



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

САНДРА М. ГРУЛИЋ

**КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БИОФИЛМОВА И
ПРОЦЕНА ЊИХОВЕ ЕФИКАСНОСТИ У
УКЛАЊАЊУ ПОЛУТАНАТА У БИОЛОШКОМ
ТРЕТМАНУ ОТПАДНИХ ВОДА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Крагујевац, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE
INSTITUTE OF BIOLOGY AND ECOLOGY

SANDRA M. GRUJIĆ

**CHARACTERIZATION OF BIOFILMS AND
EVALUATION OF THEIR EFFICIENCY
IN REMOVAL OF POLUTANTS IN BIOLOGICAL
WASTEWATER TREATMENT**

DOCTORAL DISSERTATION

Крагујевац, 2021.

Аутор
Име и презиме: Сандра Грујић
Датум и место рођења: 24.02.1989. године, Крагујевац, Србија
Садашње запослење: истраживач-сарадник, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
I Докторска дисертација
Наслов: Карактеризација биофилмова и процена њихове ефикасности у уклањању полутаната у биолошком третману отпадних вода
Број страница: 176
Број слика: 29
Број табела: 28
Број графика: 18
Број библиографских података: 365
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Научна област (УКД): Екологија; Заштита животне средине; Микробиологија; Примењена микробиологија 579.66:502/504(497.11)(043.3); 628.315.23(497.11)(043.3)
Ментор: др Александар Остојић , ванредовни професор, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 13.09.2017. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: Веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу IV-01-1124/11 од 14.12.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: Веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу IV-01-939/11 од 11.10.2017. године
<ol style="list-style-type: none"> 1. др Александар Остојић, ванредовни професор, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине – предложени ментор; 2. др Ивана Теодоровић, редовни професор, Универзитет у Новом Саду Природно-математички факултет, ужа научна област: Заштита животне средине; 3. др Ивана Радојевић, научни сарадник, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, научна област: Биологија – председник комисије.
<p>Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. др Ивана Теодоровић, редовни професор, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, ужа научна област: Заштита животне средине; 2. др Ивана Радојевић, доцент, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, ужа научна област: Микробиологија (председник комисије); 3. др Ђурђа Керкез, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, ужа научна област: Заштита животне средине.
Датум одбране дисертације:

МЕНТОР

др Александар Остојић, ванредни професор
Универзитет у Крагујевцу
Природно-математички факултет
Ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине

КОМИСИЈА

др Ивана Теодоровић, редовни професор
Универзитет у Новом Саду
Природно-математички факултет
Ужа научна област: Заштита животне средине

др Ђурђа Керкез, ванредни професор
Универзитет у Новом Саду,
Природно-математички факултет
Ужа научна област: Заштита животне средине

др Ивана Радојевић, доцент
Универзитет у Крагујевцу
Природно-математички факултет
Ужа научна област: Микробиологија
Председник Комисије

ЗАХВАЛНИЦА

*Приложена докторска дисертација је урађена на Институту за биологију и екологију
Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.*

Овом приликом желим да се захвалим свима који су допринели да се дисертација изradi.

Сандра Грујић

ИЗВОД

У овом рукопису испитана је и утврђена отпорност идентификованих микроорганизама који су изоловани из два различита типа отпадних вода. Тестирана је њихова способност да формирају појединачне и мешовите биофилмове, као и њихова отпорност и биосорпциона способност према изабраним полутантима. Изабрани полутанти су раствори тешких метала: Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} и Ni^{2+} , и пет основних боја из аутомобилске индустрије. Отпорност, а за неке микроорганизме и биосорпциона ефикасност, је тестирана и у планктонској форми. Извршена је селекција микроорганизама према способности да успешно формирају биофилмове и њиховој отпорности и биосорпцији према изабраним полутантима. Додатна селекција је извршена у корист најотпорнијих биофилмова и тражена је идеална комбинација микроорганизама који у оквиру биофилма успостављају синергистичке односе и формирају мешовити биофилм са великом отпорношћу и способношћу биосорпције ка изабраним полутантима. Примењена методологија за селекцију најуспешнијих мешовитих биофилмова у уклањању тешких метала је тестирана и на лабораторијским сојевима из колекције са Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и добијени резултати су упоређени. Исти принцип у тестирању је примењен и на изолатима из отпадних вода аутомобилске индустрије за уклањање комерцијалних аутоиндустријских боја.

Највећи број изолованих и идентификованих микроорганизама из постројења Система за пречишћавање отпадних вода „Цветовевац“ су показали способност формирања биофилма. Микроорганизми са најбољом продукцијом биофилма (*Enterobacter cloacae* PMFKG-CV3, *Serratia odorifera* PMFKG-CV7, *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-CV10 и *Klebsiella oxytoca* PMFKG-CV4) су показали и највећу отпорност на тестиране метале и они су даље тестирани и на формирање мешовитих биофилмова. Мешовити биофилм кога чине *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* показао је највећу отпорност у присуству свих тестираних метала. Бољу способност уклањања тешких метала из раствора показали су мешовити биофилмови у односу на индивидуалне. Из раствора је од метала најбоље уклањан бакар. Кадмијум, олово и живу најбоље уклања биофилм *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera* (уклоњено 99.03%, 99.14% и 99.03%). За уклањање никла су најбољи резултати забележени за индивидуални биофилм *K. oxytoca*. Биофилм *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* је показао најбоље резултате за уклањање бакра (99.19%), док је за уклањање цинка, најбоље резултате показао биофилм *E. cloacae* (98.06%).

У планктонској форми највећу отпорност према тешким металима показала су два соја *Escherichia coli* PMFKG-CV1 и CV2. Олово најмање утиче на микроорганизме у планктонској форми, док бакар и жива највише утичу, са изузетком изолата *Candida utilis* PMFKG-CV11.

На сличан начин тестирани су лабораторијски изолати *E. coli* LM1, *Rhodotorula mucilaginosa* и *Saccharomyces bulardii* из колекције Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и резултати су упоређени. Тестирана је отпорност биофилма и планктонских ћелија према тешким металима. *S. bulardii* није имао способност да формира биофилм, а у планктонској форми је показао отпорност једино у присуству Pb^{2+} и Zn^{2+} , па је искључен из истраживања. Планктонске ћелије *R. mucilaginosa* су најотпорније у присуству Cu^{2+} , Cd^{2+} и Zn^{2+} , док је ова врста значајно отпорна у форми биофилма у присуству свих тестираних метала. *R. mucilaginosa* показује и способност формирања мешовитог биофилма са *E. coli* LM1 и тај мешовити биофилм је отпорнији на утицај тешких метала од индивидуалних. Резултати су потврђени флуоресцентом микроскопијом. Ови индивидуални биофилмови, као и мешани биофилм, показују изузетно велики биосорпциони потенцијал. Количина апсорбованих метала код индивидуалних биофилмова је за нијансу мања у односу на мешовити. Направљен је и мешовити биофилм од изолата из отпадне воде са најбољим карактеристикама *E. cloacae* и *R. mucilaginosa* који није испољио очекивано већу отпорност ка тестираним металима.

Исте методе примењене су код тестирања за уклањање комерцијалних аутоиндустријских боја. Тестирани микроорганизми за ову сврху су изолати отпадних вода из постројења за пречишћавање у Компанији FCA Србија d.o.o. Крагујевац. Већи број идентификованих изолата успешно формира биофилмове. Микроорганизмима са најбољом продукцијом биофилма (*Escherichia coli* PMFKG-F1, PMFKG-F2, *Proteus vulgaris* PMFKG-F3, *P. mirabilis* PMFKG-F4, *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-F6, PMFKG-F7, *Rhodotorula mucilaginosa* PMFKG-F8, *Candida utilis* PMFKG-F9, *Cladosporium cladosporioides* PMFKG-F-11, *Penicillium variotii* PMFKG-F12, *P. chrisogenum* PMFKG-F13 и *P. expansum* PMFKG-F14) је одређен степен

отпорности према аутобојама. Сви тестирани биофилмови су показали знатно већу отпорност у присуству свих тестираних супстанци у односу на планктонске ћелије. Резултати су потврђени флуоресцентом микроскопијом. Сви тестирани биофилмови показали су слабе ензимске активности чији су резултати добијени испитивањем синтезе деградационих ензима, кроз спектрофотометријско одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе. Оба соја *E. coli* показују најбољу алкално фосфатазну активност у присуству A-F107137-MF, па се може претпоставити да би могле да учествују у разлагању масноћа у отпадним водама. *R. mucilaginosa* показује највећу алкално фосфатазну активност у присуству A-F107119-CN, као и *C. cladosporioides*. *P. expansum* има највећу алкално фосфатазну активност (β -glicerofosfat) у присуству A-F107107-FM. Добре протеазне активности забележене су за *C. utilis* и оба соја *E. coli*. У присуству A-F107117-CP једино је мешовити биофилм показао кисело инвертазну активност. Остале ензимске активности су биле слабе или их није ни било.

Истраживање је утврдило да различите врсте аутохтоних микроорганизама изолованих из отпадних вода у форми појединачног и/или мешовитих биофилмова имају значајно већи потенцијал од планктонског облика исте врсте у отклањању различитих органских или неорганских полутаната. Из тог разлога могу да послуже као адекватни биосорбенти за пречишћавање отпадних вода различитог порекла. Показано је да коришћена методологија има потенцијал да се примени на различитим отпадним водама, али и да одређени изолати из природе, који нису аутохтоно са места загађења тестираних супстанци, такође могу ефикасно послужити у исте сврхе. Све наведено указује на потенцијал за даљу примену у биоремедијацији отпадних вода.

Кључне речи: биофилм, тешки метали, биолошко пречишћавање отпадних вода, бактерије, квасци

SUMMARY

In this manuscript, the resistance of identified microorganisms isolated from two different types of wastewater was examined and determined. Their ability to form single and mixed biofilms, as well as their resistance and biosorption ability to selected pollutants was tested. The selected pollutants were solutions of heavy metals: Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} and Ni^{2+} , and five basic paints from the automotive industry. Resistance, and for some microorganisms, biosorption efficiency, was also tested in planktonic form. The selection of microorganisms according to the ability to successfully form biofilms and their resistance and biosorption according to selected pollutants was performed. Additional selection was performed in favor of the most resistant biofilms and the ideal combination of microorganisms was sought, which within the biofilm establish synergistic relationships and form a mixed biofilm with high resistance and biosorption ability to selected pollutants. The applied methodology for the selection of the most successful mixed biofilms in the removal of heavy metals was tested on laboratory strains from the collection from the Faculty of Sciences, University of Kragujevac, and the obtained results were compared. The same principle in testing was applied to automotive industry wastewater isolates to remove commercial automotive paints.

The largest number of isolated and identified microorganisms from the plant of the Wastewater Treatment System "Cvetojevac" showed the ability to form a biofilm. The microorganisms with the best biofilm production (*Enterobacter cloacae* PMFKG-CV3, *Serratia odorifera* PMFKG-CV7, *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-CV10 and *Klebsiella oxytoca* PMFKG-CV4) also showed the highest resistance to the tested metals and were further formed. Mixed biofilm made up of *K. oxytoca* / *S. odorifera* / *S. cerevisiae* showed the highest resistance in the presence of all tested metals. Mixed biofilms showed better ability to remove heavy metals from the solution compared to individual ones. Copper is best removed from the metal solution. Cadmium, lead and mercury were best removed by the biofilm *E. cloacae* / *K. oxytoca* / *S. odorifera* (removed 99.03%, 99.14% and 99.03%). For nickel removal, the best results were recorded for the individual biofilm of *K. oxytoca*. Biofilm *K. oxytoca* / *S. odorifera* / *S. cerevisiae* showed the best results for copper removal (99.19%), while for zinc removal, *E. cloacae* biofilm showed the best results (98.06%).

In the planktonic form, the highest resistance to the heavy metals was shown by two strains of *Escherichia coli* PMFKG-CV1 and CV2. Lead has the least effect on microorganisms in planktonic form, while copper and mercury have the greatest effect, with the exception of the *Candida utilis* PMFKG-CV11 isolate.

Laboratory isolates of *E. coli* LM1, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces bulardii* from the collection of the Faculty of Science, University of Kragujevac were similarly tested and the results were compared. The resistance of biofilm and planktonic cells to heavy metals was tested. *S. bulardii* did not have the ability to form a biofilm, and in the planktonic form it showed resistance only in the presence of Pb^{2+} and Zn^{2+} , so it was excluded from the research. Planktonic cells of *R. mucilaginosa* were most resistant in the presence of Cu^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} , while this species is significantly resistant in the form of biofilm in the presence of all tested metals. *R. mucilaginosa* also showed the ability to form a mixed biofilm with *E. coli* LM1 and this mixed biofilm was more resistant to the influence of heavy metals than individual ones. The results were confirmed by fluorescence microscopy. These individual biofilms, as well as the mixed biofilm, showed extremely high biosorption potential. The amount of absorbed metals in individual biofilms was slightly lower compared to mixed. The mixed biofilm of wastewater isolates with the best characteristics of *E. cloacae* and *R. mucilaginosa* was also made, which did not show the expected higher resistance to the tested metals.

The same methods were applied in testing to remove commercial automotive paints. The microorganisms tested for this purpose were wastewater isolates from the treatment plant in the Company FCA Srbija d.o.o. Kragujevac. A large number of identified isolates successfully formed biofilms. Microorganisms with the best biofilm production (*Escherichia coli* PMFKG-F1, PMFKG-F2, *Proteus vulgaris* PMFKG-F3, *P. mirabilis* PMFKG-F4, *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-F6, PMFKG-F7, *Rhodotorula mucilaginosa* PMFKG-F8, *Cladosporium cladosporioides* PMFKG-F-11, *Penicillium variotii* PMFKG-F12, *P. chrisogenum* PMFKG-F13 and *P. expansum* PMFKG-F14) has a certain degree of resistance to car paints. All tested biofilms showed significantly higher resistance in the presence of all tested substances compared to planktonic cells. The results were confirmed by fluorescence microscopy. All tested biofilms showed weak enzymatic activities, the results of which were obtained by examining the synthesis of degradation enzymes, through spectrophotometric determination of

proteinase concentration, alkaline phosphatase and lipase activity. Both strains of *E. coli* show the best alkaline phosphatase activity in the presence of A-F107137-MF, so it can be assumed that they could participate in the decomposition of fats in wastewater. *R. mucilaginosa* shows the highest alkaline phosphatase activity in the presence of A-F107119-CN as well as *C. cladosporioides*. *P. expansum* has the highest alkaline phosphatase activity (β -glycerophosphate) in the presence of A-F107107-FM.

Good protease activities have been reported for *C. utilis* and both strains of *E. coli*. In the presence of A-F107117-CP, only the mixed biofilm showed acidic invertase activity. Other enzyme activities were weak or non-existent. The study found that different species of indigenous microorganisms isolated from wastewater in the form of single and / or mixed biofilms have significantly higher potential than the planktonic form of the same species in removing various organic or inorganic pollutants. For that reason, they can serve as adequate biosorbents for wastewater treatment of various origins. It has been shown that the methodology used has the potential to be applied to different wastewaters, but also that certain isolates from nature, which are not autochthonous from the place of contamination of the tested substances, can also effectively serve the same purposes. All of the above indicates the potential for further application in wastewater bioremediation.

Key words: biofilm, heavy metals, biological wastewater treatment, bacterias, yeasts

ЛИСТА СЛИКА

Слика 1. Фазе формирања биофилма (1. реверзибилна адхезија; 2. иреверзибилна адхезија; 3, 4. матурација; 5. одвајање и проливање ћелија)
(извор: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552112004231>).

Слика 2. Интеракције микроорганизама и метала са потенцијалном применом у процесу биоремедијације (преузета и прерађена из рада Lloyd, 2002).

Слика 3. МВВР технологија се заснива на полиетиленским биофилм носачима који, када се додају у рецикулациони базен, обезбеђују велику унутрашњу површину за раст микроорганизама.

Слика 3. МВВР технологија – полиетиленски биофилм носачи у рецикулационом базену (слика је преузета и прерађена са <https://www.sewagewaters.com/wastewater-treatment-systems/moving-bed-biofilm-reactor.html>).

Слика 4. Типови материјала који се користе као биофилм носачи (Shrestha, 2013).

Слика 5. Сликровити приказ експеримента испитивања способности формирања биофилма и толеранције планктонских ћелија и биофилма у присуству тешких метала. (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

Слика 6. Поступак инокулације МВЕС™ – НТР тест модела одабраним микроорганизмима (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

Слика 7. Плејт са 96 отвора и пластичним клиновима на поклопцу за формирање и раст биофилма.

Слика 8. Шематски приказ излагања планктонских ћелија и биофилма тешким металима (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

Слика 9. Постављање плејта за излагање формираног биофилма одабраним тешким металима (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

Слика 10. Одређивање вредности МИК(п) и МЛК(п) читавањем оптичке густине на ELISA читачу микротитарских плоча (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

Слика 11. Неутрализација тешких метала и опоравак преживелог биофилма (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

Слика 12. Одређивање вредности МБЕК читавањем оптичке густине ELISA читачу микротитарских плоча (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

Слика 13. Утицај а) бабра; б) олова с) живе д) никла на биофилм *R. mucilaginosa*.

Слика 14. Утицај а) цинка и б) кадмијума на биофилм *R. mucilaginosa*.

Слика 15. Утицај амфотерицина Б на биофилм *R. mucilaginosa*.

Слика 16. Утицај тестираних супстанци на биофилм *E. coli* након 24 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).

Слика 17. Утицај тестираних супстанци на биофилм *E. coli* након 48 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).

Слика 18. Утицај тестираних супстанци на биофилм *E. coli* након 72 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).

Слика 19. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa* након 24 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).

Слика 20. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa* након 48 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).

Слика 21. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa* након 72 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).

Слика 22. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa/E. coli* након 24 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).

Слика 23. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa/E. coli* након 48 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).

Слика 24. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa*/*E. coli* након 72 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).

Слика 25. Деловање основне боје прајмера на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, h) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.

Слика 26. Деловање разређивача за испирање боје на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, h) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.

Слика 27. Деловање разређивача на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, h) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.

Слика 28. Деловање металик црвене боје на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, h) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.

Слика 29. Деловање беле боје на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, h) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.

ЛИСТА ТАБЕЛА

Табела 1. Максималне дозвољене концентрације тешких метала у води у Србији (ЕПА/Србија, 1994).

Табела 2. Коришћени апарати и њихова намена.

Табела 3. Распон тестираних концентрација за упоредно тестирање планктонских ћелија и биофилмова (лабораторијских изолата).

Табела 4. Распон концентрација тестираних метала коришћен за упоредно тестирање индивидуалних и мешовитог биофилма лабораторијских сојева.

Табела 5. Распон концентрација тестираних метала коришћен за тестирање отпорности биофилмова и планктонских ћелија изолата из отпадних вода.

Табела 6. Аутоиндустријске боје коришћене за тестирање отпорности биофилмова и планктонских ћелија изолата из отпадних вода.

Табела 7. Опсег концентрација аутоиндустријских боја коришћен за тестирање изолата из постројења за прераду отпадне воде FCA.

Табела 8. Боје за визуелизацију биофилмова употребом флуоресцентне микроскопије.

Табела 9. Преглед коришћених, изолованих и идентификованих врста микроорганизама (ознаке CV – односе се на отпадне воде Централног постројења за прераду отпадних вода Цветојевац, ознаке F – односе се на отпадне воде аутоиндустрије FCA).

Табела 10. Отпорност планктонских ћелија *R. mucilaginosa* и *S. bouldarii* у присуству тешких метала у периоду излагања од 48 h изражена као МИКп и МЛКп.

Табела 11. Отпорност биофилма *R. mucilaginosa* у присуству тешких метала.

Табела 12. Индекс толеранције за *R. mucilaginosa* у присуству тешких метала.

Табела 13. Отпорност индивидуалних и мешовитог биофилма на присуство тешких метала.

Табела 14. Биосорпција метала *R. mucilaginosa* (%).

Табела 15. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској форми на изабране тешке метала изражена као МИКп и МЛКп.

Табела 16. Отпорност индивидуалних и мешовитих биофилмова изолованих и идентификованих микроорганизама у присуству одабраних тешких метала (¹МИКб-минимална инхибиторна концентрација планктонских ћелија; ²МЛКб-минимална летална концентрација планктонских ћелија; Вредности у табели су приказане у µg/mL).

Табела 17. Отпорност индивидуалних и мешовитог биофилма изабраног лабораторијског изолата и изолата из отпадне воде у присуству одабраних тешких метала.

Табела 18. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирану основну боју прајмер изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб.

Табела 19. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирани разређивач за испирање боје изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб.

Табела 20. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирани разређивач изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб.

Табела 21. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирану металик црвену боју изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб.

Табела 22. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирану белу боју изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб.

Табела 23. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе.

Табела 24. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе.

Табела 25. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе.

Табела 26. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе.

Табела 27. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе.

Табела 28. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе.

ЛИСТА ГРАФИКА

График 1. Стандардна крива за протеин (BSA).

График 2. Стандардна крива глукозе.

График 3. Стандардна крива тирозина.

График 4. Стандардна крива за фосфат.

График 5. Раст биофилмова *R. mucilaginosa*, *E. coli*, *R. mucilaginosa/E. coli* током 24, 48 и 72 h читавањем апсорбанце.

График 6. Продукција биофилма праћена одређивањем суве масе биофилмова током петодневног третмана.

График 7. Раст индивидуалних биофилмова микроорганизама изолованих из Централног постројења за прераду отпадних вода Цветојевац на полистиренским микротитарским плочама.

График 8. Раст одабраних индивидуалних и мешовитих биофилмова (различите комбинације микроорганизама са најбољом продукцијом биофилмова) на полистиренским микротитрационим плочама.

(**E** - *E. cloacae*; **K** - *K. oxytoca*; **S** - *S. odorifera*; **C** - *S. cerevisiae*; **EK** - *E. cloacae/K. oxytoca*; **ES** - *E. cloacae/S. odorifera*; **EC** - *E. cloacae/S. cerevisiae*; **KS** - *K. oxytoca/S. odorifera*; **KC** - *K. oxytoca/S. cerevisiae*; **EKS** - *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera*; **EKC** - *E. cloacae/K. oxytoca/S. cerevisiae*; **KSC** - *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae*; **ESC** - *E. cloacae/S. odorifera/S. cerevisiae*; **EKSC** - *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae*; **R** - *R. mucilaginosa*; **RE** - *R. mucilaginosa/ E. cloacae*).

График 9. Раст биофилмова на AMB Media биофилм носачима.

График 10. Раст индивидуалних биофилмова микроорганизама изолованих из постројења за прераду отпадних вода фабрике за производњу аутомобила ФИАТ на полистиренским микротитарским плочама.

График 11. Раст индивидуалних и мешовитог биофилма врста изолованих из постројења за прераду отпадних вода фабрике за производњу аутомобила ФИАТ на AMB Media биофилм носачима.

График 12. Процент уклањања Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} и Pb^{2+} индивидуалним и мешовитим биофилмовима *R. mucilaginosa*, *E. coli* и *R. mucilaginosa/E. coli* током пет дана испитивања.

График 13. Процент уклањања (наставак) Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} и Pb^{2+} индивидуалним и мешовитим биофилмовима *R. mucilaginosa*, *E. coli* и *R. mucilaginosa/E. coli* током пет дана испитивања

График 14. Сува маса појединачних и мешовитог биофилма у присуству Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} и Hg^{2+} .

График 15. Развој биофилмова на AMB Media носачима у присуству тестираних тешких метала после I дана.

График 16. Развој биофилмова на AMB Media носачима у присуству тестираних тешких метала после V дана.

График 17. Развој биофилмова на AMB Media носачима у присуству тестираних тешких метала после X дана.

График 18. Биосорпциона ефикасност тестираних појединачних и мешовитих биофилмова у присуству цинка, никла, кадмијума, бакра и олова изражена као % уклањања мерена за пети и десети дан.

САДРЖАЈ

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Проблематика истраживања	2
1.2. Тешки метали у животној средини.....	3
1.2.1. Биолошка улога и токсичност.....	3
1.3. Отпадне воде и њихов утицај на окружење.....	6
1.4. Биолошко пречишћавање отпадних вода.....	6
1.4.1. Фактори који утичу на биоремедијацију	7
1.4.2. Одговарајуће стратегије	9
1.5. Микроорганизми у животној средини	10
1.5.1. Биофилм.....	11
1.5.2. Односи микроорганизама унутар индивидуалних и мешовитих биофилмова	15
1.5.3. Интеракције у биофилмовима.....	17
1.5.4. Интеракције биофилма са другим организмима	20
1.5.5. Интеракције микроорганизама – метали.....	20
1.5.6. Биодиверзитет микроорганизама у срединама контаминираним тешким металима	23
1.6. Биофилм и пречишћавање отпадних вода	24
1.6.1. Биореактори	25
1.6.2. Утицај неорганских полутаната (тешки метали) и органских полутаната (аутоиндустријске боје) на планктонске ћелије, индивидуалне и мешовите биофилмове	28
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	30
3. МАТЕРИЈАЛ.....	32
3.1. Апарати и инструменти	33
3.2. Хемикалије и хранљиве подлоге	34
3.2.1. Хемикалије.....	34
3.2.2. Хранљиве подлоге.....	36
4. МЕТОДЕ.....	40
4.1. Радни раствори тестираних супстанци (тешки метали и комерцијалне аутоиндустријске боје) – припрема.....	41
4.1.1. Радни раствори соли тешких метала.....	41

4.1.2. Радни раствори аутоиндустријских боја	43
4.2. Тестирани микроорганизми, узорковање, изолација и идентификација микроорганизама из отпадних вода	44
4.2.1. Изолација и идентификација бактерија из узорака отпадних вода.....	44
4.2.2. Изолација и идентификација гљива из отпадних вода.....	46
4.2.3. Организми и услови раста.....	46
4.3. Тестирање отпорности, квантификација и потенцијал уклањања	48
4.3.1. Тестирање отпорности и квантификација планктонских ћелија и биофилмова на присуство тешких метала и аутобоја употребом МВЕС™ – НТР (Minimum Biofilm Eradication Concentration – High Throughput Plates) теста.....	48
4.3.2. Тестирање отпорности индивидуалних и мешовитих биофилмова на присуство тешких метала и аутобоја и квантификација	53
4.3.3. Уклањање тестираних раствора (тешких метала и аутобоја) у присуству испитиваних микроорганизама	54
4.3.4. Ензимска активност изолованих микроорганизама из отпадних вода у присуству аутобоја	56
4.3.5. Флуоресцентна микроскопија.....	61
4.3.6. Статистичка анализа података.....	62
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	63
5.1. Тестирани микроорганизми.....	64
5.2. Формирање биофилмова и квантификација.....	66
5.2.1. Лабораторијски изолати	66
5.2.2. Изолати из отпадних вода комуналног предузећа за пречишћавање отпадних вода Цветојевац.....	67
5.2.3. Изолати из отпадних вода постројења за пречишћавање отпадних вода индустрије за производњу аутомобила.....	71
5.3. Отпорност и биосорпциона ефикасност лабораторијских изолата према тестираним тешким металима – планктонске ћелије и карактеризација биофилмова.....	73
5.3.1. Отпорност планктонских ћелија на присуство тешких метала	73
5.3.2. Отпорност биофилмова на присуство тешких метала	74
5.3.3. Поређење отпорности планктонских ћелија и биофилмова у присуству тешких метала	75
5.3.4. Поређење отпорности индивидуалних и мешовитог биофилма изабраних врста у присуству тешких метала	76
5.3.5. Флуоресцентна микроскопија.....	78
5.3.6. Биосорпциона ефикасност планктонских ћелија и формираног биофилма.....	89
5.3.7. Биосорпциона ефикасност индивидуалних и мешовитог биофилма.....	91

5.4. Отпорност и биосорпциона ефикасност изолата из постројења за пречишћавање комуналних отпадних вода Цветојевац према тестираним тешким металима – планктонске ћелије и карактеризација биофилмова.....	95
5.4.1. Отпорност планктонских ћелија и њихових биофилмова на присуство тешких метала	95
5.4.2. Отпорност биофилмова на присуство тешких метала	97
5.4.3. Поређење отпорности индивидуалних и мешовитог биофилма изабраног лабораторијског и изолата из отпадне воде у присуству тешких метала.....	100
5.4.4. Поређење отпорности индивидуалних и мешовитих биофилмова изабраних врста у присуству тешких метала.....	100
5.4.5. Биосорпциона ефикасност индивидуалних и мешовитих биофилмова – поређење активности	103
5.5. Отпорност и биосорпциона ефикасност изолата из постројења за пречишћавање отпадних вода фабрике за производњу аутомобила ФИАТ према тестираним аутоиндустријским бојама – планктонске ћелије и карактеризација биофилмова	108
5.5.1. Отпорност планктонских ћелија и њихових биофилмова на присуство аутоиндустријских боја	108
5.5.2. Флуоресцентна микроскопија.....	113
5.5.3. Ензимска активност микроорганизама у присуству аутобоја	118
5.6. Разматрање резултата.....	126
6. ЗАКЉУЧАК.....	130
7. ЛИТЕРАТУРА.....	134
8. ПРИЛОЗИ.....	157
8.1. Спецификације аутоиндустријских боја.....	157
Биографија кандидата.....	174
Библиографија.....	175

1. УВОД

1.1. Проблематика истраживања

Тешки метали се природно јављају у животној средини и у површинске воде обично доспевају из веома различитих извора, као што су атмосферске падавине или доспевају из подлоге (Namieśnik and Rabajczyk, 2010). У свету се као последица индустријског развоја у животну средину све више испушта велика количина штетних материја. Међу њима су и тешки метали попут арсена, баријума, кадмијума, хрома, олова, живе, никла и цинка (Kimuthia et al., 2020; Pratush et al., 2018; Wu et al., 2016; Ahmed et al., 2011; Conrad et al., 2007; Sandrin and Maier, 2003).

Тешки метали могу бити присутни у различитим физичким и хемијским формама: могу представљати засебну чврсту фазу, могу бити везани за компоненте које се налазе у води или се могу налазити у облику јона. Физичка и хемијска својства воде, односно седимента (температура, рН, јонска јачина водене фазе, садржај органске материје) утичу на физичка и хемијска својства метала (Coelho et al., 2015; Sandrin and Maier, 2003). Промена температуре утиче на повећање, односно смањење растворљивости једињења метала, а самим тим и на дистрибуцију и стопу дифузије једињења метала (Whitehouse, 1984). Неутрална до благо кисела средина (рН 5-7) помаже мобилност металних једињења, док померање ка киселијим и алкалним рН вредностима доводи до смањења биодоступности. Испитивања Król et al. (2020) су показала да је са порастом рН долазило до смањења концентрације тешких метала, при чему је повећана концентрација уочена за бакар, али само при вредностима рН 10.5. Претпоставка је да до промена у концентрацији тешких метала долази услед процеса који се дешавају у раствори, тј. растворљивости/таложењу минералне фазе и сорпције/десорпције. Повишене концентрације соли у загађеним срединама доводе до смањења растворљивости метала (Whitehouse, 1984), па самим тим и до повећања стабилности њихових једињења.

Последњих деценија се све више испитују новије методе и технике за пречишћавање отпадних вода (Carolin et al, 2017). Стога је могућност коришћења живих микроорганизама привукла пажњу истраживача (Pennafirme et al., 2015; Fu and Wang, 2011). За разлику од физичко-хемијских метода, примена биолошких метода је довела како до приступачније цене, тако и веће ефикасности у уклањању и високих и ниских концентрација јона метала (Wang and Chen, 2006).

До скоро су микробиолози били фокусирани на слободно-пливајуће (планктонска форма) микроорганизме одгајане у виду чистих лабораторијских култура. Многобројна истраживања су већ рађена на тему толеранције слободно-пливајућих бактерија у присуству метала (видети у Rathnayake et al., 2010). Однедавно је прихваћено да највећи потенцијал за пречишћавање загађених средина имају управо они микроорганизми који опстају и живе у таквим срединама (Riat, 2020). Зато се при проучавању потенцијалне примене микроорганизама у биоремедијацији нпр. тешких метала, прво испитују, изолују и идентификују микроорганизми који живе у природи, тј. загађеним срединама. Повећан садржај тешких метала условио је промене биодиверзитета микроорганизама у животној средини, што је довело до смањења броја врста микроорганизама, а до повећања бројности оних врста микроорганизама који су отпорни на тешке метале (Shuaib et al., 2021). Да би опстали у контаминираној средини микроорганизми су временом развили различите адаптационе механизме. Један од тих механизма је и живот у форми биофилма који омогућава опстанак у неповољним условима средине коју насељавају (Prabhakaran et al., 2016).

1.2. Тешки метали у животној средини

Као резултат индустријске активности и убрзаног технолошког развоја, у животној средини се непрестано повећава концентрација тешких метала, који се данас убрајају у најчешће полутанте животне средине. Када су присутни у већим концентрацијама, тешки метали су токсични и представљају озбиљну претњу како за животну средину, тако и за здравље људи, јер се због немогућности разградње нагомилавају у ланцима исхране (Shah et al., 2021; Kumar et al., 2019; Evanko and Dzombak, 1997).

Тешки метали се не могу разградити или разградити да би смањили токсичност, али се могу трансформисати у нереактивне и мање токсичне облике. Еколошки (eco-friendly) и економични (cost-effective) микроорганизми показали су се као ефикасна алтернатива у санацији средина загађених тешким металима (Pandey and Keshavkant, 2021).

1.2.1. Биолошка улога и токсичност

Тешки метали су група метала чија је атомска густина већа од 5 g/cm^3 , тако да је од преко 90 елемената који постоје у природи 53 тешких и 16 лаких метала, а 21 припада групи 'неметала' (Weast, 1984). Временом је укључиван све већи број критеријума, што је довело до великог броја дефиниција тешких метала, тако да не постоји њихова општеприхваћена подела (Duffus, 2002). Катјони неких тешких метала имају важну улогу као микроелементи у биохемијским процесима: катализују ензимске реакције (Mg, Mn, Zn), учествују у редокс процесима (Fe, Cu, Ni) и учествују у процесима регулације осмотског баланса (K, Na) (Nies, 1999). Међу тешким металима има и оних који немају никакву биолошку функцију и штетни су чак и у врло ниским концентрацијама (Cd, Hg, Pb итд). Међутим, у повећаним концентрацијама и есенцијални метали постају токсични за организам јер могу мењати специфичност ензима, оштетити ћелијске мембране, нарушити структуру ДНК и нормално функционисање ћелије. Стога, концентрација тешких метала унутар сваке ћелије мора бити строго контролисана (Nies, 1999), посебно због тога што испољавају цитотоксичан ефекат и при врло ниским концентрацијама, тако да могу да узрокују болести које могу бити опасне и по људе и по животиње (Misra et al., 2021).

Према Weast (1984), могуће је разликовати четири групе потенцијалних микроелемената:

- Fe, Zn и Мо, у опсегу концентрација од 100 nM до 1 μM ;
- Ni, Cu, As, V, Mn, Sn и U, са концентрацијама од 10 nM до 100 nM;
- Co, Se, Ag и Sb, са концентрацијама од 10 nM;
- Cd, Cr, W, Ga, Zr, Th, Hg и Pb, са концентрацијама испод 1 nM

Повишеним концентрацијама тешких метала сматрају се концентрације које неколико пута до неколико стотина пута прелазе вредности дозвољене за дату средину.

Загађење тешким металима присутно је у бројним земљама у свету, и постоји велика разноликост прописа о њиховој концентрацијама које се сматрају дозвољеним.

За потребе овог истраживања као повећане концентрације узете су у обзир концентрације веће од максимално дозвољених концентрација. Законски оквир за праћење стања и извештавање представљен је у Закону о водама (Службени гласник РС, 30/2010-81, 93/2012-27, 101/2016-9, 95/2018-388, 95/2018-267) и подзаконским актима, Уредби о граничним вредностима приоритетних и приоритетних хазардних супстанци које загађују површинске воде и роковима за њихово достизање (Службени

гласник РС, бр. 24/14), Уредби о граничним вредностима емисије загађујућих материја у води и роковима за њихово достигање (Службени гласник РС, бр. 67/11, 48/12, 1/16), као и Уредби града Крагујевца о МДК вредностима за отпуштање отпадне воде у градско колектор (Службени лист града Крагујевца 9/1993). Ова правна документа су у великој мери усклађена са Оквирном Директивом Европске уније о водама (Direktiva 2000-60-EC), Direktivom 2008/108/EZ (Sl. list EU, 2008), одговарајућим Wath List-ама (Negrão De Carvalho et al., 2015; Loos et al., 2018).

Дозвољене максималне концентрације и граничне вредности појединих тешких метала у води, у Србији, су приказане у Табели 1.

Табела 1. Максималне дозвољене концентрације изабраних тешких метала у води у Србији (ЕРА/Serbia, 1994) и граничне вредности за исте (Службени гласник РС; бр. 01/2016).

Метал	МДК ^а , mg/L	Граничне вредности, mg/L
Cu	0.1	0.01
Cd	0.01	0.01
Hg	0.001	0.001
Ni	0.1	0.02
Zn	1.0	1.0
Pb	0.1	0.1

^аМДК=максимално дозвољена количина

За сваки од тешких метала представљених у табели дат је сажет приказ биолошке улоге, токсичности и ефекта на животну средину.

Бакар (Cu)

Бакар се везује за неколико различитих металопротеина, у којима има структуралну улогу и делује као кофактор каталитичке активности. Описано је око двадесетак ензима који садрже бакар и они имају различиту ћелијску и ванћелијску активност, која укључује учествовање у антиоксидативној функцији, производњи енергије и др (Danks, 1988). Најважнија биолошка улога бакра је то што је кључни део комплекса цитохром Ц оксидазе. Бакар лако интерагује са радикалима, посебно са молекулским кисеоником, што га и чини веома токсичним. Cu^{2+} је најтоксичнији облик бакра, мада је токсичност детектована и код $CuOH^+$ и $Cu_2(OH)_2^{2+}$. У анаеробним условима, када је присутан сумпор, бакар ће формирати CuS . У аеробним срединама доминантна растворљива форма бакра је $CuCO_3$, мада су чести и Cu^{2+} , $CuOH^+$ и $Cu(OH)_2^{2+}$ (Weast, 1984). Tang et al. (2019) користили су биореактор за тестирање уклањања бакра и кадмијума из отпадних вода помоћу микробиолошке заједнице. Fathollahi et al. (2021) испитивали су биосорпцију бакра употребом микроорганизама (92% уклоњено). Khosravi et al. (2020) су тестирали уклањање бакра и цинка применом биофилма *Escherichia coli*. Након 10 дана уклоњено је 54.61% катјона бакра и 57.35% цинка.

Кадмијум (Cd)

Најчешће се налази у виду Cd^{2+} , различитих комплекса кадмијума и цијанида или $Cd(OH)_2$. У срединама са високим рН вредностима доминирају $Cd(OH)_2$ и $CdCO_3$, док Cd^{2+} доминира при вредностима рН мањим од 8. У условима редукције, у присуству сумпора, кадмијум преципитира формирајући CdS . Извори контаминације кадмијумом су галванизација и одлагање отпада који садрже кадмијум. Како је веома токсичан,

предмет је проучавања великог броја студија, са посебним акцентом на токсични ефекат кадмијума на микроорганизме. Штетан утицај овог тешког метала на микроорганизме везује се за денатурацију протеина, везивање тиола, интеракцију са метаболизмом калцијума и нарушавање интегритета ћелијске мембране (Nies, 1999). У циљу развоја технологије за уклањање тешких метала из отпадних вода Xing et al. (2021) предложили су иновативни начин припреме бактеријског биофилма формирајући биофилм на носачима који су већ били у отпадној води. Singh and Kaushik (2021) дали су увид у молекуларној карактеризацији заједница биофилма приликом уклањања кадмијума и никла.

Жива (Hg)

Контаминира животну средину најчешће приликом сагоревања угља, а загађењу доприноси и жива ослобођена из манометара. Након ослобађања у животну средину, жива се може наћи у виду елементарне живе Hg^0 , у виду Hg^{2+} , Hg_2^{2+} или алкиловане форме. Редокс потенцијал и рН вредност средине одређују у ком облику ће жива бити заступљена. Hg^{2+} и Hg_2^{2+} су стабилнији у оксидационим условима, док се у условима благе редукције органска или неорганска жива редукује до елементарне форме, која се затим претвара у алкиловане форме, биотичким или абиотичким процесима. Жива је најтоксичнија када је у алкилованом облику, јер је тад растворљива у води и испарљива на ваздуху. У анаеробним условима, и неорганске и органске форме живе могу се претворити у алкиловане облике активношћу микорорганизама, као што су сумпор-редукујуће бактерије. Hg^{2+} формира комплексе са различитим неорганским и органским лигандима. Механизми за уклањање овог тешког метала обухватају адсорпцију на земљиште, седименте или хумусни материјал, као и копреципитацију са сулфидима (Weast, 1984). Обзиром да је жива токсична и има способност биоакумулације, Wei et al. (2021) су користили биофилм реактор у којем су тестирали уклањање живе. Доминантне бактерије у биофилм реактору биле су *Halomonas*, *Anaerobacillus*, *Halomonas* и *Pseudomonas*. Hg^0 је успешно уклоњен 88% за 280 дана. Hg^{2+} је имобилисан, а Hg^{2+} и $MeHg$ преведен у HgS .

Никл (Ni)

Најчешће се јавља у оксидационим стањима Ni^{2+} и Ni^{3+} . Никл има улогу као кофактор или структурна компонента у неким металоензимима који су слични неким никл ензимима претходно идентификованим код биљака и микроорганизма. Они укључују уреазу, хидрогеназу и угљен моноксид дехидрогеназу. Овај тешки метал има биолошку улогу у катализи комплексних молекулских реаранжмана, а $(NiFe)$ хидрогеназа и уреазе само су неки од ензима у којима је никл кофактор. У индустрији се никл користи у изради легура. Легуре никла одликују се снагом и отпорношћу на корозију и топлоту. Главни извор загађења ваздуха никлом су електране. Из ваздуха, након киша, никл се спушта на земљу или у површинске воде. Већина једињења никла која се нађу у животној средини адсорбују се за седименте или честице тла и постају непокретна. Међутим, у киселом земљишту никл постаје покретнији и често се из земљишта испере у подземне воде (Przybyla et al., 1992). Бактеријски биофилмови имају веома важну улогу у уклањању јона метала из отпадних вода. Naque et al. (2021) су известили да биофилм *Vitreoscilla* sp. ENSG301 и *Bacillus thuringiensis* ENSW401 у потпуности уклањају никл (100%) при иницијалној концентracији никла од 100 mg/L.

Цинк (Zn)

Искључиво се јавља у виду двовалентног јона Zn^{2+} и формира комплексе са бројним анјонима, аминокиселинама и органским киселинама. Како су му d орбитале

комплетно попуњене, катјон цинка не подлеже редокс променама у физиолошким условима. Овај тешки метал улази у састав више од 70 ензима који су укључени у метаболизам протеина, липида и угљених хидрата. У индустрији се цинк користи као нерђајући премаз за гвожђе или челик. У условима неутралне и ниске рН вредности цинк је присутан у виду растворљивих једињења, док на већим рН вредностима цинк може формирати комплексе карбоната и хидроксида који утичу на његову растворљивост. У веома загађеним срединама, када је присутан у високим концентрацијама, цинк лако преципитира (Weast, 1984). Отпадне воде које садрже цинк, третиране су биофилмом *Shewanella xiamenensis* формиран на зеолиту Zinicovscaia et al. (2021). Сорпциони потенцијал *Shewanella xiamenensis* биофилма је испитан при иницијалној концентрацији 52.8 mg/L. Ефикасност уклањања је била 85%.

Урбанизација и другачији стил живота су допринели порасту загађења животне средине, а самим тим и повећању индустријских и комуналних отпадних вода у којима тешки метали, као полутанти, имају значајну улогу. Загађујуће материје, а са њима и тешки метали, које се отпуштају заједно са отпадном водом директно у водене екосистеме, имају изузетно велики утицај на окружење, живот акватичних организама и људско здравље. До 2030. године очекује се раст људске популације за 35% што доводи до незаобилазне чињенице да ће потрошња воде порастати за 62% (ABS, 2006). Отпадна вода, чија ће се количина повећавати са растом популације, као и велики финансијски трошкови за њено третирање, представљаће озбиљан проблем у будућности. Како би се спречило даље загађење водених екосистема, постројења за прераду отпадних вода омогућавају контролисано увођење и редукцију органских и хранљивих материја, као и других потенцијално опасних и штетних агенаса (Matlock et al., 2002).

1.3. Отпадне воде и њихов утицај на окружење

Отпадна вода је садржај сакупљеног отпада из индустрије, предузећа или институционалних комплекса и атмосферских вода. Отпадне воде углавном садрже суспендоване честице, микроорганизме, патогене, људски и други органски отпад, нутријенте (нпр. азот и фосфор) и хемикалије институција и индустрије. Раст комерцијалних и индустријских тржишта један је од главних фактора који повећавају производњу отпадних вода. Након коришћења воде за различите активности, чиста вода добија напред набројане штетне састојке, као и токсична једињења, која се касније мешају са природним акватичним ресурсима (Tchobanoglous et al., 2003). Када једном органска материја доспе у отпадну воду, врло брзо долази до распадања при чему настају гасови непријатног мириса (H_2S , NH_3 или CH_4). Такође, велики број патогених микроорганизама у нетретираној води може лако да доспе у ланац исхране људи (Khan et al., 2008). Сви ови агенси имају велики утицај на околину и здравље људи. Због сложеног састава и великих количина штетних материја, управљање отпадним водама постао је значајан светски проблем.

1.4. Биолошко пречишћавање отпадних вода

Као одговор на све дужи списак полутаната, као и на све значајније негативне утицаје који исти врше на животну средину, развијене су бројне физичке и хемијске методе за уклањање, како различитих полутаната, тако и тешких метала из животне средине. Ове бројне методе се обично морају комбиновано користити да би биле што

ефикасније (Farhadian et al., 2008). Поред тога што су физичко-хемијске технике ремедијације веома скупе, велики проблем представља и то што њихова употреба често доводи до стварања интермедијерних једињења са потенцијално токсичним ефектом од полазних полутаната. Употреба микроорганизама са способношћу да користе широк спектар једињења као извор угљеника и енергије у сврху пречишћавања средина загађених полутаната се означава као *биоремедијација* и представља обећавајућу, релативно ефикасну и веома исплативу технологију (Megharaj et al., 2011). С обзиром на све дужу листу полутаната и постојањем великог броја микроорганизама и њиховог великог диверзитета (Curtis et al., 2002), постоји стална потреба за изолацијом и идентификацијом нових микроорганизама са способношћу деградације полутаната, као и разумевањем генетике и биохемије процеса биодеградације. Такође, поред потраге за самим организмима који би се могли користити у пречишћавању отпадних вода, напредак у области метагеномике и настојање да се секвенцира што већи број генома, отворили су врата потрази за самим генима, чији производи имају улогу у деградацији полутаната (Zhao and Poh, 2008; Golyshin et al., 2003).

Биоремедијација се тако појавила као атрактивна, економична и еколошки прихватљива алтернатива. Улога различитих микроорганизама у санацији загађења тешким металима је од изузетног значаја јер такви микроорганизми показали велику прилагодљивост у погледу толеранције и преживљавања у присуству повишених концентрација ових метала. Биомаса микроорганизама делује као потенцијални биосорбент који се може ефикасно применити као део одрживог третмана за рекултивацију воде онечишћене тешким металима у различитим постројењима за пречишћавање отпадних вода (Misra et al., 2021).

1.4.1. Фактори који утичу на биоремедијацију

Биоремедијација, која поред микроорганизама подразумева и употребу биљака или њихових ензима за третирање загађених станишта (означава се и као фиторемедијација), има поред великог потенцијала и неке ограничавајуће факторе. Наиме, иако највећи број метала подлеже биодеградацији, постоје бројни фактори који утичу на ефикасност деградације. За успешност биоремедијационог процеса, поред микроорганизама способних да разграде контаминант, морају се узети у обзир и други фактори, као што су лако усвојиви извор азота и фосфора (хранљиве супстанце), влажност, температура, кисеоник (аерација) и евентуално присуство сурфактаната. Осим тога, важне су и карактеристике воде, као што су рН, хемијски састав и садржај органске супстанце (Voopathy, 2000; Karpińska and Kotowska, 2019). Физичко-хемијске особине загађујућих материја у спречи са метаболичким карактеристикама микроорганизама утичу на успешност интеракција микроорганизама-загађујуће материје, која ће зависити од средисних услова где се успостаља та интеракција (Ali et al., 2015).

Доступност датог полутанта

Један је од битних фактора који утичу на сам процес биоремедијације. По уласку у воду, метали интерагују са минералним и органским компонентама и што се дато једињење одликује већим степеном хидрофобности то је интеракција чвршћа. Стога, потенцијал десорпције, односно отпуштања полутанта, утиче на његову подложност биодеградацији (Megharaj et al., 2011; Sharma, 2020). Биодеградација је од велике важности када су у питању токсичне материје. Уколико је стопа биоразградње висока,

концентрација и токсични ефекти ће бити смањени, док постојани полутанти дуго задржавају токсични ефекат (Jørgensen, 2008).

Хранљиве супстанце

Загађујућа супстанца представља извор угљеника за микроорганизме, а контаминирана вода је углавном сиромашна азотом и фосфором. Доступност нутријената, пре свега азота и фосфора, има велики значај за ефикасност биоремедијације (Van Hamme et al., 2003). Додатак ових састојака доводи до повећаног раста микроорганизама и убрзава деградацију контаминанта. Хранљиве супстанце се додају води ради успостављања масеног односа угљеник:азот:фосфор (C:N:P) око 120:10:1, што је приближно односу ових елемената у биомаси (Aleksander, 1999; Voorthuyt, 2000). Нека новија истраживања указују да је потребно израчунати комбиновани однос угљеника и азота како би се обезбедило да буде задовољена гранична вредност потребна за несметани процес биоремедијације (Ogbeh et al., 2018)

Температура

Утиче на раст микроорганизама, састав микробних заједница и брзину деградације полутаната. Од температуре зависи вискозитет, растворљивост, физичка природа и хемијски састав полутаната (Aleksander, 1999; Das and Chandran, 2011; Das et al., 2012). Биодеградација се може одвијати у широком опсегу температуре и у различитим истраживањима се изоловани психрофилни (Aislabie et al., 2006), мезофилни и термофилни микроорганизми (Obuekwe et al., 2001) који користе тешке метале као извор електрона. Један од проблема када су у питању отпадне воде је ниска температура околне средине, јер за највећи број микроорганизама који се користе у анаеробним дигесторима оптимална температура је 15-35°C. Ако су температуре ниже, то ће смањити ефикасност анаеробне дигестије (Bhatia et al., 2020).

Аерација

Деградација полутаната се најбрже и најкомплетније остварује у аеробним условима. Доступност кисеоника зависи од интензитета укупне микробиолошке потрошње. За повишење концентрације кисеоника у контаминираној средини се користе бројне методе попут превртања, принудне аерације, механичког мешања, биовентилације, увођења ваздуха и додатком алтернативних извора кисеоника, као што су водоник-пероксида или, најчешће, магнезијум-пероксида.

Ефикасност у смањивању хемијске потрошње кисеоника се повећавала када су коришћене технике испрекидане и континуиране аерације. Међутим, треба водити рачуна да то не мора обавезно да доведе до смањења садржаја азота и нитрата због неповољних услова за денитрификацију (Donoso et al., 2019).

Сурфактанти

Представљају једињења која смањују површински напон воде и повећавају растворљивост хидрофобних супстанци у води. Тешки метали се везују за органске компоненте, па сурфактанти помажу процес десорпције неполарних једињења, чиме се повећава њихова биоусвојивост. Могу се користити сурфактанати хемијског и биолошког порекла (Mulligan, 2005). Хемијски сурфактанти који се употребљавају у биоремедијацији треба да буду биодеграбилни и да не инхибирају раст микроорганизама. Површински активни биомолекули настали радом микроорганизама се називају биосурфактанти (Sáenz-Marta et al., 2015). Неки микроорганизми синтетишу биосурфактанте гликолипиде, као што су рамнолипиди код сојева *Pseudomonas aeruginosa*, или трехалолипиди код рода *Rhodococcus*, липопептиде, као што

је сурфактин код сојева *Bacillus subtilis*, полимере, односно емулзан код бактерије *Acinetobacter calcoaceticus* (Singh et al., 2007).

Данас се улажу напори да се замене синтетички сурфактанти бисурфактантима, а један од услова је да њихова производња буде исплатива. Зато је важно да се развију сојеви микроорганизама који производе биосурфактанте (Sáenz-Marta et al., 2015).

1.4.2. Одговарајуће стратегије

Проблеми у вези са ефикасношћу биоремедијације се могу превазићи одабиром одговарајуће стратегије (Andreoni and Gianfreda, 2007; Farhadian et al., 2008). Биоремедијација се може спроводити и у *ex-situ* и у *in-situ* условима, што зависи од великог броја фактора, као што су трошкови, карактеристике локације, врста и концентрација полутаната. Зато је потребно изабрати одговарајућу технику биремедијације (биостимулација, биоаугментација, биоатенуација и слично) јер ће на тај начин биоремедијација представљати најефикаснији, економичан и еколошки прихватљив алат за санирање зађањене животне средине (Sharma, 2020).

Природна атенуација

Уколико у датој средини владају повољни услови за биоремедијацију долази до *природне атенуације*, односно процеса биоремедијације без спољашње интервенције који се ослања на природне услове и способности микроорганизама који га насељавају. Због тога се интензивно проучавају биогеохемијски и микробиолошки процеси који утичу на успешност природне атенуације (Scow and Hicks, 2005).

Биостимулација

Уколико у датој средини владају услови ограничености нутријената може се користити *биостимулација* која подразумева употребу аутохтоних популација микроорганизама уз додавање нутријената, чиме се модификује средина, како би се поспешило раст микроорганизама. У овоме се огледа предност биостимулације јер се користе нативне популације микроорганизама које су већ добро прилагођене постојећој средини (Adams et al., 2015).

Биоаугментација

Трећи тип биоремедијације подразумева увођење егзогенних микроорганизама, који нису карактеристични за дату средину, али са способношћу детоксикације одређеног полутаната. Овај процес се означава као *биоаугментација* и понекада подразумева употребу генетички модификованих микроорганизама (Adams et al., 2015).

Биоаугментација представља додавање концентроване и специјализоване популације микроорганизама (појединачни сој или мешана култура). Може се користити биоаугментација обogaћивањем аутохтоним или неаутохтоним микроорганизмима (Huang and Ye, 2020). Ова техника се користи у отпадним водама у којима је број микроорганизама мањи од 10^5 CFU/mL (Mishra et al., 2001) или уколико присутни микроорганизми не поседују метаболичке способности за разградњу контаминаната. У литератури се за додавање микроорганизама наводе стратегије додавања чисте културе, мешане културе, додаток генетски модификованих организама (ГМО) или додаток специфичног гена пакованог у вектор тако да се инсертује коњугацијом у нативну популацију (Mrozik and Piotrowska-Seget, 2010). Мешане микробне културе имају предност због ширег деградационог потенцијала,

синергизма и могућности кометаболизма. Микроорганизми који се употребљавају за биоаугментацију могу се изоловати са места контаминације или се набавити из комерцијалних извора. Комерцијални микробни препарати овог типа у неким земљама нису прихваћени у јавности. Поред тога, ГМО се нигде у свету не користе у такозваним „филд” (eng. *field*) експериментима (Mrozik and Piotrowska-Seget, 2010; Tuagi et al., 2011). Иако постоји велики број публикованих радова о позитивним ефектима биоаугментације, у неким случајевима се ова техника показала као неуспешна (Fantroussi and Agathos, 2005; Thompson et al., 2005). Истраживања указују да се убрзо по примени, број егзогених микроорганизама знатно смањи. Разлози за то могу бити многобројни: конкуренција између додатих и природно присутних микроорганизама, антагонизам или предаторство (протозое, бактериофаги). Осим тога, водена средина је сложен систем, па преживљавање и способност деградације код додатих микроорганизама зависе и од флукуација у температури, рН или доступности контаминаната и хранљивих супстанци. Због ефикасности (али и због јавног мњења), најпрактичније је употребити микроорганизме изоловане из отпадних вода која треба да буде деконтаминирана (Horakova and Nemes, 2000).

Природна атенуација има ограничене капацитете, зато се чешће прибегава биоаугментацији и биостимулацији.

1.5. Микроорганизми у животној средини

Живимо у свету који је препун живота. Baas Becking-ов постулат “*everything is everywhere, but, the environment selects*” (De Wit and Bouvier, 2006) говори у прилог идеји да је микробиолошки свет свуда око нас и да услови који владају у датом окружењу одређују шта ће у њему опстати. Када је Чарлс Дарвин развио своју теорију природне селекције, разноликост макро-организама (биљке и животиње) приписана је специјацији изазваној географским одвајањем (O’Malley, 2008). За микроорганизме, географска локација има минималан ефекат (O’Malley, 2008), али локални физичко-хемијски услови (рН, салинитет, температура итд) имају велики утицај на биогеографску дистрибуцију микроорганизама (Cardozo, 2015; Chu, 2010).

Микроорганизми могу насељавати средине погодне за организме вишег организационог нивоа, као и средине у којима владају екстремни услови у којима већина еукариота не би преживела. Одличне адаптационе способности омогућиле су им да, поред средина у којима се најуспешније развијају, могу успешно насељавати и средине у којима владају неповољни услови. Добре адаптационе способности развијене су захваљујући променљивим фенотипским карактеристикама и метаболизму. Опште је познато да се животна средина одликује различитим абиотичким факторима (t °C, рН, светлост, концентрације органских и неорганских једињења, вода, итд). У стабилним екосистемима, у којима су услови микросредине стабилни, бројност и врсте микроорганизама остају константни. Међутим, у природним екосистемима у којима владају променљиви услови, често је величина популације одређена неким од ограничавајућих фактора, најчешће хранљивим састојцима (Elias and Vanin, 2012). Тако, на пример, на насељеност родова *Chromatium* и *Chlorobium* утиче интензитет светлости, количина раствореног кисеоника, количина H_2S . Када наступе анаеробни услови долази до ослобађања H_2S . Узимајући у обзир малу осетљивост на присуство кисеоника и велику осетљивост на присуство H_2S , *Chromatium* насељава зону испод површине воде, док *Chlorobium* насељава дубље слојеве (Gajin et al., 2007). Један или више ограничавајућих фактора продужава време микроорганизама који расту у природним условима. Међутим, чињеница да микроорганизми могу да расту и да се

размножавају у датој микросредини указује да је испуњен први и основни услов, доступност нутријената (Simon et al., 2002).

Механизам који игра битну улогу у насељавању микроорганизама у природним екосистемима је *агрегација* или причвршћивање. Уобичајено се сматра да бактерије имају два главна начина/форме живота, као планктонске јединке или у облику биофилмова којима се причвршћују за подлогу (Cai, 2020). Причвршћивањем, бактерије не само да насељавају неку одређену површину већ, захваљујући агрегацији, долази до формирања заједнице, познатије као *биофилм*, која пружа бројне предности. У већини случајева је и развој микроорганизама у заједници много продуктивнији, него као слободнопливајући организми (Gajin et al., 2007). Међусобно повезивање бактеријских ћелија исте врсте се означава и као *аутоагрегација* или *аутоаглутинација*, док се удруживање бактерија различитих сојева и врста означава као *коагрегација* (Trunk et al., 2018).

1.5.1. Биофилм

Кроз историју науке су микроорганизми често класификовани као планктонски, односно као организми који слободно пливају кроз течни медијум. Antonie van Leeuwenhoek је приметио да микробне ћелије могу да стварају агрегате на површини зуба. Касније су и други научници утврдили да микроорганизми имају тенденцију да се причвршћују за површину и међусобно, уместо да се слободно крећу у околини. Коначно, развој микроскопије омогућио је научницима да утврде састав биофилма, као и матрикс кога продукују саме ћелије биофилма (Donlan, 2002).

Биофилм представља сесилну заједницу микроорганизама који су иреверзибилно везани за чврсту површину и међусобом, помоћу екстрацелуларне полисахаридне супстанце коју су сами створили. Биофилм се може састојати од различитих микроорганизама, као што су бактерије, диатомеје, гљиве, алге, протозое, као и нецелуларне материје (нпр. соли и муљ). Способност формирања биофилма је универзална особина и могуће је да се развила услед тога што пружа еколошку предност у преживљавању. Иако је некада важило да микроорганизми живе као усамљени ентитети, данас се биофилмови сматрају заступљенијим обликом живота микроорганизама и могу настати у природном, медицинском и индустријском окружењу (Hall-Stoodley and Stoodley, 2005, 2009; Hall-Stoodley et al., 2004).

Разноврсни динамични и сложени процеси, који су одређени унутрашњим биолошким својствима, као и различити фактори животне средине, утичу на успостаљање и развој биофилмова. Бактерије, као и други микроорганизми, који образују биофилмове се одликују посебним карактеристикама у односу на планктонске облике (Alotaibi and Bukhari, 2020):

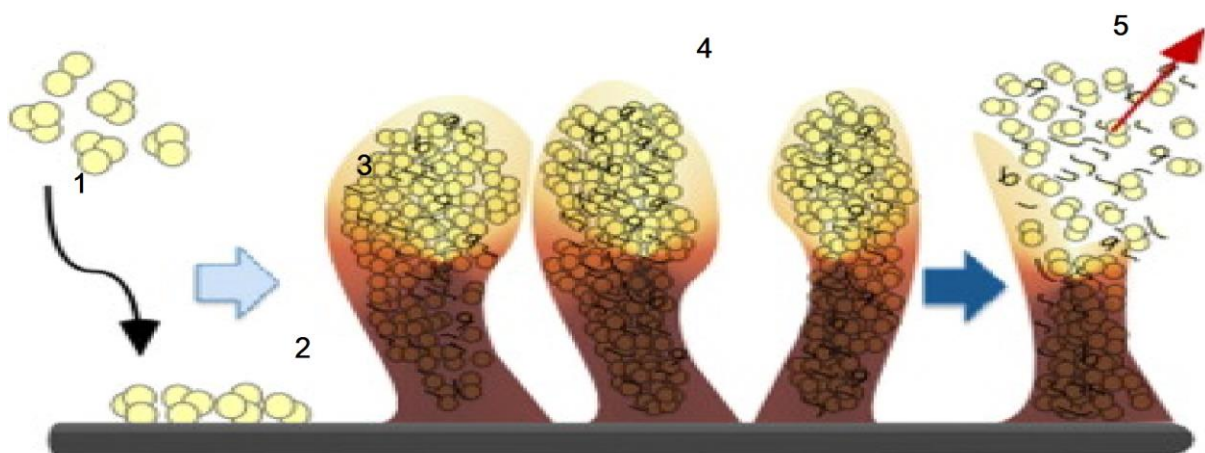
- међућелијски сигнални системи (попут *quorum sensing*). У њима ћелије продукују сигналне молекуле који регулишу развој биофилмова;
- циклични нуклеотидни секундарни преносиоци, као што је бактеријски секундарни преносилац c-di-GMP. Он регулише стварање и ширење биофилма тако што контролише покретљивост бичева, везивање и продукцију екстрацелуларних полисахарида;
- протеини повезани са биофилмом, који чине основу и изграђују матрикс биофилма.

