korena poravnalo i istanjilo. Ploče su analizirane pomoću fluorescentnog mikroskopa Axio Vert (Carl Zeiss, Germany), u opsegu ekscitacije 450-500 nm i opsegu detekcije 515-565 nm, uz uveličanje od 40x i 63x. Korišćen je filter FITC: Chroma set 41001, ekscitacija: 460-500 nm, emisija: 510-560 nm (bandpass filter).

### 3.13 Test formiranja biofilma

Formiranje biofilma je testirano prema O'Toole i sar. (2000). Bakterijski sojevi su uzgajani u LB i MS hranljivoj podlozi sa fenolom (200 mg L<sup>-1</sup>) kao jedinim izvorom ugljenika u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarića tokom 48 h jer je preporuka autora protokola da se utvrdi da li postoji razlika u formiranju biofilma zavisno od sastava hranljive podloge. Koncentracija od 200 mg L<sup>-1</sup> fenola je i u ovom slučaju, kao i prethodno, izabrana kao najniža, ali toksična koncentracija fenola na kojoj je većina izolata u ovoj studiji i dalje mogla da opstaje. Mikrotitarske ploče nisu bile na šejkeru. Nakon ovog perioda, suspenzije su odlivene iz bunarića, koji su zatim isprani destilovanom vodom. Biofilm koji je formiran na zidovima bunarića je obojen pomoću vodenog rastvora 0.1% (w/v) kristal-vajoleta (CV). Reakcija boje i biofilma je trajala preko noći. Sledećeg dana, višak boje je odstranjen ispiranjem destilovanom vodom. Za kvantifikaciju biofilma, vezana boja je rastvorena u 30% glacijalne sirćetne kiseline. Količina rastvorene vezane boje je direktno proporcionalna formiranju biofilma i izmerena je spektrofotometrom (FC Multiskan Microplate Reader, ThermoFisher, USA) na talasnoj dužini od 590 nm, gde se nalazi maksimum apsorbance boje CV. Eksperimenti su ponavljani tri puta, a rezultati su predstavljeni grafički.

### 3.14 Bakterijska rezistencija na antibiotike

Kako su rezistentni ili multirezistentni bakterijski sojevi nebezbedni za primenu u bioremedijaciji, bilo neophodno testirati rezistentnost bakterijskih sojeva koji su planirani za bioremedijaciju. Izabrani bakterijski sojevi su testirani na rezistenciju na antibiotike koji se najčešće koriste u kliničkoj praksi: Marocen (Fluorohinolon), Mipacid (Imipenem), Aminocen (Aminoglikozid), Piptaz (Piperacilin) i Cefepim (četvrta generacija Cefalosporina). Prekonočne bakterijske kulture su dovedene do krajnje koncentracije  $0.5 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>. Bakterijska suspenzija (10 µL) naneta je na meki LB agar (7%) suplementiran sa odgovarajućim koncentracijama antibiotika u klasičnoj metodi razblaženja u agaru (eng. „agar dilution“) za određivanje antibiotske rezistencije, koja podrazumeva korišćenje serijskog razblaženja antibiotika od najveće do najniže, tako što je svaka sledeća koncentracija dva puta manja od prethodne (Wiegand i sar. 2008). Testiranje bakterijskih sojeva, odabir opsega koncentracija antibiotika kao i interpretacija rezultata, izvedeni su prema zvaničnim smernicama za testiranje bakterijskih sojeva u kliničkim laboratorijama, tj. prema protokolu Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing (Control and Lab. Standards Institute, 26<sup>th</sup> International Supplement, 2016). Ovi protokoli se koriste za utvrđivanje rezistentnosti bakterijskih sojeva izolovanih u kliničkom okruženju. Antibiotici su testirani u sledećim opsezima: Aminocen od 0.13 do 128 mg L<sup>-1</sup>; Piptaz od 0.13 do 256 mg L<sup>-1</sup>; Cefepim od 0.06 do 128 mg L<sup>-1</sup>; Mipacid od 0.06 do 128 mg L<sup>-1</sup>; Marocen od 0.06 do 128 mg L<sup>-1</sup>. Inkubacija bakterijskih kultura na pločama sa odgovarajućim koncentracijama antibiotika je trajala 48h. Kao kontrole, korišćene su ploče sa LB agarom bez antibiotika. Petri šolje su zatim fotografisane. Eksperimenti su ponovljeni najmanje dva puta. Rezultati su interpretirani prema prethodno navedenom protokolu Instituta za kontrolu i laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne PA 19807, USA) (Patel i sar. 2016). Interpretativni kriterijumi su predstavljani tabelarno (Tabela 7).

Tabela 7. Interpretativni kriterijumi za minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC)

Interpretacija	Aminocen	Piptaz	Cefepim	Mipacid	Marocen
S	≤16	≤16	≤2	≤2	≤1
I	32	32 – 64	4 – 8	4	2
R	≥64	≥128	≥16	≥8	≥4

Opis oznaka: S – senzitiv; I – intermedijeran; R – rezistentan

U poljima su date minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika koje su uzimane kao kriterijum za rezistenciju izražene u mg L<sup>-1</sup>

### 3.15 Salkowski test formiranja indol-3-sirćetne kiseline (IAA) u MS hranljivoj podlozi

Tokom eksperimenta sa inokulacijom sočivica bakterijama, primećeno je da prisustvo bakterija pozitivno utiče na brzinu multiplikacije sočivica. Najčešće objašnjenje ovog fenomena je da bakterije deluju promotivno na rast biljaka izlučivanjem bakterijske indol-sirćetne kiseline (IAA). Kako bi se proverilo da li bakterijski sojevi zaista proizvode IAA u MS hranljivoj podlozi, izveden je Salkowski test prema Gordon i Weber (1951), sa nekim modifikacijama (Gilbert i sar. 2018). Bakterijske kulture su uzgajane 5 dana pod mirujućim uslovima (bez šejkera) u 100 mL tečne MS hranljive podloge bez dodatka egzogenog L-triptofana. Iz ove suspenzije, uzeto je po 1 mL uzorka koji je centrifugiran na 11200 xg. Supernatant je pomešan sa 2 mL Salkowski reagensa (2% 0.5 M FeCl<sub>3</sub> u 35% HClO<sub>4</sub> rastvoru) u sudovima od zatamnjenog stakla. Uzorci su inkubirani tokom 30 minuta u mraku. Apsorbanca obojenog (roze do crvenog) kompleksa, koji je indikator IAA, meri se na 530 nm.

### 3.16 Test uklanjanja fenola iz hranljive podloge

Za određivanje uklanjanja fenola iz hranljive podloge, korišćen je površinski sterilisani biljni materijal pripremljen kao u odeljku 3.2. i nesterilni biljni materijal pripremljen kao u odeljku 3.3. u poglavlju Materijal i metode.

Za eksperiment sa mešovitom mikrobijalnom populacijom rizosfere i sočivicama, odnosno sa mikrobiomom rizosfere i sičivicama, oko 150 pojedinačnih nesterilnih frondi prebačeno je u hranljivu tečnu MS podlogu sa dodatkom fenola: 10, 15, 20, 30 i 100 mg L<sup>-1</sup>. Kontrolna grupa sočivica bila je površinski sterilisana kao u odeljku 3.2. Kontrolni uzorak hranljive podloge nije sadržao fenol, već samo MS hranljivu podlogu sa nesterilnim, odnosno površinski sterilisanim sočivicama.

Za eksperiment sa čistim bakterijskim kulturama i sočivicama, oko 150 pojedinačnih površinski sterilisanih frondi je gajeno na MS hranljivoj podlozi sa dodatkom 500 mg L<sup>-1</sup> fenola. Pojedinačne bakterijske monokulture i fronde inokulisane ovim monokulturama takođe su uzgajane u istoj hranljivoj podlozi. Finalna razblaženja bakterijskih suspenzija su bila 0.5x10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup> za kultivaciju sa sočivicama i 1x10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup> za kultivaciju individualnih monokultura bakterija. Stakleni sudovi su inkubirani 24h na rotacionom šejkeru sa 150 xg u minutu. Nakon toga je određivana koncentracija fenola u rastvoru.

Ukupni fenoli su određeni pomoću kolorimetrijske metode sa 4-aminoantipirinom (4-AAP), koja se standardno koristi za određivanje prisustva fenola u vodi. Uzorci MS hranljive podloge (1 mL) su liofilizovani, a zatim tretirani fosfatnom kiselinom do pH 4.0 i destilovani pre merenja. Reakciona mešavina za merenje sadrži destilovani uzorak hranljive podloge, pufer (16.9 g amonijum-hlorida rastvorenog u 143 mL amonijum-hidroksida, pH 10), 2 ml 2% (w/v) 4-AAP rastvora i 2 mL 80% (w/v) kalijum-fericijanidnog rastvora. Reakcioni rastvor je promešan i nakon 15 minuta, apsorbanca je očitana na 430 nm. Apsorbanca standarda se meri na istoj talasnoj dužini, u koncentracionom opsegu od 0 do 1000 µg L<sup>-1</sup>. Sva merenja su izvedena prema regulativama Instituta za standarde Republike Srbije, ISO kod 6439 B: 1997, određivanje fenolnog indeksa i kvalitet vode (Institut MOL, Stara Pazova, Srbija).

### **3.17 Određivanje sastava MS hranljive podloge sa sočivicama i monokulturom *K. oxytoca*, soj 14, pomoću tečne hromatografije i masene spektrometrije (LC-MS)**

Prilikom gajenja sočivice sa monokulturom *K. oxytoca*, soj 14, primećeno je bojenje tečne MS hranljive podloge. Maksimalna obojenost primećena je oko 3. dana ko-kultivacije. Intenzivniji razvoj boje primećen je u hranljivoj podlozi bez fenola u odnosu na hranljivu podlogu sa fenolom. Analiza je izvedena pomoću tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS). Primenjen je sledeći sistem za LC-MS: UHPLC Accela 6000 - ESI - LTQ Orbitrap XL, sa kolonom Synchronis C18, od 1.7 mikrona, proizvođača Thermo Fisher Sci, USA. Za hromatografsku analizu, primenjeno je gradijentno eluiranje pomoću dva eluciona pufera, A i B: (A) - 0.1% vodeni rastvor mravlje kiseline (HCOOH) i (B) - acetonitril. Rezultati su prikazani tabelarno.

### **3.18 Određivanje antioksidativnih enzima i nekih neenzimskih komponentni antioksidativne zaštite sočivice**

#### **3.18.1 Zimogramska detekcija peroksidaza sočivice *in vitro***

Za razdvajanje izoformi peroksidaza na gelu korišćen je poliakrilamidni gel koji je sadržao 3.75 mL akrilamida, 0.75 mL amfolita pH opsega 3-10, 4 mL glicerola, 6.5 mL vode, 12 µL TEMED-a, 75 µL APS. Izoforme peroksidaza su određene inkubiranjem gela 30 min u 50 mM M K-P puferu (pH 5.8) koji je sadržao gvajakol (10 µL gvajakola je resuspendovano u 10 mL 20 mM Tris pH 7.0) i 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Siegel i Galston, 1967). Izoelektrično fokusiranje vršeno je na +10°C na poliakrilamidnom gelu na koji je naneto 15 µL uzorka i 10 µL pI markera. Izoelektrično fokusiranje trajalo je tri sata na 1200 V. Analiza gelova rađena je primenom grafičkog paketa TotalLab TL 120.

#### **3.18.2 Zimogramska detekcija polifenol oksidaze**

Za razdvajanje izoformi polifenol oksidaze na gelu korišćen je poliakrilamidni gel koji je sadržao 3.75 mL akrilamida, 0.75 ml amfolita pH opsega 3-10 (Sigma), 4 mL glicerola, 6.5 mL vode, 12 µL

TEMED-a, 75  $\mu\text{L}$  APS. Izoforme PPO su određene inkubiranjem gela 3-5 min u 20 ml 0,1 M Na-acetatnom puferu (pH 6) koji je sadržao 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidrohlorid hidrat (MBTH) i 10 mM fenola kao supstrat na +25 °C. Izoelektrično fokusiranje vršeno je na +10 °C na poliakrilamidnom gelu na koji je naneto 15  $\mu\text{L}$  uzorka i 10  $\mu\text{L}$  pI markera. Izoelektrično fokusiranje trajalo je tri sata na 1200 V, a korišćeni pH opseg bio je od 3-10. Analiza gelova rađena je primenom grafičkog paketa TotalLab TL 120.

### 3.18.3 Detekcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Merenje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izvršeno je prema protokolu Velikove i sar. (2000). Biljni materijal je ekstrahovan u hladnom avanu, sa tečnim azotom i 0,1% trihlorsirćetnom kiselinom (TCA). Ekstrakt je zatim centrifugiran na 15000 xg, 15 minuta na +4 °C. U supernatant je dodan 10mM kalijum-fosfatni pufer (pH 7.0) sa 1M KI, u odnosu 1:1:2 (supstrat:K-P pufer:KI). Mešavina je analizirana spektrofotometrijski, na talasnoj dužini od 390 nm.

Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je izračunata iz sledeće formule, tj. na osnovu poznatog ekstinkcionog molarnog koeficijenta ( $\epsilon$ ) za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

$$\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{M g}^{-1} \text{FW}) = [(A_{390}) / 0,28] \times 1000 \times \text{Vol}_{\text{extract}} / \text{Vol}_{\text{aliquot}} \times 1/\text{FW} (\text{mg}) \quad (4)$$

A – Apsorbanca

0,28 – mM ekstinkcioni molarni koeficijent ( $\epsilon$ ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Vol<sub>extract</sub> – Zapremina celokupnog ekstrakta = 800  $\mu\text{L}$

Vol<sub>aliquot</sub> – Zapremina ekstrakta nanetog u bunarić = 200  $\mu\text{L}$

### 3.18.4 Detekcija malondialdehida (MDA)

Ukupni MDA određen je prema protokolu Health i Packer (1968). Svež biljni materijal je homogenizovan u avanu sa tečnim azotom. Ekstrakcija je izvršena sa 0.1% hladnim rastvorom TCA. Ekstrakt je zatim centrifugiran na 15000 xg, 10 minuta na +4°C. U supernatant je dodata mešavina 20% TCA i 0.5% tiobutiratne kiseline (TBA), u odnosu 1:2. Reakciona smeša je inkubirana 30 minuta na +95°C. Eppendorf mikrotube su brzo ohlađene na ledu, i kratko centrifugirane. Supernatant je analiziran na dve talasne dužine, 532 i 600 nm.

Koncentracija MDA je izračunata iz sledeće formule, tj. na osnovu poznatog ekstinkcionog molarnog koeficijenta ( $\epsilon$ ) za MDA:

$$\text{MDA} (\mu\text{M g}^{-1} \text{FW}) = [(A_{532} - A_{600}) / 155] \times 1000 \times \text{Vol}_{\text{extract}} / \text{Vol}_{\text{aliquot}} \times 1/\text{FW} (\text{mg}) \quad (5)$$

A – Apsorbanca

155– mM ekstinkcioni molarni koeficijent ( $\epsilon$ ) MDA

Vol<sub>extract</sub> – Zapremina celokupnog ekstrakta = 750  $\mu\text{L}$

Vol<sub>aliquot</sub> – Zapremina ekstrakta nanetog u bunarić = 100  $\mu\text{L}$

### 3.18.5 Merenje ukupne askorbinske kiseline (AsA)

Ukupna AsA određena je prema protokolu Mukherjee i Choudhuri (1983). Sveža biljna masa je usitnjena u hladnom avanu sa tečnim azotom, u mešavini 5% metafosfatne kiseline i 10% glacijalne sirćetne kiseline, u odnosu 1:20. Ekstrakt je centrifugiran 10 minuta na 5000 xg, na +4°C. Od supernatanta je uzeto 1 mL uzorka koji je pomešan sa 0.5 mL rastvora fenilhidrazina i 100  $\mu\text{L}$  rastvora tiouree. Ova mešavina je inkubirana u vodenom kupatilu na +100°C tokom 15 minuta, i zatim brzo ohlađena na ledu. Zatim, dodata je sumporna kiselina (85%) na ledu i ova reakciona smeša je inkubirana tokom 30 minuta. Apsorbance su očitane na 530 nm. Koncentracija AsA je određena iz standardne krive sa poznatim koncentracijama AsA. Blank je sadržao sumpornu kiselinu umesto AsA.



### 3.18.6 Ekstrakcija i kvantifikacija ukupnih proteina

Da bi se odredili ukupni proteini u tkivu biljke, uzimane su fronde ukupne mase 1 g, koje su homogenizovane u avanu uz dodatak tečnog azota. U svaki uzorak dodato je po 1 ml pufera za ekstrakciju proteina, koji je sadržao: 0.1 M Amonijum-acetatni pufer pH 6.8, polivinilpirolidon (PVPP) 1.5%, 10 mM ditriotreitol (DTT) i 1 mM fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF). Posle homogenizacije, uzorci su centrifugirani na 12000 xg u trajanju od 5 min na +4°C. Izolati su čuvani na -80°C i dalje korišćeni za kvantifikaciju ukupnih proteina i enzimske testove. Ukupni proteini su kvantifikovani pomoću Bradford metode (Bradford, 1976). Za ovu analizu pripremljena je smeša od 10 µL uzorka i 200 µL Bradfordovog reagensa. Apsorbancija je izmerena spektrofotometrijski na 620 nm. Rezultati su prikazani grafički.

### 3.18.7 Procena broja bakterija na površini sočivica

Za potrebe testova antioksidativnog stresa, bilo je potrebno odrediti kolika je biomasa bakterija na sočivicama i da li ona može uticati na prethodna merenja. Posle 1. i 5. dana kokultivacije, 0.1 g sveže mase sočivica je potopljen u 1 mL sterilnog fiziološkog rastvora (0.9% NaCl) tokom 15 minuta uz pulsno vorteksovanje na svakih 5 minuta da bi se većina bakterija sprala sa površine sočivica, a zatim je ova suspenzija korišćena za serijska razblaženja. Serijska razblaženja su korišćena za određivanje relativnog broja bakterija na površini korena sočivica, u hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola i bez fenola. Broj bakterija je predstavljen kao broj jedinica koje formiraju kolonije (colony-forming units, CFU) po miligramu sveže mase sočivica (CFU mg<sup>-1</sup>). Biomasa bakterija po svežoj masi sočivica je izračunata na osnovu prosečne mase bakterijske ćelije od 10<sup>-12</sup> g, tj. 1 pg.

### 3.19 Statistička analiza i grafička analiza

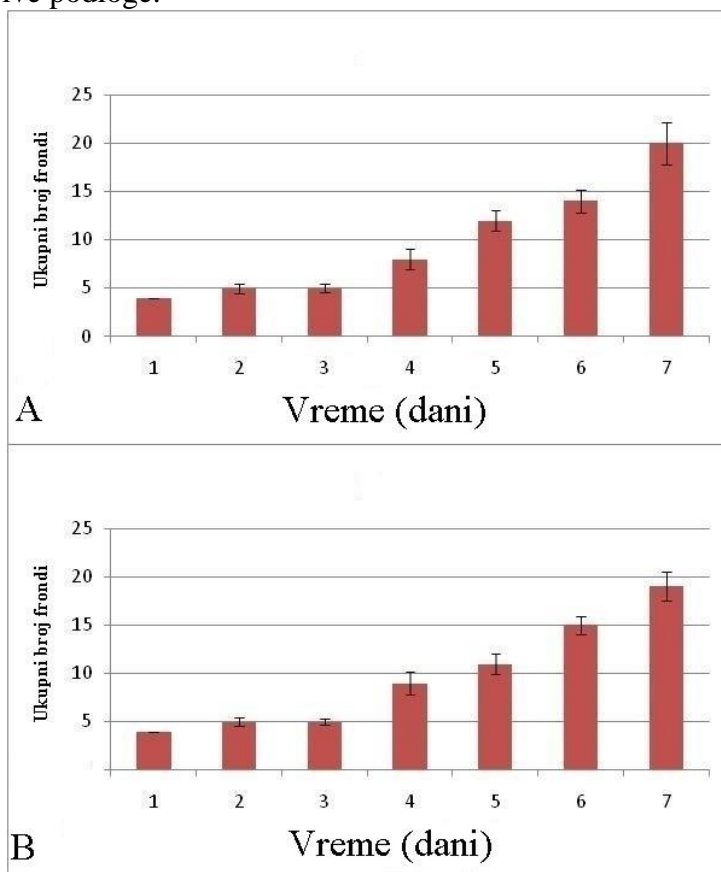
Numerički podaci su analizirani pomoću programa Statgraphics, verzija 4.2. (STSci Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA). Svaka vrednost predstavlja srednju vrednost i standardnu grešku (SE). Svi grafici su generisani u Microsoft Excel. Mikrografije su generisane pomoću AxioVision softvera, verzija 4.8.

Za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćena je analiza varijanse (ANOVA), LSD („least significant difference“) test za utvrđivanje statistički značajnih razlika na nivou  $p \leq 0.05$ , kao i R program za t-test (R Core Team, 2017).

## 4. Rezultati

### 4.1 Gajenje sočivica na H i MS hranljivoj podlozi

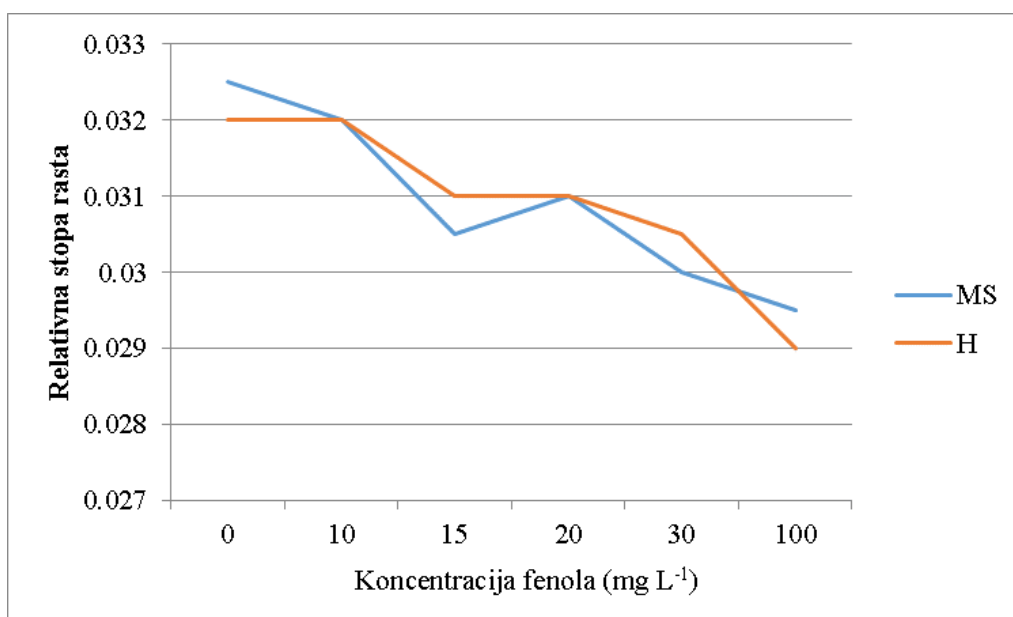
Obe ispitivane hranljive podloge (H i MS) imaju slične efekte na multiplikaciju sočivice (Slika 19). U H hranljivoj podlozi je uočeno 5 novih frondi (Slika 19A). Posle 4 dana kultivacije, 4 nove fronde su nastale od početne majke-fronde u MS hranljivoj podlozi (Slika 19B). Nakon 7 dana, broj novoformiranih frondi bio je preko 5 puta veći nego na početku eksperimenta. Morfologija biljaka je bila ista na obe hranljive podloge.



Slika 19. Umnožavanje sočivice na dve različite hranljive podloge tokom 7 dana gajenja na A) MS (Murashige-Skoog) i B) H (Hoagland) tečnoj hranljivoj podlozi

### 4.2 Relativna stopa rasta sočivica u hranljivoj podlozi sa fenolom

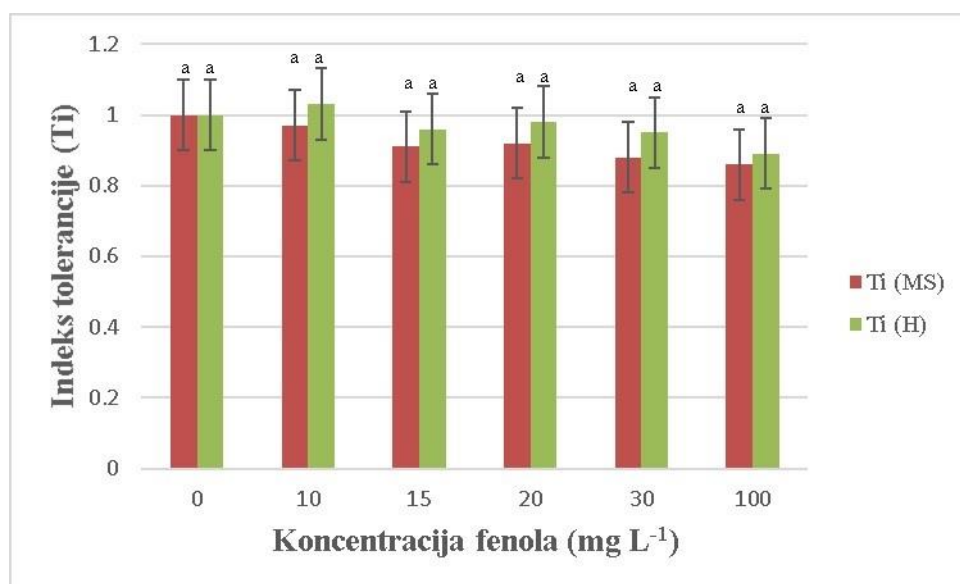
Relativna stopa rasta (RGR) sočivica postepeno opada u prisustvu fenola (Slika 20). Trend opadanja je konstantan, ali spor. Najniža produkcija biomase je zabeležena na najvišoj koncentraciji fenola ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). U odnosu na hranljivu podlogu bez fenola, hranljiva podloga sa fenolom je dovela do opadanja RGR sočivica od 8%. Makroskopske morfološke promene biljaka koje su rasle u hranljivoj podlozi sa fenolom, nisu primećene.



Slika 20. Zavisnost relativne stope rasta sočivica od koncentracije fenola *in vitro* posle pet dana gajenja na MS i H – Hoagland tečnim hranljivim podlogama

#### 4.3 Tolerancija sočivice na prisustvo fenola u hranljivoj podlozi

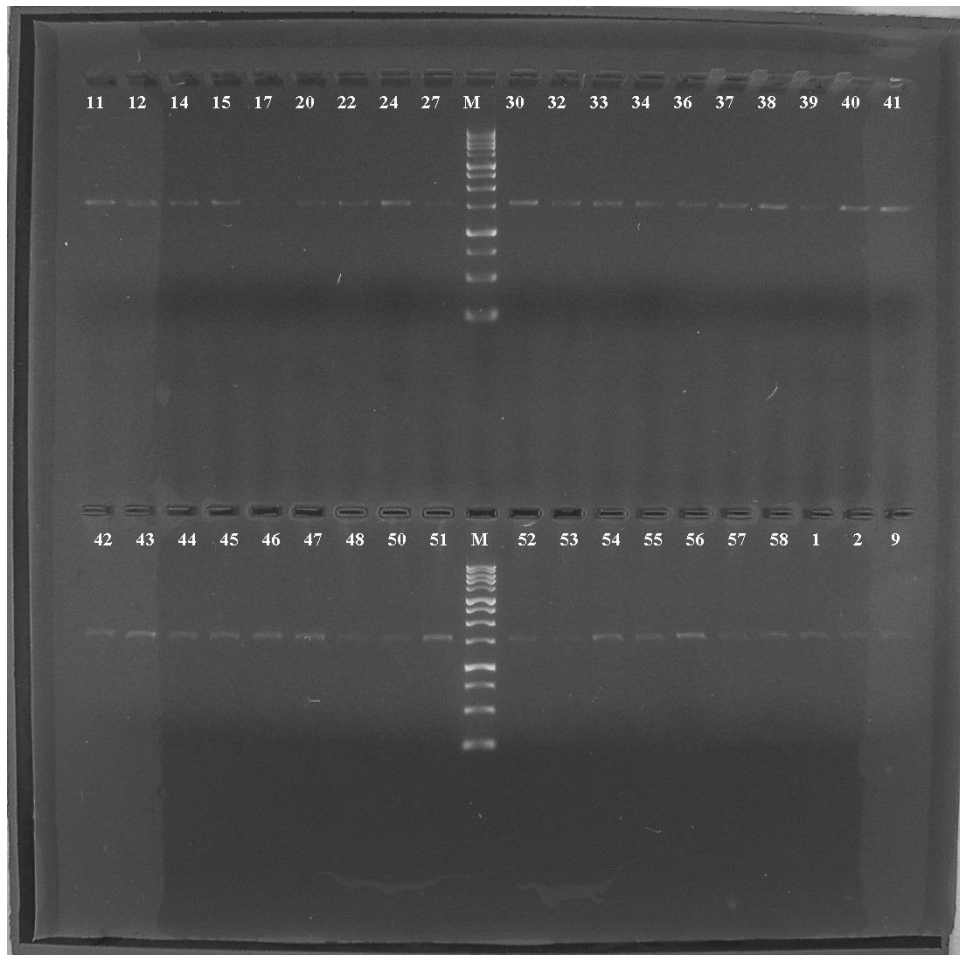
Tolerancija na fenol prikazana je Slikom 21. Vrednosti Indeksa tolerancije (Ti) se ne razlikuju značajno između biljaka gajenih na dve različite hranljive podloge. Takođe, vrednosti Ti se nisu razlikovale među biljkama gajenim na rastućim koncentracijama fenola.