Структура биофилма се састоји од микроколонија унутар којих су ћелије утиснуте у матрицу екстрацелуларне полимерне супстанце (ЕПС). Микроколоније су одвојене хидродинамичким каналима који представљају средство за комуникацију

међу ћелијама и дозвољавају размену нутријената, кисеоника и детритуса процесом дифузије. Разлике у структури биофилма потичу од врсте микроорганизама који формирају биофилм. Такође, на структуру биофилма утичу хидродинамички услови, деловање спољашњих фактора, доступност хране, интеракције са нецелуларним материјама из окружења (Donlan and Costerton, 2002).

Матрикс биофилма одређује архитектуру и облик биофилма. ЕПС је главна компонента матрикса и обухвата од 50% до 90% укупног органског угљеника биофилма. Иако се физичке и хемијске особине ЕПС-а различитих биофилмова разликују, главна компонента код свих су полисахариди. Полисахариди ЕПС-а садрже велику количину воде (97%) услед везивања водоника. Синтеза ЕПС-а зависи од доступности хранљивих материја, посебно азота и фосфора. Стимулативно на синтезу ЕПС-а може утицати и инхибиција раста микроорганизама. Поред структурне функције, друга главна функција матрикса је да обезбеди заштиту. ЕПС спречава дехидратацију биофилма и повећава отпорност биофилма на антимикробна средства. Матрикс такође служи као баријера токсинима и штити од предатора. Више информација о ЕПС-у дате су у поглављу Екстрацелуларни полимерни матрикс.

Формирање биофилма подразумева низ различитих фаза које се састоје из реверзибилне и иреверзибилне адхезије, матурације и одвајања (Сл. 1). Биофилм се формира захваљујући *адхезији*, способности микроорганизама да се причврсте за влажну површину. Микроорганизми се причвршћују за површину захваљујући деловању слабе Van der Waals-ове силе (Kjelleberg and Givskov, 2007). Микроорганизми се боље везују за храпаве и неполарне површине (Donlan, 2002). Следећи корак у формирању биофилма је *матурација* (сазревање) или тродимензионални раст биофилма. Након иреверзибилне адхезије (везивања), организми почињу да расту и агрегирају у микроколоније. Почиње продукција екстрацелуларних полимера, а организми бивају уграђени у високохидратисани матрикс. Завршни корак раста биофилма је дисперзија или *одвајање*, које резултира деадхеренцијом (отпуштањем великог броја појединачних ћелија или мањих агрегата из унутрашњости биофилма) микроорганизама из структуре биофилма. Хидродинамична снага и брзина притицања течности резултира ерозијом биофилма, у којима се мали сегрегати биофилма елиминишу. Истраживања су показала да је стопа одвајања већа код дебље формираних биофилмова (Kurladze, 2007).



Слика 1. Фазе формирања биофилма (1. реверзибилна адхезија; 2. иреверзибилна адхезија; 3, 4. матурација; 5. одвајање и проливање ћелија (извор: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552112004231>)

Екстрацелуларни полимерни матрикс представљају полисахаридна влакна које продукују саме ћелије микроорганизама у биофилму, што су и потврдиле слике снимљене електронским микроскопом. Полисахаридна влакна матрикса не само да позиционирају ћелије микроорганизама у биофилму већ имају улогу у одржавању и концентрисању дигестивних ензима. Заправо, матрикс представља идеалан резервоар за складиштење екстрацелуларних ензима (захваљујући акумулационим и сорпционим способностима биофилма) (Sinsabaugh et al., 1991). Како би се апсорбоване супстанце разградиле, екстрацелуларни ензими делују на супстанцу при чему долази до биоразградње, што доприноси процесима самопречишћавања. Може се рећи да се у оквиру матрикса, а помоћу ензима, врши рециклирање при чему се као крајњи производ добијају хранљиве материје које обезбеђују опстанак микроорганизама (Decho, 2000). Услед блиског физичког контакта долази и до преноса хранљивих материја из једног организма у други (Flemming 2016a; Flemming et al., 2016b). Задржавање егзоензима и ензимска активност у матриксу, настају као последица интеракције између липазе и соли алгинске киселине, нпр. код *Pseudomonas aeruginosa*, што је потврђено биохемијским експериментом (Tielen et al., 2010).

Термин *екстрацелуларна полимерна супстанца (ЕПС)* је дефинисао Geesey 1982, према Flemming, 2016b) као супстанцу биолошког порекла која учествује у формирању микробних агрегата. У природи, ЕПС постоји у виду високохидратисаног гела (98% вода), кога изграђује мрежа влакана коју производи конзорцијум (заједницу) микроорганизама (укључујући и прокариоте и еукариоте). Влакна су изграђена од полисахарида, мада је уочено и присуство протеина. Значење појма је даље еволуирало, тако да је на интернационалном скупу “Biofilm workshop”, ЕПС дефинисан као екстрацелуларна полимерна супстанца која је изграђена од протеина, нуклеинске киселине и липида, што је супротно од термина “егзополисахариди” која покрива постојање само једне компоненте која гради матрикс (Flemming, 2016b). У скоро више од 2000 научних радова термин “бактеријски егзополисахариди” се поистовећују са “ЕПС” термином, што доводи до конфузије. Међутим, термин “ЕПС” је устаљен са напредовањем у истраживању са аспекта мултиспецијских биофилмова. Термин ЕПС је постао стандардни термин за научнике који се баве истраживањем биофилмова (Wingender et al., 1999a, 1999b).

Грађа ЕПС је добро структурирана што су потврдили јасни снимци добијени коришћењем конфокалне ласерско скенирајуће микроскопије. Матрикс ЕПС-а не представља само аморфни гел, већ да је структуриран и изграђен од различитих компоненти и зона. Примена флуоресцентних боја које боје матрикс биофилма и врше диференцијацију ћелија и матрикса у биофилму, открива невероватно сложену структуру природног биофилма (Flemming, 2016b).

ЕПС функције се најчешће повезују са ткз. “појавним својствима” биофилма (Flemming, 2016a) при чему аутор сликовито наводи да се биофилм може сматрати “градом микроба” (Watnick and Kolter, 2000), док ЕПС у том граду представља “кућу у којој ћелије биофилма бораве” (Flemming et al., 2007). У ствари, матрикс је идентификован као главна компонента која је задужена за настанак “појавних својстава” биофилма са чиме је повезан успешан начин живота микроба у оквиру биофилма. “Појавна својства” су формирање нових структура, активности, особина које настају током процеса формирања биофилма али и као последица само-организовања унутар биофилма (Corning, 2002, према Flemming, 2016a). Унутрашњост биофилма се одликује високом стопом биодиверзитета, сложеношћу, динамичким и синергистичким интеракцијама које укључују размену гена при чему долази до настанка мултицелуларних карактеристика (Flemming, 2016a). Компоненте које улазе у састав матрикса, попут макромолекула, имају веома важне функције у животу ћелија

биофилма. Неке од функција компоненти ЕПС су: адхезија, агрегација, кохезија биофилма, задржавање воде, заштитна баријера од антимикуробних агенаса, сорпција поларних и аполарних органских материја, неорганских јона, микрочестица, ензимска активност, пренос гена између ћелија, размена интрацелуларних информација, донор и ацептор електрона, продукција и везивање ензима, итд. (Flemming et al., 2016a).

Након што ћелије продукују ЕПС, он се може модификовати током животног циклуса биофилма у коме ћелије константно ремоделирају своје окружење. У раду Flemming (2016b) дат је преглед ЕПС модификација и структуре матрикса након екскреције. Неке од микробних модификација су варијације у саставу ЕПС-а током развоја мешовитих биофилмова, при чему као резултат настаје ЕПС са другачијим својствима, попут резистенције на ензиме који разграђују ЕПС, итд.

ЕПС представља примарну структурну компоненту микробиолошког микроокружења и има утицај на физичке особине биофилма (стабилизација и заштита микроколине). Активности ћелија унутар биофилма могу бити појачане продуковањем ЕПС. Sutherland је још 1982. описао физичко стање ЕПС-а као континуум, чији облик варира од гела до потпуно раствореног стања, течности (Decho 2000).

Улога биофилмова у биогехемијским процесима зависи од физичких и хемијских својстава ЕПС-а. До краја двадесетог века је било релативно мало информација о хемијским својствима ЕПС-а изолованих од микробиолошких култура из природе (Decho, 2000). Велики број студија је испитивао физичко-хемијске интеракције полимерних молекула са аспекта формирања полимера. Полимери су изграђени од мреже молекула међусобно повезаних хемијским или физичким путем при чему се испољава јединствен скуп физичких својстава. Микроанализама је откривено да је микробиолошки гел изграђен од полимера који су богати Са, а сиромашни Mg и P (Chin et al., 1998). Лабораторијске студије су показале да мале промене у функционалним групама могу да мењају својства полимера. Чвршће везани полимери имају тенденцију да задрже воду и на овај начин обезбеде хидратацију ћелијама у процесу десикације. Код неких биофилмова се претпоставља да је главна улога продуковања ЕПС-а управо задржавање воде у неповољним условима (Potts, 1994). Та физичка ултраструктура међусобних интеракција ЕПС-а и даље није довољно добро објашњена (Decho and Gutierrez, 2017). Ипак, исти аутори у свом прегледном раду наводе да „молекули ЕПС матрице формирају тродимензионалну архитектуру у којој ћелије могу да локализују ванћелијске активности и спроводе кооперативне/антагонистичке интеракције које слободноживеће ћелије не могу да остваре“.

Локализација екстрацелуларних ензима је у близини ћелија унутар биофилма, што Норре још 1991. наводи као потенцијално важан, али изненађујуће мало истражен аспект. Екстрацелуларни ензими нису у директном контакту са ћелијском мембраном, већ их секретују саме ћелије како би се извршила хидролиза органских материја на мање олигомерне и мономерне компоненте које ћелије директно могу преузети (Decho, 2000). Активност екстрацелуларних ензима у воденом окружењу је посматрана мерењем флуоресценције *metilumbeliferalne* (MUF) супстанце. Такође, ензимска активност је праћена употребом *fluorescently-labeled* (FLA-) полисахарида при чему је величина полисахарида, пре и после микробиолошке хидролизе, квантитативно испитана и мерена је стопа хидролизе (Arnosti, 1996). Претпоставља се да екстрацелуларни ензими могу имати важну улогу у дисперзији или ослобађању микробних ћелија из биофилма. Велики број екстрацелуларних ензима које продукују микроорганизми имају хидролитичке функције (*P. aeruginosa*). Hoffman и Decho, 1999. године су претпоставили да ензими могу бити локализовани у хидрофилним регионима

који се јављају у матриксу, што се може потврдити помоћу конфокалног ласерског микроскопа (Decho 2000).

У наредном периоду и овом проблему је посвећена пажња. Ikuma et al., (2013) су испитивали локализацију екстрацелуларних ензима у матриксу биофилма, док су Decho and Gutierrez (2017) у ревијалном раду сумирали сазнања о ензимима екстрацелуларне полимерне супстанце (ЕПС) биофилмова у океанским системима. Поменути аутори наводе да резултати многих истраживања показују да ЕПС доприноси ефикасном трофичком преносу загађујућих материја и да представљају неку врсту рефугијума за патогене ћелије у моринским екосистемима. Такође, ти секретни значајно доприносе опстанку у екстремним срединама, од заједница које се развијају на морском леду преко хиперсалиних система до хидротермалних извора на океанском дну (hydrothermal vent) са високим температурама и притиском.

Недавни резултати указују да ензими могу бити везани за полисахариде преко сулфхидралне везе. Broeker et al. (2018) су извршили карактеризацију хемицелулолитичких гликозидних хидролаза бактерије *Clostridium stercorarium* који могу имати индустријску примену у оптимизацији разградње полисахарида и хемицелулозе.

1.5.2. Односи микроорганизама унутар индивидуалних и мешовитих биофилмова

Садашња разумевања о физиологији и структури мешовитих биофилмова су још увек неадекватна и заснивају се углавном на проучавању биофилмова кога чини једна врста организма. Протеклих деценија велики број студија бавио се проучавањем утицаја биофилмова на наш свакодневни живот. Elias и Vanin (2012) су објавили ревијалан рад у коме су навели да је биофилм наш први „комшија“ са којим смо несвесно увек у контакту. Чланак садржи свеобухватне информације о интеракцијама које се одвијају унутар мешовитих биофилмова. Ови научници истичу да постоји битна разлика између биофилма кога чини:

- 1) једна врста микроорганизама (нпр. *Escherichia coli*);
- 2) више врста микроорганизама (нпр. *E. coli*, *Proteus* sp.);
- 3) различите групе микроорганизама (нпр. бактерије, гљиве, протозое).

Разлика се огледа у интерспецијској динамици, као што су комуникација и/или конкуренција за хранљивим материјама и физичким ресурсима и која утиче на фенотип читаве заједнице унутар биофилма (Elias and Vanin, 2012).

Комуникација у оквиру биофилма

Одвја се путем продуката који су у стању да дифундују из једне у другу ћелију. Овакав вид комуникације представља социјално понашање које омогућава позитивне интеракције у оквиру индивидуалних и мешовитих биофилм заједница. Иницијација експресије гена, тек при граничној концентрацији међућелијских сигналних молекула (аутоиндуцера), назива се *quorum sensing*. При постигнутој граничној концентрацији аутоиндуцера, регулише се процес синтезе антибиотика, експресије фактора вируленције, адсорпције егзогене ДНК, коњугације, кретања, раста, стварања спора, токсина и др. Постоје два основна типа аутоиндуцерских молекула. Код грам позитивних бактерија то су кратки пептидни ланци, а грам негативне бактерије користе ацил-хомосерин лактоне (АHL). Иста бактерија може да синтетише различите АHL. На овај начин бактерије могу „осећати“ не само густину сопствене, већ и других популација бактерија у свом окружењу. Када је продукција аутоиндуцера повећана, долази до повећања густине ћелија у биофилму, мада повећана густина ћелија такође

зависи и од услова средине. *P. aeruginosa* показује up-регулацију гена algC током првог минута од адхезије на чврсту површину. Овај ген контролише ензим фосфоманомутаза који је укључен у синтезу егзополисахарида алгината (Stapper et al., 2004). *P. aeruginosa* у биофилму просечно за четири пута повећава транскрипцију algC гена у поређењу са планктонским ћелијама. Becker et al. (2002) су код ћелија *Staphylococcus aureus*-а у биофилму потврдили up-регулацију (повећану генску експресију) четири гена који кодирају синтезу ензима укључених у гликолизу или ферментацију. Претпоставка је да up-регулација настаје због дефицита кисеоника у биофилму, чиме се фаворизују процеси ферментације. Неки аутори истичу да је једна од важних предности живота у биофилму убрзана вредност коњугације која је потпомогнута физичком близином ћелија (Hausner and Wuertz, 1999).

Quorum sensing је показао важну улогу у развоју мешовитих биофилмова (Bjarnsholt et al., 2010). Неки од *quorum sensing* система су специфични за интраспецијску комуникацију, док су други задужени за интерспецијску комуникацију, при чему је омогућено да бактерија осети присуство других врста. Конкретно, AI-2 систем је универзалан и омогућава посредовану интерспецијску комуникацију (Federle, 2009), што је показано на примеру мешовитог биофилма који се формира у усној дупљи код људи. Интерспецијски *quorum sensing* укључује AI-2 систем који није ограничен само на интеракције између различитих врста бактерија, већ обухвата и интеракције између бактерија и гљивица. Гљива *Candida albicans* се такође може наћи у усној дупљи код људи (Cannon and Chaffin, 1999).

Поред AI-2 система, постоји и N-acilhomoserin lakton (AHL)-матични *quorum sensing* систем. Овај сигнални систем није универзалан, али подржава интраспецијску комуникацију. Постоји неколико студија које описују учешће AHL у развоју мултиспецијских биофилмова, што је показано на примеру *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*, при чему AHL-матични *quorum sensing* систем контролише експресију фактора вируленције и формирање биофилма (Elias and Banin, 2012). Riedel et al., (2001) су користили проточни биореактор како би показали да у мешовитом биофилму *B. cepacia* има способност да препозна неколико AHL сигнала које производи *P. aeruginosa*. Када је *B. cepacia* гајена са AHL-продукујућим *P. aeruginosa* у проточном биореактору, ове две врсте су се повезале и формирале мешовити биофилм. Међутим, када је *B. cepacia* гајена са AHL-непродукујућим *P. aeruginosa* формирао се биофилм са засебним колонијама. Други аутори су дошли до сличног закључка након испитивања интеракције мешовитог биофилма *P. aeruginosa* и *Agrobacterium tumefaciens* у проточном биореактору (An et al., 2006).

Wang и сарадници су показали да када *Streptococcus gordonii* расте са *Streptococcus mutans* у полистриенским микротитарским плочама, способност *S. mutans* да формира биофилм је нарушена. Утврђено је да *S. gordonii* лучи протеазу и на тај начин деградира *S. mutans* и онемогућава јој да формира колоније на површини микротитарског плејта (Wang et al., 2011). Пептидни сигнал тако може посредовати у интерспецијској интеракцији, што значи да једна врста може да координира понашање друге врсте при чему утиче на њену способност формирање биофилма.

Elias and Banin (2012) су саопштили да је утврђено да постоји још један *quorum sensing* сигнал – DSF (енгл. diffusible signal factor), који је одговоран за интерспецијске интеракције. Ради се о сигналном молекулу за масне киселине који је идентификован код неколико бактеријских врста, укључујући и *B. cepacia* и *P. aeruginosa*. Показано је да DSF има важну улогу у формирању биофилма и отпорности на антибиотике, а утиче и на понашање бактеријских врста у мешовитим биофилмовима. Као пример наводи се мешовити биофилм *P. aeruginosa* и *Stenotrophomonas maltophilia*. Када *S. maltophilia* лучи DSF, повећава се отпорност на полимиксин, при чему се мења структура *P.*

aeruginosa (Ryan et al., 2008). DSF може и да инхибира формирање биофилма суседних врста. Код мешовитих биофилмова, кога чине квасци и бактерије, DSF кога секретује *Burkholderia cenocepacia*, инхибира развој *Candida albicans* (Boon et al., 2008). Иако је DSF систем мање испитан, нарочито код мешовитих биофилмова, чињеница је да управо овај систем може имати кључну улогу у интеракцијама, управо код биофилмова кога чине квасац и бактерија (Elias and Banin, 2012). Новије студије су показале да генетичке варијације DSF система код врсте *Stenotrophomonas maltophilia* утичу на фенотип, вируленцију и резистенцију генотипски различитих клиничких изолата (Yero et al., 2020).

Комуникациони распон и агрегација (груписање) ћелија у оквиру мешовитих биофилмова су спорадично истраживани, а нешто од резултата приказано је у ревијалним радовима Elias и Banin (2012) и Berlanga и Guerrero (2016). Саопштено је да врсте у оквиру мешовитих биофилмова поседују невероватну способност комуникације и значајне комуникационе распоне. Утврђен је комуникациони распон на нивоу ризосфере (површина корена парадајза) помоћу *Pseudomonas putida* AHL биосензора. Ове бактерије, које су формирале биофилм, имају способност да комуницирају путем AHL сигнала *in situ*. У другом раду је наведено да размак између ћелија може бити важнији него количина присутних ћелија (Hense et al., 2007). Alotaibi и Bukhari (2021) указују да грам-позитивне и грам-негативне бактерије користе различите врсте *quorum sensing* система који укључују продукцију, детекцију и одговор на екстраћелијске сигналне молекуле, који су означени као аутоиндуктори.

1.5.3. Интеракције у биофилмовима

Интензивна проучавања током последњих неколико деценија допринела су познавању међусобних односа микроорганизама који формирају биофилмове (Liu et al., 2016). Тим испитивањима је утврђено не само да такве интеракције имају велики значај у обликовању укупне биомасе и просторне расподеле ћелија, већ и да доводе до усаглашене регулације генске експресије код врста које формирају биофилмове, као и до појаве нових особина у биофилмовима, као што су повећана отпорност на антибиотике, полутанте и слично. Међутим, још увек није у потпуности схваћено шта одређује стабилност тих заједница (Li and Tian, 2015).

Синергизам и антагонизам

Због непосредне близине и комплексне интеракције присутних врста представљају основне интеракције у оквиру мешовитих биофилмова. На пример, врсте унутар биофилма могу се такмичити за нутритивне ресурсе (*антагонизам*) или алтернативно, могу да се усклађују како би се хранљиве материје боље искористиле како би преживеле неповољне услове (*синергизам*). С обзиром да су мешовити биофилмови присутни свуда, подједнако и у природном и у клиничком окружењу, може се претпоставити да су синергистичке интеракције, нарочито ако врстама омогућавају егзистенцију, доминантније у односу на антагонистичке интеракције.

Синергистичке интеракције имају позитиван утицај на формирање мешовитих биофилмова (Zurančić et al., 2018).

Коегзистенција

Представља једну од честих интеракција у природном окружењу. Elias и Banin су навели неколико истраживања која указују да од бактерија које формирају мешовити биофилм у усној дупљи, свака врста има своју улогу (Elias and Banin, 2012). *Streptococcus mutans* је почетни колонизатор на површини зуба и заједно са *Actinomyces*

врстом стимулише развој биофилма *Lactobacillus*-а, при чему се формира један мешовити биофилм (Filoche et al., 2004). *S. gordonii* је додатни колонизатор на површини зуба и он обезбеђује услове који дозвољавају да се касније у мешовити биофилм прикључи *Porphyromonas gingivalis*. Овај процес сарадничке колонизације није пасиван поступак. *S. gordonii* експримира неколико гена који су задужени за “регрутацију” *Porphyromonas gingivalis* у мешовити биофилм. Укључују се гени који активирају биосинтезу екстрацелуларних полимера, интегритет ћелијског зида, адхезију, интерцелуларну и интрацелуларну сигнализацију. Гени који учествују у синтези екстрацелуларних полимера код *S. gordonii* врше експресију на ко-агрегационе рецепторе који се налазе на површини *Porphyromonas gingivalis*. Слично овоме, показано је да полисахариди ћелијског зида код стрептокока омогућавају да их друге бактерије препознају, при чему долази до агрегације (груписања ћелија) и формирања денталног плака (Elias and Banin, 2012).

Simmons et al. (2020) су, испитујући структуру биофилмова код бактерија осетљивих на фаге и оних које су отпорне њих, утврдили да осетљиве врсте бактерија коегзистирају у великој бројности/густини заједно са отпорним врстама захваљујући заштити коју пружа просторна структура биофилма. Отпорне врсте бактерија спречавају приступ фагима до осетљивих ћелија.

Коагрегација

Представља процес који се код бактерија у природном окружењу често дешава. Способност неких врста да формирају коагрегате зависи од компонената које изграђују ћелијски зид. Управо од компоненти од којих је ћелијски зид изграђен зависи адхезија једне врсте за другу. Нпр, две бактерије задужене за настанак периодонтитиса, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola*, ступају у синергистичке односе и формирају мешовити биофилм. У студији коју су спровели Yamada et al., (2005) *Porphyromonas gingivalis* је био иницијатор колонизације на полистиренском супстрату, након чега му се придружила врста *T. denticola*. Утврђено је да флагела (flgE) и цитоплазматични филамент (cfrA) *T. denticola* врсте имају важну улогу за агрегацију ове две врсте. Сматра се да покретљивост органела може служити као посредник у мултиспецијским биофилмовима (Yamada et al., 2005). Испитивана је и генска експресија као последица коагрегације код две иницијалне колонизаторске врсте зубног плака, *Streptococcus gordonii* и *Veillonella parvula*. Код врсте *V. parvula* је утврђено присуство 272 регулаторна гена, а код врсте *S. gordonii* је идентификовано 69 гена као потенцијалних регулатора коагрегације (Mutha et al., 2019). Способност оралних бактерија да формирају агрегате је кључни покретач којим се обликује природа биофилмова усне дупље.

Феномен да једна бактерија формира колоније на површини и обезбеђује услове који омогућавају другим врстама да се прикључе, није ограничен само на бактерије које формирају мешовити биофилм у усној дупљи (Leung et al., 1998). Забележено је и да се мешовити биофилм, кога формира једна врста из рода *Enterococcus*, ослања на присуство *E. coli*, која има већи афинитет према адхеренцији. Примећено је да се ћелије *E. coli* самоиницијално лакше везују за површину, олакшавајући *Enterococcus* врсти да се веже и касније формира мешовити биофилм (Leung et al., 1998).

Сарадња и коменсализам

Такође представљају честе интеракције у мешовитим биофилмовима. Elias и Banin (2012) наводе као пример метаболичку сарадњу при чему једна врста користи хранљиве материје, метаболише их и њихов нуспродукт касније користе друге врсте.

Овај феномен се често назива *метаболички коменсализам* и показан је код мешовитог биофилма кога чине *Pseudomonas putida* и *Acinetobacter* sp. Обе врсте могу да користе угљеник из бензил алкохола као извор енергије, тако да се између ове две врсте формира конкурентна интеракција за исти извор хране. Међутим, када се мешовити биофилм гаји на подлози која садржи бензил алкохол, *Acinetobacter* sp. производи бензоат кога метаболише *P. putida*, тако да је у овом случају доминантна кооперација а не конкуренција. Ова метаболичка интеракција је помогла да се утврди да *Acinetobacter* sp. борави у гоњим слојевима биофилма како би био ближи извору хранљивих материја. За разлику од *Acinetobacter* sp., *P. putida* борави у нижим слојевима (ближе површини), што му омогућава да користи бензоат, нуспродукт *Acinetobacter*-а. Метаболичке интеракције су показане и код бактерија из усне дупље људи. Утврђено је да *Veillonella* sp. користи млечну киселину коју продукује *Streptococcus oralis* ферментацијом шећера (Periasamy and Kolenbrander, 2010). Коменсализам утиче не само на повећање бројности, већ и на природу интеракција између микроорганизама који формирају мешовити биофилм (Khweek and Amer, 2018).

Разлике у генској експресији и ћелијски одговор

Свака интеракција, било да се ради о синергизму или конкуренцији, као и свака промена у животној средини, потенцијално доводи до промене у експресији гена. Elias и Banin (2012) дају преглед неколико студија које су пратиле промене у експресији гена током формирања мешовитог биофилма. Примећено је и да током ко-агрегације *Actinomyces naeslundii* и *Streptococcus gordonii* долази до експресије гена који су задужени за синтезу аргинина код *S. gordonii*. *S. gordonii* у одсуству или услед смањења количине аргинина у мешовитом биофилму са *A. naeslundii*, неће расти. *P. aeruginosa* у присуству *S. aureus* продукује веће количине екотоксина А. У овом случају долази до промена у експресији вирулентних гена (Elias and Banin, 2012). Када се биофилм *Veillonella parvula* помеша са биофилмовима *Streptococcus mutans*, *V. parvula* изазива промене у физиологији биофилма *S. mutans* при чему *S. mutans* постаје отпоран на антимикуробне агенсе. Када се биофилм *V. parvula* узгаја заједно са биофилмом *S. mutans* примећено је да долази до измењене генске експресије код *S. mutans*. Ово укључује и гене који су задужени за метаболизам пурина, метаболизам аминокиселина, синтезу протеина и продукцију ЕПС-а (Kara et al., 2006).

Последице интеракција

Интеракције у мешовитим биофилмовима у неким случајевима могу довести до еволуционих промена фенотипа код врста. Пример је раније описан у случају метаболичког коменсализма и односи се на двоспецијски биофилм, кога чине *Pseudomonas putida* и *Acinetobacter* sp., формиран у проточном биореактору са бензил алкохолом из кога су бактерије користиле угљеник као једини извор енергије. *P. putida* у овој студији није користио бензил алкохол као извор енергије, већ је зависио од присуства *Acinetobacter* sp. Истраживачи су приметили да је након неколико дана интимног контакта између *P. putida* и *Acinetobacter* sp. дошло до еволуционе промене фенотипа *P. putida*, тачније *P. putida* је добила “грубље колоније”. Овакав фенотип је постао наследан, а касније је утврђено да је дошло до мутације специфичног гена. Промене фенотипа које су се јавиле код *P. putida* биле су адаптациони одговор на физичко окружење и присуство *Acinetobacter* sp. како би се формирала стабилна и продуктивна мешовита биофилм заједница (Elias and Banin, 2012).

Други пример еволутивних промена је, на пример, када *S. aureus* и *P. aeruginosa* ступе у интеракцијске односе. У присуству *S. aureus*, *P. aeruginosa* индукује

ослобађање 2-heptil-4-hidroksikinoN-oksida (HQNO). Дуготрајно излагање HQNO доводи до селекције и фаворизовања генетичких варијанти (SCV) *S. aureus* отпорних на аминокликозид (Hoffman et al., 2006). HQNO инхибира раст многих грам позитивних бактерија (Machan et al., 1992).

1.5.4. Интеракције биофилма са другим организмима

Природни биофилм је изграђен од различитих микроорганизама, као што су бактерије, алге, гљиве, протозое и метазое. Састав заједнице микроорганизама у природном биофилму зависи од спољашњих фактора, као што су присуство хранљивих материја, присуство предатора и конкурената. Абиотички елементи, попут соли, муља и минерала, такође могу улазити у састав биофилма. Силикатне алге или дијатомеје (Bacillariophyta) су најранији и најбројнији колонизатори природних биофилмова. Оне се причвршћују за површину биофилма помоћу бројних механизма, као што су лепљива влакна, лепљиве супстанце и др. Када се неколико ћелија веже за површину биофилма, ћелије се деле и брзо долази до колонизације. Једноћелијске и филаментозне зелене алге, као и *Cyanobacteria*, такође улазе у састав биофилмова. *Cyanobacteria* су фотосинтетске бактерије које егзистирају као појединачне ћелије, влакна или колоније способне да врше азотофиксацију и преживљавају екстремне температуре. Ова способност се огледа у томе да искоришћавају азот у случају недостатка кисеоника или нутријента, а егзистенција је додатно подржана формирањем биофилма (Melo, 1992).

Присуство протозоа и метазоа мења састав и снабдевање храном у биофилму. Присуство протозоа редукује број бактерија у биофилму од 30% до 100%. Протозоа расту са нпр. ротиферама и нематодама. Студије су показале да и канали присутни између микроколонија у биофилму омогућавају кретање и исхрану протозоа и метазоа (Fried et al., 2000). Протозое егзистирају као појединачни организми или у виду агрегата у колонијама.

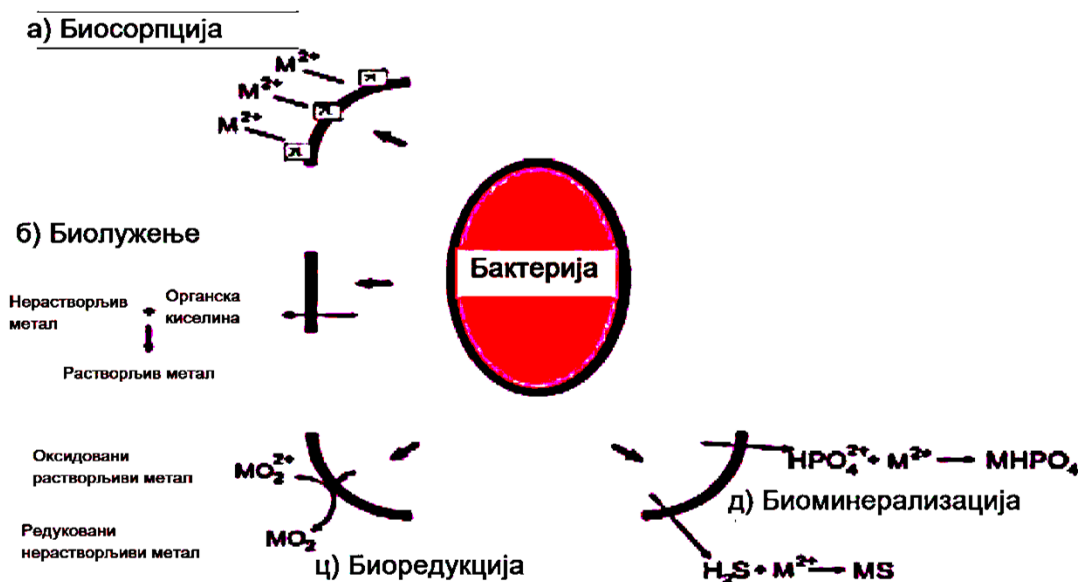
Метазоа користе бактерије и протозое као извор хране. Ротаторије (ротифера) су најчешћи бескичмењаци присутни на биофилмовима. Оне се хране бактеријама филтрирајући воду и на тај начин налажу на површину биофилма. Хране се и сесилним цилијатама које мигрирају по биофилму. Нематодe живе унутар матрикса у биофилму и хране се бактеријама, амебама, сесилним цилијатама и мртвим ћелијама. На овај начин, нематодe обезбеђују себи раст и пролиферацију нових ћелија у биофилмовима (Fried et al., 2000).

1.5.5. Интеракције микроорганизми – метали

Данас, када се повећава количина метала у окружењу и живим системима услед људских активности, шире се и наша знања о њиховом дејству. Природа метала и бактерија у окружењу доводи до успостављања интеракција (Ehrlich, 1997; Gadd, 2004). Микробиолошка активност мења солубилност метала и оксидационо стање док, са друге стране, метали поспешују раст микроорганизама (Ehrlich, 1997). Познавање метал-микробних интеракција и последица које ове интеракције могу проузроковати, неопходно је да би се разумели механизми који омогућавају микроорганизмима да постану отпорни на присуство метала. Метаболичка потреба микроорганизама за металима и потенцијална токсичност метала за микроорганизме, стварају услове за успостављање система неопходних за одржавање хомеостазе и контролом токсичности метала (Dong, 2010).

Микроорганизми могу мењати хемијске карактеристике тешких метала различитим механизмима, а неки од механизма се могу искористити за уклањање тешких метала из загађених средина (Сл. 2). У механизме који се могу употребити у санацији спадају:

- а) Биосорпција метала;
- б) Хетеротрофно биолужење метала;
- ц) Ензимски катализоване трансформације метала – биоредукција.



Слика 2. Интеракције микроорганизама и метала са потенцијалном применом у процесу биоремедијације: а) биосорпција; б) биолужење; в) биоредукција и г) биоминерализација (преузето и преађено из Lloyd, 2002).

Биосорпција

Подразумева везивање супстанце (нпр. метала) из гасовите или течне фазе на површину чврстог тела или у течности (апсорпција, адсорпција, хемисорпција), при чему је концентрација ове супстанце на њиховој површини повећана (Сл. 2а). Термин апсорпција употребљава се када се везивање врши у читавој запремини течног сорбента, а адсорпција када је у питању везивање на површини чврсте или течне материје гасовитих или течних супстанци. Хемисорпција подразумева грађење хемијске везе, поред физичког везивања супстанце за сорбент. Супстанца која се адсорбује назива се *адсорбат*, а тело на коме долази до адсорпције – *адсорбент*. Адсорбенти се карактеришу порозношћу и великом слободном површином. Површина 1 g адсорбента назива се специфична површина. Максимална количина супстанце која се под датим условима може узети за јединицу масе адсорбента назива се адсорпциони капацитет (Volesky, 1990).

Биосорпција је најједноставнији начин за уклањање метала када се нађу у раствору и многи микроорганизми биосорпцијом обезбеђују преживљавање у присуству тешких метала (Bruins et al., 2000; Mustapha and Halimoon, 2015). Површина ћелије бактерија и квасаца носи негативно наелектрисање на неутралној рН вредности и може адсорбовати значајне количине катјона метала (Сл. 2а) (Lloyd, 2002). Предност овог механизма је што се за сорпцију метала може употребити јефтина отпадна

биомаса, а мане су осетљивост на промене рН вредности и недостатак специфичности, што се може решавати употребом метода молекуларне биотехнологије.

Током година најбоље је испитана биосорпција тешких метала код квасца *Saccharomyces cerevisiae* (Massoud et al., 2020; Ririhena et al., 2018; Fadel et al., 2017; Wang и Chen, 2006; Brady и Duncan, 1994). Испитана је биосорпција Pb^{2+} од стране *Rhodotorula glutinis*, као и фактори који утичу на биосорпцију овог метала. Демонстриран је механизам размене јона приликом биосорпције, као и преципитација фосфата који су ослобођени из биомасе *R. glutinis* (Cho et al., 2001). *R. glutinis* КСТС 7989 продукује ЕПС који је идентификован као екополимер који садржи уронску киселину, која утиче на уклањање тешких метала из контаминиране средине. На основу овога, *R. glutinis* КСТС 7989 може се сматрати потенцијалним биосорбентом за третман отпадних вода (Cho et al., 2001). Приказана је и отпорност *Rhodotorula sp.* на токсичност тешких метала (Salinas et al., 2000), као и потенцијал *Rhodotorula sp.* у деградацији цијанометала и биолужењу (Rezza et al., 2001). Испитана је акумулација олова и кадмијума видљиве биомасе *R. rubra*, при чему је акумулација била слаба у поређењу са другим биосорбентима (Salinas et al., 2000). Описана је и биосорпциона ефикасност хемијски модификованог соја *Rhodotorula glutinis* (Bai et al., 2010; 2014).

Torges (2020) у ревијалном прегледу даје преглед најзначајних достигнућа и радова из ове области за период 2019-2020. година, како за биосорпцију метала, тако и органских једињења (боја, антибиотици и других загађујућих материја).

Хетеротрофно биолужење метала

Представља претварање метала из нерастворљивог облика у растворљиви описано је на примеру *R. rubra* и *R. glutinis*, које продукују органске киселине (цитратна, глуконска, оксална, уронска) помоћу којих могу превести метал из нерастворљивог облика у растворљиви (Сл. 2б), чиме се омогућава уклањање метала из контаминиране средине. Поред квасаца, испитана је и примена хетеротрофних бактерија *Microbacterium sp.*, *Curtobacterium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* и *Bacillus pumil* (Kazak et al., 2018). Поред примене у санацији загађења, овај механизам мобилизације метала вековима има примену и у лужењу метала из руда слабог квалитета (Jeremic et al., 2016; Ren et al., 2007; Rezza et al., 2001;).

Биоредукција

Представља ензимски катализоване трансформације метала и такође је доказана код квасаца који су развили широк спектар биохемијских путева који им обезбеђују толеранцију на присуство тешких метала, а могу се такође употребити у процесима биоремедијације (Сл. 2в). Пример за овакав вид интеракције је ензимски катализована редукација живе, којом се веома токсични Hg^{2+} јон преводи у нетоксичан елементарни Hg^0 деловањем ензима жива редуктазе (Сл. 2ц). На овај начин микроорганизми преживљавају присуство живе, а уједно и преводи у нерастворљиви елементарни облик који је лакше уклонити из контаминиране средине. На сличан начин, врста *Shewanella oneidensis* (Springthorpe et al., 2019) редукује леталне дозе $Cr(VI)$. Поред квасаца који редукују живу, постоји велики број других микроорганизма (*Spirochaetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Clostridium*, *Deinococcus-Thermus* и *Bacteroidetes*), који у анаеробним условима имају способност да користе метале као акцепторе електрона (Lv, 2019). Неки од метала који се на овај начин могу редуковати су Fe^{2+} , Cr^{6+} и As^{5+} , чиме се у одређеним случајевима драстично мења њихова солубилност и олакшава уклањање. *R. mucilaginosa* МТСС 9315 има способност редукације Cr^{6+} до Cr^{3+} . Показано је да се редукација Cr^{6+} до Cr^{3+} одвија екстрацелуларно.

Анализиран је супернатант квасца *R. mucilaginosa* МТСС 9315 при чему је потврђена ова претпоставка (Chatterjee et al., 2012).

Биоминерализација

Биоминерализација представља механизам у коме се тешки метали уклањају из средине тако што се врши њихова разградња (Ding et al., 2019). Биоминерализацијом метала бактерије продукују нерастворљиве сулфидне и фосфатне минерале (Слика 2г). Сулфат-редукујуће бактерије, као што су представници рода *Acidithiobacillus*, могу уклањати метале из средине индиректним механизмом (Lloyd, 2002). Филуми бактерија Nitrospirae и Proteobacteria обухватају неке од најстаријих магнетотаксичних бактерија које врше биоминерализацију (Lin et al., 2017). Механизам биоминерализације испитан је и код *Bacillus subtilis* J2 (Han et al., 2019). Преципитација, понекад истовремено са редукцијом, одвија се преко сулфида који настаје када се у процесу респирације сулфат користи као терминални акцептор електрона.

1.5.6. Биодиверзитет микроорганизама у срединама контаминираним тешким металима

Станишта загађена тешким металима данас представљају извор још увек неоткривених заједница микроорганизама и специфичних сојева микроорганизама (Tarekegn et al., 2020; Li et al., 2017; Gadd, 2010; Pieper and Reineke, 2000).

Доминантни родови микроорганизама који разграђују тешке метале су код бактерија: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* и *Bacillus*, код квасаца: *Rhodotorulla*, *Candida*, *Sporobolomyces* и *Aureobasidium*, а код плесни: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* и *Phanerochaete* (Li et al., 2017; Coelho et al., 2015; Lenart-Boroń and Boroń, 2014; Kuhad and Gupta, 2009; Cerniglia and Sutherland, 2001; Balba et al., 1998).

С обзиром на број и распрострањеност бактерија, односно њихову биомасу у односу на друге организме, бактерије представљају доминантне организме у загађеним екосистемима (Abatenh et al., 2017; Curtis et al., 2002). Стога није изненађујућа интензивна потрага за новим бактеријским популацијама управо у контаминираним срединама, које би могле бити искоришћене у биоремедијацији. Показано је да у загађеним срединама долази до смањења диверзитета бактеријских популација, а истовремено се дешава „обогаћивање“ дате средине специфичним популацијама (Röling et al., 2002; Juck et al., 2000). Бројне студије о бактеријском диверзитету у загађеним и незагађеним стаништима су показале да у незагађеним екосистемима организми са способношћу деградације метала, попут припадника рода *Pseudomonas*, чине мање од 0.1% популације бактерија које се могу култивисати, док у контаминираним стаништима псеудомонаде могу чинити и до 100% вијабилне популације бактерија (Atlas, 1981). Бактерије које се на присуство полутаната прилагођавају интензивном пролиферацијом, као што је случај са неким врстама из рода *Pseudomonas*, означавају се као организми са р-стратегијом (повећана репродукција). Насупрот њима се налазе организми чија је стратегија искоришћавање присутног полутанта, попут припадника родова *Rhodococcus* и *Mycobacterium*, и они представљају стабилнију популацију бактерија у загађеној средини (Atlas et al., 1998). Бактерије са способношћу деградације тешких метала су по први пут изоловане пре готово једног века, и до данас је изолован и описан велики број разграђивача тешких

метала који углавном припадају роду *Pseudomonas* и њему сличним родовима попут *Halomonas* sp. SZN1, *Alcanivorax* sp. SZN2, *Pseudoalteromonas* sp. SZN3, *Epibacterium* sp. SZN4, и *Virgibacillus* sp. SZN7 (Dell'Anno et al., 2020; Igiri et al., 2018; Seo et al., 2009). У водама контаминираним тешким металима, већину бактерија које се могу култивисати чине Proteobacteria, највећим делом *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* и *Sphingomonas* и Actinobacteria (пре свега *Rhodococcus* и *Arthrobacter*) (Hendrickx et al., 2006; Cavalca et al., 2004; Stapleton et al., 2000). Изгледа да је пролиферација бактерија са способношћу деградације једињења метала главна карактеристика адаптације бактерија у водама контаминираним овим једињењима. У водама контаминираним металима поред доминантне популације бактерија из рода *Pseudomonas*, селективно су стимулисане и Грам-позитивне *Mycobacterium*, *Arthrobacter* и *Nocardia* (Daane et al., 2001; Kanaly and Narayama, 2000). *Mycobacteria* представљају одличне кандидате за биоремедијацију вода контаминираним тешким металима и показале су се као потентни разграђивачи (Bogan et al., 2003), што потврђује и студија Azadi et al., (2017) у којој је извршена карактеризација биодеградационог потенцијала врста *Mycobacterium fortuitum*, *M. flavescens*, *M. paragordoniae*, *M. monacense*, *M. fredriksbergense*, *M. aurum*, *M. conceptionense*, *M. porcinum*, *M. simiae*, *M. celeriflavum*, *M. novocastrense*, *M. neoaurum* и *M. obuense* у различитим екосистемима у Ирану.

1.6. Биофилм и пречишћавање отпадних вода

Повећана потрошња воде, продукција већих количина отпадних вода, ограничен простор за третман, све сложенији стандарди и контрола квалитета вода су неки од најзначајнијих фактора који су довели до развоја технологије биофилма за пречишћавање отпадних вода. Како би наведени захтеви били задовољени развијени су нови процеси са већом компактношћу, оперативном стабилношћу и прихватљивим трошковима (Sehar and Naz, 2016; Gajin et al., 2007).

Побољшање биолошких перформанси (брзина реакције, контрола биофилма, старост биомасе, динамика популације) и хидродинамичке особине реактора (трансфер масе и мешање) зависе од укупне концентрације биомасе која се налази у систему (Jianlong et al., 2000). У оквиру система, микроорганизми расту и изграђују танак слој биофилма на специјално дизајнираним материјалима (шљунак, песак, тресет, пластика, сунђер), који се слободно креће по целој запремини реактора при чему се врши апсорпција органских материја и других штетних састојака. Основни принцип процеса је да се биофилм који се формирао на специјално дизајнираним носачима уводи у реактор паралелно са аерацијом. Како би се омогућила мобилност носача, подешава се испуштање ваздуха и уједно се врши и аерација и мешање носача (у аеробним условима). Носачи на којима се формира биофилм сматрају се погодним из више разлога. Они омогућавају заузимање веће површине, обезбеђују услове за бољи развој и раст биофилма, побољшавају нитрификациону стопу и омогућавају да се оствари денитрификација у аноксичним зонама реактора (di Biase et al., 2019; Shrestha, 2013).

Главне предности система у коме је примењен биофилм јесу продукција велике количине биомасе која обезбеђује стабилност под органским и хидрауличним оптерећењем, мања осетљивост на токсична једињења и лакша адаптација да полутанте користе као храну (Shrestha, 2013). Биофилм омогућава дуго одржавање биомасе, при чему се фаворизује развој спорорастућих бактерија (нитрификатора) и редукција њиховог спирања из система (Gajin et al., 2007). Значајном научном напретку допринео је индустријски развој нових биофилм реактора који су олакшали контролу и рад са

биофилмом (di Biase et al., 2019). Недостаци су лоше управљање по хладном времену и потенцијални проблеми са непријатним мирисима. Поред тога, биофилмови могу да се нађу и тамо где нису пожељни, као што су, на пример, системи за водоснабдевање, где могу да изазову корозију водоводних цеви (Butler and Boltz, 2014). Због тога се при дизајнирању технологија мора добро познавати сложеност хетерогених заједница микроорганизама које доводе до деградације супстрата.

1.6.1. Биореактори

Биофилм реактори садрже носаче или потпорни материјал на коме се формира биофилм. Отпадна вода која се третира је у директном контакту са биофилмом при чему је омогућена размена нутријената и продуката метаболизма између отпадне воде и биофилма. Биореактори су прилично једноставни за рад (Tekere, 2019). Смањени су таложење, рецикулација муља и флотација (подизање муља). Биолошка оксидација органског загађења се одвија посредством имобилисаних аеробних микроорганизама (дисимилација, асимилација и ендогена респирација). Отпадна вода заплускује носаче са фиксираним биофилмом кроз које дифундује ваздух (кисеоник), а који из слоја воде дифундује у биофилм. Микроорганизми који учествују у изградњи биофилма су они који деградирају органски материјал (Zhang et al., 2018). За почетну деградацију је задужен спољашњи слој биофилма (аеробни микроорганизми – од 0,1 до 0,2 mm дебљине). Органски материјал из воде се апсорбује на слузавом слоју биофилма. Како дебљина биофилма расте, кисеоник који путује у дубље слојеве биофилма не стиже јер се троши. Из тог разлога су и услови у биофилму који су дубље од површине анаеробни. Истовремено се, како дебљина биофилма расте, органска материја која се апсорбовала метаболише пре него што стигне до дубљих слојева биофилма. Због недостатка угљеника дубљи слојеви биофилма улазе у ендегену фазу и губе способност адхеренције (причвршћивања за површину). Вода са тог места спира зрели биофилм и на том месту почиње да расте нови биофилм. На брзину спирања биофилма утиче хидрауличко оптерећење, док органско утиче на брзину метаболизма (Gajin et al., 2007). Loukidou and Zouboulis (2001) су пратили брзину раста биофилма изолованог из санитарних отпадних вода депоније. Khan et al. (2011) су проучавали перформансе које утичу на раст биофилма и планктонских ћелија у мембранском биореактору.

Биолошка заједница биореактора

Биолошка заједница биореактора се састоји од анаеробних, аеробних и факултативних бактерија, гљива, алги и протозоа. Такође, присутне су и животиње сложеније грађе (црви, ларве инсеката и пужеви). Доминантне микроорганизме чине факултативне бактерије које заједно са аеробним и анаеробним бактеријама врше деградационе процесе у отпадним водама. Ближе површини присутне су бактерије попут *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*. У слузном слоју углавном су присутне филаментозне форме *Sphaerotilus natans* и *Beggiatoa*. У нижим деловима присутне су *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* (Gajin et al., 2007).

За уклањање отпада, али при ниским рН вредностима, одговорне су гљиве. Најчешће присутне врсте гљива су из родова *Trichoderma*, *Acremonium*, *Talaromyces*, *Raecilomyces*, *Cladophialophora* и *Saccharomyces*, као и различите врсте квасаца (Gajin et al., 2007). Заједнице гљива у биореакторима могу да буду јако разноврсне. Assress et al. (2019) су у три постројења за пречишћавање отпадних вода у Јужноафричкој Републици утврдили присуство гљива из чак 361 рода, односно из шест филума. Доминирали су представници филума Basidiomycota и Ascomycota, пре свега врсте из

рода *Naumovozyma*, *Pseudotomentella*, *Derxomyces*, *Ophiocordyceps*, *Pulchromyces* и *Raecilomyces*.

Микроалге представљају занимљив одговор на многе проблеме који су тренутно повезани са постројењима за пречишћавање отпадних вода. Фотобиореактори који користе отпадне воде као медиј за раст алги, могу отпадне воде третирати на биолошки начин, троше мање енергије и производе биомасу у радном процесу. Отпадне воде су изузетно доступан медиј за раст алги, јер се продукују у великим количинама, а инфраструктура за сакупљање и пречишћавање већ постоји у многим великим градовима. Због количине микроорганизама који су већ присутни у отпадним водама, резултирајућа заједница бактерија и алги у фотобиореактору био би робустан и способан да разгради многе полутанте у отпадним водама (Krustok, 2015).

Протозое (*Vorticella*, *Opercularia*, *Epistylis*...) и њихова улога у реактору се више базира на стабилизацији микробиолошке заједнице и одржавању баланса популације, него стабилизацији отпада (Gajin et al., 2007). Сматра се да је њихова примарна улога у уклањању чврстих партикула, што доприноси пречишћавању отпадних вода које постају бистрије и провидније (Madoni, 2011)

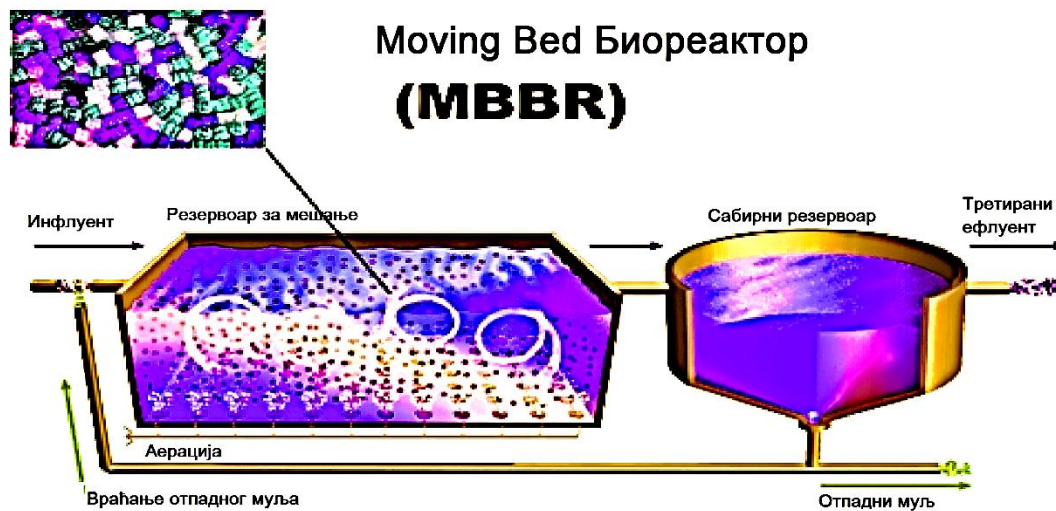
Животиње сложеније организације се хране биофилмом па се на овај начин омогућава висока стопа раста и брза разградња супстрата (Gajin et al., 2007). Са променама органског, хидрауличног оптерећења, састава отпадне воде, рН, температуре, који се мењају са дубином, јављају се и варијације у популацији заједнице (Gajin et al., 2007).

Биореактори у системима за пречишћавање отпадних вода

Биофилм и реактори са покретном и турбулентном испуном (Moving bed biofilm reactor – MBBR) у третману отпадних вода

Биореактор са покретним и турбулентним испунама (Moving bed biofilm reactor – MBBR) је једна од најбољих опција за третирање отпадних вода који укључује микроорганизме који расту као биофилм на површини суспендованих носача у реактору (Bhattacharya and Mazumder, 2021). MBRR је постао популаран у области пречишћавања отпадних вода због бројних предности, као што су висока ефикасност, мања продукција талога због дугог хидрауличног задржавања (Hydraulic retention time – HRT) и деловања биомасе микроорганизама, процес комплексовања је минималан итд. Унутар биореактора налази се висока концентрација активне биомасе (микроорганизми) која се користи за биолошки третман. Систем се заснива на паралелном деловању аерације и специјално дизајнираних носача (који имају улогу да обезбеде већу површину за формирање биофилма) (McQuarrie and Boltz, 2011; Rahimi et al., 2011). Оваква технологија омогућава претварање постројења за пречишћавање отпадних вода у одрживи технолошки систем (Leuva-Díaz et al., 2019).

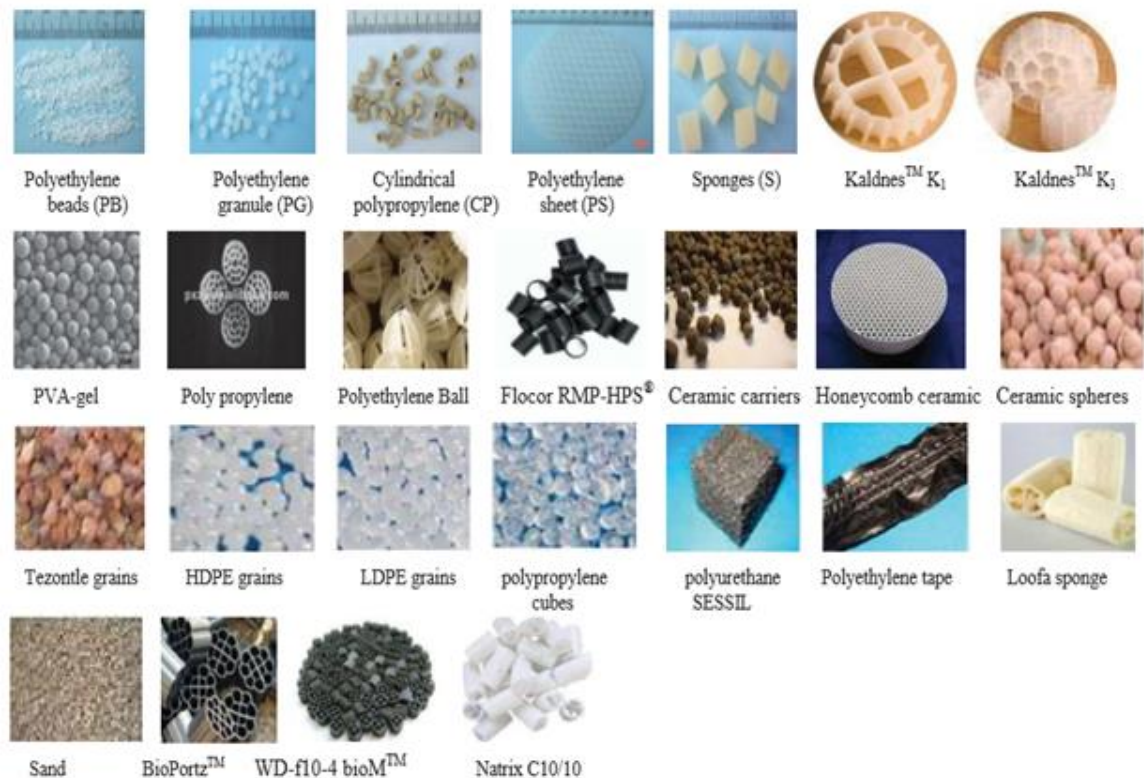
Постоји више типова биофилм носача који су развијени за примену у индустрији (Ødegaard et al., 2000; Ødegaard, 1999). На Слици 3 дат је приказ биореактора са Kaldnes покретним носачима.



Слика 3. MBBR технологија – полиетиленски биофилм носачи у рецикулационом базену (слика је преузета и прерађена са <https://www.sewagewaters.com/wastewater-treatment-systems/moving-bed-biofilm-reactor.html>)

Различити типови материјала се користе за MBBR. Материјали на којима се развија биофилм дизајнирају се тако да се добије велика унутрашња површина, а да густина буде мало мања од воде како би носач лакше плутао по води (Слика 4) (Shrestha, 2013).

На Слици 4 дат је приказ типова материјала се користе као биофилм носачи.



Слика 4. Типови материјала који се користе као биофилм носачи (Shrestha, 2013).

Биомаса се помоћу носача у аерационом резервоару може удвостручити (Jianlong et al., 2000). Микроорганизми продукују природан полимер који им помаже да се причврсте за површину носача што резултира формирањем биофилма (Tavares et al., 1995).

Због ефикасности (али и због јавног мњења), за третман отпадних вода најпрактичније је употребити микроорганизме изоловане из отпадних вода која треба да буде деконтаминирана (Horakova and Nemes, 2000). При изолацији и селекцији микробних култура поред деградационих способности води се рачуна и о способности за преживљавање и отпорности на евентуално присутне друге загађујуће супстанце (Fantroussi and Agathos, 2005; Thompson et al., 2005).

Због свега наведеног најчешће се припрема мешана култура, умножава се и као активна биомаса апликује на контаминирану локацију што се означава као реинокулација или аутохтона биоаугментација (Ueno et al., 2007).

1.6.2. Утицај неорганских полутаната (тешки метали) и органских полутаната (аутоиндустријске боје) на планктонске ћелије, индивидуалне и мешовите биофилмове

Употреба микроорганизама као биодеградационих агенаса је у сталном порасту због њиховог великог биодиверзитета и огромног катаболичког потенцијала. Деградационе способности су условљене катаболичким генима и ензимима (Khomenkov et al., 2008). Осим тога, микроорганизми поседују различите механизме за адаптацију на хидрофобне супstrate, као што су: модификација ћелијске мембране, производња површински активних супстанци итд. (Van Hamme, 2004). Поједини микроорганизми имају способност да разграде само одређене компоненте тешких метала, док мешане културе, микробне заједнице, присутне у води омогућавају већи степен деградације (Milić et al., 2009; Rahman et al., 2003; Mishra et al., 2001; Horakova and Nemes, 2000). Неке од компоненти се могу разложити само кометаболички – заједничким дејством више микроорганизама. Осим микроорганизама који примарно разлажу једињења метала, у води су присутни и други микроорганизми који за своју исхрану користе компоненте настале примарном разградњом. Афинитет метала ка везивању за ћелије бактерија, квасаца, филаментозних гљива објашњава се тиме да ћелије микроорганизама представљају одлична нуклеарна места за сорпцију јона метала (Rezić et al., 2011). У радовима је описано уклањање тешких метала различитим бактеријским механизмима (редукција метала, превођење метала из токсичног облика у облик који је биодоступан и мање токсичан) (Ali Redha, 2020; Kapoor and Virarghavan, 1995). Упркос овој чињеници, мали број сојева (врста) је нашао комерцијалну примену (Alluri et al., 2007).

У потрази за развојем биосорбената који би имали бољу апликативну али и комерцијалну примену у пречишћавању отпадних вода, последњих 15-ак година је пажња посвећена испитивању биосорпционог потенцијала биофилмова (Maurya and Raj, 2020; Mitra and Mukhopadhyay, 2016; Quintelas et al., 2009a, 2009b; Quintelas et al., 2008; Harrison et al., 2006). За разлику од планктонске заједнице, у оквиру заједнице биофилма се налази већи број бактеријских ћелија па је сорпциона снага већа у поређењу са једном бактеријском ћелијом. Метали показују афинитет да се вежу за молекуле биофилма (тачније екстрацелуларног полимерног матрикса), при чему долази до имобилизације метала процесом биосорпције или таложењем уколико дође до формирања металних комплекса (Flemming and Wingender, 2010). Бактеријски биофилм има способност уклањања јона метала концентрације од 0.005 до 0.1 mg/l (Kamika and Motba, 2013). Биореактори са биофилмовима пружају одређене предности у односу на

биореакторе у којима се користе суспендоване бактеријске ћелије (планктонска форма) (Wang et al., 2019). Биофилмом се обезбеђују повољности као што су већа биомаса, већа продуктивност и стабилност на промене из окружења (Rezić et al., 2011).

Дугогодишњи фокус микробиолога са планктонских бактеријских ћелија преусмерен је на бактерије које воде другачији начин живота (Hoiby et al., 2010). Формирајући биофилмове, фенотип ћелија унутар биофилма се мења и разликује од фенотипа планктонских ћелија (Fu and Wang, 2011). Способност микроорганизама да формирају биофилм омогућава им опстанак и у оним условима у којима планктонски облици истих врста не би могли да се развијају. Отпорност на загађења (нпр. тешким металима) може да буде вишеструко већа у односу на појединачне планктонске ћелије. Ово им даје еволутивну предност коју ми можемо да искористимо у циљу развијања и примене метода за смањивање негативних утицаја великог броја полутаната.

Поређењем толеранције индивидуалних биофилмова (Harrison et al., 2005b; Harrison et al., 2006) са толеранцијом мешовитих биофилмова показани су још бољи резултати (Golby et al., 2014; Jahid and Ha, 2014). Егзистенција микроорганизама у оквиру мешовитог биофилма је омогућена захваљујући способности успостављања синергистичких односа (Elias and Vanin, 2012). Управо ова способност мешовите биофилмове претвара у практичан алат који има бољи потенцијал и од индивидуалних биофилмова у биоремедијацији загађених средина (Perera et al., 2019; Golby et al., 2014).