Slika 21. Tolerancija na fenol sočivica gajenih na MS i H hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama fenola. Vrednosti u tabeli su rezultat tri ponavljanja sa standardnom greškom. Ista slova pored vrednosti ukazuju da nema statistički značajne razlike u merenjima

#### 4.4 Genetičke i metaboličke karakteristike izolata

Identifikacija bakterijskih izolata je izvedena pomoću sekvenciranja. Pre sekvenciranja, prečišćeni uzorci su testirani vizuelno pod UV lampom, elektroforetskim razdvajanjem na 1% agaroznom gelu i obeleženi etidijum-bromidom (EtBr). Rezultati razdvajanja elektroforezom su prikazani na Slici 22.



Slika 22. Prečišćeni PCR proizvodi sa amplifikovanom 16S rDNK na 1% agaroznom gelu i obojeni EtBr, vizualizovani pomoću UV lampe. Centar: molekularni marker, Invitrogen (USA); prvi red: 11, 12, 14, 15, 17, 20, 22, 24, 27, M - marker, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41; drugi red: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, M - marker, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 1, 2, 9)

Identitet bakterijskih sojeva dalje je utvrđen proverom identičnosti dobijenih DNK sekvenci sa sekvencama u dostupnoj bazi podataka. Identičnost sekvencija veća od 91% uzeta je kao kriterijum za odabir najboljih pogodaka.

U Tabeli 8, prikazana je taksonomija bakterijskih izolata, njihovi odgovarajući denominatori, kao i njihova rezistencija na fenol i mogućnost rasta na minimalnoj hranljivoj podlozi sa fenolom kao jedinim izvorom ugljenika. Takođe, tabelom su obuhvaćene različitosti grupa izolata dobijenih posle različitih pretretmana biljnog materijala (grupe A, B, C i D). Grupa A biljaka je obrisana o sterilni filter papir i na taj način su eliminisani bakterijski sojevi sa slabim fizičkim vezama sa rizosferom; grupa B je osušena na vazduhu u sterilnom okruženju i na taj način su eliminisani i bakterijski sojevi sa prolaznim vezama sa rizosferom, kao i motilni, slobodnoplivajući organizmi koji zavise od vodenog okruženja; grupa D je isprana u destilovanoj vodi 2 puta po 15 minuta, čime je eliminisan najveći deo bakterijskih sojeva na površini korena, dok su endofitske vrste (koje nastanjuju unutrašnjost korena) ostale intaktne. Bakterijski sojevi grupe C su izolovani iz okolnog rastvora oko nesterilnih frondi, u kome je očekivano prisustvo brojnih motilnih i slobodnoživećih bakterija sa vrlo slabom fizičkom interakcijom sa rizosferom, nasuprot grupama A, B i D, gde je očekivano prisustvo bakterijskih sojeva koji žive pretežno epifitno, tj. pričvršćeni za površinu korena.

Skoro svi identifikovani izolati pripadaju grupi  $\gamma$ -proteobakterija, izuzev 3 vrste (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus sp.* i *Bacillus thuringiensis*) koje pripadaju grupi Firmicutes.

Manje prisutni su članovi familija *Xanthomonadaceae* (7), *Hafniaceae* (6), *Staphylococcaceae* (6), *Enterobacteriaceae* (6), *Yersiniaceae* (5), i najmanje članovi familija *Micrococcaceae* (1) i *Bacillaceae* (1).

Od 60 izolata, utvrđeno je da 18 nema sposobnost rasta na najnižoj testiranoj koncentraciji fenola (200 mg L<sup>-1</sup>). To su sojevi: *B. thuringiensis* 6-2-101, *Staphylococcus* sp. B2-106/5, *Stenotrophomonas maltophilia* A3-104/2, *Pseudomonas putida* A3-104/3, *Serratia fonticola* A3-104/4, *S. maltophilia* A6-104/3, *Pseudomonas* sp. A7-102/2, *P. brenneri* B1-105/1, *S. maltophilia* B2-106/1, *P. oryzae* B2-106/6, *P. gessardii* C31-106/3, *P. fluorescens* C31-106/5, *P. panacis* D1-105/1, *M. luteus* D4-106/2, *Xanthomonadales bacterium* A3-102/1, *Stenotrophomonas* sp. B2-106/7, *Pseudomonas* sp. B3-106/2, *Klebsiella* sp. B3-106/3.

Ukupno 42 izolata rastu na hranljivoj podlozi koja sadrži sledeće koncentracije fenola: 200, 500 i 1000 mg L<sup>-1</sup>.

Na hranljivim podlogama sa 1000 mg L<sup>-1</sup> fenola, bez prethodne aklimatizacije (direktnim zasejavanjem na hranljivu podlogu sa 1000 mg L<sup>-1</sup>), vidljive kolonije nakon 3 dana formiraju sledeći sojevi: *Klebsiella oxytoca* A6-104/2 (soj 9), *Lelliottia* sp. B1-105/2 (soj 11), *Klebsiella oxytoca* D1-104/14bg (soj 14), *Hafnia alvei* C31-106/2 (soj 37), *Hafnia paralvei* C32-106/3 (soj 43) i *Serratia nematodiphila* D1-104/1 (soj 51).

Na hranljivim podlogama sa 1000 mg L<sup>-1</sup> fenola, sa prethodnom aklimatizacijom (postepenim presejavanjem sa hranljivih podloga sa nižom koncentracijom na više koncentracije fenola), rastu dodatno sledeći sojevi: *Pseudomonas brenneri* (soj 8), *Serratia fonticola* (soj 19), *P. oryzae* (soj 25), *Serratia* sp. (soj 27), *P. putida* (soj 33), *Hafnia alvei* (soj 36), *H. alvei* (soj 41), *Pseudomonas* sp. (soj 42), *Hafnia paralvei* (soj 48), *Enterobacter* sp. (soj 50), *Pseudomonas putida* (soj 53), *P. putida* (soj 63), i *P. putida* (soj 66).

Na minimalnoj hranljivoj podlozi sa fenolom (20 mg L<sup>-1</sup>) kao jedinim izvorom ugljenika vidljive su kolonije sledećih sojeva: *Staphylococcus haemolyticus* (soj 1), *K. oxytoca* (soj 9), *Buttiauxella* sp. (*Enterobacteriaceae bacterium*) (soj 10), *Lelliottia* sp. (soj 11), *K. oxytoca* (soj 14), *P. oryzae* (soj 15), *Pseudomonas* sp. (soj 17), *Serratia* sp. (soj 27), *P. putida* (soj 29), *P. putida* (soj 31), *P. putida* (soj 33), *Stenotrophomonas maltophilia* (soj 35), *H. alvei* (soj 37), *P. gessardii* (soj 39), *Pseudomonas* sp. (soj 42), *H. paralvei* (soj 43), *P. yamanorum* (soj 47), *S. nematodiphila* (soj 51), *P. putida* (soj 53), *P. putida* (soj 63), i *P. putida* (soj 66).

Na osnovu ovih rezultata rasta na hranljivim podlogama sa različitim sadržajem fenola, kao kriterijumi za izbor najboljih sojeva za potencijalnu biodegradaciju fenola uzeto je sledeće:

1. koncentracija fenola na kojoj je moguć rast pojedinačnih kolonija,
2. sposobnost rasta u minimalnoj hranljivoj podlozi sa fenolom (20 mg L<sup>-1</sup>) kao jedinim izvorom ugljenika,
3. sposobnost rasta na hranljivoj podlozi sa 1000 mg L<sup>-1</sup> fenola bez prethodne aklimatizacije
4. brzina rasta izražena kroz brzinu formiranja kolonija na čvrstim podlogama sa fenolom na 500 i 1000 mg L<sup>-1</sup> kao i kroz pojavu turbiditeta u tečnoj minimalnoj hranljivoj podlozi (manje od 3 dana).

Najuspešnim sojem smatran je onaj čije kolonije su formirane na podlogama sa fenolom (500 i 1000 mg L<sup>-1</sup>) za manje od 3 dana bez prethodnog rasta na nižoj koncentraciji fenola (bez aklimatizacije) i koji dovodi do zamućenja (turbiditeta) tečne minimalne hranljive podloge za manje od 3 dana kultivacije.

Prema ovim kriterijumima, za dalja ispitivanja izabrano je 7 sojeva: *Klebsiella oxytoca* A6-104/2, MF526910; *Lelliottia* sp. B1-105/2bg, MK212916; *K. oxytoca* D1-104/14bg, MK212915; *Serratia* sp. A7-102/1, MF526924; *Hafnia alvei* C31-106/2, MF526934; *H. paralvei* C32-106/3, MF526939; *S. nematodiphila* D1-104/1, MF526945.

Tabela 8. Taksonomija bakterijskih izolata iz rizosfere sočivice, rezistencija na različite koncentracije fenola i mogućnost rasta na minimalnoj hranljivoj podlozi

ID	Grupa (pretretman biljnog materijala)	Najbliži takson	Access. No. (najbližeg taksona)	Identičnost	Accession No. (izolati rizosfere)	Rast na fenolu (mg L <sup>-1</sup> )				Minimalni medijum
						Ne raste na 200	200	500	1000	
1	4-1-3-100/1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 0078	KP236214	99%	MF526904		+			+
2	4-1-3-100/2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> CIFRI P-TSB4	JF784022	99%	MF526905			+		
3	4-2-100/1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SS-13	KX964163	99%	MF526906			+		
4	4-2-100/2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> LCR 51	FJ976569	99%	MF526907			+		
5	4-2-100/3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> strain S1.2.2	KR779793	98%	MF526962			+		
6	5-1-102	<i>Enterobacter</i> sp. WJ3	KT318370	100%	MF536889		+			
7	6-2-101	<i>Bacillus thuringiensis</i> NBRC3951	AB680181	91%	MF526908	+				
8	A5-106/3	<i>Pseudomonas</i> sp. JL21	JF740045	99%	MF526909				+	
9	A6-104/2	<i>Klebsiella oxytoca</i> N7	KM349412	99%	MF526910				+	+
10	B1-105/2	<i>Enterobacter</i> sp. YUST-DW17	HM640295	94%	MF526911		+			+
11	B1-105/2bg	<i>Lelliottia</i> sp. 11bg	MH703498	95%	MK212916				+	+
12	B2-106/5	<i>Staphylococcus</i> sp. EA_L_11	KJ642371	98%	MF526912	+				
14	D1-104/14bg	<i>Klebsiella oxytoca</i> N7	KM349412	99%	MK212915				+	+
15	D1-104/3	<i>Pseudomonas oryzae</i> L-1	NR_025881	99%	MF526913		+			+
16	D1-105/4	<i>Lelliottia amnigena</i> Lmb019 16S	KT986089	99%	MF526914		+			
17	A3-102/2	<i>Pseudomonas</i> sp. X8	KY490127	99%	MF526960			+		+
18	A3-102/3	<i>Serratia fonticola</i> GS2	CP013913	98%	MF526915			+		
19	A3-104/1	<i>Serratia fonticola</i> GS2	CP013913	98%	MF526916				+	
20	A3-104/2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Q1	HE862285	99%	MF526917	+				
21	A3-104/3	<i>Pseudomonas putida</i> KAR35	KR054997	99%	MF526918	+				
22	A3-104/4	<i>Serratia fonticola</i> GS2	CP013913	98%	MF526919	+				
23	A3-104/5	<i>Pseudomonas putida</i> L3	T767824	99%	MF526920				+	

24	A5-106/1	<i>Pseudomonas oryzihabitans L-1</i>	NR_025881	99%	MF526921			+		
25	A6-104/1	<i>Pseudomonas oryzihabitans L-1</i>	NR_025881	98%	MF526922				+	
26	A6-104/3	<i>Stenotrophomonas maltophilia Q1</i>	HE862285	98%	MF526923	+				
27	A7-102/1	<i>Serratia sp. 1136</i>	JX566540	98%	MF526924				+	+
28	A7-102/2	<i>Pseudomonas sp. E88</i>	KR703537	98%	MF526925	+				
29	B1-104/2	<i>Pseudomonas putida KAR35</i>	KR054997	99%	MF526926			+		+
30	B1-105/1	<i>Pseudomonas brenneri strain NA</i>	KT184488	98%	MF526927	+				
31	B1-105/3	<i>Pseudomonas putida KAR35</i>	KR054997	99%	MF526928				+	+
32	B2-106/1	<i>Stenotrophomonas maltophilia Q1</i>	HE862285	99%	MF526929	+				
33	B2-106/4	<i>Pseudomonas putida KAR35</i>	KR054997	99%	MF526930				+	+
34	B2-106/6	<i>Pseudomonas oryzihabitans L-1</i>	NR_025881	98%	MF526931	+				
35	B3-106/4	<i>Stenotrophomonas maltophilia Q1</i>	HE862285	99%	MF526932			+		+
36	C31-106/1	<i>Hafnia alvei FDAARGOS_158</i>	CP014031	99%	MF526933				+	
37	C31-106/2	<i>Hafnia alvei JCM 1666</i>	NR_112985	99%	MF526934				+	+
38	C31-106/3	<i>Pseudomonas gessardii IHBB 9179</i>	KR085817	99%	MF526935	+				
39	C31-106/4	<i>Pseudomonas gessardii IHBB 9179</i>	KR085817	99%	MF526936			+		+
40	C31-106/5	<i>Pseudomonas fluorescens A12</i>	KT767652	100%	MF526959	+				
41	C32-106/1	<i>Hafnia alvei 14</i>	KY849243	98%	MF526937				+	
42	C32-106/2	<i>Pseudomonas sp. AceT-1</i>	FJ605388	99%	MF526938				+	+
43	C32-106/3	<i>Hafnia paralvei ATCC 29927</i>	NR_116898	99%	MF526939				+	+
44	C32-106/4	<i>Pseudomonas fragi NRRL B-727</i>	LT629783	99%	MF526940				+	
45	C32-106/5	<i>Pseudomonas putida NBRC 14164</i>	KY952686	98%	MF526961			+		
47	C44-104/1	<i>Pseudomonas yamanorum LMG 27247</i>	LT629793	99%	MF526941				+	+
48	C44-104/2	<i>Hafnia paralvei strain ATCC 29927</i>	NR_116898	98%	MF526942			+		
49	C44-106/1	<i>Pseudomonas sp. AMF4009</i>	JQ316310	98%	MF526943			+		

50	C44-106/2	<i>Enterobacter nimipressuralis</i> LMG 10245	JF430421	98%	MF526944				+	
51	D1-104/1	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	NR_044385	99%	MF526945				+	+
52	D1-105/1	<i>Pseudomonas panacis</i> D313	KT758723	98%	MF526946	+				
53	D1-105/2	<i>Pseudomonas putida</i> KAR35	KR054997	99%	MF526947				+	+
54	D1-105/3	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> IHB B 13621	KP762549	99%	MF526948			+		
55	D4-106/1	<i>Pseudomonas putida</i> L3	T767824	99%	MF526949			+		
56	D4-106/2	<i>Micrococcus luteus</i> HN-18	KT003262	98%	MF526950	+				
57	5-2-101	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Q1	HE862285	99%	MF526951		+			
60	A3-102/1	<i>Xanthomonadales bacterium</i> F2V8C04	HG322894	98%	MF526952	+				
62	B2-106/7	<i>Stenotrophomonas</i> sp. LMG 29892	KY973973	98%	MF526953	+				
63	B3-106/1	<i>Pseudomonas putida</i> KAR35	KR054997	99%	MF526954				+	+
64	B3-106/2	<i>Pseudomonas</i> sp. WXB RN2	KJ184953	98%	MF526955	+				
65	B3-106/3	<i>Klebsiella</i> sp. ZA	KP769536	98%	MF526956	+				
66	D12-106	<i>Pseudomonas putida</i> L3	T767824	99%	MF526957				+	+

Dodatna identifikacija dva bakterijska soja (*Serratia* sp. 27 i *S. nematodiphila* 51) izvedena je pomoću sekvenciranja gyrB gena i rezultati sekvenciranja i bioinformatičke analize predstavljeni su takođe tabelarno (Tabela 9).

Tabela 9. Dodatna identifikacija odabranih sojeva (*Serratia* sp. 27 i *S. nematodiphila* 51) na osnovu gyrB gena

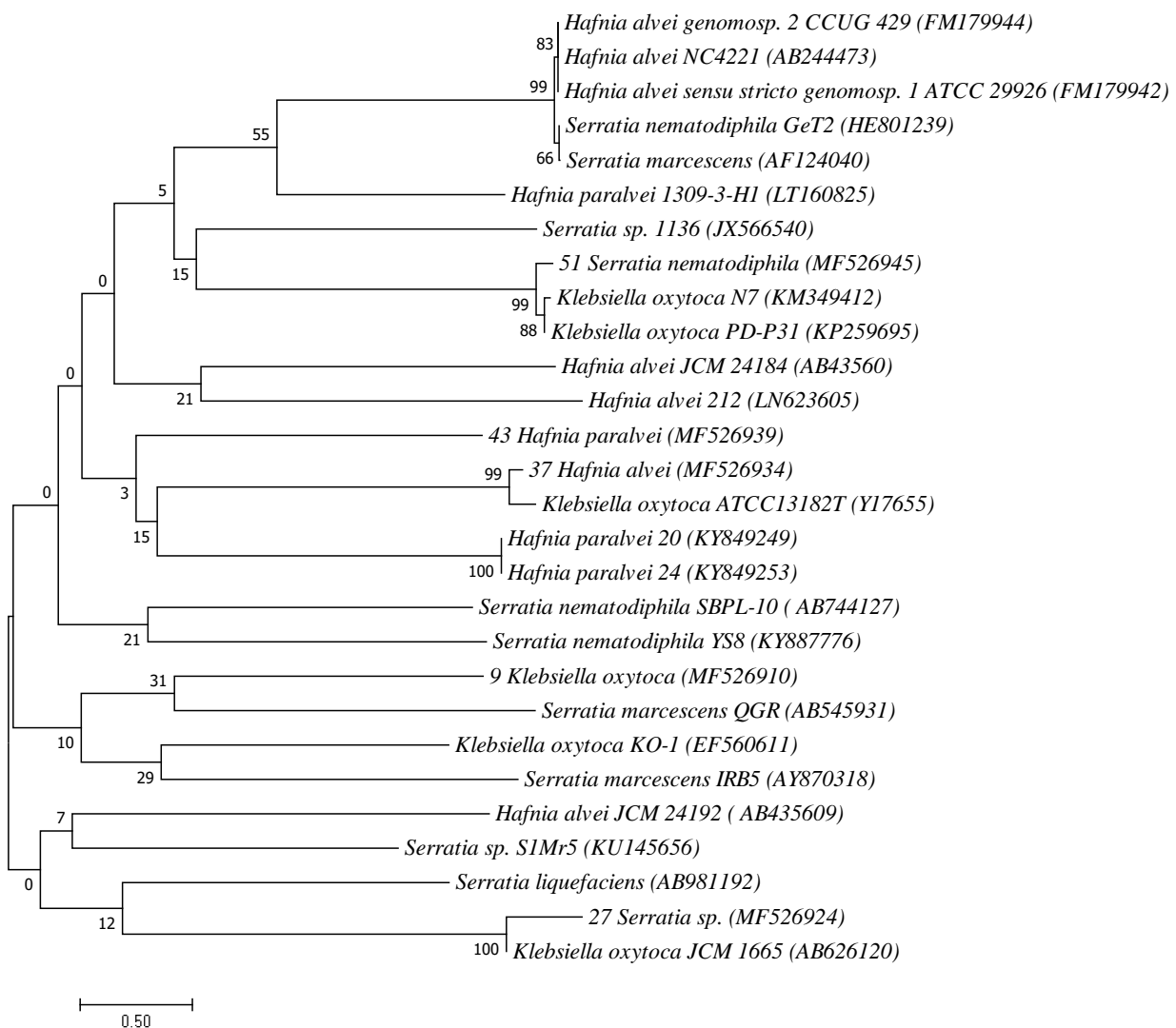
Naziv sekvence	Najbliži takson	Identitet	ID najbližeg taksona
27 gyrB	<i>Serratia marcescens</i> SSM2560	96%	DQ386886
51 gyrB	<i>Serratia marcescens</i> RSC-14	93%	CP012639

Filogenetski odnosi među odabranim sojevima su prikazani filogenetskim stablima koja su konstruisana pomoću MEGA7 programa (Slika 21). Distance su proračunate pomoću kompozitne metode maksimalne verovatnoće i izražene kao broj supstitucija po nukleotidnom mestu. Topologija stabala je konstruisana korišćenjem „bootstrap“ metode sa 1000 replikata. Procenat replikata stabala u kojoj se povezani taksoni grupišu zajedno u bootstrap testu sa 1000 replikata prikazan je pored grana. Stablo je konstruisano srazmerno skali, sa dužinom grana koje imaju iste jedinice kao i pri računanju evolutivnih razdaljina tokom konstruisanja filogenetskog stabla. Evolutivna istorija taksona je izvedena korišćenjem „Neighbor-Joining“ (NJ) metode. Evolutivne razdaljine su



generisane kompozitnom metodom najveće sličnosti (eng. Maximum Composite Likelihood) i predstavljene su pomoću broja supstitucija baza na datom nukleotidnom mestu. Analiza je uključila 28 nukleotidnih sekvencija. Sve nukleotidne pozicije sa manje od 95% pokrivenosti nukleotida su eliminisane, tj. nepotpuni segmenti sa manje od 5% pukotine (gap) tokom poravnanja, nedostajući podaci i neodređene baze su dozvoljene na svakoj nukleotidnoj poziciji. U konačnom datasetu bilo je 399 pozicija. Sve evolutivne analize su izvedene u programu MEGA7.

Filogenetsko stablo (Slika 23) ukazuje na filogenetske veze između izabranih bakterijskih sojeva (9 - *Klebsiella oxytoca* A6-104/2, MF526910; 27 - *Serratia* sp. A7-102/1, MF526924; 37 - *Hafnia alvei* C31-106/2, MF526934; 43 - *H. paralvei* C32-106/3, MF526939; 51 - *S. nematodiphila* D1-104/1, MF526945) i njihovih najbližih srodnika, čije su sekvence uzete iz javne baze podataka GenBank.



Slika 23. Filogenetsko stablo odabranih bakterijskih sojeva: (9 - *Klebsiella oxytoca* A6-104/2, MF526910; 27 - *Serratia* sp. A7-102/1, MF526924; 37 - *Hafnia alvei* C31-106/2, MF526934; 43 - *H. paralvei* C32-106/3, MF526939; 51 - *S. nematodiphila* D1-104/1, MF526945). Prikazano je optimalno stablo sa zbirom dužine grana = 33.30619557

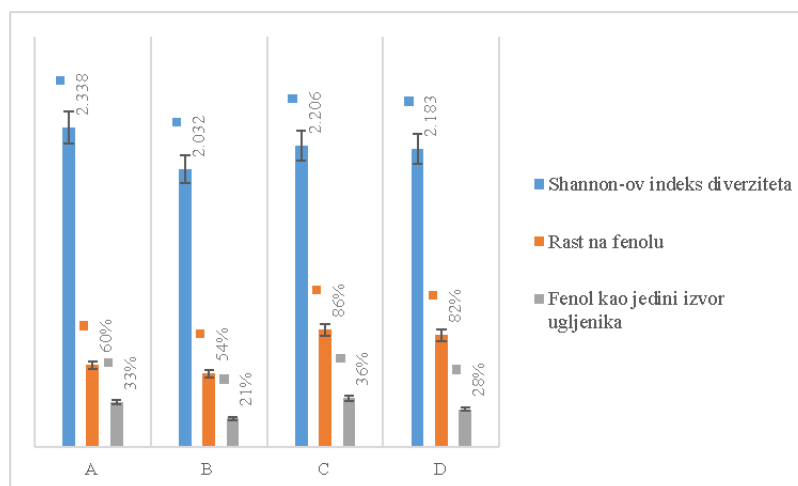
## 4.4 Biohemijska karakterizacija, ekološki diverzitet, formiranje biofilma i rezistencija na antibiotike

### 4.4.1 Biohemijska karakterizacija odabranih sojeva

Pet odabranih sojeva dodatno je okarakterisano putem automatskog sistema Vitek 2 (Biomerieux, France). Rezultati analize na Vitek 2 sistemu pokazuju potpunu saglasnost sa molekularno-biološkom identifikacijom putem sekvenciranja 16S rRNK gena. Kako Vitek 2 pravi diskriminaciju između bakterijskih kultura na osnovu genetičke čistote, ovaj postupak je potvrdio i da su testirane kulture, dobijene presejavanjem iz minimalne hranljive podloge sa fenolom kao jedinim izvorom ugljenika, zaista genetički vrlo čiste (>90%) (Prilog 1).

### 4.4.2 Ekološki diverzitet izolovanih bakterijskih sojeva

Određen je Shannonov indeks diverziteta (Slika 24) kao kvantitativna mera zastupljenosti određenog taksona u grupi organizama. U ovom slučaju, Shannonov indeks diverziteta odnosi se na broj genetički različitih sojeva u grupi bakterijskih izolata, izolovanih sa korena sočivice posle različitih pretrretmana biljnog materijala. Pretretman je definisan na početku odeljka 4.4: „Genetičke i metaboličke karakteristike izolata“. Što je Shannonov indeks diverziteta veći, to je veći ekološki diverzitet grupe. Najveći ekološki diverzitet nalazi se u grupi A. Najmanji ekološki diverzitet nalazi se u grupi B, kao i najmanji procenat sojeva koji mogu da koriste fenol kao jedini izvor C-atoma. Grupe A i C imaju približno isti procenat sojeva koji mogu da koriste fenol kao jedini izvor C-atoma. Najveći procenat bakterija koje rastu na fenolu (na bilo kojoj od sledećih koncentracija: 200, 500 ili 1000 mg L<sup>-1</sup>) nalazi se u grupi C. Približno isti procenat bakterija koje rastu na fenolu nalazi se u grupi D.



Slika 24. Shannonov indeks diverziteta, rast na fenolu, i mogućnost korišćenja fenola kao jedini izvor ugljenika

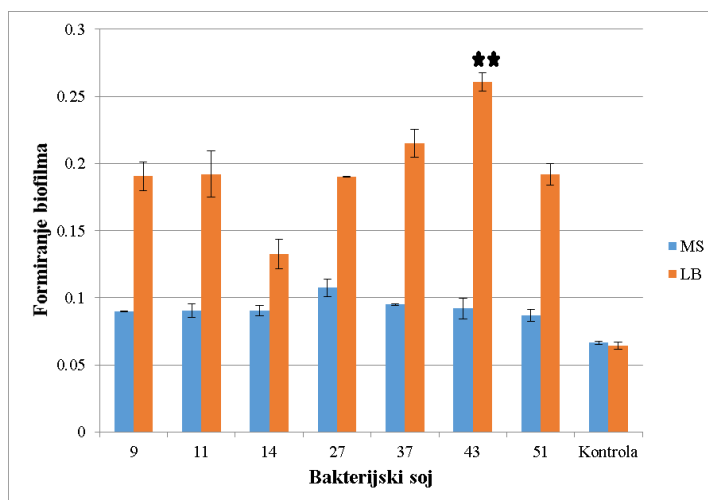
### 4.4.3 Formiranje biofilma *in vitro*

Svi bakterijski sojevi koji su označeni kao potencijalno dobri kandidati za bioremedijaciju na osnovu prethodnih testova (ukupno 7 sojeva) testirano je na mogućnost formiranja biofilma.

Svih 7 bakterijskih sojeva ima sposobnost formiranja biofilma. Međutim, sposobnost *H. paralvei* da formira biofilm je statistički značajno veća u odnosu na druge sojeve tokom uzgajanja na LB hranljivoj podlozi (statistička značajnost obeležena je pomoću \*\*, i određena pomoću t-testa za jedan uzorak, 6 df,  $p < 0.01$ , Slika 25).

Primećena je razlika u formiranju biofilma između grupe LB i MS.. Ne postoji statistički značajna razlika u formiranju biofilma unutar grupe MS. *K. oxytoca* ima najmanju sposobnost formiranja

biofilma u odnosu na ostale ispitivane sojeve na LB hranljivoj podlozi. Na MS hranljivoj podlozi su primećene manje razlike u formiranju biofilma kod svih ispitivanih sojeva..



Slika 25. Mogućnost formiranja biofilma na LB i MS hranljivoj podlozi sa 200 mg L<sup>-1</sup> fenola. Bakterijski sojevi su prikazani brojevima na x osi: 9 – *Klebsiella oxytoca*, 11 – *Lelliottia sp.*, 14 – *K. oxytoca*, 27 – *Serratia marcescens*, 37 – *Hafnia alvei*, 43 – *H. paralvei*, 51 – *S. nematodiphila*, Kontrola – negativna (sterilna) kontrola. Optička gustina biofilma je merena na 590 nm. Srednja vrednost označena sa \*\* predstavlja statistički značajnu razliku formiranja biofilma i najbolje formiranje biofilma u grupi LB određeno t-testom za jedan uzorak, 6 df, p<0.01

#### 4.4.4 Minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika (MIC)

Rezistencija na antibiotike je predstavljena minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIC), tj. najnižom koncentracijom antibiotika resuspendovanog u mekom LB agaru (u mg L<sup>-1</sup>) koja je inhibirala bakterijski rast.