Улога микроорганизама, тачније биофилмова, у уклањању ауто-боја је, за сада, још у експерименталној фази. Према нашим сазнањима, до сада није испитана толеранција и капацитет за уклањање ауто-боја микроорганизама који су изоловани из отпадних вода ауто индустрије. Barkusaraey et al. (2020) су узорковали микроорганизме из отпадног муља фабрике аутомобилских боја и том приликом су изоловали и идентификовали следеће врсте: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Micrococcus yunnanensis*, *Rothia amarae*, *Gordonia terrae* и *Brevibacillus agri*. Аутори су закључили да се, према сојевима добијеним у студији и присуству отпорних микроорганизама у муљу из фабрике аутомобилских боја, даље може истражити идеја биоремедијације помоћу микроорганизама који постоје у овој врсти муља, како би се смањило оптерећење загађењем и постигла усклађеност са стандардима депонија.

Како је одређивање нивоа толеранције микроорганизама битан сегмент испитивања за уклањање ауто-боја, један од циљева нашег истраживања био је тестирање толеранције биофилмова и њихових планктонских ћелија, ради касније селекције “идеалне комбинације” организама који формирају мешовити биофилм у циљу примене за ефективно уклањање полутаната из отпадних вода.

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

ЦИЉ докторске дисертације је побољшање ефикасности уклањања органских и неорганских једињења применом изабраних врста аутохтоних микроорганизама из отпадних вода, у форми појединачног и/или мешовитих биофилмова у лабораторијским условима. Циљ је налажење најбоље комбинације микроорганизама који формирају биофилм и његове примене у уклањању изабраних полутаната.

Основни циљ рада спроведен је кроз низ појединачних циљева:

- Изолација и идентификација микроорганизама из два различита типа отпадних вода (комуналне и индустријске отпадне воде);
- Испитивање отпорности, а за неке микроорганизме и биосорпционе ефикасности, изабраних лабораторијских изолата као и идентификованих микроорганизама у планктонској животној форми на изабране полутанте (раствори тешких метала: Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} и Ni^{2+} и пет основних боја из аутомобилске индустрије);
- Тестирање способности изабраних лабораторијских изолата као и идентификованих микроорганизама да формирају појединачне и мешовите биофилмове;
- Селекција микроорганизама са добрим потенцијалом за формирање биофилма и тестирање отпорности индивидуалних биофилмова на изабране полутанте;
- Селекција најотпорнијих биофилмова и проналажење комбинације микроорганизама са најбољим карактеристикама који успостављају синергистичке односе и формирају мешовити биофилм;
- Тестирање отпорности мешовитих биофилмова према изабраним полутантима коришћењем полистиренских плоча и визуализација и валоризација добијених резултата коришћењем флуоресцентне микроскопије;
- Тестирање отпорности и биосорпционе ефикасности изабраних појединачних и мешовитих биофилмова према изабраним полутантима коришћењем модификоване лабораторијске методологије коришћењем АБМ медиа носача;
- Квантификација синергистичких односа микроорганизама у оквиру биофилма, кроз евалуацију брзине раста, динамике и густине биофилмова, испитивање синтезе деградационих ензима, кроз спектрофотометријско одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе, као и одређивање резидуалне количине тешких метала у раствору UV и атомским пламеним спектрофотометром;
- Тестирање примењене биофилм методологије на АБМ медиа носачима за селекцију најуспешнијих мешовитих биофилмова у уклањању изабраних полутаната на лабораторијским врстама из колекције Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу;
- Тестирање и примена исте биофилм методологије за селекцију најуспешнијих мешовитих биофилмова у уклањању полутаната на изабраним изолатима из отпадних вода аутомобилске индустрије ка уклањању комерцијалних аутоиндустријских боја.

3. МАТЕРИЈАЛ

3.1. Апарати и инструменти

Апарати и инструменти коришћени у овом раду приказани су у Табели 2.

Табела 2. Коришћени апарати и њихова намена

Назив	Намена
Суви стерилизатор (Instrumentaria, Загреб)	Стерилизација лабораторијског посуђа
Аутоклав (VX-55 Systec, Немачка)	Стерилизација хранљивих подлога, физиолошког раствора, пластичног прибора. Стерилизација контаминираног материјала
Инкубатор (Сутјеска)	Раст микроорганизама под оптималним условима
Ламинарна комора (F8-42 Termovent)	Рад под стерилним условима
McFarland дензитометар (DEN-1, BioSan, Latvia)	Одређивање густине суспензије микроорганизама
Спектрофотометар (Iskra, Крањ, Словенија)	Квантитативна анализа узорка
Читач микротитарских плоча (ELISA -RT-2100C, Rayto, Shenzhen, China)	Квантитативна анализа узорка
Аналитичка вага (OHAUS Corporation Pioneer USA)	Прецизно мерење физичких мерних величина
Флуоресцентни микроскоп (Nikon, Ti-Eclipse, 400x, Аустрија)	Визуелна потврда и фотографисање присуства и утицаја тешких метала на формиране биофилмове
Светлосни микроскоп Olympus, U-RFLT-T, GmbH, (Germany)	Испитивање морфолошких особина добијених чистих култура (облик, присуство спора, бојење по Граму)
UV-VIS спектрофотометар	Одређивање преостале концентрације метала у медијуму
Центрифуга (HermLe Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany)	Издавање супернатанта из узорка
Водено купатило (Inako, Загреб, Хрватска/Vk6ERN)	Одвијање хемијских реакција на повишеној температури
pH-метар (inoLab 7110, Немачка)	Одређивање pH вредности
pH-метар (HANNA instruments, Румунија)	
Вортекс (VELP, Scientifica, Italy)	Мешање и растварање, хомогенизација узорака, техничке потребе
Ротациона мешалица (PSU-20I, Енглеска)	
Ултразвучна када	Процес соникације
Ротациони шејкер	Техничке потребе
Водено купатило за соникацију (Aquasonic 250 HT Ultrasonic Cleaner, VWR International, Radnor, Pensilvanija, SAD)	соникација узорака
Атомски апсорциони пламени спектрофотометар (Flame atomic absorption spectrophotometer – FAAS, Perkin Elmer 3300),	Одређивање преостале количине метала у медијуму

3.2. Хемикалије и хранљиве подлоге

3.2.1. Хемикалије

У овом раду коришћене су хемикалије:

1. Натријум хлорид (NaCl) - „Зорка фарм“ Шабац;
2. Етанол, Метанол, Етил ацетат, Глацијална сирћетна киселина „Зорка фарм“ Шабац - фиксирање узорака и биофилма;
3. Кристал виолет – Acros (Београд) - индикатор раста бактерија;
4. Акридин оранж, SYTO9, Con Texas Red – Molecular probes (Београд) –бојење ћелија бактерија и квасаца, бојење ЕПС-а, на флуоресцентном микроскопу;
5. Антибиотици: тетрациклин, доксициклин - Галеника, Београд, амфотерицин Б - Pfizer Inc. - Acros Organics (Београд), позитивне контроле у антимикуробним тестирањима;
6. Microgen ID A+B (AlfaMed) – test za identifikaciju enterobakterija (Alfamed, Београд)
7. API 20 C AUX (Biomerix, Београд) – тест за брзу идентификацију квасаца
8. Bradford reagens – квантификација биофилма
9. Bovine serum albumin – конструјисање стандардне криве
10. Тешки метали у облику соли - Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} (Sigma); Соли пореклом од $CdSO_4$, $ZnSO_4$, $NiSO_4$, $Pb(NO_3)_2$, $CuSO_4$, $HgCl_2$ (Sigma)
11. Аутоиндустријске боје: Основна боја Прајмер А-F107486-FH; Разређивач за испирање боје А-F107137-MF; Разређивач А-F107119-CN; Металик црвена боја 108 А-F107107-FM; Бела боја 268 А-F107117-CP.
12. Дитизон – „Alfamed“ Београд - реагенс за квантитативно одређивање преостале количине јона метала у медијуму
13. Редуковани глутатион (GSH, TwinLab, Мађарска).
14. Физиолошки раствор коришћен у овом раду направљен је:
 - ✓ натријум хлорид (NaCl) 8.5 g
 - ✓ дестилована вода 1000 mL
15. Кристал виолет боја у етанолу – радни раствор 20% w/v (бојење по Граму)
 - ✓ 1 mL боје
 - ✓ 10 mL дестилована вода
 - ✓ 40 mL раствор оксалата (1% w/v)
16. Луголов раствор (бојење по Граму)
 - ✓ J_2 0.3% w/v
 - ✓ KJ 0.7% w/v
 - ✓ $NaHCO_3$ 1% w/v
17. Фуксин у етанолу - радни раствор 2.5% (бојење по Граму)
 - ✓ 1 mL боја
 - ✓ 5 mL дестилована вода
18. Реагенс по Ehrlich-у
 - ✓ 8 g p-dimetilaminobenzaldehyda
 - ✓ 760 mL 96% етанола
 - ✓ 160 mL концентрована HCl
19. Раствор А 0.8% w/v (сулфанилна киселина у глацијалној сирћетној киселини)
20. Раствор Б 0.5% w/v (алфанафтиламин у глацијалној сирћетној киселини)
21. Радни раствор метил црвено 0,02%

- ✓ метил црвено 0,1 g
 - ✓ етанол 95% 300 mL
 - ✓ пречишћена вода до 500 mL.
22. PBS (Phosphate Buffered Saline) пуфер (pH 7.4):
- ✓ 8 g/L NaCl
 - ✓ 0,2 g/L KCl
 - ✓ 1,78 g/L Na₂HPO₄ × 2 H₂O
 - ✓ 0,27 g/L KH₂PO₄
23. Калијум фосфатни пуфер 50 mM
- ✓ 0.6 g NaH₂PO₄ у 90 mL dH₂O
 - ✓ 0.323g KCl
 - ✓ дестилована вода до 100 mL
24. Реагенси за одређивање укупне концентрације протеина у узорку методом по Lowry-ју.
- ✓ % CuSO₄·5H₂O,
 - ✓ 2% калијум натријум тартарат,
 - ✓ 2% Na₂CO₃,
 - ✓ mol/L NaOH,
 - ✓ Folin-Ciocalteu,
 - ✓ Стандард протеина (BSA) (Sigma Chemical, St. Louis, MO).
25. Реагенси за одређивање активности киселе и алкалне инвертазе (β -fruktofuranozidaza)
- ✓ Сахароза,
 - ✓ Стандард глукозе (Sigma, Aldrich),
 - ✓ Динитросалицилни реагенс,
 - ✓ Фосфатни пуфер (pH 8.0),
 - ✓ Натријум-ацетатни пуфер (pH 4.5).
26. Реагенси за одређивање активности алкалне протеазе
- ✓ 2% казеин,
 - ✓ 5% ТСА,
 - ✓ 6% Na₂CO₃,
 - ✓ Стандардни раствор L-тирозина (Sigma, Aldrich).
27. Реагенси за одређивање активности алкалне фосфатазе (ortofosfat-monoester-fosfohidrolaza)
- ✓ β -глицерофосфат,
 - ✓ гликолни пуфер (pH 9,0),
 - ✓ 10% ТСА,
 - ✓ амидол,
 - ✓ 60% РСА,
 - ✓ NH₄-молибдат.
28. Реагенси за одређивање активности алкалне фосфатазе
- ✓ *p* - нитрофенил фосфат, pH 8,8 (0.1M глицински пуфер са 1 mM MgCl₂).

3.2.2. Хранљиве подлоге

Основне хранљиве подлоге

У овом раду за култивацију и изоловање микроорганизама коришћене су следеће подлоге:

- Хранљиви агар (Торлак, Београд) – за култивацију микроорганизама.
 - ✓ пептон 1.....15 g
 - ✓ месни екстракт3 g
 - ✓ натријум хлорид (NaCl).....5 g
 - ✓ дикалијум хидроген фосфат (K_2HPO_4).....0.3 g
 - ✓ агар18 g

- Триптон соја бујон (ТСБ), (Торлак, Београд) – за изоловање, култивацију и тестирање великог броја микроорганизама.
 - ✓ Пептон од казеина Торлак.....17 g
 - ✓ Соја пептон.....3 g
 - ✓ Декстроза2.5 g
 - ✓ Натријум хлорид.....5 g
 - ✓ Калијум-хидрогенофосфат.....2.5 g

- Триптон соја агар (Торлак, Београд) – за култивацију и изоловање великог броја микроорганизама.
 - ✓ Пептон од казеина.....15 g
 - ✓ Соја пептон5 g
 - ✓ Натријум хлорид.....5 g
 - ✓ Агар15 g

- Сабоурауд декстрозни бујон (СДБ), (Торлак, Београд) – за изоловање, култивацију и тестирање гљива.
 - ✓ Декстроза.....20 g
 - ✓ Пептон Торлак.....10 g

- Сабоурауд декстрозни агар (СДА), (Торлак, Београд) – за изоловање и култивацију гљива.
 - ✓ Декстроза.....40 g
 - ✓ Пептон Торлак.....10 g
 - ✓ Агар.....20 g

- YPD (Yeast Extract – Peptone - Dextrose) бујон – за тестирање квасаца у експериментима уклањања метала
 - ✓ Екстракт квасца Торлак10.0 g
 - ✓ Пептон Торлак20.0 g
 - ✓ Декстроза20.0 g

Селективне, диференцијалне и комбиноване подлоге

За изоловање бактерија и биохемијске тестове (идентификацију) коришћене су хранљиве подлоге:

- Пептонска вода (Торлак, Београд, Србија) – за тестирање производње индола.

- ✓ Пептон Торлак10 g
- ✓ Натријум-хлорид5 g

- Simmons-ов цитратни агар (Торлак, Београд, Србија) – за тестирање коришћења цитрата.
 - ✓ Амонијум хидрогенфосфат..... 1 g
 - ✓ Калијум хидрогенфосфат 1 g
 - ✓ Натријум цитрат..... 2 g
 - ✓ Натријум хлорид 5 g
 - ✓ Магнезијум сулфат..... 0,2 g
 - ✓ Агар..... 15 g
 - ✓ Бромтимол плаво..... 0,08 g

- Christensen-ова уреа - за тестирање разлагања урее.
 - ✓ Пептон Торлак..... 1 g
 - ✓ Декстроza 1 g
 - ✓ Натријум-хлорид..... 5 g
 - ✓ Калијум-хидрогенфосфат..... 2 g
 - ✓ Уреа 20 g
 - ✓ Фенол црвено..... 0,012 g

- Метил црвено-Voges Proskauer (Торлак, Београд, Србија) – за диференцијацију колиформних микроорганизама.
 - ✓ Пептон Торлак..... 7 g
 - ✓ Декстроza..... 5 g
 - ✓ Калијум-хидрогенфосфат..... 5 g

- Сулфитни агар (Торлак, Београд, Србија) – за детекцију сулфито редукујућих термофилних анаеробних микроорганизама
 - ✓ Казеин хидролизат Торлак..... 10 g
 - ✓ Натријум-сулфит..... 0,5 g
 - ✓ Гвожђе(III)-цитрат 0,5 g
 - ✓ Агар 15 g

- Троструки шећер (Торлак, Београд, Србија) – диференцијална подлога за идентификацију ентеробактерија за тестирање способности ферментације лактозе, сахарозе и декстроze и ставрања водоник сулфида.
 - ✓ Пептон Торлак 20 g
 - ✓ Месни екстакт..... 3 g
 - ✓ Екстракт квасца..... 3 g
 - ✓ Лактоза..... 10 g
 - ✓ Сахароза..... 10 g
 - ✓ Декстроza..... 1 g
 - ✓ Натријум хлорид..... 5 g
 - ✓ Гвожђе (III)-амонијумцитрат..... 0,3 g
 - ✓ Натријум тиосулфат..... 0,3 g
 - ✓ Агар..... 12 g
 - ✓ Фенол црвено..... 0,024 g

➤ Брилијант зелени агар (Торлак, Београд, Србија) – селективна подлога за изоловање *Salmonella spp.*

- ✓ Пептон Торлак.....13 g
- ✓ Екстракт квасца..... 3 g
- ✓ Лактоза.....10 g
- ✓ Сахароза.....10 g
- ✓ Натријум хлорид.....5 g
- ✓ Агар.....15 g
- ✓ Фенол црвено.....0,08 g
- ✓ Брилијант зелено.....0,0125 g

➤ SS агар (Торлак, Београд, Србија) – за изоловање *Salmonella spp.* и неких *Shigella spp.* (високо селективна и диференцијална подлога)

- ✓ Пептон Торлак.....5 g
- ✓ Месни екстракт.....5 g
- ✓ Лактоза.....10 g
- ✓ Жучне соли.....8,5 g
- ✓ Натријум – цитрат.....8,5 g
- ✓ Натријум-тиосулфат.....8,5 g
- ✓ Гвожђе(III)-цитрат.....1 g
- ✓ Агар.....13,5 g
- ✓ Неутрал црвено.....0,025 g
- ✓ Брилијант зелено.....0,00033 g

➤ Шарман-ова подлога (Торлак, Београд, Србија) – за изолацију стафилокока и диференцијацију на основу њихове способности да ферментишу манитол

- ✓ Пептон Торлак.....10 g
- ✓ Месни екстракт.....1 g
- ✓ Манитол.10 g
- ✓ Натријум хлорид.75 g
- ✓ Агар.....15 g
- ✓ Фенол црвено.....0,025 g

➤ Todd Hewitt бујон (Торлак, Београд, Србија) – за продукцију стрептококног хемолизина нарочито за култивацију бета хемолитичких стрептокока групе А

- ✓ Tripton Torlak.....20 g
- ✓ Mesni ekstrakt.....7 g
- ✓ Dekstroza.....2 g
- ✓ Natrijum-hlorid.....2 g
- ✓ Natrijum-karbonat.....2 g
- ✓ Natrijum-hidrogenfosfat.....0,4 g

➤ Ендо агар (Торлак, Београд, Србија) – за доказивање присуства колиформних бактерија и идентификацију лактоза ферментујућих ентеробактерија и њихову диференцијацију од лактоза неферментујућих ентеробактерија.

- ✓ Пептон Торлак.....10 g
- ✓ Лактоза10 g
- ✓ Калијум хидрогенфосфат.....3,5 g
- ✓ Натријум сулфит2,5 g
- ✓ Агар15 g

- ✓ Фуксин0,4 g
- МасКонкеу бујон (Торлак, Београд, Србија) – потврда изолованих врста уз помоћ Ендо агара.
 - ✓ Пептон Торлак.....20 g
 - ✓ Лактоза.....10 g
 - ✓ Жучне соли5 g
 - ✓ Натријум хлорид.....5 g
 - ✓ Бромкрезол пурпур0,01 g
- Еозин метилен плави агар (Торлак, Београд, Србија) – за диференцијацију *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*.
 - ✓ Пептон Торлак.....10 g
 - ✓ Лактоза.....10 g
 - ✓ Калијум-хидрогенфосфат.....2 g
 - ✓ Агар.....15 g
 - ✓ Еозин Y.....0,4 g
 - ✓ Метилен плаво.....0,065 g
- Специфична подлога за тестирање разлагања масних киселина (липаза тест):
 - ✓ Пептон.....10 g
 - ✓ Натријум-хлорид.....5 g
 - ✓ Калицијум-хлорид.....0,1 g
 - ✓ Агар.....20 g
 - ✓ Tween 80.....0.5 g

Стерилизација, одређивање рН и других параметара, као и читавање резултата коришћених подлога вршено је на начин који је предвидео сваки произвођач.

4. МЕТОДЕ

4.1. Радни раствори тестираних супстанци (тешки метали и комерцијалне аутоиндустријске боје) – припрема

Отпорност планктонских ћелија микроорганизама и биофилмова испитана је у присуству следећих металних јона: Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} чији су јони пореклом из соли $CdSO_4$, $ZnSO_4$, $NiSO_4$, $Pb(NO_3)_2$, $CuSO_4$ и $HgCl_2$ (Sigma), као и у присуству аутоиндустријских боја приказаних у Табели 4. Осим отпорности микроорганизама тестирана је и њихова способност да исте супстанце уклањају и неутралишу из раствора.

Соли тестираних тешких метала су растворени у стерилној дестилованој води за добијање концентрованих раствора који се разблажују пре употребе. Аутоиндустријске боје су растваране директно у ТСБ и СДБ медијум на дан постављања експеримента. Концентровани раствори метала и боја су процеђени помоћу филтер шприца 0.22 mm у стерилне стаклене бочице и чувани су на собној температури до употребе. Радни раствори метала и боја су припремани у ТСБ медијуму, од концентрованих раствора, не више од 60 минута пре тестирања. Као контрола у тестирању отпорности лабораторијских изолата на присуство тешких метала коришћени су Амфотерицин Б и Тетрациклин.

4.1.1. Радни раствори соли тешких метала

Распон тестираних концентрација за упоредо тестирање планктонских ћелија и биофилмова (лабораторијских изолата) узета је према Al-Enzi и Al-Charrakh (2015).

Табела 3. Распон тестираних концентрација за упоредо тестирање планктонских ћелија и биофилмова (лабораторијских изолата)

Тестиране супстанце (метал/контрола)	Распон концентрација*						
Cd	19247	1925	192	19	-	-	-
Ni	3200	1600	800	400	200	100	-
Zn	16144	1614	161	16	-	-	-
Pb	2304	1152	576	288	144	72	36
Cu	2048	1024	512	256	128	64	-
Hg	84.16	42	21	10.5	5.25	2.63	-
Амфотерицин Б	15.15	7.58	3.79	1.89	-	-	-
Тетрациклин	15.15	7.58	3.79	1.89	-	-	-

* вредности приказане у табели су изражене у $\mu g/mL$

За изолате из отпадних вода распон концентрација је одређен на основу наших предходних истраживања деловања тешких метала на планктон. Вршена су и прелиминарна тестирања на биофилмовима, при чему је одабран опсег концентрација тако да у финалном тесту најнижа примењена концентрација не доводи до значајног одговора, тј. примењена концентрација не утиче на развој биофилма, а највиша концентрација изазива 100% одговор тест организма тј. концентрација је летална за биофилм. Распон тестираних супстанци, које су двоструко разблажене, приказане су у Табелама 4 и 5.

Табела 4. Распон концентрација тестираних метала коришћен за упоредо тестирање индивидуалних и мешовитог биофилм лабораторијских сојева

Тестиране супстанце	Распон концентрација* – двострука разблажења						
	7	6	5	4	3	2	1
Метал/Контрола							
Cd	834000	416925	208462	104231	52115	26057	13028
Ni	615000	307500	153750	76875	38437	19218	9609
Zn	645000	322500	161250	80625	40312	20156	10078
Pb	128000	64000	32000	16000	8000	4000	2000
Cu	128000	64000	32000	16000	8000	4000	2000
Hg	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81
Амфотерицин Б	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81
Тетрациклин	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81

* вредности приказане у табели су изражене у $\mu\text{g/mL}$

Табела 5. Распон концентрација тестираних метала коришћен за тестирање отпорности биофилмова и планктонских ћелија изолата из отпадних вода

Форма микроорганизма	Распон концентрација* – двострука разблажења							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Планктон	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81
Биофилм	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1562	781

* вредности приказане у табели су изражене у $\mu\text{g/mL}$

Коришћене концентрације у овом раду су високе и прелазе максимално дозвољене и граничне концентрације (Табела 1). Истраживање је планирано да обухвати широк опсег концентрација и он је изабран тако да покаже ефикасност биофилмова како у неким реалним оквирима, тако и у инцидентним ситуацијама.

Неутрализација тешких метала

Метали и метални катјони су неутралисани употребом 5 mM и 10 mM редукованог глутатиона (GSH, TwinLab, Мађарска). Ћелије микроорганизама користе GSH као оксидационо-редукциони пуфер како би елиминисале широк спектар неорганских токсина. Из тог разлога се GSH користи као средство за неутрализацију (Harrison et al., 2004a, Harrison et al., 2005a).

Неутрализација јона метала је неопходна. Глутатион је лиганд који везује јоне метала, тако да има важну улогу у транспорту, депоновању и метаболизму метала. Сулфхидрилна група цистеина у молекулу глутатиона има висок афинитет за метале и формира меркаптиде са неколико ендогених метала, као што су жива, кадмијум, бакар, селен, хром, олово и цинк. Једна од важних улога глутатиона је складиштење и транспорт цистеина, који се брзо аутооксидује у цистин, чиме се стварају токсични радикали кисеоника. Да би се спречила токсичност ове аутооксидативне реакције, већина непротеинског цистеина се налази у форми глутатиона (Wang and Ballatori, 1998). Глутатион се у ћелијама налази као учесник метаболизма, транспорта и заштите у ћелији. Укључен је у редукцију дисулфатних и других молекула, као и у коњугацији са једињењима егзогеног и ендогеног порекла. На тај начин он штити ћелију од штетног дејства слободних радикала кисеоника. Најважнија улога глутатиона је да као тиолно једињење делује као антиоксидат у ћелији што се остварује директним

уклањањем слободних радикала кроз неензимску реакцију, глутатион зависном редукцијом H_2O_2 и других хидропероксида уз глутатион пероксидазу (GPx) и детоксикацијом ксенобиотика и електрофила уз глутатион С – трансферазу (Parke and Sapota, 1996).

4.1.2. Радни раствори аутоиндустријских боја

Тестиране супстанце су примарне боје аутомобила из индустрије. Преглед тестираних супстанци и њихове ознаке су дате у Табели 6. Безбедносни листови свих тестираних боје, са детаљним саставом/информацијама о састојцима (оригинал, енглески језик), дати су у Прилогу 1.

Комерцијалне боје смо испитивали у различитим концентрацијама. Обзиром да за сада не постоје студије које су се бавиле испитивањем утицаја тестираних аутоиндустријских боја на планктонске ћелије и биофилм микроорганизама који су изоловани из отпадних вода постројења за пречишћавање из аутоиндустрије, прво су урађена прелиминарна тестирања.

Направљени су концентровани раствори у стерилним стакленим боцама. Боје као течност растворене су у ТСБ и САБ течним подлогама до одређених концентрација. Припремљени су на дан тестирања. Изведени су прелиминарни тестови, са одабраним опсегом концентрације. Највиша испитивана концентрација је двоструко разблаживана до најниже испитиване концентрације. За планктон, опсег концентрације је био 10–0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, док је за биофилм био 1000-15,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ – Табела 7 (биофилм тестираних микроорганизама, у односу на своје планктонске ћелије, је у прелиминарним тестовима показивао значајно већу отпорност на испитиване супстанце). Карактеризација тестираних боја је дата у прилозима у којима је приказан састава боја. Боје су комерцијалне.

Табела 6. Аутоиндустријске боје коришћене за тестирање отпорности биофилмова и планктонских ћелија изолата из отпадних вода

Назив производа	Код производа	Ознака у раду
Основна боја Прајмер	A-F107486-FH	- 1
Разређивач за испирање боје	A-F107137-MF	- 2
Разређивач	A-F107119-CN	- 3
Металик црвена боја 108	A-F107107-FM	- 4
Бела боја 268	A-F107117-CP	- 5

Табела 7. Опсег концентрација аутоиндустријских боја коришћен за тестирање изолата из постројења за прераду отпадне воде FCA

Форма микроорганизама	Распон концентрација* – двострука разблажења						
	1	2	3	4	5	6	7
Планктон	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	0.15
Биофилм	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.15

* вредности приказане у табели су изражене у $\mu\text{g}/\text{mL}$

4.2. Тестирани микроорганизми, узорковање, изолација и идентификација микроорганизама из отпадних вода

У овом истраживању на присуство тешких метала и аутоиндустријских боја тестирани су микроорганизми, лабораторијски изолати (комерцијални производ, изолат из контаминиране хране, изолат из природе), као и изолати из отпадних вода. Лабораторијски изолати су са изолатима из отпадних вода загађених тешким металима коришћени и за добијање тз. идеалне комбинације за формирање биофилма који најуспешније уклања тешке метале из окружења.

Микроорганизми (бактерије, квасци, филаментозне гљиве) које живе у отпадним водама су изоловани из отпадних вода из постројења за пречишћавање отпадних вода Цветојевац (Крагујевац, Србија) и фабрике за производњу аутомобила FCA (Fiat Chrysler Automobiles), из биореакционог и рецикулационог базена, почетком априла и почетком септембра 2016. године. Узорци отпадних вода са мешовитим културама микроорганизама прикупљени су у стерилним пластичним боцама и пренети у лабораторију за Микробиологију, Природно математичког факултета у Крагујевцу.

4.2.1. Изолација и идентификација бактерија из узорака отпадних вода

Из узорака отпадних вода изоловане су колоније бактерија које су биле најзаступљеније у испитиваним узорцима. Одабране колоније су пресејане на опште, диференцијалне, селективне и комбиноване подлоге (описане у делу 3. Материјал). Добијени изолати одржавани су коришћењем хранљивих подлога. Чисте културе бактерија добијене су пресејавањем одабраних изолата, методом исцрпљивања. Након 24-часовне инкубације чистих култура на хранљивој подлози при температурама од 27 и 37°C, извршено је испитивање морфолошких особина добијених чистих култура (облик, присуство спора, бојење по Граму) помоћу светлосног микроскопа (Olympus, U-RFLT-T, GmbH, Germany). Идентификација бактеријских изолата обављена је применом стандардних биохемијских тестова (наведене микробиолошке подлоге), а потврђена је применом брзог биохемијског API теста (Microgen).

Бојење по Граму

Бојење бактерија рађено је по процедури коју је описао Грам и заснива се на разликама у грађи ћелијског зида Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија. Кап бактеријске преконоћне културе је размазана на микроскопску плочицу и након сушења на ваздуху размаз је фиксиран на пламену. Препарат је бојен радним раствором кристал виолета (инкубација 2 минута), након чега је боја испирана водом. Потом је препарат инкубиран 2 минута са радним раствором Лугола. Вишак лугола је одливан, а препарат је испран етанолом, па дестилованом водом. Након одбојавања препарата додат је радни раствор боје фуксина (инкубација 30 секунди). По истеку инкубације препарат је испиран водом и сушен уз помоћ филтер папира. Препарати су посматрани под светлосним микроскопом.

Стандардни биохемијски низ за идентификацију бактерија

За фенотипску карактеризацију бактеријских сојева коришћен је сет стандардних биохемијских тестова (Tindall et al., 2007).

Липаза тест – Присуство липазе се утврђивало тестирањем способности бактерија да хидролизују Tween 80 на олеинску киселину и сорбитол. Бактерије се засејавају на

специфичну подлогу са Tween-ом 80, инкубирају 24 h на 30°C и уколико је реакција позитивна око колонија се стварају зоне просветљења.

Редуција нитрата – Овим биохемијским тестом се доказује способност микроорганизама да редукују нитрате у нитрите. Након засејавања, испитиване културе су инкубиране 96 h на 30°C. Затим је у епрувете додато по 100 µL раствора А, па раствора Б. Појава црвене боје је знак позитивне реакције.

Коришћење различитих извора угљеника – Бактерије за своје метаболичке процесе могу да користе различите изворе угљеника (фруктоза, глукоза, лактоза, декстроза, сахароза, малтоза, глицерол и манитол). Та органска једињења се користе као једини извор угљеника у облику супстрата (1% w/v) који се додаје течном медијуму. течном медијуму. Културе су гајене 48 h на 30°C.

Продукција H₂S – Велика количина бактеријских ћелија се езом захвата са чврсте подлоге а затим се преноси у епрувете са сулфитним агаром забадањем езе до дна подлоге. Натријум-сулфит служи као извор сумпора за бактерије које су способне да га користе. При томе се сулфит редукује до сулфида. Настали водоник-сулфид са гвожђе(III)- цитратом гради црни преципитат гвожђе сулфида у дубини подлоге. Црни преципитат је доказ да бактерија продукује водоник сулфид.

Раст на различитим концентрацијама NaCl – Испитивани сојеви су засејавани у 10 mL ТСБ медијума са растућим концентрацијама NaCl, од 1% до 10% (w/v) и инкубирани на 30 °C (250 обрт. у мин. у шејкеру са хоризонталном платформом). Раст микроорганизама праћен је 7 дана.

Коришћење цитрата – Испитивани микроорганизми су засејавани на Simmons-ов цитратни агар и инкубирани 48 h на 30°C. Промена боје подлоге из зелене у плаву указује да испитивани сој користи цитрате као извор енергије.

Испитивање присуства каталазе – Велика количина бактеријских ћелија је езом захватана са чврсте подлоге које су потом наносене на стерилну Петри шољу. На ћелије је сипано 1-2 капи 3% (w/v) водоник пероксида. Уколико испитивана врста поседује ензим каталазу долази до бурне реакције уз ослобађање мехурића кисеоника.

Испитивање присуства ензима цитохром ц оксидазе – Велика количина бактеријских ћелија је езом захватана са чврсте подлоге које су потом наносене на стерилан филтер папир натопљен оксидазним реагенсом (тетраметил-п-фенилендиамин дихидрохлорид). Уколико испитивана врста поседује ензим цитохром ц оксидазу долази до љубичасто плавог обојења на филтер папиру.

Хидролиза урее – Christensen уреа агар је након стерилизације разливан у искошене епрувете. Подлога разливена у епрувете је остављана да се стегне, након чега је подлога постала жуте боје. Засејавање је вршено по косини, а засејана подлога је инкубирана 24-72 h на 30 °C. Уколико микроорганизам разлаже уреу појављује се црвена (розе) боја.

Производња индола – Бактерије су засејаване у бујон и инкубиране 24 h на 30°C, након чега је додаван реагенс по Ehrlich-у (1 mL). Појава црвеног прстена означава да микроорганизам производи индол.

Метил црвено тест, МЦ – У епрувету са 5 mL инокулисане подлоге додати 5 капи 0,02% раствора индикатора метил-црвено. Црвена боја подлоге означава позитвну реакцију.

Voges Proskauer test, VP – У епрувету са 5 mL инокулисане подлоге додати 3 mL 5% α -нафтола (растворен у апсолутном алкохолу). Добро промућкати. Добија се замућен раствор боје коже (прљаво розе до наранцасто). Додати 1 mL 40% КОН (растворен у пречишћеној води) и добро промућкати. Љубичасто-црвена боја (прстен) означава позитивну реакцију.

Специјализовани биохемијски API тестови за брзу идентификацију Enterobacteriaceae

Microgen ID A+B (AlfaMed) – тест за идентификацију ентеробактерија је коришћен за прелиминарну идентификацију изолованих Enterobacteriaceae, оксидаза позитивних/негативних и Грам негативних бацила. За читавање резултата коришћен је Microgen идентификациони софтвер (MID60)

4.2.2. Изолација и идентификација гљива из отпадних вода

Након смештања узорак отпадних вода у микробиолошку лабораторију, извршена је и изолација гљива. Изоловане су колоније које су биле најзаступљеније у испитиваним узорцима. Одабране колоније квасаца су пресејане на Триптон соја агар (ТСА) са стрептомицином (спречава раст бактерија), а филаментозне гљиве на Сабоурауд декстрозни агар (СДА) са стрептомицином. рН подлоге је подешена на 6,5-6,8 додавањем раствора 1 mol/L NaOH и 1 mol/L HCl. Реизолација култура гљива вршена је на стерилисаном ТСА или СДА, без стрептомицина.

Чисте културе квасаца добијене су пресејавањем одабраних изолата различите морфолошке структуре уочене микроскопирањем, методом исцрпљивања. Након 48-72 часовне инкубације чистих култура на ТСА/СДА подлози извршено је испитивање њихових морфолошких особина помоћу светлосног микроскопа.

Идентификација чистих култура филаментозних гљива обављена је у Лабораторији за микробиологију и микологију, на Институту за биологију и екологију ПМФ-а, Универзитета у Крагујевцу, на основу морфолошких карактеристика раста гљива и применом кључа за идентификацију гљива. Идентификоване филаментозне гљиве су одржаване на косом СДА, чуване на $4^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ и пресејаване месечно у стерилним условима.

Специјализовани биохемијски API тестови за брзу идентификацију квасаца

У циљу прецизне детерминације и идентификације изолованих квасаца, идентификација је извршена применом брзог биохемијског API 20 C AUX теста (BioMérieux, Француска) у Лабораторији за микробиологију и микологију, на Институту за биологију и екологију, ПМФ-а у Крагујевцу. Добијени идентификовани изолати одржавани су коришћењем истих хранљивих подлога.

4.2.3. Организми и услови раста

За истраживање коришћени су микроорганизми изоловани из отпадних вода, као и лабораторијски сојеви. Лабораторијски сојеви су коришћени због поређења резултата ефикасности са сојевима изолованих из отпадних вода, због добијања ткз. Идеалне комбинације за формирање биофилма који најуспешније уклања тешке метале из окружења. У сврхе истраживања коришћени су само они микроорганизми који су успешно формирали биофилмове како сами, тако и у комбинацијама са другим микроорганизмима. Као контрола експеримента, за лабораторијске сојеве, коришћени су стандардни антибиотици (амфотерицин Б и тетрациклин), а припремљени су према описаној методи (Hawser and Douglas, 1994). За спровођење свих тестова као хранљиви

медијум одабран је Триптон соја бујон (ТСБ), како за планктонске ћелије, тако и за биофилмове бактерија и квасаца (Harisson et al., 2006). За филаментозне гљиве, коришћен је Сабоурауд декстрозни бујон (СДБ).

Суспензија микроорганизама је направљена методом директне колоније. Замућеност суспензије подешена је помоћу дензитометра (DEN-1, BioSan, Latvia), McFarland 1.0 тако да одговара 10^8 CFU/mL за бактерије и 10^6 CFU/mL за квасце (colony-forming unit – јединица за бројање бактерија и спора гљива у узорку). Суспензије спора филаментозних гљива испране су стерилном дестилованом водом, а она је коришћена за одређивање замућености на спектрофотометру (530 nm). Такве суспензије су затим даље разблажене до приближно 10^6 CFU/mL.

Свим изолованим и идентификованим микроорганизмима (планктонске ћелије) је тестирана отпорност на присуство тешких метала и боја из аутоиндустрије. За планктонске ћелије неких изолата је тестирана и способност уклањања истих из медијума.

Формирање биофилмова и квантификација

Способност формирања индивидуалних и мешовитих биофилмова, лабораторијских сојева, као и идентификованих микроорганизама из отпадних вода, испитана је у полистиренским микротитарским плејтовима са 96 отвора (SARSTEDT, Beograd) по описаној методи Adam et al., (2002a) са одређеним модификацијама. У сваки отвор плејта је додато по 100 μ L одговарајуће подлоге и 10 μ L суспензије микроорганизама. Плејтови су постављени у инкубатор на 26°C, 24 h за бактерије, 48 h за квасце и 72 h за филаментозне гљиве, за формирање индивидуалних биофилмова. За формирање мешовитих биофилмова, за све микроорганизме плејтови су остављени на инкубацији на 26°C, 48 h/72 h.

Потврда да се биофилм формирао извршена је помоћу кристал виолет (ЦВ) теста по методи Almeida et al., (2011) са одређеним модификацијама: након инкубације садржај из плејтова је уклоњен а додато је 50 μ L метанола 98% (vol/vol). 15 минута касније, садржај метанола је уклоњен а плејт је остављен да се осуши на собној температури. Затим је додато 50 μ L ЦВ (5 минута). Плејт је испиран три пута дестилованом водом, а затим је додато по 100 μ L глацијалне сирћетне киселине 33% (vol/vol). Квантификација биофилмова одређена је спектрофотометријским читавањем на читачу микротитарских плоча (OD_{650}) (ELISA -RT-2100C, Rayto, Shenzhen, China). Сви тестови су рађени у дубликату и резултати су били константни.

За тестове биосорпционог потенцијала лабораторијских изолата формирани су појединачни и мешовити биофилмови на стакленим поклопцима димензија 22×22 mm, који су уроњени у отворе микротитарских плоча са 6 отвора у којима су се налазили одабрани хранљиви медијум (10 mL) и суспензије тестираних микроорганизама (100 μ L) (McFarland 0.5 за бактерије; McFarland 1.0 за квасце; за формирање мешовитих биофилмова помешана је иста количина суспензија непосредно пре инкубације (Sternberg et al., 2014).

За одређивање биосорпционог потенцијала појединачних и мешовитих биофилмова микроорганизама изолованих из отпадних вода, као и квантификације истих, коришћене су плоче за тестирање са 6 отвора у које су стављени АМВ Media (Assisting Moving Bad Media) биофилм носачи, који су претходно стерилисани аутоклавирањем. У сваки отвор плејта додато је 10 mL медијума ТСБ (разблаженог стерилном дестилованом водом односа 1:3 (Beściak and Surmacz-Górska, 2011). Отвори плејта су инокулисани додавањем 100 μ L суспензије микроорганизама (McFarland 0.5 за бактерије; McFarland 1.0 за квасце; за формирање мешовитих биофилмова помешана је

иста количина суспензија непосредно пре инкубације) и постављени на инкубацију на температури од 25°C. Сваког другог дана током 10 дана, мењан је медијум аспирирањем и испирањем АМВ Media носача стерилним физиолошким раствором, а додавањем свежег медијума.

Квантификација биофилмова извршена је коришћењем Брадфорд протеинског теста (Kruger, 2009) првог, петог и десетог дана. Процедура за мерење биомасе биофилма формираног на АМВ Media носачу обухватала је скидање биофилма са носача тако што је коришћен процес соникације (ултразвучна кадица у присуству фосфатног пуфера). 2 mL сонифицираног узорка центрифугирано је 10 мин на 10000 обртаја. Ћелијски талог је ресуспендован додавањем 100 µL физиолошког раствора. Епрувете су затим изложене у воденом купатилу, остављене да садржај епрувета кључа 10 минута како би се протеини „растворили“. Аликвоти стандарда и узорака (20 µL) пренети су у епрувете у које је додато по 1 mL Брадфорд-а (реагенс коришћен за квантификацију биофилма). На основу линеарне зависности абсорбанце садржаја протеина квантитативно је одређена непозната концентрација протеина. Непозната концентрација протеина биофилмова очитана је из калибрацијског правца начињеног низом разблажења албумина говеђег серума (BSA) који је изражен као mg протеина/mL. Абсорбанца је очитана на UV-VIS спектрофотометру (OD₅₉₅) и упоређена са стандардом. За конструисање стандардне криве коришћен је албумин говеђег серума (BSA) чији је опсег концентрација био 125-1250 µL/mL (<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>).

Микроорганизми који су успешно формирали индивидуалне и мешовите биофилмове, коришћени су за испитивање отпорности биофилмова у присуству испитиваних супстанци (Harrison et al., 2004a). Различитим методама је испитивана и њихова способност да из медијума уклањају исте.

4.3. Тестирање отпорности, квантификација и потенцијал уклањања

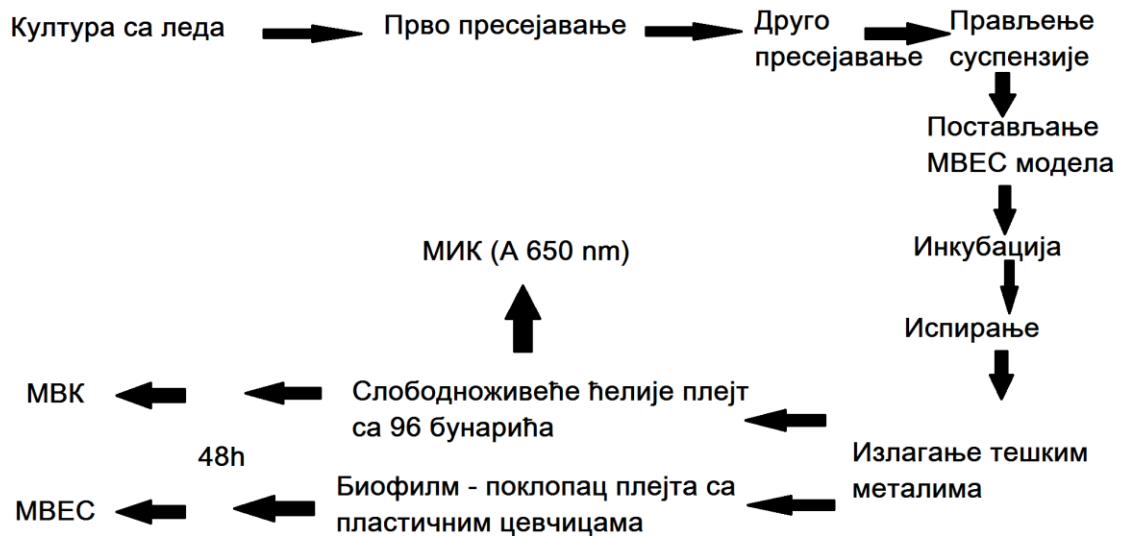
4.3.1. Тестирање отпорности и квантификација планктонских ћелија и биофилмова на присуство тешких метала и аутобоја употребом МВЕС™ – НТР (Minimum Biofilm Eradication Concentration – High Throughput Plates) теста

МВЕС™ – НТР (Minimum Biofilm Eradication Concentration - High Throughput Plates) тест омогућава истовремено праћење отпорности, као и поређења, планктонских ћелија и биофилма третираних микроорганизама. Поступак целог експеримента је приказан на Слици 5.

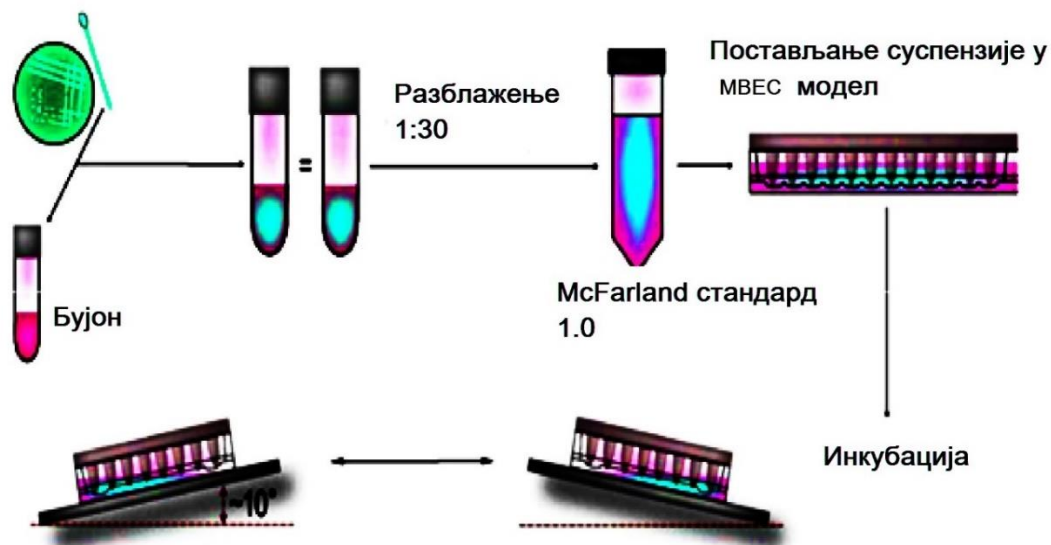
Припрема инокулума – суспензије

Криогене културе (-80°C) засејане су на коси ТСА и инкубиране на 26°C, а раст је праћен 48 h. Након инкубације (24 h на 36°C за бактерије, 48 h на 26°C за квасце и 7-14 дана на 26°C за филаментозне гљиве), направљена је секундарна култура која је инкубирана на косој ТСА и СБА подлози. Ова култура је затим коришћена као инокулум за тестирање.

У стерилне епрувете се сипа 1.5 mL медијума. Стерилном езом са површине косог агара узимају се колоније микроорганизама који се тестира и преносе се у епрувету са 1.5 mL медијума (1 mL суспензије (McFarland 1.0) се преноси у 29 mL медијума). У отворе микротитарског плејта (200 µl по отвору) се преноси укупно 22 mL овог инокулума (Сл. 6). Тиме је МВЕС™ – НТР тест модел постављен.

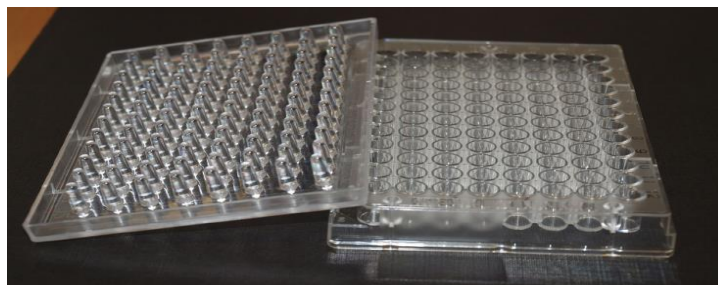


Слика 5. Сликровити приказ експеримента испитивања способности формирања биофилма и толеранције планктонских ћелија и биофилма у присуству тешких метала. (преузето и прерађено, Harrison и сар., 2006).



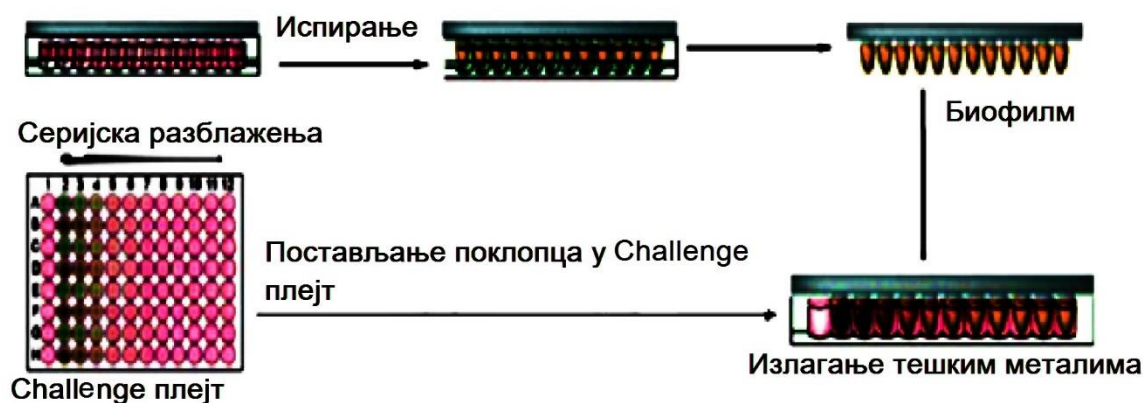
Слика 6. Поступак инокулације МВЕС™ – НТР тест модела одабраним микроорганизмима (преузето и прерађено, Harrison и сар., 2006).

МВЕС™ – НТР тест представља плејт у коме се истовремено тестирају и пореде планктонске ћелије и биофилм изабраног микроорганизма. Биофилмови се формирају и расту на клиновима од пластике, дужине 1 cm, спољашњег пречника 2.5 mm и унутрашњег пречника 0.5 mm, који су причвршћени за поклопац микротитарског плејта (Сл. 7). Поклопац са пластичним клиновима се пре тестирања ураћа у 1% раствор L-лизина (ради боље адхезије ћелија за површину) и инкубира 16 h на собној температури. Приликом затварања поклопца, клинови ураћају у отворе плејта и на тај начин пружају потпору за формирање биофилма. Овако постављен модел се премешта на инкубацију.

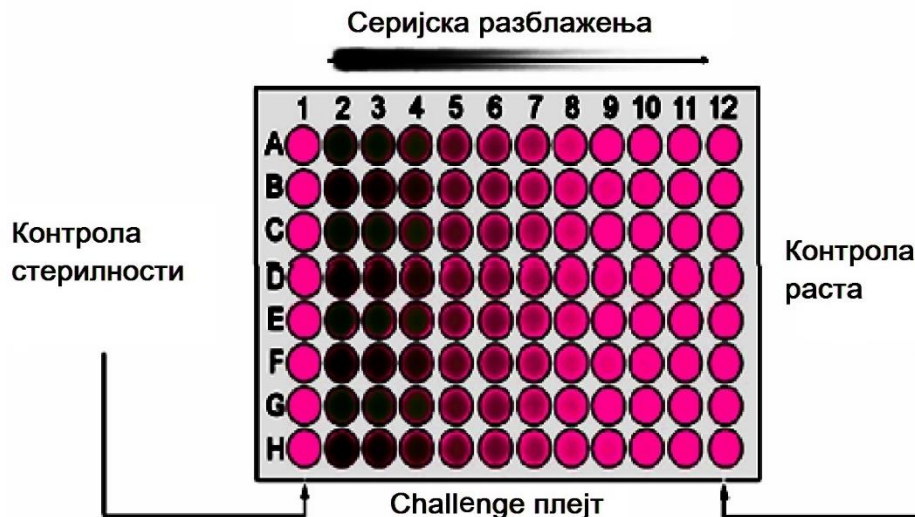


Слика 7. Плејт са 96 отвора и пластичним клиновима на поклопцу за формирање и раст биофилма (фото: Сандра Грујић).

Након инкубације, поклопац микротитарске плоче је пажљиво испран два пута стерилним PBS (Phosphate Buffered Saline) пуфером (Сл. 8). Затим је поклопац са пластичним клиновима, на којима је формиран биофилм, уроњен у плејт са свежим ТСБ коме су додате соли метала одговарајућих концентрација. Плејт је назван *challenge* плејт (Сл. 9) и служио је за излагање и планктонских ћелија и формираног биофилма тешким металима.

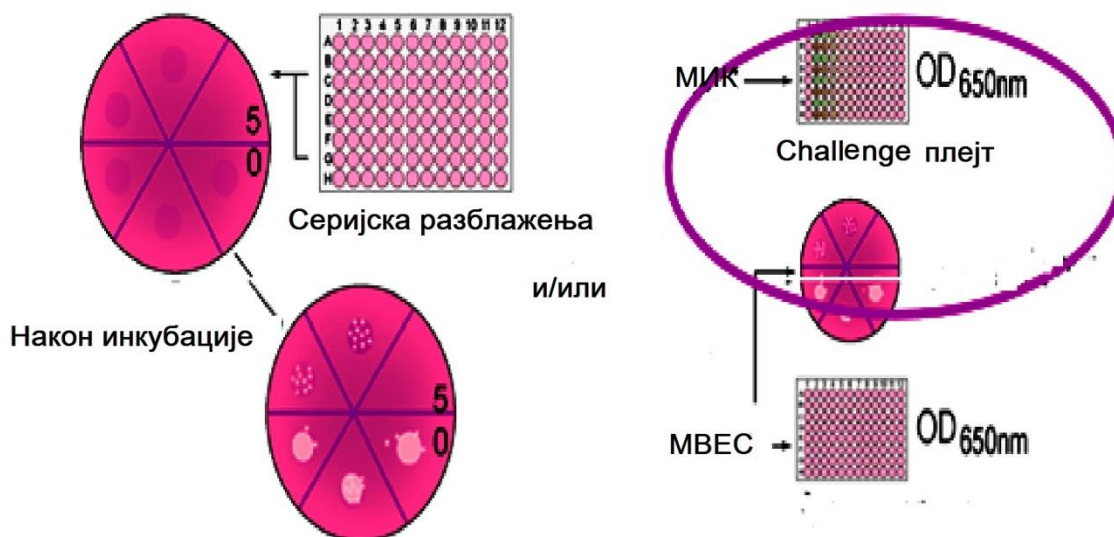


Слика 8. Шематски приказ излагања планктонских ћелија и биофилма тешким металима (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).



Слика 9. Постављање плејта за излагање формираног биофилма одабраним тешким металима (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

У истом плејту одређена је минимална инхибиторна концентрација (МИК) (након 48 h) и минимална летална концентрација (МЛК) (након 72 h) планктонских ћелија тестираних микроорганизама (Сл. 10) (Ceri et al., 1999). Током периода инкубације, неке од ћелија неће ући у процес формирања и састав биофилма. Ове ћелије задржавају свој планктонски фенотип и бивају изложене тешким металима у планктонском стању. Раст који се препознаје као замућење, у било ком отвору плејта, показује да су планктонске ћелије преживеле третман.

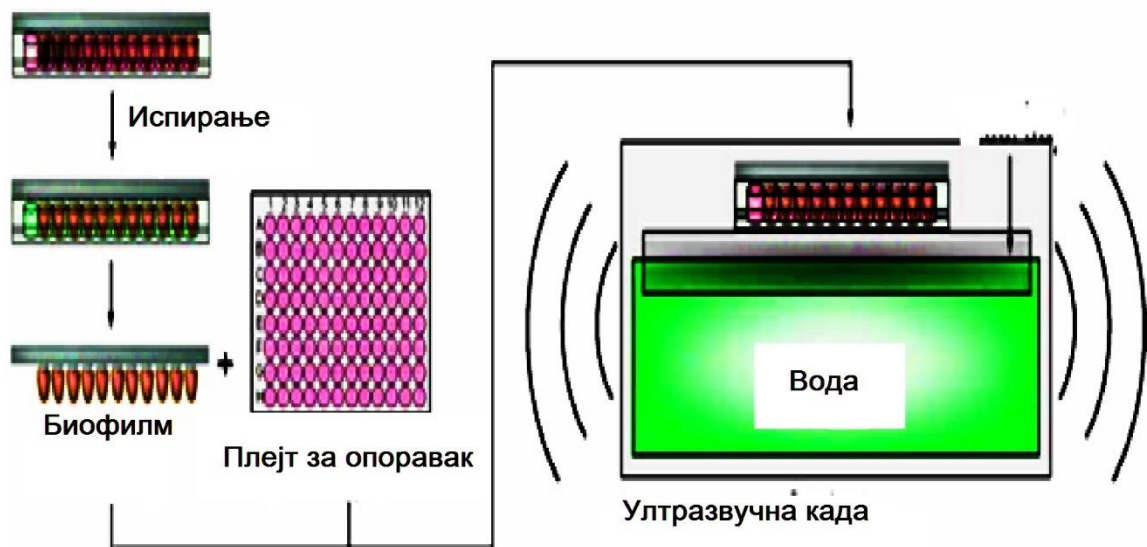


Слика 10. Одређивање вредности МИК(п) и МЛК(п) читавањем оптичке густине на ELISA читачу микротитарских плоча (преузето и прерађено, Harrison и сар., 2006).

Минимална летална концентрација је дефинисана као концентрација антимикробног агенса који убија 99.95% популације микроорганизама (Fothergill and McGough, 1995). Ова дефиниција је примењена за планктонске ћелије и означена је као МЛКп. Минимална летална концентрација биофилма (МЛКб) је дефинисана слично:

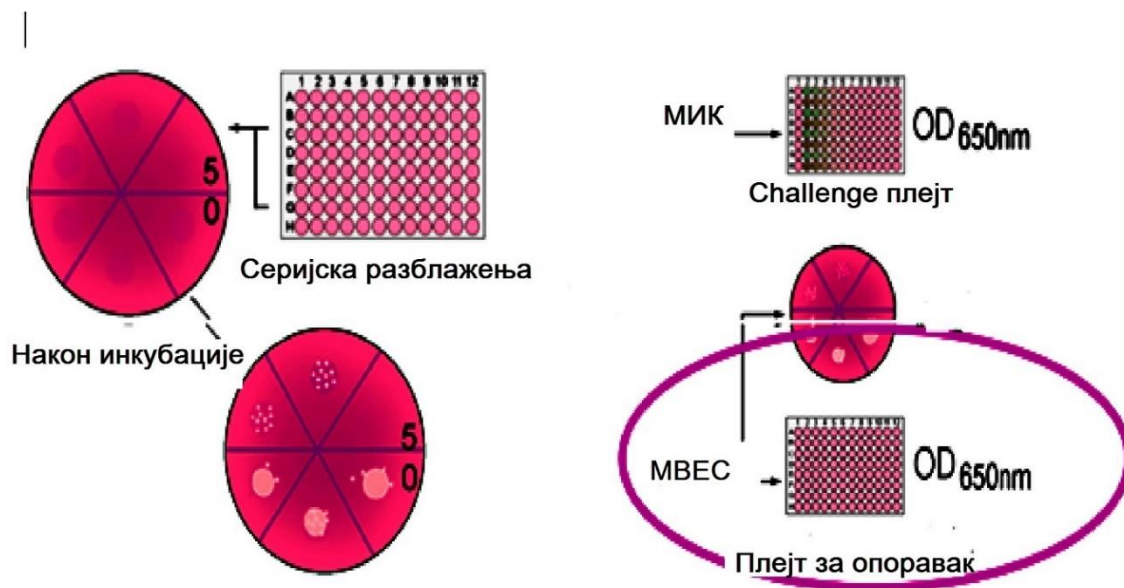
концентрација која убија 99.95% популације биофилма, при чему је на пример, на петри плочи присутна једна колонија или нема колонија. Однос МЛКб:МЛКп је дефинисан као **индекс толеранције (*fold tolerance*)**, што значи да ако је МЛКб већа од максималне концентрације (тј. детектовано је присуство микроорганизма на највећој концентрацији), а МЛКп је позната, онда је МЛКб два пута јача у односу на највећу одређену концентрацију МЛКп. Отпорност се дефинише као способност микроорганизма да настави да расте у присуству неког тестираног, најчешће антимикробног једињења. Толеранција се дефинише као способност микроорганизма да преживи излагање али не расте у присуству истог (Harrison et al., 2006).

Након периода излагања биофилма тешким металима или аутобојама (24 и 48 h за бактерије, 48 и 72 h за квасце и 72 и 96 h за филаментозне гљиве), поклопац са клиновима на којима је формиран биофилм је два пута испран стерилним физиолошким раствором и пребачен у нов плејт са свежим медијумом који је при тестирању отпорности на тешке метале садржавао неутрализатор (200 μL по отвору). Након тога, поклопац је постављен у нов плејт и биофилм је излаган деловању ултразвучних таласа, фреквенције од 20 kHz до 400 kHz, у трајању од 5 минута у воденом купатилу за соникацију (Aquasonic 250 HT Ultrasonic Cleaner, VWR International, Radnor, Pensilvanija, SAD) (Сл. 11). Вибрације скидају биофилм са пластичних клинова и биофилм остаје у отворима плејта. Плејт је означен као плејт за опоравак од излагања тестираним супстанцама и поставља се на инкубирање (24 и 48 h за бактерије, 48 и 72 h за квасце и 72 и 96 h за филаментозне гљиве).



Слика 11. Неутрализација тешких метала и опоравак преживелог биофилма (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

Након инкубације, одређена је минимална елиминациона концентрација биофилма (МБЕК) (MBEC – *eng. minimum biofilm eradication concentration*) читавањем оптичке густине на 650 nm (OD_{650}) на ELISA читачу микротитарских плоча (Сл. 12).



Слика 12. Одређивање вредности МБЕК читавањем оптичке густине ELISA читачу микротитарских плоча (преузето и прерађено, Harrison и сар, 2006).

4.3.2. Тестирање отпорности индивидуалних и мешовитих биофилмова на присуство тешких метала и аутобоја и квантификација

Код микроорганизама који су успешно формирали индивидуалне и/или мешовите биофилмове, након процеса формирања биофилмова које је описано у претходним деловима, истим методама (Adam et al., 2002a; Almeida et al., 2011) је испитивана отпорност формираних биофилмова на присуство тешких метала и аутоиндустријских боја. Биофилмови лабораторијских изолата су тестирани на присуство стандардних антибиотика (амфотерицин Б и тетрациклин) који су служили као позитивна контрола експеримента, а припремљени су према Hawser и Douglas (1995).