Rezultati su predstavljeni tabelarno (Tabela 10). Na osnovu svih prikazanih rezultata i interpretativnih kriterijuma iz protokola Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing (Control and Lab. Standards Institute, 26<sup>th</sup> International Supplement, 2016), zaključeno je da su svi bakterijski sojevi osetljivi prema svim upotrebljenim antibioticima.

Tabela 10. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) antibiotika izabranih bakterijskih sojeva

Bakterijski soj	Antibiotici i MIC (mg L <sup>-1</sup> )				
	Aminocen (Aminoglikozid)	Piptaz (Piperacilin)	Cefepim (Cefalosporina)	Mipecid (Cilastatin + Imipenem)	Marocen (Fluorohinolon)
<i>K. oxytoca</i> 9	8	2	0.13	0.13	0.13
<i>Lelliottia sp.</i> 11	4	2	0.13	0.06	0.13
<i>K. oxytoca</i> 14	4	2	0.06	0.06	0.06
<i>S. marcescens</i> 27	8	2	0.25	0.06	0.13
<i>H. alvei</i> 37	8	2	0.13	0.13	0.13
<i>H. paralvei</i> 43	8	2	0.13	0.06	0.06
<i>S. nematodiphila</i> 51	8	2	0.13	0.13	0.13

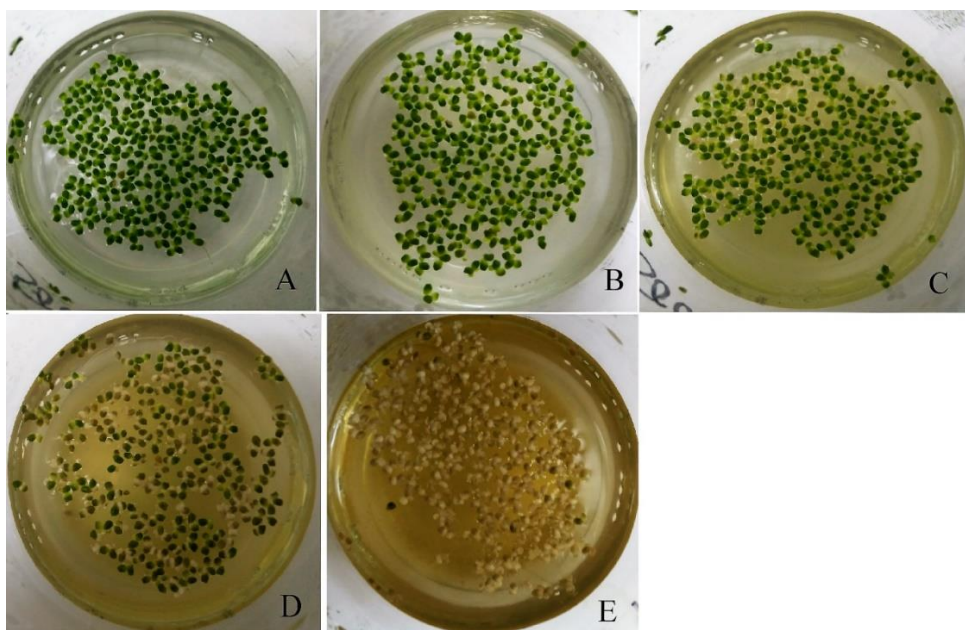
#### 4.5 Stopa multiplikacije i makroskopski efekti fenola i bakterija na sočivice

Prisustvo bakterija ne menja morfologiju biljaka posle 14 dana ko-kultivacije u hranljivoj podlozi bez fenola. Rast bakterija u hranljivoj podlozi sa biljkama vidljiv je po promeni turbiditeta (zamućenju) i prema činjenici da je sterilni rastvor sa površinski sterilisanim sočivicama ostao bistar i na kraju eksperimenta (Slika 26). Posle 3. dana, postaje primetno formiranje boje samo u uzorku sa sojem *K. oxytoca* 14.



Slika 26. Izgled kulture sočivice i ko-kultura bakterija i sočivica posle 14 dana kultivacije u MS hranljivoj podlozi bez fenola. Oznake (redom, s leva na desno) predstavljaju bakterijski soj kojim su inokulisane sočivice: 14 – *K. oxytoca*, 9 – *K. oxytoca*, 11 – *Lelliottia* sp., NK – negativna kontrola, površinski sterilisane sočivice bez prisustva bakterija, 37 – *H. alvei*, 43 – *H. paralvei*, 27 – *S. marcescens*, 51 – *S. nematodiphila*

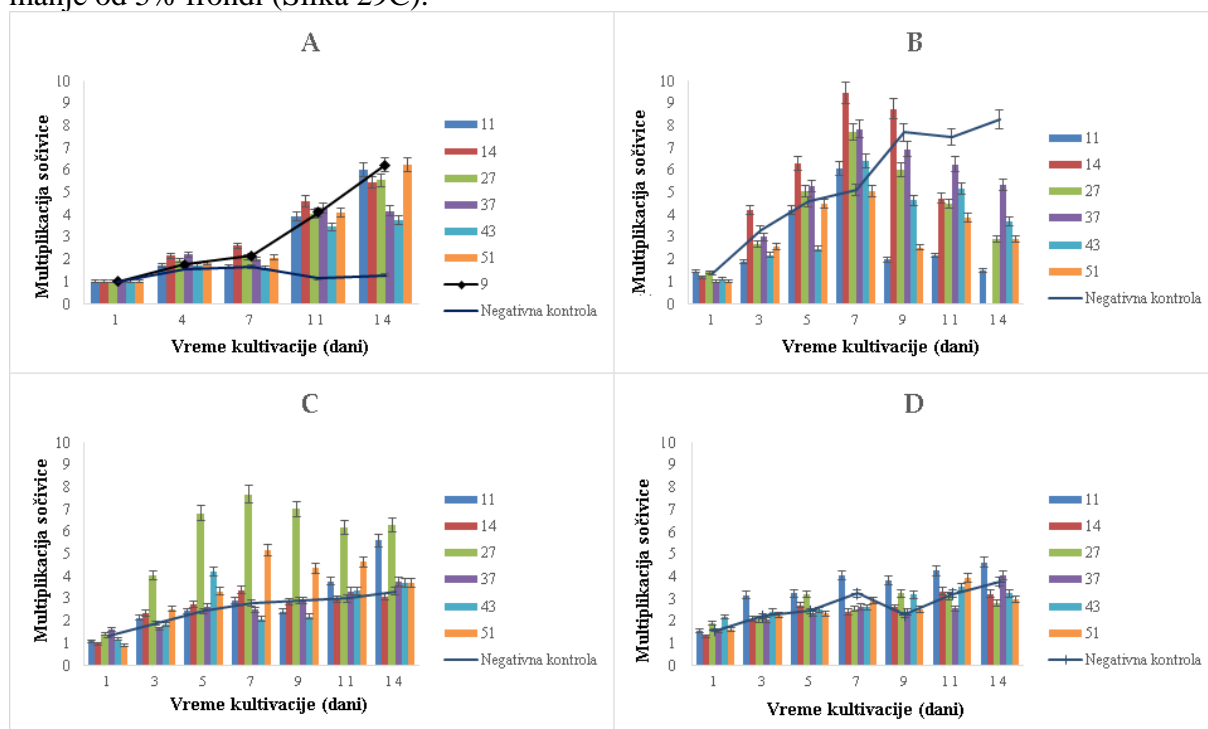
Ovaj efekat primećen je u hranljivoj podlozi bez fenola i sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola, ali kasnije tokom kultivacije, tj. posle 7 dana. Ni pod jednim od eksperimentalnih uslova nije primećen fitopatogeni efekat, osim kod uzoraka sočivice sa bakterijskim sojem *K. oxytoca* 14 na 500 mg L<sup>-1</sup> fenola posle 7. dana kultivacije, kada nastupa ubrzano uvenuće sočivica (Slika 27).



Slika 27. Postepeno uvenuće sočivica u ko-kulturi sa *K. oxytoca* 14 tokom 14 dana ko-kultivacije u hranljivoj MS podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup>. Stanje sočivica posle A – 3 B – 5 C – 7 D – 9 E – 14 dana ko-kultivacije.

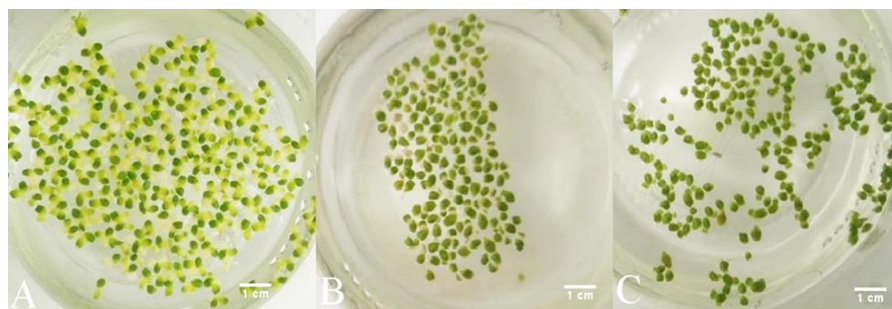
Prisustvo bakterija ubrzava stopu multiplikacija sočivica (Slika 28). U MS hranljivoj podlozi bez fenola, ovaj efekat je najočigledniji i pokazuje eksponencijalni rast posle 7. dana kultivacije, nasuprot kontroli koja održava približno isti broj frondi od 7. do 14. dana (Slika 28A). Na koncentraciji od 500 mg L<sup>-1</sup> (Slika 28B), do 7. dana kultivacije, stopa multiplikacije je povećana u odnosu na sočivice koje rastu bez prisustva bakterija. Do 7. dana, stopa multiplikacije je veća i u odnosu na biljke gajene u

prisustvu bakterija, ali bez fenola (uporediti sa 28A). Posle 7. dana dolazi do zaustavljanja rasta biljke i pada njene stope multiplikacije (Slika 28B). Makroskopski, kod svih uzoraka uočava se ekstenzivna hloroza (oko 50% svih frondi) samo na ovoj koncentraciji fenola ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Slika 29A). Na koncentraciji fenola od  $750 \text{ mg L}^{-1}$  (Slika 28C) dolazi do inhibicije rasta skoro svih ko-kultura, izuzev ko-kulture sa sojevima bakterija *Lelliottia sp.* 11, *S. marcescens* 27 i *S. nematodiphila* 51. Hloroza je prisutna kod manje od 10% frondi (Slika 29B). Na koncentraciji fenola od  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  stope multiplikacije biljaka se smanjuju skoro dvostruko u odnosu na kultivaciju bez fenola, u prisustvu bakterija (Slika 28D). Negativna kontrola (uzorak sterilnih sočivica) ima nešto višu stopu multiplikacije i pri ovoj koncentraciji u odnosu na uslove bez fenola. Hloroza je slabo primetna, kod manje od 5% frondi (Slika 29C).



Slika 28. Stope multiplikacije sočivica u MS hranljivom medijumu bez fenola (A) i sa B)  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , C)  $750 \text{ mg L}^{-1}$ , D)  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  fenola. Sojevi su predstavljeni brojevima u legendi svakog grafika: 9 – *Klebsiella oxytoca*, 11 – *Lelliottia sp.*, 14 – *K. oxytoca*, 27 – *Serratia marcescens*, 37 – *Hafnia alvei*, 43 – *H. paralvei*, 51 – *S. nematodiphila*, Negativna kontrola – površinski sterilisane fronde bez prisustva bakterija

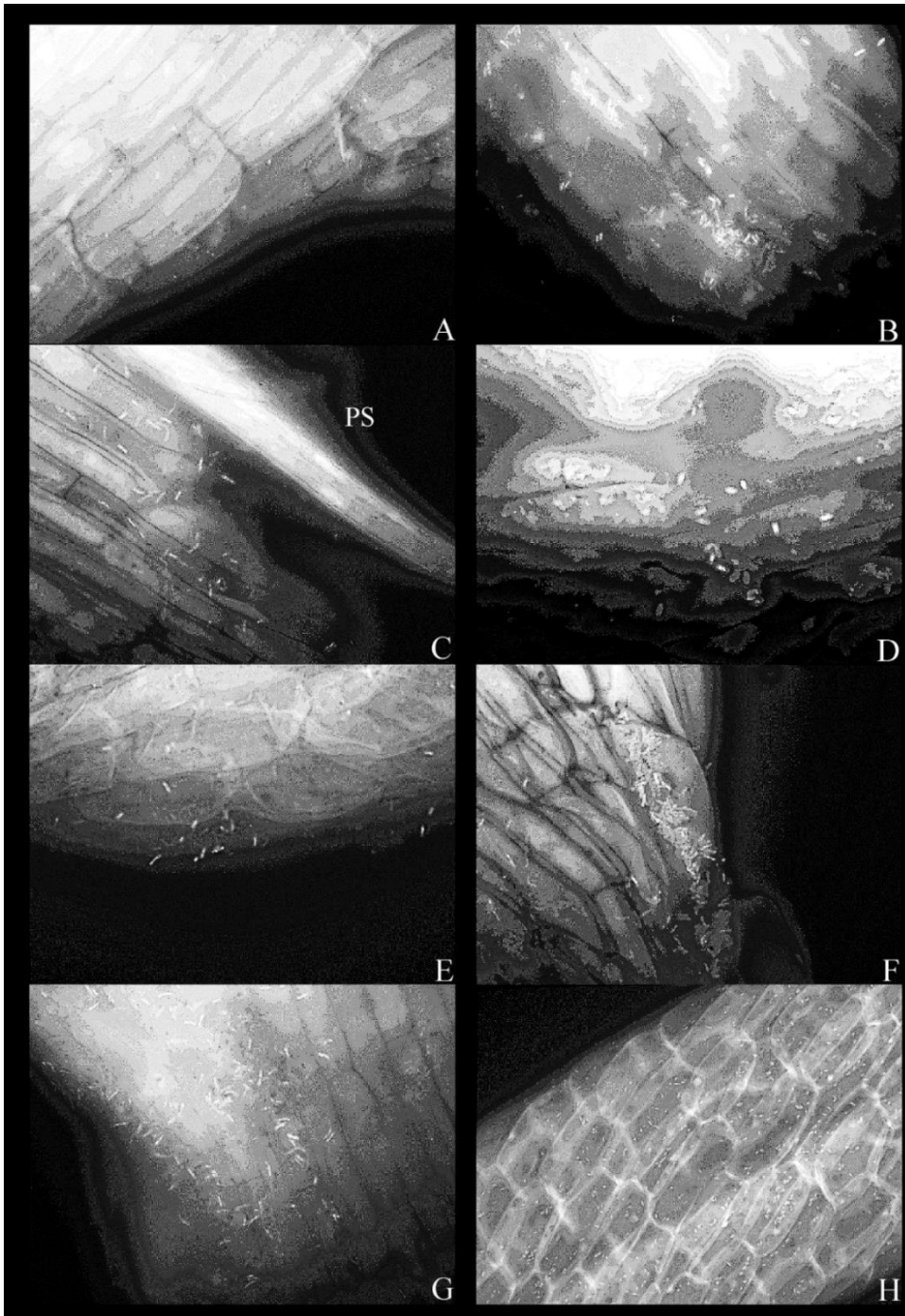
Hloroza je uočena kod svih biljnih kultura gajenih na  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , bez obzira na prisustvo bakterija. Prisustvo hloroze je manje zastupljeno na višim koncentracijama ( $750$  i  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), gde je zapaženo i da su fronde u proseku manje od frondi na  $500 \text{ mg L}^{-1}$  (oko  $0.2 \text{ cm}$  nasuprot  $0.4 \text{ cm}$  dijametra frondi na  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) i većinom tamnije pigmentacije (Slika 29). Zbog brze multiplikacije sočivica i pojave hloroze na  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , dalji eksperimenti vezani za uklanjanje fenola rađeni su na ovoj koncentraciji.



Slika 29. Promene pigmentacije i veličine frondi na A)  $500$ ; B)  $750$  i C)  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  fenola u MS hranljivoj podlozi

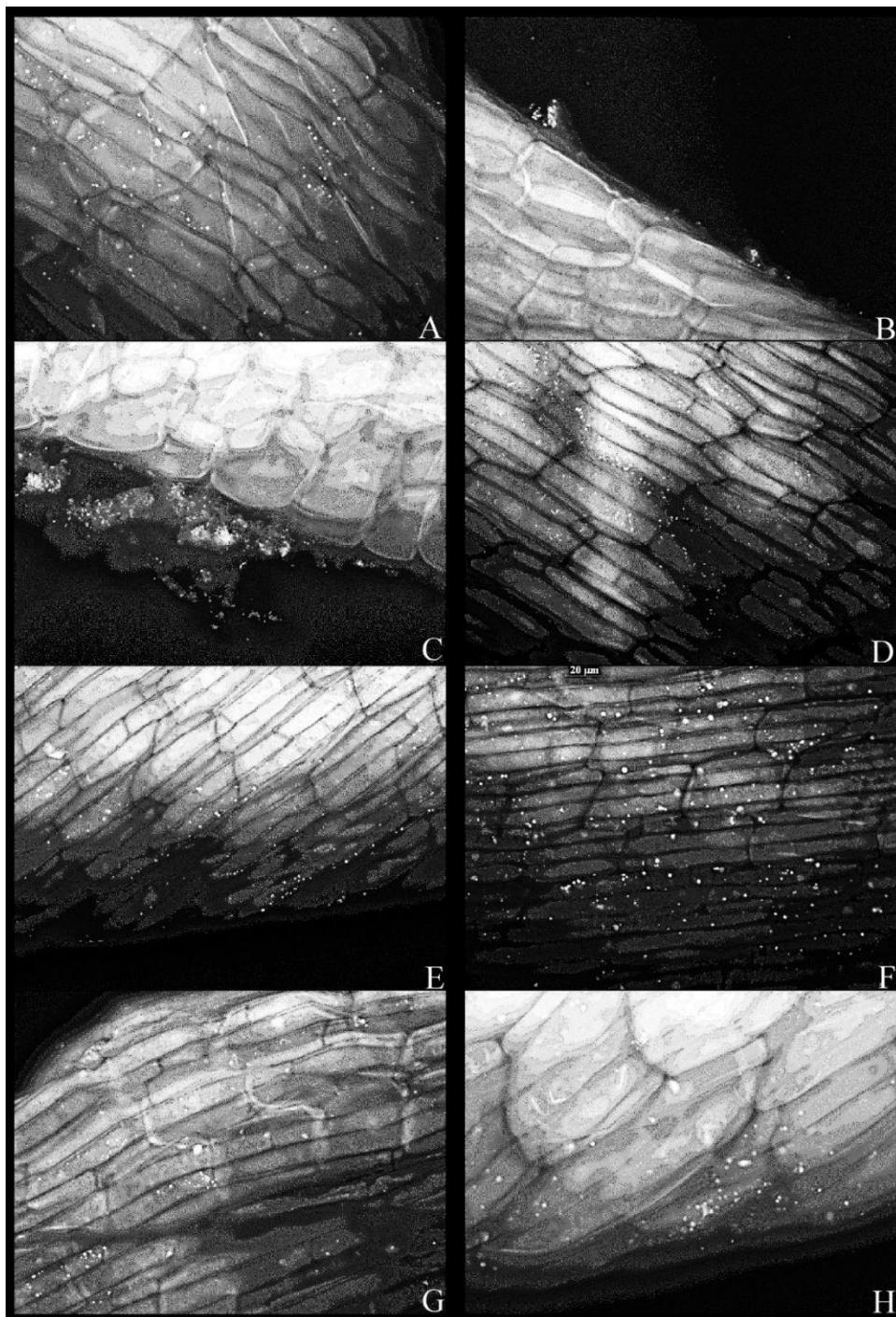
#### 4.6 Fluorescentne mikrografije i interakcije sočivica i bakterija

Fluorescentnim mikrografijama korena sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi bez fenola, a u prisustvu različitih odabranih sojeva bakterija (Slika 30) potvrđeno je da se od svih testiranih sojeva (9 – *Klebsiella oxytoca*, 11 – *Lelliottia sp.*, 14 – *Klebsiella oxytoca*, 27 – *Serratia marcescens*, 37 – *Hafnia alvei*, 43 – *Hafnia paralvei*, 51 – *Serratia nematodiphila*), samo soj *K. oxytoca* 9 nije vezivao za koren biljke (Slika 30A). U hranljivoj podlozi bez fenola, sve bakterije su zadržale svoju bacilarnu formu i raspoređene su duž središnjeg dela korena.



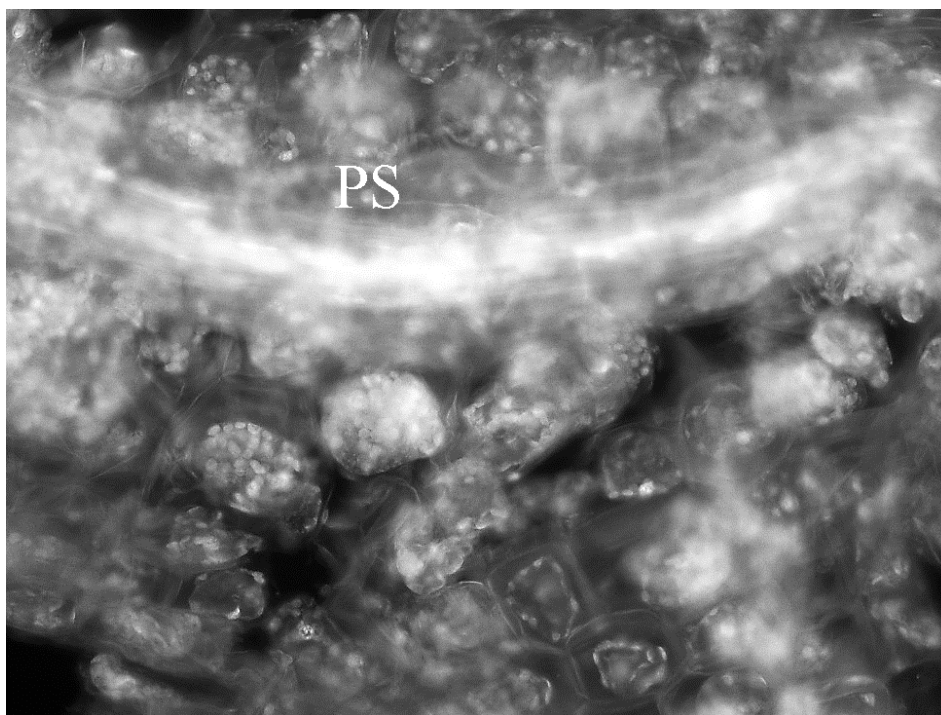
Slika 30. Mikrografije različitih bakterijskih sojeva iz rizosfere sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi bez fenola. Mikrografije predstavljaju površinu korena sočivice sa sledećim sojevima: A) *Klebsiella oxytoca* 9, uvećanje 63x; B) *Lelliottia sp.* 11, uvećanje 63x; C) *K. oxytoca* 14 i provodni snopić (PS), uvećanje 63x; D) *K. oxytoca* 14, uvećanje 100x sa imerzijom; E) *Serratia marcescens* 27, uvećanje 63x; F) *Hafnia alvei* 37, uvećanje 63x; G) *H. paralvei* 43, uvećanje 63x; H) *S. nematodiphila* 51, uvećanje 40x

U MS hranljivoj podlozi sa fenolom ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), svi ispitivani sojevi bakterija, osim soja 9 (*K. oxytoca*), bili su pričvršćeni za površinu korena, što se vidi na Slici 31. U prisustvu fenola, bakterije su kokoidne, za razliku od istih sojeva gajenih u hranljivoj podlozi bez fenola. *K. oxytoca* formira agregate, koji sadrže veliki broj bakterijskih ćelija, na mestima gde je koren posebno oštećen (Slika 31B i C). Bakterije su raspoređene duž sredine korena i njihovo prisustvo nije primećeno u osnovi ili na vrhu korena.



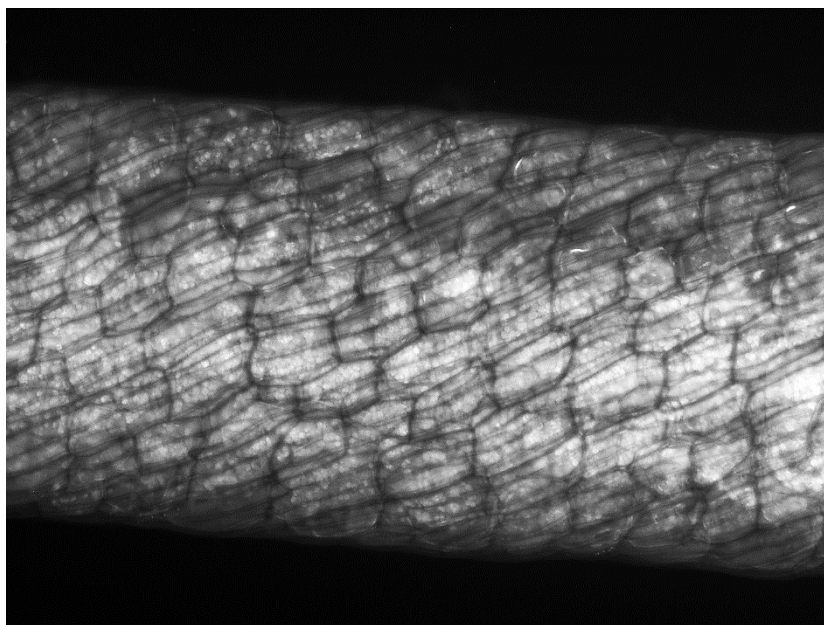
Slika 31. Mikrografije različitih bakterijskih sojeva iz rizosfere sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi sa fenolom. Mikrografije predstavljaju površinu korena sočivice sa sledećim sojevima: A) *Lelliottia sp.* 11, uvećanje 40x; B) *K. oxytoca* 14 u agregatima blizu oštećenih delova korena, uvećanje 40x; C) *K. oxytoca* 14, uvećanje 63x; D) *K. oxytoca* 14 na površini intaktnog korena sočivice, uvećanje 40x; E) *Serratia marcescens* 27, uvećanje 40x; F) *Hafnia alvei* 37, uvećanje 63x; G) *H. paralvei* 43, uvećanje 63x; H) *S. nematodiphila* 51, uvećanje 63x

U prisustvu fenola, primećeno je oštećenje korena sočivice (Slika 32). Jasno se vide ćelije zahvaćene plazmolizom. Uočeni su brojni plastidi. Celijski zidovi su zadebljali i oštećeni na pojedinim mestima.



Slika 32. Oštećenja korena sočivica gajenih u MS hranljivoj podlozi sa fenolom. PS - provodni snopić. Uvećanje: 40x

Povećan broj plastida dovodi do pojačanog autofluorescentnog signala koji se vidi na mikrografiji (Slika 33).



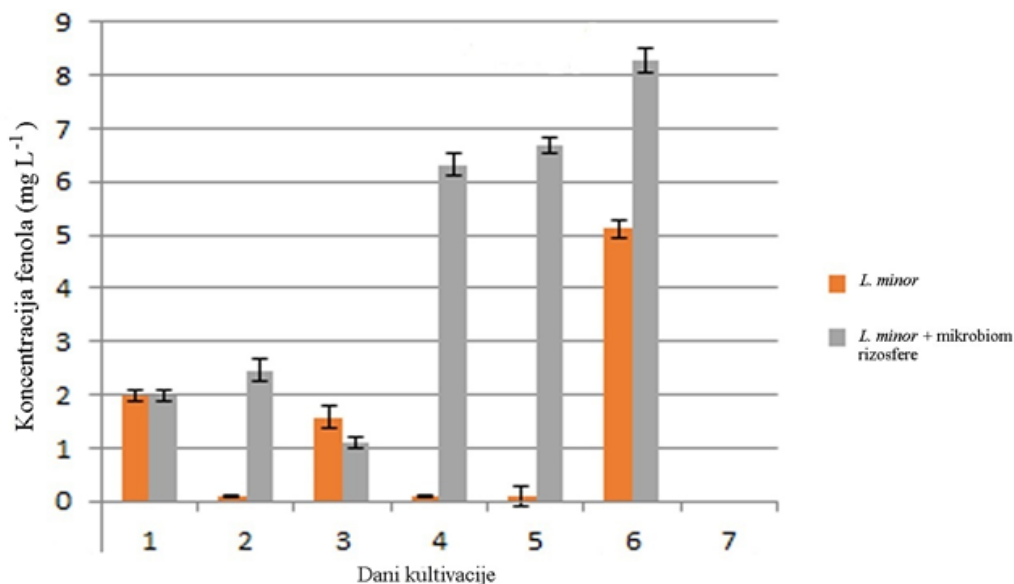
Slika 33. Fluorescentni signal poreklom od brojnih plastida u korenu sočivica uzgajanih u MS hranljivoj podlozi sa fenolom. Uvećanje: 20x

#### **4.7 Ukupni endogeni fenoli poreklom od nesterilnih i površinski sterilisanih sočivica i uklanjanje fenola iz MS tečne hranljive podloge**

Merenje ukupnih endogenih fenola poreklom od nesterilnih i površinski sterilisanih sočivica pokazuje da se njihov nivo menja tokom 5 dana eksperimenta, ali da nikada ne prelazi  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (Slika 34). Na

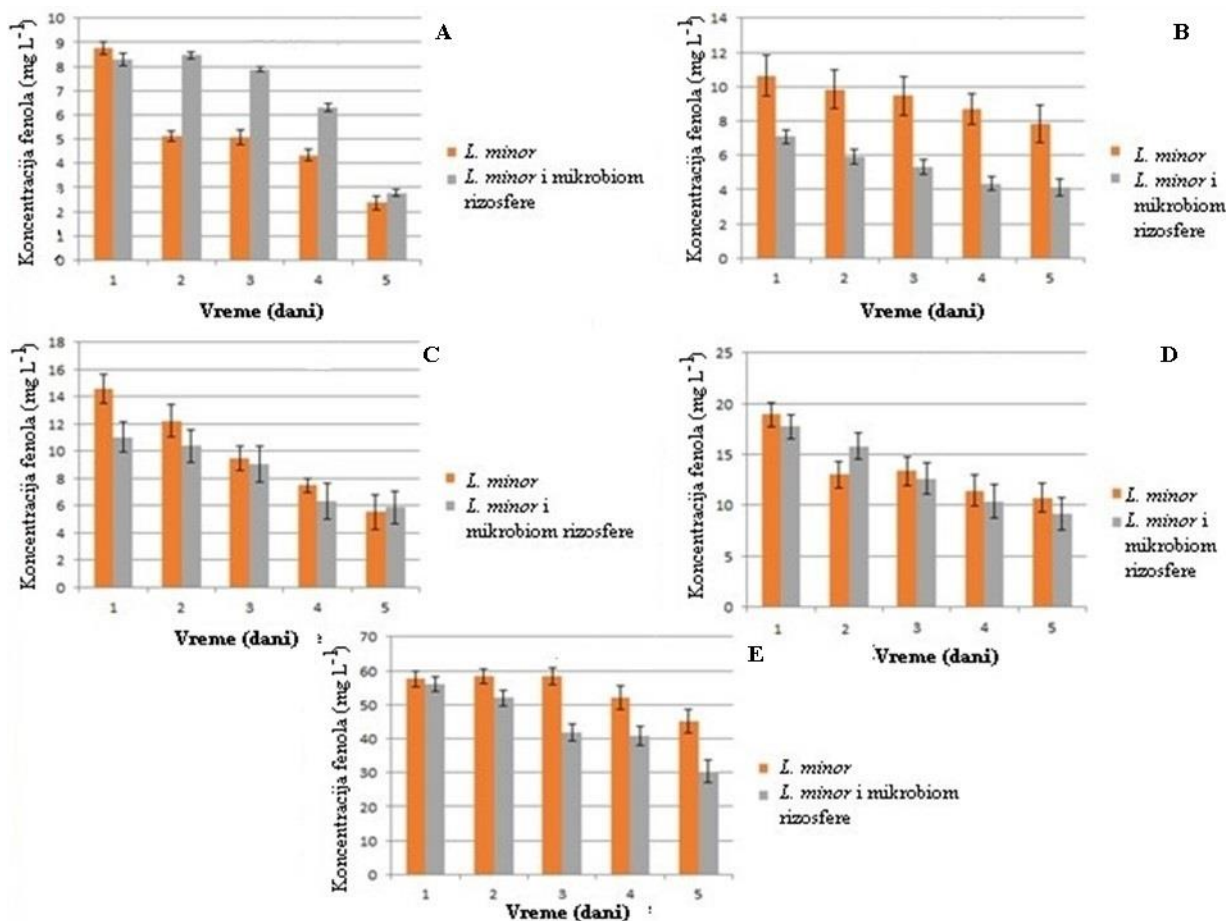


početku merenja, koncentracija endogenih fenola je bila ista u obe grupe, oko 2 mg L<sup>-1</sup>. Tokom sledeća 4 dana, koncentracija endogenih fenola u hranljivoj podlozi sa sterilnim sočivicama je opala do 0.1 mg L<sup>-1</sup>. Posle 5 dana kultivacije, tj. na kraju eksperimenta, koncentracija ukupnih endogenih fenola je iznosila približno 5 mg L<sup>-1</sup> u uzorcima sa sterilnim sočivicama. Nesterilne sočivice, koje sadrže intaktni mikrobiom rizosfere, proizvode veću količinu endogenih fenolnih jedinjenja u odnosu na površinski sterilisane sočivice. U ovoj grupi (*L. minor* + mikrobiom rizosfere), tokom prvih dva dana kultivacije, koncentracija endogenih fenola je bila između 1 i 2.2 mg L<sup>-1</sup>. Tokom 3. i 4. dana kultivacije, iznosila je 6.2 odnosno 6.8 mg L<sup>-1</sup>. Na kraju eksperimenta, izmereno je 8.1 mg L<sup>-1</sup> endogenih fenola u hranljivoj podlozi sa nesterilnim sočivicama.



Slika 34. Ukupni endogeni fenoli poreklom od površinski sterilisanih sočivica (*L. minor*) i nesterilnih sočivica (*L. minor* + mikrobiom rizosfere).

Eksperimenti sa uklanjanjem fenola sterilnim i nesterilnim biljnim materijalom, tj. onim koji je sadržao nativni mikrobiom rizosfere sočivice, ukazuju da su sterilne sočivice manje efikasne u uklanjanju fenola na skoro svim inicijalnim koncentracijama fenola tokom 5 dana eksperimenta, izuzev na 10 mg L<sup>-1</sup> (Slika 35A). Pri inicijalnoj koncentraciji od 15 mg L<sup>-1</sup> (Slika 35B), mikrobiom rizosfere i sočivice su tokom svakog dana kultivacije uklanjali više fenola u odnosu na sterilne sočivice. Posle 5 dana kultivacije, hranljive podloge sa nesterilnim sočivicama sadržale su oko 4 mg L<sup>-1</sup> fenola što je oko 27% od ukupne inicijalne koncentracije nasuprot površinski sterilisanim sočivicama, kod kojih je detektovano oko 53% od inicijalne koncentracije fenola. Pri inicijalnoj koncentraciji od 20 mg L<sup>-1</sup> (Slika 35C), detektovane su manje razlike u efikasnosti uklanjanja fenola, ali su ipak nesterilne sočivice bile efikasnije. Krajnja koncentracija se izjednačila u obe grupe posle 5 dana kultivacije (oko 30% inicijalne koncentracije u obe grupe). Pri inicijalnoj koncentraciji od 30 mg L<sup>-1</sup> (Slika 35D), detektovano je slično ponašanje u obe grupe kao i u prethodnom slučaju. Na kraju eksperimenta, sočivice i njihov mikrobiom rizosfere uklonili su oko 73% inicijalne koncentracije fenola, dok su površinski sterilisane sočivice uklonile oko 63% inicijalne koncentracije fenola. Pri inicijalnoj koncentraciji od 100 mg L<sup>-1</sup> (Slika 35E), tokom prvih dva dana kultivacije, efikasnost uklanjanja fenola je bila približno ista u obe grupe. Trećeg i četvrtog dana kultivacije primećuju se veće razlike: uklonjeno je oko 42% inicijalnog fenola u sterilnoj, odnosno 59% u nesterilnoj grupi (3. dan) i oko 49% u sterilnoj, odnosno 60% u nesterilnoj grupi (4. dan). Na kraju eksperimenta (5. dana kultivacije), u sterilnoj grupi izmereno je 43% od inicijalne količine fenola, dok je u nesterilnoj grupi izmereno 30% od inicijalne količine fenola.



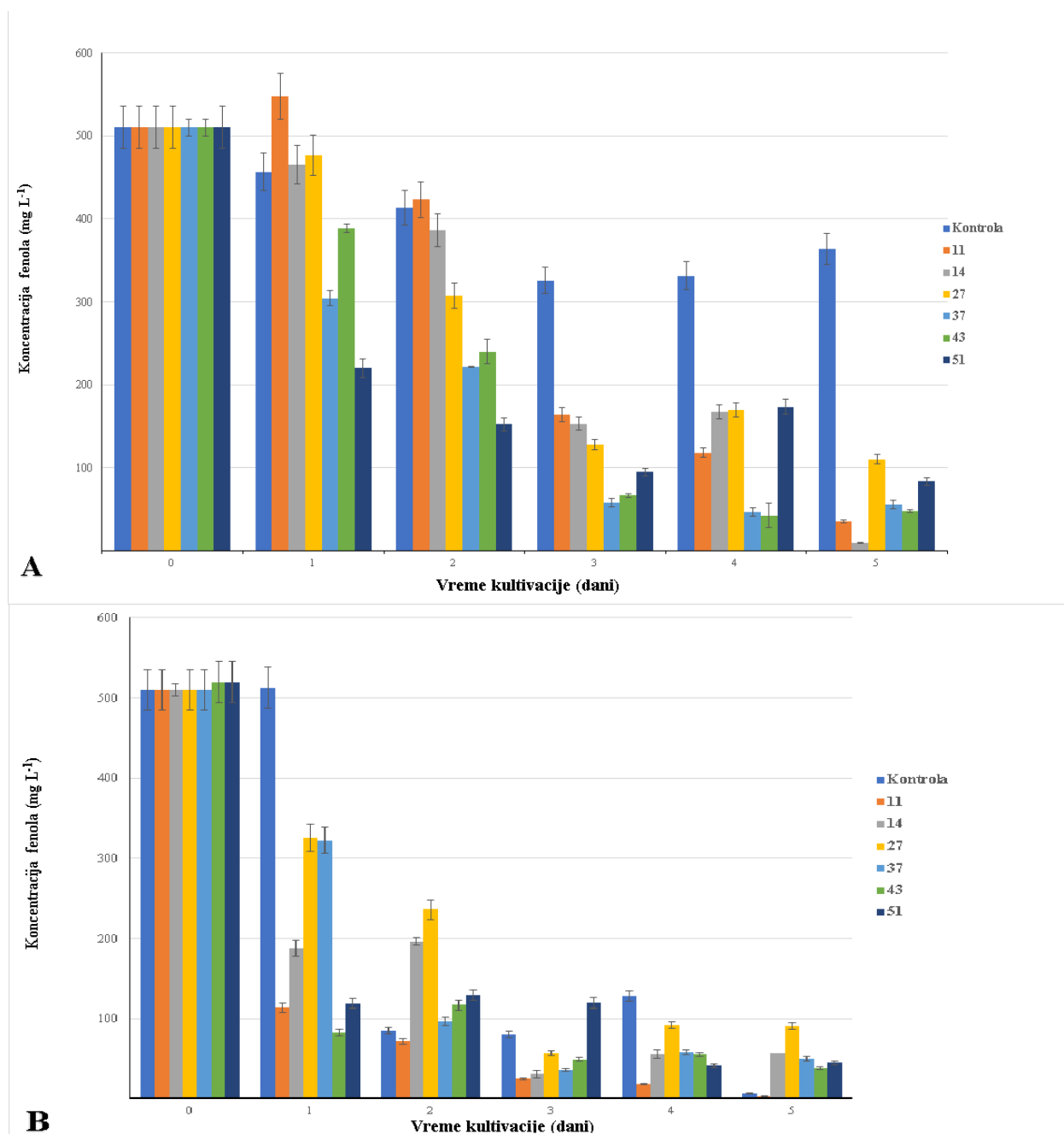
Slika 35. Uklanjanje fenola površinski sterilisanim sočivicama (*L. minor*) i mikrobiomom rizosfere i biljkama (*L. minor* i mikrobiom rizosfere) pri različitim inicijalnim koncentracijama fenola u hranljivoj MS podlozi: A – 10 mg L<sup>-1</sup> inicijalne koncentracije fenola; B – 15 mg L<sup>-1</sup>; C – 20 mg L<sup>-1</sup>; D – 30 mg L<sup>-1</sup>; E – 100 mg L<sup>-1</sup> fenola

U eksperimentima sa uklanjanjem fenola pomoću sočivica i izabranih čistih bakterijskih kultura kojim su sočivice inokulisane, od 7 izabranih sojeva na početku eksperimenata, *K. oxytoca* (soj 9) nije dalje testiran zbog nepostojanja neposredne fizičke interakcije sa korenom. Za test uklanjanja fenola iz MS hranljive podloge, testirane su bakterijske monokulture (Slika 36A) i sterilne sočivice sa 6 izabranih monokultura (Slika 36B) gajene u MS hranljivoj podlozi sa fenolom inicijalne koncentracije 500 mg L<sup>-1</sup>. Kod uzoraka sa ispitivanim bakterijskim monokulturama detektovan je pad od 70 do 90% fenola iz rastvora za tri dana. Posle 5 dana gajenja, *K. oxytoca* MK212915 (soj 14) skoro potpuno uklanja fenol (Slika 36B). Konstantan pad u koncentraciji fenola primećen je kod svih ispitivanih sojeva tokom 5 dana. Ukoliko se sočivica gaji sa određenom bakterijskom monokulturom, dolazi do naglog pada koncentracije fenola već posle dva dana gajenja, osim za sojeve 14 (*Klebsiella oxytoca*, MK212915) i 27 (*Serratia sp.*, MF526924) kod kojih se pad koncentracije fenola vidi posle tri dana gajenja (Slika 36B). Posle 5 dana eksperimenta, uzorci sa bakterijskim monokulturama su sadržali između 9 mg L<sup>-1</sup> fenola (uzorak 14) i 110 mg L<sup>-1</sup> fenola (uzorak 27), dok je u isto vreme, u kontrolnom uzorku, finalna koncentracija fenola bila oko 363 mg L<sup>-1</sup>. S obzirom da je fenol isparljiva i relativno fotosenzitivna supstanca, ovi fizičko-hemijski faktori su verovatno doprinicali gubitku fenola tokom vremena: u kontrolnom uzorku sa sterilnim MS rastvorom sa fenolom, pasivni gubitak fenola je iznosio oko 28% do kraja eksperimenta.

U uzorcima samo sa površinski sterilisanim frondama, uklanjanje fenola je bilo praktično zanemarljivo posle 1. dana eksperimenta. Između 1. i 2. dana, nagli pad fenola (ukupno oko 83% manje fenola u odnosu na inicijalni nivo) detektovan je u ovim uzorcima (Slika 36B).

Najveći pad koncentracije od inicijalne bio je detektovan u uzorku sa *H. paralvei* (soj 43) i sočivicama. Tokom prvog dana, koncentracija se ovde promenila od 500 mg L<sup>-1</sup> do 83 mg L<sup>-1</sup> posle čega je koncentracija fenola postepeno opadala svakog dana do oko 38 mg L<sup>-1</sup> na kraju eksperimenta

(Slika 36B). Najmanje efikasno je bilo uklanjanje fenola pomoću sočivica i *S. marcescens*, soja 27 – na kraju eksperimenta je krajnja koncentracija iznosila 91 mg L<sup>-1</sup>.



Slika 36. Uklanjanje fenola iz tečne MS hranljive podloge sa inicijalnom koncentracijom fenola od 500 mg L<sup>-1</sup> pomoću bakterijske monokulture (A) i sočivice sa izabranom bakterijskom monokulturom (B). Oznake bakterijskih sojeva date su u legendi: 11 - *Lelliottia sp.*, MK212916; 14 - *Klebsiella oxytoca*, MK212915; 27 - *Serratia sp.* 27, MF526924; 37 - *Hafnia alvei* 37, MF526934; 43 - *H. parolvei* 43, MF526939; 51 - *Serratia nematodiphila* 51, MF526945; Kontrola – sterilna MS hranljiva podloga bez bakterija (A) i površinski sterilisana biljka sočivice (B)

#### 4.8 Test IAA produkcije sa Salkowski reagensom u MS hranljivoj podlozi

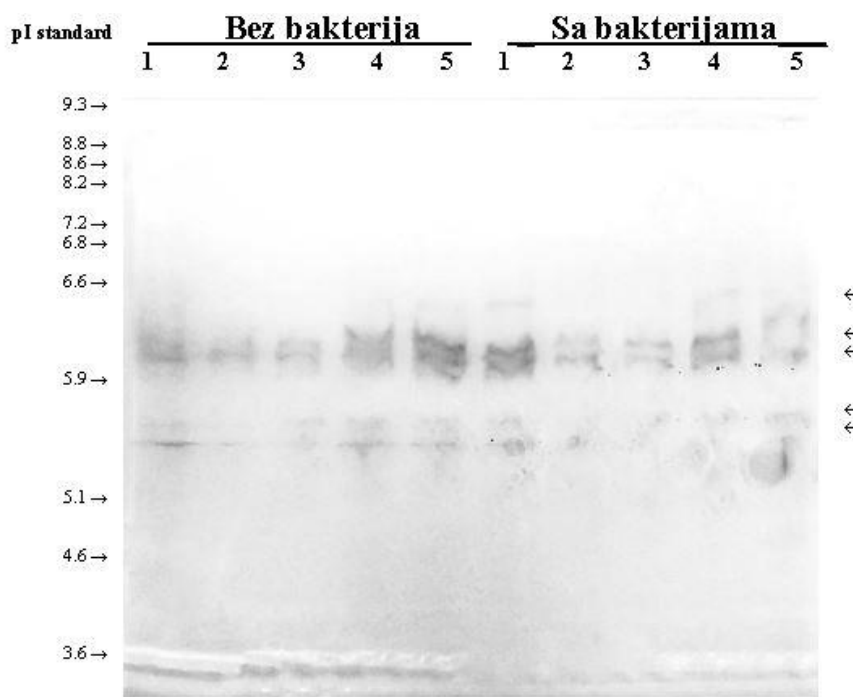
Izveden je test prisustva bakterijske IAA zbog uočenog pozitivnog efekta bakterija na brzinu umnožavanja sočivica. Roze boja kompleksnog jedinjenja, koje nastaje u reakciji Salkowski reagensa i bakterijske IAA i koje je indikator prisustva IAA, nije detektovana pod primenjenim eksperimentalnim uslovima (bez dodatka egzogenog triptofana, tj. samo sa komponentama MS hranljive podloge).

#### 4.9 Zimogramska detekcija polifenol-oksidge (PPO)

Za zimogramsku detekciju PPO izolovane iz tkiva sočivice korišćene su sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola kao i u MS hranljivoj podlozi bez fenola. Osim toga, korišćene su sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi kojoj su dodati fenol i bakterije soja *H. paralvei* 43, kao i sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi kojoj nije dodat fenol, ali su dodate bakterije soja *H. paralvei* 43. Ovaj soj je izabran zbog: rasta na hranljivoj podlozi sa 1000 mg L<sup>-1</sup> fenola bez prethodne aklimatizacije, korišćenja fenola kao jedinog izvora ugljenika, efikasnog uklanjanja fenola sa sočivicama i bez sočivica, povećanog formiranja biofilma i pozitivnog efekta na umnožavanje sočivice. Pošto je izvedena zimogramska detekcija sa MBTH i fenolom kao supstratom, na gelu nisu detektovani nikakvi znaci prisustva PPO ni u jednom od četiri tipa uzoraka (sočivice + fenol - sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola; sočivice + bakterije + fenol - sočivice gajene sa *H. paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola; sočivice + bakterije - sočivice gajene sa *H. paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi bez fenola; kontrola - sterilne sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi bez fenola) tj. nije detektovana nijedna traka koja bi odgovarala PPO.

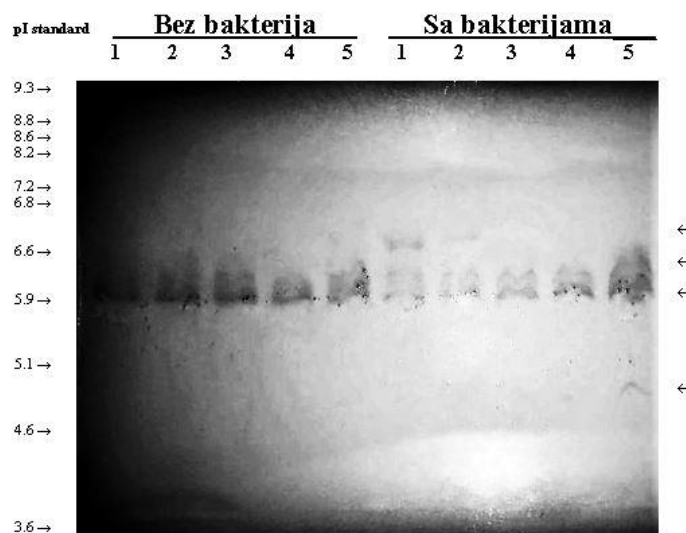
#### 4.10 Zimogramska detekcija gvajakol-peroksidaze (GPX)

Za određivanje GPX korišćena je biljka sočivice gajena u hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola. Pored sterilne sočivice, bakterijski soj 43 (*H. paralvei*) je gajen sa sočivicom u istoj hranljivoj podlozi u drugom delu eksperimenta. Detektovano je ukupno 5 izoformi GPX u tkivu sočivice gajene u prisustvu fenola (Slika 37). Svih 5 izoformi je uočeno u tkivu biljaka gajenih sa ili bez bakterija. Sve detektovane izoforme nalaze se u kiselom delu pI vrednosti koje su približno: 6.5, 6.2, 6.0, 5.9 i 5.6. Sve izoforme GPX vidljive su 1, 4. i 5. dana gajenja. Izoforma sa pI vrednošću 6.5 ne može se videti tokom drugog i trećeg dana gajenja. Ukoliko je biljka gajena sa bakterijskom monokulturom, izoforme GPX su slabije izražene 5. dana gajenja.



Slika 37. Zimogramska detekcija GPX u tkivu sočivice gajene u hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola. Na gelu su prikazani uzorci biljke gajene bez (levo) i sa bakterijskom monokulturom *H. paralvei* 43 (desno). Strelicama su obeležene izoforme GPX. Brojevima su označeni dani kultivacije

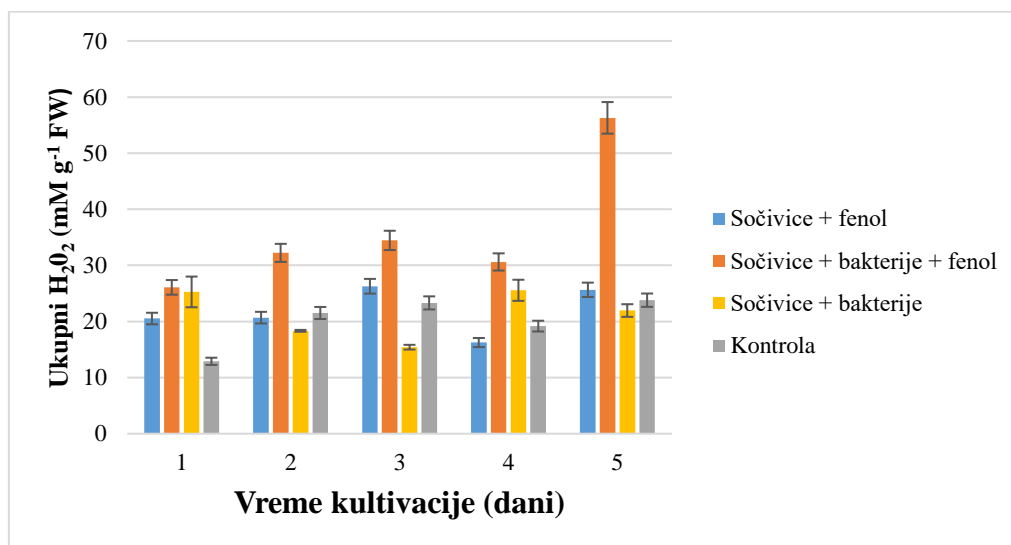
Kada su biljke gajene u hranljivoj podlozi bez fenola, primećuje se samo jedna izoforma GPX, približne pI vrednosti 6.0 i njen intenzitet je konstantan tokom svih pet dana gajenja (Slika 38). Kada su sočivice gajene sa sojem *H. parvalvei* 43, detektovane su ukupno četiri izoforme GPX. Jedna izoforma je ista kao i kod sterilnih sočivica (pI 6.0), dok ostale tri imaju pI vrednosti 6.2, 6.5 i 4.8. Sve detektovane izoforme se nalaze u kiselom delu. Tokom prva dva dana gajenja sočivice sa bakterijama, vidljiva je izoforma GPX sa pI 6.5. Poslednjeg dana gajenja biljaka sa bakterijama javlja se izoforma pI 4.8, koja je vidljiva jedino tada u celom eksperimentu. Intenzitet izoformi je jači ukoliko je sočivica gajena bez bakterija.



Slika 38. Zimogramska detekcija GPX u tkivu sočivice gajene u hranljivoj podlozi bez fenola. Na gelu su prikazani uzorci biljke gajene bez (levo) i sa bakterijskom monokulturom *H. parvalvei* (desno). Strelicama su obeležene izoforme GPX. Brojevima su označeni dani kultivacije

#### 4.11 Detekcija vodonik-peroksida, malondialdehida, ukupne askorbinske kiseline i ukupnih proteina

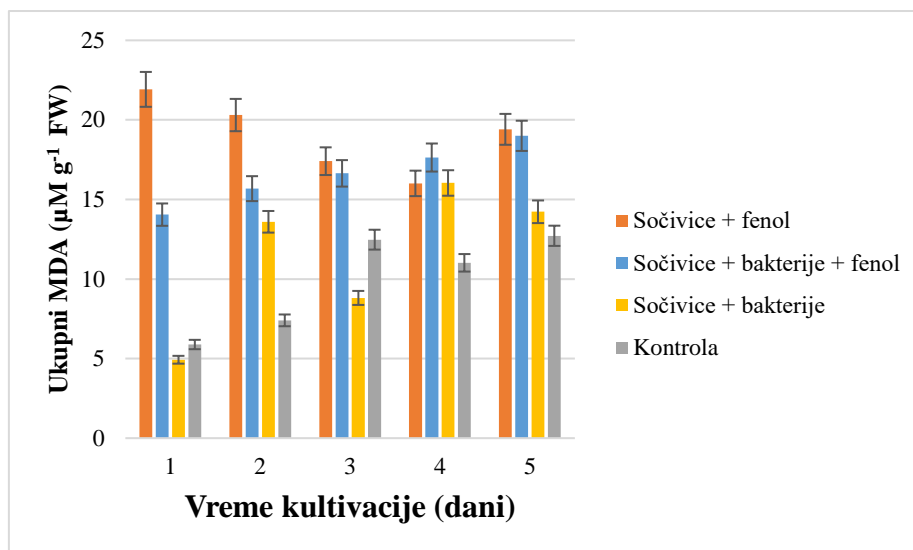
Vodonik-peroksid je povećan kod sočivica gajenih sa bakterijama u hranljivoj podlozi sa fenolom tokom svih pet dana eksperimenta i dostiže maksimum 5. dana (Slika 39). Smanjena koncentracija  $H_2O_2$  je primećena na samom početku gajenja kod sočivica bez prisustva bakterija i fenola (kontrola).



Slika 39. Ukupna koncentracija vodonik-peroksida ( $H_2O_2$ ) u sočivicama u zavisnosti od vremena kultivacije. Sočivice + fenol - sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi sa  $500 \text{ mg L}^{-1}$  fenola; sočivice + bakterije + fenol - sočivice gajene sa *H.*

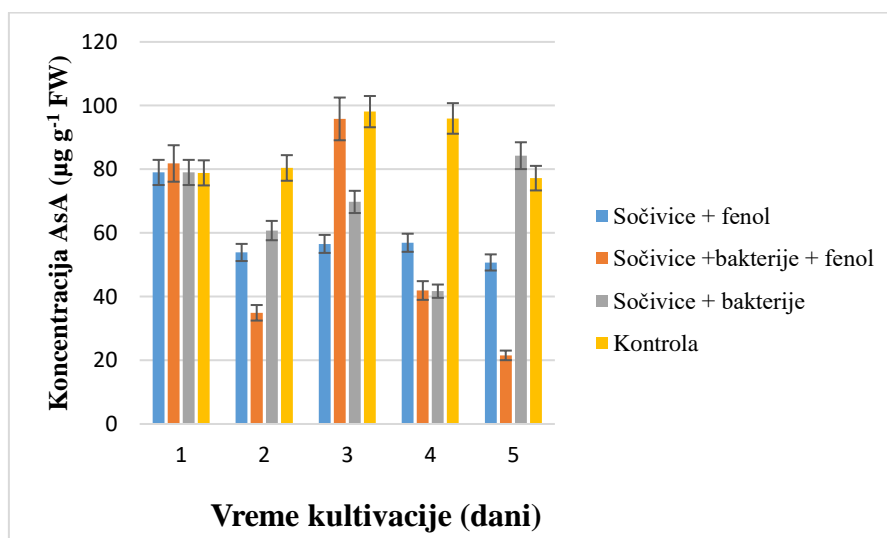
*paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola; sočivice + bakterije - sočivice gajene sa *H. paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi bez fenola; kontrola - sterilne sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi bez fenola

Povećane vrednosti MDA u odnosu na druge uzorke, primećene su kod sočivica gajenih u prisustvu fenola bez bakterija i to tokom prva dva dana gajenja (Slika 40). Blagi porast koncentracije MDA uočava se kod biljaka gajenih sa bakterijama u hranljivoj podlozi sa fenolom.