Након периода инкубације формирања биофилмова садржај из плејтова у коме су формирано је отклоњен. У сваки отвор плејта додато је по 100 μ L ТСБ медијума а затим је у прве редове додато по 100 μ L раствора тестираних супстанци (тешких метала, аутобоја и антибиотика – почетних концентрација наведених у делу 4.1. *Радни раствори тестираних супстанци*). Направљена је серија двоструких разблажења тако да је добијен опсег концентрација који је наведен у истом делу. Биофилмови су постављени у инкубатор на 26°C. Након периода инкубације (24 и 48 h за бактерије, 48 и 72 h за квасце и 72 и 96 h за филаментозне гљиве) извршено је ЦВ бојење (Almeida et al., 2011) и измерена је апсорбанца на 570 nm (OD_{570}) помоћу ELISA читача микротитарских плоча.

За све експерименте, као контрола стерилности, коришћени су неинокулирани отвори микротитарског плејта који су садржали само медијум. Контрола раста је садржала медијум и биофилмове тестираних микроорганизама. Одређена је минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална летална концентрација (МЛК) за све, како индивидуалне тако и мешовите биофилмове. Све је рађено у дупликату а резултати су били константни.

4.3.3. Уклањање тестираних раствора (тешких метала и аутобоја) у присуству испитиваних микроорганизама

Свим лабораторијским изолатима и идентификованим изолатима микроорганизама из отпадних вода утврђен је степен отпорности (толеранције) на тешке метале и аутобоје у планктонском облику, одређивањем МИКп/МЛКп. Микроорганизмима који су формирали биофилм (индивидуални/мешовити) такође је одређен степен отпорности (толеранције) на тешке метале и аутобоје у форми биофилма, одређивањем МБЕК, МИКб и МЛКб. Микроорганизми који су формирали биофилм и који су показали највећи степен отпорности према тестираним супстанцама коришћени су за накнадне тестове биосорпционог потенцијала.

Ефикасност уклањања планктонских хелија

Ефикасност уклањања тестираних тешких метала лабораторијским изолатима је испитана према методи коју су описали Muneer и сарадници (2007) са одређеним модификацијама. Микроорганизми су се развијали у ерленмајерима (250 mL) који су садржали ТСБ, суспензију и тестирани метал концентрације 100 µg/mL. Један ерленмајер је био контролни. Након периода инкубације раст микроорганизама (планктон) је одређен читавањем оптичке густине на 520 nm (OD₅₂₀) након 12, 24 и 48 h. Упоредо, из ерленмајера је узето по 5 mL аликвота и центрифугирано (15 минута, 3000 обртаја). Супернатант (узорци и контрола) је анализиран спектрофотометром (520 nm) како би се одредила резидуална концентрација метала. Процентуална ефикасност уклањања E (%) метала је рачуната из једначине (1):

$$E(\%) = \frac{(C_i - C_r)}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

где је C_i иницијална количина метала а C_r резидуална количина метала.

Ефикасност уклањања индивидуалних и мешовитих биофилмова (лабораторијски изолати – тешки метали)

За тестирање биосорпционог потенцијала индивидуалних и мешовитих биофилмова ови биофилмови су формиран на плочицама које су биле урођене у плејтове за тестирање са 6 отвора (описано у потпоглављу 4.2.4.) према методи коју су описали Sternberg и сарадници (2014). Плоче су затим постављене у инкубатор 48 h на 26°C. Тест биосорпције тешких метала из медијума индивидуалним и мешовитим биофилмовима изведен је према модификованој методи Basak et al., (2014). Покровне плочице са формираним биофилмовима су урођене у растворе метала иницијалне концентрације 100 µg/mL. Након 24, 48, 72, 96 и 120 h узети су узорци од по 1.5 mL и центрифугирани на 10.000 rpm 5 минута. Супернатант центрифугираних узорка је анализиран читавањем абсорбанце помоћу спектрофотометра (OD₅₂₀) чиме је забележена резидуална количина метала у супернатанту. На основу добијених резултата одређивана је процентуална ефикасност уклањања тестираних јона метала која је праћена током 5 дана. Процентуална ефикасност уклањања E (%) метала је рачуната из једначине (1).

Одређивање резидуалне количине јона испитиваних тешких метала – Дитизон тест

Потврда да тестирани биофилмови имају способност уклањања Pb²⁺, Cu²⁺ и Zn²⁺, испитана је Дитизон тестом према методи Greenberg et al., (1985). Дитизон

(дифенилтиокарбазон) је један од органских реагенса који се најчешће употребљавају јер омогућава веома осетљиво одређивање количине Pb, Zn, Cd, Ag, Hg, Cu, Bi. Дитизон се раствара у CCl₄ или хлороформу и тада се раствор боји у зелено.

Формирани биофилмови су излагани јонима метала растворених у хранљивом медијуму у периоду од 5 дана. Сваког дана узимани су узорци медијума од по 5 mL и центрифугирани на 10.000 rpm 5 минута. Тест узорци су анализирани читавањем абсорбанце (OD₅₁₀) помоћу спектрофотометра чиме је забележена резидуална количина метала. Резидуална количина Cu²⁺ и Zn²⁺ је одређена дитизон тестом према методи Sandell (1945). Тест узорци који су третирани дитизоном анализирани су читавањем абсорбанце (OD₅₃₅ за Cu²⁺ и OD₅₃₀ за Zn²⁺) помоћу спектрофотометра. Процентуална ефикасност уклањања *E* (%) метала је рачуната из једначине (1).

Одређивање суве масе биофилма

Како би се испитао и пратио утицај количине индивидуалних и мешовитог биофилма на уклањање Cd²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ и Hg²⁺ јона из раствора укупне концентрације 100 µg/mL, након 24, 48, 72, 96 и 120 h одређена је сува маса биофилмова по методи коју је први пут описао Pedersen (1982). Пре почетка експеримента, покровне плочице на којима ће се формирати биофилм су обележене и измерена им је тежина. Плочице са формираним биофилмом су пренете у сушницу на 70°C. Након 6 часова, маса плочица је поново измерена. Разлика у маси је узета као маса биофилма.

Ефикасност уклањања биофилмова, изолата из отпадних вода, формираних на AMB Media (Assisting Moving Bad Media) носачима према тешким металима

МВЕС™ – НТР систем је дизајниран за упоредна тестирања биофилмова и њихових планктонских ћелија (детаљна методологија за постављање система је описана у поглављу 4.2.4). Идеја рада је да се овај систем модификује (прилагоди), тако да се биофилмови формирају на AMB Media (Assisting Moving Bad Media) носачима, који се иначе користе у биореакторима постројења за пречишћавање отпадних вода.

Биофилмови формиран на AMB Media носачима након 5 дана су пренети у ерленмајере од 250 mL који су симулирали МВБР биореакторе. Сваки ерленмајер садржао је 200 mL ТСБ медијум (разблажен 1:3), 7 стерилних AMB Media носача. У ерленмајере су додати раствори тешких метала, тако да је сваки ерленмајер садржао 200 µg/mL тестираног метала. Инокулација је извршена додавањем по једног AMB Media носача са формираним биофилмом у ерленмајер. Ерленмајери су постављени на инкубацију 10 дана на температури од 25°C.

Ефикасност биофилмова да уклоне јоне метала из медијума праћена је тестом биосорпције. Експеримент је трајао 10 дана. Првог, петог и десетог дана, узет је по 1 mL узорка из сваког ерленмајера. Узорци су центрифугирани 20 минута на 10.000 обртаја како би се отклонила биомаса микроорганизама. Супернатант је затим филтриран кроз филтер (0.22 µm) и анализирана је количина метала која је остала у медијуму (Basak et al., 2014).

За одређивање заостале количине метала коришћен је атомски апсорциони пламени спектрофотометар (Flame atomic absorption spectrophotometer – FAAS, Perkin Elmer 3300), са лампом Д2 као коректором, цинк (213,9 nm), бакар (324.8 nm), никл (232.0 nm), олово (283.3 nm) и кадмијум (228.8 nm). За калибрацију су коришћени стандардни раствори одговарајућих концентрација. Распон стандардних раствора био је 0.5-2.0 mg/dm³ за бакар, цинк, кадмијум, никл и 1.0-5.0 mg/dm³ за олово. Сви узорци

су анализирани применом атомског апсорционог пламеног спектрофотометра коришћењем ацетиленског пламена (2.0:10.0). Измерене вредности садржаја елемената у узорцима материјала су изражене у mg/kg суве материје. При наведеним условима, границе детекције метала биле су: цинк (0.5 ppm), бакар (0.5 ppm), никл (1.0 ppm), олово (1.0 ppm) и кадмијум (0.5 ppm).

Резултати су изражени процентуално. Тестирања полазе од реалних концентрација тешких метала а процентуално је приказана успешност биофилмова у уклањању истих. Преостала количина метала у подлози за живу је одређена спектрофотометријски а за остале метале коришћен је ААС (Атомски апсорциони спектрофотометар).

4.3.4. Ензимска активност изолованих микроорганизама из отпадних вода у присуству аутобоја

Екстракција ЕПС-а

АМВ Media носачи са биофилмом формираним у описаним експерименталним условима су соницирани након петог дана експеримента су како би се биофилм скинуо са носача. Затим су епрувете са биофилмом, који је скинут са носача, центрифугиране на 20.000 обртаја 20 минута. Талог је изложен дејству 50 mM калијум фосфатног пуфера и враћен у ултразвучну кадицу, 15 минута на 40 ампера. Супернатант је затим процеђен кроз филтер (0.22 μm) и филтрат је коришћен као ЕПС узорак. Овако припремљен узорак се даље користио за одређивање активности екстрацелуларних ензима.

Одређивање укупне концентрације протеина

Укупна концентрација протеина у узорку одређена је методом по Lowry-ју. Припремљен је алкални реагенс који садржи 2% (w/v) Na_2CO_3 растворен у 0.1 mol/L NaOH , 1% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ и 2% (w/v) раствор К- Na -тартарата. У једну епрувету (проба) одмерено је 0,2 mL узорка и додато је 3 mL припремљеног алкалног реагенса. У другу епрувету (контрола) додато је 0,2 mL дестиловане воде и 3 mL алкалног реагенса. Обе епрувете су промешане и остављене на собној температури 15 минута. Након тога у епрувете је додато 0,6 mL Folin-Ciocalteu-овог реагенса (разблажен у дестилованој води у односу 1:2). Епрувете су промешане и остављене на собној температури 15 минута. Концентрација протеина у узорку одређена је спектрофотометријски, читавањем апсорбанце на 750 nm. За конструисање стандардне криве коришћен је стандардни раствор говеђег серум албумина (BSA) концентрације 1 mg/mL. У девет епрувета одмерено је 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.85 и 1 mL стандардног раствора. Епрувете су допуњене до 1 mL дестилованом водом. Једна епрувета са дестилованом водом служила је као бланк стандард. Даљи поступак је био исти као за одређивање концентрације протеина у узорку. Након конструисања стандардне криве за BSA, у графикон су унете добијене вредности апсорбанце и израчуната је количина протеина у узорку из једначине регресионе праве.

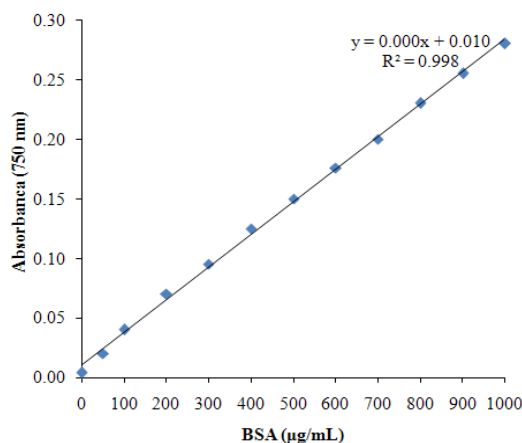


График 1. Стандардна крива за протеин (BSA)

Одређивање активности киселе и алкалне инвертазе (β -fruktofuranozidaza) (EC 3.2.1.26)

Активност киселе и алкалне инвертазе одређена је методом Sumner и Howell (1935).

За одређивање активности алкалне инвертазе у узорку направљена је реакциона смеша са 0.5 mL сировог ензимског екстракта, 0.5 mL 0.02 mol/L фосфатног пуфера (pH 8.0) и 1 mL 1% (w/v) сахарозе. Садржај епрувете (проба) се меша и инкубира у воденом купатилу на 37°C/15 минута. Контрола има све састојке као и проба и стоји на леду док се не заврши инкубација пробе. Узима се по 1 mL садржаја обе епрувете и додаје по 2 mL динитросалицилног реагенса. Пробне епрувете се инкубирају на 100°C/5 минута. Затим се охладе на собној температури и спектрофотометријски се одређује количина ослобођених редукујућих шећера на 540 nm (Miller, 1959).

Ензимска активност киселе инвертазе одређена је на исти начин; у реакционој смеси која садржи 0.5 mL узорка, 0.5 mL 0.01 mol/L натријум-ацетатног пуфера (pH 4.5) и 1 mL 1% (w/v) сахарозе. Садржај епрувете (проба) се меша и инкубира у воденом купатилу на 55°C/20 минута. Контрола има све састојке као проба и стоји на леду док се не заврши инкубација пробе. Узима се по 1 mL садржаја из епрувета и додаје по 2 mL динитросалицилног реагенса. Пробне епрувете се инкубирају на 100°C/5 минута. Епрувете се охладе на собној температури и након тога се спектрофотометријски одређује количина ослобођених редукујућих шећера на 540 nm.

За конструисање стандардне криве потребно је направити 1 mg/mL раствора $5.56 \cdot 10^{-3}$ mol/L глукозног стандарда (Sigma Aldrich). У шест епрувета одмерити 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 и 0.50 mL стандардног раствора глукозе и епрувете допунити дестилованом водом до запремине 1 mL. Садржај епрувета се промеша и епрувете се инкубирају на 55°C/20 минута. Даљи поступак је исти као за одређивање инвертазне активности.

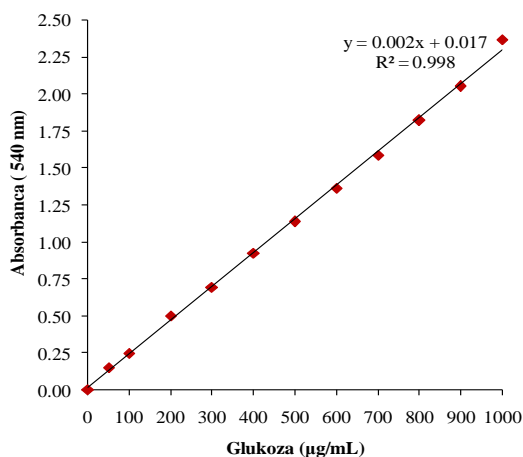


График 2. Стандардна крива глукозе

Јединица инвертазне активности (IU) је дефинисана као количина ензима који катализује продукцију 1 µmol глукозе у минути на 37°C.

$$IU/ml = \frac{(\mu\text{mol gluкоze})(df)}{(20)(0,5)(2)} \quad (2)$$

df – дилуциони фактор

20 – време инкубације (у минутима)

0,5 – запремина ензимског екстракта (у милилитрима)

2 – фактор конверзије 1 µmol сахарозе која хидролизује на глукозу и фруктозу.

Одређивање активности алкалне протеазе (ЕС 3.4.21-24)

Протеолитичка активност је одређена на основу присуства ензима у 1 mL течне подлоге методом по Anson-у (Anson, 1938), на основу количине тирозина који се ослобађа хидролизом казеина под дејством протеолитичких ензима. У једну епрувету се одмери 1 mL узорка а у другу 5 mL 2% (w/v) раствора казеина. Обе се загревају у воденом купатилу на 37°C/15 минута. Након тога у епрувету са узорком (проба) се додаје 2 mL загрејаног казеина, промеша и врати се на инкубацију још 10 минута. Ензимска реакција се прекида додавањем 5 mL хладне 5% (w/v) трихлорсирћетне киселине (ТСА – trichloroacetic acid). Смеша се меша и процеди кроз филтер папир. У контролној епрувети одмери се 1 mL узорка и одмах дода 2 mL хладног казеина и 5 mL 5 % (w/v) ТСА, садржај се меша и процеди кроз филтер папир. 2 mL филтрата из пробне и контролне епрувете се помеша са 5 mL 6% (w/v) Na₂CO₃ и 1 mL Folin-Ciocalteu-овог реагенса. Садржај епрувета се промућка и остави на собној температури 30 минута док се не развије плава боја. У посебној епрувети (бланк) одмери се 1 mL дестиловане воде уместо тирозина и додају се остале супстанце. Вредност апсорбанце се читава на спектрофотометру на 660 nm.

За одређивање количине тирозина потребно је конструисати стандардну криву (График 3). У шест епрувета одмерити 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 и 0.60 mL стандардног раствора тирозина и епрувете допунити дестилованом водом до 2 mL. Као бланк стандарда треба узети 2 mL дестиване воде. Све епрувете се инкубирају на 37°C/10 минута и даљи поступак је исти као за одређивање активности протеолитичких ензима.

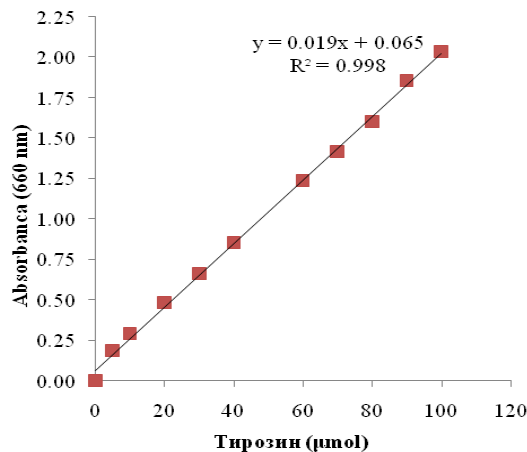


График 3. Стандардна крива тирозина

Након конструисања стандардне криве за тирозин, треба унети вредности апсорбанце тирозина који се налази у филтрату пробе (а) и филтрату контроле (б).

$$IU/ml = \frac{(\mu\text{mol тирозина})(8)(df)}{(1)(10)(2)} \quad (3)$$

8 – укупна запремина узорка (у милилитрима)

10 – време инкубације узорка (у минутима)

1 – запремина ензима (у милилитрима)

2 – запремина узета за колориметријску детерминацију (у милилитрима)

df – дилуциони фактор

Одређивање активности алкалне фосфатазе (*ortofosfat-monoester-fosfohidrolaza*)

Ензимска активност алкалне фосфатазе одређена је на основу количине неорганског фосфора Аллен-овом методом (Allen, 1940). Ензимска активност је мерена у реакционој смеши која садржи 1 mL гликолног пуфера (pH 9.0) са Mg^{2+} , 1 mL узорка и 1 mL β -глицерофосфата (супстрата). Епрувете са реакционом смешом су инкубиране на 37°C/30 минута. Након инкубације, ензимска реакција је прекинута додавањем 3 mL 10% трихлорсирћетне киселине (ТСА). Епрувете се ставе на лед 15 минута после чега се садржај филтрира и филтрат се сакупља. Контролне епрувете се припремају на исти начин, али без инкубације, већ се одмах додаје ТСА, епрувете се држе на леду 15 минута и филтрирају. Да би се одредила концентрација фосфора у узорку потребно је урадити Алленову реакцију. Одмери се по 1 mL филтрата пробе и контролне пробе у две епрувете, додаје се 0.4 mL амидола, 0.4 mL 60% перхлорне киселина (РСА), 0.2 mL NH_4 -молибдата и 3 mL дестиловане воде. Епрувете се инкубирају на собној температури 11 минута. Истовремено се припремају серије разблажења стандардног раствора фосфора и понавља се иста процедура. Та серија служи за конструисање стандардне криве за фосфор. Мерење апсорбанце раствора врши се на 720 nm.

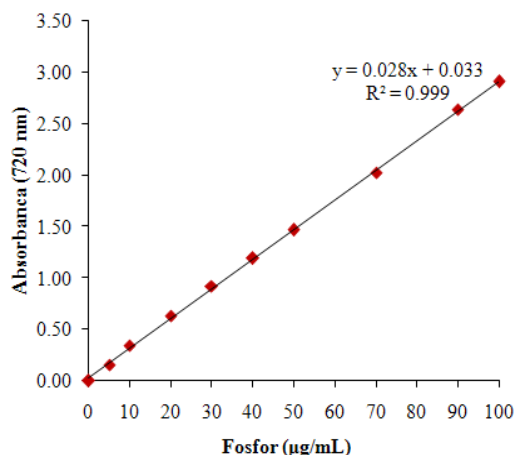


График 4. Стандардна крива за фосфат

Јединица ензимске активности:

$$IU/ml = \frac{(\mu\text{mola fosfora})(6)(df)}{(1)(30)(5)} \quad (4)$$

6 – запремина реакционе смеше (у милилитрима)

df – дилуциони фактор

1 – запремина ензимског екстракта (у милилитрима)

30 – време инкубације (у минутима)

5 – запремина узета за колориметријску детерминацију (у милилитрима).

Одређивање активности алкалне фосфатазе

Активност алкалне фосфатазе испитивана је на *p*-нитрофенил фосфату као супстрату (*p*-нитрофенил фосфат + H₂O → *p*-нитрофенол + Pi).

Ензимска активност одређена је у реакционој смеши која садржи 0.5 mL глицинског пуфера са MgCl₂ (pH 8,8) и 0.5 mL 15.2 mM *p*-нитрофенил фосфата. Смеша је инкубирана на 37°C/10 минута, а затим је у епрувету, која је означена као главна проба, додат 0.1 mL узорка. У посебну епрувету (бланк) додат је 0.1 mL дестиловане воде уместо узорка. Садржај епрувета се промеша и инкубира на 37°C/10 минута. Након инкубације у епрувете је додато 10 mL 20 mM раствора NaOH. Садржај епрувета се поново промеша, а ослобођени *p*-нитрофенол се одређује спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 410 nm.

Јединица ензимске активности

$$IU/ml = \frac{(A_{410nm\ test} - A_{410nm\ blank})(11.1)(df)}{(18,3)(0,1)(10)} \quad (5)$$

11,1 – укупна запремина реакционе смеше у mL

18,3 – милимоларни екстинкциони коефицијент *p* – нитрофенола на 410 nm

0,1 – запремина узорка (ензима) у mL

10 – време инкубације (мин)

df – дилуциони фактор.

Једна јединица ензимске активности хидролизује 1 µmol *p*-нитрофенил фосфата у минути на pH 8.8 и температури 37°C.

4.3.5. Флуоресцентна микроскопија

Флуоресцентна микроскопија је коришћена за евалуацију и визуелизацију утицаја тешких метала и аутоиндустријских боја на биофилмове (бактерије и квасци) према методама Kronvall и Myhre (1977) и Harrison et al. (2006). У Табели 8 дат је приказ коришћених боја и упутство за употребу.

Визуелизација утицаја тешких метала

Утицај тешких метала на биофилмове квасаца (лабораторијских изолата) евалуиран је флуоресцентном микроскопијом помоћу методе Kronvall и Myhre (1977). Плоче са тестираним биофилмовима су испране стерилним физиолошким раствором да би се уклонили медијум и неадхериране ћелије. Фиксирање биофилма је извршено метанолом. Плоче су инкубирани на собној температури док метанол не испари. Биофилмови су третиран са педесет микролитара акридин оранж (0,1 mg/mL). Након 2 минута плоче се исперу стерилном дестилованом водом и затим посматрају на флуоресцентном микроскопу (Olympus BX51, Shinjuku, Tokyo, Japan) и анализиран употребом Cytovision 3.1 софтверског пакета (Applied Imaging Corporation, Santa Clara, California, USA).

Табела 8. Боје за визуелизацију биофилмова употребом флуоресцентне микроскопије

Време инкубације		Екситација (nm)		Сакупљена емисија (nm)	
Боја I (60 min)	Боја II (5 min)	$\lambda 1$	$\lambda 2$	$\lambda 1$	$\lambda 2$
^c TRITC-ConA (200 $\mu\text{g/mL}$)	^a АО (0.1% u PBS)	543	476	555 – 615	505 – 535
TRITC-ConA (50 $\mu\text{g/mL}$)	^b Syto-9 (6.7 μM)	543	488	555 – 615	510 – 540

Скраћенице за боје: ^aАО= акридин оранж; ^b Syto-9 500 пута разблажен у односу на почетну концентрацију прописану од стране произвођача (Molecular Probes); ^cTRITC-ConA= tetrametilrodamin izocianat конјуговани конканавалин А

Визуелизација утицаја аутобоја

Утицај аутобоја на биофилмове тестираних бактерија и квасаца изолованих из отпадне воде евалуиран је флуоресцентном микроскопијом методом Harrison и сарадници (2006). Утицај испитиваних супстанци на бактеријски биофилм праћен је након 48 h, а на биофилмове квасаца после 72 h. Плоче са тестираним биофилмовима су испране стерилним физиолошким раствором да би се уклонили медијум и неадхериране ћелије. Фиксирање биофилма је извршено метанолом (30 минута до 1 h на 30 °C). Плоче су затим испране стерилним физиолошким раствором. Биофилмови су третиран одговарајућим флуоресцентним бојама, SYTO 9 и ConA-Texas Red (Molecular Probes), посматрани на флуоресцентном микроскопу и анализирани употребом Cytovision 3.1 софтверског пакета.

4.3.6. Статистичка анализа података

Сви резултати су обрађени статистички коришћењем Microsoft Excel-а (Redmond, Washington, DC, USA). Резултати су читавани у дупликату и трипликату при чему су константни резултати прихваћени као такви, а код резултата који то нису је одређена средња вредност \pm стандардна девијација (СД). Резултати су приказани као бројчане вредности и део резултата је изражен у процентима.

Pearson-ов коефицијент линеарне корелације и Spearman-ов коефицијент ранг корелације су коришћени за одређивање корелације између времена инкубације и продукције биофилмова, са или без утицаја полутаната, при одређивању суве масе биофилма или мерењем апсорбанце.

За поређење утицаја различитих полутаната (тешких метала и аутобоја) код података са нормалном расподелом коришћен је Упарени Т – тест, а код података без нормалне расподеле је коришћен Wilcoxon signed-rank тест. Анализа варијанси (ANOVA) је коришћена за поређење разлика у отпорности између микроорганизама (планктон и биофилм). Резултати су анализирани уз помоћ SPSS софтвера, верзија 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

5.1. Тестирани микроорганизми

У Табели 9 дат је преглед микроорганизма коришћених за тестирање у овом истраживању. Осим изолата из отпадних вода, коришћени су и микроорганизми из колекције која припада Лабораторији за микробиологију и микологију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Лабораторијски изолати су пореклом из хране (*Escherichia coli* LM1), природе (*Rhodotorula mucilaginosa*) и из комерцијалних производа (*Saccharomyces boulardii*). Ови изолати су коришћени да се утврди ефикасност у уклањању полутаната који су присутни у отпадним водама и упореди њихова ефикасност са ефикасношћу сојева који су изоловани из места загађења. Они изолати чија је активност била најзначајнија (формирање биофилмова и биосорпциона активност) коришћени су за добијање ткз. идеалне комбинације за пречишћавање тестираних супстанци, заједно са микроорганизмима који су изоловани из отпадних вода.

Изолати из отпадних вода су пореклом из рецикулационог и биореакционог базена Централног постројења за прераду комуналних отпадних вода Цветојевац и фабрике за производњу аутомобила ФИАТ, Крагујевац (FCA). Сви микроорганизми који су идентификовани су коришћени за почетна тестирања отпорности према одговарајућем полутанту. У зависности од тога који микроорганизми су показали највећу толерантност на присуство тешких метала, даљи рад је настављен на изолатима који су показивали највечи степен толеранције. Станишта загађена полутантима представљају извор још увек неидентификованих микробних заједница и специфичних микроорганизма (Nascimento et al., 2018; Gadd, 2010). Показано је да у загађеним срединама долази до смањења диверзитета бактеријских популација, а истовремено се дешава „обогаћивање“ дате средине популацијама микроорганизма који су отпорни на полутанте (Nascimento et al., 2018; Juckett et al., 2000). Због ефикасности, делом и због законске процедуре, за процес биоремедијације отпадне воде, најпрактичније је употребити микроорганизме изоловане из отпадних вода, односно из средине која треба да буде деконтаминирана (Xia et al., 2019).

При идентификацији микроорганизма водило се рачуна да идентификовани различити сојеви истих врста, као што су нпр. *E. coli* PMFKG-CV1 и *E. coli* PMFKG-CV2 и *E. coli* PMFKG-F1 и *E. coli* PMFKG-F2, које ферментишу или не ферментишу лактозу, или исто *S. cerevisiae* PMFKG-CV9 и *S. cerevisiae* PMFKG-CV10 и *S. cerevisiae* PMFKG-F6 и *S. cerevisiae* PMFKG-F7, који су хапло или диплотипови, остану у свим тестирањима да би се утврдила разлика у њиховом понашању у односу на ову врсту истраживања.

Табела 9. Преглед коришћених, изолованих и идентификованих врста микроорганизама
(ознаке CV – односе се на отпадне воде комуналног постројења Цветојевац, ознаке F – односе се на отпадне воде аутоиндустрије FCA)

Лабораторијски изолати	Изолати (Цветојевац)	Изолати (FCA)
<i>Escherichia coli</i> LM1	<i>Escherichia coli</i> PMFKG-CV1	<i>Escherichia coli</i> PMFKG-F1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Escherichia coli</i> PMFKG-CV2 – inactive	<i>Escherichia coli</i> PMFKG-F2 – inactive
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> PMFKG-CV3	<i>Proteus vulgaris</i> PMFKG-F3
	<i>Klebsiella oxytoca</i> PMFKG-CV4	<i>Proteus mirabilis</i> PMFKG-F4
	<i>Acinetobacter lwoffii</i> PMFKG-CV5	<i>Proteus mirabilis</i> PMFKG-F5
	<i>Hafnia alvei</i> PMFKG-CV6	<i>Enterobacter cloacae</i> PMFKG-F16
	<i>Serratia odorifera</i> PMFKG-CV7	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PMFKG-F17
	<i>Serratia marcescens</i> PMFKG-CV8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PMFKG-F6 тип 1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PMFKG-CV9 тип 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PMFKG-F7 тип 2
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PMFKG-CV10 тип 2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PMFKG-F8
	<i>Candida utilis</i> PMFKG-CV11	<i>Candida utilis</i> PMFKG-F9
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> PMFKG-F-11
		<i>Paecilomyces variotii</i> PMFKG-F12
		<i>Penicillium chrysogenum</i> PMFKG-F13
		<i>Penicillium expansum</i> PMFKG-F14

5.2. Формирање биофилмова и квантификација

Док је у медицинским истраживањима циљ да се смањи способност формирања биофилмова, у биоремедијацији је ова особина једна од кључних за микробиолошки третман отпадних вода. Сви тестирани микроорганизми, лабораторијски изолати и идентификовани микроорганизми из отпадних вода, су тестирани на способност формирања биофилмова.

5.2.1. Лабораторијски изолати

На способност да формирају како појединачни, тако и мешовити биофилм, од лабораторијских изолатата су тестирана два квасца (*Saccharomyces boulardii*, *Rhodotorula mucilaginosa*) и једна бактерија (*Escherichia coli* LM1). *S. bulardii* није показао потенцијал у формирању биофилма, док резултати показују да *R. mucilaginosa* и *E. coli* поседују способност да формирају како индивидуалне, тако и мешовити биофилм. Способност формирања биофилма ове две врсте показују како на полистиренској микротитарској плочи, тако и на стакленим покровним плочицама. Продукција појединачних и мешовитиог биофилма квантификована је помоћу ЦВ теста, читавањем апсорбанце након 24, 48 и 72 h, као и одређивањем суве масе биофилмова. Резултати су приказани на Графицима 5 и 6.

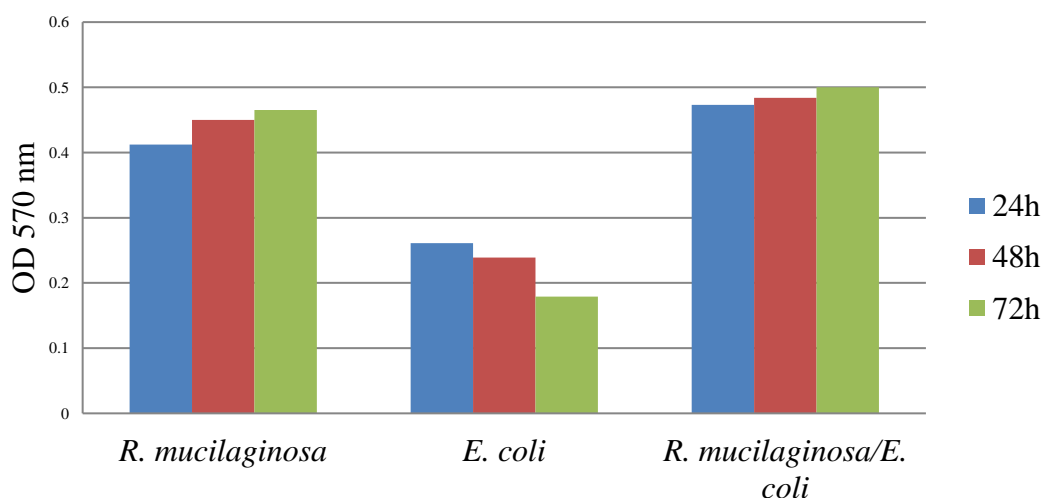


График 5. Раст биофилмова *R. mucilaginosa*, *E. coli*, *R. mucilaginosa/E. coli* током 24, 48 и 72 h читавањем апсорбанце

Резултати оба теста показују да је продукција биофилма *R. mucilaginosa/E. coli* била већа у односу на појединачне биофилмове ($E. coli < R. mucilaginosa < R. mucilaginosa/E. coli$ ($p < 0.05$)). Претпоставља се да је разлог најмање дебљине биофилма *E. coli* величина бактеријске ћелије, која је знатно мања од ћелија квасца *R. mucilaginosa*, што не значи и да је и број бактеријских ћелија у биофилму *E. coli* био мањи.

Раст микроорганизама кроз време је линеаран ($R = 0.99; 0.95; 0.97$). Раст *E. coli* је у негативној линеарној корелацији у односу на друга два биофилма док је биофилм *R. mucilaginosa* у позитивној корелацији са мешовитим биофилмом ($R = -0.87; -0.99; 0.94$).

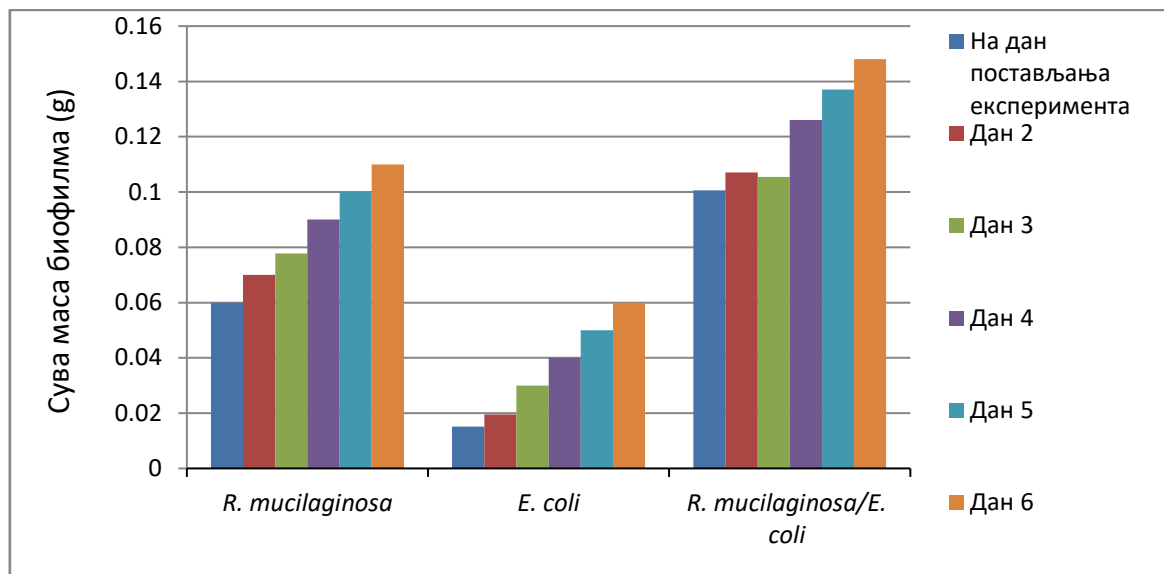


График 6. Продукција биофилма праћена одређивањем суве масе биофилмова током петодневног третмана

Ови резултати су у сагласности са резултатима Nunes et al. (2013) који су испитивали и упоређивали способност формирања биофилма више врста рода *Rhodotorula*. Резултати наведене студије су показали да врста *R. mucilaginosa* има бољу способност формирања биофилма од других представника овог рода (*R. glutinis*, *R. minuta*, *R. dairenensis*, *R. pallida* и *R. slooffiae*). Harrison et al. (2006) такође у свом истраживању показују да *Candida tropicalis* преживљава неповољне услове захваљујући способности да формира биофилм.

E. coli је такође формирала биофилм у полистиренским микротитарским плејтовима са 96 отвора. Zalewska-Piątek и сарадници (2013) испитивали су способност формирања биофилма уропатогених сојева *E. coli* и саопштили да ови сојеви *E. coli* показују потенцијал у формирању биофилма. Такође, резултати Harrison и сарадника (2005b), који су узгајали различите сојеве *E. coli* (*E. coli* JM109, *E. coli* HM21 и *E. coli* HM22) а које су формирале биофилм у МВЕС-НТР систему, су у сагласности са резултатима наше студије.

На формирање мешовитог биофилма утичу бројни процеси који одређују облик и природу мешовитог биофилма. Један од основних је комуникација ћелија-ћелија (тј. *quorum sensing*) која може да утиче на успостављање интеракција (синергизам или антагонизам) у мешовитом биофилму и које утичу на формирање биофилма (Elias and Vanin, 2012). Vurttølle и сарадници (2006) су испитивали раст и формирање мешовитог и индивидуалних биофилмова *Microbacterium phyllosphaerae*, *Shewanella japonica*, *Dokdonia donghaensis* и *Acinetobacter wolffii* при чему су утврдили да је продукција мешовитог биофилма била већа у односу на индивидуалне. Резултати наведене студије су у складу са нашим резултатима (Графици 5 и 6).

5.2.2. Изолати из отпадних вода комуналног предузећа за пречишћавање отпадних вода Цветојевац

Све идентификоване врсте микроорганизама изоловане из отпадних вода комуналног предузећа за пречишћавање Цветојевац формирају биофилм у полистиренским микротитарским плочама са 96 отвора (Табела 9). Продукција

биофилмова је квантификована помоћу ЦВ теста, читавањем апсорбанце након 24 h за бактерије и 48 h за квасце. Резултати су приказани на Графику 7. На графицима 5 и 7 се уочавају различите таласне дужине на којима је вршено мерење због различите методологије рада (Поглавље 4.2.3).

Највећи раст појединачног биофилма забележен је за врсту *Enterobacter cloacae* PMFKG-CV3. Поред врсте *E. cloacae* PMFKG-CV3, добра биофилм продукција је примећена код *Serratia odorifera* PMFKG-CV7, *Klebsiella oxytoca* PMFKG-CV4 и *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-CV10. Постоји статистички значајна разлика у продукцији ових биофилмова у односу на друге изоловане микроорганизме ($p < 0.05$).

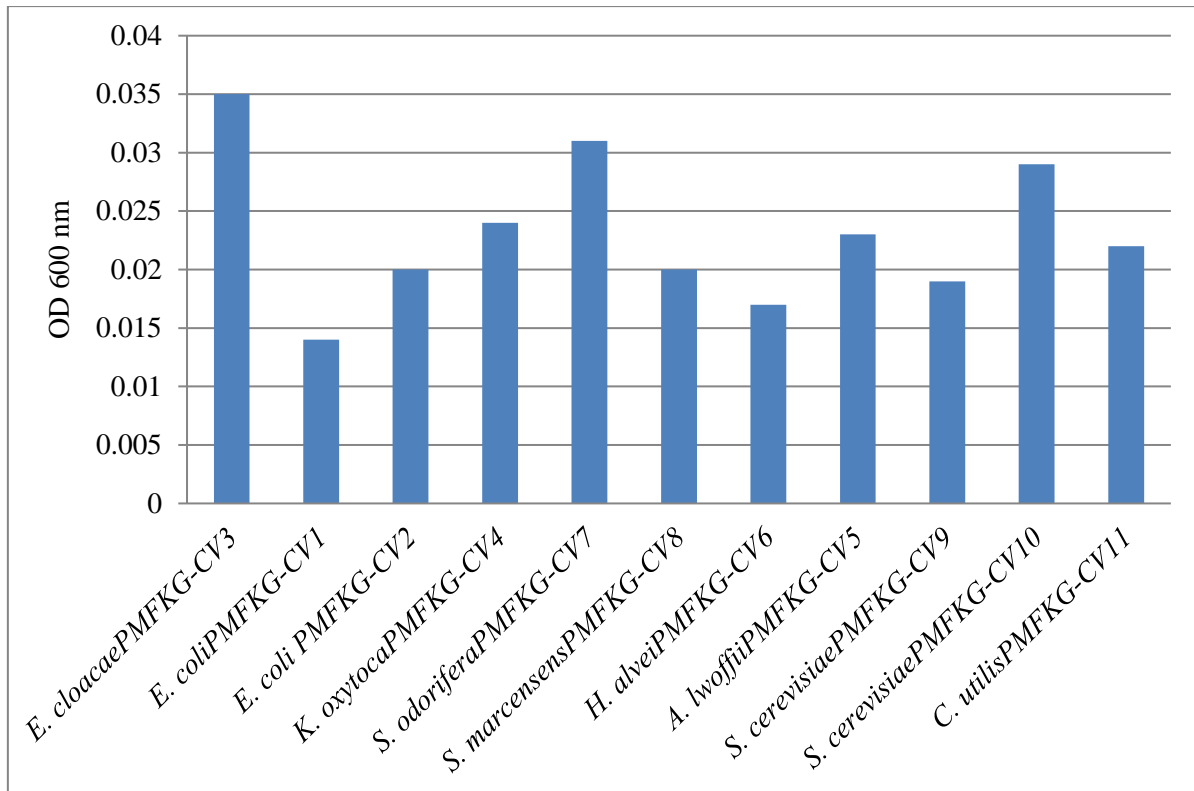


График 7. Раст индивидуалних биофилмова микроорганизама изолованих из постројења за прераду отпадних вода Цветојевац у полистиренским микротитарским плочама

Не постоји статистички значајна разлика између дебљине биофилмова добијене мерењем апсорбанце код једноспецијских биофилмова изолата који су изабрани због своје продукције (*E. cloacae* PMFKG-CV3, *K. oxytoca* PMFKG-CV4, *S. odorifera* PMFKG-CV7 и *S. cerevisiae* PMFKG-CV10; $p > 0.05$).

Способност формирања биофилма код *Saccharomyces cerevisiae* је била предмет проучавања више аутора, при чему су добијени различити резултати. Chandra и сарадници (2001) су навели да *S. cerevisiae* (изолат из столице пацијента под имуносупресивном терапијом) има способност адхезије за биосинтетичку површину, али није успео да формира зрео биофилм. Наши резултати се подударају са резултатима Reynolds и Fink (2001) који су испитивали способност формирања биофилма пекарског квасца *S. cerevisiae*. Наведени аутори су утврдили да способност формирања биофилма *S. cerevisiae* зависи од типа подлоге, при чему ниске концентрације глукозе на пластичним подлогама подстичу формирање биофилма.

Врсте са најбољом продукцијом биофилма су даље коришћене за прављење мешовитих биофилмова (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia odorifera* и *Saccharomyces cerevisiae* тип 2). Наредна тестирања су укључила комбинације ових врста (две и/или три) у циљу проналажења најбоље комбинације микроорганизама који ће формирати ефикасан мешовити биофилм. Комбиновањем врста су добијени резултати приказани на Графику 8. Ознаке на овом графику и на даље у тексту за ове изолате, као и за биофилмове које граде, су дате по првим словима из латинског назива. Објашњења су дата испод Графика 8.

Са Графика 8 се уочава да највећу продукцију показују три појединачна биофилма *E. cloacae*, *K. oxytoca* и *S. cerevisiae*. Уколико се посматрају биофилмови изграђени од две врсте микроорганизама, најзначајнију продукцију показује биофилм *K. oxytoca/S. cerevisiae* (КС). Од мешовитих биофилмова са три врсте микроорганизама најбољу продукцију показује биофилм *E. cloacae/K. oxytoca/S.odorifera*. На основу добијених резултата види се да је продукција индивидуалних биофилмова била већа од продукције мешовитих, са изузетком појединачног биофилма *S. odorifera*. Такође, на основу добијених резултата забележено је да је *E. cloacae/S.odorifera/S. cerevisiae* (ЕСС) биофилм имао најслабију продукцију. Уочава се статистички значајна разлика између продукције како једно- тако и вишеспесијских биофилмова ($p < 0.05$).

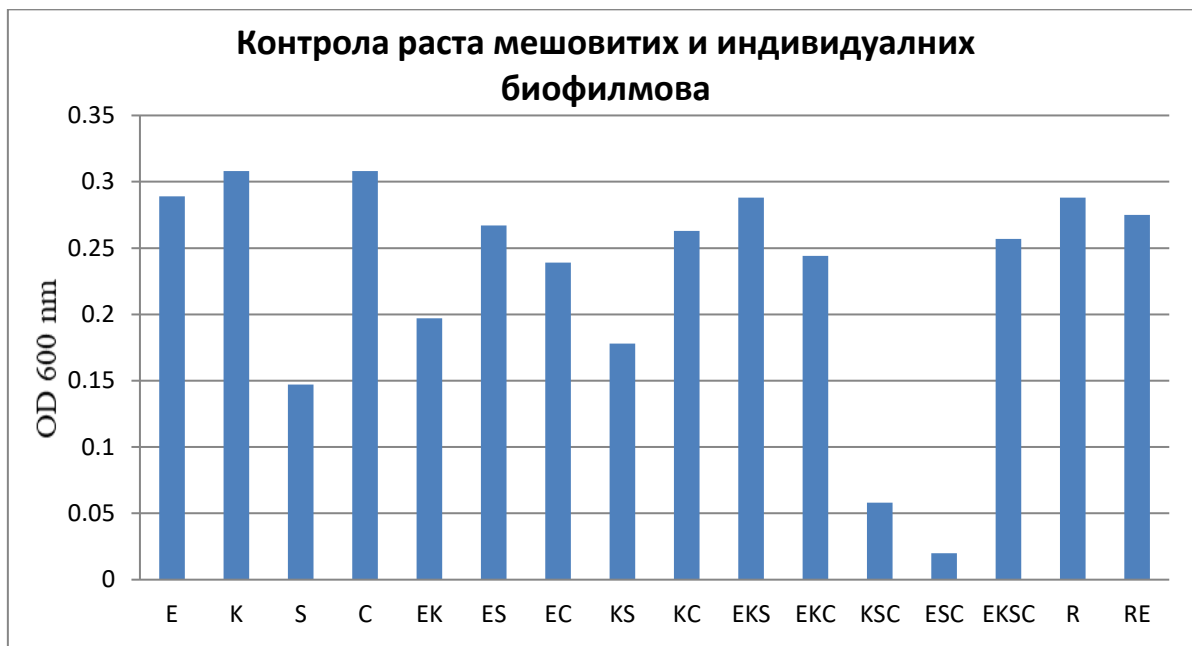


График 8. Раст одабраних индивидуалних и мешовитих биофилмова (различите комбинације микроорганизама са најбољом продукцијом биофилмова) у полистиренским микротитрационим плочама

(**E**-*E. cloacae*; **K**-*K. oxytoca*; **S**-*S.odorifera*; **C**-*S. cerevisiae*; **EK**-*E. cloacae/K. oxytoca*; **ES**-*E. cloacae/S.odorifera*; **EC**-*E. cloacae/S. cerevisiae*; **KS**-*K. oxytoca/S.odorifera*; **KC**-*K. oxytoca/S. cerevisiae*; **EKS**-*E. cloacae/K. oxytoca/S.odorifera*; **EKC**-*E. cloacae/K. oxytoca/S. cerevisiae*; **KSC**-*K. oxytoca/S.odorifera/S. cerevisiae*; **ESC**-*E. cloacae/S.odorifera/S. cerevisiae*; **EKSC**-*E. cloacae/K. oxytoca/S.odorifera/S. cerevisiae*; **R**-*R. mucilaginosa*; **RE**-*R. mucilaginosa/ E. cloacae*).

Резултати испитивања потврђују способност тестираних микроорганизама да се вежу за синтетичке подлоге и формирају биофилмове, као што су утврдили Jacobsen and Shirliff (2011). Унутар биофилма одигравају се регулаторни процеси (биохемијски

и генетички) који омогућавају бактеријама да развију бољи механизам толеранције и побољшају своју отпорност у присуству тешких метала (Harrison et al., 2007). Егзистенција микроорганизама у оквиру биофилма је омогућена управо захваљујући способности успостављања синергистичких односа (Elias and Banin, 2012), што за последицу има нпр. нежељену појаву у медицини да је биофилм отпорнији на антибиотике у односу на своје планктонске ћелије (Ceri et al., 1999), што су потврдила и новија истраживања (Sharma et al., 2019). Међутим, управо ова способност биофилмова претвара у практичан алат који има значајнији потенцијал у биоремедијацији (Golby et al., 2014).

Интересантан резултат је забележен код мешовитог биофилма *E. cloacae/S. odorifera/S. cerevisiae* који је имао најслабију продукцију, док су врсте које га изграђују појединачно показале значајно већи потенцијал у изградњи биофилма. То се може објаснити компетитивним или антагонистичким односима, јер се врсте унутар биофилма могу такмичити за нутритивне ресурсе, па се међу њима успостављају конкурентни односи (Elias and Banin, 2012). Један од услова формирања биофилма је продукција ЕПС-а чија је једна од улога и заштита од антимикуробних агенаса (Flemming et al., 2016). Након што ћелије продукују ЕПС, он подлеже модификацијама и ћелије константно преуређују своје окружење. После ћелијске екскреције, током развоја мешовитих биофилмова, настају варијације у саставу ЕПС, при чему настаје ЕПС са другачијим особинама, попут резистенције на антимикуробне агенсе итд. (Flemming, 2016).

Да би се успешно развили мешовити биофилмови потребно је да се успоставе и синергистички односи унутар самог биофилма. У супротном се јављају конкурентски односи, при чему је развој биофилма инхибиран, што је показано у студији Hoffman et al., (2006), што су потврдила и нека новија истраживања (Rodrigues et al., 2019; Camarillo-Marquez et al., 2018).

S. aureus и *P. aeruginosa* ступају у интеракцијске односе, при чему у присуству *S. aureus*, *P. aeruginosa* индукује ослобађање 2-хептил-4-хидроксикинолин N-оксида (HQNO) (Hoffman et al., 2006), једињења које инхибира раст *S. aureus* (Machan et al., 1992). У нашем раду није испитано да ли нека од врста индукује неко инхибиторно једињење које инхибира или омета раст и развој других врста у мешовитим биофилмовима *E. cloacae/K. oxytoca/S. cerevisiae* и *E. cloacae/S.odorifera/S. cerevisiae*, али је највероватније да комбиновањем три врсте долази до успостављања антагонистичких односа и да је последица тога слаб развој биофилма.

Изолати (*E. cloacae*, *K. oxytoca*, *S. odorifera*, *S. cerevisiae*) су показали добру продукцију биофилмова и на АМВ Media биофилм носачима, како за појединачне тако и за мешовите биофилмове (*K. oxytoca/S. odorifera*, *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* и *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera*). Развој биофилмова на АМВ Media носачима приказан је на Графику 9. На Графику 8 приказани су резултати формирања биофилма на полистриенским микротитарским плочама са 96 отвора. АМВ носачи имају већу површину, па је и продукција биофилма била боља. Не уочава се статистички значајна разлика у продукцији биофилмова како појединачних, тако и мешовитих међусобно ($p > 0,05$). Уочава се статистички значајна разлика код свих микроорганизама између раста биофилмова и времена (I, V и X дан) ($p < 0,05$).

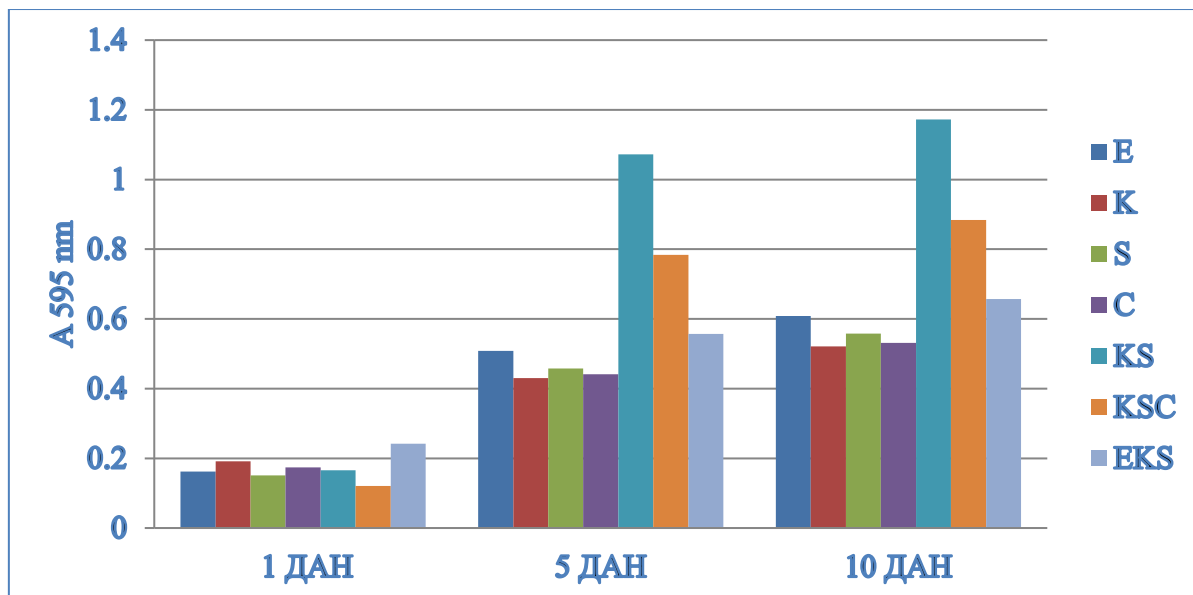


График 9. Раст биофилмова на AMB Media биофилм носачима

Након првог дана, највећа продукција биофилма забележена је код *E. cloacae*/*K. oxytoca*/*S. Odorifera* (EKS). Након V дана највећа продукција биофилма забележена је код *K. oxytoca*/*S. odorifera* (KS) и сличан тренд се наставља и током, као и до X-тог дана експеримента. Разлике се уочавају у продукцији биофилмова између првог и петог дана, и петог и десетог дана. Оне се тичу саме продукције биофилмова између врста микроорганизама који га граде. Биофилмови се других пет дана експеримента развијају доста споријим темпом него првих пет дана. Од појединачних биофилмова најзначајнији раст је уочен код *E. cloacae* (E) и то после петог и десетог дана.

5.2.3. Изолати из отпадних вода постројења за пречишћавање отпадних вода индустрије за производњу аутомобила

Већи број идентификованих изолата из отпадних вода постројења за пречишћавање отпадних вода фабрике за производњу аутомобила ФИАТ (FCA) су успешно формирали биофилмове. Резултати продукције индивидуалних биофилмова изолата који су формирали биофилмове на полистиренским микротитарским плочама је приказана на Графику 10. Изолати *Proteus mirabilis* PMFKG-F5, *Enterobacter cloacae* PMFKG-F16 и *Pseudomonas fluorescens* PMFKG-F17 нису формирали биофилмове и они су на даље искључени из истраживања. Шест микроорганизама са најбољом продукцијом биофилмова у својој групи којој припадају (равномерно изабране бактерије, квасци и филаментозне гљиве) су изабране за даља истраживања на AMB Media носачима.

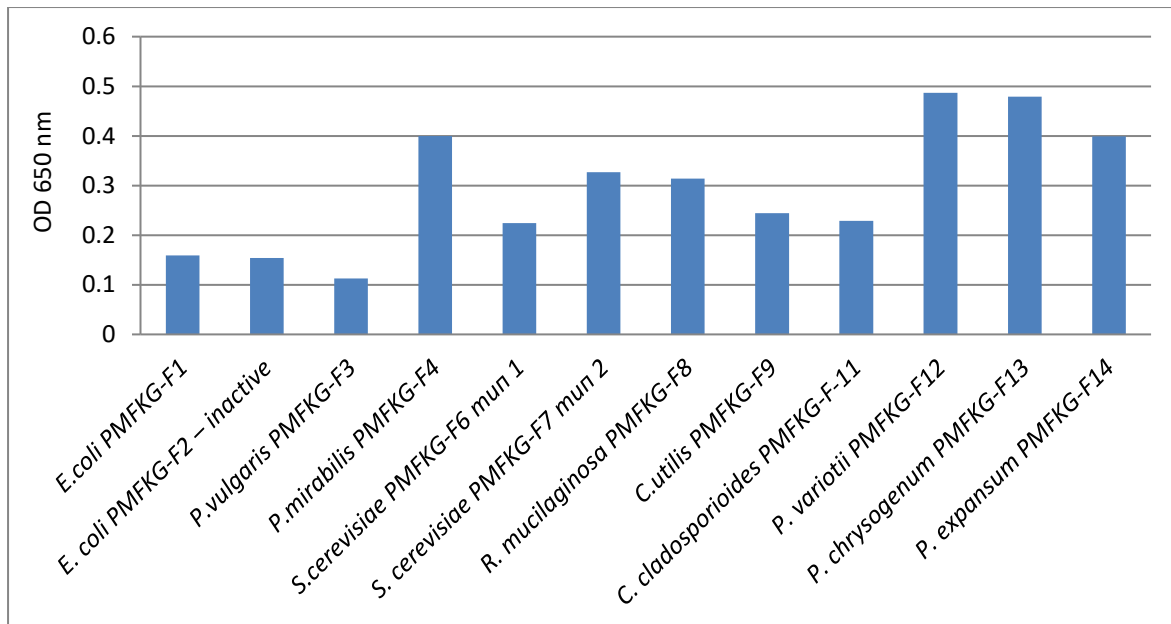


График 10. Раст индивидуалних биофилмова микроорганизама изолованих из постројења за прераду отпадних вода фабрике за производњу аутомобила ФИАТ у полистиренским микротитарским плочама

Резултати продукције индивидуалних биофилмова и мешовитог биофилма направљеног од свих врста које формирају биофилмове на АМВ Media биофилм носачима су приказани на Графику 11.

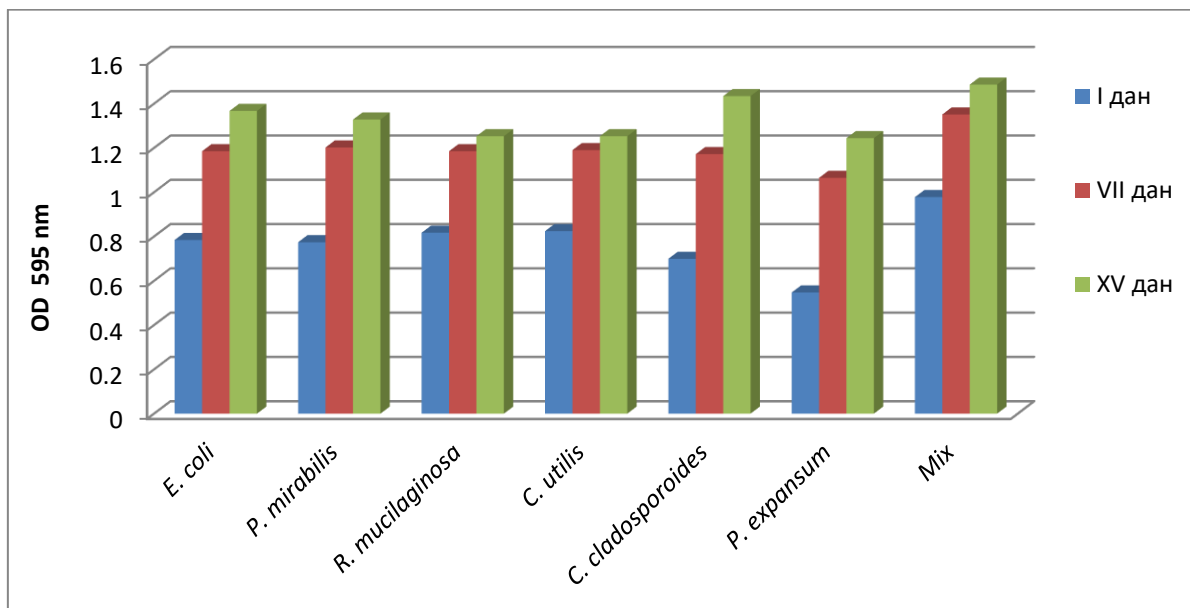


График 11. Раст индивидуалних и мешовитог биофилма врста изолованих из постројења за прераду отпадних вода фабрике за производњу аутомобила ФИАТ на АМВ Media биофилм носачима

Резултати показују да је мешовити филм направљен од свих врста микроорганизама, који и сами појединачно праве биофилм, нешто продуктивнији од појединачних биофилмова. Разлика је више уочљива првог и седмог дана у односу на последњи дан посматрања продукције биофилма. Уочава се статистички значајна

разлика код свих микроорганизама између раста биофилмова и времена (I, VII и XV дан) ($p < 0.05$).

Појединачни биофилмови свих врста се статистички значајно разликују само од *C. cladosporoides* и *P. expansum* ($p < 0.05$). Сви појединачни биофилмови са изузетком *C. utilis* и *C. cladosporoides* се статистички значајно разликују од мешовитог ($p < 0.05$).

5.3. Отпорност и биосорпциона ефикасност лабораторијских изолата према тестираним тешким металима – планктонске ћелије и карактеризација биофилмова

5.3.1. Отпорност планктонских ћелија на присуство тешких метала

Тестирана је отпорност планктонских ћелија на присуство изабраних тешких метала за лабораторијске сојеве *Rhodotorula mucilaginosa* и *Saccharomyces cerevisiae*. Раст и развој планктонских ћелија *R. mucilaginosa* и *S. boulardii* анализирана је у присуству Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} јона. Отпорност планктонских ћелија *R. mucilaginosa* и *S. boulardii* на тестиране тешке метале изражена је као МИКп и МЛКп а резултати су приказани у Табели 10.

R. mucilaginosa је показала раст у присуству свих тестираних метала. У поређењу са њом за *S. bulardii* је детектован раст једино у присуству Pb^{2+} на концентрацијама од 144 $\mu\text{g/mL}$ и мањим, као и у присуству Zn^{2+} на концентрацијама 16 $\mu\text{g/mL}$ и мањим. *R. mucilaginosa* је расла у присуству Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Cd^{2+} на јако високим концентрацијама (1024, 1152, 1614 и 1925 $\mu\text{g/mL}$). У присуству Hg^{2+} и Ni^{2+} њен раст је детектован на нижим концентрацијама (21 $\mu\text{g/mL}$ за Hg^{2+} и 800 $\mu\text{g/mL}$ за Ni^{2+}). Такође, примећено је да са повећањем концентрације метала број ћелија квасца опада.

Метаболичка потреба микроорганизама за металима и потенцијална токсичност метала за микроорганизме стварају потребу за успостављање система неопходних за одржавање хомеостазе и контролу токсичности метала (Dong, 2010).