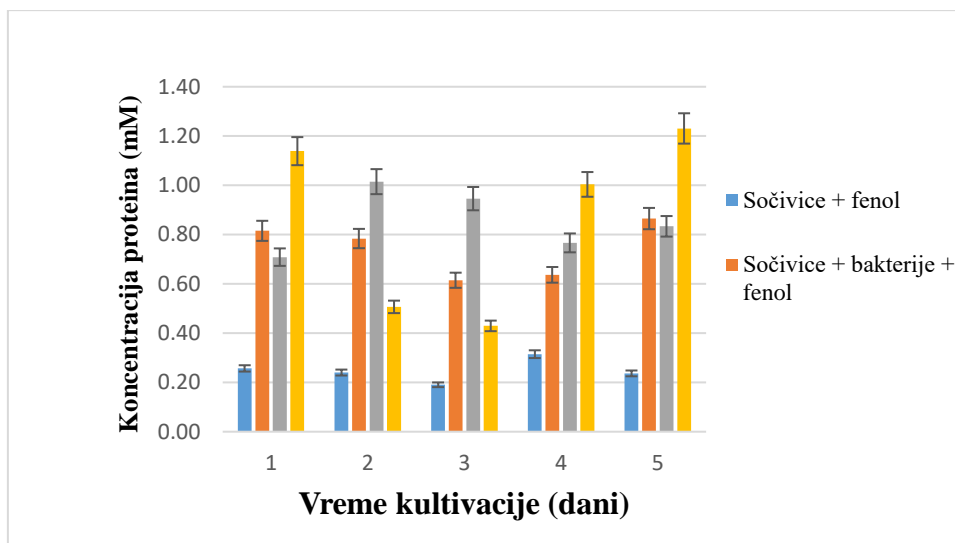
Slika 40. Ukupna koncentracija malondialdehida (MDA) u sočivicama u MS hranljivoj podlozi u zavisnosti od vremena kultivacije. Sočivice + fenol - sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola; sočivice + bakterije + fenol - sočivice gajene sa *H. paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola; sočivice + bakterije - sočivice gajene sa *H. paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi bez fenola; kontrola - sterilne sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi bez fenola

Posle prvog dana gajenja, koncentracija AsA je ista u svim uzorcima (Slika 41). Sočivice gajene u hranljivoj podlozi sa fenolom pokazuju pad u koncentraciji AsA koji ostaje na tom nivou do kraja eksperimenta. Visoke koncentracije AsA u odnosu na druge uzorke detektovane su kontrolnoj grupi i to sve do kraja eksperimenta. Prisustvo bakterija i fenola u hranljivoj podlozi dovodi do niskih vrednosti AsA na kraju eksperimenta.



Slika 41. Ukupna količina askorbinske kiseline (AsA) u sočivicama u zavisnosti od vremena kultivacije u MS hranljivoj podlozi. Sočivice+fenol - sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola; sočivice+bakterije+fenol - sočivice gajene sa *H. paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola; sočivice+bakterije - sočivice gajene sa *H. paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi bez fenola; kontrola - sterilne sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi bez fenola

Ukupni solubilni proteini sočivice (Slika 42) konstantno su niski kod sterilnih sočivica uzgajanih u hranljivoj podlozi sa fenolom. Kod sočivica gajenih bez fenola (kontrola) najveća koncentracija proteina je zabeležena poslednjeg dana gajenja. Sočivice gajene sa bakterijama na obe hranljive podloge imaju viši sadržaj proteina u odnosu na sterilne biljke gajene na fenolu.



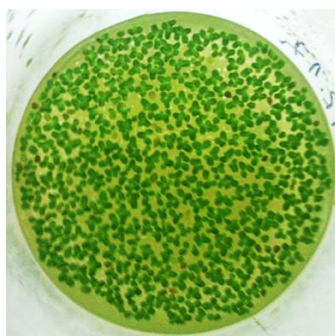
Slika 42. Ukupni solubilni proteini sočivice u zavisnosti od vremena kultivacije u tečnoj hranljivoj MS podlozi. Sočivice+fenol - sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola; sočivice+bakterije+fenol - sočivice gajene sa *H. paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi sa 500 mg L<sup>-1</sup> fenola; sočivice+bakterije - sočivice gajene sa *H. paralvei* 43 u MS hranljivoj podlozi bez fenola; kontrola - sterilne sočivice gajene u MS hranljivoj podlozi bez fenola

#### 4.12 Procena bakterijske biomase na površini korena sočivica

Posle prvog dana ko-kultivacije, metodom serijskog razblaženja i brojanja kolonija procenjeno je da je broj bakterija po svežoj masi sočivice oko 2000 CFU mg<sup>-1</sup> na hranljivoj podlozi sa fenolom. Nasuprot ovome, prvog dana ko-kultivacije u hranljivoj podlozi bez fenola, izbrojano je 6600 CFU mg<sup>-1</sup>. Broj bakterija na površini korena je do kraja eksperimenta (posle 5 dana) bio približno isti na korenu sočivica u hranljivoj podlozi sa fenolom (2400 CFU mg<sup>-1</sup>), dok je na korenu sočivica gajenih bez fenola bio veći (8800 CFU mg<sup>-1</sup>). S obzirom da je prosečna masa jedne bakterije oko 1 pg (10<sup>-12</sup> g), ukupna biomasa bakterija po 1 mg sveže mase sočivica ne prelazi 10<sup>-5</sup> mg.

#### 4.13 LC-MS analiza MS hranljive podloge sa sočivicama i bakterijskim sojem *K. oxytoca* 14

Primećeno je da se prilikom gajenja sočivice sa sojem *K. oxytoca* 14 na MS hranljivoj podlozi bez dodatog fenola, javlja žutozelena boja već posle dva dana gajenja (Slika 43). Ovakva boja hranljive podloge nije primećena prilikom gajenja sočivice sa drugim ispitivanim bakterijskim sojevima pod istim uslovima.



Slika 43. Pojava žutozelene boje u hranljivoj podlozi sa sočivicama i bakterijama *K. oxytoca* 14, posle 2 dana gajenja, bez dodatka egzogenog fenola

Izvedena je LC/MS analiza hranljive podloge u kojoj je gajena biljka sa ovom bakterijom tokom tri dana i rezultati su predstavljeni tabelarno (Tabela 11). Detektovana su polifenolna jedinjenja: luteolin 6,8-di-*C*-heksozid (polifenolno jedinjenje i flavonoid), *p*-hidroksibenzoeva kiselina, kafeinska kiselina, apigenin 6-*C*-(2"-pentozil)heksozid (polifenolno jedinjenje i flavonoid), i *p*-kumarinska kiselina.

Tabela 11. LC/MS analiza MS hranljive podloge posle tri dana gajenja sočivica sa sojem 14 (*K. oxytoca*)

$t_R$ , min	Naziv jedinjenja	Molekulska formula, $[M-H]^-$	Proračun mase, $[M-H]^-$	Tačna masa, $[M-H]^-$	$\Delta$ ppm	MS <sup>2</sup> fragmenti, (% Base Peak)	MS <sup>3</sup> fragmenti, (% Base Peak)	MS <sup>4</sup> Fragments, (% Base Peak)
5.16	Luteolin 6,8-di- <i>C</i> -heksozid	$C_{30}H_{25}O_{14}^-$	609.14611	609.14380	3.79	591(10), 519(30), 489(100), 429(10), 399(20), 369(15)	471(10), 399(30), 369(100)	341(100), 313(40), 298(30)
5.66	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	$C_7H_5O_3^-$	137.02442	137.02415	1.97	109(10), 93(100)	–	–
5.91	Kafeinska kiselina	$C_9H_7O_4^-$	179.03498	179.03513	-0.84	135(100)	135(60), 117(15), 107(100), 91(55), 79(15)	–
6.24	Apigenin 6- <i>C</i> -(2"-pentozil)heksozid	$C_{26}H_{27}O_{14}^-$	563.14063	563.13922	2.50	443(10), 431(10), 413(100), 341(10), 311(20), 293(40)	293(100)	275(20), 265(60), 249(90), 221(40), 175(100), 173(70)
6.60	<i>p</i> -kumarinska kiselina	$C_9H_7O_3^-$	163.04007	163.03984	1.41	119(100)	119(60), 101(20), 93(25), 91(100), 72(10)	–



## 5. Diskusija

Bakterije koje nastanjuju rizosferu biljaka imaju značajnu ulogu u globalnim geohemijskim ciklusima, regulaciji rasta i održavanju fitnesa biljaka (Na i sar. 2018). Genetička struktura i raznovrsnost bakterija koje naseljavaju rizosferu značajno variraju zavisno od tipa staništa, vrsta biljaka i geografskog položaja. Postoje razlike u strukturi bakterijskih populacija rizosfere čak i unutar istog staništa, a posebno velike razlike postoje u strukturi populacija rizosfere kopnenih i vodenih biljaka (Tanaka i sar. 2011). Zbog svega navedenog, nije bilo neočekivano da se diverzitet bakterijskih populacija rizosfere sočivice u ovoj disertaciji značajno razlikuje u odnosu na bakterijske populacije koje se pominju u literaturi (Berg i Smalla, 2009). Do sada su u sličnim studijama identifikovane brojne vrste *Pseudomonas* i *Enterobacter*, dok su vrste roda *Hafnia* bile retko identifikovane, osim u rizosferi pojedinih halofita (Szymanska i sar. 2016; Pacifico i sar. 2019).

U odnosu na slične radove iz oblasti bioremedijacije, najupadljivija razlika ove teze je potpuni izostanak bilo koje vrste iz roda *Acinetobacter* (Radulović i sar. 2019a). Ove bakterije su široko rasprostranjene, izolovane iz veoma različitih izvora, uključujući i rizosferu različitih biljaka, a poznate su po rezistenciji na fenol i efikasnom metabolizmu fenolnih jedinjenja (Sachdev i sar. 2010; Yamaga i sar. 2010; Ogata i sar. 2013; Suzuki i sar. 2014).

Osim što se mogu smatrati netipičnim stanovnicima rizosfere biljaka, vrste roda *Hafnia* iz rizosfere sočivice pokazuju rezistenciju i sposobnost uklanjanja fenola (Radulović i sar. 2019b). Nijedna dosadašnja studija nije opisala nijednu vrstu roda *Hafnia* koja može degradovati fenol. Svi podaci u dosadašnjoj literaturi opisuju vrste roda *Hafnia* kao akumulatore teških metala (Marzan i sar. 2017). Dodatne analize metabolizma fenola kod ovih sojeva bi dodatno rasvetlile ovu retku pojavu za *Hafnia spp.*

*Pseudomonas spp.* predstavljaju najbrojnije prirodne populacije u rizosferi i poznate su po sposobnosti degradacije ogromnog broja različitih organskih jedinjenja prirodnog i sintetičkog porekla, kao i po sposobnosti rasta na različitim minimalnim hranljivim podlogama (Gupta i Thakur, 2017). *Pseudomonas spp.*, pogotovo *P. putida*, najzastupljeniji su izolati u ovoj studiji. Međutim, nijedan soj *Pseudomonas spp.* izolovan iz rizosfere sočivice nije pokazao, posle testova rezistencije na fenol i rasta na minimalnoj podlozi, izuzetne osobine što se tiče ovih kriterijuma. Ovo je bilo u suprotnosti sa brojnim podacima koji ukazuju da *Pseudomonas putida* poseduje efikasan degradativni metabolizam fenola i rezistenciju na fenol (Tibbles i Baecker, 1989; Reardon i sar. 2000; Mahadevaswamy i sar. 2004; Tsuey-Ping Chung, 2005; Gurusamy Annadurai i sar. 2007; Gupta i Thakur, 2017). Moguće je da su unutar rizosfere sočivica ovi sojevi specijalizacijom dobili druge uloge, a da je degradacija fenola pozitivno selekcionisana kod drugih vrsta, poput *Hafnia spp.*, *Lelliottia spp.*, *Klebsiella spp.* i *Serratia spp.*

Priprema biljnog materijala ima veliki uticaj na genetičku strukturu bakterija izolovanih sa korena sočivice (Radulović i sar. 2019b). Sušenje i brisanje korena u grupama A i B smanjuje diverzitet bakterijskih sojeva nađenih na korenu, što se ogleda u Shannonovim indeksima diverziteta. Manje „invazivna“ metoda pripreme, ispiranjem u destilovanoj vodi (grupa D), održava diverzitet na višem nivou. Interesantno je da se grupa C upadljivo razlikuje po strukturi sojeva u odnosu na grupe A, B i D. Naime, grupa C, dobijena izolacijom bakterijskih sojeva iz uzorka vode oko sočivica, sadrži predominantno *Pseudomonas sp.* i *Hafnia sp.* koji se nalaze isključivo u ovoj grupi, ali ne i u drugim grupama. Upadljive razlike u taksonomskoj strukturi između grupe C i grupa A, B i D ukazuju da grupa C sadrži bakterijske sojeve koji nisu bliže asocirani sa korenom sočivice. Nasuprot njoj, grupe A, B i D su međusobno sličnije po genetičkoj strukturi i dobijene su izolacijom bakterija sa površine korena, što snažno ukazuje da su ovi bakterijski sojevi uže povezani sa rizosferom sočivice. Shannonovi indeksi ukazuju da je diverzitet svake pojedinačne grupe umanjen u odnosu na ukupni ekološki diverzitet cele bakterijske populacije rizosfere, što pokazuje da su unutar svake pojedinačne grupe bakterije genetički sličnije i da su po toj genetičkoj sličnosti i organizovane u prirodi. Ova strukturirana, nenasumična organizacija najverovatnije je zasnovana na pozitivnoj hemotaksiji

usmerenoj ka eksudatima korena, pogotovo ka raznovrsnim fenolnim jedinjenjima koja predstavljaju njihov značajni deo (Pandey i Jain, 2002; Hartmann i sar. 2009; Toyama i sar. 2009).

S obzirom na to da se mnogo više zna o genetičkoj raznovrsnosti bakterija rizosfere zemljišnih biljaka, sva dodatna saznanja o genetičkoj strukturi bakterijskih populacija rizosfere vodenih biljaka su posebno značajna.

Po našim saznanjima, nijedna studija se do sada nije bavila rezistencijom na fenol celokupne bakterijske populacije rizosfere neke biljne vrste. Zbog nedostatka dostupnih podataka o zastupljenosti i distribuciji bakterijskih populacija rezistentnih na fenol, ova studija prva ukazuje na rezistenciju bakterija na fenol u rizosferi sočivice. Rezultati pokazuju da je otpornost bakterija rizosfere mnogo zastupljenija nego što se to moglo očekivati s obzirom na izraziti baktericidni efekat fenola (Berger i Wyss, 1952). Fenol je ispoljavao toksični efekat na bakterije, u obliku smanjene biomase i usporenog rasta kolonija na hranljivim podlogama sa različitim koncentracijama fenola. Ipak, neočekivano visok broj izolata formirao je kolonije na koncentraciji od 200 mg L<sup>-1</sup> fenola, koja se smatra letalnom koncentracijom za skoro sve žive organizme (Radulović i sar. 2019b).

Iako bi dodatne analize preciznije objasnile ovako široku pojavu rezistencije na fenol u rizosferi sočivice, jedan važan faktor svakako doprinosi toj izraženoj rezistenciji. Poznato je da fenolna jedinjenja u eksudatima korena sočivice i biljaka uopšte utiču na selekciju bakterijskih sojeva sa efikasnim metabolizmom fenola i njegovih derivata (Kuiper i sar. 2004; Toyama i sar. 2009; Backer i sar. 2018). Među fenol-rezistentnim sojevima, izabrano je 7 sojeva koji pripadaju vrstama *H. alvei*, *H. paralvei*, *S. marcescens*, *S. nematodiphila*, *Lelliottia sp.* i *K. oxytoca* kao najbolji kandidati za bioremedijaciju. Kriterijumi po kojima su izabrani su bili prvenstveno brzina povećanja biomase u minimalnoj hranljivoj podlozi i rezistencija na visoke koncentracije fenola (Radulović i sar. 2019b).

Sočivice korišćene u ovoj studiji, pokazale su takođe visoku toleranciju na fenol (Radulović i sar. 2019a). Ovo je i inače jedna od relativno dobro dokumentovanih osobina ove i srodnih vrsta (Leng, 1999; Radić i sar. 2011; Ziegler i sar. 2016). Biljke su se brzo umnožavale i na vrlo visokoj koncentraciji fenola od 500 mg L<sup>-1</sup>, bez obzira na vidljive makroskopske promene u obliku hloroze (Radulović i sar. 2020). Promena ukupne količine pigmenata, posebno hlorofila, u odgovoru na toksična jedinjenja, poznata je osobina sočivica i iskorišćena je kao osnova za bioindikaciju u slučajevima zagađenja jedinjenjima bora i fenolom (Bocuk i sar. 2012; Forni i sar. 2014). Dodatno, u ovoj studiji zabeležena je promena boje frondi, od svetlozelene ka tamnozelenoj na 750 i 1000 mg L<sup>-1</sup> fenola, što ukazuje na akumulaciju hlorofila na ovim ekstremnim koncentracijama fenola (Radulović i sar. 2020). Povećanje ukupne količine hlorofila kod sočivice (*L. minor*) u odgovoru na povećanje fenola u otpadnim vodama ustanovili su Forni i sar. (2014). Ova interesantna osobina sočivica zahteva dalja istraživanja i ima potencijal za buduću primenu u bioindikaciji.

Bez obzira na brzu multiplikaciju sočivica u hranljivoj podlozi sa fenolom (500 mg L<sup>-1</sup>), već na nižoj koncentraciji fenola (200 mg L<sup>-1</sup>) uočena su mikroskopska oštećenja u vidu zadebljanih ćelijskih zidova, povećanog broja plastida i celih regiona korena biljke zahvaćenih plazmolizom (Radulović i sar. 2020). Ova oštećenja nisu bila neočekivana, s obzirom na to da ultrastrukturalna oštećenja mitohondrija i hloroplasta nastaju i na mnogo nižim koncentracijama fenolnih derivata koji se koriste kao herbicidi (Tigre i sar. 2015). Zadebljanja ćelijskih zidova mogu nastati kao univerzalna biljna reakcija na stresne uslove, a posebno abiotičke faktore, kada se sintetišu veće količine lignina i hemiceluloze i deponuju u ćelijski zid (Le Gall i sar. 2015).

Veći broj plastida u uslovima gajenja biljaka u prisustvu fenola odražava verovatno povećanje opšte biosintetičke aktivnosti i moguće povećanje ukupnog broja amiloplasta (Bramham i Pyke, 2017). Akumulacija skroba je poznati odgovor sočivica na abiotički stres (Sree i Appenroth, 2014; Sree i sar. 2015). U navedenim studijama abiotički stres je izazvan hipersalinitetom i kadmijumom, pa se može se pretpostaviti da se isti mehanizam aktivira i u prisustvu fenola. Mogućnost povećanja nutritivne i energetske vrednosti sočivica u stresnim uslovima privlači pažnju naučne javnosti,

pogotovo zbog mogućnosti korišćenja intermedijera koji nastaju metaboličkom aktivnošću sočivica tokom bioremedijacije (Xu i sar. 2011; Stout i Nuesslein, 2010; Sree i Appenroth, 2014). Kako primenjena metoda sa bojenjem AO ne omogućava razlikovanje različitih tipova plastida, preciznije biohemijske i mikroskopske analize bi razjasnile metaboličku aktivnost sočivica i procese unutar plastida (Radulović i sar. 2020).

Bez obzira na pomenute makro i mikropromene koje su znaci stresa, sočivice ipak poseduju mehanizme kojima mogu do izvesne mere da umanje toksične efekte fenola. Ovi mehanizmi se ogledaju u povećanju stope multiplikacije na  $500 \text{ mg L}^{-1}$  u odnosu na kontrolnu grupu biljaka gajenih u hranljivoj podlozi bez fenola. Umnožavanje se nastavlja i na višim koncentracijama fenola ( $750 \text{ mg L}^{-1}$ ). Takođe, tokom 14 dana gajenja u hranljivoj podlozi sa najvišom koncentracijom fenola ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) nije primećeno uvenuće frondi. Na ovoj koncentraciji je broj frondi ostao nepromenjen tokom celog trajanja eksperimenta (14 dana). Ovi rezultati ukazuju da sočivice obustavljaju rast i ne uvećavaju biomasu u ekstremno nepovoljnim uslovima (Radulović i sar. 2020). Slični mehanizmi dokumentovani su kod sočivica i drugih vrsta biljaka i smatraju se univerzalnim kada je reč o preživljavanju vro nepovoljnih uslova spoljašnje sredine (Obermeier i sar. 2015; Figlioli i sar. 2019). Preživljavanje i nepromenjena brojnost sočivica pri ekstremnim uslovima sredine dodatno ukazuje na izvanredno visoku toleranciju sočivica na fenol. Po našim saznanjima, ne postoje prethodne studije koje se bave fiziologijom sočivica na ovako visokoj koncentraciji fenola i mogućim strategijama njenog preživljavanja.

Interakcije bakterija i rizosfere su složene i u velikoj meri reflektuju dugu koevoluciju ove dve grupe organizama (Backer i sar. 2018). Nijedna biljka na planeti ne egzistira kao izolovan organizam, već je uvek u bliskoj komunikaciji i koegzistenciji sa složenim mikrobiomom, te pojedini autori ovu simbiozu nazivaju holobiontom, tj. potpunim organizmom (holos – ceo, biont – živi organizam). U ovoj studiji, posebna pažnja je posvećena mikroskopskoj analizi prostornih odnosa između izabranih bakterijskih sojeva i korena sočivice (Radulović i sar. 2020).

Poznato je da je aktivna pokretljivost fundamentalna osobina skoro svih bakterijskih vrsta u ovoj studiji: *Serratia sp.*, *Hafnia sp.* i *Lelliottia sp.* (O'Rear i sar. 1992; Nowicki i sar. 2014). Jedini izuzetak je *Klebsiella spp.* (Dantur i sar. 2018). Kvalitativni test formiranja biofilma ukazuje da je biofilm prisutan kod svih bakterijskih sojeva. Kvantitativni testovi formiranja biofilma pokazuju da svi bakterijski sojevi imaju nisku do umerenu sposobnost formiranja biofilma, sa izuzetkom soja 43, *Hafnia paralvei*. Primećuje se pravilnost u organizaciji bakterija na površini korena, tj. uočeni su određeni regioni za koje se bakterije preferencijalno vezuju, a to su granice između biljnih ćelija. To se posebno opaža na mikrografijama koje predstavljaju soj *S. nematodiphila* 51 (Radulović i sar. 2020). Kuiper i sar. (2004) su primetili da se mikrokolonije epifitskih bakterija formiraju upravo na ovim mestima, na kojima spontano cure izvesne količine eksudata korena. Moguće je da se i sojevi u ovoj studiji organizuju na sličan način. Poznato je da je prisustvo mikrokolonija (manjih grupa bakterija koje se organizuju na jednom mestu) takođe indikator rane organizacije biofilma (Bridier i sar. 2017).

Iako je biofilm prisutan, on nije jedini način organizacije analiziranih sojeva rizosfere, kao što je to slučaj sa *Acinetobacter calcoaceticus* P23 koji su izolovali Yamaga i sar. (2010). Kod pomenutog soja je moguće i vizuelno pratiti smanjenje inicijalnog turbiditeta tečne hranljive podloge zbog postepene epifitske kolonizacije i formiranja biofilma na površini korena sočivice. Ovakvo kretanje bakterija nije primećeno tokom naših eksperimenata. Analiza mikrografija i broja bakterija u hranljivoj MS podlozi sa i bez fenola ukazuje da se većina bakterija slobodnopokretnih vrsta (*Serratia spp.*, *Lelliottia spp.* i *Hafnia spp.*) korišćenih u ovoj studiji zadržava u okolini korena, a ne na samoj površini korena.

Za razliku od slobodnopokretnih vrsta koje su ostale u slobodnom rastvoru i u manjoj meri kolonizovale površinu korena, *K. oxytoca*, soj 14, kolonizovao je i unutrašnjost ćelija korena sočivice, a uz to je u manjoj meri prisutan i na površini korena (Radulović i sar. 2020). Endofitska kolonizacija

je dobro dokumentovana kod *K. oxytoca* i njoj srodnih vrsta (Min i sar. 2016; Dantur i sar. 2018), a u ovoj studiji je potvrđena na mikrografijama na kojima se vide oštećene ćelije korena, iz kojih su oslobođene manje ili veće skupine bakterijskih ćelija. Veće skupine, koje se mogu opisati kao ćelijski agregati, nađene su na korenovima biljaka gajenim na hranljivoj podlozi sa fenolom. Manje skupine (do nekoliko ćelija), detektovane su kod biljaka u kontrolnoj grupi. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da fenol stimuliše endofitsku kolonizaciju korena i na taj način preživljavanje ovog soja, odnosno odbrambenu reakciju bakterija na toksične uslove.

Mikrografije pokazuju da se deo kolonija *K. oxytoca* uvek nalazi na površini korena bez obzira na prisustvo fenola u hranljivoj podlozi. Poznato je da endofitska kolonizacija protiče u nekoliko faza tokom kojih bakterije ostvaruju sve bliži odnos sa biljkom (Germaine i sar. 2004), pa se može pretpostaviti da mikrografije predstavljaju bakterije *K. oxytoca* u različitim fazama kolonizacije korena (Radulović i sar. 2020).

Takođe, soj *K. oxytoca* 14, izazvao je naglo uginuće cele populacije sočivica oko 7. dana ko-kultivacije u hranljivoj podlozi sa fenolom ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ), ali ne i na drugim koncentracijama, uključujući i kontrolnu grupu (bez fenola). Do sada, smatralo se da se mutualizam rizosfere sočivica i njenih bakterija održava u svim uslovima, čak i u slučaju zagađenja (O'Brien i sar. 2018), što je suprotno rezultatima iz ove teze, gde je primećeno odumiranje cele populacije sočivica na određenoj koncentraciji fenola (Radulović i sar. 2020). Za postepeno odumiranje populacije sočivica verovatno je zaslužan veliki broj bakterija, odgovarajuća koncentracija fenola i dovoljno dugo vreme ko-kultivacije. Brz rast ovog soja u prisustvu fenola ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) doprinosi trošenju hranljivih materija, što dodatno doprinosi uvenuću sočivica. Međutim, negativan efekat ovog soja u prisustvu fenola je istovremeno i potencijalno povoljna osobina, jer bakterije na taj način regulišu broj sočivica prirodnim putem. Kao opšte pravilo, endofiti su poželjni bioremedijatori jer imaju nekoliko prednosti u odnosu na epifite: nisu u direktnoj kompeticiji za nutrijente i prostor sa drugim bakterijama rizosfere i fizički su zaštićeni od nepovoljnih uslova. Mnoge endofitske bakterijske vrste proizvode ACC dezaminazu i time smanjuju količinu hormona stresa, etilena, što je jedan od osnovnih PGP mehanizama (Fatima i sar. 2015; Gkorezis i sar. 2016).

Drugi soj (9) iste vrste, *K. oxytoca*, nije primećen na površini korena niti blizu oštećenih delova korena, iako je bakterijska populacija uspešno rasla u okolnoj hranljivoj podlozi tokom ko-kultivacije. Ova pojava može se takođe objasniti visokom specifičnošću odnosa endofitskih bakterija i biljaka, koju odlikuje bakterijska kompetencija za rizosferu date biljke i genetička i metabolička kompatibilnost biljke i bakterije (Kuiper i sar. 2004; Gkorezis i sar. 2016). Genetičke razlike između ova dva, vrlo bliska soja, svakako određuju kompetenciju ovih bakterija prema rizosferi sočivice.

Mikrobiom rizosfere sočivice u kom su bakterije raznovrsniji i dominantniji deo mikrobioma doprinosi većoj efikasnosti uklanjanja fenola u odnosu na površinski sterilisane sočivice, kod kojih je ovaj bogati mikrobiom uklonjen. Ovo je bio očekivani rezultat, s obzirom da i jednoćelijske gljivice izolovane iz mikrobioma i bakterije poseduju sposobnost uklanjanja fenola i srodnih jedinjenja. Takođe, merenja ukupne količine endogenih fenolnih jedinjenja pokazuju da se veća količina ovih jedinjenja nalazi u uzorcima sa nesterilnim biljnim materijalom. Ovaj zaključak je takođe bio očekivan, s obzirom da je poznato da sve biljke i njihov mikrobiom oslobađaju izvesnu količinu različitih fenolnih jedinjenja poput kafeinske, hlorogenske, izohlorogenske, galne, pirogalne, hipogalne, kumarinske kiseline i sličnih jedinjenja, od kojih su neka kasnije i identifikovana u ovoj studiji, u eksperimentu sa *K. oxytoca*, soj 14, i sočivicom (videti kasnije). Merenja ukupnih endogenih jedinjenja su takođe pokazala da je ukupna količina endogenih fenolnih jedinjenja i kod sterilnih i kod nesterilnih sočivica relativno niska, ne viša od  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , te da stoga nema većih interferencija sa testovima uklanjanja fenola (Radulović i sar. 2019a).

Testovi uklanjanja fenola ukazuju da su sočivice inokulisane čistim bakterijskim kulturama efikasnije od sočivica sa intaktnim mikrobiomom u kom se nalazi istovremeno više mikrobijalnih vrsta, i da se ova efikasnost postiže čak i pri znatno višoj koncentraciji fenola ( $500 \text{ mg L}^{-1}$  fenola kod bakterijskih

monokultura i sočivica, nasuprot 100 mg L<sup>-1</sup> fenola kod sočivica sa intaktnim mikrobiomom). Isto se odnosi i na sterilne sočivice testirane na ove dve inicijalne koncentracije (Radulović i sar. 2019a; Radulović i sar. 2020). Moguće je da fenol pri višim koncentracijama predstavlja signal koji aktivira više odbrambenih mehanizama i sočivica i bakterija, kao i da sama čista bakterijska kultura efikasnije uklanja fenol od mešovitog mikrobioma u kom mogu da postoje i odnosi kompeticije među različitim vrstama, koji usporavaju uklanjanje fenola. Takođe, moguće je da pri nižoj koncentraciji fenola (do 100 mg L<sup>-1</sup>), dominiraju drugačiji mehanizmi preživljavanja toksičnih efekata fenola. Na kraju, testovi sa multiplikacijom sočivica pokazuju da povećanje koncentracije fenola rezultuje i u ubrzanju multiplikaciji sočivica, i da je ovaj efekat primećen u ovoj studiji pogotovo na 500 mg L<sup>-1</sup> fenola u odnosu na MS hranljivu podlogu bez fenola. Samo povećanje broja sočivica svakako utiče na sveukupnu efikasnost uklanjanja fenola pri višim koncentracijama, u odnosu na 100 mg L<sup>-1</sup> kolika je bila najviša koncentracija korišćena u eksperimentima sa sočivicama i njihovim mikrobiomom (Radulović i sar. 2019a; Radulović i sar. 2020). Ovi rezultati se mogu uporediti sa istraživanjima Hoang i sar. 2009, Kristanti i sar. 2011, Ogata i sar. 2013. sa srodnom vrstom sočivice, barskom lećom, *S. polyrhiza*, kod koje je degradacija različitih fenolnih jedinjenja više puta ubrzana u prisustvu bakterija. Kristanti i sar. (2011) čak prijavljuju da je degradacija nitrofenolnih derivata bila moguća jedino u prisustvu bakterija, i potpuno nepostojeća u sterilnim rastvorima sa površinski sterilisanim biljkama. Ove studije, kao i ova studija, pokazuju ogroman uticaj bakterijske populacije na uspešnost uklanjanja različitih fenolnih jedinjenja. U daljim istraživanjima, a s obzirom na sve navedene zaključke sa mikrobiomom i bakterijskim monokulturama, bilo bi od značaja ispitati da li određene kombinacije bakterijskih monokultura, tj. bakterijski konzorcijumi, dodatno povećavaju efikasnost uklanjanja fenola. Sinergija između bakterijskih sojeva dokazano povećava efikasnost uklanjanja različitih aromatičnih jedinjenja (Jambon i sar. 2018; Li i sar. 2018). Međutim, kompeticija između bakterijskih sojeva dovodi do inhibicije uklanjanja aromatičnih jedinjenja (Vila i sar. 2010; Wang i sar. 2016).

Testovi uklanjanja fenola sa sočivicama i čistim bakterijskim monokulturama pokazuju da bakterijski sojevi (11 – *Lelliottia sp.*, 14 – *K. oxytoca*, 27 – *S. marcescens*, 37 – *H. alvei*, 43 – *H. paralvei*, 51 – *S. nematodiphila*) efikasno uklanjaju fenol kao monokulture, a efikasnost uklanjanja fenola se povećava u prisustvu sočivica (Radulović i sar. 2020). Sterilne sočivice takođe uklanjaju fenol, ali sporije u odnosu na biljke koje su inokulisane odgovarajućim bakterijskim sojevima. Usporeno uklanjanje fenola od strane sterilnih sočivica tokom prvih 24h testa može ukazati na to da je biljkama potrebno duže vreme prilagođavanja na visoku inicijalnu koncentraciju fenola (500 mg L<sup>-1</sup>). Kada su biljke inokulisane bakterijama, bakterijska metabolička aktivnost ima primarnu ulogu u uklanjanju fenola, a ne sama biljka. Zajedničko delovanje bakterija i sočivica je imalo veći uticaj na uklanjanje fenola od same biljke ili bakterijskih suspenzija, što ukazuje na sinergiju biljaka i bakterija. Pet dana uzgajanja je bilo potrebno sočivicama sa bakterijama, kao i sterilnim sočivicama, da uklone najveći deo fenola iz hranljive podloge (skoro 90% fenola u slučaju *H. paralvei* 43 sa sočivicom). Bakterijske monokulture su uklanjale do 80% inicijalne količine fenola iz rastvora. Ovo je daleko veća efikasnost eliminacije od nekih drugih biljnih vrsta, poput salate, koja je uklonila samo polovinu inicijalne koncentracije fenola od 200 mg L<sup>-1</sup> tokom 10 dana uzgajanja *ex vitro* (Tadić i sar. 2018a). Rezultati testa eliminacije fenola u ovoj studiji mogu se pre svega uporediti sa rezultatima Yamaga i sar. (2010), ali i drugih autora (Hoang i sar. 2010; Ogata i sar. 2013; Jin i sar. 2019). Među testiranim sojevima, *H. alvei* (soj 37), a posebno *H. paralvei* (soj 43), pokazuju visok stepen eliminacije fenola.

Prema našim saznanjima, ova sposobnost pomenutih sojeva je po prvi put opisana. Nasuprot tome, degradativni metabolizam fenola je relativno dobro izučen kod *Serratia sp.*, pogotovo *S. marcescens*, ali i kod *K. oxytoca* i *Lelliottia sp.* (donedavno taksonomski izjednačavana sa *Enterobacter sp.*) (Nowicki i sar. 2014). Dalje analize krajnjih proizvoda degradacije i transformacije fenola pomoću sočivica i bakterija su neophodne da bi se tačno utvrdili metabolički putevi kod navedenih bakterijskih vrsta i biljaka. Kako nisu svi krajnji metaboliti fenola u bioremedijaciji podjednako poželjni, ovo bi znatno unapredilo kvalitet bioremedijacije otpadne vode. Na kraju, važno je naglasiti

da sočivice i bakterije mogu da uklone fenol i biosorpcijom. Na primeru različitih biljnih vrsta, kvasaca i bakterija, poznato je da udeo biosorpcije u uklanjanju fenola znatno varira i generalno zavisi od ukupne površine bioloških membrana na kojima se odvija ovaj pasivni proces (Agostini i sar. 2011).

Iako je uočen izraziti pozitivan efekat prisustva bakterija na umnožavanje sočivica, nijedan od bakterijskih sojeva u ovoj studiji ne proizvodi IAA pod primenjenim eksperimentalnim uslovima (Radulović i sar. 2020). Međutim, ograničenje reakcije sa Salkowski reagensom je da ne može da detektuje koncentraciju IAA manju od 5 µg/mL u rastvoru u koji nije dodat egzogeni L-triptofan, kao što je slučaj u ovom eksperimentu. Moguće je da testirani bakterijski sojevi proizvode vrlo niske koncentracije IAA i pod ovim uslovima, ali da ovaj nivo IAA standardni test sa Salkowski reagensom nije mogao da detektuje (Gilbert i sar. 2018). Efekat IAA se dodatno komplikuje u slučaju sočivica jer nedavne studije ukazuju da IAA ima drugačiji efekat na sočivice i verovatno većinu vodenih biljaka, u odnosu na kopnene biljke koje su uzimane kao model organizmi za ova ispitivanja (Utami i sar. 2019). Takođe, nije isključeno da bakterijski sojevi primenjeni u ovoj studiji poseduju druge PGP mehanizme (siderofore, solubilizaciju fosfora, produkciju giberelina, sintezu ACC deaminaze, itd). Svakako, organska jedinjenja poreklom iz izumrlih bakterija, pogotovo ona koja su izvor fosfora i azota koji su najveći ograničavajući faktor za rast svih biljaka, mogu da doprinesu značajno ovom efektu ubrzanog umnožavanja sočivica, premda ovaj efekat nije PGP svojstvo (Guignard i sar. 2017). Određivanje različitih PGP mehanizama bakterija rizosfere koji dovode do povećanog umnožavanja sočivica bi bio dalji cilj započetog istraživanja.

Tokom ko-kultivacije sočivica i *K. oxytoca* (14), iz hranljive podloge je izolovano 5 fenolnih jedinjenja: luteolin 6,8-di-*C*-heksozid, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, kafeinska kiselina, apigenin 6-*C*-(2"-pentozil)heksozid i *p*-kumarinska kiselina. Primećena promena boje hranljive podloge tokom ko-kultivacije isključivo sa ovim bakterijskim sojem je najverovatnije posledica oslobađanja *p*-hidroksibenzoeve, kafeinske i *p*-kumarinske kiseline, koje prirodno poseduju žućkastu ili mrku boju. Luteolini su antioksidativni, a uz to i signalni flavonoidi kod nekih vrsta biljaka, kod kojih moduliraju nodulaciju i uspostavljanje simbioze sa *Rhizobacterium sp.* (Mierziak i sar. 2014). Luteolin 6,8-di-*C*-heksozid se nalazi u velikim količinama kod mnogih biljaka, pogotovo onih sa medicinskim značajem i ispoljava antiinflamatorno i imunomodulatorno dejstvo kod eksperimentalnih životinja (Kim i sar. 2016). *Para*-hidroksibenzoeva kiselina se akumulira kod biljaka napadnutih bakterijskim patogenima. Takođe, može se javiti i kao intermedijer u biotransformaciji nekih monoaromatičnih jedinjenja kod bakterija (Bertani i sar. 2001). Kafeinska kiselina je esencijalni molekul svih biljaka, jer je prekursor u sintezi lignina, dok je neuobičajen metabolit kod bakterija (Wang i sar. 2017). Apigenin 6-*C*-(2"-pentozil)heksozid je takođe flavonoid, koji se nalazi u eksudatima korena i čija je sinteza stimulirana tokom endofitske kolonizacije korena (Salehi i sar. 2019). *Para*-kumarinska kiselina je povezana sa endofitskom kolonizacijom korena i odbrambenim odgovorom biljaka (Ray i sar. 2018). Osim toga, ima i antimikrobno dejstvo (Sudharshana i sar. 2018). Dakle, svi navedeni molekuli mogu da budu dovedeni u vezu sa endofitskom kolonizacijom korena sočivice, sa signalizacijom između bakterija i biljaka i modulacijom biljnog antioksidativnog odgovora od strane bakterije. Međutim, neophodne su dalje analize za potpuno razumevanje ovog konkretnog procesa između *K. oxytoca* 14 i sočivice *in vitro*.

Antioksidativni odgovor biljaka na prisustvo zagađujućih jedinjenja, pogotovo aromatičnih, i na prisustvo bakterija je nedovoljno proučen fenomen. Kod nekih kopnenih fenol-rezistentnih biljaka (obična grahorica, *Vicia sativa* i orijentalni dvornik, *Polygonum orientale*) u odgovoru na fenol aktiviraju se pre svega peroksidaze (POD), dok ostali enzimi i neenzimski parametri ostaju nepromenjeni, uključujući i ukupni MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ibanez i sar. 2012; Wang i sar. 2015). Kod orijentalne sočivice, *Lemna paucicostata*, fenol izaziva povećanje skoro svih antioksidativnih parametara tokom 7 dana kultivacije, izuzev ukupnih askorbata (AsA) i aktivnosti SOD. Koncentracija gvajakol-peroksidaze (GPX) se povećava sa povećanjem koncentracije fenola, dok je oštećenje membrana, kvantifikovano kroz ukupnu količinu MDA, zanemarljivo, što ukazuje da

antioksidativni sistem uspešno štiti membrane orijentalne sočivice od oksidativnog oštećenja (Kim i sar. 2015).

Sve navedeno u pomenutim studijama je u korelaciji sa rezultatima ove teze. Oštećenje membrana sočivica, izraženo kroz ukupni MDA nije drastično u prisustvu fenola, bakterija ili tokom njihovog zajedničkog delovanja. Ovo takođe sugerise da prisustvo bakterija soja *H. paralvei* 43 na površini korena sočivice nema negativne posledice po integritet biljnih membrana.

Ukupna AsA kod orijentalne sočivice raste u ranim fazama izlaganja fenolu (prvih 48h), a zatim ove rezerve bivaju brzo potrošene zbog aktivnosti APX i uloge AsA u antioksidativnom, odbrambenom odgovoru (Kim i sar. 2015; Varga i sar. 2013). Vrlo slični rezultati kod evropske sočivice u ovoj studiji pokazuju da je AsA efikasna u odbrani od oksidativnog stresa izazvanog fenolom. Uticaj mikrobijalne populacije korena na antioksidativni odgovor sočivice nije praćen u ranijim istraživanjima pa su rezultati ove teze jedinstveni i pokazali su da *H. paralvei* može imati čak i blagi zaštitni efekat na biljku. Fluktuacije ukupne količine AsA kod sočivica uzgajanih sa bakterijama ili sa bakterijama u hranljivoj podlozi sa fenolom, sugerisu da fenol izaziva veći oksidativni stres za biljke od bakterija *H. paralvei*. Naime, sterilne sočivice u hranljivoj podlozi sa fenolom imaju konstantno nisku ukupnu količinu AsA, što se može najbolje objasniti time da se AsA troši brže nego što se obnavlja u biljnim ćelijama izloženim fenolu. Za obnovu AsA, neophodno je recikliranje postojećeg AsA i *de novo* sinteza, koja je većim delom zavisna od enzima na unutrašnjoj membrani mitohondrija (Smirnov, 2001). Osim toga, velike rezerve AsA nalaze se i unutar hloroplasta (Smirnov i Wheeler, 2000). S obzirom da fenol ima negativan uticaj na mitohondrije i plastide, smanjenje ukupne AsA u prisustvu fenola je očekivano. Prisustvo bakterija dovodi do obnove zaliha AsA, što se najbolje vidi trećeg dana ko-kultivacije u hranljivoj podlozi bez fenola i petog dana ko-kultivacije u hranljivoj podlozi sa fenolom. Molekularne analize, pogotovo ekspresije askorbat-sintetaze, objasnile bi tačno na koji način bakterije pozitivno deluju na ukupnu količinu AsA u ovim eksperimentalnim uslovima.

Ishizawa i sar. (2017b) pokazuju da PGPB sojevi u rizosferi sočivice (*L. minor*) održavaju i enzimsku aktivnost i ukupne ROS na sličnom nivou kao i kod kontrolnih uzoraka (sa izuzetkom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dok inhibitorni sojevi (PGIB) povećavaju i enzimsku aktivnost i ukupni ROS. Ukupna količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se povećava i u ovoj studiji sa vremenom ko-kultivacije bakterija i biljaka u hranljivoj podlozi sa fenolom. Koncentracija vodonik-peroksida je veća kada su prisutne bakterije u hranljivoj podlozi sa fenolom, nego kada su biljke gajene samo sa fenolom. Ova pojava, osim što ukazuje na stres, može biti znak komunikacije između sočivica i bakterija, s obzirom da je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i signalni molekul. Takođe, maksimum koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detektuje se kasnije (5. dana) tokom ko-kultivacije bakterija i sočivica, slično kao i kod Ishizawa i sar. (2017b) kod kojih je taj maksimum postignut 8. dana u ko-kultivaciji biljaka i PGPB sojeva. U ovoj studiji, inokulacija u hranljivoj podlozi bez fenola ne izaziva značajno povećanje ukupnog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biljke tokom pet dana ko-kultivacije, što dodatno pokazuje da bakterije ne izazivaju oksidativni stres kod sočivice. Moguće je da, kao i kod Ishizawa i sar. (2017b) do akumulacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dolazi kasnije, tokom duže ko-kultivacije.

U prisustvu fenola i soja *H. paralvei* 43, menja se način ekspresije izoformi gvajakol-peroksidaze (GPX) sočivica. Naime, u prisustvu fenola, kao i fenola i bakterija, detektovano je ukupno 5 različitih izoformi GPX. U prisustvu bakterija u hranljivoj podlozi bez fenola, detektovane su samo 3 izoforme GPX, nasuprot samo jednoj izoformi kod sterilnih sočivica u kontrolnim uslovima bez fenola. Prisustvo bakterija vidljivo utiče na nivo ekspresije ovih izoformi. Primećeno je da 2. i 3. dana dolazi do smanjenja ekspresije izoformi GPX u prisustvu bakterija u hranljivoj podlozi sa i bez fenola. Dobro je poznato da su peroksidaze rana i najznačajnija linija zaštite biljaka od širokog spektra negativnih spoljašnjih uticaja i imaju ulogu u prepoznavanju patogenih i ne-patogenih bakterija (Tamas i sar. 2007; Dorantes i Zuniga 2012; Helepiciu i sar. 2014). Ishizawa i sar. (2017b) su takođe pokazali da se aktivnost GPX sočivica smanjuje tokom vremena ko-inokulacije sa PGPB sojevima. Slični rezultati dobijeni su i sa drugim, nesrodnim biljnim vrstama, npr. sa uljanom repicom (*Brassica*

*napus* L.) gde se aktivnost peroksidaza takođe smanjivala u prisustvu PGPB sojeva (Ren i sar. 2019). Kurnik i sar. (2015) detektovali su ukupno 7 izoformi peroksidaza u pulpi krompira koje su bile aktivne u odgovoru na fenol, ali nisu testirali uticaj PGPB sojeva. Slično, Ibanez i sar. (2012) pronašli su ukupno 3 izoforme peroksidaza aktivnih u odgovoru na fenol kod obične grahorice (*V. sativa*).

Dalje analize detektovanih izoformi kod sočivica izloženih fenolu i *H. paralvei* 43 i njihova aktivnost, posebno su značajne jer do sada nije pokazano na koji način bakterije moduliraju odgovor biljaka na fenol i kako se ova osobina može odraziti na uspeh bioremedijacije.

Polifenol oksidaze (PPO), kao heterogena grupa enzima sa širokim spektrom supstrata i različitim ulogama u metabolizmu biljaka i signalizaciji, takođe su moguća grupa enzima koja može transformisati fenol, kao što je već opisano u naučnoj literaturi (Mukherjee i sar. 2013; Sullivan, 2015). Kod evropske sočivice, PPO je detektovana kod biljaka izloženih rastvoru SDS (natrijum-dodecilsulfatu) (Forni i sar. 2011). PPO je detektovana i kod Tadić (2015) kao jedan od mogućih enzima odgovornih za eliminaciju slobodnog fenola iz hidroponičkog rastvora u kome je gajena zelena salata (*L. sativa*). Međutim, kod sočivica testiranih u ovoj studiji, PPO nije detektovana kod biljaka kao odgovor na fenol ili bakterije. Može se pretpostaviti da ova grupa enzima ne igra ulogu u direktnoj eliminaciji fenola ili u odbrambenom, antioksidativnom odgovoru na prisustvo fenola ili bakterija kod sočivice.

Pozitivna modulacija antioksidativnog odgovora od strane PGPB sojeva je tek nedavno poznata u nauci. Ova pogodnost može biti iskorišćena za augmentaciju zemljišta i zaštitu biljaka u različitim stresnim uslovima, a naročito kada su u pitanju nepovoljni abiotički faktori. Kultivari poput ženšena i kravljeg graška zaštićeni su od oksidativnog stresa izazvanog hipersalinitetom ako su ko-inokulisani određenim sojevima bakterija iz roda *Paenibacillus*, odnosno *Bradyrhizobium* (Santos i sar. 2017; Sukwenaadhi i sar. 2018). Veoma malo se zna o ovom načinu zaštite kod vodenih biljaka, a pogotovo u okviru bioremedijacije. Stoga su svi novi podaci o fenomenu pozitivne modulacije biljnog antioksidativnog odgovora od strane nepatogenih bakterija izuzetno značajni.



## 6. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, mogu se izvući sledeći zaključci:

- Sekvenciranje 16S rRNK gena pokazuje da su bakterijske populacije koje naseljavaju rizosferu sočivice gajene u urbanim uslovima veoma raznovrsne. Mnogi od ovih bakterijskih sojeva imaju sposobnost rasta na veoma toksičnim i letalnim koncentracijama fenola, kao i korišćenja fenola kao izvora energije.
- Predtretman biljnog materijala, iz koga su izolovane bakterije, utiče na diverzitet bakterijskih populacija i verovatno odražava prostorne i genetičke odnose u samoj rizosferi. Genetički sličnije bakterije se grupišu zajedno unutar rizosfere, što odgovara modelu rizosfere kao stratifikovanom mikrostaništu.
- Fluorescentna mikroskopija pokazuje da se bakterije preferencijalno vezuju za središnji deo korena sočivice i da su svi izabrani sojevi, osim jednog, epifiti.
- Endofitska bakterija *K. oxytoca*, soj 14, u interakciji sa sočivicom proizvodi niz aromatičnih jedinjenja koja se mogu dovesti u vezu sa antioksidativnim odgovorom biljke na prisustvo bakterije i na endofitsku kolonizaciju od strane ove bakterije.
- Bakterije rizosfere sočivice, kao monokulture, nemaju fitopatogeni efekat. Samo na određenoj koncentraciji fenola *K. oxytoca* 14 ima fitopatogeni efekat – izaziva uvenuće sočivica tokom dugotrajne ko-kultivacije – što može biti iskorišćeno za samokontrolu broja sočivica i bakterija u potencijalnoj primeni u bioremedijaciji.
- Sočivice korišćene u ovoj studiji pokazuju izrazitu toleranciju prema fenolu. Hloroza se javlja kod sočivica uzgajanih samo na određenoj koncentraciji fenola, dok se na višim koncentracijama ne pojavljuje, što može biti osnova za korišćenje sočivica u bioindikaciji zagađenja.
- Efikasnost uklanjanja fenola iz hranjive podloge je veća ako se koriste površinski sterilisane sočivice ko-kultivisane sa izabranim bakterijskim monokulturama, u odnosu na površinski sterilisane sočivice koje nisu inokulisane bakterijama. Ova efikasnost se posebno opaža tokom prvog dana kultivacije, dok posle 5 dana kultivacije obe grupe postižu skoro identičan nivo efikasnosti. Najveća efikasnost postignuta je sa sočivicama koje su inokulisane sojem *H. paralvei* 43.
- Prisustvo bakterije *H. paralvei* 43 nesumnjivo utiče na antioksidativni odgovor sočivice i može se potencijalno primeniti u budućnosti kako bi se povećao odgovor na fenol i moguće razne druge stresogene faktore.
- Nivo neenzimskih parametara stresa: malondialdehida, vodonik-peroksida, askorbinske kiseline, i ukupnih solubilnih proteina menja se u zavisnosti od dana kultivacije, prisustva bakterija, i prisustva fenola.
- Modulacija antioksidativnog odgovora takođe se ogleda u smanjenju ekspresije vodonik-peroksidaze sočivice, kao i u gubitku ili pojavi ekspresije određenih izoformi ovog enzima tokom određenih dana ko-kultivacije sa bakterijom *H. paralvei* 43.

- Nije detektovano prisustvo biljne polifenol-oksidge, enzima za koji je bilo očekivano da se aktivira kao odgovor na fenol. S obzirom da su polifenol-oksidge značajna grupa enzima kod različitih vrsta biljaka, ovo ukazuje na to da su sočivice razvile drugačiji sistem odgovora na fenol.
- Iako nije detektovano prisustvo indol-sirćetne kiseline kao najčešćeg fitohormona sa pozitivnim efektom na rast biljaka, moguće je da bakterijski sojevi u ovoj studiji imaju pozitivni efekat na rast biljaka (PGP) koji se odražava u izrazitom povećanju stope multiplikacije sočivica.
- Gledano sveobuhvatno, sočivice i bakterije njene rizosfere imaju ogroman potencijal za buduće primene u bioremedijaciji jer su na osnovu testova sa uklanjanjem fenola pokazali niz povoljnih karakteristika, i nude jeftinu i ekološki minimalno škodljivu zamenu za standardne fizičko-hemijske metode remedijacije zagađenja fenolom. Bakterije rizosfere mogu uticati na smanjenje oksidativnog stresa kod biljke i svojim brzim rastom mogu potencijalno uticati na rast drugih, patogenih organizama, tako da sojevi navedeni u ovoj studiji mogu potencijalno imati primenu, osim u bioremedijaciji, u drugim oblastima, npr. agrikulturi.

## 7. Literatura

1. Tilley, E., Ulrich, L., Lüthi, C., Reymond, P. Zurbruegg, C. (2014) Compendium of sanitation systems and technologies. 2nd Revised Edition. Swiss Federal Institute Of Aquatic Sci And Technology (Eawag), Duebendorf, Switzerland.
2. Hall, R. P., Van Koppen, B., Van Houweling, E. (2014). The human right to water: the importance of domestic and productive water rights. *Sci Eng Ethics*. 20(4), 849–868. doi:10.1007/s11948-013-9499-3
3. Raschid-Sally, L., Jayakody, P. (2008). Drivers and characteristics of wastewater agriculture in developing countries: results from a global assessment. Dostupno na: [www.iwmi.cgiar.org/publications/iwmi-research-reports/iwmi-research-report-127/](http://www.iwmi.cgiar.org/publications/iwmi-research-reports/iwmi-research-report-127/)
4. Mateo-Sagasta, J., Raschid-Sally, L., Thebo, A. (2015). Global Wastewater and Sludge Production, Treatment and Use. *Wastewater: Economic Asset in an Urbanizing World*. 15-38. doi:10.1007/978-94-017-9545-6\_2.
5. Sato, T., Qadir, M., Yamamoto, S., Endo, T., Zahoor, A. (2013). Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. *Agricult. Water Manag.* 130, 1–13. doi:10.1016/j.agwat.2013.08.007
6. Corcoran, E., Nellemann, C., Baker, E., Bos, R., Osborn, D., Savelli, H. (2010) Sick Water? The Central Role of Wastewater Management in Sustainable Development. United Nations Environment Programme/United Nations Human Settlements Programme/GRID-Arendal (UNEP/UN- Habitat). Dostupno na: [www.unep.org/pdf/SickWater\\_screen.pdf](http://www.unep.org/pdf/SickWater_screen.pdf)
7. Malmqvist, B., Rundle, S. (2002). Threats to the running water ecosystems of the world. *Environ. Conservation*. 29(2), 134–153. doi: 10.1017/S0376892902000097
8. Gu, Y., Li, Y., Li, X., Luo, P., Wang, H., Wang, X., Li, F. (2017). Energy Self-sufficient Wastewater Treatment Plants: Feasibilities and Challenges. *Energy Procedia*, 105, 3741–3751. doi:10.1016/j.egypro.2017.03.868
9. Carducci, A., Verani, M. (2013). Effects of Bacterial, Chemical, Physical and Meteorological Variables on Virus Removal by a Wastewater Treatment Plant. *Food Environ. Virol.* 5, 69–76. doi:10.1007/s12560-013-9105-5
10. Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielińska, M. (2016). Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World J of MicroBiol and Biotech.* 32, 1–8. doi:10.1007/s11274-016-2012-9
11. Naughton, C., Rousselot, O. (2017). Activated Sludge. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros. *Global Water Pathogen Project*. doi:10.14321/waterpathogens.62
12. Ward, B. Nitrification. Editor(s): Brian Fath, *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)*, Elsevier, 2013, 351-358. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7.
13. Veljković, N., Petrović, Z., Šotić, A., Cibulić, V. (2018). Perspektiva primene evropske direktive u prečišćavanju komunalnih otpadnih voda u Srbiji. *Voda i sanitarna tehnika*. XLVII (1) 5 – 16.
14. Todić, D. (2015). Upravljanje vodnim resursima i evropske integracije Srbije. *Zbornik radova Pravnog fakulteta u Nišu*, (71), 149-168.
15. Santana, C. M., Ferrera, Z. S., Padrón, M. E. T., Juan, J., Rodríguez, S. (2009). Methodologies for the Extraction of Phenolic Compounds from Environmental Samples: New Approaches. *Molecules*. 9, 298–320. doi:10.3390/molecules14010298
16. Iurascu B., Siminiceanu I., Vione D. (2009) Phenol degradation in water through a heterogeneous photo-Fenton process catalyzed by Fe-treated laponite. *Water Research*. 43: 1313–1322
17. Pilato, Louis. (2010). Phenolic Resins: A Century of Progress (Book). doi:10.1007/978-3-642-04714-5.
18. Michałowicz, J., Duda, W. (2007). Phenols – Sources and Toxicity. *Pol. J. Environ. Stud.* 16(3), 347-362.
19. Paisio, CE., Talano, MA., González, PS., Magallanes-Noguera, C, Kurina-Sanz, M, Agostini, E. (2016) Biotechnological tools to improve bioremediation of phenol by *Acinetobacter sp.* RTE1.4. *Environ Technol.* 37(18):2379-90. doi:10.1080/09593330.2016.1150352.
20. Barry F., Finnegan P., Lynskey I., McKeever B. (2007). Report on a contaminated drinking water incident in Counties Cavan and Monaghan. Co Meath, Republic of Ireland. 1–40. Dostupno na: [www.cavancoco.ie/file/environment/water%20services/HSE-Report-East-Cavan.pdf](http://www.cavancoco.ie/file/environment/water%20services/HSE-Report-East-Cavan.pdf)
21. Häkkinen, J. M., Posti, A. I. (2014). Review of Maritime Accidents Involving Chemicals – Special Focus on the Baltic Sea. *TransNav, the International J on Marine Navigation and Safety of Sea Transportation*, 8(2), 295–306. doi:10.12716/1001.08.02.16
22. Kim DH, Lee SK, Chun BY, Lee DH, Hong SC, Jang BK. (1994) Illness associated with contamination of drinking water supplies with phenol. *J Korean Med Sci*. 9(3):218-23.
23. Paisio, C.E., Agostini, E., González, P.S., Bertuzzi, M.L. (2009) Lethal and teratogenic effects of phenol on *Buffo arenarum* embryos. *J. Hazard. Mater.* 167, 64-68.
24. Davidenko, T.I., Oseychuk, O.V., Sevastyanov, O.V. (2004) Peroxidase Oxidation of Phenols. *App Biochemistry MicroBiol* 40. 542–546 doi:10.1023/B:ABIM.0000046986.69900.64
25. Haynes W.M, editor. (2016) Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press (Francis Taylor Publishing Group). 97th edition.