Табела 10. Отпорност планктонских ћелија *R. mucilaginosa* и *S. boulardii* у присуству тешких метала у периоду излагања од 48 h изражена као МИКп и МЛКп

Тестирана врста	Јон метала	МИКп ^{а*}	МЛКп ^{б*}
<i>R. mucilaginosa</i>	Pb^{2+}	1152	2304
	Cu^{2+}	1024	2048
	Cd^{2+}	1925	19247
	Zn^{2+}	1614	16144
	Hg^{2+}	21	42
	Ni^{2+}	800	1600
	Amfotericin B	15.15	>15.15
<i>S. bulardii</i>	Pb^{2+}	72	144
	Cu^{2+}	< 64	< 64
	Cd^{2+}	< 19	< 19
	Zn^{2+}	16	161
	Hg^{2+}	< 2.63	< 2.63
	Ni^{2+}	< 100	< 100
	Amfotericin B	< 1.89	< 1.89

^аМИКп – Минимална инхибиторна концентрација планктона, ^бМЛКп – Минимална летална концентрација планктона, *вредности приказане у табели су изражене у $\mu\text{g/mL}$.

R. mucilaginosa је показала највећу отпорност у присуству Cu^{2+} (МИКп 1024 $\mu\text{g/mL}$), Cd^{2+} (1925 $\mu\text{g/mL}$) и Zn^{2+} (1614 $\mu\text{g/mL}$) у односу на остале јоне метала. *S. boulardii* показао је отпорност једино у присуству Pb^{2+} (72 $\mu\text{g/mL}$) и Zn^{2+} (161 $\mu\text{g/mL}$). Добијени резултати показују да је *R. mucilaginosa* отпорнија и на присуство Pb^{2+} и Zn^{2+} од *S. boulardii*. Најзначајнији ефекат на *R. mucilaginosa* показује присуство Hg^{2+} где изузетно ниске концентрације доводе до смрти ћелија (МИКп – 21 $\mu\text{g/mL}$).

Други аутори су истраживали отпорност планктонских ћелија *R. mucilaginosa* LM9 у присуству бакра (Kan et al., 2019; Rajpert et al., 2013). Garza-Gonzalez и сарадници (2016) су утврдили да *R. mucilaginosa*, изолат из водотока, регистрован као UANL-001L, показује способност да преживи утицај тешких метала, при чему је МИК за Cu^{2+} и Pb^{2+} добијена на концентрацијама 0.8 и 1 g/L. Добијени резултати су у складу са резултатима добијеним у нашој студији у којој је МИКп за Cu^{2+} и Pb^{2+} детектована на копнцентрацијама 1024 и 1152 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 10).

И за планктонски облик квасца *Rhodotorula rubra* (у цитираном раду наведена под овим називом, иначе је у питању синоним за *R. mucilaginosa*) истражена је отпорност у присуству живе, при чему је толеранција уочена на концентрацији 16.8 $\mu\text{g/mL}$ (Ghosh et al., 2006). Резултати ове студије се поклапају са резултатима наше студије у којој је толеранција за *R. mucilaginosa* уочена на концентрацији 21 $\mu\text{g/mL}$. Постоје и подаци да вредности те толеранције могу да буду и више. Тако су Liu et al., (2017) изоловали сој *R. mucilaginosa* R1 који је могао да расте и при концентрацији од 80 mg/L Hg^{2+} , али је при тим вредностима способност усвајања јона живе била релативно ниска. Аутори су закључили да не постоји повезаност између толеранције на метал и способност акумулације. Присутне органске супстанце су смањиле доступност Hg^{2+} , чиме су утицале на смањивање способности уклањања јона живе. Ипак, утврђено је у наведеном раду да ћелије R1 соја током активног раста могу да троше околне органске материје и на тај начин последично акумулирају садржај Hg^{2+} у раствору.

Li и Yuan (2008) су утврдили отпорност *Rhodotorula* Y11 у присуству кадмијума (0.1 mM), што није у складу са нашим резултатима. *R. mucilaginosa* је у нашем раду показала отпорност према кадмијуму до концентрације 1925 $\mu\text{g/ml}$ (10 mM). Можемо претпоставити да је разлог неслагања резултата био разлика у врсти, иако оне припадају истом роду. У нашем раду коришћена је *R. mucilaginosa* изолат из природе, а у раду Li и Yuan (2008) изолат добијен из рудника, што може имати утицаја на добијене резултате. Други аутори су уочили отпорност *R. rubra* на концентрацији 10 mM (Salinas et al., 2000), што је у потпуности у сагласности са добијеним резултатом наше студије.

5.3.2. Отпорност биофилмова на присуство тешких метала

У потпоглављу 5.2.1 је наведено да комерцијални изолат *S. boulardii* није показао потенцијал за формирање биофилма у полистиренским микротитарским плочама. Из тог разлога овај изолат није даље коришћен у тестирањима.

R. mucilaginosa је успешно формирала биофилм (потпоглавље 5.2.1.), зато је даље тестирана отпорност овог изолата у форми биофилма у присуству јона изабраних тешких метала (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} и Ni^{2+}). Добијени резултати су приказани у Табели 11.

Из добијених резултата се уочава да биофилм *R. mucilaginosa* показује значајну отпорност у присуству свих тестираних метала, што је у складу са резултатима других аутора (Liu et al., 2017; Kan et al., 2019). Harrison et al (2006) су забележили велику отпорност биофилма *S. tropicalis* у присуству тешких метала. У поменутој студији МЛКб за Hg^{2+} уочена је на 1.9 mM, а за Pb^{2+} и Cu^{2+} уочена је на > 77 mM и > 1.3 x 10² mM, са чиме се наши резултати у складу.

Табела 11. Отпорност биофилма *R. mucilaginosa* у присуству тешких метала

Јон метала	МИК6 ^а *	МЛК6 ^б *
Pb ²⁺	> 2304	> 2304
Cu ²⁺	2048	> 2048
Cd ²⁺	> 19247	> 19247
Zn ²⁺	> 16144	> 16144
Hg ²⁺	> 84	> 84
Ni ²⁺	> 3200	> 3200
Амфотерицин Б ^п	15.15	> 15.15

^аМИК6 – Минимална инхибиторна концентрација биофилма; ^бМЛК – Минимална летална концентрација биофилма, *вредности приказане у табели су изражене у µg/mL.

У оквиру биофилма се одигравају регулаторни процеси (хемијски, физички, физиолошки, генетички), који омогућавају микроорганизмима да побољшају механизам толеранције у присуству метала (Harrison et al., 2007). Teitzel и Parsek (2003) су утврдили отпорност планктонских ћелија и биофилма *P. aeruginosa* у присуству Pb²⁺ и Cu²⁺, при чему је МЛК за Pb²⁺ уочена на 0.8 mM и за Cu²⁺ на 6 mM. Ако ове резултате упоредимо са нашим можемо да закључимо да је биофилм *R. mucilaginosa* отпорнији у присуству Pb²⁺ и Cu²⁺ од биофилма *P. aeruginosa*, што показују и новије студије (Kan et al., 2019).

5.3.3. Поређење отпорности планктонских ћелија и биофилмова у присуству тешких метала

Поређењем отпорности планктонских ћелија *R. mucilaginosa* и њеног биофилма на присуство изабраних јона тешких метала се дошло до закључка о значајно већој отпорности форме биофилма у присуству свих тестираних метала. Индекс толеранције (представља однос МЛК6:МЛКп (Harrison et al., 2006) и детаљно је објашњен у поглављу 4.3.1)) дат је у Табели 12.

Табела 12. Индекс толеранције за *R. mucilaginosa* у присуству тешких метала

Јон метала	Индекс толеранције ^а
Pb ²⁺	>1
Cu ²⁺	>2
Cd ²⁺	>1
Zn ²⁺	>1
Hg ²⁺	>1.93
Ni ²⁺	>2

^аоднос МЛК6:МЛКп

Биофилм се по физиологији разликује од планктонских ћелија, што му омогућаје да буде и преко 600 пута отпорнији на утицај тешких метала (Teitzel and Parsek, 2003; Harrison et al., 2006). Биофилм *C. tropicalis* је око 65 пута отпорнији од својих планктонских ћелија. Индекс толеранције за биофилм *C. tropicalis* за Cu²⁺ је био > 26, а за Hg²⁺ 1.5 (Harrison et al., 2006). Резултати нашег истраживања су у корелацији са резултатима наведене студије. Биофилмови су мање осетљиви на антимицробне агенсе од планктонских облика због разлике у метаболизму или због постојања

“персистер” ћелија које се фенотипски разликују од планктонских (Harrison et al., 2004b). Booth и сарадници (2011) наводе да се услед различитих метаболичких функција које се одвијају унутар биофилма, остварује отпорност на више метала истовремено. Биохемијски и генетички регулаторни процеси унутар биофилма, омогућавају микроорганизмима да побољшају механизме толеранције што доприноси бољој отпорности у присуству метала (Harrison et al., 2007), тим пре што се ћелије бактерија у биофилмовима међусобно физиолошки разликују због ограничених количина нутријената и кисеоника (Wan et al., 2017).

Обзиром да *R. mucilaginosa* (планктон и биофилм) показује висок ниво отпорности у присуству изабраних тешких метала (Табеле 10 и 11), истраживање је проширено тестирањем њене способности да формира и мешовити биофилм са лабораторијским изолатом *Escherichia coli* LM1, који формира индивидуално биофилм, као и тестирањем отпорности тих биофилмова према изабраним тешким металима.

5.3.4. Поређење отпорности индивидуалних и мешовитог биофилма изабраних врста у присуству тешких метала

Лабораторијски изолати *R. mucilaginosa* и *Escherichia coli* LM1 су успешно формирали биофилм, како појединачно тако и заједно (потпоглавље 5.2.1). Утицај изабраних тешких метала (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} и Ni^{2+}) на индивидуалне и мешовити биофилм ових изолата испитан је након 24, 48 и 72 h. Одређена је МИКб и МЛКб у присуству тешких метала. Резултати су приказани у Табели 13.

Табела 13. Отпорност индивидиуалних и мешовитог биофилма на присуство тешких метала

Тешки метал	Индивидуални биофилмови				Мешовити биофилм	
	<i>R. mucilaginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>R. mucilaginosa/E. coli</i>	
	МИКб ^{а*}	МЛКб ^{б*}	МИКб	МЛКб	МИКб	МЛКб
Cd^{2+}	52 115	834000	26057	208462	208462	834000
Zn^{2+}	161250	645000	80625	161250	322500	645000
Ni^{2+}	76875	153750	38437	153750	307500	615000
Pb^{2+}	4000	64000	4000	16000	16000	32000
Cu^{2+}	8000	64000	4000	8000	64000	128000
Hg^{2+}	250	500	31.25	62.5	250	500
Амфотерицин Б ^ц	7.81	62.5	7.81	31.25	250	500
Тетрациклин ^д	62.5	125	15.62	62.5	500	500

^аМИКб – минимална инхибиторна концентрација биофилма; ^бМЛКб – минимална летална концентрација биофилма; * вредности у табели су изражене у $\mu\text{g/mL}$.

Резултати показују да је мешовити биофилм отпорнији на присуство тешких метала од индивидуалних. Отпорност према тестираним металима је: *R. mucilaginosa/E. coli* > *R. mucilaginosa* > *E. coli*. Сви биофилмови (индивидуални и мешовити) су показали највећу отпорност у присуству Zn^{2+} и Ni^{2+} , а највећу осетљивост у присуству Hg^{2+} и Pb^{2+} . Иста МИКб код оба индивидуална биофилма била је само за Pb^{2+} (4000 $\mu\text{g/mL}$). Постоје статистички значајне разлике и на нивоу МЛК-а код свих посматраних биофилмова, а на нивоу МИК-а између *R. mucilaginosa* и *R. mucilaginosa/E. coli* ($p < 0.05$).

Неколико студија је испитивало утицај антимикуробних агенаса на осетљивост вишеспецијског (мешовитог) и индивидуалног биофилма. Испитивана је толерантност

R. mucilaginosa UANL-001L (изолиране из реке Pesquería) на присуство тешких метала (Cd, Pb, Zn, Ni, Cu). МИК у присуству ових тешких метала уочена је у распону од 1000 µg/mL до 600 µg/mL (Gonzalez Garza et al., 2016). Наши резултати показују већу отпорност биофилмова на основу вредности МИК, у односу на МИК планктонских ћелија у раду Gonzalez Garza et al., (2016), што иде у прилог тврдњи да биофилм испитиваних врста показује већу отпорност на тешке метале у односу на планктонске форме. У литератури постоје доступни подаци о толеранцији биофилма *R. mucilaginosa* на дејство метала Cu (Kan et al., 2019) и Hg (Liu et al., 2017) чији су резултати у сагласности са нашим резултатима. Наше резултате смо упоредили и са резултатима Harrison и сар. (2006). Они су уочили да је отпорност биофилма *Candida tropicalis* у присуству тешких метала већа него отпорност у планктонској форми. МЛКБ за *C. tropicalis* у присуству Cd >29 186 µg/mL, Zn >79 107 µg/mL, Ni >70 968 µg/mL, Pb >25 503 µg/mL, Cu >10 215 µg/mL и Hg >32 459 µg/mL. За ове резултате можемо рећи да се слажу са нашим истраживањем са изузетком живе (Табела 13).

Да је мешовити биофилм отпорнији на антимикуробни третман у поређењу са индивидуалним биофилмом потврдило је више студија (Burmølle et al., 2006; Kara et al., 2006; Al-Bakri et al., 2005; Leriche et al., 2003). Golby и сар. (2014) су испитивали толеранцију мешовитог биофилма, кога су чиниле бактерије из муља јаловишта из Северне Алберте (Канада), на присуство јона метала Cu, Ag, Pb, Ni, Zn, V, Cr и Sr. Ово истраживање је довело до закључка да је бактеријски мешовити биофилм изузетно отпоран на дејство тестираних метала; МИК преко 20.000 µg/mL за Pb, 16.000 µg/mL за Zn и 3.200 µg/mL за Ni. Наши резултати такође показују да је мешовити биофилм отпоран на тешке метале. МИКБ за мешовити биофилм у присуству Pb је уочен на концентрацији од 16.000 µg/mL, за Zn МИК 32.2500 µg/mL и Ni 307.500 µg/mL (Табела 13). Непосредна близина и комплексне интеракције између микроорганизама у мешовитим биофилмовима представљају основу синергистичког и антагонистичког понашања. Синергистичке интеракције су чешће и обезбеђују егзистенцију. Као последица се јавља отпорност на антимикуробне агенсе. Отпорност у оквиру мешовитих биофилмова се заснива на способности заједнице да сарађују и да на овај начин опстану и преживе утицај антимикуробних агената (Elias and Banin, 2012).

Adam и сарадници (2002a) су испитивали утицај антибиотика на мешовити биофилм кога чине квасац *S. albicans* и бактерија *Staphylococcus epidermidis*. Истраживање је утврдило да у овом мешовитом биофилму бактерија и квасац обезбеђују опстанак један другом када су суочени са дејством антибиотика. Резултати ове студије су у сагласности са нашим резултатима где је мешовити биофилм био толерантнији на дејство антибиотика у поређењу са индивидуалним (Табела 13). Компоненте које чине ЕПС матрикс варирају у зависности од врсте и услова у којима се биофилм формира (Elias and Banin, 2012). Утврђено је да када *S. epidermidis* који не производи довољну количину ЕПС-а, формира мешовити биофилм са *S. albicans*, отпорност на антибиотик се повећава. ЕПС који производи *S. albicans*, штити *S. epidermidis* од утицаја ванкомицина (Adam et al., 2002a). На основу поменуте студије може се претпоставити да се сличан процес одиграва и у оквиру мешовитог биофилма кога чини *R. mucilaginosa* и *E. coli*.

Elvers и сарадници су испитали како на биофилм који се састоји од три врсте бактерија и три врсте гљива утиче антимикуробни агенс. Све три бактеријске врсте су показале отпорност ка антимикуробном агенсу када су у мешовитом биофилму. Гљивице су се у овом истраживању показале као мање отпорне (Elvers et al., 2002).

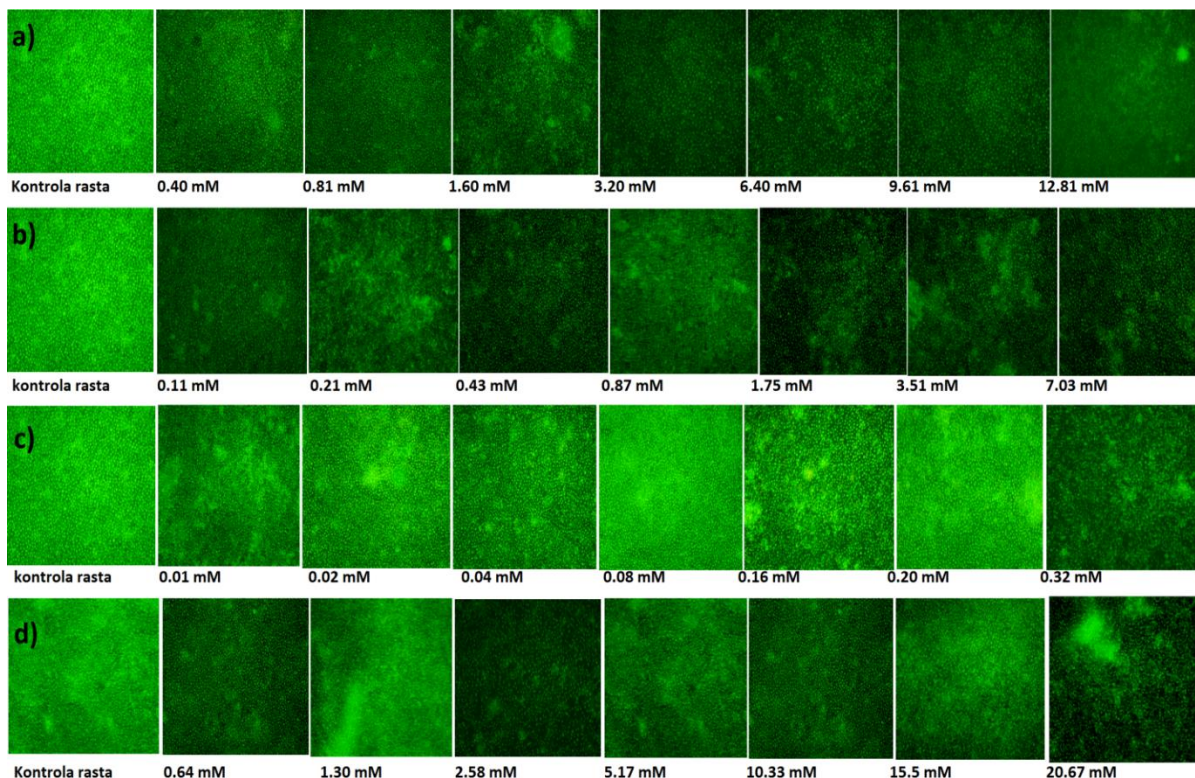
На основу добијених резултата може се рећи да две врсте када су у мешовитом биофилму боље подносе утицај тестираних метала и антибиотика, него када биофилм

формирају појединачно, што показују и новије судије (Lara и Lopez-Ribot, 2020; Rao et al., 2020; Rodrigues and Rodrigues, 2020).

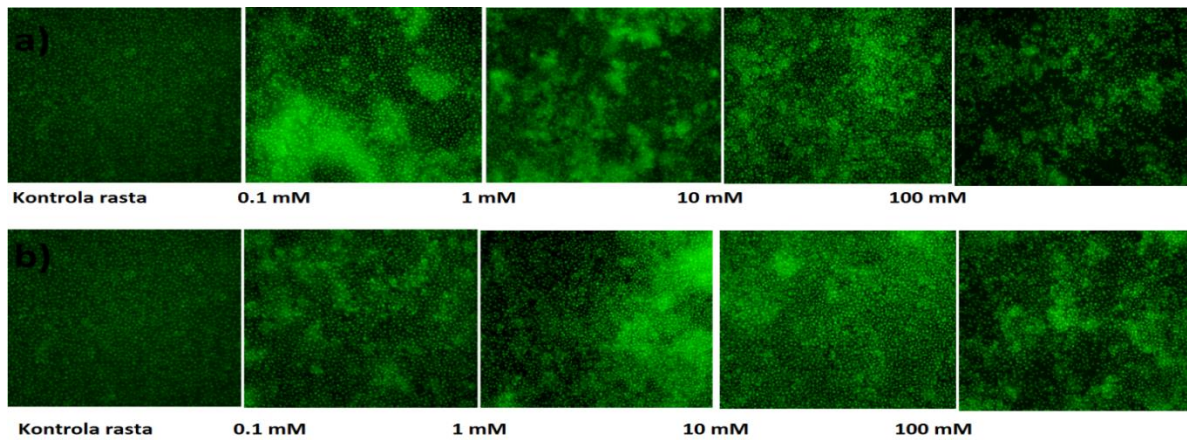
5.3.5. Флуоресцентна микроскопија

У зависности од тога шта се проучава, Quintas et al. (2014) наводе да код коришћења оваквог облика микроскопије постоји широк спектар различитих комбинација боја, које се могу користити у више сврха, као што су обележавање ћелија или идентификација виталности бактерија. Флуоресцентне технике које се користе у комбинацији са микроскопијом знатно су превазишле нека ограничења традиционалних техника за праћење формирања биофилма на плочама, мада показују и нека ограничења, попут контроверзе око њихове поузданости при процени дебљине биофилма. Из тог разлога је наведено да би мерења виталности бактерија изведена применом ових техника требало упоређивати са другим молекуларним и микробиолошким техникама и допуњавати их осталим техникама микроскопије.

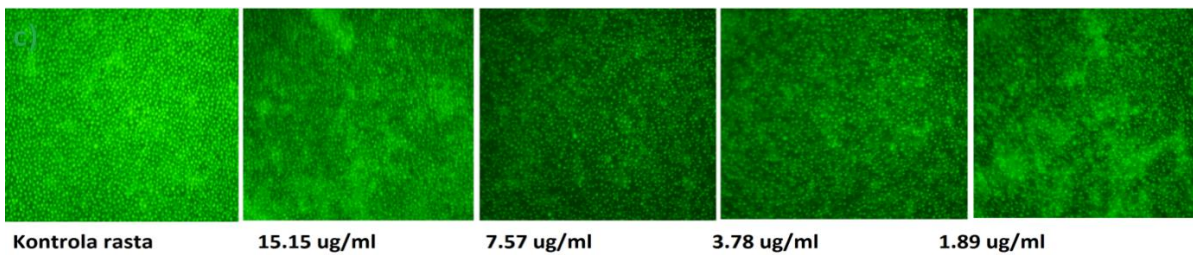
У тесту отпорности индивидуалног биофилма као допуна ЕЛИСА тесту коришћена је флуоресцентна микроскопија чиме је извршено обележавање биофилма ради праћења утицаја тешких метала на биофилм после 72 h. Утицај тешких метала на формирану биофилм *R. mucilaginosa* посматран је на флуоресцентном микроскопу а резултати су приказани на Сликама 13-15. Биофилм је био присутан на свим тестираним концентрацијама као и у контроли раста. Резултати МЛКБ добијени читавањем оптичке густине на ЕЛИСА читачу (Табела 11), се поклапају са резултатима добијеним на флуоресцентном микроскопу. Флуоресцентна микроскопија је коришћена као визуелна потврда резултата добијених ЕЛИСА читачем. Резултати МЛКБ добијени читавањем оптичке густине на ЕЛИСА читачу, се поклапају са резултатима добијеним на флуоресцентном микроскопу.



Слика 13. Утицај а) бабра; б) олова с) живе д) никла на биофилм *R. mucilaginosa*.
Слике су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.

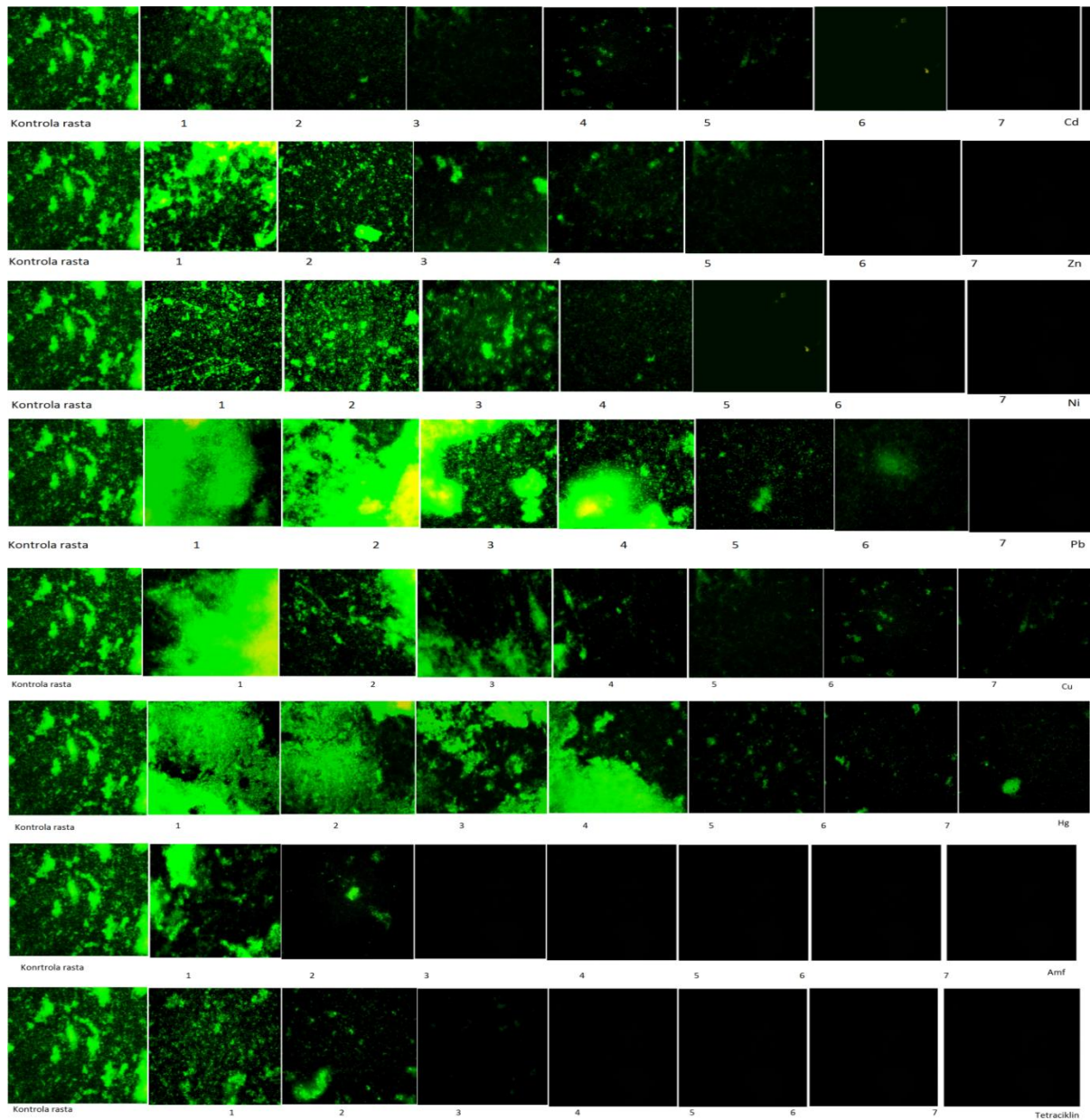


Слика 14. Утицај а) цинка и б) кадмијума на биофилм *R. mucilaginosa*. Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.

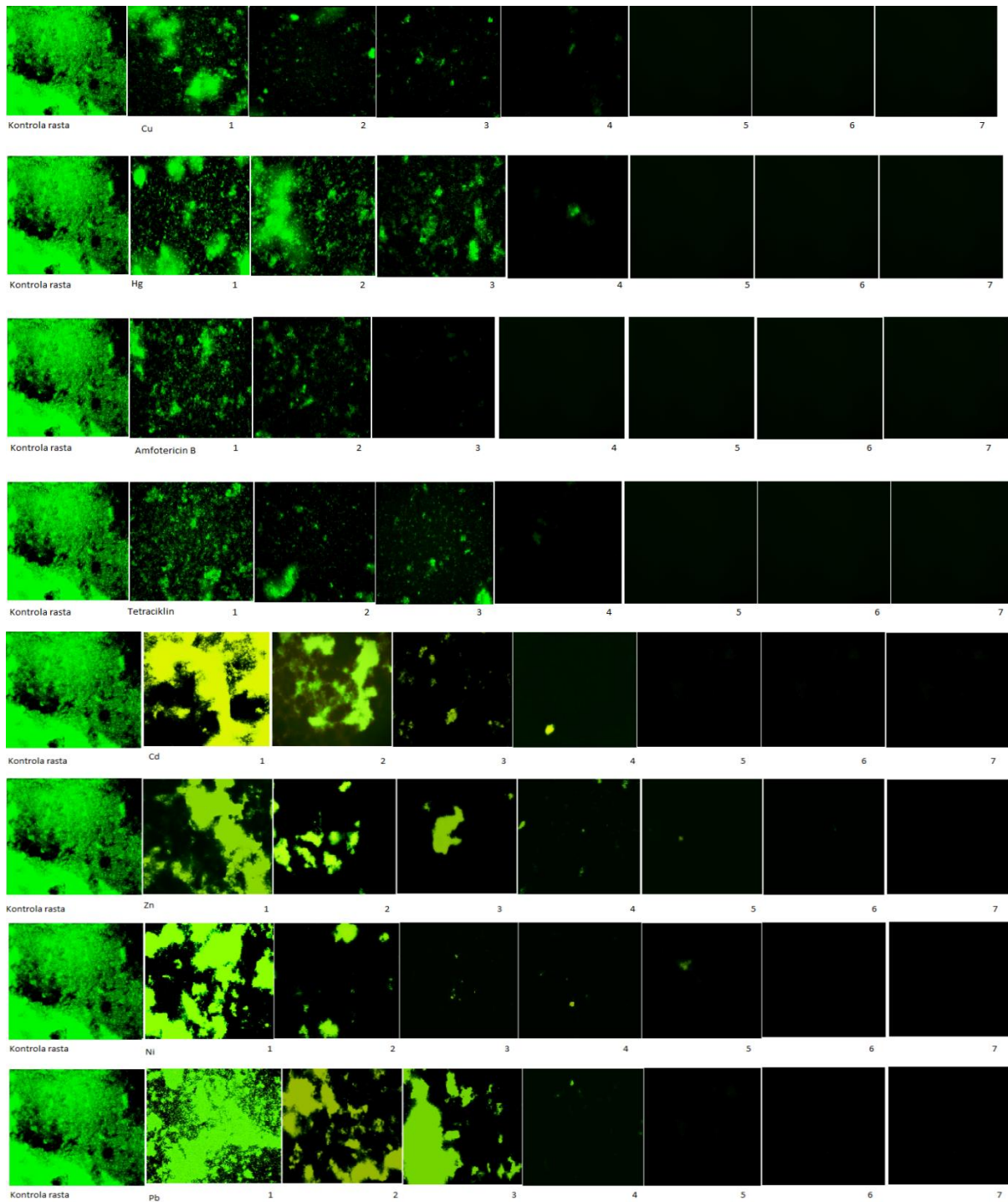


Слика 15. Утицај амфотерицина Б на биофилм *R. mucilaginosa*, Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.

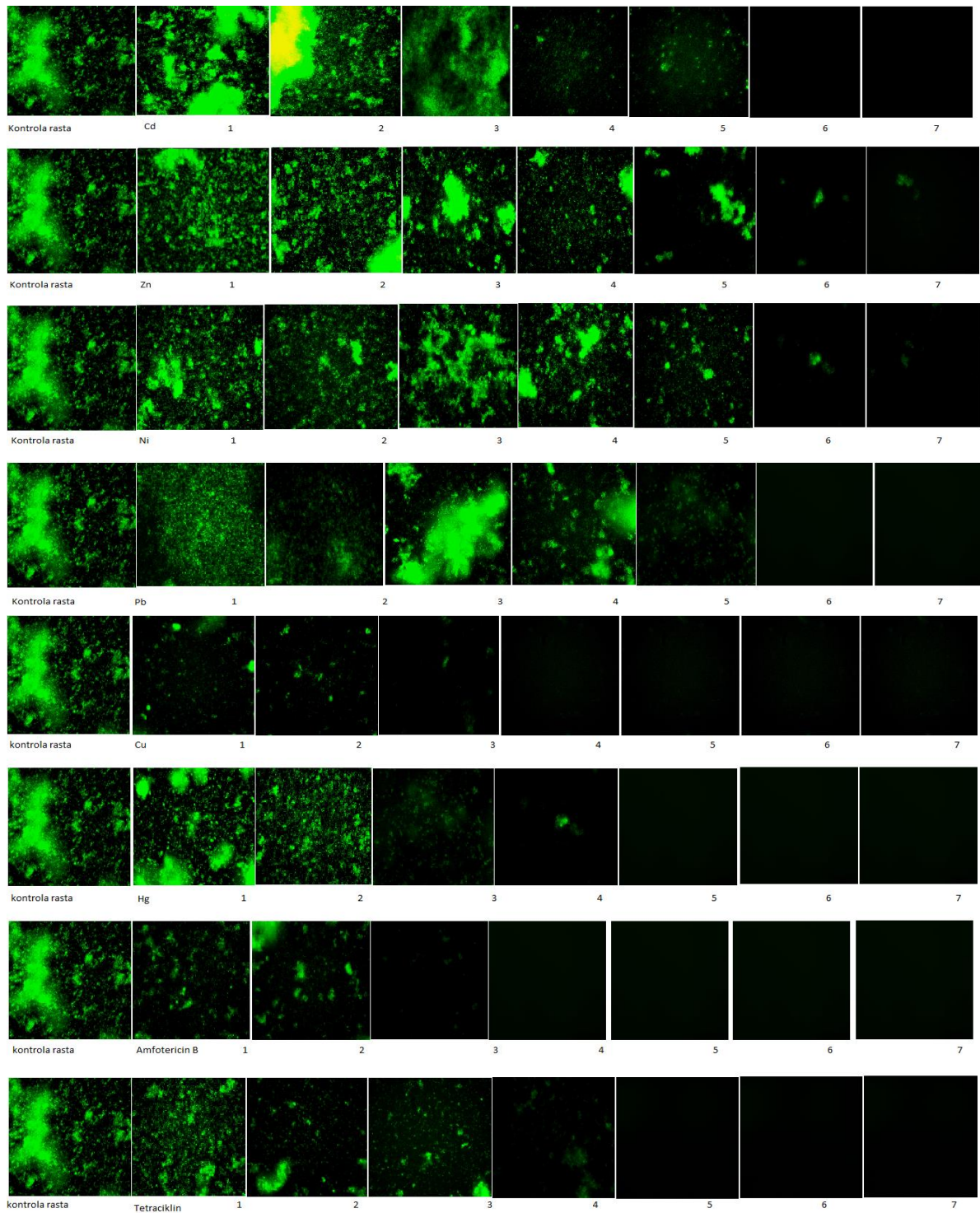
У тесту отпорности индивидуалних и мешовитог биофилма истовремено је флуоресцентном микроскопијом праћен утицај тешких метала на појединачне и мешовити биофилм током 24, 48 и 72 h. Резултати флуоресцентне микроскопије приказани су на Сликама 16-24, а бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација приказан у Табели 4 (потпоглавље 4.1.1).



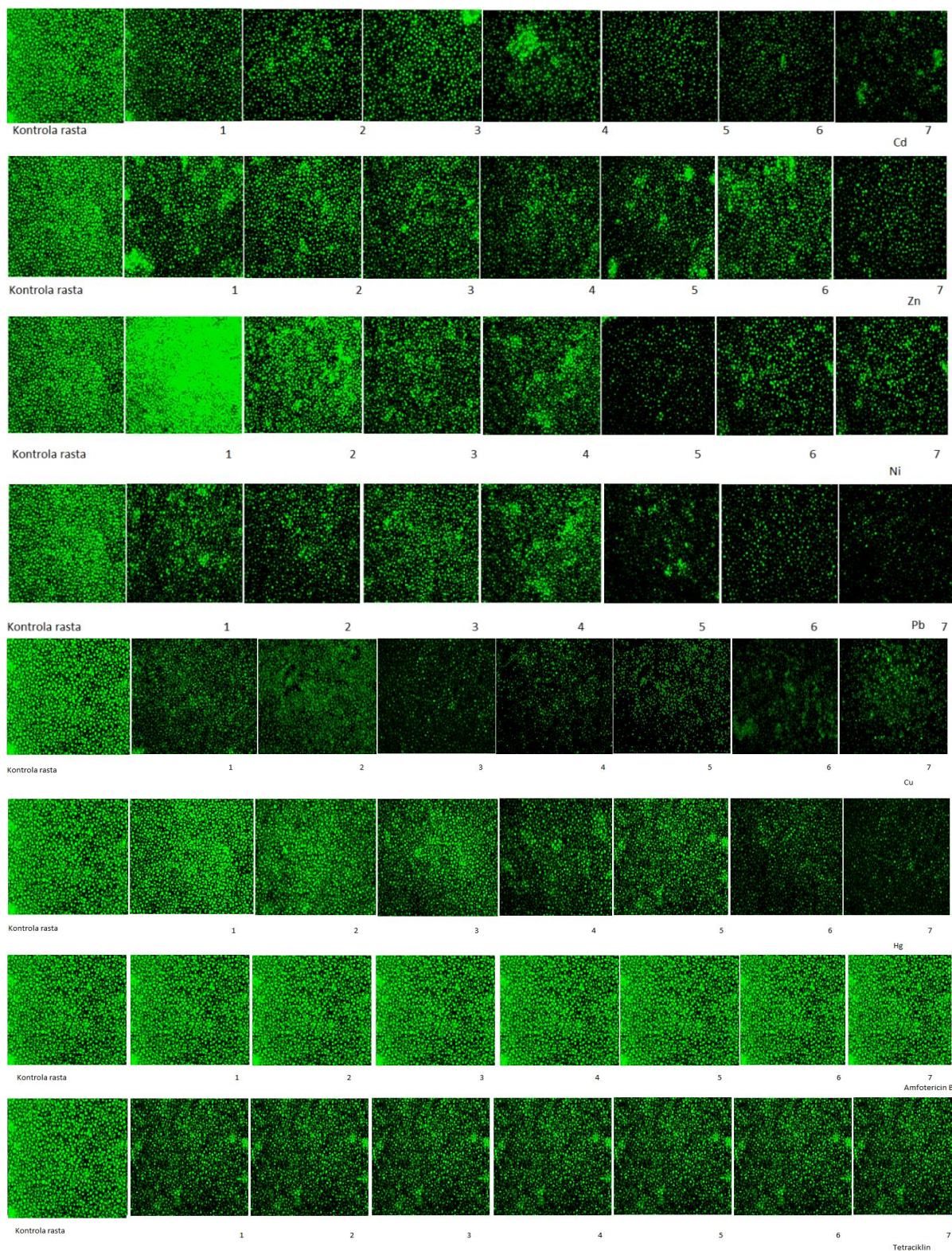
Слика 16. Утицај тестираних супстанција на биофилм *E. coli* након 24 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4). Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.



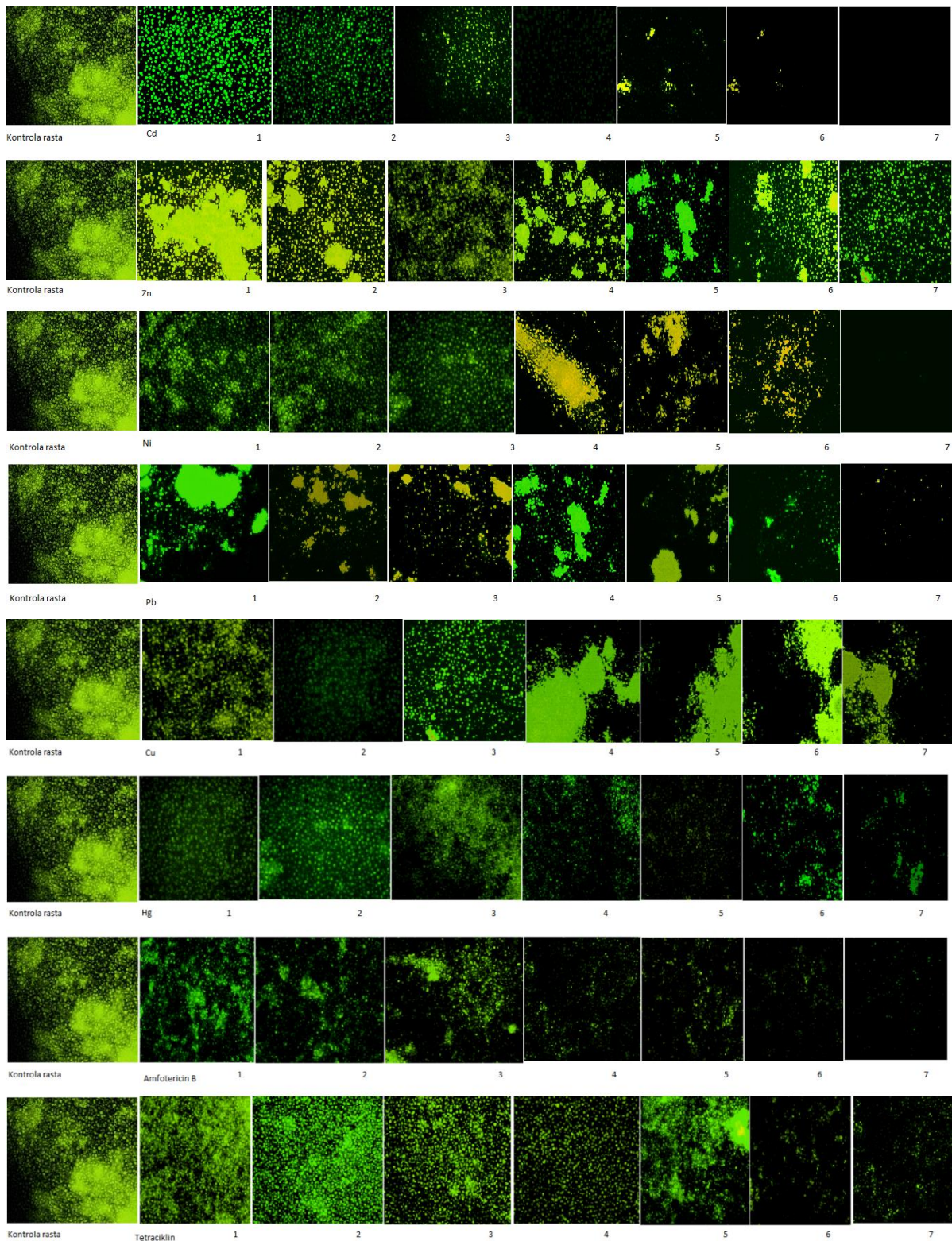
Слика 17. Утицај тестираних супстанци на биофилм *E. coli* након 48 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4). Слике су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.



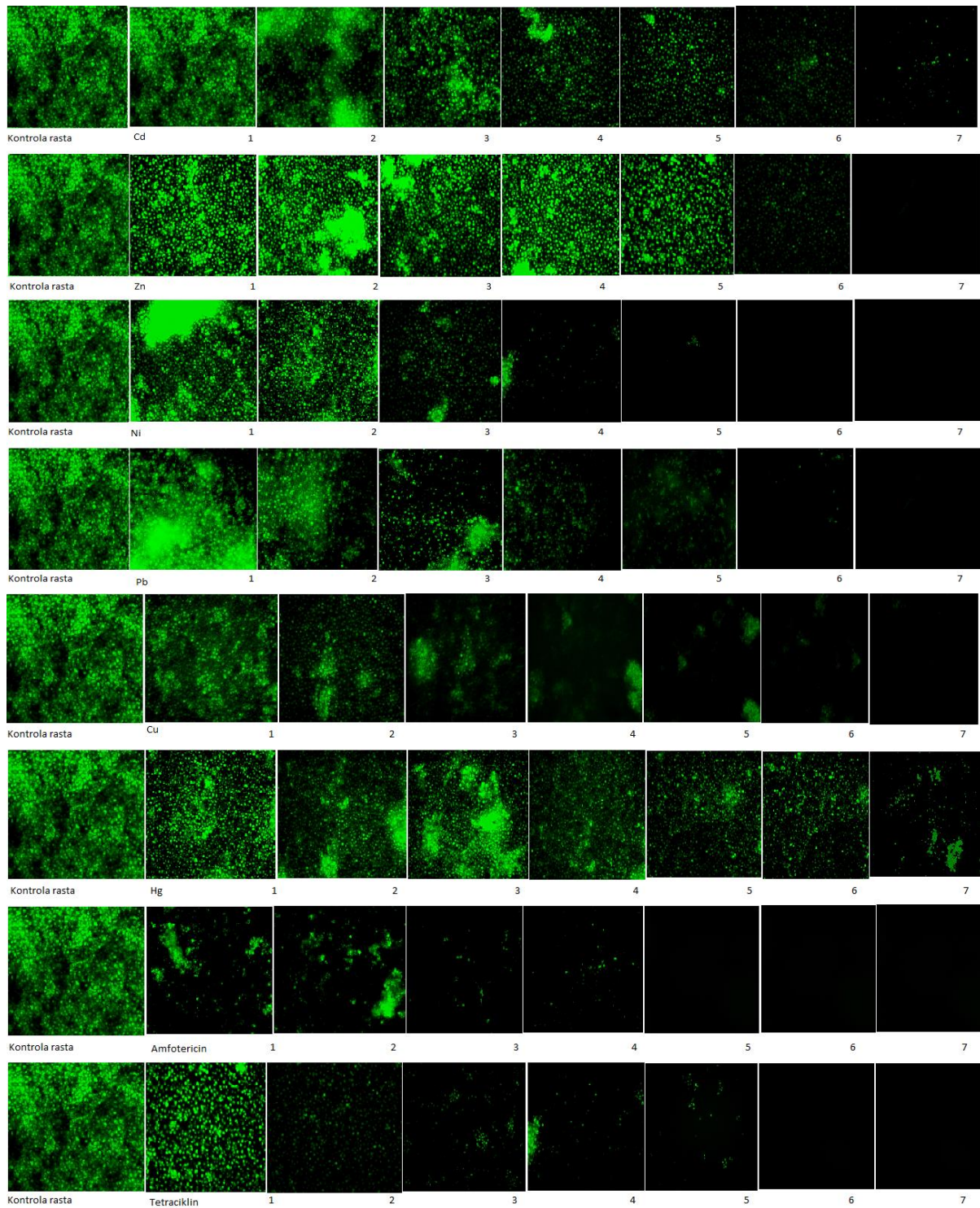
Slika 18. Утицај тестираних супстанци на биофилм *E. coli* након 72 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4). Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.



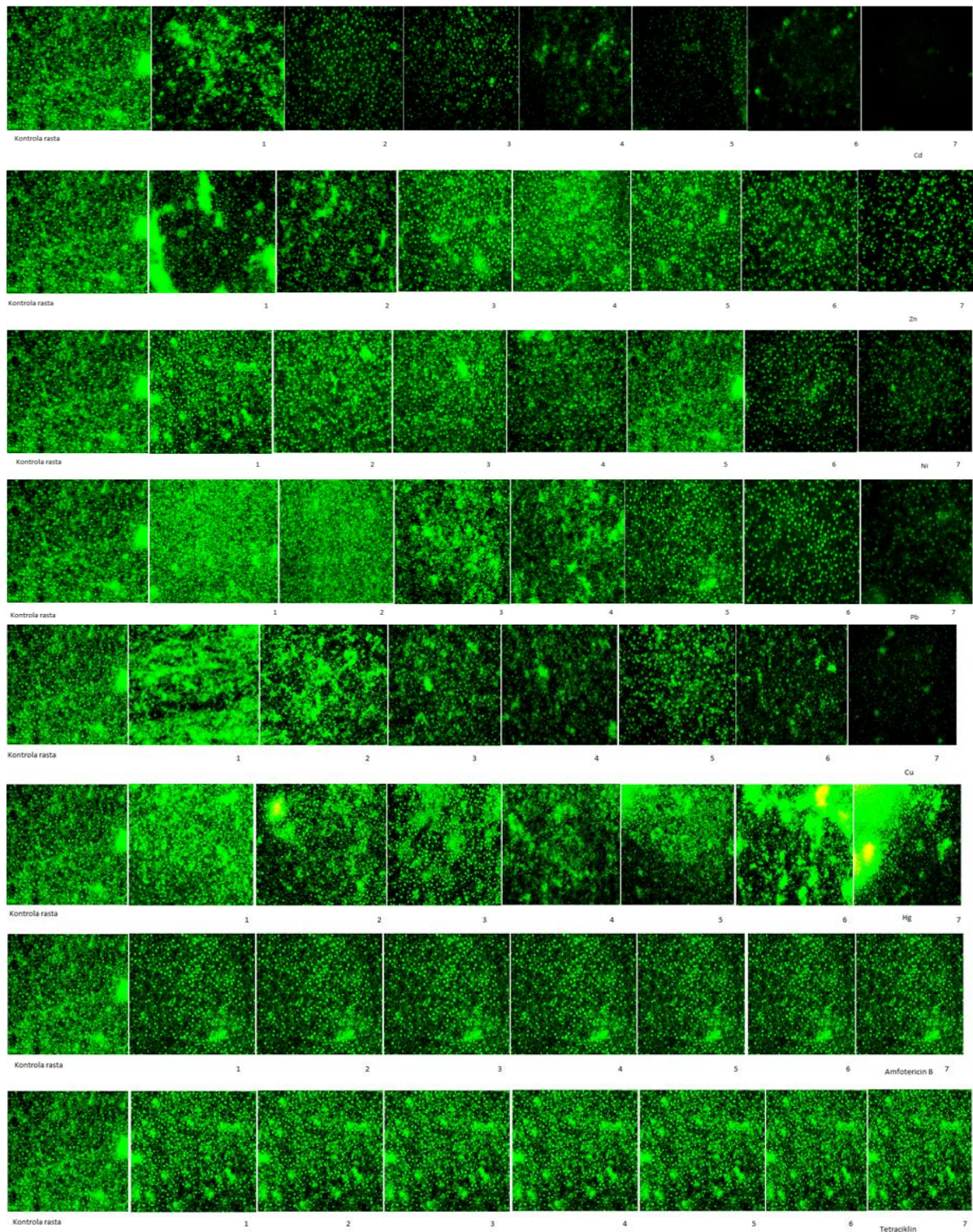
Слика 19. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa* након 24 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4). Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.



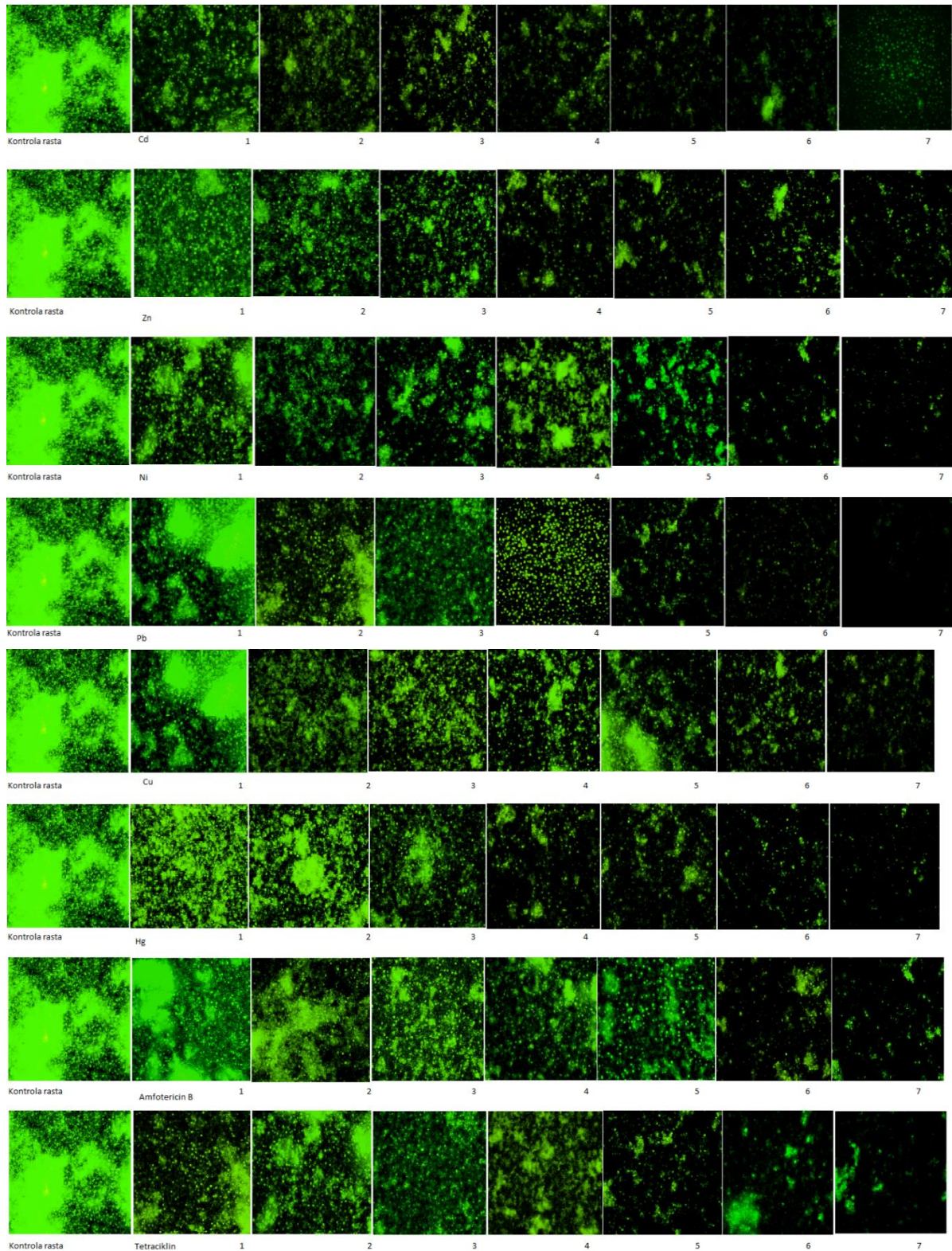
Слика 20. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa* након 48 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4). Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.



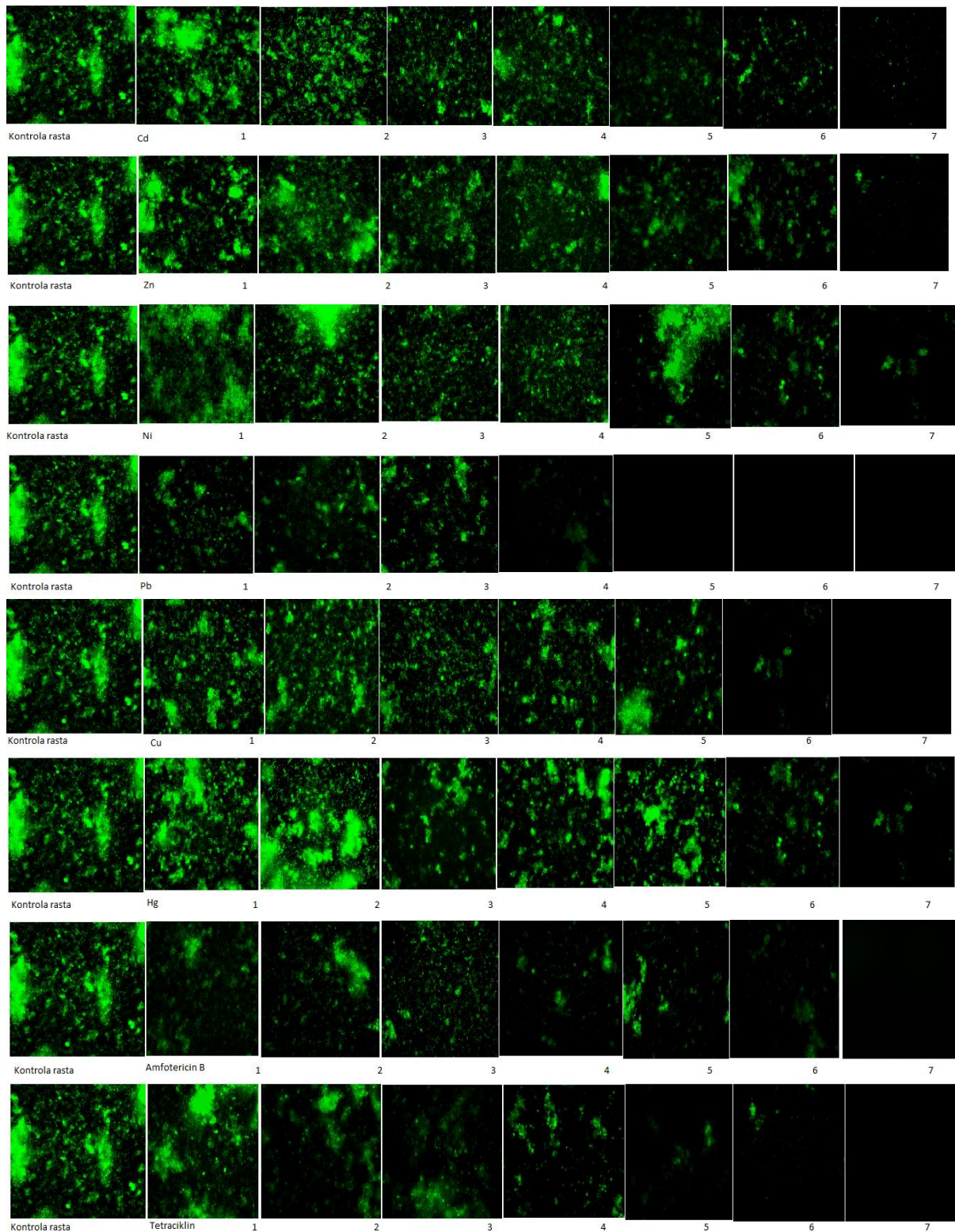
Слика 21. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa* након 72 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4). Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.



Слика 22. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa/E. coli* након 24 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4). Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.



Слика 23. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa/E. coli* након 48 h. Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4).



Слика 24. Утицај тестираних супстанци на биофилм *R. mucilaginosa/E. coli* након 72 h. Бројевима од 1 до 7 обележен је распон концентрација (Табела 4). Сlike су добијене коришћењем флуоресцентне микроскопије.

Обзиром да је утицај тешких метала праћен током 72 h, уочено је да отпорност индивидуалних и мешовитог биофилма у присуству тешких метала опада са временом. Такође је уочено да се са повећањем концентрације тестираних метала смањује продукција биофилмова. На сликама се МИКБ процењује као најнижа концентрација антимикробног агенса којом се инхибира видљив раст микроорганизама, а МЛКБ као концентрација која изазива летални ефекат на тест организам (Andrews, 2001).

У доступној литератури има радова о праћењу биофилма флуоресцентним микроскопом (Bogachev et al., 2018; Daddi Oubekka et al., 2017; Quintas et al., 2014). Teitzel и Parsek (2003) су користили конфокални микроскоп за истраживање планктонских форми и биофилма *Pseudomonas aeruginosa* у присуству тешких метала, као и у новијој студији Reichhardt и Parsek (2019). Vojsen et al. (2012) су навели да се биофилм *S. cerevisiae* јако добро може применити за конфокалну ласерску скенирајућу микроскопију и флуорофорно обележавање протеина, ДНК и РНК. У студији Gonzalez Garza et al. (2016) су за испитивање толерантности планктонске форме соја *R. mucilaginosa* UANL-001L на тешке метале, користили електронски микроскоп, као и у раду Nunes et al. (2013), где је испитана способност продукције биофилмова различитих врста *Rhodotorula*.

Флуоресцентна микроскопија у овом раду коришћена је да би се добио визуелни приказ виталности биофилма и визуелни приказ површинског слоја и изглед микробиолошких ћелија изложених једињењима метала у односу на контролу. Такође је праћено стање способности продукције биофилма у присуству тешких метала, ради праћења толеранције биофилма на присуство тешких метала. Резултати са флуоресцентног микроскопа поклапају се са резултатима у којима су добијене вредности МИКБ и МЛКБ (Табела 11).

5.3.6. Биосорпциона ефикасност планктонских ћелија и формираног биофилма

Пошто је лабораторијски изолат *R. mucilaginosa* показао значајне резултате у предходним испитивањима (продукција биофилма, индивидуално и са другим микроорганизмом, као и значајна отпорност на присуство тестираних тешких метала) на даље је коришћен за испитивање тестова бисорпције. Биосорпциона ефикасност је праћена током 12, 24 и 48 h. Резултати биосорпције Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} јона од стране планктонских ћелија и формираног биофилма *R. mucilaginosa*, приказани су у Табели 14.

Табела 14. Биосорпција метала *R. mucilaginosa* (%)

Време/метал	Планктон					
	Cd^{2+}	Zn^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{2+}	Cu^{2+}	Ni^{2+}
12 h	1.11	2.57	0.28	6.25	0.05	2.42
24 h	1.49	3.15	4.08	9.92	1.09	3.03
48 h	2.11	4.99	4.79	10.25	5.49	29.25
Биофилм						
12 h	81.12	82.22	81.58	75.37	80.89	77.85
24 h	83.49	85.04	83.59	85.93	90.81	87.23
48 h	90.71	89.62	95.39	94.81	91.71	91.24

Значајно бољу ефикасност показао је биофилм *R. mucilaginosa*. Ефикасност уклањања метала кретала се у распону од 0.05%-29.25% за планктонске ћелије и

81.12%-95.39 за биофилм (Табела 14). Постоји линеарна корелација између посматраног времена и отклања свих метала како код планктонских микроорганизама, тако и код биофилмова (распон $R=0.99$ - $R=0.80$). Ако се упореде стопе уклањања метала код биофилма постоји корелација у уклањању код свих метала, док код планктонске форме корелација у уклањању се не уочава само између Zn и Cu са Hg и Pb (распон $R=0.78$ - $R=0.70$). Уколико се пореди отклањање метала код планктонске форме постоји статистички значајна разлика у отклањању Pb у односу на отклањање Cd, Zn, Hg и Cu ($p<0.05$). Не постоји статистички значајна разлика у отклањању ниједног метала у односу на друге код биофилма ($p>0.05$). Добијени резултати показују уочљиву разлику у ефикасности уклањања јона метала поређењем биофилма и планктонских ћелија, што потврђују и резултати студије Kan et al. (2019).

Доступна литература садржи информације о уклањању бакра од стране планктонских ћелија *Candida* sp. изолата из канализације. Биосорпциона ефикасност кретала се од 22-55% у период од 8 дана (Dönmez and Aksu, 2001). Биосорпција бакра код планктонских ћелија *Saccharomyces cerevisiae* у период од 4 дана била је 13-74% (Malik, 2004). У овом истраживању проценат уклањања Cu^{2+} након 2 дана излагања био 5.49%.

Поједини научници су одређивали ниво биосорпције планктонских ћелија *Candida utilis* и *Aspergillus niger* (Safaa et al., 2013) у присуству Pb^{2+} и Ni^{2+} . Резултати те студије су забележили изразиту биосорпцију планктонске форме *C. utilis* која је за јоне Pb^{2+} износила 83%, а за јоне Ni^{2+} 80%. Афинитет ћелија квасца према металу може се објаснити чињеницом да ћелије микроорганизама имају активна нуклеарна места намењена сорпцији јона метала (Volesky, 2003).