26. Amoores, J.E. and Hautala, E. (1983) Odors as an aid to chemical safety: odor threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. *Appl. Toxicol.* 3 : 272-290
27. Hugo WB. (1978) Phenols: a review of their history and development as antimicrobial agents. *Microbios.* 23(92):83-85.
28. Worboys, M. (2013). Joseph Lister and the performance of antiseptic surgery. Notes and Records of the Royal Society of London, 67(3), 199-209. Dostupno na: [www.jstor.org/stable/43287684](http://www.jstor.org/stable/43287684)
29. Berger, H., Wyss, O. (1953). Studies on bacterial resistance to inhibition and killing by phenol. *J of Bacteriology*, 65(1), 103–110.
30. Hansch C, McKarns SC, Smith CJ, Doolittle DJ. (2000) Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chem Biol Interact.* 127(1):61-72. PubMed PMID: 10903419
31. D'Souza S., Warner, S. Phenol Nerve Block. (2019) In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525978/>.
32. Gardner, D. (2009) National Research Council (US) Committee on Acute Exposure Guideline Levels; National Research Council (US) Committee on Toxicol. Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals: Volume 7. Washington (DC): National Academies Press (US). 4, Phenol Acute Exposure Guideline Levels. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK214904/>
33. Monteiro-Riviere, A., Inman, O., Jackson, H., Dunn, B., Dimond, S. (2001) Efficacy of topical phenol decontamination strategies on severity of acute phenol chemical burns and dermal absorption: in vitro and in vivo studies in pig skin. *Toxicol Ind Health.* 17(4):95-104.
34. Moreland D., Novitzky W. (1987). Effects of Phenolic Acids, Coumarins, and Flavonoids on Isolated Chloroplasts and Mitochondria. *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry Chapter 23*, 247-261, *ACS Symposium Series*. doi:10.1021/bk-1987-0330.ch023 330
35. Weisburger J. Mutagenic, Carcinogenic, and Chemopreventive Effects of Phenols and Catechols. (1992) The Underlying Mechanisms. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II Chapter 3*, pp 35-47. *ACS Symposium Series*. doi:10.1021/bk-1992-0507.ch003
36. Ge T, Han J, Qi Y, Gu X, Ma L, Zhang C, Naeem S, Huang D. (2017) The toxic effects of chlorophenols and associated mechanisms in fish. *Aquat Toxicol.* 184:78-93. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.01.005.
37. Dewidar H., Nosier A., El-Shazly H. (2018) Photocatalytic degradation of phenol solution using Zinc Oxide/UV, *J of Chemical Health and Safety.* 25, 1. doi:10.1016/j.jchas.2017.06.001.
38. Perelo LW. (2010) Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater* 177:81–9.
39. Angelucci DM, Tomei MC. (2016) Ex-situ bioremediation of chlorophenol contaminated soil: Comparison of slurry and solid-phase bioreactors with the two-step polymer extraction–bioregeneration process. *J Chem Technol Biotechnol* 91:1577–84.
40. Pimmata, P., Reungsang, A., Plangklang, P. (2013) Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *Int Biodeter Biodegr* 85:196–204.
41. Salt, D.E., Smith R.D., Raskin, I. (1998) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biol.* 49:1, 643-668
42. Krämer, U. (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 61:517-34. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112156.
43. Bilal M., Iqbal H., Hu H., Wang W., Zhang X. (2017) Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. *J of Environmental Management.* 188, 137-143. doi:10.1016/j.jenvman.2016.12.015.
44. Pradhan N., Ingle A. (2006) Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. *Inter Biodet Biodegr* 60, 103-108. doi:10.1016/j.ibiod.2007.01.001.
45. Dictionary of Biol. (2004). Robert S. Hine, Elizabeth Martin, editors. Magpie Books (Oxford University Press).
46. Nešvera, J., Rucká, L., Pátek, M. (2015). Catabolism of phenol and its derivatives in bacteria: genes, their regulation, and use in the biodegradation of toxic pollutants. *Advances in App MicroBiol.* 93, 107–160. doi:10.1016/bs.aambs.2015.06.002
47. Babich H., Davis L. (1981) Phenol: a review of environmental and health risks. *Regul Toxicol Pharmacol* 1:90–109.
48. Duan, W., Meng, F., Cui, H., Lin, Y., Wang, G., Wu, J. (2018). Ecotoxicity of phenol and cresols to aquatic organisms : A review. *EcoToxicol Environmental Safety.* 157, 441–456. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.089
49. Shigeoka, T., Sato, Y., Takeda, Y., Yoshida, K. and Yamauchi, F. (1988), Acute toxicity of chlorophenols to green algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris*, and quantitative structure-activity relationships. *Environ Toxicol Chemistry.* 7: 847-854. doi:10.1002/etc.5620071007
50. Tisler, T, Zagorc-Koncan J. Relative sensitivity of some selected aquatic organisms to phenol. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1995 May;54(5):717-23. PubMed PMID: 7780215.

51. Ertürk, MD, Saçan, MT, Novic, M, Minovski, N. (2012) Quantitative structure-activity relationships (QSARs) using the novel marine algal toxicity data of phenols. *J Mol Graph Model.* 38:90-100. doi: 10.1016/j.jmgl.2012.06.002.
52. Trebst, A. (2014). Inhibition of Photosynthetic Electron Flow by Phenol and Diphenylether Herbicides in Control and Trypsin-Treated Chloroplasts. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 34(11), 986-991. Retrieved 5 Jan. 2020, from doi:10.1515/znc-1979-1121
53. Walter Oettmeier, Christa Kude, Hans-Joachim Soll, Phenolic herbicides and their methylethers: Binding characteristics and inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Volume 27, Issue 1, 1987, Pages 50-60, ISSN 0048-3575, doi:10.1016/0048-3575(87)90095-2.
54. Tigre, R. C., Pereira, E. C., da Silva, N. H., Vicente, C., Legaz, M. E. (2015). Potential phenolic bioherbicides from *Cladonia verticillaris* produce ultrastructural changes in *Lactuca sativa* seedlings. *South African J Botany*, 98, 16–25. doi:10.1016/j.sajb.2015.02.002
55. Painter R.B., Howard R. (1982) The HeLa DNA synthesis inhibition as a rapid screen for mutagenic carcinogens. *Mutat. Res.* 92, 427 – 437
56. Weisburger, J. H. (1992). Mutagenic, Carcinogenic, and Chemopreventive Effects of Phenols and Catechols. In *ACS Symposium Series: Vol. 507. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II* (pp. 3–35). doi:10.1021/bk-1992-0507.ch003
57. Ge, T., Han, J., Qi, Y., Gu, X., Ma, L., Zhang, C., Huang, D. (2017). The toxic effects of chlorophenols and associated mechanisms in fish. *Aquatic Toxicol*, 184, 78–93. doi:10.1016/j.aquatox.2017.01.005
58. Gupta, A., Thakur, I. S. (2017). Treatment of Organic Recalcitrant Contaminants in Wastewater. *Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery*, (March). doi:10.5772/66346
59. Villegas, L. G. C., Mashhadi, N., Chen, M., Mukherjee, D., Taylor, K. E., Biswas, N. (2016). A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater. *Curr Pollution Reports*, 2(3), 157–167. doi:10.1007/s40726-016-0035-3
60. Sridevi, V., Pradesh, A. (2009). A Review on Biodegradation of Phenol from Industrial effluents. *J of Industrial Pollution Control*, 25(1).
61. Pradeep, N. V., Anupama, S., Navya, K., Shalini, H. N., Idris, M., Hampannavar, U. S. (2015). Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review. *App Water Sci*, 5(2), 105–112. doi:10.1007/s13201-014-0176-8
62. Tausz J, Donath P. (1930) Über die Oxydation des Wasserstoffs und der Kohlenwasserstoffe Mittels Bakterien. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 190: 141–68. doi:10.1515/bchm2.1930.190.3-6.141
63. Raymond RL, Jamison VW, Hudson JO Jr. 1975. Final Report on Beneficial Stimulation of Bacterial Activity in Groundwater Containing Petro- leum Products. Washington (DC): American Petroleum Institute
64. Litchfield, C. (2005). Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime? *BioSci*, 55(3), 273. doi:10.1641/0006-3568(2005)055[0273:tyacbi]2.0.co;2
65. Dzionek, A., Wojcieszynska, D., Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic J of Biotech*, Vol. 23, pp. 28–36. doi:10.1016/j.ejbt.2016.07.003
66. Perelo LW. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater* 2010;177:81–9. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.12.090.
67. Angelucci DM, Tomei MC. Ex-situ bioremediation of chlorophenol contaminated soil: Comparison of slurry and solid-phase bioreactors with the two-step polymer extraction–bioregeneration process. *J Chem Technol Biotechnol* 2016;91:1577–84. doi:10.1002/jctb.4882
68. Rawe, J., V. Hodge, C. M. Acheson, C. Lutes, D. Liles. In situ and ex situ biodegradation technologies for remediation of contaminated sites [engineering issue]. EPA/625/R-06/015, 2006.
69. Cunningham, S. D., Ow, D. W. (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*, 110(3), 715–719. doi:10.1104/pp.110.3.715
70. Vasavi, A., Usha, R., Swamy, P. M. (2010). Phytoremediation- An overview review. *J of Industrial Pollution Control*, 26(1), 83–88.
71. Rao, M. A., Scelza, R., Scotti, R., Gianfreda, L. (2010). Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *J of Soil Sci and Plant Nutrition*, 10(3), 333–353. doi:10.4067/S0718-95162010000100008
72. Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. V., Lugtenberg, B. J. J. (2004). *Rhizoremediation : A Beneficial Plant-Microbe Interaction Bioremediation : A natural method.* 17(1), 6–15.
73. Wei, X., Lyu, S., Yu, Y., Wang, Z., Liu, H., Pan, D., Chen, J. (2017). Phylloremediation of air pollutants: Exploiting the potential of plant leaves and leaf-associated microbes. *Front Plant Sci*, 8(2), 1–23. doi:10.3389/fpls.2017.01318
74. Kramer U (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61:517–534
75. Bilal, M., Iqbal, H.M., Hu, H., Wang, W., Zhang, X. (2017) Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. *J Environ Manage.* 1;188:137-143. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.12.015.

76. Kurnik, K., Treder, K., Skorupa-Kłaput, M., Tretyn, A., Tyburski, J. (2015). Removal of Phenol from Synthetic and Industrial Wastewater by Potato Pulp Peroxidases. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(8). doi:10.1007/s11270-015-2517-0
77. Mukherjee, S. P., Choudhuri, M. A. (1983). Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in Vigna seedlings. *Physiologia Plantarum*, 58(2), 166–170. doi:10.1111/j.1399-3054.1983.tb04162.x
78. Mukherjee, S., Basak, B., Bhunia, B., Dey, A., Mondal, B. (2013). Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotech*, 12(1), 61–73. doi:10.1007/s11157-012-9302-y
79. Šalić, A., Strelec, I., Tišma, M. (2018). Potential Use of Apple Polyphenol Oxidase for Bioremediation of Phenolic Contaminants. *Kemija u Industriji*, 67(3–4), 109–116. doi:10.15255/kui.2017.036
80. Yadav, M., Rai, N., Yadav, H. S. (2017). The role of peroxidase in the enzymatic oxidation of phenolic compounds to quinones from *Luffa aegyptiaca* (Gourd) fruit juice. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 10(3), 154–161. doi:10.1080/17518253.2017.1336575
81. Bansal, N., Kanwar, S.S., 2013. Peroxidase(s) in environment protection. *Sci. World J.* doi:10.1155/2013/714639
82. Yang, J., Li, W., Bun Ng, T., Deng, X., Lin, J., Ye, X. (2017). Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Front MicroBiol*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00832
83. Nicell, J. (2001). Environmental applications of enzymes. *Interdisciplinary Environmental Review* 2001 3 (1): 14–41. 3. doi:10.1504/IER.2001.053866.
84. Hiltner, L. (1904) Uber neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderes Berucksichtigung der Grundugungen und Brauche. *Arb. Dtsch. Landwirtsch. Ges. Berlin* 98:59-78.
85. Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., and Berg, G. (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321: 235–257.
86. Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol* 163:459–480
87. Hawes, M. C., Brigham, L. A., Wen, F., Woo, H. H. Zhu, Z. Function of root border cells in plant health: Pioneers in the rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology* 36, 311-327 (1998).
88. Aminov, R. I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front MicroBiol*, 2(JULY), 1–19. doi:10.3389/fmicb.2011.00158
89. Berg G., Eberl L., Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ. Microbiol. Review.* 7 (11), 1673, 2005.
90. Wang, Y., Kou, S., Jiang, Q., Xu, B., Liu, X., Xiao, J., et al. (2014). Factors affecting transfer of degradative plasmids between bacteria in soils. *Appl. Soil Ecol.* 84, 254–261. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.07.009
91. Crowley E, Bird P, Fisher K. (2012) Evaluation of the VITEK 2 Gram-negative (GN) microbial identification test card: collaborative study. *J AOAC Int.* 95(3):778-785. doi:10.5740/jaoacint.cs2011\_17
92. Gkorezis, P., Daghio, M., Franzetti, A., Van Hamme, J. D., Sillen, W., Vangronsveld, J. (2016). The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Front MicroBiol*, 7, 1–27. doi:10.3389/fmicb.2016.01836
93. Mkandawire, M., Dudel, E. (2007). Are Lemna spp. effective phytoremediation agents. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 1(1), 56–71.
94. Agostini, E., Talano, M. A., González, P. S., Wevar Oller, A. L., Medina, M. I. (2011). Phytoremediation of phenolic compounds: Recent advances and perspectives. In : *Handbook Of Phytoremediation*. 1-50.
95. Ma, Y., Prasad, M. N. V., Rajkumar, M., and Freitas, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Adv.* 29, 248–258. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.12.001
96. O'Callaghan, M. (2016). Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *App MicroBiol and Biotech*, 100(13), 5729–5746. doi:10.1007/s00253-016-7590-9
97. Berg, G., Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS MicroBiol Ecology*, 68(1), 1–13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x
98. Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front Plant Sci*, 871, 1–17. doi:10.3389/fpls.2018.01473
99. Toyama, T., Sei K., Yu N., Kumada H., Inoue D., Hoang, H., Soda, S., Chang, Y., Kikuchi, S., Fujita, M. (2009). Enrichment of bacteria possessing catechol dioxygenase genes in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*: a mechanism of accelerated biodegradation of phenol. *Water research*, 43:3765–3776.
100. Neagu, L., Cirstea, D. M., Curutiu, C., Mitache, M. M., Lazăr, V., Chifiriuc, M. C. (2017). Microbial biofilms from the aquatic ecosystems and water quality. *Water Purification*, 621–642. doi:10.1016/b978-0-12-804300-4.00018-6

101. Kurzbaum, E., Kirzhner, F., Armon, R. (2016). Short communication: Performance comparison of plant root biofilm, gravel attached biofilm and planktonic microbial populations, in phenol removal within a constructed wetland wastewater treatment system. *Water SA*, 42(1), 166–170. doi:10.4314/wsa.v42i1.17
102. Yamaga F, Washio K, Morikawa M (2010) Sustainable bio- degradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aouki-kusa*. *Environ Sci Technol* 44:6470–6474
103. Pandey, G., Jain, R.K. (2002) Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 68(12):5789-95.
104. Jin, J., Wang, M., Lu, W., Zhang, L., Jiang, Q., Jin, Y., ... Xiao, M. (2019). Effect of plants and their root exudate on bacterial activities during rhizobacterium–plant remediation of phenol from water. *Environment International*, 127(March), 114–124. doi:10.1016/j.envint.2019.03.015
105. Toyama, T., Furukawa, T., Maeda, N., Inoue, D., Sei, K., Mori, K. (2011) Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[a]pyrene in the *Phragmites australis* rhizosphere by bacteria–root exudate interactions. *Water Res* 45, 1629–1638.
106. Brazil, G. M., Kenefick, L., Callanan, M., Haro, A., de Lorenzo, V., Dowling, D. N., O’Gara, F. (1995). Construction of a rhizosphere *Pseudomonad* with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of bph gene expression in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1946-1952
107. Kingsley, M. T., Fredrickson, J. K., Metting, F. B., Seidler, R. J. (1994). Environmental restoration using plant-microbe bioaugmentation. 287-292. In: Bioremediation of Chlorinated and Polyaromatic Hydrocarbon Compounds. R. E. Hinchee, A. Leeson, L. Semprini, and S. K. Ong, eds.
108. Ronchel, M. C., Ramos, J. L. (2001). Dual system to reinforce biological containment of recombinant bacteria designed for rhizoremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2649-2656
109. Hoang, H., Yu, N., Toyama, T., Inoue, D., Sei, K., Ike, M. (2010). Accelerated degradation of a variety of aromatic compounds by *Spirodela polyrrhiza*-bacterial associations and contribution of root exudates released from *S. polyrrhiza*. *J Environ Sci.* 22(4), 494–499. doi:10.1016/S1001-0742(09)60135-2
110. Gu, Q., Wu, Q., Zhang, J., Guo, W., Wu, H., Sun, M. (2016). Community analysis and recovery of phenol-degrading bacteria from drinking water biofilters. *Front Microbiol.* 7, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.00495
111. Bridier, A., Piard, J., Pandin, C., Labarthe, S., Dubois-brissonnet, F., Briandet, R. (2017). *Spatial Organization Plasticity as an Adaptive Driver of Surface Microbial Communities.* 8(July), 1–19. doi:10.3389/fmicb.2017.01364
112. Li, N., Jiang, J., Chen, D., Xu, Q., Li, H., Lu, J. (2015). A reusable immobilization matrix for the biodegradation of phenol at 5000 mg/L. *Sci Reports*, 5, 1–5. doi:10.1038/srep08628
113. Tibbles, B.J. and Baecker, A.A.W. 1989. Effects and fate of phenol in simulated landfill sites. *Microb. Ecol.* 17 (2) : 210-206
114. Munoz JA, Perez-Esteban B, Esteban M, de la Escalera S and Gomez MA, Martinez-Toledo MV and Gonzalez-Lopez J (2001) Growth of moderately halophilic bacteria isolated from sea water using phenol as the sole carbon source. *Folia Microbiol.* 46: 297-302
115. Liu, Z., Xie, W., Li, D., Peng, Y., Li, Z., Liu, S. (2016). Biodegradation of phenol by bacteria strain *Acinetobacter Calcoaceticus* PA isolated from phenolic wastewater. *International J of Environmental Research and Public Health*, 13(3). doi:10.3390/ijerph13030300
116. Masai, E., Katayama, Y., Fukuda, M. (2007). Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *BioSci, Biotech and Biochemistry*, Vol. 71, pp. 1–15. doi:10.1271/bbb.60437
117. Nešvera, J., Rucká, L., Pátek, M. (2015). Catabolism of Phenol and Its Derivatives in Bacteria: Genes, Their Regulation, and Use in the Biodegradation of Toxic Pollutants. *Advances in App MicroBiol*, 93, 107–160. doi:10.1016/bs.aambs.2015.06.002
118. Pérez-Pantoja, D., González, B., Pieper, D.H. (2010). Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid MicroBiol.* Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, 800–837.
119. Nordlund, I., Powlowski, J., Hagstrom, A., Shingler, V. (1993). Conservation of regulatory and structural genes for a multi-component phenol hydroxylase within phenol-catabolizing bacteria that utilize a meta-cleavage pathway. *J of General MicroBiol*, 139(11), 2695–2703. doi:10.1099/00221287-139-11-2695
120. Peng, A., Liu, J., Ling, W., Chen, Z., Gao, Y. (2015). Diversity and distribution of 16S rRNA and phenol monooxygenase genes in the rhizosphere and endophytic bacteria isolated from PAH-contaminated sites. *Nature Publishing Group.* 1–12. doi:10.1038/srep12173
121. Murray J., Lippard J. (2007) Substrate trafficking and dioxygen activation in bacterial multicomponent monooxygenases. *Acc Chem Res.* 40(7):466-74.
122. Mason, JR, Cammack, R. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu Rev Microbiol.* 1992;46:277-305. Review. PubMed PMID:1444257.
123. Sazinsky, MH, Dunten, PW, McCormick, MS, DiDonato A, Lippard, SJ. (2006) X-ray structure of a hydroxylase-regulatory protein complex from a hydrocarbon-oxidizing multicomponent monooxygenase, *Pseudomonas* sp. OX1 phenol hydroxylase. *Biochem.* 45(51):15392–15404. doi:10.1021/bi0618969

124. Tinberg, CE, Song, WJ, Izzo, V, Lippard, SJ. (2011). Multiple roles of component proteins in bacterial multicomponent monooxygenases: phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas* sp. OX1. *Biochemistry*. 2011 Mar 22;50(11):1788-98. doi: 10.1021/bi200028z.
125. Jiang Q., Zhou C., Wang Y., Si F., Zhou Y., Chen B., Zhao Y., Chen J., Xiao M. (2014) *Pseudomonas stutzeri* strain possessing a self-transmissible TOL-like plasmid degrades phenol and promotes maize growth in contaminated environments. *Appl Biochem Biotechnol*. 172(7):3461-75. doi: 10.1007/s12010-014-0785-6.
126. Takeo M., Prabu S., Kitamura C., Hirai M., Takahashi H., Kato D., Negoro S. (2006). Characterization of alkylphenol degradation gene cluster in *Pseudomonas putida* MT4 and evidence of oxidation of alkylphenols and alkylcatechols with medium-length alkyl chain. *J Biosci Bioeng*. 102, 352-361. doi:10.1263/jbb.102.352.
127. Tuan N., Lin Y-W., Huang , S. (2013) Catabolism of 4-alkylphenols by *Acinetobacter* sp. OP5: Genetic organization of the oph gene cluster and characterization of alkylcatechol 2, 3-dioxygenase, *Bioresource Technol*, 131, 420-428.
128. Garbisu, C., Garaiyurrebaso, O., Epelde, L., Grohmann, E., Alkorta, I. (2017). Plasmid-mediated bioaugmentation for the bioremediation of contaminated soils. *Front Microbiol*, 8, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2017.01966.
129. Jussila, M. M., Zhao, J., Suominen, L., and Lindström, K. (2007). TOL plasmid transfer during bacterial conjugation in vitro and rhizoremediation of oil compounds in vivo. *Environ. Pollut*. 146, 510–524. doi: 10.1016/j.envpol.2006.07.012
130. Franklin, H., Bagdasarian, M. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. 78(12), 7458–7462.
131. Benson, S., & Shapiro, J. (1978). TOL is a broad-host-range plasmid. *J bacterial*. 135(1), 278–280. <https://doi.org/10.1128/JB.135.1.278-280.1978>
132. Banik, R., Mayank, R., Prakash, S.. (2008) Microbial biosensor based on whole cell of *Pseudomonas* sp. for online measurement of p-Nitrophenol, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 131, 1, 295-300. doi:10.1016/j.snb.2007.11.022.
133. Riedel, K., Hensel, J., Rothe, S., Neumann, B., Scheller, F. (1993). Microbial sensors for determination of aromatics and their chloroderivatives. Part II: determination of chlorinated phenols using a *Rhodococcus*-containing biosensor. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 38, 556–559
134. Emelyanova, E.V., Reshetilov, A.N. (2002). *Rhodococcus erythropolis* as the receptor of cell-based sensor for 2,4-dinitrophenol detection: effect of ‘co-oxidation’. *Process Biochem*. 37, 683–692
135. Harde, G. S., Jackson, H. W. (1918) Sur l'acclimatation des Staphylococques aux antiseptiques, in vitro et in vivo. *Compt. rend. soc. biol*. 81, 635-637
136. Izaki, K., Takahashi, M., Sato, Y., Sasagawa, Y., Sato, K., Furusaka, C. (1981). Some properties of pentachlorophenol-resistant gram-negative bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(3), 765–767. doi:10.1080/00021369.1981.10864596
137. Guimarães A., Tibana, A., Nunes, N., dos Santos, K. (2000) Disinfectant activity in hospital isolates. Disinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in brazilian hospital bacterial isolates. *Brazilian J of MicroBiol*. 31:193-199
138. Mikłasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., & Wąsik, T. J. (2018). Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus Aureus* Clinical Strains. *Inter J environ res pub health*, 15(10), 2321. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102321>
139. Ajaz, M., Noor, N., Rasool, S. A., Khan, S. (2004). Phenol Resistant Bacteria From Soil: Genetical Studies. *Proteus*, 36(2), 415–424. doi:10.1128/AAC.01459-18
140. Banerjee, A., Ghoshal, A. K. (2010). Phenol degradation by *Bacillus cereus*: pathway and kinetic modeling. *Bioresour. Technol*. 101, 5501. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.018
141. Hasan, S. A., Jabeen, S. (2015). Degradation kinetics and pathway of phenol by *Pseudomonas* and *Bacillus* species. *Biotech BiotechEquipment*, 29(1), 45–53. doi:10.1080/13102818.2014.991638
142. Ereqat, S. I., Abdelkader, A. A., Nasereddin, A. F., Zaid, T. M., Letnik, I., Abdeen, Z. A., Amer, O. (2017). Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain *Bacillus thuringiensis* J20 from olive waste in Palestine. *J EnvironSciHealth, Part A*. 0(0), 1–7. doi:10.1080/10934529.2017.1368300
143. Djokic, L., Narancic, T. (2011). Isolation and characterization of four novel Gram-positive bacteria associated with the rhizosphere of two endemorelict plants capable of degrading a broad range of aromatic substrates. *Environ Biotech*. 1227–1238. doi:10.1007/s00253-011-3426-9
144. Pradhan, N., Ingle, A. (2007). Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 60, 103–108. doi: 10.1016/j.ibiod.2007.01.001
145. Gu, Q., Wu, Q., Zhang, J., Guo, W., Wu, H., Sun, M. (2016). Community analysis and recovery of phenol-degrading bacteria from drinking water biofilters. *Front Microbiol*. 7, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.00495
146. Young, L.Y. and Rivera, M.D. (1985). Methanogenic degradation of 4 phenolic compounds. *Wat. Res*. 19 (10) : 1325-1332



147. Colvin, R.J. and Rozich, A.R. (1986). Phenol growth kinetics of heterogenous populations in a two-stage continuous culture system. *Wat. Pollut. Cont. Fed.* 58 (4) : 326-332
148. Shimp, R.J. and Pfaender, F.K. (1987). Effect of adaptation to phenol on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (7) : 1496-1499
149. Wiggins, B.A. and Alexander, M. 1988. Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (11) : 2803-2807
150. Dewitt TJ, Sih A, Wilson DS. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol Evol.* 1998 Feb 1;13(2):77-81. PubMed PMID: 21238209.
151. Moreno-Andrade, I., Buitrón, G. (2004). Evolution of the microbial activity during the acclimation and deacclimation (starvation) of activated sludge to 4- chlorophenol. *4th IWA World Water Congress, Marrakech,* 19–24.
152. Wiggins, B. A., Jones, S. H., Alexander, M. (1987). Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *App and Environmental MicroBiol,* 53(4), 791–796.
153. Zaidi, B. R., Imam, S. H., Greene, R. V. (1996). Accelerated biodegradation of high and low concentrations of p- nitrophenol (PNP) by bacterial inoculation in industrial wastewater: The role of inoculum size on acclimation period. *Curr MicroBiol,* 33(5), 292–296. doi:10.1007/s002849900116
154. Wang, H., Zhang, S., Pratush, A., Ye, X., Xie, J., Wei, H., ... Hu, Z. (2018). Acclimation of culturable bacterial communities under the stresses of different organic compounds. *Front Microbiol.* 9, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2018.00225
155. Didanović, S., Sekulić, G. (2012). Biljke u procesu prečišćavanja otpadnih voda u Crnoj Gori. *Zaštita materijala,* 53(2), 137-142.
156. Marin, J., Caravelli, A., Zaritzky, N. (2015). Nitrification and Aerobic Denitrification in Anoxic-Aerobic Sequencing Batch Reactor. *Bioresource Tech.* 200. doi:10.1016/j.biortech.2015.10.024.
157. El-Bestawy, E., Sabir, J., Mansy, A. H., Zabermaawi, N. (2013). Isolation, identification and acclimatization of Atrazine-resistant soil bacteria. *Annals AgricultSci.* 58(2), 119–130. doi:10.1016/j.aosas.2013.07.005
158. Wang, H., Wang, B., Dong, W., Hu, X. (2016). Co-acclimation of bacterial communities under stresses of hydrocarbons with different structures. *SciReports.* 6, 1–12. doi:10.1038/srep34588
159. Mailin, M., Firdausi, R. (2006). High Performance Phenol Degrading Microorganisms Isolated from Wastewater and Oil-Contaminated Soil. *Malay J Microbiol.* 2(3), 32–36. doi:10.21161/mjm.220606
160. Janzen, N., Banzhaf, S., Scheytt, T., Bester, K. (2009). Vertical flow soil filter for the elimination of micro pollutants from storm and waste water. *Chemosphere.* 77(10), 1358–1365. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.024
161. Lemon, G. D., Posluszny, U. (2000). Comparative shoot development and evolution in the Lemnaceae. *Inter J Plan Sci.* 161(5), 733–748. doi: 10.1086/314298
162. Leng, R. A., Duckweed: A Tiny Aquatic Plant with Enormous Potential for Agriculture and Environment, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, Italy, 1999, www.fao.org/ag/AGAinfo/resources/documents/DW/Dw2.htm, on 12 March 2017
163. Escobar, C. M., Escobar, A. C. (2017). Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for bioregenerative life support systems. *International Conference on Environmental Systems,* 4(July), 1–9.
164. Fu, L., Huang, M., Han, B., Sun, X., Sree, K. S., Appenroth, K. J., Zhang, J. (2017). Flower induction, microscope-aided cross-pollination, and seed production in the duckweed *Lemna gibba* with discovery of a male-sterile clone. *Sci Reports,* 7(1), 1–13. doi:10.1038/s41598-017-03240-8
165. Forni, C., Braglia, R., Harren, F. J. M., Cristescu, S. M. (2012). Stress responses of duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dodecyl-sulphate (SDS). *Aqua Toxicol,* 110–111, 107–113. doi:10.1016/j.aquatox.2011.12.017
166. Stout, L.M., Dodova, E.N., Tyson, J.F., Nüsslein, K. (2010). Phytoprotective influence of bacteria on growth and cadmium accumulation in the aquatic plant *Lemna minor*. *Water Res.* 44, 4970–4979
167. Bianconi, Daniele Pietrini, Fabrizio Massacci, Angelo Iannelli, Maria. (2013). Uptake of Cadmium by *Lemna minor* , a (hyper?) accumulator plant involved in phytoremediation applications. E3S Web of Conferences. 1. 13002. 10.1051/e3sconf/20130113002.
168. Yan, Y., Candreva, J., Shi, H., Ernst, E., Martienssen, R., Schwender, J., Shanklin, J. (2013). Survey of the total fatty acid and triacylglycerol composition and content of 30 duckweed species and cloning of a  $\Delta 6$ -desaturase responsible for the production of  $\gamma$ -linolenic and stearidonic acids in *Lemna gibba*. *BMC Plant Biol,* 13(1). doi:10.1186/1471-2229-13-201
169. Chakrabarti, R., Clark, W. D., Sharma, J. G., Goswami, R. K., Shrivastav, A. K., Tocher, D. R. (2018). Mass production of *Lemna minor* and its amino acid and fatty acid profiles. *Frontiers Chem.* 6, 1–16. doi:10.3389/fchem.2018.00479
170. Ziegler, P., Sree, K. S., Appenroth, K. J. (2016). Duckweeds for water remediation and toxicity testing. *Toxicological and Environmental Chemistry,* 98(10), 1127–1154. doi:10.1080/02772248.2015.1094701

171. Toyama, T., N. Yu, H. Kumada, K. Sen, M. Ike, and M. Fujita. (2006). Accelerated Aromatic Compounds Degradation in Aquatic Environment by Use of Interaction Between *Spirodela polyrrhiza* and Bacteria in its Rhizosphere. *J Biosci Bioeng.* 101: 346-353
172. Ishizawa, H., Kuroda, M., Morikawa, M., Ike, M. (2017a). Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. *Biotech Biofuel*, 10(1). doi:10.1186/s13068-017-0746-8
173. Kristanti, R. A., Kanbe, M., Toyama, T., Tanaka, Y., Tang, Y., Wu, X., Mori, K. (2012). Accelerated biodegradation of nitrophenols in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*. *J Environ Scis*, 24(5), 800–807. doi:10.1016/S1001-0742(11)60839-5
174. Wang, K., Cai, J., Xie, S., Feng, J., Wang, T. (2015). Phytoremediation of phenol using *Polygonum orientale* and its antioxidative response. *Archives of Environmental Protection*, 41(3), 39–46. doi:10.1515/aep-2015-0024
175. Fu, L., Huang, M., Han, B., Sun, X., Sree, K. S., Appenroth, K. J., Zhang, J. (2017). Flower induction, microscope-aided cross-pollination, and seed production in the duckweed *Lemna gibba* with discovery of a male-sterile clone. *Sci Reports*, 7(1), 1–13. doi:10.1038/s41598-017-03240-8
176. Gilbert, S., Xu, J., Acosta, K., Poulev, A., Lebeis, S., Lam, E. (2018). Bacterial production of indole related compounds reveals their role in association between duckweeds and endophytes. *Front Chem.* 6, 265. doi:10.3389/fchem.2018.00265
177. Kittiwongwattana, C., Vuttipongchaikij, S. (2013). Effects of nutrient media on vegetative growth of *Lemna minor* and *Landoltia punctata* during in vitro and ex vitro cultivation. *Maejo Inter J Sci Tech.* 7. 60-69. doi:10.14456/mijst.2013.5.
178. Ziegler, P., Adelmann, K., Zimmer, S., Schmidt, C., Appenroth, K. J. (2015). Relative in vitro growth rates of duckweeds (*Lemnaceae*) - the most rapidly growing higher plants. *Plant Biol*, 17(s1), 33–41. doi:10.1111/plb.12184
179. Wilkins DA. (1978). The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytology* 80: 623–633
180. Landolt, E. (1986). The Family of Lemnaceae – A Monographic Study, vol. 1. Part of the Series: Biosystematic Investigations in the Family of Duckweeds (Lemnaceae), vol. 2 of 4. Veröffentlichungen Des Geobotanischen (pub.).
181. Ho, K. H. E. (2018). The effects of asexuality and selfing on genetic diversity, the efficacy of selection and species persistence. Retrieved from <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/89664>
182. Iatrou, E. I., Kora, E., Stasinakis, A. S. (2018). Investigation of biomass production, crude protein and starch content in laboratory wastewater treatment systems planted with *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 3330, 1–8. doi:10.1080/09593330.2018.1448002
183. Xu, J., W. Cui, J.J. Cheng, and A.-M. Stomp. (2011). Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosystems Engineering* 110, 67-72
184. Stout, L., and Nüsslein, K. (2010). Biotechnological potential of aquatic plant- microbe interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 339–345. doi: 10.1016/J. Copbio.2010.04.004
185. Burken, J.M, Xingmao. (2006). Phytoremediation of Volatile Organic In: Compounds. *Phytoremediation & Rhizoremediation (Book)*. doi:10.1007/978-1-4020-4999-4\_14.
186. Reis, A. R., Tabei, K., Sakakibara, Y. (2014). Oxidation mechanism and overall removal rates of endocrine disrupting chemicals by aquatic plants. *J of Hazardous Materials*, 265, 79–88. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.11.042
187. Adler, P. R., Arora, R., El Ghaouth, A., Glenn, D. M., Solar, J. M. (1994). Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases. *J Environ Quality*, 23(5), 1113–1117. doi:10.2134/jeq1994.00472425002300050038x
188. Pradeep, N. V, Hampannavar, U. S. (2012). Polymerization of phenol using free and immobilized horseradish peroxidase. *J of Environment and Earth Sci*, 2(1), 31–37.
189. Younis, A. M., Nafea, E. M. A., Mosleh, Y. Y. I., Hefnawy, M. S. (2016). Low cost biosorbent (*Lemna gibba* L.) for the removal of phenol from aqueous media. *J Mediterr Ecology.* 14, 55-62.
190. Ensley HE, Sharma HA, Barber JT, Polito MA (1996) Metabolism of chlorinated phenols by *Lemna gibba*, duckweed. In: Kruger EL, Anderson TA, Coats JR (Eds) *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, American Chemical Society, Washington DC, 238-253
191. Tadić V, Petrić M, Milošević S, Raspor M, Spasojević D, Subotić A. (2014) Effect of phenol on germination capacity and polyphenol oxidase, peroxidase and catalase activity of lettuce. *Archives of Biological Scis*, 66 (4), 1503-1514.
192. Lončar, N., Božić, N., Andjelković, I., Margetić, A., Dojnov, B., Vujčić, M., Roglic, G., Vujčić, Z. (2011). Removal of aqueous phenol and phenol derivatives by immobilized potato polyphenol oxidase. *J of the Serbian Chemical Society.* 76. 513-522. doi:10.2298/JSC100619046L.
193. Bais HP, Prithiviraj B, Jha AK, Ausubel FM, Vivanco (2005) Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interaction. *Sci* 301, 1377-1380.
194. Mayer AM. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry.* 67(21):2318-31.

195. Holzapfel, C., Shahrokh, P., Kafkewitz, D. (2010). Polyphenol oxidase activity in the roots of seedlings of Bromus (Poaceae) and other grass genera. *American J of Botany*, 97(7), 1195–1199. doi:10.3732/ajb.0900337
196. Martí MC, Camejo D, Fernández-García N, Rellán R, Álvarez S, Marques F, Sevilla Jiménez A (2009) Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. *J Hazard Mater* 171:879–885
197. Basiglioni, E., Pintore, M., Forni, C. (2018) Effects of treated industrial wastewater and temperatures on growth and enzymatic activities of duckweed (*Lemna minor* L.). *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 153, 54-59. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.01.053
198. Seekin B, Turkan I, Sekmen AH, Ozfidan C (2010) The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barley grass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). *Environ Exp Bot* 69:76–85
199. Ashraf M (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol Adv* 27:84–93
200. Gerhardt, K.E.; Huang, X.D.; Glick, B.R.; Greenberg, B.M. (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants; Potential and challenges. *Plant Sci*. 176, 20-30.
201. Rodríguez Dorantes, A, Angélica, L., Zúñiga, G. (2012). Phenoloxidases activity in root system and their importance in the phytoremediation of organic contaminants. *J Environ Chem EcoToxicol*. 4. 35-40. 10.5897/JECE11.012x.
202. Hiraga, S; Sasaki, K; Ito, H; Ohashi, Y; Matsui, H. A large family of class III peroxidases. *Plant Cell Physiol.*, (2001) 42, 462-468
203. Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C., 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep*. 24, 255–265
204. Tamás E, Důrčková K, Halušková L, Huttova J, Mistric I, Olle M (2007) Rhizosphere localized cationic peroxidase from barley roots is strongly activated by cadmium and correlated with root growth inhibition. *Chemosphere* 66, 1292-1300.
205. Das, K., and Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci*. 2:53. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053
206. Gao, J., Garrison, A. W., Hoehamer, C., Mazur, C. S., Wolfe, N. L. (2000). Uptake and phytotransformation of o,p'-DDT and p,p'-DDT by axenically cultivated aquatic plants. *J of Agricult Food Chem*. 48(12), 6121–6127. doi:10.1021/jf990956x
207. Pascal-Lorber, S; Rathahao, E; Cravedi, JP; Laurent, F. Metabolic fate of [14C]-2,4- dichlorophenol in macrophytes. *Chemosphere*, (2004) 56, 275-284
208. Ishizawa, H., Kuroda, M., Morikawa, M., Ike, M. (2017b). Differential oxidative and antioxidative response of duckweed *Lemna minor* toward plant growth promoting/inhibiting bacteria. *Plant Physiol Biochem*. 118, 667–673. doi:10.1016/j.plaphy.2017.08.006
209. Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologica Plantarum*, 15 (3), 473–497
210. Hoagland, R. Arnon, I. (1950) The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. *California Agricultural Experiment Station, Circular-347*.
211. Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* 2007; 189:8746-9. doi:10.1128/JB.01368-07
212. Mossel D. A. (1962). Attempt in classification of catalase-positive staphylococci and micrococci. *J Bacteriol*. 84(6), 1140–1147.
213. Turner, S.; Pryer, K.M.; Miao, V.P.W.; Palmer, J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol*. 46, 4, 327-338.
214. Kronvall G., Myhre, E.B., 1977. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 85, 249-254
215. O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol*. 54, 49-79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49
216. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26th ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8 [Print]; ISBN 1-56238-924-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.
217. Rahman, P., Pasirayi, G., Auger, V., Ali, Z. (2010). Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 55, 45–52. doi: 10.1042/BA20090277
218. Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci*. 151, 59e66
219. Mukherjee, S. P., Choudhuri, M. A. (1983) Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 58(2), 166–170. doi:10.1111/j.1399-3054.1983.tb04162.x

220. Heath, R., Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 125:189–198. doi: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.
221. Tanaka, Y., Tamaki, H., Matsuzawa, H., Nigaya, M., Mori, Kazuhiro, K., Yoichi, K. (2012). Microbial community analysis in the roots of aquatic plants and isolation of novel microbes including an organism of the candidate phylum Op10. *Microbes and environments / JSME.* 27. 149-57. doi:10.1264/jsme2.ME11288.
222. Szymańska, S., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., Hryniewicz, K. (2016). Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. – community structure and metabolic potential. *Microbiological Research.* 192. doi:10.1016/j.micres.2016.05.012.
223. Pacifico, D., Squartini, A., Crucitti, D., Barizza, E., Lo Schiavo, F., Muresu, R., Carimi, F., Zottini, M. (2019). The Role of the Endophytic Microbiome in the Grapevine Response to Environmental Triggers. *Front plant Sci.* 10, 1256. doi:10.3389/fpls.2019.01256
224. Radulović, O, M. Petrić, M, Raspor, M, Tadic, V, Urošević, I, Zečević, V. (2019a) Assessment of in vitro multiplication of *Lemna minor* in the presence of phenol: plant/bacteria system for potential bioremediation – Part I. *Pol. J. Environ. Stud.* doi: 10.15244/pjoes/84921
225. Radulović, O, Petrić, M, Raspor, M, Stanojević, O, Janakiev, T, Tadić, V, Stanković, S. (2019b) Culture-dependent analysis of 16S rRNA sequences associated with the rhizosphere of *Lemna minor* and assessment of bacterial phenol-resistance: plant/bacteria system for potential bioremediation – Part II. *Pol. J. Environ. Stud.* doi: 10.15244/pjoes/81687
226. Radulović, O., Stanković, S., Uzelac, B., Tadić, V., Trifunović-Momčilov, M., Lozo, J., Marković, M. (2020) Phenol removal capacity of the common duckweed (*Lemna minor* L.) and six phenol-resistant bacterial strains from its rhizosphere: in vitro evaluation at high phenol concentrations. *Plants.* 9(5):599. doi:10.3390/plants9050599
227. Sachdev, D., Nema, P., Dhakephalkar, P., Zinjarde, S., Chopade, B. (2010). Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of Acinetobacter community from the rhizosphere of wheat. *Microbiol. Res.* 165(8), 627–638. doi:10.1016/j.micres.2009.12.002
228. Ogata, Y., Toyama, T., Yu, N., Wang, X., Sei, K., Ike, M. (2013). Occurrence of 4- tert -butylphenol (4- t -BP) biodegradation in an aquatic sample caused by the presence of *Spirodela polyrrhiza* and isolation of a 4- t -BP-utilizing bacterium. *Biodegradation.* 191–202. doi:10.1007/s10532-012-9570-9
229. Suzuki, W., Sugawara, M., Miwa, K., Morikawa, M. (2014). Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). *J of BioSci and Bioengineering,* 118(1), 41–44. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.12.007
230. Reardon, F., Mosteller, C., Rogers, J. (2000). Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 385–400. doi: 10.1002/1097-0290(20000820)69:4<385::AID-BIT5>3.0.CO;2-Q
231. Mahadevaswamy, M., Mishra, I.M., Prasad, B., Mall, I.D. (2004). Kinetics and biodegradation of phenol. In: Ujang, Z. and Henze, M. (Eds.). *Environmental Biotech: Advancement in Water and Wastewater application in the tropics. Water Environment Management. Ser.* 85-92.
232. Chung, T.P., Wu, P.C., Juang, R. (2005). Use of microporous hollow fibres for improved biodegradation of high-strength phenol solutions. *J Membrane Sci.* 258, 55-63. doi:10.1016/j.memsci.2005.02.026.
233. Annadurai, G., Ling, L.Y., Lee, Y-F. (2007) Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *J Hazard Mater.* 151(1):171-8. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.05.061.
234. Radic, S., Stipanicev, D., Cvjetko, P., Srac, S., Pevalak-Kozlina, B., Pavlica, M. (2011). Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 182–187
235. Böcük, H., Yakar, A., Türker, O. C. (2013). Assessment of *Lemna gibba* L. (duckweed) as a potential ecological indicator for contaminated aquatic ecosystem by boron mine effluent. *Ecological Indicators,* 29, 538–548. doi:10.1016/j.ecolind.2013.01.029
236. Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants,* 4(1), 112–166. doi:10.3390/plants4010112
237. Bramham, L., Pyke, K. (2017). Changing plastid dynamics within early root and shoot apical meristem-derived tissue of *A. thaliana*. *BioSci Horizons,* 10, 1–10. doi:10.1093/biohorizons/hzx001
238. Sree, K. S., Appenroth, K. (2014). Increase of starch accumulation in the duckweed *Lemna minor* under abiotic stress. *Albanian J of Agriculture Sci,* (Special Edition), 11–14.
239. Sree, K. S., Adelman, K., Garcia, C., Lam, E., Appenroth, K. J. (2015). Natural variance in salt tolerance and induction of starch accumulation in duckweeds. *Planta,* 241(6), 1395–1404. doi:10.1007/s00425-015-2264-x
240. Obermeier, M., Schröder, C. A., Helmreich, B., Schröder, P. (2015). The enzymatic and antioxidative stress response of *Lemna minor* to copper and a chloroacetamide herbicide. *Environmental Sci Pollution Res.,* 22(23), 18495–18507. doi:10.1007/s11356-015-5139-6
241. Figlioli, F, Sorrentino, M, Memoli, V, Maisto C., Giordano G., Capozzi, S., Spagnuolo, V. (2018). Overall plant responses to Cd and Pb metal stress in maize: Growth pattern, ultrastructure, and photosynthetic activity. *Environ Sci Pollution Res.* doi:10.1007/s11356-018-3743-y.

242. O'Rear, J., Alberti, L., Harshey, R. M. (1992). Mutations that impair swarming motility in *Serratia marcescens* 274 include but are not limited to those affecting chemotaxis or flagellar function. *J of Bacteriology*, 174(19), 6125–6137. doi:10.1128/jb.174.19.6125-6137.1992
243. Nowicki, G., Barylski, J., Kujawa, N., Goździcka-Józefiak, A. (2014). Complete genome sequence of *Lelliottia podophage* phD2B. *Genome Announcements*, 2(6), 4–5. doi:10.1128/genomeA.01046-14
244. Dantur, K. I., Chalfoun, N. R., Claps, M. P., Tórtora, M. L., Silva, C., Jure, Á., Welin, B. (2018). The endophytic strain *Klebsiella michiganensis* Kd70 lacks pathogenic island-like regions in its genome and is incapable of infecting the urinary tract in mice. *Front MicroBiol.* 9, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2018.01548
245. Huang, M., Lin, L., Wu, Y. Xin, Honhing, H., He, P. Fei, Li, G. Zhi, He, Y. Qiu. (2016). Pathogenicity of *Klebsiella pneumonia* (KpC4) infecting maize and mice. *J of Integrative Agriculture*, 15(7), 1510–1520. doi:10.1016/S2095-3119(16)61334-5
246. Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., van der Lelie, D., Barac, T. (2004). Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 109–118. doi: 10.1016/j.femsec.2003.12.009
247. O'Brien, A. M., Laurich, J., Lash, E., Frederickson, M. E. (2018). Mutualism outcome across plant populations, microbes, and environments in the duckweed *Lemna minor*. *BioRxiv*, 448951. doi:10.1101/448951
248. Fatima, K., Afzal, M., Imran, A., and Khan, Q. M. (2015). Bacterial rhizosphere and endosphere populations associated with grasses and trees to be used for phytoremediation of crude oil contaminated soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 314–320. doi: 10.1007/s00128-015-1489-5
249. Bertani I, Kojic M, Venturi V. Regulation of the p-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (pobA) in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *MicroBiol.* 2001 Jun;147(Pt 6):1611-20. PubMed PMID: 11390692.
250. Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., ... Martins, N. (2019). The Therapeutic Potential of Apigenin. *International J of molecular Scis*, 20(6), 1305. doi:10.3390/ijms20061305
251. Ray, S., Mishra, S., Bisen, K., Singh, S., Sarma, B. K., Singh, H. B. (2018). Modulation in phenolic root exudate profile of *Abelmoschus esculentus* expressing activation of defense pathway. *Microbiological Research*, 207, 100–107. doi:10.1016/J.MICRES.2017.11.011
252. Sudharshana, T. N., Venkatesh, H. N., Nayana, B., Manjunath, K., Mohana, D. C. (2019). Anti-microbial and anti-mycotoxigenic activities of endophytic *Alternaria alternata* isolated from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: molecular characterisation and bioactive compound isolation. *Mycology*, 10(1), 40–48. doi:10.1080/21501203.2018.1541933
253. Ibáñez, S. G., Alderete, L. G. S., Medina, M. I., Agostini, E. (2012). Phytoremediation of phenol using *Vicia sativa* L. plants and its antioxidative response. *Environmental Sci and Pollution Research*, 19(5), 1555–1562. doi:10.1007/s11356-011-0664-4
254. Kim, S., Kim, H., Park, A., Park, J. H., Lee, Y., Kim, Y. J., Choi, E. M. (2015). The antioxidant response of *Lemna paucicostata* upon phenol exposure. *Toxicol and Environmental Health Scis*, 7(1), 73–81. doi:10.1007/s13530-015-0223-3
255. Varga, M., Horvatić, J., Čelić, A. (2013). Short term exposure of *Lemna minor* and *Lemna gibba* to mercury, cadmium and chromium. *Central European J of Biol*, 8(11), 1083–1093. doi:10.2478/s11535-013-0238-1
256. Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm.* 2001;61:241-66. Review. PubMed PMID: 11153268.
257. Smirnoff N, Wheeler GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000;35(4):291-314. Review. PubMed PMID: 11005203.
258. Helepciuc, F. E., Mitoi, M. E., Manole-Păunescu, A., Aldea, F., Brezeanu, A., Cornea, C. P. (2014). Induction of plant antioxidant system by interaction with beneficial and/or pathogenic microorganisms. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(3), 9366–9375
259. Ren, X. M., Guo, S. J., Tian, W., Chen, Y., Han, H., Chen, E., Chen, Z. J. (2019). Effects of plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculation on the growth, antioxidant activity, cu uptake, and bacterial community structure of rape (*Brassica napus* L.) grown in cu-contaminated agricultural soil. *Front MicroBiol*, 10(JUN), 1–12. doi:10.3389/fmicb.2019.01455
260. Sullivan, M. L. (2015). Beyond brown: Polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Front Plant Sci*, 5(JAN), 1–7. doi:10.3389/fpls.2014.00783
261. Tadić, V. (2015). *Uklanjanje fenola iz otpadnih voda sortama zelene salate (Lactuca sativa L.)*. Univerzitet u Beogradu. Doktorska teza.
262. Tadić, Vojin Petrić, Marija Uzelac, Branka Milosevic, Snezana Vujčić, Zoran Stevanović, Jasmina Tadić, Jovan. (2018). Phenol removal from solution using different varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) – Part 1. *Scientia Horticulturae*. 231. 210-218. 10.1016/j.scienta.2017.12.025.
263. Tadić, V., Tadić, J., Milosevic, S., Cingel, A., Prodanović, O., Cosic, T., Vujčić, Z. (2018). Phenol induced physiological stress in hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.)— Part 2. *Scientia Horticulturae*. 232. 71-83. 10.1016/j.scienta.2017.12.024.
264. Santos, A. de A., Silveira, J. A. G. da, Bonifacio, A., Rodrigues, A. C., Figueiredo, M. do V. B. (2018). Antioxidant response of cowpea co-inoculated with plant growth-promoting bacteria under salt stress. *Brazilian J MicroBiol*, 49(3), 513–521. doi:10.1016/j.bjm.2017.12.003

Prilog 1. Rezultati biohemijske analize odabranih bakterijskih sojeva automatizovanim Vitek 2 sistemom

Rezultati 16S rRNK sekvenciranja i bioinformatičke analize:	<i>Klebsiella oxytoca</i> 14	<i>Serratia nematodiphila</i> 51	<i>Serratia sp.</i> 27	<i>Hafnia alvei</i> 37	<i>Hafnia paralvei</i> 43
Vitek 2 rezultati – identifikacija taksona i procena čistote kulture:	<i>Klebsiella oxytoca</i> (94%)	<i>Serratia marcescens</i> (99%)	<i>Serratia marcescens</i> (99%)	<i>Hafnia alvei</i> (99%)	<i>Hafnia alvei</i> (99%)
Reakcija:					
Ala-Phe-Pro-arilamidaza	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	+	-
Beta-glukozidaza	+	+	+	-	-
L-Pro-arilamidaza	+	+	+	-	+
Saharoza	+	+	+	-	-
L-laktat alkalinizacija	+	+	+	+	+
Glicin arilamidaza	(+)	+	+	-	-
O129 rezistencija	+	+	+	-	+
Adonitol	+	+	+	+	-
Beta-N-acetil glukozaminidaza	-	+	+	+	+
D-maltoza	+	-	+	-	+
Lipaza	-	-	-	-	-
D-tagatoza	+	-	-	-	-
Alfa-glukozidaza	-	-	-	+	-
Ornitin dekarboksilaza	-	+	+	-	+
Glu-Gly-Arg aminidaza	-	+	+	-	-
L-pirolidonil arilamidaza	+	+	+	-	-
Glutamil arilamidaza pNA	-	-	-	+	-
D-manitol	+	+	+	-	+
Palatinoza	+	-	-	+	-
D-trehaloza	+	+	+	+	+
Alkalinizacija sukcinata	+	+	-	+	+
Lys dekarboksilaza	+	+	+	-	+
L-malat asimilacija	(-)	-	-	-	-
L-arabitol	-	+	+	+	-
D-glukoza	+	+	+	+	+
D-manoza	+	+	+	+	+
Tyr arilamidaza	+	+	+	-	+
Citrat	+	+	+	-	-
Beta-N-acetil galaktozaminidaza	-	-	+	-	-
L-histidin asimilacija	-	-	-	+	-
ELLMAN	-	-	-	-	+
D-celobioza	+	-	-	+	-
Gamma-glutamil transferaza	+	+	-	-	+
Beta-ksilozidaza	+	-	-	-	-
Ureaza	+	-	-	+	-
Malonat	+	-	-	-	+
Alfa-galaktozidaza	+	-	-	-	-

<b>Kumarat</b>	-	+	+	-	-
<b>L-laktat asimilacija</b>	+	-	-	-	-
<b>Beta-galaktozidaza</b>	+	+	+	-	+
<b>Fermentacija glukoze</b>	+	+	+	-	+
<b>Beta-Ala arilamidaza</b>	-	+	-	+	-
<b>D-Sorbitol</b>	+	+	+	-	-
<b>5-ketoglukonat</b>	+	-	-	+	-
<b>Fosfataza</b>	+	+	+	-	+
<b>Beta-glukuronidaza</b>	-	-	-	+	-

Procenti u zagradi označavaju stepen čistoće kulture koju je automatski analizirao i odredio Vitek 2 sistem. Rezultati biohemijske analize pomoću Vitek 2 se poklapaju sa rezultatima bioinformatičke analize sekvencija.

## 9. Biografija

Olga S. Radulović rođena je 1986. godine u Beogradu.

Osnovnu i srednju školu pohađala je u Beogradu.

2005. godine upisala je Biološki fakultet u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija.

Diplomirala je 2012. godine i odbranila master rad iz oblasti imunobiologije 2013. godine.

Zimski semester 2013/2014. godine provela je na studijskom boravku u Nemačkoj kao stipendista Nemačkog društva za naučna istraživanja (Deutsche Forschungsgemeinschaft) i radila je pri Institutu za kliničku i molekularnu imunologiju Univerziteta Otto-von-Guericke u Magdeburgu.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2014. godine, modul Molekularna biologija prokariota.

Učestvovala je na projektima TR37001 „Uticaj rudarskog otpada iz RTB-a Bor na zagađenje vodotokova sa predlogom mera i postupaka za smanjenje štetnog dejstva na životnu sredinu“ i OI173015 “Biotehnologija *in vitro* - gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste”.

Nosi zvanje istraživač saradnik od 2018. godine.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Олга С. Радуловић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ М3013/2014 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

## Систем за биоремедијацију вода загађених фенолом употребом сочивице (*Letna minor* L.) и бактерија њене ризосфере

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Олга Радуловић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ М3013/2014 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_ Молекуларна биологија прокариота \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Систем за биоремедијацију вода загађених фенолом употребом сочивице (*Lemna minor* L.) и бактерија њене ризосфере

Ментори \_\_\_\_\_ проф. др Славиша Станковић и др Марија Марковић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

### Систем за биоремедијацију вода загађених фенолом употребом сочивице (*Letna minor* L.) и бактерија њене ризосфере

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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