Биофилм *R. mucilaginosa* је показао већу ефикасност у уклањању метала у поређењу са планктонским ћелијама. Процент уклањања тешких метала планктонским ћелијама *R. mucilaginosa* након 48 часова инкубације износио је за Cd^{2+} (2,11%), Zn^{2+} (4,99%) и Ni^{2+} (29,25%). Процент уклањања тешких метала биофилмом *R. mucilaginosa* за 48 h за сва три метала је износио је преко 90%. Процент уклањања Ni^{2+} након 5-15 дана био је 29-57%. У раду Villegas et al. (2005) забележен је раст *R. mucilaginosa* RCL-11 у присуству 0.1 mM Cu^{2+} . За *Rhodotorula mucilaginosa* AN5, изолат са Антарктика, забележена је толеранција у присуству тешким металима следећим редоследом: $Cd > Pb = Mn > Cu > Cr > Hg$ (Kan et al., 2019). *Rhodotorula mucilaginosa* у раду Salvadori et al., (2014) је коришћена за анализу биосорпције бакра. Мртва биомаса је показала највећи биосорпциони капацитет бакра, 26,2 мг г (-1). Сој *Rhodotorula mucilaginosa* R1 је показао способност раста у присуству 80 mg/L Hg^{2+} . Максимални капацитет везивања Hg^{2+} употребом *Rhodotorula mucilaginosa* R1 био је 69,9 mg/L, при чему мртве ћелије могу да вежу 15% више Hg^{2+} од живих ћелија (Liu et al., 2017).

Током тестираног времена (12, 24 и 48 h) уочено је да се концентрација јона метала у медујуму смањује. На овај начин показана је биосорпциона ефикасност биофилма, што је у складу са резултатима Basak et al., (2014). Показано је да постоје варијације у брзини уклањања јона метала од стране биофилма, током тестираног времена (Табела 14). Очигледно је да се процес биосорпције одвијао у две фазе. Прва фаза се одвијала јако брзо, због високе иницијалне активности биофилма као биосорбента. Велика ефикасност уклањања јона метала примећена је током првог дана. Након тога уследила је спора фаза уклањања метала, при чему су промене преостале концентрације јона метала биле занемарљиве. Наша опажања била су у складу са студијом Volesky (2003). Basak et al. (2014) испитивали су уклањање јона Zn^{2+} помоћу биофилма *Candida rugosa* и *Cryptococcus laurentii*. Процент уклањања Zn^{2+} био је 88% и 72%.

5.3.7. Биосорпциона ефикасност индивидуалних и мешовитог биофилма

Пошто је биофилм *R. mucilaginosa* показао значајну биосорпциону ефикасност надаље је праћена и упоређивана биосорпциона способност овог биофилма и биофилма *E. coli*, као и њиховог мешовитог биофилма према изабраним тешким металима. Биосорпциона ефикасност индивидуалних и мешовитог биофилма, током 5 дана, за тестиране тешке метале изражена као проценат уклањања истих приказана је на Графицима 12 и 13. У истом третману мерена је и сува маса биофилмова и резултати су приказани на Графику 14. Резултати биосорпционог потенцијала потврђени су дитизон тестом за Pb^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} .

Ефикасност уклањања метала појединачних биофилмова била је у опсегу од 81.56% до 97.85% (Графици 12 и 13). Кад се пореди уклањање метала, појединачни биофилмови су били најефикаснији у уклањању Cd^{2+} (*E. coli* 94.85%, *R. mucilaginosa* 97,85%). Назначајнију ефикасност у уклањању тешких метала показао је мешовити биофилм и то током свих пет дана испитивања. Биофилм *R. mucilaginosa/E. coli* показао је распон уклањања метала од 94.99% до 99.88% (Графици 12 и 13). Концентрације јона метала су се смањивале у току третмана, што указује на високу ефикасност биофилмова. Наши резултати су у складу са резултатима других истраживања (Liu et al., 2019; Rezić et al., 2017; Basak et al., 2104; Quintelas et al., 2009; Quintelas et al., 2008).

Као и код поређења биосорпционе способности планктона и биофилма *R. mucilaginosa*, и у овом експерименту се може видети да се процес уклањања метала одвија у две фазе. Прва је екстремно брза због велике иницијалне активности биофилмова као биосорбента. Уочава се да је највећа ефикасност током третмана била прва 2-3 дана. Након тога следи спора фаза уклањања метала при чему су промене у резидуалној количини метала јако мале (Volesky, 2003). Quintelas и сар. (2008) су у свом раду испитивали биосорпцију Cr^{6+} помоћу биофилма *Bacillus coagulans* и гранула активног угља. Капацитет усвајања Cr^{6+} био је 5.34 mg/g при иницијалној концентрацији од 100 $\mu g/mL$. Quintelas и сар. (2009) су представили резултате студије у којој су измерили проценат уклањања Cd^{2+} и Ni^{2+} јона на различитим иницијалним концентрацијама, помоћу биофилма *E. coli* и каолина. Процент уклањања Cd^{2+} на иницијалној концентрацији 97 mg/l био је 71.3%, што је у складу са нашим резултатом где је процентуална ефикасност уклањања Cd^{2+} биофилмом *E. coli* након 48 h била 74.18%, што је у складу са резултатима Quintelas et al. (2009).

Процент уклањања Ni^{2+} на иницијалној концентрацији 101 mg/L био је 45.3%, што је у складу са резултатом добијеним у нашем раду где је процентуална ефикасност уклањања Ni^{2+} биофилмом *E. coli* након 24 h била 49.34%.

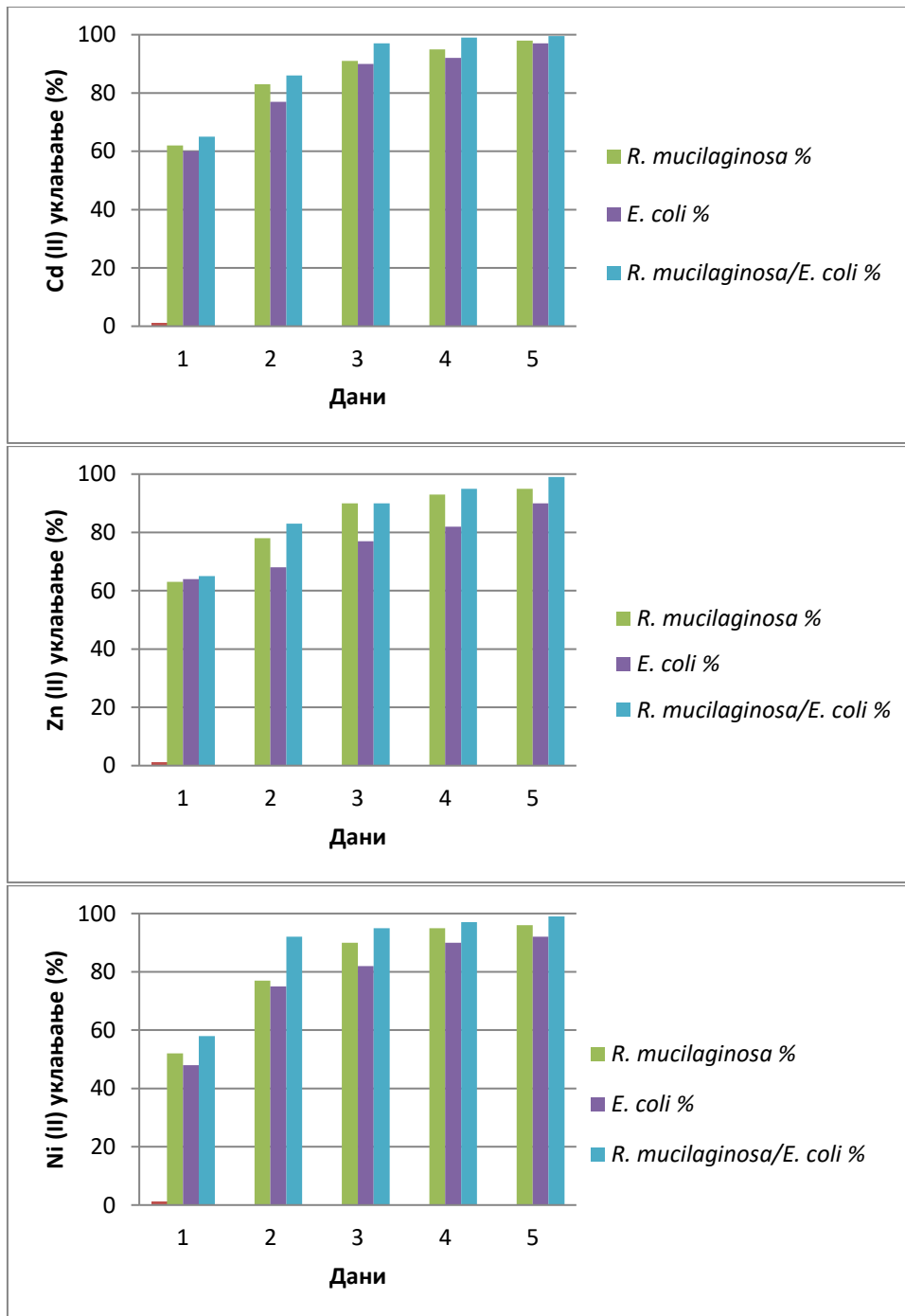


График 12. Процент уклањања Cd^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} индивидуалним и мешовитим биофилмовима *R. mucilaginosa*, *E. coli* и *R. mucilaginosa/E. coli* током пет дана испитивања

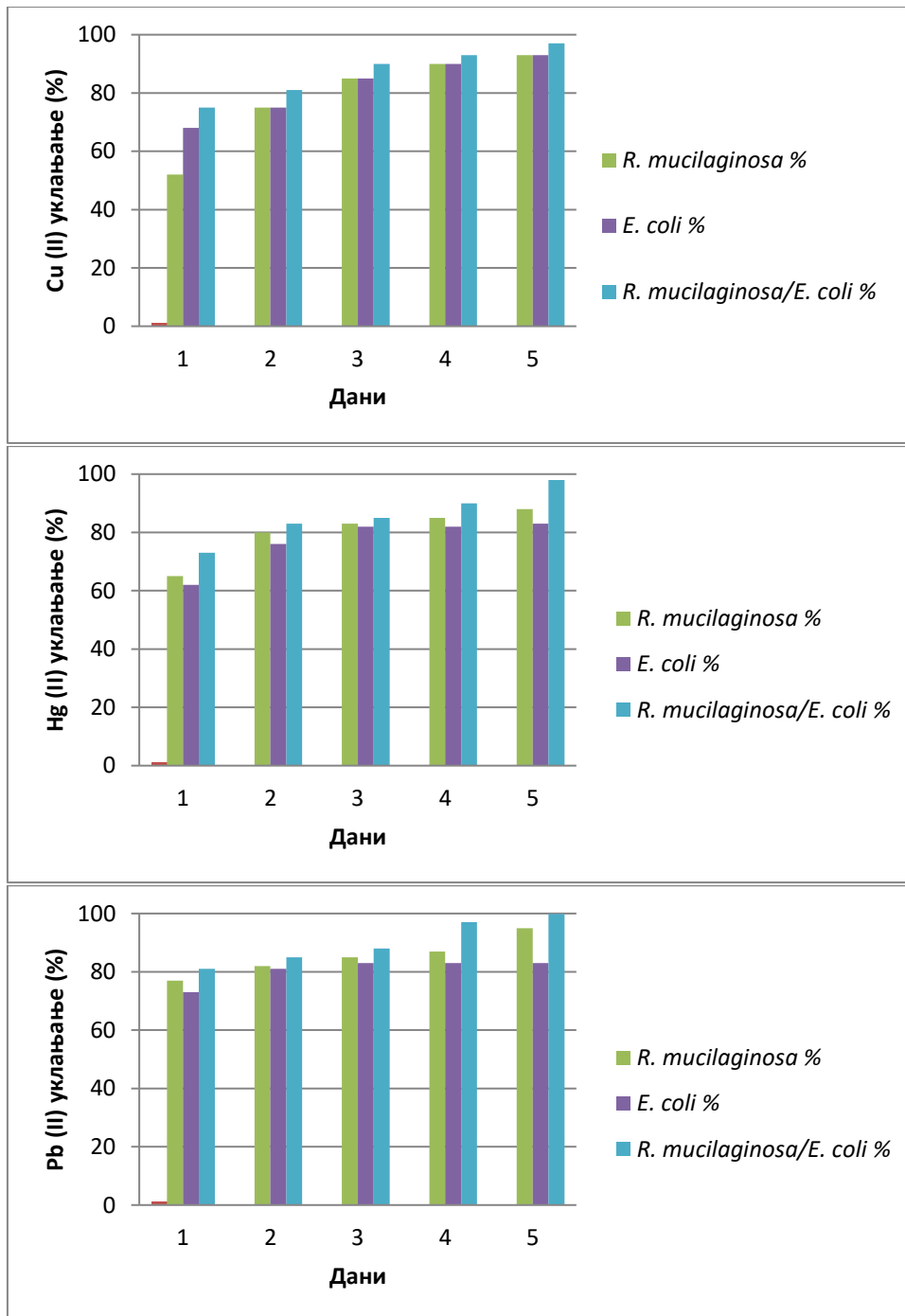


График 13. Процент уклањања Cu^{2+} , Hg^{2+} и Pb^{2+} индивидуалним и мешовитим биофилмовима *R. mucilaginosa*, *E. coli* и *R. mucilaginosa/E. coli* током пет дана испитивања

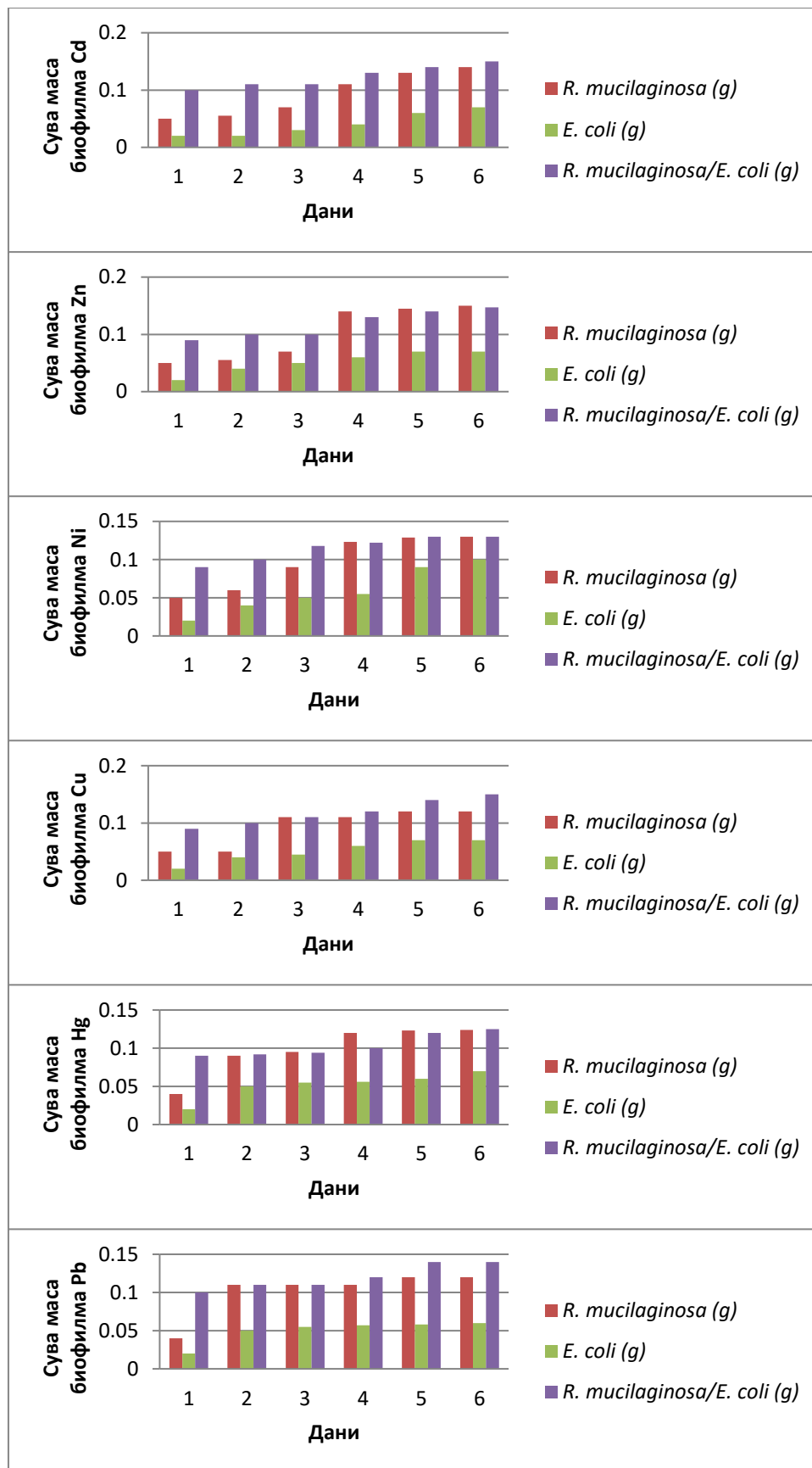


График 14. Сува маса појединачних и мешовитог биофилма у присуству Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} и Hg^{2+} .

У нашем истраживању процентуална ефикасност уклањања Zn^{2+} биофилмом *R. mucilaginosa* након 5 дана је била 89.62% (График 12) што је у складу са резултатом који су добили Basak и сар. (2014). У нашим резултатима процентуална ефикасност уклањања Zn^{2+} мешовитим биофилмом након 48 h била је 87%, док је процентуална ефикасност уклањања Zn^{2+} индивидуалним биофилмом *R. mucilaginosa* 89.62% и *E. coli* LM168.25% након 48 h.

Сличне резултате добили су White и Gadd (1998) који су испитивали способност биофилма чисте и мешане културе сулфат-редукујућих бактерија, да акумулирају кадмијум.

Наши резултати су показали да оба индивидуална биофилма, као и мешовити биофилм, имају изузетно велики биосорпциони потенцијал али, количина коју су апсорбивали биофилмови индивидуално је била нешто мања у односу на њихов мешовити биофилм (Графици 12 и 13).

У нашем истраживању је указано и на чињеницу да количина и индивидуалних и мешовитог биофилма може утицати на уклањање Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} и Hg^{2+} јона из медијума (График 14). Повећање масе (количине) биофилмова током времена значајно утиче на повећање ефикасности уклањања јона тестираних метала. Ова запажања су у складу са студијом коју су спровели Al-Garni и сарадници (2009) који су испитивали биосорпциону ефикасност *Aspergillus fumigatus* у уклањању кадмијума из водених раствора. Ово је потврдила и новија студија Chen et al. (2020).

5.4. Отпорност и биосорпциона ефикасност изолата из постројења за пречишћавање комуналних отпадних вода Цветојевац према тестираним тешким металима – планктонске ћелије и карактеризација биофилмова

5.4.1. Отпорност планктонских ћелија и њихових биофилмова на присуство тешких метала

Већина микроорганизама која се налази у форми планктона показује највећу осетљивост на присуство живе (МИК од <7.81 до 62.50 $\mu\text{g/mL}$), док према олову, бакру и никлу показују значајну отпорност (МИК од 250 до >1000 $\mu\text{g/mL}$) (Табела 15). *K. oxytoca*, *A. lwoffii* и *H. alvei* од тестираних микроорганизама показују највећу отпорност према свим тестираним металима, са изузетком кадмијума. Остали тестирани микроорганизми, за разлику од претходно наведених, показују изразиту осетљивост према живи, док су према осталим тешким металима, као и према кадмијуму, веома отпорни. Статистички значајна разлика у деловању на нивоу МИК-а се не уочава само код Pb према Ni, Cu и Zn, и између Ni и Zn ($p>0.05$), док се статистички значајне разлике у деловању на нивоу МЛК-а уочавају само између Hg и Cd са осталим металима ($p>0.05$).

Минимална ерадикациона концентрација за биофилмове (МБЕК) за све микроорганизме који су формирали биофилм и за све тестиране метале је износила >1000 $\mu\text{g/mL}$. Са оваквим резултатима форма биофилма микроорганизма који га је формирао се показала као знатно толерантнија и отпорнија на присуство свих тестираних тешких метала, у односу на њихов планктонски фенотип.

Иако је познато да на микробиолошко узимање живе у планктонским културама утиче екстрацелуларна спецификација живе у воденим системима, узимање живе у форми биофилма није још увек довољно проучено. Студија Najera и сарадници (2005)

је проучавала утицај и спецификацију токсичности Hg^{2+} на планктон и биофилм форму *E. coli*. Осим што су поредили сам утицај живе на ове две форме, праћен је и утицај салинитета на утицај живе. У истраживању је забележена велика осетљивост планктонске форме *E. coli* у присуству живе ($<0.25 \mu\text{g/mL}$), за шта се може рећи да је у сагласности са нашим резултатима, на основу којих је *E. coli* једна од осетљивијих микроорганизама према живи (МИК $<7,81 \mu\text{g/mL}$). Примећена и већа отпорност биофилмова тестиране бактерије ($>0.25 \mu\text{g/mL}$) на живу од планктонских ћелија, као и у нашој студији (МИК $>1000 \mu\text{g/mL}$).

Табела 15. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској форми на изабране тешке метала изражена као МИКп и МЛКп

Врсте / Тешки метали		Hg^{2+}	Ni^{2+}	Pb^{2+}	Cu^{2+}	Cd^{2+}	Zn^{2+}
<i>E. coli</i> PMFKG-CV1	МИК ¹	<7.81	500	500	250	250	500
	МЛК ²	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i> PMFKG-CV2 – inactive	МИК	<7.81	500	500	250	250	250
	МЛК	1000	1000	>1000	>1000	1000	>1000
<i>E. cloacae</i> PMFKG-CV3	МИК	<7.81	500	250	500	250	125
	МЛК	125	1000	>1000	1000	1000	>1000
<i>K. oxytoca</i> PMFKG-CV4	МИК	62.50	500	500	500	31.25	500
	МЛК	250	1000	>1000	>1000	500	>1000
<i>A. lwoffii</i> PMFKG-CV5	МИК	15.625	500	500	500	15.62	500
	МЛК	125	1000	>1000	>1000	250	>1000
<i>H. alvei</i> PMFKG-CV6	МИК	31.25	500	1000	500	31.25	100
	МЛК	250	1000	>1000	>1000	250	>1000
<i>S. odorifera</i> PMFKG-CV7	МИК	<7.81	250	1000	>1000	250	500
	МЛК	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. marcescens</i> PMFKG-CV8	МИК	<7.81	500	1000	>1000	62.5	500
	МЛК	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG-CV9 - тип 1	МИК	<7.81	500	500	>1000	125	500
	МЛК	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG-CV10 - тип 2	МИК	<7.81	500	500	>1000	125	500
	МЛК	62.50	1000	>1000	>1000	1000	>1000
<i>C. utilis</i> PMFKG-CV11	МИК	<7.81	500	500	>1000	125	500
	МЛК	7.81	1000	>1000	>1000	500	>1000

¹МИКп – минимална инхибиторна концентрација планктонских ћелија; ²МЛКп – минимална летална концентрација планктонских ћелија; Вредности у табели су приказане у $\mu\text{g/mL}$.

Резултати овог истраживања (Najera et al., 2005), као и наши резултати, су у складу са другим истраживањима која се баве проучавањем отпорности биофилма микроорганизама на антибиотике и тешке метале. Биофилмови генерално показују повећану толеранцију на антибиотике у поређењу са планктонским ћелијама (Mah et al., 2003; Mah and O'Toole, 2001; Costerton et al., 1999). Ова отпорност форме биофилма код микроорганизама је такође доказана и за тешке метале (Cu^{2+} , Zn^{2+} и Pb^{2+}) (Teitzel and Parsek, 2003) и металоидне оксидоване ањоне (Harrison et al., 2004a). Слична отпорност се може уочити и код утицаја антимикуробних лекова на биофилм и планктонске ћелије микроорганизама (Spoeing and Lewis, 2001). У неким случајевима, повећана отпорност ћелија у биофилму, у поређењу са планктонским формама, може

се објаснити спорим воденим дифузионим транспортом у самој унутрашњости биофилма (de Araújo and de Oliveira, 2019; Völkel et al., 2018; Stewart, 2003; Hoyle et al., 1992).

Металорегулаторни протеин MerR који игра важну улогу у мер оперон систему (функционална јединица регулације генетичке активности) показује висок афинитет и селективност према Hg²⁺. У студији Wei и сарадници (2018), да би се побољшала адсорпциона способност *Saccharomyces cerevisiae* за Hg²⁺, MerR је први пут стављен на површину *S. cerevisiae* са системом који је заснован на α-аглутиници. Испољавање MerR-а индиректно је потврђено побољшаном способношћу адсорпције *S. cerevisiae* за Hg²⁺ што је потврђено и са PCR-ом (Polymerase chain reaction). Способност адсорпције живе овог генетички измењеног квасца је била знатно виша него код природних и контролних сојева. Створен сој квасца може адсорбовати Hg²⁺ под широким распоном рН вредности, а такође може ефикасно адсорбовати Hg²⁺ заједно са Cd²⁺ и Cu²⁺ (Wei et al., 2018).

У нашој студији, за разлику од претходно наведене, су коришћени изолати из природе (*S. cerevisiae* PMFKG CV9 – тип 1 и *S. cerevisiae* PMFKG CV10 – тип 2) који нису показали значајну отпорност на живу. Исти изолати су показали значајну отпорност ка бакру (МИКп >1000 µg/mL), а мању ка кадмијуму (МИКп 125 µg/mL). Испитивани квасци у планктонском облику су толерисали Hg²⁺ само у ниским концентрацијама, док су на Cd²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ и Pb²⁺ били отпорни (Табела 15).

У студији Xu et al., (2018) испитана је хетерологна експресија гена CsMTL3 код *E. coli*. Резултати су показали толеранцију на тешке метале, нарочито на Cd²⁺ и Cu²⁺. Ови налази показују да CsMTL3 може побољшати толеранцију микроорганизама на тешке метале, нарочито за Cd²⁺ јоне када се хетерологно изрази код *E. coli*. Цистеински остаци повезани су са способношћу везивања и преферирањем различитих металних јона. Ова студија је у сагласности са нашим истраживањем у коме *E. coli* показује значајну толерантност (>500 µg/mL) у присуству Cd²⁺ и Cu²⁺.

Биофилм тестираних врста је показао отпорност на распон концентрација испитиваних тешких метала (7.81-1000 µg/mL, Табела 15). Из тог разлога је даље тестирање отпорности и индивидуалних и мешовитих биофилмова било у присуству 100 пута већих концентрација тешких метала, што је приказано у наредном потпоглављу.

5.4.2. Отпорност биофилмова на присуство тешких метала

Избор микроорганизама за даље тестирање је извршен на основу претходних тестирања способности формирања биофилма, при чему су одабране врсте са најбољом продукцијом биофилма. Микроорганизми који су најуспешније формирали биофилм, како појединачни тако и мешовити, су: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia odorifera* и *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG CV10-тип 2 (потпоглавље 5.2.1, Графици 5 и 6). Упоредо је тестирана отпорност мешовитих биофилмова (комбинације микроорганизама по две и три врсте) са циљем да се пронађе идеална комбинација микроорганизама који у оквиру биофилма формирају мешовити биофилм са бољом отпорношћу на тешке метале од индивидуалних биофилмова. Ниво отпорности најпродуктивнијих индивидуалних и мешовитих биофилмова према одабраним тешким металима је одређен добијањем минималне инхибиторне (МИКБ) и минималне леталне концентрације (МЛКБ). Резултати су приказани у Табели 16. Ознаке су дате по првим словима из латинског назива одабраног микроорганизама и објашњења су дата у потпоглављу 5.2.1.

Сви тестирани биофилмови су показали највећу толеранцију према Zn^{2+} , Cd^{2+} и Ni^{2+} , док су највећу осетљивост показали у присуству Pb^{2+} и Hg^{2+} . Највећа отпорност у присуству Pb^{2+} је забележена за KSC биофилм ($12.500 \mu g/mL$). Из резултата се види да су појединачни биофилмови били отпорнији на присуство тешких метала у односу на биофилмове изграђене од две врсте, али и да су мешовити биофилмови изграђени од три врсте, нарочито *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* (KSC), показали највећу отпорност у присуству свих тестираних метала. Изузетак је биофилм *E. cloacae/S. odorifera/S. cerevisiae* (ESC) који је раније наведен као једини са најмањом продукцијом биофилма. Ова комбинација врста имала је и највећу осетљивост према свим тестираним металима, где су и МИКБ и МЛКБ били $< 781 \mu g/mL$, при чему се није детектовало формирање биофилма.

Врсте које имају слабу продукцију биофилма су осетљивије на утицај тешких метала. Успешан начин живота микроорганизама, у оквиру биофилма, зависи од формирања нових структура и нових особина које настају током процеса формирања биофилма (Corning, 2002).

За разлику од биофилма ESC, мешовити биофилм који је такође показао слабију продукцију, *E. cloacae/K. oxytoca/S. cerevisiae* (EKC), је истовремено показао и значајну толеранцију према Cd^{2+} и Ni^{2+} . Осим њега, високу толеранцију показали су и остали биофилмови које изграђују три врсте (*E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera* (EKS) и *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* (KSC)) који су имали МИК и МЛК $>100\ 000 \mu g/mL$ за Cd^{2+} , а сличне резултате су показали и према Ni^{2+} . То су уједно и најзначајније забележене отпорности према металима добијене у овом истраживању.

За индивидуалне биофилмове највећа отпорност је забележена за биофилм *E. cloacae* према Cu^{2+} (МИК $50.000 \mu g/mL$). Неке испитиване врсте показују велику осетљивост према неком тешком металу, али повећавају отпорност уколико граде мешовити биофилм са неком другом врстом. Нпр. *S. odorifera* биофилм у присуству Cu^{2+} показује велику осетљивост (МИК $3.125 \mu g/mL$), а заједно са *K. oxytoca* врстом, повећава отпорност на присуство Cu^{2+} (МИК $50.000 \mu g/mL$), јер граде мешовити биофилм.

То је потврђено и у истраживању толеранције природног, мешовитог биофилма на присуство тешких метала из јаловишта (Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и други) (Golby et al., 2014). У њиховом истраживању врста *Rhodococcus erythropolis* је издвојена из заједнице и поређена са мешовитим биофилмом. Показало се да је сама врста много мање толерантна на присуство метала у поређењу са мешовитим биофилмом, и да самим тим није у стању да врши биоминерализацију метала (Golby et al., 2014). Наше истраживање се бавило мешовитим и појединачним биофилмовима, кога су чиниле лабораторијски изолати *Rhodotorula mucilaginosa* и *Escherichia coli*, и резултати које смо добили су показали да је отпорност на присуство тешких метала била већа код мешовитог биофилма.

5.4.3. Поређење отпорности индивидуалних и мешовитог биофилма изабраног лабораторијског и изолата из отпадне воде у присуству тешких метала

Избор микроорганизама за даље тестирање је извршен на основу претходних тестирања. Лабораторијски изолат *R. mucilaginosa* је испољио значајан потенцијал у формирању биофилма и отпорност на присуство тешких метала, па је изабран да се са изолатом *E. cloacae* из отпадне воде, који је имао најбоље карактеристике у истом погледу, испита са аспекта формирања и отпорности мешовитог биофилма.

Табела 17. Отпорност индивидуалних и мешовитог биофилма изабраног лабораторијског изолата и изолата из отпадне воде у присуству одабраних тешких метала

Врста	Метал	Pb ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Hg ²⁺
<i>R. mucilaginosa</i>	МИКБ ¹	3125	25000	25000	12500	3125	12500
	МЛКБ ²	>100000	>100000	>100000	>100000	100000	>100000
<i>E. cloacae</i>	МИКБ	781	12500	25000	6250	50000	<781
	МЛКБ	100000	100000	50000	100000	100000	6250
<i>R. mucilaginosa/E. cloacae</i>	МИКБ	781	1562	6250	6250	50000	12500
	МЛКБ	>100000	>100000	>100000	>100000	100000	>100000

(¹МИКБ-минимална инхибиторна концентрација биофилма; ²МЛКБ-минимална летална концентрација биофилма; Вредности у табели су приказане у µg/mL); Ознаке: R – *R. mucilaginosa*; RE – *E. cloacae*; RE – *R. mucilaginosa/ E. cloacae*

Резултати су показали да су овај квасац и бактерија успешно формирали мешовити биофилм који је показивао отпорност према тестираним металима у рангу отпорности појединачних микроорганизама. За Hg²⁺ је то била *R. mucilaginosa*, а за Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ је то био ранг отпорности *E. cloacae*. Из резултата се уочава и да мешовити биофилм није био најотпорнији према тестираним металима већ да највећу отпорност показује *R. mucilaginosa*, са изузетком Cu²⁺ где већу отпорност показују друга два биофилма. Мешовити биофилм је најмање отпоран према Zn²⁺ и Cd²⁺.

Претходно тестирање отпорности појединачних и мешовитог биофилма *Rhodotorula mucilaginosa* и *Escherichia coli* у присуству тешких метала показало је да је МИКБ (Pb²⁺) (*E. coli*, *R. mucilaginosa* и *R. mucilaginosa/E. coli*) забележен на концентрацијама 4000, 4000 и 16000 µg/mL (респективно). МИКБ (Hg²⁺) забележена је на концентрацијама 31.25, 250 и 250 µg/mL (респективно). Ови резултати су показали да је отпорност мешовитог биофилма боља у поређењу са отпорношћу појединачних биофилмова у присуству тешких метала.

5.4.4. Поређење отпорности индивидуалних и мешовитих биофилмова изабраних врста у присуству тешких метала

Биофилмови који су показали највећу продукцију, као и најзначајнију отпорност на присуству тешких метала у полистиренским микротитарским плочама са 96 отвора, тестирани су на способност формирања појединачних и мешовитих биофилмова на АМВ Media биофилм носачима и у присуству изабраних тешких метала. Сви тестирани микроорганизми су формирали биофилмове (*E. cloacae*, *K. oxytoca*, *S. odorifera*, *S. cerevisiae*) и показали добру продукцију биофилма и на АМВ Media биофилм носачима, како за појединачне, тако и за мешовите биофилмове (*K.*

oxytoca/S. odorifera, *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* и *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera*). Резултати контроле раста биофилмова на АМВ Медиа носачима су приказани у потпоглављу 5.2.2. (График 9). Резултати раста биофилмова у присуству тешких метала на АМВ Медиа носачима су приказани на Графицима 15-17.

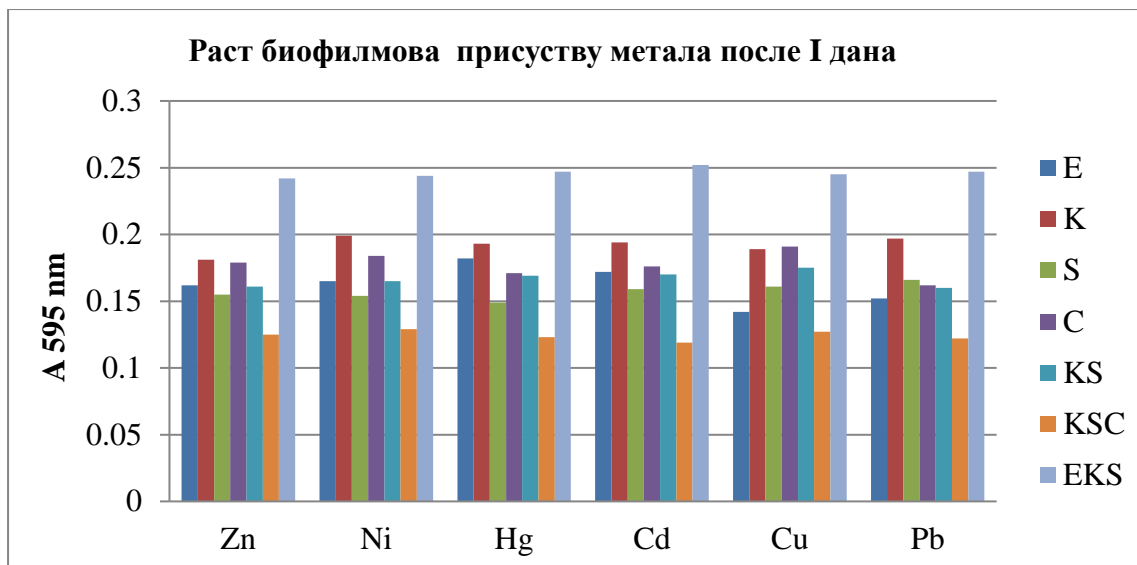


График 15. Развој биофилмова на АМВ Медиа носачима у присуству тестираних тешких метала после првог дана

Ознаке: E-*E. cloacae*; K-*K. oxytoca*; S-*S. odorifera*, C-*S. cerevisiae*, KS-*K. oxytoca/ S. odorifera*, KSC-*K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae*, EKS-*E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera*.

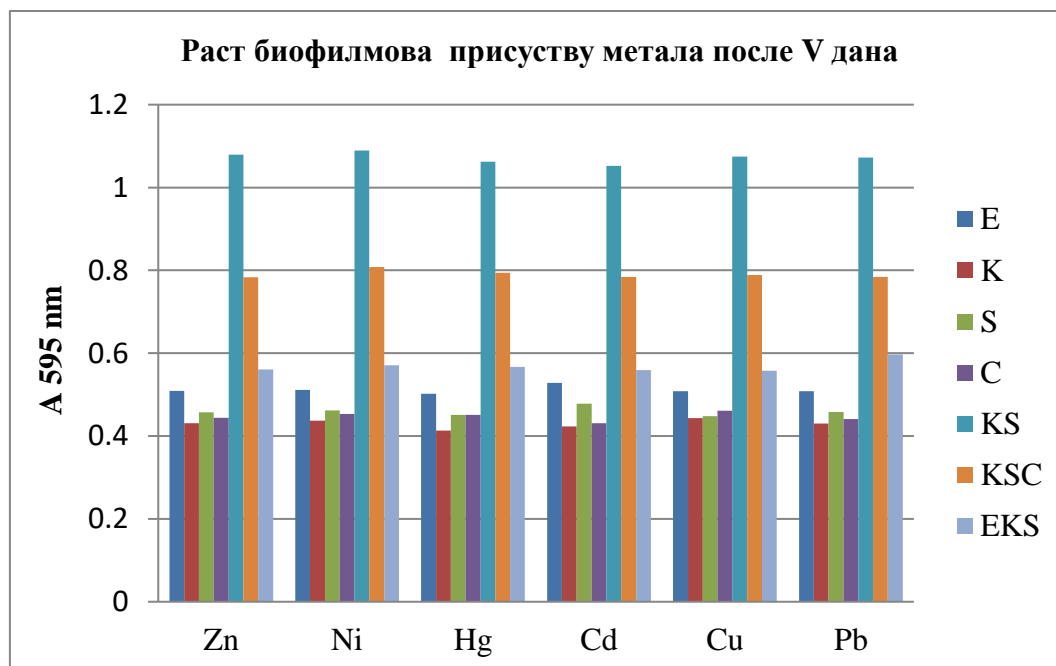


График 16. Развој биофилмова на АМВ Медиа носачима у присуству тестираних тешких метала после петог дана

Ознаке: E-*E. cloacae*; K-*K. oxytoca*; S-*S. odorifera*, C-*S. cerevisiae*, KS-*K. oxytoca/ S. odorifera*, KSC-*K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae*, EKS-*E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera*.

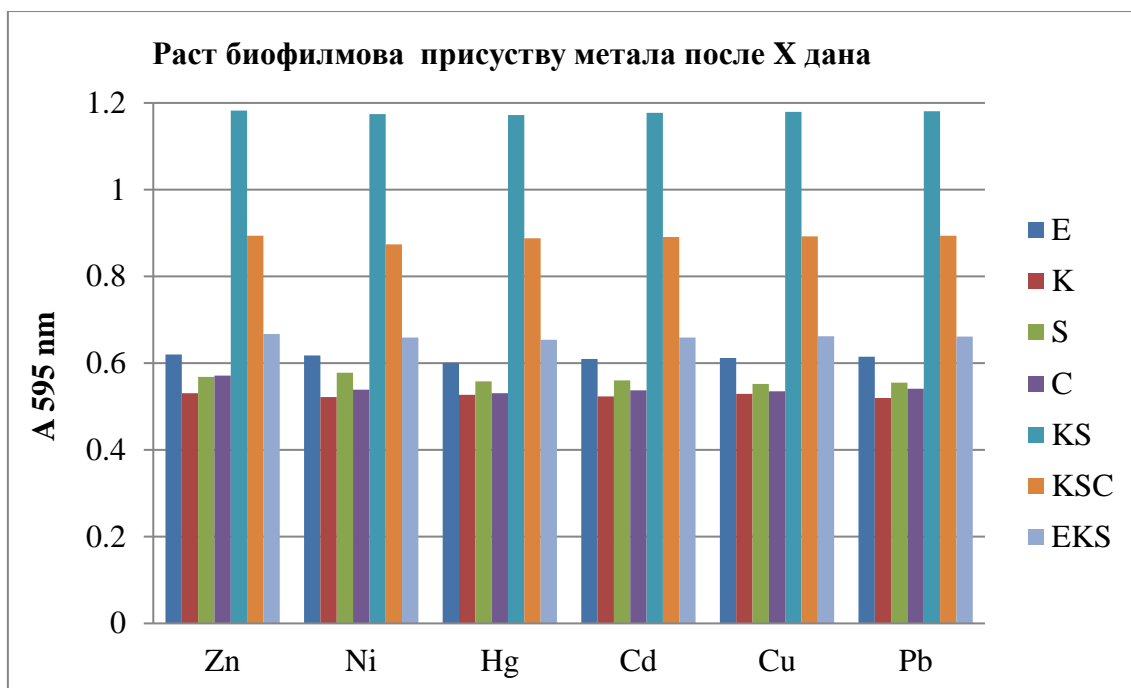


График 17. Развој биофилмова на AMB Media носачима у присуству тестираних тешких метала после десетог дана.

Ознаке: E-*E. cloacae*; K-*K. oxytoca*; S-*S. odorifera*, C-*S. cerevisiae*, KS-*K. oxytoca*/ *S. odorifera*, KSC-*K. oxytoca*/*S. odorifera*/*S. cerevisiae*, EKS-*E. cloacae*/*K. oxytoca*/*S. odorifera*.

Утицај тешких метала у раствору на саму продукцију како индивидуалних, тако и мешовитих биофилмова, није уочен. Раст индивидуалних и мешовитих биофилмова након првог дана у присуству тешких метала је био сличан као и продукција биофилмова без њиховог присуства. Највећи раст је забележен код *E. cloacae*/*K. oxytoca*/*S. odorifera*, како у присуству свих тестираних метала али, ако се упореди са контролом, исти раст је забележен и без њих. Сви биофилмови показују нешто већи раст у присуству Cd^{2+} у односу на контролу раста (График 9). Слични резултати се уочавају и код присуства Hg^{2+} . Биофилмови *E. cloacae* и *E. cloacae*/*K. oxytoca*/*S. odorifera* (EKS) имају бољу продукцију у присуству Hg^{2+} него у контроли раста. Незнатан утицај показао је после првог дана Cu^{2+} на биофилм *E. cloacae* (График 15). Ни након петог дана се не примећују значајније разлике у продукцији биофилмова у присуству тешких метала у односу на контролу раста. Разлике које се виде после петог дана тичу се саме продукције биофилмова између врста микроорганизама који га граде (График 16). Док је после првог дана највећу продукцију имао мешовити биофилм *E. cloacae*/*K. oxytoca*/*S. odorifera*, после петог дана највећи раст је забележио биофилм *K. oxytoca*/*S. odorifera*. Исти биофилм је у присуству Ni^{2+} имао и нешто значајнију продукцију у односу на контролу раста и он је задржао највећу продукцију и након десетог дана (График 17). Биофилмови су, и у одсуству и присуству тешких метала, наставили да се развијају и других пет дана експеримента, али са доста споријим темпом него првих пет дана. Од појединачних биофилмова најзначајнији раст је уочен код *E. cloacae*. Статистички значајне разлике се уочавају код деловања свих метала, код свих микроорганизама, између времена излагања (V и X дан) ($p < 0,05$). V дана се уочавају статистички значајне разлике у деловању између Ni и Zn и Hg ($p < 0,05$). X дана се статистички значајне разлике уочавају у деловању између Zn са Cd, Hg и Pb ($p < 0,05$). Не постоји статистички значајна разлика између врста микроорганизама у продукцији биофилмова и са и без присуства тешких метала ($p > 0,05$).

5.4.5. Биосорпциона ефикасност индивидуалних и мешовитих биофилмова – поређење активности

Биосорпциона ефикасност биофилмова праћена је одређивањем количине тешких метала у подлози након првог, петог и десетог дана. За Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} , резидуална количина тешких метала у подлози је мерена атомским апсорционим пламеним спектрофотометром (Flame atomic absorption spectrophotometer), док је код Hg^{2+} мерена на обичном спектрофотометру.

Биофилмови микроорганизама који су показали највећу отпорност према тестираним тешким металима, а формирали су успешно биофилмове на АМВ Медиа носачима, су одабрани за праћење биосорпционе ефикасности. Изабрани су биофилмови: *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *S. odorifera*, *S. cerevisiae*, *K. oxytoca/S. odorifera*, *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* и *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera*.

Као што смо већ навели у поглављу Материјал и поглављу Методе, у ерленмајере са АМВ носачима на којима се формирао биофилм је додато по 200 $\mu g/mL$. Првог дана по додавању раствора тешких метала проверена је количина истих у медијуму и у свим случајевима је измерена иста количина која је и додата тог дана. Уопштено код свих тешких метала, и за све микроорганизме, важи правило да се садржај тешких метала у раствору смањује са протеклим временом, али да брзина смањивања те количине није иста. Резултати биосорпционе ефикасности индивидуалних и мешовитих биофилмова дати су на Графику 18. Мешовити биофилмови показали су бољу способност уклањања тешких метала након десет дана (концентрација јона тешких метала се постепено смањивала) у поређењу са индивидуалним биофилмовима ($p < 0.05$). Највећи проценат уклањања метала из подлоге од стране свих биофилмова уочен је за Cu^{2+} . Код овог метала после петог дана за све биофилмове проценат уклањања је био преко 97%, а за десети дан скоро код свих преко 98% (изузетак, иако не значајан, је *S. cerevisiae*). Анализирањем утицаја мешовитих биофилмова на тешке метале појединачно је забележено да на уклањање кадмијума, олова и живе, најбољи утицај има примена ЕКС биофилма (уклоњено 99.03%, 99.14% и 99.03%). Сви биофилмови су показали и добру способност уклањања Ni^{2+} , која се такође кретала у опсегу од 96.8% петог дана од стране *S. odorifera*, до 98.47% десетог дана од стране биофилма *K. oxytoca*. Мешовити биофилм *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* уклања Cu^{2+} са ефикасношћу од 99.04% пети дан и 99.18% за десети дан. Исто тако значајан резултат показује и биофилм кога граде *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera* за уклањање Pb^{2+} (98.06% – пети дан, 99.14% – десети дан). За уклањање цинка, најбоље резултате показао је биофилм *E. cloacae* (99.11%).

Уочава се статистички значајна разлика у биосорпцији Hg , Cd и Ni између V и X дана мерења ($p < 0.05$), док се код осталих метала та разлика не уочава ($p > 0.05$). Тешки метали се различитим темпом уклањају из раствора од стране биофилмова и то ако се посматра V дан. Најмање усвајање се уочило код Hg и Pb , а највеће код Cu и Ni ($p < 0.05$). X дана је уочено стагнирање у усвајању Cu и Ni , док се процес знатно убрзао код других метала, тако да се учинак после X дана између метала статистички значајно разликовао само између Zn са Ni и Cu ($p < 0.05$).

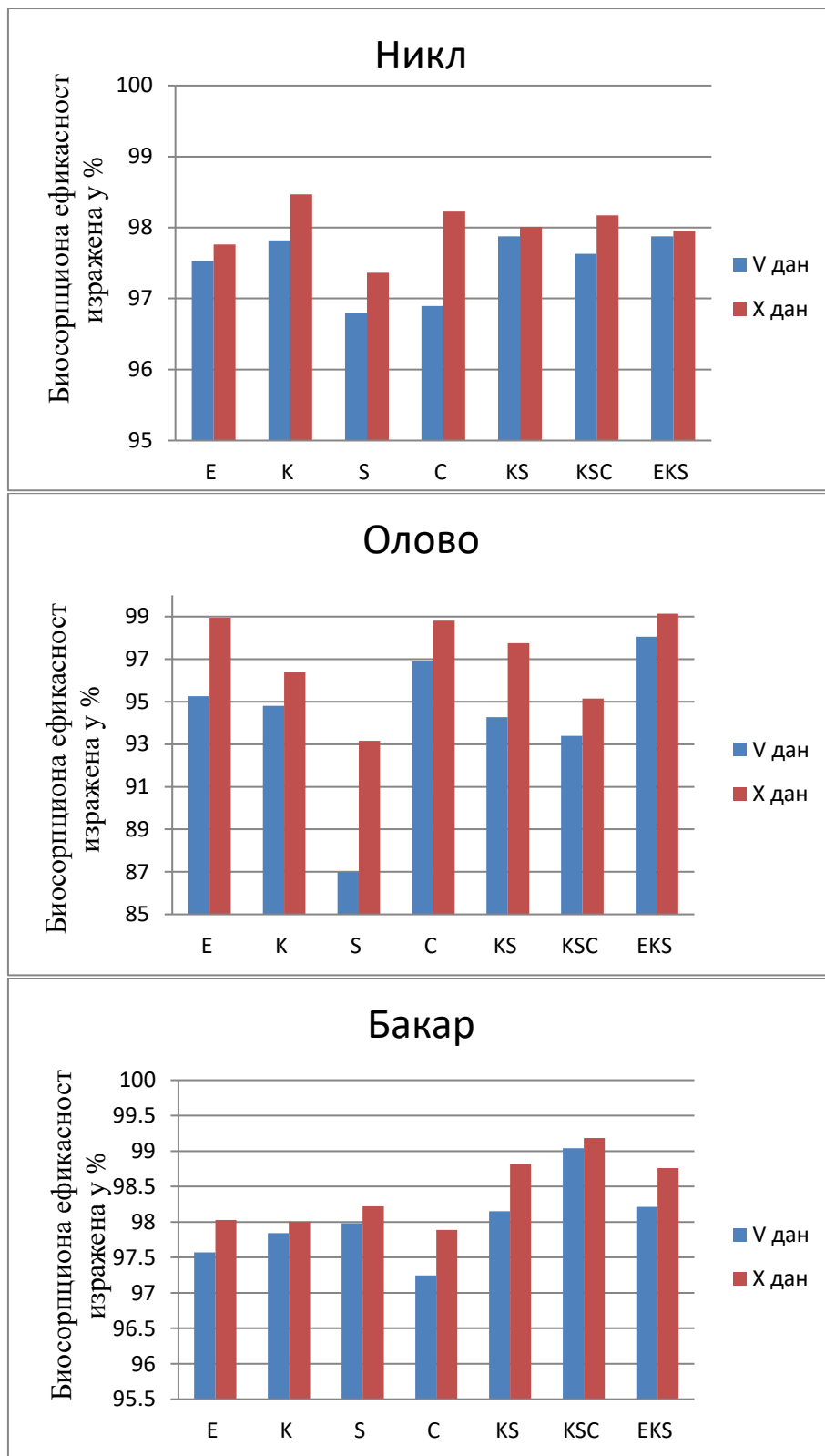


График 18. Биосорпциона ефикасност тестираних појединачних и мешовитих биофилмова у присуству цинка, никла, кадмијума, бабра и олова изражена као % уклањања мерена за пети и десети дан.

Ознаке: E-*E. cloacae*; K-*K. oxytoca*; S-*S. odorifera*, C-*S. cerevisiae*, KS-*K. oxytoca/S. odorifera*, KSC-*K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae*, EKS-*E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera*.

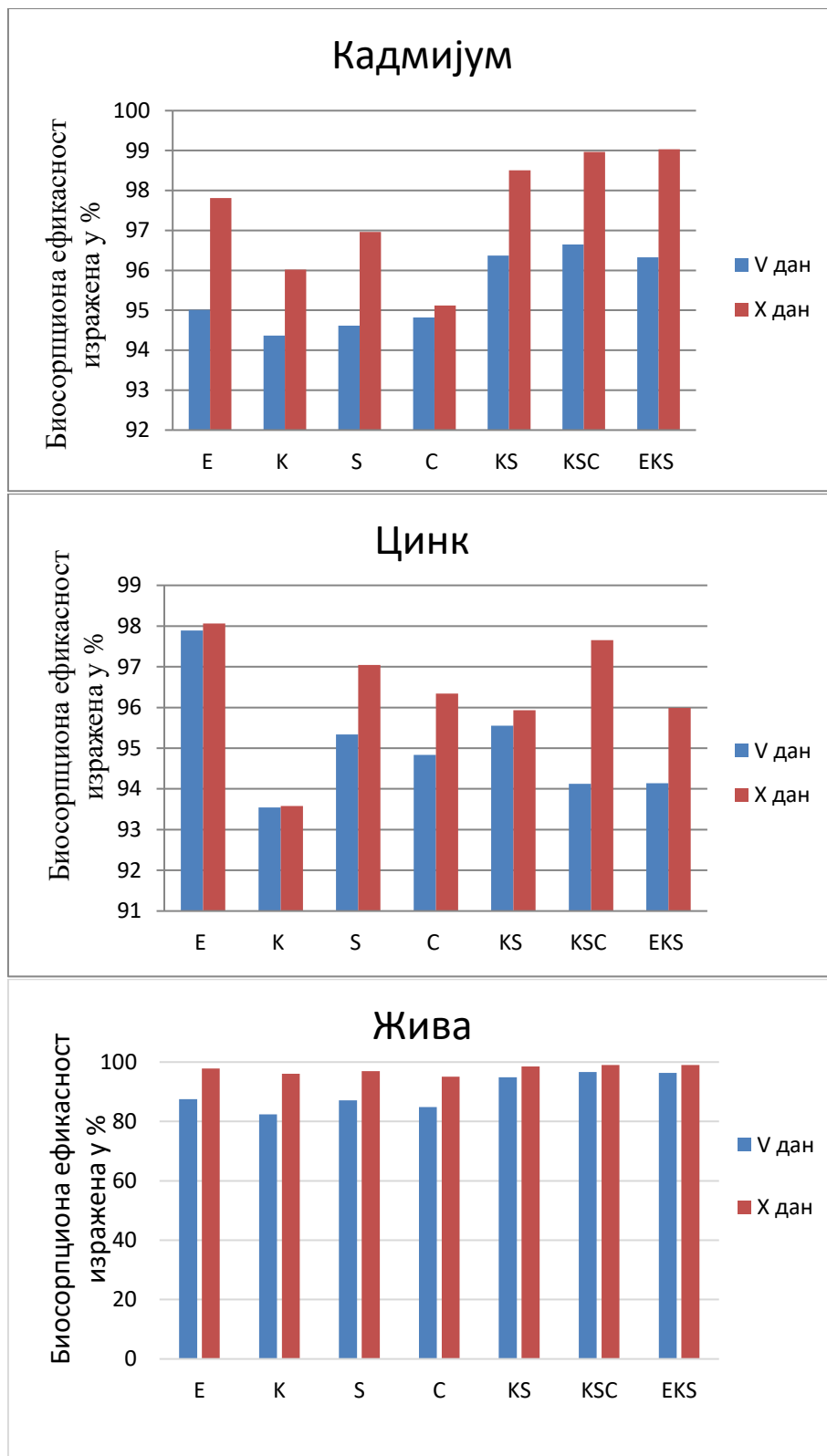


График 18. – наставак. Биосорпциона ефикасност тестираних појединачних и мешовитих биофилмова у присуству цинка, никла, кадмијума, бабра и олова изражена као % уклањања мерена за пети и десети дан.

Ознаке: E-*E. cloacae*; K-*K. oxytoca*; S-*S. odorifera*, C-*S. cerevisiae*, KS-*K. oxytoca/S. odorifera*, KSC-*K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae*, EKS-*E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera*.

Биофилм *S. cerevisiae* тип 2 је показао сличан биосорптивни потенцијал за никл, после десетог дана посматрања, као и *K. oxytoca* која је била са добром биосорпцијом и петог дана експеримента (График 18). *S. cerevisiae* тип 2 је највиши степен биосорпције имала за олово, затим за никл, што се поклапа са истраживањем других аутора (Nadiani et al., 2018; Ririhena et al., 2018; Ozer and Ozer, 2003). Они су навели да је квасац имао највећи степен апсорције тешких метала на температурном оптимуму од 25°C, и да је степен уклањања био највиши за олово. Резултати нашег истраживања су показали да је биофилм *E. cloacea* показао добру ефикасност у уклањања јона Zn^{2+} и Cd^{2+} , док је од појединачних биофилмова најбољи биосорпциони потенцијал за јоне Cu^{2+} показао биофилм *S. odorifera* (График 18).

Разлике у биосорпцији тешких метала могу да буду последица хемијске структуре сваког од њих, као и особина микроорганизама нпр. структура, функционалне групе и површина. Nolan and Volesky (1994) су, такође, навели да се метална сорпција повећава са порастом валенце и атомског броја метала, са чиме се слаже наше истраживање. Научници су испитивали и способност суве биомасе квасца *S. cerevisiae* за уклањање Cu^{2+} јона из водених раствора, као и утицај различитих параметара (иницијална концентрација, почетни рН раствора и температура) на само узимање бакра. Установљено је да адсорпција јона бакра на осушене ћелије квасца *S. cerevisiae* јесте ендотермни процес и са повећањем температуре, као и у опсегу рН од 3 до 4, тај процес постаје ефикаснији и значајнији. Такође се процес побољшавао са повећањем корисне површине саме биомасе квасца (Sojocaru et al, 2009).

S. cerevisiae је у неким истраживањима коришћен и као отпадна биомаса за адсорпцију више различитих врста тешких метала. Максимум биосорпционог капацитета опада следећим редоследом $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+}$ (Chen et al. 2007). Наше истраживање се делимично поклапа са наведеним јер биосорпциони потенцијал изолованог квасца из нашег истраживања има следећи капацитет: $Pb^{2+} > Ni^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+}$. Непоклапање постоји код јона Ni^{2+} , који квасац у овом истраживању боље усваја, од јона Cu^{2+} . То се може објаснити чињеницом да је биофилм квасца у овом истраживању живи систем, за разлику од отпадне биомасе коришћене у наведеној студији. Ако поредимо усвајање осталих метала (Chen et al, 2007) уочава се сагласност са нашим резултатима.

S. cerevisiae је доста проучаван у примени биосорпције тешких метала. Истраживан је његов капацитет везивања различитих метала под различитим условима. Дошло се до закључка да овај микроорганизам у неким случајевима олово и уран може ефикасније уклонити из разређених раствора, у поређењу са другим металима. Способност биосорпције овог квасца у великој мери зависи од различитих параметара: рН, односа почетних концентрација јона метала и биомасе, присуства различитих металних јона у раствору, као и, у неким случајевима, од температуре (Zinicovscaia et al., 2020; Wang and Chen, 2006).

У нашем истраживању *S. cerevisiae* је највиши степен биосорпције имала за олово, никл и бакар (График 18), што се поклапа са ранијим истраживањем других аутора (Özer and Özer, 2003). Они су истакли и утицај температуре на степен апсорције тешких метала (оптимум од 25°C), што је у нашем истраживању било блиско радној температури.

Нека ранија истраживања су се бавила проучавањем оптимизације процеса биосорпције Cd^{2+} варирањем три параметра (рН, концентрација јона, количина *S. cerevisiae*). Показало се да је за максималну биосорпцију овог јона у воденом раствору од стране *S. cerevisiae* било потребно да је почетна рН 5, 3.8 g/L *S. cerevisiae* и 19 mg/L Cd^{2+} и период од 4 h од времена контакта. Показало се да су једнослојни механизми адсорпције са дифузијом унутар честица били ефикасни у самом процесу биосорпције

Cd^{2+} . Овим експериментом је потврђено да методологија површинских реакција даје вредне информације о интеракцијама између микроорганизама и доводи до идентификације изводљивих оптималних вредности испитиваних фактора (Ghorbani et al., 2008).

Доступна литература сугерише да је толеранција биофилмова на тешке метале временски зависна (Harrison et al., 2005a, 2005b; Volesky, 2003), што је уочено и у првом делу испитивања биосорпције планктонских ћелија, индивидуалних и мешовитог биофилма лабораторијских изолата *R. mucilaginosa* и *E. coli* (потпоглавља 5.3.6. и 5.3.7). Као што смо већ навели, процес уклањања тешких метала одиграо се брже у првих пет дана истраживања него у других пет. Прва фаза биосорпције се одиграла изузетно брзо због високе иницијалне активности биофилма као биосорбента. Најбоља биосорпциона ефикасност (91.71-95.39%) у почетном времену излагања металима (до 48 h) забележена је и код биофилма *R. mucilaginosa* (Табела 14). Концентрације јона метала су се смањивале у току времена и код испитивања биосорпционе ефикасности појединачних и мешовитог биофилма *R. mucilaginosa* и *E. coli* (распон уклањања метала од 94.99% до 99.88% (Графици 12 и 13), при чему је назначајнију ефикасност у уклањању тешких метала показао је мешовити биофилм и то у прва 2-3 испитивања. Сви биофилмови формиран на АМВ Медиа носачима су показали већи проценат уклањања за све тестиране тешке метале из подлоге након 10 дана, али се процес уклањања у првих 5 дана одвијао знатно брже него наредних 5 дана (График 18).

Ако се пореде ефикасности појединачних и мешовитих биофилмова у уклањању тешких метала можемо да кажемо да у нашем истраживању, у највећем броју случајева, већу ефикасност уклањања метала из раствора, исто као што им је и већа отпорност на њихово присуство, имају мешовити биофилмови ($p < 0.05$). Постоје неки изузеци, нпр. *E. cloacae* за Zn^{2+} и Pb^{2+} , *S. cerevisiae* за Pb^{2+} и *K. oxytoca* за Ni^{2+} .

И други аутори су испитивали разлике између индивидуалних и мешовитих биофилмова у биосорпцији тешких метала и дошли до закључка да мешовити биофилм показује већу ефикасност у уклањању тешких метала у односу на биофилм појединачних врста. У испитивању *R. mucilaginosa* и *E. coli*, као и њиховог мешовитог биофилма у уклањању различитих тешких метала, показало се да је ефикасност уклањања метала била у опсегу од 81.56 до 97.85% за појединачни, и од 94.99 до 99.88% за мешовити биофилм (потпоглавље 5.3.7). У сагласности са овим истраживањем су и друга која указују да су мешовити биофилмови практичнији алат у ремедијацији загађених средина од појединачних биофилмова (Golby et al., 2014). Код Cd^{2+} и Pb^{2+} се уочава значајнија разлика у ефикасности уклањања између петог и десетог дана експеримента у односу на друге тестиране тешке метале. Код ова два метала адсорпција се и после пет дана одвијала са значајним уделом и више код мешовитих у односу на појединачне биофилмове.

Basak et al. (2014) су забележили 88% и 72.2% уклањања Zn^{2+} од стране биофилма *Candida rugosa* и *Cryptococcus laurentii*, за 24 h. Наведено је у сагласности са нашим истраживањем код свих тестираних и појединачних и мешовитих биофилмова. Уколико посматрамо период од пет дана у нашем истраживању, тестирани изоловани микроорганизми су имали и бољу способност уклањања изабраних тешких метала.

5.5. Отпорност и биосорпциона ефикасност изолата из постројења за пречишћавање отпадних вода фабрике за производњу аутомобила ФИАТ према тестираним аутоиндустријским бојама – планктонске ћелије и карактеризација биофилмова

5.5.1. Отпорност планктонских ћелија и њихових биофилмова на присуство аутоиндустријских боја

Сви идентификовани микроорганизми из отпадних вода индустријског постројења који су формирали биофилм (Табела 9, поглавља 5.1. и 5.2.) су коришћени за одређивање отпорности планктона и биофилма у присуству изабраних аутоиндустријских боја. Отпорност планктонских ћелија и биофилма на деловање тестираних супстанци испитана је помоћу МВЕС-НТР уређаја према упутству које су описали Ceri et al. (1999). Отпорност је одређивана у периоду од 24 и 48 h за бактерије, 48 и 72 h за квасце и 72 and 94 h за филаментозне гљиве. Одређена је минимална инхибиторна (МИКп) и минимална летална концентрација (МЛКп) за планктонске ћелије и минимална инхибиторна концентрација (МИКб) и минимална летална концентрација (МЛКб) за биофилмове. Добијени резултати су приказани у Табелама 18-22.

Резултати потврђују прелиминарна испитивања да је форма биофилма микроорганизма који га је формирао, у односу на њихов планктонски фенотип, знатно толерантнија и отпорнија и на присуство свих тестираних аутобоја. Већина микроорганизма која се налази у форми планктона показује значајну отпорност на присуство разређивача за испирање боје (МИКп од 0.31 до 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Табела 19) и делимично белој боји (Табела 22), док највећу осетљивост показује према разређивачу (МИКп од $<1 \mu\text{L}/\text{mL}$) и, у већој мери, ка металик црвеној боји (Табела 21). Нешто другачије је у форми биофилма где највећу отпорност, генерално, тестирани микроорганизми, испољавају према основној боји прајмеру (МИКб од 7.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$; МЛКб до 1.000 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Табела 18). Статистички значајна разлика у деловању аутобоја се не уочава ни код једног микроорганизма понаособ ($p>0.05$).

У присуству основне боје прајмера (Табела 18) највећу отпорност међу бактеријама показују планктонске ћелије *Escherichia coli* PMFKG-F2 и *Proteus vulgaris* PMFKG-F3 (МИКп – 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Од квасаца најотпорнија је *Candida utilis* PMFKG-F9 (МИКп – 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), док се од филаментозних гљива издвојила врста *Paecilomyces variotii* PMFKG-F12 (МИКп – 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Највећа осетљивост уочена је код *Sacharomyces cerevisiae* PMFKG-F6 (МИКп – 0.08 $\mu\text{L}/\text{mL}$) и *Penicilium expansum* PMFKG-F14 (МИКп – 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Тестирањем отпорности биофилма, највећа отпорност је уочена код *Proteus mirabilis* (МИКб – 62.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), *S. cerevisiae* PMFKG-F6 (МИКб – 62.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) и *Rhodotorula mucilaginosa* PMFKG-F8 (МИКб – 125 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Највећа осетљивост уочена је за биофилм *P. expansum* PMFKG-F14 (МИКб – 7.81 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Овде је уочен случај (*S. cerevisiae* PMFKG-F6, МИКп – 0.08 $\mu\text{L}/\text{mL}$ и МИКб – 62.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) где планктонске ћелије показују највећу осетљивост, а биофилм исте врсте највећу отпорност према овој аутобоји (Табела 18). Претоставља се да је то последица метаболичке разлике или пак постојања “persister” ћелија у оквиру биофилма као што је случај у студији Harrison et al., (2004a).

Статистички значајне разлике се уочавају на нивоу разлика између група микроорганизма ($p<0.05$). *P. mirabilis* PMFKG-F4, *C. utilis* PMFKG-F9, *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 се међусобно не разликују у отпорности ($p>0.05$) али се разликују од отпорности које показују *P. vulgaris* PMFKG-F3, *P. mirabilis* PMFKG-F4,

R. mucilaginosa PMFKG-F8, *C. utilis* PMFKG-F9, *P. variotii* PMFKG-F12 које су опет слично отпорне ($p > 0.05$).

Табела 18. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирану основну боју прајмер изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб

Тестирани микроорганизми	1* – Основна боја прајмер А-F107486-FH			
	МИКп	МЛКп	МИКб	МЛКб
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	0.31	10	31.25	250
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	1.25	5	31.25	250
<i>P. vulgaris</i> PMFKG- F3	1.25	10	31.25	125
<i>P. mirabilis</i> PMFKG- F4	0.31	5	62.5	125
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG- F6	0.08	10	62.5	/
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG-F7	0.62	5	31.25	500
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	2.5	10	125	500
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	5	10	31.25	1000
<i>P. chrisogenum</i> PMFKG-F13	0.31	0.62	31.25	1000
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	0.15	10	7.81	1000
<i>P. variotii</i> PMFKG-F12	1.25	10	31.25	1000
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	0.31	10	15.62	1000

*Вредности у табели су приказане у $\mu\text{L}/\text{mL}$. МИКп – минимална инхибиторна концентрација планктонских ћелија, МЛКп – минимална летална концентрација планктонских ћелија, МИКб – минимална инхибиторна концентрација биофилма, МЛКб – минимална летална концентрација биофилма.

У присуству разређивача за испирање боје (Табела 19) највећу отпорност показују у планктонском облику *E. coli* PMFKG-F1, *P. mirabilis* PMFKG- F4 (МИКп – 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) и *C. utilis* PMFKG-F9 (МИКп – 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Највећу осетљивост показује *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 (МИКп – 0.31 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Код форме биофилма највећу отпорност ка овом разређивачу показује *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 (МИКб – 62.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Табела 19). У табели се такође истиче да планктонске ћелије ове врсте показују ниску отпорност (МИКп – 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$) у односу на *C. utilis* PMFKG-F9, док је то обрнуто у форми биофилма. Овај резултат се може објаснити тиме да се успешан живот микроба у форми биофилма повезује са ткз. “појавним својствима”. То подразумева формирање нових структура, активности, особина које настају током процеса формирања биофилма, али и као последице само-организовања ћелија унутар биофилма (Corning, 2002). Статистички значајна разлика у отпорности се уочава код *P. variotii* PMFKG-F12 у односу на остале врсте ($p < 0.05$), док се врсте *P. vulgaris* PMFKG-F3, *P. mirabilis* PMFKG-F4, *C. utilis* PMFKG-F9 и *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 показују сличан степен отпорности ($p > 0.05$) који се разликује од других врста ($p < 0.05$).

У присуству разређивача (Табела 20) од планктонских ћелија највећу отпорност показале су *E. coli* PMFKG-F1, *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 (МИКп – 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$) и *C. utilis* PMFKG-F9 (МИКп – 0.31 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Све остале врсте у планктонском облику, са изузетком *S. cerevisiae* PMFKG-F6, показују изузетну осетљивост према овој супстанци (МИКп – 0.08 и $< 0.08 \mu\text{L}/\text{mL}$). За разлику од планктона, биофилм скоро свих тестираних врста показује значајну отпорност (МИКб 31.25 – 62.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), а за *E. coli* PMFKG-F1 и *C. utilis* PMFKG-F9 МИКб је био 125 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Биофилмови *E. coli* PMFKG-F2 и *P. vulgaris* PMFKG-F3 једини показују осетљивост (МИКб $< 7.81 \mu\text{L}/\text{mL}$) (Табела 20).

Табела 19. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирани разређивач за испирање боје изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб

Тестирани микроорганизми	2* – Разређивач за испирање боје (А-F107137-МФ)			
	МИКп	МЛКп	МИКб	МЛКб
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	5	10	31.25	62.5
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	2.5	10	7.81	31.25
<i>P. vulgaris</i> PMFKG- F3	2.5	10	31.25	15.62
<i>P. mirabilis</i> PMFKG- F4	5	10	15.62	15.62
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG- F6	2.5	10	7.81	62.5
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG-F7	0.62	10	7.81	15.62
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	0.62	10	62.5	250
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	10	10	31.25	31.25
<i>P. chrisogenum</i> PMFKG-F13	0.62	10	7.81	15.62
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	1.25	2.5	7.81	62.5
<i>P. variotii</i> PMFKG-F12	0.62	2.5	7.81	31.25
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	0.31	2.5	7.81	31.25

*Вредности у табели су приказане у $\mu\text{L/mL}$. МИКп – минимална инхибиторна концентрација планктонских ћелија, МЛКп – минимална летална концентрација планктонских ћелија, МИКб – минимална инхибиторна концентрација биофилма, МЛКб – минимална летална концентрација биофилма.

Табела 20. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирани разређивач изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб

Тестирани микроорганизми	3* – Разређивач (А-F107119-CN)			
	МИКп	МЛКп	МИКб	МЛКб
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	0.62	2.5	125	125
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	0.08	5	<7.81	15.62
<i>P. vulgaris</i> PMFKG- F3	0.08	10	<7.81	62.5
<i>P. mirabilis</i> PMFKG- F4	0.08	10	31.25	62.5
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG- F6	0.15	2.5	31.25	62.5
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG-F7	0.08	5	31.25	62.5
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	0.62	10	62.5	125
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	0.31	5	125	125
<i>P. chrisogenum</i> PMFKG-F13	<0.08	0.62	31.25	250
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	<0.08	1.25	31.25	250
<i>P. variotii</i> PMFKG-F12	0.08	10	62.5	500
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	<0.08	1.25	62.5	500

*Вредности у табели су приказане у $\mu\text{L/mL}$. МИКп – минимална инхибиторна концентрација планктонских ћелија, МЛКп – минимална летална концентрација планктонских ћелија, МИКб – минимална инхибиторна концентрација биофилма, МЛКб – минимална летална концентрација биофилма.

Значајна разлика у отпорности, између планктонских облика и њихових биофилмова, може се приписати матриксу (Corning, 2002), захваљујући чијој

продукцији је обезбеђена заштита од антимикуробних агенаса. ЕПС представља примарну структурну компоненту микробиолошког окружења, која има утицај на физичке особине биофилма (стабилизација и заштита микрооколине). Самим тим, активност ћелија унутар биофилма може бити појачана са његовом продукцијом (Flemming, 2007).

Присуство металик црвене боје најмање утиче на планктонске ћелије *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 (МИКп – 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), ($p < 0.05$). Све остале врсте у овој форми показују значајну остелјивост (МИКп 0.08 – 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Биофилмови ових врста показују десетоструко и већу отпорност на присуство исте боје (МИКб 7.81 – 62.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Табела 21). На нивоу отпорности биофилма нема статистички значајне разлике између *C. cladosporioides* PMFKG-F-11, *P. vulgaris* PMFKG-F3, *P. mirabilis* PMFKG-F4, *C. utilis* PMFKG-F9 и *P. variotii* PMFKG-F12 ($p > 0.05$) али се оне као група по отпорности издвајају статистички од других микроорганизама ($p < 0.05$).

Табела 21. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирану металик црвену боју изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб

Тестирани микроорганизми	4* – Металик црвена боја 108(A-F107107-FM)			
	МИКп	МЛКп	МИКб	МЛКб
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	0.15	10	62.5	62.5
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	0.08	5	31.25	125
<i>P. vulgaris</i> PMFKG-F3	0.08	10	62.5	125
<i>P. mirabilis</i> PMFKG-F4	0.31	10	15.62	62.5
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG-F6	0.15	5	/	62.5
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG-F7	0.08	2.5	15.62	250
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	0.08	1.25	62.5	125
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	0.15	2.5	31.25	500
<i>P. chrisogenum</i> PMFKG-F13	0.31	10	62.5	125
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	0.62	10	31.25	31.25
<i>P. variotii</i> PMFKG-F12	0.62	10	7.81	62.5
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	5	10	31.25	125

*Вредности у табели су приказане у $\mu\text{L}/\text{mL}$. МИКп – минимална инхибиторна концентрација планктонских ћелија, МЛКп – минимална летална концентрација планктонских ћелија, МИКб – минимална инхибиторна концентрација биофилма, МЛКб – минимална летална концентрација биофилма.

Овде се издваја супротан пример везан за отпорност на тестиране аутобоје, између планктонских облика и биофилма исте врсте. Ако се *P. variotii* PMFKG-F12 упореди са другим врстама, показује једну од најзначајнијих отпорности у форми планктона, док у форми биофилма то није случај, он је један од најосетљивијих (Табела 21). То се може објаснити чињеницом да улога биофилмова у биогеохемијским процесима зависи од хемијских својстава ЕПС-а (Flemming et al., 2007). У прилог овоме је да ЕПС може заштити ћелије које живе слободно, чак и да спречава формирање биофилма (Dragoš and Kovács, 2017). Лабораторијске студије су показале да мале промене у функционалним групама могу да мењају својства ЕПС-а (Potts, 1994). Супротно од врсте *P. variotii* PMFKG-F12, планктонске ћелије *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 су биле најосетљивије, а форма биофилма показује високу отпорност, као и у много примера ранијих тестирања овог истраживања. Flemming (2016a) наводи да се унутрашњост биофилма одликује високом стопом биодиверзитета, сложеносту, динамичким и синергистичким интеракцијама које укључују размену гена, при чему

долази до настанка мултицелуларних карактеристика, чиме можемо објаснити разлику у отпорности биофилма и планктонских ћелија.

Присуство беле боје (Табела 22). најмање утиче на планктонске ћелије *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 (МИКп – 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$), а високу отпорност показују и *E. coli* PMFKG-F1, *S. cerevisiae* PMFKG-F6 и *P. chrisogenum* PMFKG-F13 (МИКп – 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$). У форми биофилма највећу отпорност показују У оквиру биофилмова, највећа отпорност је уочена за *E. coli* PMFKG-F2, *P. mirabilis* PMFKG-F4, *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 (МИКб – 125 $\mu\text{L}/\text{mL}$). И код овог тестирања уочавамо да врста филаментозне гљиве *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 показује већу отпорност у планктонској форми него у форми биофилма (МИКп – 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ а МИКб <7.81 $\mu\text{L}/\text{mL}$) а квасац *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 значајно повећава отпорност у форми биофилма према овој аутобоји (МИКп – 0.08 $\mu\text{L}/\text{mL}$, МИКб 125 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Табела 22. Отпорност изолованих и идентификованих микроорганизама у планктонској и биофилм форми на тестирану белу боју изражена као МИКп, МЛКп, МИКб и МЛКб

Тестирани микроорганизми	5* – Бела боја 268 (А-F107117-CP)			
	МИКп	МЛКп	МИКб	МЛКб
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	2.5	5	62.5	62.5
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	0.15	10	125	125
<i>P. vulgaris</i> PMFKG-F3	0.15	10	31.25	62.5
<i>P. mirabilis</i> PMFKG-F4	0.31	10	125	125
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG-F6	2.5	5	7.81	62.5
<i>S. cerevisiae</i> PMFKG-F7	0.62	10	62.5	125
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	0.08	10	125	250
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	0.62	>10	62.5	125
<i>P. chrisogenum</i> PMFKG-F13	2.5	5	62.5	250
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	1.25	2.5	7.81	500
<i>P. variotii</i> PMFKG-F12	1.25	10	31.25	1000
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	10	10	<7.81	500

*Вредности у табели су приказане у $\mu\text{L}/\text{mL}$. МИКп – минимална инхибиторна концентрација планктонских ћелија, МЛКп – минимална летална концентрација планктонских ћелија, МИКб – минимална инхибиторна концентрација биофилма, МЛКб – минимална летална концентрација биофилма.

Компоненте које улазе у састав матрикса, попут макромолекула, имају веома важне функције у животу ћелија биофилма. Једна од функција компоненти ЕПС је и заштитна баријера од антимикуробних агенаса (Flemming et al., 2016a). Стога су биофилмови показали приметну отпорност у присуству свих тестираних супстанци у односу на планктонске ћелије. У оквиру биофилма одигравају се другачији физички, физиолошки и генетички процеси, који омогућавају микроорганизмима да развију боље механизме толеранције што им обезбеђује отпорност у присуству антимикуробних агенаса (Harrison et al., 2007). Физиологија биофилма (Donné and Dewilde, 2015; Lazăr and Chifiriuc, 2010) се разликује од физиологије планктонских ћелија, при чему је биофилм око 600 пута отпорнији на утицај стресора (Harrison et al., 2006), у овом случају на утицај боја и разлеђивача. Биофилм омогућава опстанак у неповољном окружењу. Из тог разлога се јавља повећана отпорност биофилмова ка антимикуробним агенсима (Hoiby et al., 2010).

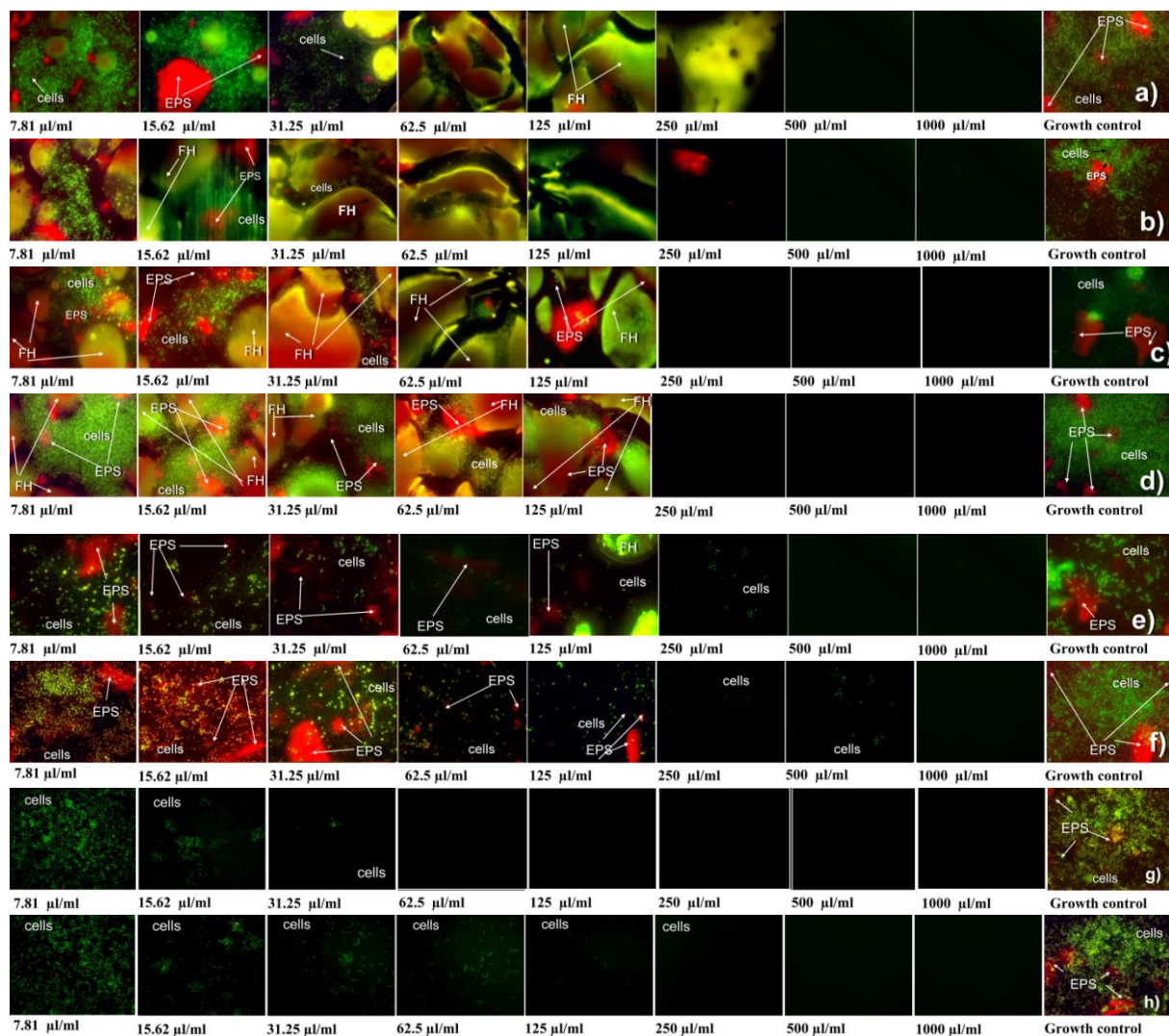
5.5.2. Флуоресцентна микроскопија

Резултати добијени применом ЕЛИСА тестова су потврђени флуоресцентном микроскопијом. Осим потврде предходних тестова визуелизацијом је омогућено уочавање и разликовање живих ћелија у биофилмовима, као и способност микроорганизама да продукују ЕПС у контакту са различитим аутобојама што није било могуће одредити предходним методама.

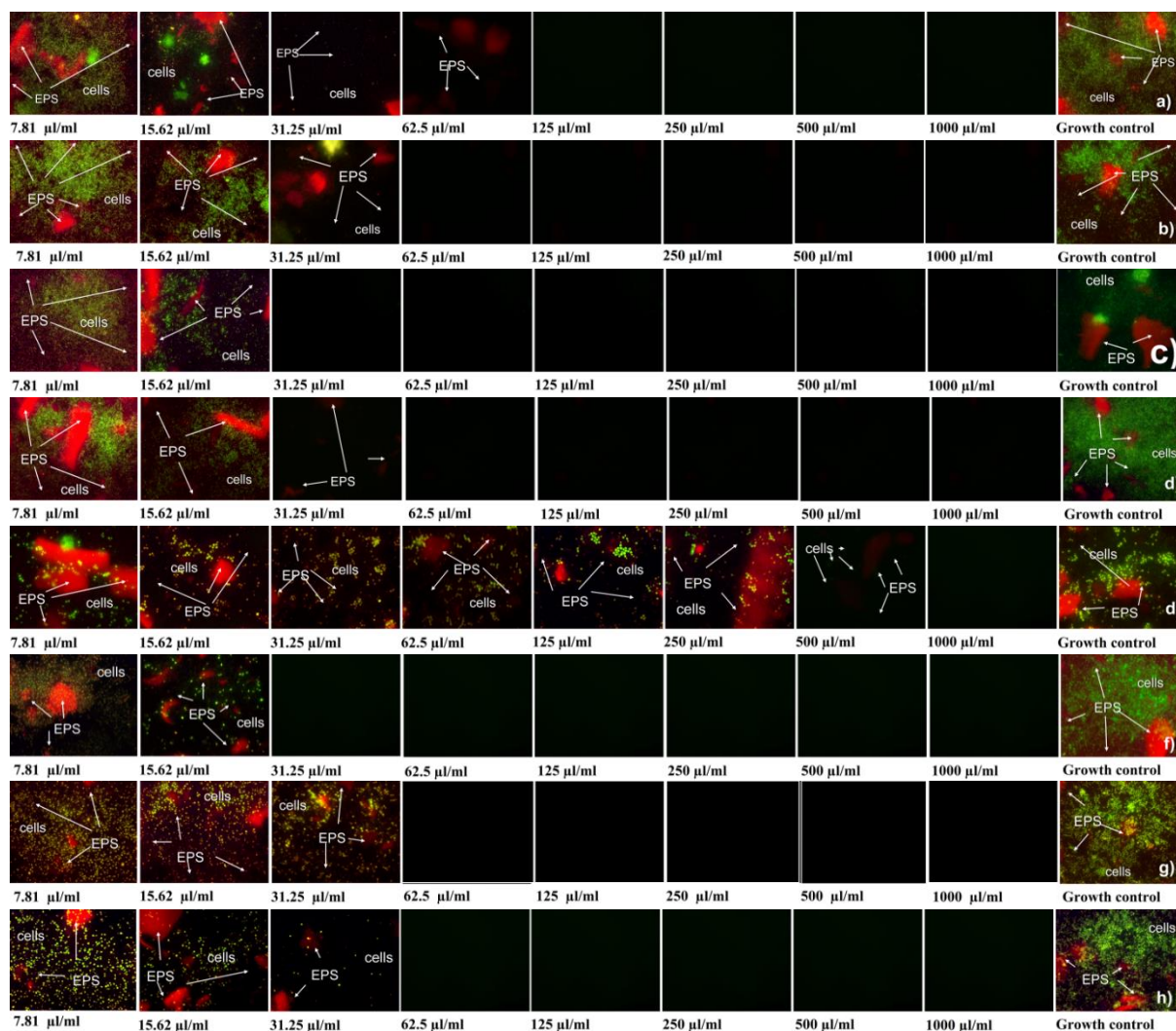
Oubekka et al. (2012) су локално и тачно проценили дифузијску реакцију антибиотика и први пут користили сет напредних флуоресцентних микроскопских алата (опоравак флуоресценције након фотобелења, флуоресцентна корелациона спектроскопија и живо сликање флуоресценције) који нуде просторно-временску резолуцију која није уобичајена time lapse конфокална метода снимања. Овај низ техника коришћен је за карактеризацију динамике флуоресцентно обележених ванкомицина у биофилмовима формираним од два изолата *Staphylococcus aureus*. Bogachev et al. (2018) наводе да резултати микроскопије указују на то да су процене удела суб-популације добијене на основу података о сликању ћелија обојених флуоресцентно обојеним средствима помоћу БиоФилмАнализер-а врло блиски резултатима добијеним другим техникама, као што су стручно ручно бројање и проточна цитометрија. Флуоресцентна микроскопија показује живе ћелије на површини биофилма (Hassan et al., 2010), при чему је закључено да се и ћелије у дубоким слојевима биофилма и површинске ћелије могу одупрети чишћењу и санитацији.

Ефекат деловања тестираних аутобоја на биофилмове бактерија снимљен је након 48 h, а код биофилмова квасаца након 72 h. Биофилм филаментозних гљива није могао успешно да се визуелизује. Биофилм бактерија и квасаца бојен је бојом SYTO 9 (вијабилне ћелије су обојене зелено) и ConA-Texas Red (екстрацелуларни матрикс је обојен црвено). Резултати су приказани на Сликама 25-29.

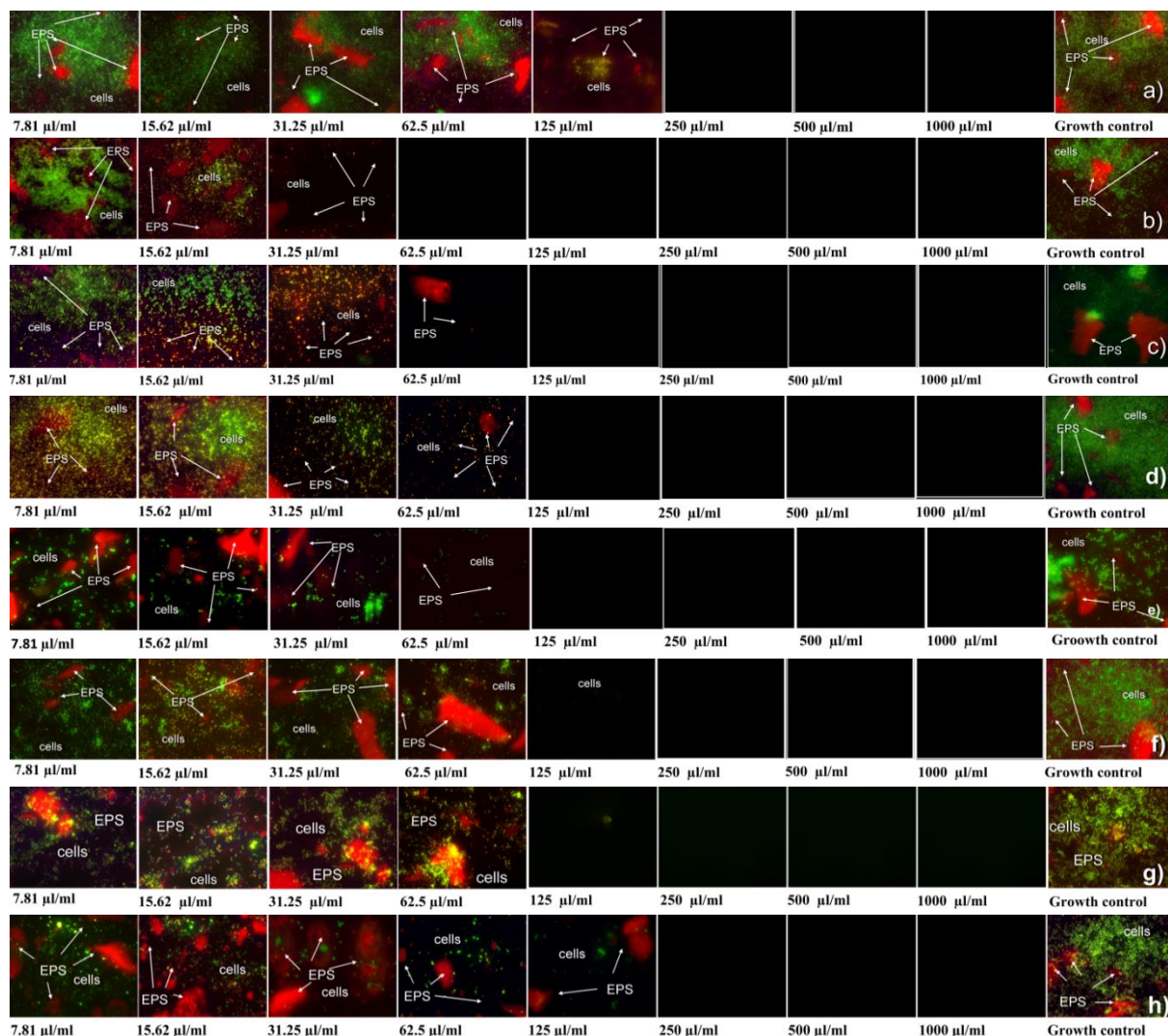
Резултати добијени употребом флуоресцентног микроскопа се поклапају са добијеним вредностима за МЛКб (Табеле 18-22). На сликама се МЛКб уочава као концентрација која изазива летални ефекат на тест организам (Andrews, 2001). Резултати флуоресцентне микроскопије такође показују да боја ConA-Texas Red, која боји екстрацелуларни матрикс у црвено, није уочена на Слици 25g и 25h, из чега се може претпоставити да биофилм *S. cerevisiae* PMFKG-F6 и биофилм *S. cerevisiae* PMFKG-F7 не продукују ЕПС у присуству основне боје – прајмера (Слика 25). Исти резултати су добијени за биофилмове *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, *C. utilis* PMFKG-F9, *S. cerevisiae* PMFKG-F6 и *S. cerevisiae* PMFKG-F7 у присуству беле боје (Слика 29e-h).



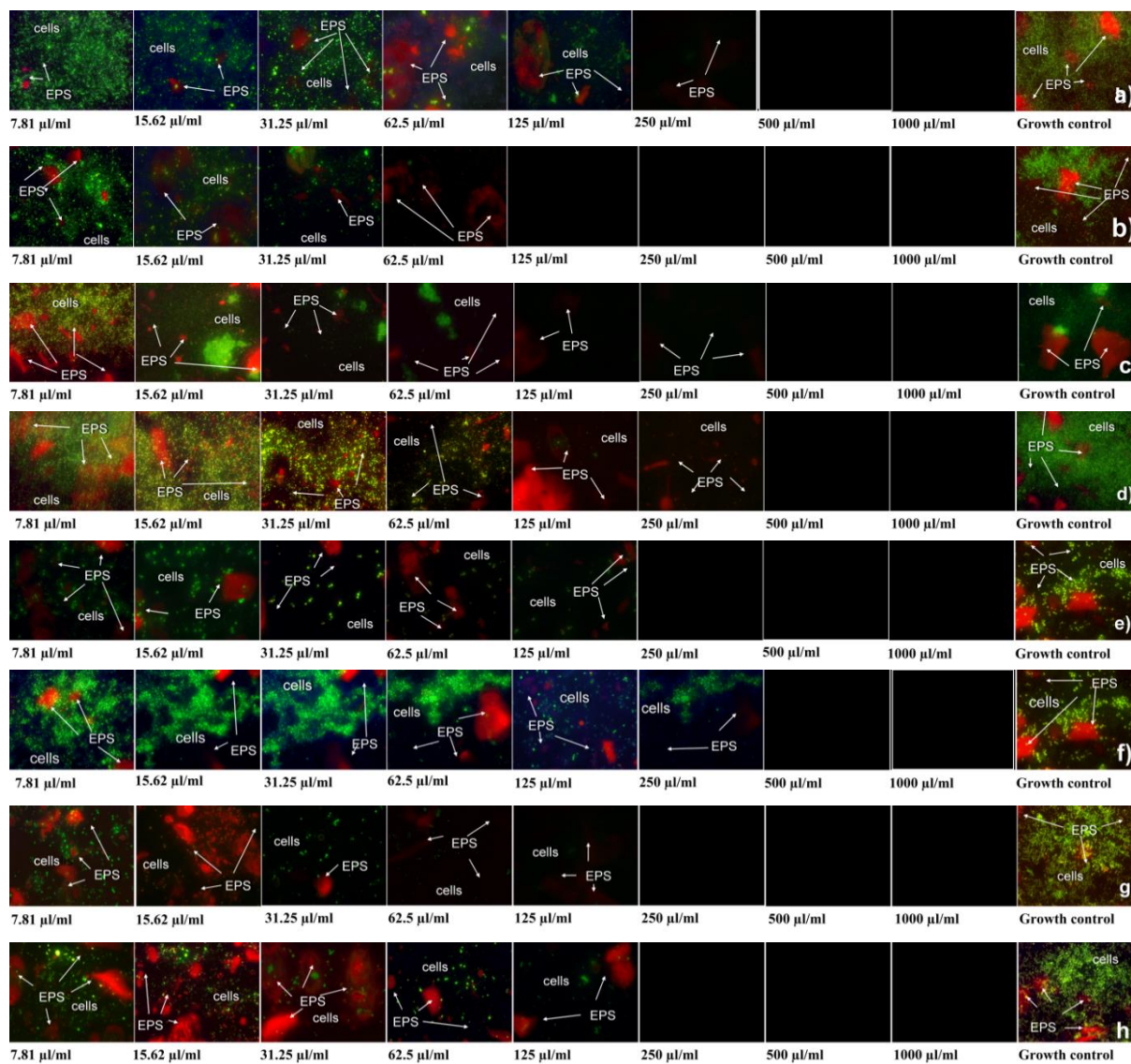
Слика 25. Деловање основне боје прајмера на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, х) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.



Слика 26. Деловање разређивача за испирање боје на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, х) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.



Слика 27. Деловање разређивача на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, х) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.



Слика 28. Деловање металик црвене боје на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, х) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.



Слика 29. Деловање беле боје на биофилм а) *E. coli* PMFKG-F1, б) *E. coli* – PMFKG-F2, в) *P. mirabilis* PMFKG-F5, д) *P. vulgaris* PMFKG-F3, е) *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, ф) *C. utilis* PMFKG-F9, г) *S. cerevisiae* PMFKG-F6, х) *S. cerevisiae* PMFKG-F7.

5.5.3. Ензимска активност микроорганизама у присуству аутобоја

Тестиране супстанце, чак и када су подложне микробијалној колонизацији, су рестриктивни супстрат и само они микроорганизми који имају посебне прилагођености, нпр. метаболичке (присуство хидролитичких ензима) или физиолошке (производња спора, отпорност на недостатак хранљивих састојака, отпорност на недостатак воде итд.), могу расти или преживети у присуству истих (Dar et al., 2005; Mohlenhoff et al., 2001). Karpouzias и Singh (2006) су дали преглед разградње оргоанофосфатних једињења применом микроорганизама и метаболичке путеве. Такође

су испитали биохемијске и молекуларне основе разградње органофосфата од стране микроорганизама и еволуцију и дистрибуцију гена/ензима. Sahoo et al. (2012) наводе да постоји неколико фактора који могу ограничити биоразградњу ксенобиотичких једињења. Такође су представљени недавни помаци направљени на основу ових аспеката у превазилажењу одређених ограничења у метаболизму бактерија које разграђују ароматична једињења. Agrawal и Shahi (2015) у свом испитивању дају преглед микроорганизама, процес разградње, молекуларне технике за проучавање трансформација ксенобиотичких једињења у савременој технологији. Најефикаснија и најзначајнија стратегија за регулацију отпадних једињења је биоремедијација. Овај биолошки приступ санације може се спровести увођењем ефикасних сојева микроорганизама (биоаугментација) или додавањем хранљивих састојака (биостимулација) да би се значајно побољшао поступак санације. Постојећи литературни извори наводе широк спектар ефикасних сојева микроорганизама у санацији токсичних, сложених и отпорних полутаната (Goswami et al., 2018; Agrawal and Shahi 2015; Sahoo et al., 2012; Karpouzias and Singh 2006).

У овом истраживању је проучавана ензимска активност тестираних микроорганизама како бисмо сазнали да ли ови микроорганизми заиста имају метаболички и физиолошки потенцијал да буду одговорни за биолошку разградњу испитиваних супстанци. Активност хидролитичких ензима, као што су алкална протеаза, алкална фосфатаза (супстрат β -глицерофосфат и *p*-нитрофосфат) и алкална и кисела инвертаза микробних биофилмова произведених у медијуму са испитиваним бојама (испитиване супстанце), измерена је после инкубације од 15 дана.

Резултати испитивања активности хидролитичких ензима микроорганизама: алкалне протеазе, алкалне фосфатазе (супстрати β -глицерофосфат и *p*-нитрофенил фосфат), киселе и алкалне инвертазе, као и укупан садржај протеина у подлогама са испитиваним тест супстанцама, приказани су у Табелама 23-28.

У одређеним деловима ЕПС-а примећена је значајна активност хидролитичких ензима. Велики број цитоплазматских протеина у неким деловима у ЕПС-у указује или на стварање ванћелијских мембранских везикула или на лизу ћелија током развоја биофилма (Jachlewski et al., 2015).

У присуству тест супстанце 1 – основне боје прајмера (Табела 23), микроорганизми су, изузев *C. cladosporioides* PMFKG-F11 су продуковали различиту количину протеина (0.03-0.33 mg/mL). Највећу количину протеина продуковала је мешовита култура, која је истовремено имала и највећу густину биофилма. Активност хидролитичких ензима микроорганизама у наведеној подлози била је углавном слаба. Активност алкалне протеазе измерена је код свих микроорганизама и кретала се у интервалу 0.002-0.109 IU/mL, изузев код *E. coli* PMFKG-F1 и *C. cladosporioides* PMFKG-F11. Највећу активност алкалне протеазе остварила је *E. coli* PMFKG-F2, а најмању *C. utilis* PMFKG-F9 и *P. expansum* PMFKG-F14. Алкална фосфатазна активност (β -глицерофосфат) је измерена само код *E. coli* PMFKG-F1, *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 и *C. utilis* PMFKG-F9. Највећу ензимску активност остварила је *C. utilis* PMFKG-F9 (0.12 IU/mL), док је ензимска активност код највећег броја микроорганизама била потпуно инхибирана. Активност киселе инвертазе измерена је само код појединих микроорганизама – *E. coli* PMFKG-F1, *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 и мешовите културе. За разлику од киселе инвертазе, активност алкалне инвертазе била је потпуно инхибирана код свих врста микроорганизама.

У присуству тест супстанце 2 – разређивача за испирање боје (Табела 24), сви микроорганизми су продуковали протеине (0.10-0.56 mg/mL). Највише протеина је продуковала *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, а најмање *C. cladosporioides* PMFKG-F11. Активност алкалне протеазе микроорганизама је била потпуно инхибирана, изузев *C.*

utilis PMFKG-F9 код које је била веома изражена (0.219 IU/mL), и мешовите културе која је имала веома слабу ензимску активност. Активност алкалне фосфатазе (β -глицерофосфат) била је потпуно инхибирана код свих микроорганизама, док је активност алкалне фосфатазе (*p*-нитрофенил фосфат) код највећег броја микроорганизама била значајна (0.128-0.421 IU/mL). Највећу фосфатазну активност остварила је *E. coli* PMFKG-F1, а најмању мешовита култура. Испитивана тест супстанца потпуно је инхибирала активност алкалне фосфатазе (*p*-нитрофенил фосфат) *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 и *P. expansum* PMFKG-F14. Активност киселе инвертазе микроорганизама такође је била инхибирана и забележена једино код *P. expansum* PMFKG-F14 и *C. Cladosporioides* PMFKG-F-11. За разлику од киселе, активност алкалне инвертазе је забележена код већине микроорганизама (0.007-0.11 IU/mL).

У присуству тест супстанце 3 – разређивача (Табела 25), сви микроорганизми су продуковали протеине (0.01-0.15 mg/mL). Највише протеина продуковала је *C. utilis* PMFKG-F9, а најмање *C. cladosporioides* PMFKG-F-11. Активност алкалне протеазе у зависности од врсте микроорганизама била је потпуно инхибирана (*R. mucilaginosa* PMFKG-F8, *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 и *E. coli* PMFKG-F2), слаба (*P. expansum* PMFKG-F14, *E. coli* PMFKG-F1 и мешовита култура), или изражена (*C. utilis* PMFKG-F9). Активност алкалне фосфатазе (β -глицерофосфат) измерена је код свих микроорганизама изузев код *E. coli* PMFKG-F1 и *E. coli* PMFKG-F2. Највећа ензимска активност забележена је код *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 (1.404 IU/mL), а знатно слабија код *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 (0.108 IU/mL), *C. utilis* PMFKG-F9, *P. expansum* PMFKG-F14 и мешовите културе (0.006 IU/mL). Активност осталих хидролитичких ензима микроорганизама била је потпуно инхибирана тест супстанцом, са изузетком киселе инвертазе која је измерена само код *E. coli* PMFKG-F1, *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 и мешовите културе.

У присуству тест супстанце 4 – металик црвена боја (Табела 26), сви микроорганизми су продуковали протеине (0.09-0.52 mg/mL). Највише протеина продуковала је *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, а најмање *C. cladosporioides* PMFKG-F-11. Активност испитиваних хидролитичких ензима била је у великој мери потпуно инхибирана тест супстанцом. Спорадична активност хидролитичких ензима забележена је у зависности од врсте микроорганизама и специфичности ензима. Активност алкалне протеазе забележена је само код *E. coli* PMFKG-F1, *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 и мешовите културе. Активност алкалне фосфатазе (β -глицерофосфат) забележена је само код *P. expansum* PMFKG-F14, а активност фосфатазе (*p*-нитрофенил фосфат) код *E. coli* PMFKG-F1, *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 и *C. utilis* PMFKG-F9. Активност киселе инвертазе забележена је само код *E. coli* PMFKG-F1, *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 и *P. expansum* PMFKG-F14, док је активност алкалне инвертазе забележена једино код *E. coli* PMFKG-F1 и *C. utilis* PMFKG-F9.

Табела 23. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе

Биофилм	1* – Основна боја прајмер А-F107486-FH					
	Протеини	Протеазна активност	Алкална фосфатаза (β -glicerofosfat)	Алкална фосфатаза (p-nitrofenil fosfat)	Кисела инвертаза	Алкална инвертаза
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	0.13	0	0.012	0	0	0
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	0.03	0.109	0	0	0.004	0
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	0.07	0.012	0.018	0	0.005	0
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	0.16	0.002	0.12	0	0	0
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	0	0	0	0	0	0
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	0.06	0.003	0	0	0	0
Све тестиране врста	0.33	0.033	0	0	0.011	0

* Активност ензима изражена је у IU/mL

Табела 24. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе

Биофилм	2* – Разређивач за испирање боје (А-F107137-MF)					
	Протеини	Протеазна активност	Алкална фосфатаза (β -glicerofosfat)	Алкална фосфатаза (p-nitrofenil fosfat)	Кисела инвертаза	Алкална инвертаза
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	0.3	0	0	0.421	0	0.02
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	0.15	0	0	0.335	0	0
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	0.56	0	0	0.146	0	0.008
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	0.16	0.219	0	0.22	0	0.011
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	0.1	0	0	0	0.022	0
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	0.17	0	0	0	0.007	0
Све тестиране врста	0.37	0.002	0	0.128	0	0.007

* Активност ензима изражена је у IU/mL

Табела 25. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе

Биофилм	3* – Разређивач (А-F107119-CN)					
	Протеини	Протеазна активност	Алкална фосфатаза (β-glicerofosfat)	Алкална фосфатаза (p-nitrofenil fosfat)	Кисела инвертаза	Алкална инвертаза
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	0.04	0.005	0	0	0.025	0
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	0.05	0	0	0	0	0
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	0.06	0	1.404	0	0.025	0
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	0.15	0.167	0.006	0	0	0
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	0.01	0	0.108	0	0	0
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	0.02	0.001	0.006	0	0	0
Све тестиране врста	0.06	0.004	0.006	0	0.01	0

* Активност ензима изражена је у IU/mL

Табела 26. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе

Биофилм	4*- Металик црвена боја 108(А-F107107-FM)					
	Протеини	Протеазна активност	Алкална фосфатаза (β-glicerofosfat)	Алкална фосфатаза (p-nitrofenil fosfat)	Кисела инвертаза	Алкална инвертаза
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	0.47	0.052	0	0.037	0.043	0.002
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	0.34	0	0	0	0	0
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	0.52	0.035	0	0.146	0.012	0
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	0.22	0	0	0.073	0	0.005
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	0.09	0	0	0	0	0
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	0.19	0	0.312	0	0.02	0
Све тестиране врста	0.16	0.004	0	0	0	0

* Активност ензима изражена је у IU/mL

Табела 27. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе

Биофилм	5 * – Бела боја 268 (A-F107117-CP)					
	Протеини	Протеазна активност	Алкална фосфатаза (β-glicerofosfat)	Алкална фосфатаза (p-nitrofenil fosfat)	Кисела инвертаза	Алкална инвертаза
<i>E. coli</i> PMFKG-F1	0.22	0.002	0	0	0	0.007
<i>E. coli</i> PMFKG-F2	0.04	0.004	0	0	0	0
<i>R. mucilaginosa</i> PMFKG-F8	0.26	0.003	0.012	0	0	0
<i>C. utilis</i> PMFKG-F9	0.2	0.001	0	0	0.007	0.008
<i>C. cladosporioides</i> PMFKG-F-11	0	0	0	0	0	0
<i>P. expansum</i> PMFKG-F14	0.13	0	0	0	0	0.006
Све тестиране врста	0.18	0.009	0.004	0	0.043	0.005

* Активност ензима изражена је у IU/mL

Табела 28. Одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе

Биофилм	Све аутоиндустријске боје					
	Протеини	Протеазна активност	Алкална фосфатаза (β-glicerofosfat)	Алкална фосфатаза (p-nitrofenil fosfat)	Кисела инвертаза	Алкална инвертаза
Све тестиране врсте микроорганизама	0.08	0.001	0	0	0	0

* Активност ензима изражена је у IU/mL

У присуству тест супстанце 5 – бела боја (Табела 27), изузев *C. cladosporioides* PMFKG-F-11, сви микроорганизми су продуковали протеине (0.04-0.26 mg/mL). Од свих испитиваних хидролитичких ензима активност алкалне протеазе била је најмање инхибирана тест супстанцом. Активност алкалне протеазе измерена је код свих микроорганизама (0.001-0,009 IU/mL), изузев код *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 и *P. expansum* PMFKG-F14. Алкална фосфатазна активност (β -глицерофосфат) је измерена само код *R. mucilaginosa* PMFKG-F8 и мешовите културе, док је фосфатазна активност (*p*-нитрофенил фосфат) била потпуно инхибирана код свих микроорганизама. Активност киселе инвертазе забележена је једино код *C. utilis* PMFKG-F9 и мешовите културе, а активност алкалне инвертазе забележена је код *E. coli* PMFKG-F1, *C. utilis* PMFKG-F9, *P. expansum* PMFKG-F14 и мешовите културе.

Резултати испитивања активности хидролитичких ензима и количине протеина мешовите културе микроорганизама (биофилм) у присуству свих тестираних супстанци приказани су у Табели 28. Резултати су показали да присуство свих тестираних супстанци потпуно инхибира ензимску активност мешовите културе, изузев протеазне активности која је била јако слаба.

Отпадне воде пореклом из аутомобилске индустрије и процеса могу садржати мноштво опасних органских и неорганских једињења, при чему је присуство чак и врло малих количина боја (<1 ppm), посебно синтетичких, у води непожељно (Rasalingam et al., 2014). Полициклични ароматични угљоводоници имају токсични ефекат на организме и могу да изазову канцерогене и мутагене ефекте. Испарљива органска једињења која се користе као растварачи у бојама (Goldstein and Galbally, 2007) могу довести до респираторних, алергијских или имуних оштећења код људи (Mendell, 2007). Стално повећање концентрације ових полутаната у водним телима изискује потребу за развојем исплативих метода за њихово уклањање, уништавање или њихово превођење у нешкодљиве хемијске супстанце. Са становишта животне средине је важно истражити способност различитих микроорганизама, пре свега аутохтоних, да разграђују и смањују садржај ових полутаната. Аутохтоне микробне заједнице су способне да метаболизују упорне органске полутанте и оксидују полутанте тешких метала. Међутим, њихова мала бројност и активност у животној средини, потешкоће у приступу полутантима или ограничењима хранљивих састојака у животној средини, спречавају да се процеси одвијају што је брже могуће и на тај начин постижу циљеви чишћења (Edwards and Kjellerup, 2013). Са друге стране, употреба биофилма у санацијама је еколошка и економична опција за неутралисање полутаната у животној средини. Употреба биофилма је ефикасна за биоремедијацију, јер биофилмови апсорбују, имобилишу и разграђују различите полутанте. Бактеријски биофилмови постоје унутар аутохтоних популација у близини јако контаминираних места како би се боље одржали, преживели и управљали суровим окружењем (Mitra and Mukhopadhyay, 2016). Различита истраживања су показала да је огроман број микроорганизама до сада имао кључну улогу при биодеградацији у загађеним животним срединама. Различити родови гљива (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, итд.) и бактерија (*Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, итд) су означени као најефикаснији биоразграђивачи боја и обојених површина (Phulpoto et al., 2016; Ishfaq et al., 2015; Subathra et al., 2013; Rosado et al., 2013; Okunye et al., 2013; Ravikumar et al., 2012; Gorbushina et al., 2004; Ciferri, 1999; Altenburger et al., 1996; Bravery, 1988). Али, сама улога микробних биофилмова у биоразградњи различитих боја је увек била слабо разумевана. Зато је у овом истраживању један део посвећен проценивању раста и производње биофилмова различитих микроорганизама изолованих из отпадних вода аутомобилске индустрије, у медијуму са појединачним аутоиндустријским бојама.

Стабилност микробних биофилмова и активност хидролитичких ензима у присуству ових полутаната је кључни фактор који одређује способност микробиолошке биодеградабилности. Сама продукција биофилмова зависи од производње и количине ЕПС-а (Sutherland, 2001). Специфични садржај ЕПС-а контролише морфологију и стабилност биофилма (Flemming and Vingender, 2010). Али састав ЕПС-а варира и између биофилмова, врста, површине на којој се биофилмови формирају и услова околине, укључујући доступност хранљивих састојака, температуру и кисеоник (Koechler et al., 2015; Nakue et al., 2012; Prouti and Gunn, 2003).

Екстрацелуларне полимерне супстанце (ЕПС) су главне структурне и функционалне компоненте микробних биофилмова изграђене од угљених хидрати и протеина. Анализа ванћелијског протеома резултирала је доказима који сугеришу цитоплазматско порекло протеина. Функционална анализа ЕПС протеина је показала активност различитих класа ензима, као што су протеазе, липазе, естеразе, фосфатазе и глукозидазе. ЕПС су углавном полисахариди, протеини, ванћелијска ДНК и липиди. Они поспешују и омогућавају адхезију биофилма на површинама и формирају кохезивну, тродимензионалну полимерну мрежу која је међусобно повезана и имобилише ћелије унутар биофилма, а биофилмовима пружају механичку стабилност (Flemming and Vingender, 2010).

У присуству тест супстанци сви микроорганизми продукују протеине, изузев *C. cladosporioides* PMFKG-F-11 у присуству тест супстанце А-F107486-FH и А-F107117-CP. У присуству А-F107486-FH активност хидролитичких ензима је углавном слаба. Само је активност алкалне протеазе измерена код већине микроорганизма, као и код А-F107117-CP. У присуству А-F107107-FM активност хидролитичких ензима била је у великој мери потпуно инхибирана, јавља само код по неког микроорганизма. А-F107119-CN инхибира већину хидролитичких ензима са изузетком алкалне фосфатазе (β -глицерофосфат). Активност алкалне протеазе у присуству А-F107137-MF је била потпуно инхибирана, изузев *C. utilis* PMFKG-F9 код које је била веома изражена (0.219 IU/mL). За разлику од активности киселе инвертазе која је била инхибирана, активност алкалне инвертазе је забележена код већине микроорганизма.

На основу добијених резултата, тестирани биофилмови су показали слабе ензимске активности. Оба соја *E. coli* су показала најбољу алкално фосфатазну активност у присуству А-F107137-MF, при чему се може претпоставити да би ове врсте имале позитивну улогу у разлагању масноћа у отпадним водама. *R. mucilaginosa* је показала највећу алкално фосфатазну активност у присуству А-F107119-CN, као и *C. cladosporioides*. Код врсте *P. expansum* је забележена алкално фосфатазна активност (β -glicerofosfat) у присуству А-F107107-FM. Добре протеазне активности забележене су за *C. utilis* и оба соја *E. coli*. У присуству А-F107117-CP једино је мешовити биофилм показао кисело инвертазну активност.

Деградационе способности су условљене катаболичким генима и ензимима (Khomenkov et al., 2008). Да би се апсорбоване супстанце разградиле, екстрацелуларни ензими делују на супстанцу при чему долази до биоразградње, што доприноси процесима самопречишћавања. У оквиру матрикса, а помоћу ензима, врши се рециклирање при чему се добијају хранљиве материје које обезбеђују опстанак микроорганизма (Decho, 2000), што на неки начин објашњава наше резултате. У овом истраживању је детектована мала количина протеина. Овај резултат сугерише да је, с обзиром на малу ензимску активност, процес разградње био мали, па самим тим и хранљиве материје које обезбеђују опстанак нису биле присутне. Истраживање је спроведено у лабораторијским условима и потребно је наставити га у постројењима, наставак, како би се ово истраживање применило у поступцима биолошког третмана отпадних вода.

5.6. РАЗМАТРАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Микроорганизми су универзални представници водених система и од великог су значаја за структурну и функционалну организацију ових екосистема. Дневно индустријске компаније производе велику количину отпадних вода које се одликују високом биолошком потрошњом кисеоника (БПК), великом количином суспендованих честица, садржајем масти, органским једињењима итд. ((Porwal et al., 2015). Отпадна вода са великом количином органских једињења узрокује озбиљне еколошке проблеме који неповољно утичу на флору и фауну, мењајући физичке и хемијске особине воде, утичу на еутрофикацију и чине воду неподобном за људске потребе. Улажу се велики напори за проналажење јефтинијег, ефикаснијег, економичнијег и дуготрајнијег решења за третман отпадних вода. Традиционалне физичке и хемијске методе пречишћавања отпадних вода су скупе и често се не могу се користити у свим постројењима. Из тог разлога биолошки третман постаје популаран због развоја релативно јефтинијег и често ефикаснијег третмана отпадне воде (Vishakha et al., 2013).

У циљу креирања ефикаснијег биолошког третмана отпадних вода, важно је одредити микробиолошки састав отпадних вода и идентификовати сојеве који метаболишу органска једињења (Ahring et al., 2001). Загађена станишта су извор неидентификованих и специфичних микроорганизама. Овакве средине су са смањеним диверзитетом, због често екстремних услова станишта, али и са популацијама микроорганизама отпорним на полутанте (Zhang et al., 2020; Rodríguez et al., 2018). Оваква својства микроорганизама омогућавају ефикаснију прераду тих отпадних вода и зато је најпрактичније употребити микроорганизме изоловане из средине која треба да буде деконтаминирана (Ногакова and Немес, 2000). Због тога је и рађена изолација и идентификација микроорганизама из постројења за пречишћавање отпадних вода у Цветојевцу и Фиат постројењу, тестирање њихове способности формирања биофилмова и отпорности према специфичним полутантима тих отпадних вода, као и одређивање њихове ефикасности у уклањању истих. Све наведено рађено је у циљу налажења најбоље комбинације микроорганизама који формирају биофилм и његове примене у уклањању изабраних полутаната ради потенцијалне примене у процесу пречишћавања отпадних вода.

У последњих 10-ак година интензивирано је увођење нових биолошких метода за уклањање једињења тешких метала из контаминираних отпада (Fu and Wang, 2011). У биолошким третманима, за уклањање једињења тешких метала из контаминираних средина често се користи биосорпција, при чему се најчешће микроорганизми користе као агенси за уклањање једињења тешких метала (Adewuyi, 2020).

Микроорганизми, попут бактерија, алги и гљива, показују тенденцију да се везују за површине и продукују екстрацелуларни полимерни матрикс (ЕПС), што резултира продукциом биофилма у оквиру кога су планктонске ћелије заштићене од предатора и других штетних агенаса (Salgar-Chararro et al., 2020). ЕПС поседује функционалне групе за које се једињења тешких метала везују (Decho and Gutierrez, 2017). Студије спроведене последњих година најчешће су са циљем да се пронађу што ефикаснији микробиолошки биофилмови ради примене у уклањању једињења тешких метала са апликативном и комерцијалном применом у пречишћавању отпадних вода (Fathollahi et al., 2020, 2021, Maurya and Raj, 2020, Mitra and Mukhopadhyay, 2016; Quintelas et al., 2009a, 2009b; Quintelas et al., 2008; Harrison et al., 2006). Способност микроорганизама да формирају биофилм омогућава им опстанак у условима у којима планктонски облици истих врста не би могли да се развијају, што потврђују истраживања у овој дисертацији (Табеле 10-12; График 5). Већа успешност биофилма

од планктонских ћелија у отпорности, лежи у продукцији ЕПС, што је у сагласности са другим студијама (Harrison et al., 2004; Teitzel and Parsek 2003).

За формирање индивидуалних и мешовитих биофилмова, у овој дисертацији, коришћене су микротитарске плоче, МВЕСTM – НТР тест и АМВ Media биофилм носачи. АМВ Media носачи су били погодни за формирање биофилмова из практичних разлога – већа површина за продукцију биофилма и већа површина за апсорпцију једињења метала. Ови носачи се користе у третманима постројења за пречишћавање отпадних вода, што је још један разлог њихове употребе. Да би се успешно развили мешовити биофилмови потребно је да се успоставе и синергистички односи унутар самог биофилма. Уколико се то не деси јављају се конкурентски односи, а развој биофилма је инхибиран (Rodrigues et al., 2019, Camarillo-Marquez et al., 2018). То је у овој дисертацији приказано у случају слабог формирања мешовитих биофилмова *E. cloacae*/*K. oxytoca*/*S. cerevisiae* и *E. cloacae*/*S. odorifera*/*S. cerevisiae*, чије су врсте иначе појединачно успешно формирале биофилмове.

Истраживање везано за лабораторијске изолате је показало да *Rhodotorula mucilaginosa* индивидуално, али и у комбинацији са *E. coli* (Табела 13), најуспешније формира биофилмове. У истим случајевима она се показала и као најотпорнија на присуство тешких метала. Zalewska-Piątek и сарадници (2013) и Harrison и сарадници (2005б) потврђују да сојеви *E. coli* показују потенцијал у формирању биофилма. Велики број истраживања показује ефикасност квасаца из рода *Rhodotorula*, нарочито *R. mucilaginosa* у уклањању тешких метала (Kan et al., 2019; Garza-Gonzalez et al., 2016; Rajpert et al., 2013; Nunes et al., 2013; Ghosh et al., 2006). Из тог разлога је она и изабрана за ово истраживање и као контрола у односу на микроорганизме изоловане из отпадних вода.

Нека од ранијих истраживања су утврдила да неки сојеви *R. mucilaginosa* могу да расту и у срединама са врло високим вредностима тешких метала, нпр Hg^{2+} , али да је у таквим условима способност усвајања јона од стране микроорганизма релативно ниска. На основу тога су аутори закључили да не постоји повезаност између толеранције на метал и способност акумулације (Liu et al., 2017). У овој дисертацији, уколико се посматра понашање микроорганизма у форми биофилма, то није био случај, јер постоји повезаност у толеранцији и способности уклањања датог полутанта.

Концентрације јона метала су се смањивале у току третмана, што указује на високу ефикасност биофилмова. Постоје варијације у брзини уклањања јона метала од стране биофилма током тестираног времена (Табела 14). Процес уклањања метала се одвијао у две фазе. Прва је екстремно брза због велике иницијалне активности биофилмова као биосорбента. Након тога следи спора фаза уклањања метала при чему су промене у резидуалној количини испитиваних метала биле јако мале (Volesky, 2003). Наши резултати су у складу са резултатима других истраживања (Liu et al., 2019; Rezić et al., 2017; Vasak et al., 2104). Процентуална ефикасност уклањања Cd^{2+} биофилмом *E. coli* након 48 h била је 74.18%, што у складу са истраживањем Quintelas et al. (2009) где је проценат уклањања Cd^{2+} на иницијалној концентрацији 97 mg/L 71.3%.

Изолати из Цветојевца, који су најуспешније формирали биофилм, како појединачни тако и мешовити (у комбинацији), су: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia odorifera* и *Saccharomyces cerevisiae*-тип 2 (Графици 5 и 6). Ово је прво истраживање које је показало да *Enterobacter cloacae* како појединачно, тако и у одређеним комбинацијама са другим микроорганизмима, може успешно да се примени у третману вода које у себи садрже и високе и ниске концентарције неких тешких метала. Од мешовитих биофилмова (комбинације микроорганизма по две и три врсте), као најотпорнији се показао биофилм *K. oxytoca*/*S. odorifera*/*S. cerevisiae* (KSC) у присуству свих тестираних метала (Табела 16). Показано је да врсте које имају слабу

продукцију биофилма су и осетљивије на утицај тешких метала. Успешан начин живота микроорганизама, у оквиру биофилма, зависи од формирања нових структура и нових особина које настају током процеса формирања биофилма (Corning, 2002).

Лабораторијски изолат *R. mucilaginosa*, који је испољио значајан потенцијал у формирању биофилма и отпорност на присуство тешких метала, и изолат *E. cloacae* из отпадне воде, који је такође имао најбоље карактеристике у истом погледу, успешно су формирали мешовити биофилм који је показивао отпорност према тестираним металима у рангу отпорности појединачних микроорганизама. За Hg^{2+} је то била *R. mucilaginosa*, а за Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} је то био ранг отпорности *E. cloacae*. Овај мешовити биофилм није био најотпорнији према тестираним металима. Продукција биофилмова изолата из отпадних вода постројења Цветојевац на АМВ Media носачима била је иста и у одсуству и у присуству тешких метала. Да је мешовити биофилм отпорнији на антимикробни третман у поређењу са индивидуалним биофилмом потврдило је неколико студија (Burmølle et al., 2006; Kara et al., 2006; Al-Bakri et al., 2005; Leriche et al., 2003). Golby и сар. (2014) су испитивали толеранцију мешовитог биофилма. Њихова истраживања показују да је бактеријски мешовити биофилм изузетно отпоран на дејство тестираних метала, што поткрепљује нашу студију (Табела 13).

Бољу способност уклањања тешких метала након десет дана показали су мешовити биофилмови у поређењу са индивидуалним биофилмовима на шта указују и други аутори (Golby et al., 2014). Највећи проценат уклањања метала из подлоге од стране свих биофилмова уочен је за Cu^{2+} (V дан за све биофилмове проценат уклањања је преко 97%, X дан преко 98%). Уклањање кадмијума, олова и живе, најбоље врши мешовити биофилм *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera* (99.03, 99.14 и 99.03%). Способност уклањања Ni^{2+} је била од 96.8% V дан од стране *S. odorifera*, до 98,47% X дан од стране биофилма *K. oxytoca*. Мешовити биофилм *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* уклања Cu^{2+} са ефикасношћу од 99.04% V дан и 99.18% за X дан. Исто тако значајан резултат показује и биофилм кога граде *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera* за уклањање Pb^{2+} (98.06% – V дан, 99.14% – X дан). За уклањање цинка, најбоље резултате показао је биофилм *E. cloacae* (99.11%).

Изолати из постројења за пречишћавање ФИАТа такође показују да форма биофилма микроорганизама који га је формирао, у односу на њихов планктонски фенотип, је знатно отпорнија и на присуство свих тестираних аутобоја. Већина микроорганизама у форми планктона показује значајну отпорност на присуство разређивача за испирање боје (Табела 19) и делимично белој боји (Табела 22), док највећу осетљивост показује према разређивачу и, у већој мери, ка металик црвеној боји (Табела 21). У форми биофилма највећу отпорност микроорганизми испољавају према основној боји прајмеру (Табела 18). Не уочава се разлика у деловању аутобоја ни код једног микроорганизама понаособ.

Флуоресцентна микроскопија је показала да биофилм *S. cerevisiae* PMFKG-F6 и биофилм *S. cerevisiae* PMFKG-F7 не продукују ЕПС у присуству основне боје – прајмера (Слика 25), као и биофилмови *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, *C. utilis* PMFKG-F9, *S. cerevisiae* PMFKG-F6 и *S. cerevisiae* PMFKG-F7 у присуству беле боје (Слике 29e-h).

У одређеним деловима ЕПС-а примећена је значајна активност хидролитичких ензима. Матрица биофилма делује као спољни систем за варење, задржавајући изванћелијске ензиме у близини ћелија биофилма, способне да метаболишу растворене, колоидне и чврсте биополимере. Зато је у овој дисертацији један део истраживања посвећен ензимској активности тестираних микроорганизама, како бисмо сазнали да ли ови микроорганизми имају метаболички и физиолошки потенцијал да буду одговорни за одређену биолошку разградњу.

У присуству тест супстанци скоро сви микроорганизми продукују протеине. У присуству А-F107486-FH активност хидролитичких ензима микроорганизама је углавном слаба. Само је активност алкалне протеазе измерена код већине микроорганизама, као и код А-F107117-CP. У присуству А-F107107-FM активност испитиваних хидролитичких ензима била је у великој мери потпуно инхибирана. А-F107119-CN инхибира већину активности хидролитичких ензима са изузетком алкалне фосфатазе (β -глицерофосфат). Активност алкалне протеазе код микроорганизама у присуству А-F107137-MF је била потпуно инхибирана, изузев *C. utilis* PMFKG-F9 код које је била веома изражена (0.219 IU/mL). За разлику од активности киселе инвертазе која је била инхибирана, активност алкалне инвертазе је забележена код већине микроорганизама. Оба соја *E. coli* су показала најбољу алкално фосфатазну активност у присуству А-F107137-MF, при чему се може претпоставити да би ове врсте имале позитивну улогу у разлагању масноћа у отпадним водама. *R. mucilaginosa* је показала највећу алкално фосфатазну активност у присуству А-F107119-CN, као и *C. cladosporioides*. Код врсте *P. expansum* је забележена алкално фосфатазна активност (β -glicerofosfat) у присуству А-F107107-FM. Добре протеазне активности забележене су за *C. utilis* и оба соја *E. coli*. У присуству А-F107117-CP једино је мешовити биофилм показао кисело инвертазну активност. Резултати су показали да присуство свих тестираних супстанци потпуно инхибира ензимску активност мешовите културе, изузев протеазне активности која је била јако слаба.

Истраживање ензимске активности тестираних микроорганизама указује на могућност да ови микроорганизми заиста имају метаболички и физиолошки потенцијал да буду одговорни за биолошку разградњу испитиваних супстанци. У одређеним деловима ЕПС-а примећена је значајна активност хидролитичких ензима. Велики број цитоплазматских протеина у неким деловима у ЕПС-у указује или на стварање ванћелијских мембранских везикула или на лизу ћелија током развоја биофилма (Jachlewski et al., 2015).

Ефикасност у уклањању полутаната је условљена катаболичким генима и ензимима (Khomenikov et al., 2008). Да би се апсорбоване супстанце разградиле, екстрацелуларни ензими делују на супстанцу при чему долази до биоразградње, што доприноси процесима самопречишћавања. Сматра се да се у оквиру матрикса, а помоћу ензима, врши рециклирање при чему се као крајњи производ добијају хранљиве материје које обезбеђују опстанак микроорганизама (Decho, 2000). Резултати ове дисертације указују на способност микроорганизама да формирају биофилм индивидуално и у комбинацији у присуству тестираних метала и аутобоја. На основу података о микроорганизмима који настајују одређену животну средину, као и на основу механизма детоксикације које микроорганизми у биофилму користе за повећање њихове отпорности и смањење токсичности загађујућих материја, могуће је развити ефикасне, еколошки прихватљиве и економски исплативе биофилтре за уклањање циљних полутаната из околине. Ово истраживање је спроведено у лабораторијским условима и потребно је наставити га у постројењима како би се применило у третману отпадних вода.

6. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата добијених у овом истраживању, може се закључити следеће:

Највећи број изолованих и идентификованих микроорганизама из оба типа отпадних вода (комуналне отпадне и индустријске воде) су показали способност формирања биофилмова. Издвојени су микроорганизми који су најефикасније уклањали органска и неорганска једињења и установљене су најуспешније комбинације микроорганизама за уклањање истих

А) Испитивање идентификованих изолата из комуналне отпадне воде и тестирање њихове способности да уклањају тешке метале изведено у полистиренским плочама и модификованом методологијом на АБМ медиа носачима дало је следеће резултате:

1. Код идентификованих изолата из комуналних отпадних вода најбоља продукција биофилма забележена је код *Enterobacter cloacae* PMFKG-CV3, *Serratia odorifera* PMFKG-CV7, *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-CV10 и *Klebsiella oxytoca* PMFKG-CV4).
2. Исти изолати су показали и највећу отпорност у присуству изабраних тешких метала.
3. Исти изолати су успешно формирали мешовите биофилмове (са изузетком *E. cloacae/S.odorifera/S. cerevisiae* који је имао најслабију продукцију, док су врсте које га изграђују показале значајно већи потенцијал појединачно), како у полистиренским плочама тако и модификованом методологијом на АБМ медиа носачима.
4. Највећу отпорност у присуству свих тестираних метала показао је мешовити биофилм *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae*.
5. Мешовити биофилмови су показали бољу способност уклањања тешких метала из раствора у односу на индивидуалне.
6. Бакар је од тестираних метала био најефикасније уклањан а најбољи је био биофилм *K. oxytoca/S. odorifera/S. cerevisiae* (99.19%).
7. Кадмијум, олово и живу је најбоље уклањао биофилм *E. cloacae/K. oxytoca/S. odorifera* (99.03, 99.14 и 99.03%).
8. Никл је одстрањиван из раствора најуспешније посредством биофилма *K. oxytoca*.
9. За уклањање цинка најбоље резултате показао је биофилм *E. cloacae* (98.06%) и то је први пут да се овај микроорганизам ефикасно користи у ове сврхе.
10. Највећу отпорност према тешким металима у планктонској форми показала су два соја *Escherichia coli* PMFKG-CV1 и CV2.
11. На микроорганизме у планктонској форми најмање утиче олово, а највише бакар и жива, са изузетком изолата *Candida utilis* PMFKG-CV11.

Б) Испитивање и тестирање лабораторијских изолата из колекције Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ради поређења, дало је следеће резултате:

1. Комерцијални пробиотик *Saccharomyces bulardii* није показао способност да формира биофилм, а у планктонској форми је показао отпорност једино у присуству Pb^{2+} и Zn^{2+} .
2. Планктонске ћелије *Rhodotorula mucilaginosa* су најотпорније у присуству Cu^{2+} , Cd^{2+} и Zn^{2+} .

3. *R. mucilaginosa* поседује способност за формирање биофилма који је показао отпорност у присуству свих тестираних метала.
4. *R. mucilaginosa* показује и способност формирања мешовитог биофилма са *Escherichia coli* LM1 и овај биофилм је отпорнији на утицај тешких метала од индивидуалних.
5. Резултати тестирања отпорности биофилмова су потврђени флуоресцентом микроскопијом.
6. Индивидуални биофилмови, као и мешовити, показују изузетно велики биосорпциони потенцијал, али је количина апсорбованих метала код индивидуалних биофилмова само незнатно мања у односу на мешовити.
7. Од изолата из комуналне отпадне воде са најбољим карактеристикама *E. cloacae* и лабораторијског изолата *R. mucilaginosa* направљен је мешовити биофилм, али његова отпорност ка тестираним металима била је у рангу активности биофилмова индивидуалних микроорганизама.

Ц) Испитивање и тестирање поновљено је, а у неким аспектима и проширено, на изолатима из отпадних вода индустрије. Тестирана је њихова способност да уклањају комерцијалне аутоиндустријске боје. Тестирање је изведено у полистиренским плочама и модификованом методологијом на АБМ медиа носачима, као и код тестирања са тешким металима и оно дало је следеће резултате:

1. Већи број идентификованих изолата успешно формира биофилмове.
2. Микроорганизмима са најбољом продукцијом биофилма (*Escherichia coli* PMFKG-F1, PMFKG-F2, *Proteus vulgaris* PMFKG-F3, *P. mirabilis* PMFKG-F4, *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-F6, PMFKG-F7, *Rhodotorula mucilaginosa* PMFKG-F8, *Candida utilis* PMFKG-F9, *Cladosporium cladosporioides* PMFKG-F-11, *Penicillium variotii* PMFKG-F12, *P. chrisogenum* PMFKG-F13 и *P. expansum* PMFKG-F14) је одређен степен отпорности према аутобојама.
3. Већина тестираних микроорганизама у форми биофилмова су показали значајно већу отпорност у присуству свих тестираних супстанци у односу на планктонске ћелије.
4. Резултати тестирања отпорности биофилмова код бактерија и квасаца потврђени су флуоресцентном микроскопијом и истом методом је омогућен увид у присуство живих ћелија и присуство или одсуство ЕПС-а
5. Резултати испитивања синтезе деградационих ензима, кроз спектрофотометријско одређивање концентрације протеиназа, активности алкалне фосфатазе и липазе показали су да сви тестирани биофилмови имају слабе ензимске активности.
6. Оба соја *E. coli* показују најбољу алкално фосфатазну активност у присуству А-F107137-MF, што указује на могућност да разлажу масти у отпадним водама.
7. *R. mucilaginosa* показује највећу алкално фосфатазну активност у присуству А-F107119-CN, као и *C. cladosporioides*.
8. *P. expansum* има највећу алкално фосфатазна активност (β -glicerofosfat) у присуству А-F107107-FM. Добре протеазне активности забележене су за *C. utilis* и оба соја *E. coli*.
9. У присуству А-F107117-CP само мешовити биофилм показује кисело инвертазну активност.
10. Остале ензимске активности су биле слабе или их није ни било.

Из спроведеног истраживања може се закључити да различите врсте аутохтоних

микроорганизама из отпадних вода, у форми појединачног и/или мешовитих биофилмова, имају значајно већи потенцијал од планктонске форме исте врсте у отклањању различитих органских или неорганских полутаната, као и потенцијал за пречишћавање отпадних вода различитог порекла. Ово истраживање указује и на могући потенцијал неких изолата из природе, који нису аутохтони на местима загађења тестираних супстанци, а који такође могу ефикасно послужити у исте сврхе. Коришћена модификована методологија на АБМ медиа носачима је адекватна за оваку врсту испитивања, јер балансира између потребне лабораторијске прецизности и применљивости у реалним оквирима. Овако модификована методологија може да се примени на различитим отпадним водама. Све наведено указује на потенцијал за даљу примену у процесима пречишћавања отпадних вода.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Wassie, M. (2017). The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology.*, 2(1), 030-046.
2. ABS (Australian Bureau of Statistics). (2006). *Water Account Australia*. Report no. 4610.0. Australian Bureau of Statistics. Commonwealth of Australia. <http://www.abs.gov.au>.
3. Adam, B., Baillie, G.S., Douglas, L.J. (2002a). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*. 5, 344-349.
4. Adam, C., Gnirss R., Lesjean, B., Buisson, H. Kraume, M. (2002b). Enhanced biological phosphorus removal in membrane bioreactors. *Water Science and Technology*. 46, 281-286.
5. Adams, G.O., Tawari-Fufeyin, P., Okoro, S.E., Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*. 3. 28-39. 10.12691/ijebb-3-1-5.
6. Agrawal, N., and Shahi, S. K. (2015). An environmental cleanup strategy-microbial transformation of xenobiotic compounds. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(4), 429-461.
7. Ahmed, F., Bibi, M.H., Fukushima, T., Seto, K., Ishiga, H. (2011). Recent sedimentary environment of coastal lagoon in southwestern Japan: evidence from major and trace elements. *Environ Monit Assess*. 173, 167-80.
8. Aislabie, J., Saul, D.J., Foght, J.M. (2006). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soil. *Extremophiles*. 10, 171–179.
9. Al-Bakri, A.G., Gilbert, P., Allison, D.G. (2005). Influence of gentamicin and tobramycin on binary biofilm formation by co-cultures of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Basic Microbiol*. 45, 392–396.
10. Aleksander, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
11. Al-Enzi, R.M., Al-Charrakh, A.H. (2015). Heavy Metals Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical and Environmental Sources in Hilla City. *Medical Journal of Babylon*. 10, 110-119.
12. Al-Garni, S., Ghanem, K., Bahobail, A. (2009). Biosorption characteristics of *Aspergillus fumigatus* in removal of cadmium from an aqueous solution. *African Journal of Biotechnology*. 8, 4163-4172.
13. Ali, U., Mudasir, S., Farooq, S., Nazir, R. (2015). Factors Affecting Bioremediation. *Journal of Research and Development*. 15, 102-109. ISSN 0972-5407.
14. Ali Redha, A. (2020). Removal of heavy metals from aqueous media by biosorption. *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*, 27(1), 183-193.
15. Allen, R. J. L. (1940). The estimation of phosphorus. *Biochem. J*. 34, 858-865.
16. Alluri, H. K., Ronda, S. R., Settalluri, V. S., Bondili, J. S., Suryanarayana, V., Venkateshwar, P. (2007). Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *African journal of Biotechnology*, 6(25), 2924-2931.
17. Almeida, C., Azevedo, N.F., Santos, S., Keevil, C.W., Vieira, M.J. (2011). Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH). *PLoS One*. 6, e14786.
18. Alotaibi, G.F., Bukhari, M.A. (2021). Factors Influencing Bacterial Biofilm Formation and Development. *Am. J. Biomed. Sci. & Res*. 12(6). DOI: 10.34297/AJBSR.2021.12.001820.

19. Altenburger, P., Kampferb, P., Makristathis, A., Lubitz, W., Busse, H.J. (1996). Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *J. Biotech.* 47(1), 39-52.
20. An, D., Danhorn, T., Fuqua, C., Parsek, M.R. (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *P Natl Acad Sci USA*. 103, 3828–3833.
21. Andreoni, V., Gianfreda, L. (2007). Bioremediation and monitoring of aromatic polluted habitats. *Appl Microbiol Biotechnol*. 76, 287-308.
22. Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48, 5-14.
23. Anson, M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol*. 20, 79-89.
24. Arnosti, C. (1996). A new method for measuring polysaccharide hydrolysis rates in marine environments. *Organic Geochemistry*. 25, 105-115
25. Assress, H. A., Selvarajan, R., Nyoni, H., Ntushelo, K., Mamba, B.B., Msagati, T. A. (2019). Diversity, co-occurrence and implications of fungal communities in wastewater treatment plants. *Scientific reports*. 9(1), 14056. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50624-z>.
26. Atlas, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev*. 45, 180-209.
27. Atlas, R.M., Bartha, R., Atlas, D. (1998). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Benjamin/Cummings.
28. Azadi, D., Shojaei, H., Mobasherizadeh, S., Naser, A.D. (2017). Screening, isolation and molecular identification of biodegrading mycobacteria from Iranian ecosystems and analysis of their biodegradation activity. *AMB Express*. 7(1), 180. doi: 10.1186/s13568-017-0472-4.
29. Bai, J., Li, Z., Fan, F., Wu, X., Tian, W., Yin, X., Zhao, L., Tian, L., Wang, Y, Qin, Z., Guo, J. (2014). Biosorption of uranium by immobilized cells of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 299(3), 1517-1524.
30. Bai, J., Yao, H., Fan, F., Lin, M., Zhang, L., Ding, H., Fuan, L., Wu, X., Li, X., Guo, Z., Qin, Z. (2010). Biosorption of uranium by chemically modified *Rhodotorula glutinis*. *Journal of environmental radioactivity*, 101(11), 969-973.
31. Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Methods*. 32, 155-164.
32. Barkusaraey, F.H., Mafigholami, R., Faezi Ghasemi, M., Khayati G. (2020). Isolation and Identification of Resistant Microorganisms from Automotive Paint Sludge. *Jundishapur J. Health Sci*. 12(2):e101226. doi: 10.5812/jjhs.101226.
33. Basak, G., Lakshmi, V., Chandran, P., Das, N. (2014). Removal of Zn (II) from electroplating effluent using yeast biofilm formed on gravels: batch and column studies. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 12, 1-11.
34. Becker, P., Hufnagle, W., Peters, G., Herrmann M. (2002). Detection of different gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using microrepresentational-difference analysis. *Appl Environ Microbiol*. 67, 2958-2965.
35. Berlanga, M., Guerrero, R. (2016). Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Fact*. 15, 165 <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>
36. Beściak, G.J., Surmacz-Górska, J. (2011). Biofilm as a basic life form of bacteria. *Proceedings of a Polish-Swedish-Ukrainian seminar*. Krakow Poland, October 17-19.

- Research and application of new technologies in wastewater treatment and municipal solid waste disposal in Ukraine, Sweden and Poland (Eds. E. Plaza, E. Levlin) .TRITA-LWR.REPORT 3031.
37. Bhatia, R.K., Sakhuja, D., Mundhe, S., Walia, A. (2020). Renewable Energy Products through Bioremediation of Wastewater. Sustainability. 12, 7501; doi:10.3390/su12187501.
 38. Bhattacharya, R., Mazumder, D. (2021). Simultaneous nitrification and denitrification in moving bed bioreactor and other biological systems. Bioprocess and Biosystems Engineering. 44, 635-652. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02475-6>
 39. Bjarsholt, T., Jensen, P.O., Jakobsen, T.H. (2010). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. PLoS One. 5: e10115. doi:10.1371/journal.pone.0010115.
 40. Bogachev, M. I., Volkov, V. Y., Markelov, O. A., Trizna, E. Y., Baydamshina, D.R., Melnikov, Murtazina R.R., Zelenikhin P.V., Sharafutdinov I. Z., Kayumov, A.R. (2018). Fast and simple tool for the quantification of biofilm-embedded cells sub-populations from fluorescent microscopic images. PLoS One, 13(5), e0193267.
 41. Bogachev, M.I., Volkov, V.Y., Markelov, O.A., Trizna, E.Y., Baydamshina, D.R., Melnikov, V., Murtazina, R.R., Zelenikhin, P.V., Shafutdinov, I.S., Kayumov, A.R. (2018). Fast and simple tool for the quantification of biofilm-embedded cells sub-populations from fluorescent microscopic images. PLoS One, 13(5), e0193267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193267>.
 42. Bojsen, R.K., Andersen, K.S., Regenber B. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* – a model to uncover molecular mechanisms for yeast biofilm biology. FEMS Immunol Med Microbiol. 65(2), 169-82. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00943.x.
 43. Boon, C., Deng, Y., Wang, L.H. (2008). A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. ISME J. 2, 27-36.
 44. Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. Bioresour. Technol. 74, 63-67.
 45. Booth, S.C., Workentine, M.L., Wen, J., Shaykhutdinov, R., Vogel, H.J., Ceri, H., Turner, R.J., Weljie, A.M. (2011). Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress. Journal of proteome research. 10, 3190-3199.
 46. Brading, M.G., Jass, J., Lappin-Scott, H.M. (2003). Dynamics of bacterial biofilm formation U: Microbial biofilms (ed Lappin-Scott H M, Costerton J W) Cambridge University Press.
 47. Brady, D., and Duncan J. R. (1994). Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. 41, 149-154.
 48. Bravery A.F. (1988). Biodeterioration of Paint-a State-of-the-Art comment. U: Biodeterioration, vol. 7 (Eds. D.R. Houghton, R.N. Smith, H.O.W. Eggings). Elsevier Applied Science, New York. pp. 466-485.
 49. Broeker, J., Mechelke, M., Baudrexel, M., Mennerich, D., Hornburg, D., Mann, M., Schwarz, W.H., Liebl, W., Zverlov, V.V. (2018). The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. Biotechnol Biofuels. 11, 229. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1228-3>.
 50. Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and environmental safety. 45, 198-207.
 51. Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sorensen, S.J., Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and

- bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 72, 3916-3923.
52. Butler, C.S., Boltz, J.P. (2014). Biofilm Processes and Control in Water and Wastewater Treatment. In: *Comprehensive Water Quality and Purification* (Ed. Ahuja S.), vol. 3, pp. 90-107. United States of America: Elsevier.
 53. Buzejić, A., Grujić, S., Radojević, I., Ostojić, A., Čomić, L., Vasić, S. (2016). Pb and Hg heavy metal tolerance of single-and mixed-species biofilm (*Rhodotorula mucilaginosa* and *Escherichia coli*). *Kragujevac Journal of Science.* 38, 115-124.
 54. Cai, Y.M. (2020). Non-surface Attached Bacterial Aggregates: A Ubiquitous Third Lifestyle. *Frontiers in Microbiology.* 11, 3106. DOI=10.3389/fmicb.2020.557035. ISSN=1664-302X.
 55. Camarillo-Márquez, O., Córdova-Alcántara, I.M., Hernández-Rodríguez, C.H., García-Pérez, B.E., Martínez-Rivera, M.A., Rodríguez-Tovar, A.V. (2018). Antagonistic interaction of *Staphylococcus aureus* toward *Candida glabrata* during in vitro biofilm formation is caused by an apoptotic mechanism. *Frontiers in microbiology.* 9:2031. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02031.
 56. Cannon, R.D., Chaffin, W.L. (1999). Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10, 359–383.
 57. Cardozo, M. (2015). Soil bacterial communities are shaped by temporal and environmental filtering: Evidence from a long-term chronosequence. *Environ. Microbiol.* 17, 3208-3218.
 58. Cavalca, L., Dell'Amico, E., Andreoni, V. (2004). Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64, 576-87.
 59. Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of clinical microbiology.* 37, 1771-1776.
 60. Cerniglia, C.E., Sutherland, J.B. (2001). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. Y: Gadd GM (Ed) *Fungi in Bioremediation*. British Mycological Society, Cambridge University Press. pp 136–187.
 61. Chatterjee, S., Chatterjee, N.C., Sikha, D. (2012). Bioreduction of chromium (VI) to chromium (III) by a novel yeast strain *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC 9315). *Afr. J. Biotechnol.* 11, 14920-14929.
 62. Chen, S.H., Cheow, Y.L., Ng, S.L., Ting, A.S.Y. (2020). Bioaccumulation and biosorption activities of indoor metal-tolerant *Penicillium simplicissimum* for removal of toxic metals. *International Journal of Environmental Research.* 14, 235-242.
 63. Chin, W.C., Orellana, M.V., Verdugo, P. (1998). Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature.* 391, 568.
 64. Cho, D.H., Chae, H.J., Kim, E.Y. (2001). Synthesis and characterization of a novel extracellular polysaccharide from *Rhodotorula glutinis*. *Appl Biochem Biotechnol.* 95, 183–193.
 65. Chu, H., Fierer, N., Lauber, C.L., Caporaso, J.G., Knight, R., Grogan, P. (2010). Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ. Microbiol.* 12, 2998–3006.
 66. Ciferri O. Microbial degradation of paintings. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(3):879-885. doi:10.1128/AEM.65.3.879-885.1999.
 67. Coelho, L. M., Rezende, H. C., Coelho, L. M., de Sousa, P. A., Melo, D. F., Coelho, N. M. (2015). Bioremediation of polluted waters using microorganisms. *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*, 10, 60770. DOI: 10.5772/60770.

68. Cohn, S., Hayes, A., Renault, K. (2010). The Effect of Substrate Variation on Biofilm Growth for Use in Wastewater Treatment (project number: TAC-MQP-FR20). Worcester Polytechnic Institute. <https://web.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-040810-131800/unrestricted/SCohnAHayesKRenaultMQP.pdf>.
69. Cojocaru, C., Diaconu, M., Cretescu, I., Savić, J., Vasić, V. (2009). Biosorption of copper (II) ions from aqua solutions using dried yeast biomass. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 335, 181-188.
70. Conrad, C.F., Fugate, D., Daus, J., Chisholm-Brause, C.J., Kuehl, S.A. (2007). Assessment of the historical trace metal contamination of sediments in the Elizabeth River. Virginia. *Mar Pollut Bull*. 54, 385-95.
71. Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am*. 238, 86-95.
72. Curtis, T.P., Sloan, W.T., and Scannell, J.W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99, 10494-10499.
73. Daane, L.L., Harjono, I., Zylstra, G.J., Haggbloom, M.M. (2001). Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl Environ Microbiol*. 67, 2683-91.
74. Daddi Oubekka, S., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M.P., Steenkeste, K. (2012). Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 56(6), 3349-3358. doi: 10.1128/AAC.00216-12.
75. Danks, D. (1988). Copper deficiency in humans. *Annual review of nutrition*. 8, 235-257.
76. Dar, S.A., Kuenen, J.G., Muyzer, G. (2005). Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulphate reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl Environ Microb*. 71, 2325-2330.
77. Das, N., Basak, G., Lakshmi, V., Salam, J. A., Evy Alice Abigail, M. (2012). Application of Biofilms on Remediation of Pollutants—An Overview. *Journal of Microbiology & Biotechnology Research*. 2(5).
78. Das, N., Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol. Res. Int.* doi:10.4061/2011/941810.
79. de Araújo, L.C.A., de Oliveira M.B.M. (2019). Effect of Heavy Metals on the Biofilm Formed by Microorganisms from Impacted Aquatic Environments. In *Bacterial Biofilms*, IntechOpen. Sadik Dincer, Melis Sümengen Özdenefe and Afet Arkut, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.89545.
80. De Wit, R., Bouvier, T. (2006). 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental microbiology*. 8, 755-758.
81. Decho, A.W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*. 20, 1257-1273.
82. Decho, A.W., Gutierrez, T. (2017). Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPSs) in Ocean Systems. *Front. Microbiol*. 8:922. doi: 10.3389/fmicb.2017.00922.
83. Dell'Anno, F., Brunet, C., van Zyl, L.J., Trindade, M., Golyshin, P. N., Dell'Anno, A., Ianora, A., Sansone, C. (2020). Degradation of Hydrocarbons and Heavy Metal Reduction by Marine Bacteria in Highly Contaminated Sediments. *Microorganisms*. 8(9), 1402. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091402>.
84. di Biase, A., Kowalski, M. S., Devlin, T. R., Oleszkiewicz, J. A. (2019). Moving bed biofilm reactor technology in municipal wastewater treatment: a review. *Journal of environmental management*. 247, 849-866.

85. Ding, C., Cheng, W., Nie, X. (2019). Chapter 3 – Microorganisms and radionucleides. In: Emerging Natural and Tailored Nanomaterials for Radioactive Waste Treatment and Environmental Remediation, Principles and Methodologies (Ed. Chen, C.). Book series Interface Science and Tecnology, Vol. 29. Elsevier Ltd. 107-139.
86. Direktiva 2000-60-EC (2000). Integralni prevod Direktive Evropskog Parlamenta i Saveta 2000/60/EC o uspostavljanju okvira za delovanje zajednice u oblasti politike voda.<http://www.rdvode.gov.rs/doc/dokumenta/direktive-eu/1.%20Direktiva%20o%20vodama%202000-%20tekst%20i%20anex%20I-X-prec.tekst.pdf>
87. Dong, H. (2010). Mineral-microbe interactions: a review. *Frontiers of Earth Science in China*. 4, 127-147.
88. Donian, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8, 881-890.
89. Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*. 15, 167-193.
90. Dönmez, G., and Aksu, Z. (2001). Bioaccumulation of copper (II) and nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. *Water Research*. 35, 1425-1434.
91. Donné, J., and Dewilde, S. (2015). The challenging world of biofilm physiology. *Advances in microbial physiology*. 67, 235-292.
92. Donoso, N., van Oirschot, D., Biswas, J.K., Michels, E., Meers, E (2019). Impact of Aeration on the Removal of Organic Matter and Nitrogen Compounds in Constructed Wetlands Treating the Liquid Fraction of Piggery Manure. *Appl. Sci*. 9, 4310; doi:10.3390/app9204310.
93. Dragoš, A., Kovács, Á.T. (2017). The Peculiar Functions of the bacterial Extracellular Matrix. *Trends in Microbiology*. 25(4), 257-266.
94. Duffus, J.H. (2002). „Heavy metals“ – a meaningless term? *Pure Appl. Chem*. 74(5), 793-807.
95. Edwards, S.J. Kjellerup, B.V. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Appl Microbiol Biotechnol* (2013) 97: 9909. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5216-z>
96. Ehrlich, H.L. (1997). Microbes and metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48, 687-692.
97. Elias, S., Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*. 36, 990-1004.
98. Elvers, K.T., Leeming, K., Lappin-Scott, H.M. (2002). Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 29, 331-338.
99. EPA/Serbia (1994). Službeni Glasnik: Regulation on the content of hazardous materials in soil and fresh water - Pravilnik o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje, Serbian Ministry of Environment.
100. Evanko, C.R., Dzombak, D.A. (1997). Remediation of metals-contaminated soils and groundwater, TE-97-01,. Ground-water remediation technologies analysis center.
101. Fadel, M., Hassanein, N. M., Elshafei, M. M., Mostafa, A. H., Ahmed, M. A., Khater, H. M. (2017). Biosorption of manganese from groundwater by biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Hbrc Journal*. 13(1), 106-113.
102. Fantroussi, S.I., Agathos, S.N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. *Curr. Opin. Microbiol*. 8, 268–275.

103. Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C. (2008). *In situ* bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresour Technol.* 99, 5296-308.
104. Federle, M.J. (2009). Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. *Contrib Microbiol.* 16, 18–32.
105. Filoche, S.K., Zhu, M., Wu, C.D. (2004). In situ biofilm formation by multi-species oral bacteria under flowing and anaerobic conditions. *J. Dent. Res.* 83, 802-806.
106. Flemming, H.C. (2016). EPS—Then and Now. *Microorganisms.* 4, 41.
107. Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D. (2007). The EPS matrix: The house of biofilm cells. *J. Bacteriol.* 8, 623
108. Flemming, H.C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
109. Flemming, H.C., Wingender, J., Kjelleberg, S., Steinberg, P., Rice, S., Szewzyk, U. (2016a). Biofilms: An emergent form of microbial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563-575.
110. Fothergill, A.W. and McGough, D.A. (1995). In vitro antifungal susceptibility testing of yeasts. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol. 1 (Isenberg HD & Hindler J, eds), ASM Press, Washington, DC.
111. Frankland, A. (1869). Summary of weakly return of birth, death and causes of death in London during the year 1868. Eyre and Spottisweek, London.
112. Fried, J., Mayr, G., Berger, H., Traunspurger, W., Psenner, R., Lemmer, H. (2000). Monitoring protozoa and metazoa biofilm communities for assessing wastewater quality impact and reactor up-scaling effects. *Water Science and Technology.* 41, 309-316.
113. Fu, F. and Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *J Environ Manage.* 92, 407-418.
114. Gadd, G.M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma.* 122, 109-119.
115. Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology.* 156, 609-643.
116. Gajin, S., Knežević, P., Radnović, Đ., Čanadi, J., Nikolić, A., Agbaba, J., Petrović, O., Karaman, M., Simeunović, J., Ivančev-Tumbas, I., Dalmacija, B., Rončević, S., Karlović, E., Markov, S., Bečelić, M., Ugarčina, S., Tričković, J., Bokorov, M., Maletić, S., Krčmar, D., Tubić, A., Tamaš, Z., Veličanski, S.A., Cvetković, D., Pešić, V. (2007). *Voda i biofilm*. Prirodno matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad.
117. Garza-Gonzalez, M.T., Perez, D.B., Rodriguez, A.V., Garcia-Gutierrez, D.I., Zarate, X., Cardenas, M.E.C., Medina-Ruiz, P. (2016). Correction: Metal-Induced Production of a Novel Bioadsorbent Exopolysaccharide in a Native *Rhodotorula mucilaginosa* from the Mexican Northeastern Region. *PloS one.* 11, doi: 10.1371/journal.pone.0150522
118. Ghomi Avili R, Takdastan A, Atabi F, Omrani G A. Feasibility Study of Chromium Removal from Paint Sludge with Biological Sludge, Using Vermicompost by *Eisenia fetida* (Case Study: Saipa Automotive Industry), *Jundishapur J Health Sci.* 2018; 10(3):e78891. doi: 10.5812/jjhs.78891.
119. Ghorbani, N., Watson, P. J., & Hargis, M. B. (2008). Integrative Self-Knowledge Scale: Correlations and incremental validity of a cross-cultural measure developed in Iran and the United States. *The Journal of Psychology.* 142(4), 395-412.

120. Ghosh, S.K., Ghosh, S., Gachhui, R., and Mandal, A. (2006). Mercury and organomercurial resistance in *Rhodotorula rubra*: Activation of glutathione reductase. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 77, 351-358.
121. Golby, S., Ceri, H., Marques, L.L., Turner, R.J. (2014). Mixed-Species Biofilms Cultured from an Oil Sand Tailings Pond can Biomineralize Metals. *Microbial ecology*. 68, 70-80.
122. Goldstein, A.H., Galbally, I.E. (2007). Known and Unexplored Organic Constituents in the Earth's Atmosphere. *Environ. Sci. & Tech.* 41(9): 1515-1521.
123. Golyshin, P.N., Martins Dos Santos, V.A., Kaiser, O., Ferrer, M., Sabirova, Y.S., Lunsdorf, H., Chernikova, T.N., Golyshina, O.V., Yakimov, M.M., Puhler, A., Timmis, K.N. (2003). Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. *J Biotechnol.* 106, 215-20.
124. Gorbushina, A.A., Heyrman, J., Dornieden, T., Gonzalez-Delvalle, M., Krumbein, W.E., Laiz, L., Petersen, K., Saiz-Jimenez, C., Swings, J. (2004). Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany). *Int. Biodeter. Biodegr.* 53, 13-24.
125. Goswami, M., Chakraborty, P., Mukherjee, K., Mitra, G., Bhattacharyya, P., Dey, S., Tribedi, P. (2018). Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. *J. Microbiol. Exp.* 6(5), 223-231.
126. Greenberg, A.E., Trussell, R.R., Clesceri, L.S. (1985). *Standard Methods for the Examination of Water and Waste ater*, 16th edn. Am. Pub. Health Assoc., Washington, DC.
127. Grujić, S., Vasić, S., Čomić, L., Ostojić, A., Radojević, I. (2017). Heavy metal tolerance and removal potential in mixed-species biofilm. *Water Science and Technology*. 76(4), 806-812.
128. Hadiani, M. R., Darani, K. K., Rahimifard, N., Younesi, H. (2018). Biosorption of low concentration levels of Lead (II) and Cadmium (II) from aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*: Response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 15, 25-34.
129. Hall-Stoodley, L. Stoodley, P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 13, 7-10.
130. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2, 95-108.
131. Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiology*. 11, 1034-1043.
132. Han, Z., Wang, J., Zhao, H., Tucker, M. E., Zhao, Y., Wu, G., Zhou, J., Zhang, H., Zhang, X., Yan, H. (2019). Mechanism of Biomineralization Induced by *Bacillus subtilis* J2 and Characteristics of the Biominerals. *Minerals*. 9(4), 218. <https://doi.org/10.3390/min9040218>.
133. Haque, M. M., Hirata, H., Tsuyumu, S. (2012). Role of PhoP-PhoQ two-component system in pellicle formation, virulence and survival in harsh environments of *Dickeya dadantii* 3937. *J. Gen. Plant Pathol.* 78, 176–189. doi: 10.1007/s10327-012-0372-z.
134. Harrison, J.J., Ceri, H., Roper, N.J., Badry, E.A., Sproule, K.M., Turner, R.J. (2005b). Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 151, 3181-3195.
135. Harrison, J.J., Ceri, H., Stremick, C., Turner, R.J. (2004b). Differences in biofilm and planktonic cell mediated reduction of metalloloid oxyanions. *FEMS microbiology letters*. 235, 357-362.

136. Harrison, J.J., Ceri, H., Stremick, C.A. Turner, R.J. (2004a). Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environmental Microbiology*. 6, 1220-1227.
137. Harrison, J.J., Ceri, H., Turner, R.J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 928-938.
138. Harrison, J.J., Rabiei, M., Turner, R.J., Badry, E.A., Sproule, K.M., Ceri, H. (2006). Metal resistance in *Candida* biofilms. *FEMS microbiology ecology*. 55, 479-491.
139. Harrison, J.J., Turner, R.J., Ceri, H. (2005a). High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC microbiology*. 5, 53.
140. Harshman, V., Barnette, T. (2010). Wastewater Odor Control: An Evaluation of Technologies [online]. Available from: <http://www.wwdmag.com/Wastewater-Odor-Control-An-Evaluation-of-Technologies-article1698>.
141. Hausner, M., Wuertz, S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3710-3713.
142. Hawser, S.P., Douglas, L.J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun*. 62, 915-921.
143. Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Ruegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber, F., Egli, T., Mau, M., Schlomann, M., Brennerova, M., Brenner, V., Pieper, D.H., Top, E.M., Dejonghe, W., Bastiaens, L., Springael, D. (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J. Microbiol. Methods*. 64, 250-265.
144. Hense, B.A., Kuttler, C., Muller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., Kreft, J.U. (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 230-239.
145. Henze, M., Herremoë, P. (2002). *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*. 3rd ed. New York: Springer.
146. Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 35, 322-332.
147. Holan, Z. R., Volesky, B. (1994). Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnology and bioengineering*. 43(11), 1001-1009.
148. Horakova, D.M.V., Nemeč, M. (2000). RC1 Consortium for soil decontamination: Its preparation and use. U: *Remediation engineering of contaminated soils* (Eds. Wise, D.L., Stottmeister, U., Inyang, H.I., Cichon, E.J., Trantolo, D.J.). Marcel Dekker Inc, New York. 357-372.
149. Hoyle, B. D., Wong, C. K., Costerton, J. W. (1992). Disparate efficacy of tobramycin on Ca²⁺-, Mg²⁺-, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Canadian journal of microbiology*. 38(11), 1214-1218.
150. Huang, H., Ye, L. (2020). Chapter 9 - Biological technologies for cHRPs and risk control. U: *High-Risk Pollutants in Wastewater* (Eds.: Hongqiang Ren, Xuxiang Zhang). Elsevier. 209-236. ISBN 9780128164488.
151. Igiri, B. E., Okoduwa, S. I., Idoko, G. O., Akabuogu, E. P., Adeyi, A. O., Ejiogu, I. K. (2018). Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: a review. *Journal of toxicology*. Vol. 2018. doi.org/10.1155/2018/2568038.
152. Ikuma, K., Decho, A. W., Lau, B. L.T. (2013). The Extracellular Bastions of Bacteria — A Biofilm Way of Life. *Nature Education Knowledge*. 4(2):2.
153. Ishfaq, S., Ali N., Tauseef, I., Khattak M.N.K., Shinwari, Z.K., Ali, M.I. (2015). Analysis of paint degradation by fungal and bacterial species. *Pak. J. Bot.* 47(2), 753-760.

154. Jachlewski S., Jachlewski, W.D., Linne, U., Bräsen, C., Wingender, J., Siebers, B. (2015). Isolation of extracellular polymeric substances from biofilms of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 3, no. 123. doi: 10.3389/fbioe.2015.00123
155. Jacobsen, S. M., Shirliff, M. E. (2011). *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*. 2(5), 460-465.
156. Jahid, I.K., Ha, S.D. (2014). The Paradox of Mixed-Species Biofilms in the Context of Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13, 990-1011.
157. Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*. 68, 167-182.
158. Jeremic, S., Beškoski, V. P., Djokic, L., Vasiljevic, B., Vrvic, M. M., Avdalović, J., Cvijović, G. G., Beškovski L. S., Nikodinovic-Runic, J. (2016). Interactions of the metal tolerant heterotrophic microorganisms and iron oxidizing autotrophic bacteria from sulphidic mine environment during bioleaching experiments. *Journal of environmental management*. 172, 151-161.
159. Jianlong, W., Hanchang, S.Yi.Q. (2000). Wastewater treatment in a hybrid biological reactor (HBR): effect of organic loading rates. *Process Biochemistry*. 36, 297–303.
160. Jørgensen, S.E. (2008). Biodegradation. U: *Encyclopedia of Ecology* (Eds. Sven Erik Jørgensen, Brian D. Fath). Academic Press. 366-367. ISBN 9780080454054. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00260-3>.
161. Juck, D., Charles, T., Whyte, L.G., Greer, C.W. (2000). Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol*. 33, 241-249.
162. Kamika, I., and Momba, M.N. (2013). Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC Microbiology*. 13, 1-14
163. Kan, G., Wang, X., Jiang, J., Zhang, C., Chi, M., Ju, Y., Shi, C. (2019). Copper stress response in yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AN 5 isolated from sea ice, Antarctic. *MicrobiologyOpen*. 8(3), e00657. doi: 10.1002/mbo3.657.
164. Kanaly, R.A., Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol*. 182, 2059-67.
165. Kapoor, A., Viraraghavan, T. (1995). Fungal biosorption — an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technology*. 5, 195-206.
166. Kara, D., Luppens, S.B., Cate, J.M. (2006). Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. *Eur. J. Oral Sci*. 114, 58-63.
167. Karpińska, J., Kotowska, U. (2019). Removal of Organic Pollution in the Water Environment. *Water*. 11. doi:10.3390/w11102017.
168. Karpouzias, D. G., Singh, B. K. (2006). Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis. *Advances in microbial physiology*. 51, 119-225.
169. Kazak, E. S., Kalitina, E. G., Kharitonova, N. A., Chelnokov, G. A., Elovskii, E. V., . Bragin, I. V. (2018). Biosorption of Rare-Earth Elements and Yttrium by Heterotrophic Bacteria in an Aqueous Environment. *Moscow University Geology Bulletin*. 73(3), 287-294.
170. Kernien, J. F., Snarr, B. D., Sheppard, D. C., and Nett, J. E. (2018). The interface between fungal biofilms and innate immunity. *Frontiers in immunology*, 8:1968. doi: 10.3389/fimmu.2017.01968.

171. Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y. M., Huang, Y. Z., Zhu, Y. G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental pollution*. 156, 686-692.
172. Khan, S.J., Ilyas, S., Javid, S., Visvanathan, C. Jegatheesan, V. (2011). Performance of suspended and attached growth MBR systems in treating high strength synthetic wastewater. *Bioresource technology*. 102, 5331-5336.
173. Khomenkov, V.G., Shevelev, A.B., Zhukov, V.G., Zagustina, N.A., Bezborodov, A.M., Popov, V.O. (2008). Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic biodegradation in microorganisms: a review, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 44, 133-152.
174. Khweek, A.A., Amer, A.O. (2018). Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8, 38. doi: 10.3389/fcimb.2018.00038.
175. Kinuthia, G.K., Ngure, V., Beti, D., Wanglia, A., Kamau, L. (2020). Levels of heavy metals in wastewater and soil samples from open drainage channels in Nairobi, Kenya: community health implication. *Sci Rep* 10, 8434. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65359-5>.
176. Kjelleberg, S., Givskov, M. (2007). *The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptations*. Norfolk, UK: Horizon Bioscience. 25, 46-49.
177. Koechler, S., Farasin, J., Cleiss-Arnold, J., Arsène-Ploetze, F. (2015). Toxic metal resistance in biofilms: diversity of microbial responses and their evolution. *Res. Microbiol.* 10, 764–773. doi: 10.1016/j.resmic.2015.03.008
178. Król, A., Mizerna, K., Bożym, M. (2020). An assessment of pH-dependent release and mobility of heavy metals from metallurgical slag. *Journal of Hazardous Materials*. 384, 121502. ISSN 0304-3894. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121502>.
179. Kronvall, G., Myhre, E. (1977). Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*. 85, 249-254.
180. Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. In: *The protein protocols handbook* (Ed. Walker, J.M.), 17-24. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4.
181. Krustok, I. (2015). *Communities of microalgae and bacteria in photobioreactors treating municipal wastewater*. Mälardalen University Press Licentiate Theses.
182. Kuhad, R.C., Gupta, R. (2009). *Biological Remediation of Petroleum Contaminants*. Y: *Advances in Applied Bioremediation*. Eds. Singh, A., Kuhad R.C., Ward, O.P. Springer-Verlag, Berlin. pp. 173-188.
183. Kumar, S., Prasad, S., Kumar Yadav, K., Shrivastava, M., Gupta, N., Nagar, S., Bach, QV., Kamyab, H., Khan, S.A., Yadav, S., Malav, L.C. (2019). Hazardous heavy metals contamination of vegetables and food chain: Role of sustainable remediation approaches - A review. *Environmental Research*, 179, Part A, 108792. ISSN 0013-9351. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108792>.
184. Kurladze, G.V. (2007). *Environmental Microbiology Research Trends*. New York: Nova Science Publishers, Inc. 107-110. (Chapter 3 - Natural Bacterial Biofilms in the Environment pp. 99-135).
185. Lara, H.H., Lopez-Ribot, J.L. (2020). Inhibition of mixed biofilms of *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by positively charged silver nanoparticles and functionalized silicone elastomers. *Pathogens*, 9(10):784. doi: 10.3390/pathogens9100784.
186. Lazăr, V., Chifiriuc, M.C. (2010). Architecture and physiology of microbial biofilms. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 69(2), 95-107.

187. Lenart-Boroń, A., Boroń, P. (2014). The effect of industrial heavy metal pollution on microbial abundance and diversity in soils-a review. Environmental risk assessment of soil contamination. IntechOpen. DOI: 10.5772/57406
188. Lens, P., Pol, L., Wilderer, P., Asano, T. (2002). Water Recycling and Resource Recovery in Industry: Analysis, Technologies and Implementation. Padstow, Cornwall, UK: TJ International (Ltd). 359-370.
189. Leriche, V., Briandet, R., Carpentier, B. (2003). Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. Environ Microbiol. 5, 64–71.
190. Leung, J.W., Liu, Y.L., Desta, T., Libby, E., Inciardi, J.F., Lam, K. (1998). Is there a synergistic effect between mixed bacterial infection in biofilm formation on biliary stents? Gastrointest Endosc. 48, 250–257.
191. Leyva-Díaz, J.C., Monteoliva, A., Martín-Pascual, J., Munio, M.M., García-Mesa, J.J., Poyatos, J.M. (2019). Moving bed biofilm reactor as an alternative wastewater treatment process for nutrient removal and recovery in the circular economy model. Bioresource Technology. 299. 122631. 10.1016/j.biortech.2019.122631.
192. Li, X., Meng, D., Li, J., Yin, H., Liu, H., Liu, X., Cheng, C., Xiao, Y., Liu, Z., and Yan, M. (2017). Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. Environmental Pollution. 231, 908-917.
193. Li, Y.H., Tian, X.L. (2016). Microbial Interactions in Biofilms: Impacts on Homeostasis and Pathogenesis. U: Microbial Biofilms - Importance and Applications (Eds. Dharumadurai Dhanasekaran and Nooruddin Thajuddin). IntechOpen, DOI: 10.5772/62942.
194. Li, Z., Yuan, H. (2008). Responses of *Rhodotorula* sp. Y11 to cadmium. Biometals. 21, 613-621.
195. Lin, W., Paterson, G. A., Zhu, Q., Wang, Y., Kopylova, E., Li, Y., Knight, R., Bazylinski, D.A., Zhu, R., Kirschvink, J.L., Pan, Y. (2017). Origin of microbial biomineralization and magnetotaxis during the Archean. Proceedings of the National Academy of Sciences. 114(9), 2171-2176.
196. Liu, B., Wang, C., Liu, D., He, N., Deng, X. (2017). Hg tolerance and biouptake of an isolated pigmentation yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. Plos one. 12(3), e0172984.
197. Liu, W., Jacquiod, S., Brejnrod, A., Russel, J., Burmølle, M., & Sørensen, S. J. (2019). Deciphering links between bacterial interactions and spatial organization in multispecies biofilms. The ISME journal, 13(12), 3054-3066.
198. Liu, W., Røder, H.L., Madsen, J.S., Bjarnsholt, T., Sørensen, S.J., Burmølle, M. (2016) Interspecific Bacterial Interactions are Reflected in Multispecies Biofilm Spatial Organization. Frontiers in Microbiology. 7, 1366. DOI=10.3389/fmicb.2016.01366. ISSN=1664-302X.
199. Liu, Y., Cao, Q., Luo, F., Chen, J. (2009). Biosorption of Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ ions from aqueous solutions by pretreated biomass of brown algae. Journal of hazardous materials. 163(2-3), 931-938.
200. Lloyd, J.R. (2002). Bioremediation of metals; the application of micro-organisms that make and break minerals. Microbiology today. 29, 67-69.
201. Loos, R., Marinov, D., Sanseverino, I., Napierska, D. Lettieri, T. (2018). Review of the 1st Watch List under the Water Framework Directive and recommendations for the 2nd Watch List, EUR 29173 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg. ISBN 978-92-79-81838-7 (print), 978-92-79-81839-4 (pdf), doi:10.2760/614367 (online), 10.2760/701879 (print), JRC111198.

202. Loukidou, M.X., Zouboulis, A.I. (2001). Comparison of two biological treatment process using attached growth biomass for sanitary landfill leachate treatment. *Environmental Pollution*. 111, 273-281.
203. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265–75.
204. Lv, X., Wang, D., Iqbal, W., Yang, B., Mao, Y. (2019). Microbial reduction of bromate: current status and prospects. *Biodegradation*. 30, 365-374. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09882-x>.
205. Machan, Z.A., Taylor, G.W., Pitt, T.L., Cole, P.J., Wilson, R. (1992). 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 30, 615–623.
206. Madoni, P. (2011). Protozoa in wastewater treatment processes: A minireview. *Italian Journal of Zoology*, 78(1), 3-11.
207. Madsen, E.L. (2011). Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current opinion in biotechnology*. 22, 456-464.
208. Mah, T. F. C., O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*. 9(1), 34-39.
209. Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 426(6964), 306-310.
210. Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment international*. 30, 261-278.
211. Margesin, R., Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56, 650-663.
212. Massoud, R., Khosravi-Darani, K., Sharifan, A., Asadi, G. H., Younesi, H. (2020). The Biosorption Capacity of *Saccharomyces Cerevisiae* for Cadmium in Milk. *Dairy*, 1(2), 169-176.
213. Matlock, M.M., Henkeb, K.R., Atwood, D.A. (2002). Effectiveness of commercial reagents for heavy metal removal from water with new insights for future chelate designs. *Journal of Hazardous Materials*. 92, 129–142.
214. Maurya, A., Raj, A. (2020). 5 – Recent advances in the application of biofilm in bioremediation of industrial wastewater and organic pollutants. *U: Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (Eds. Chowdhary, P., Ray, A., Verma, D., Akhter, Y.). Elsevier. 81-118.
215. McQuarrie, J.P., Boltz, J.P. (2011). Moving bed biofilm reactor technology: process applications, design, and performance. *Water Environment Research*. 83, 560-575.
216. McRandle, P.W. (2007). What Happens to Pharmaceuticals in Wastewater? *National Geographic Green Guide*. 122.
217. Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ Int*. 37, 1362–1375.
218. Mendell, M.J. 2007. Indoor residential chemical emissions as risk factors for respiratory and allergic effects in children. *A review of Indoor Air*. 17(4): 259-277.
219. Meyer, A., Wallis, F.M. (1997). Development of microbial biofilms on various surfaces for the treatment of heavy metal containing effluents. *Biotechnology techniques*. 11(12), 859-863.
220. Milić, J.S., Beškoski, V.P., Ilić, M.V., Ali, S.A.M., Gojgić-Cvijović, G.Đ., Vrvčić, M.M. (2009). Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. *J. Serb. Chem. Soc*. 74, 455–460.

221. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic reagent or determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
222. Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., Lal, B. (2001). *In situ* bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. *Curr. Microbiol.* 43, 328–335.
223. Misra, M., Ghosh Sachan, S., Chattopadhyay, S. (2021). Chapter 21 - Remediation of heavy metals from wastewater treatment plants using bacteria and algae. U: *New Trends in Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewater* (Eds: Maulin P Shah, Susana Rodriguez Couto, Vineet Kumar). Elsevier. 525-558.
224. Mitra, A., Mukhopadhyay S. (2016). Biofilm mediated decontamination of pollutants from the environment. *AIMS Bioengineering.* 3(1): 44-59. doi: 10.3934/bioeng.2016.1.44
225. Mitra, A., Mukhopadhyay, S. (2016). Biofilm mediated decontamination of pollutants from the environment. *Aims Bioengineering.* 3(1), 44-59.
226. Mohapatra, R. K., Behera, S. S., Patra, J. K., Thatoi, H., Parhi, P. K. (2019). Potential application of bacterial biofilm for bioremediation of toxic heavy metals and dye-contaminated environments. U: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms* (Eds. Yadav, M.K., Singh, B.P.). Elsevier. 267-281.
227. Möhlenhoff, P., Müller, L., Gorbushina, A.A., Petersen, K. (2001). Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiol Lett.* 195, 169-173.
228. Mroziak, A., Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res.* 165, 363–375.
229. Mulligan, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133: 183–198.
230. Muneer, B., Shakoori, F.R., Rehman, A., Shakoori, A.R. (2007). Chromium resistant yeast with multimetal resistance isolated from industrial effluents and their possible use in microbial consortium for bioremediation of wastewater. *Pakistan Journal of Zoology.* 39, 289.
231. Mustapha, M. U., Halimoon, N. (2015). Microorganisms and biosorption of heavy metals in the environment: a review paper. *J. Microb. Biochem. Technol.* 7(5), 253-256. DOI: 10.4172/1948-5948.1000219
232. Mutha, N.V.R., Mohammed, W.K., Krasnogor, N., Tan, G.Y.A., Wee, W.Y., Li, Y., Choo, S.W., Jakubovics, N.S. (2019). Transcriptional profiling of coaggregation interactions between *Streptococcus gordonii* and *Veillonella parvula* by Dual RNA-Seq. *Scientific Reports.* 9, 7664. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43979-w>
233. Najera, I., Lin, C. C., Kohbodi, G. A., Jay, J. A. (2005). Effect of chemical speciation on toxicity of mercury to *Escherichia coli* biofilms and planktonic cells. *Environmental science & technology.* 39(9), 3116-3120.
234. Namieśnik, J., Rabajczyk, A. (2010). The speciation and physico-chemical forms of metals in surface waters and sediments. *Chemical Speciation and Bioavailability.* 22(1). doi: 10.3184/095422910X12632119406391.
235. Nascimento, A. L., Souza, A. J., Andrade, P. A. M., Andreote, F. D., Coscione, A. R., Oliveira, F. C., Regitano, J. B. (2018). Sewage sludge microbial structures and relations to their sources, treatments, and chemical attributes. *Frontiers in microbiology.* 9:1462. doi: 10.3389/fmicb.2018.01462.
236. Negrão De Carvalho, R., Ceriani, L., Ippolito, A., Lettieri, T. (2015). Development of the First Watch List under the Environmental Quality Standards Directive. EUR 27142. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union. JRC95018.

237. Nielsen, F.H. (1994). Ultratrace elements. U: Modern Nutrition in Health and Disease (Eds. M.E. Shils JAO, M. Shike). Lea & Febiger, Philadelphia.
238. Nies, D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology. 51, 730-750.
239. Nunes, J.M., Bizerra, F.C., e Ferreira, R.C., Colombo, A.L. (2013). Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy. 57, 382-389.
240. O'Malley, M.A. (2008). Everything is everywhere: but the environment selects: ubiquitous distribution and ecological determinism in microbial biogeography. Stud. Hist. Philos. Sci. Part C Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci. 39, 314–325.
241. Obuekwe, C.O., Hourani, G., and Radwan, S.S. (2001). High-temperature hydrocarbon degradation activities in Kuwaiti desert soil samples. Folia Microbiol. 46, 535–539.
242. Ødegaard, H. (1999). The moving bed biofilm reactor. U: Water Environmental Engineering and Reuse of Water (Eds. Igarashi, T., Watanabe, Y., Asano, T., Tambo, N.). Hokkaido Press. 250-305.
243. Ødegaard, H., Givold, B., Strickland J. (2000). The Influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process. Water Science and Technology. 41, 383–391. IWA Publishing.
244. Ogbah, G.O., Tsokar, T.O., Salifu, E. (2019). Optimization of nutrients requirements for bioremediation of spent-engine oil contaminated soils. Environmental Engineering Research. 24(3), 484-494.
245. Okunye OL, Morakinyo KO, Ayedun JS (2013). Isolation and characterization of fungi associated with in-can degradation of paint. J. Environ. Earth. Sci. 3:142–145.
246. Oubekka, S. D., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M. P., Steenkeste, K. (2012). Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms. Antimicrobial agents and chemotherapy, 56(6), 3349-3358.
247. Özer, A., Özer, D. (2003). Comparative study of the biosorption of Pb (II), Ni (II) and Cr (VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats. Journal of hazardous materials. 100(1-3), 219-229.
248. Pandey, N., Keshavkant, S. (2021). Chapter 1 - Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbents, U: New Trends in Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewater (Eds: Maulin P Shah, Susana Rodriguez Couto, Vineet Kumar). Elsevier. 1-21.
249. Parke, D.V. Sapota, A. (1996). Chemical toxicity and reactive oxygen species. Int J Occup Med Environ Health. 9, 331-340.
250. Pedersen, K. (1982). Method for studying microbial biofilms in flowing-water systems. Applied and environmental microbiology. 43, 6-13.
251. Pennafirme, S., Lima, I., Bitencourt, J., Crapez, M., Lopes, R. (2015). Organic Matter Biodegradation by Bacterial Consortium under Metal Stress. U: Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems-New Advances and Technologies (Ed. Chamy, R). InTech. 67-84.
252. Perera, M., Wijayarathna, D., Wijesundera, S., Chinthaka, M., Seneviratne, G., Jayasena, S. (2019). Biofilm mediated synergistic degradation of hexadecane by a naturally formed community comprising *Aspergillus flavus* complex and *Bacillus cereus* group. BMC microbiology. 19, 84. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1460-4>.
253. Periasamy, S., Kolenbrander, P.E. (2010). Central role of the early colonizer *Veillonella* sp in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. J. Bacteriol. 192, 2965–2972.

254. Phulpoto A. H., M. A. Qazi1, S. Mangi, S. Ahmed, N. A. Kanhar. 2016. Biodegradation of oil-based paint by *Bacillus* species monocultures isolated from the paint warehouses. *International journal of Environmental Science and Technology* 13(1):125–134.
255. Pieper, D.H., Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current opinion in biotechnology*. 11, 262-270.
256. Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological reviews*. 5, 755-805.
257. Pratush, A., Kumar, A., Hu, Z. (2018). Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. *Int Microbiol*. 21(3):97-106. doi: 10.1007/s10123-018-0012-3.
258. Prouty, A.M., Gunn, J.S. (2003). Comparative analysis of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infect. Immun*. 71(12):7154-7158. doi:10.1128/iai.71.12.7154-7158.2003
259. Przybyla, A.E, Robbins J, Menon N, Peck H.D. (1992). Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiology Letters*. 88, 109-135.
260. Quintas, V., Prada-López, I., Tomás, I. (2014). Analyzing the oral biofilm using fluorescence-based microscopy: what's in a dye. U: *Microscopy: Adv Scientific Res Education* (Ed. A. Méndez-Vilas). Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 226-238.
261. Quintelas, C., Fernandes, Castro, B.J., Figueiredo, H., Tavares, T. (2008). Biosorption of Cr(VI) by a *Bacillus coagulans* biofilm supported on granular activated carbon (GAC). *Clinical & Experimental Immunology*. 151, 42-50.
262. Quintelas, C., Rocha, Z., Silva, B., Fonseca, B., Figueiredo, H., Tavares, T. (2009a). Removal of Cd(II), Cr(VI), Fe(III) and Ni(II) from aqueous solutions by an *E. coli* biofilm supported on kaolin. *Chemical Engineering Journal*. 149, 319–324.
263. Quintelas, C., Rocha, Z., Silva, B., Fonseca, B., Figueiredo, H., Tavares, T. (2009b). Biosorptive performance of an *Escherichia coli* biofilm supported on zeolite NaY for the removal of Cr(VI), Cd(II), Fe(III) and Ni(II). *Chem. Eng. J* 152, 110-115.
264. Rahimi, Y., Torabian, A., Mehrdadi, N., Rezaie, M.H., Pezeshk, H., Bidhendi, G.R.N. (2011). Optimizing aeration rates for minimizing membrane fouling and its effect on sludge characteristics in a moving bed membrane bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*. 186, 1097-1102.
265. Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M. (2003). Enhanced bioremediation of alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour. Technol*. 90, 159-168.
266. Rajpert, L., Skłodowska, A., Matlakowska, R. (2013). Biotransformation of copper from Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* LM9. *Chemosphere*. 91, 1257-1265.
267. Rao, Y., Shang, W., Yang, Y., Zhou, R., Rao, X. (2020). Fighting mixed-species microbial biofilms with cold atmospheric plasma. *Frontiers in Microbiology*. 11, 1000.
268. Rasalingam S., R. Peng, R., Koodali, T. (2014). Removal of Hazardous Pollutants from Wastewaters: Applications of TiO₂-SiO₂ Mixed Oxide Materials. *Nanomaterials for Environmental Applications*. Volume 2014 |Article ID 617405 |42 pages| <https://doi.org/10.1155/2014/617405>.
269. Rathnayake, I.V.N., Megharaj, M., Bolan, N., Naidu, R. (2010). Tolerance of heavy metals by Gram positive soil bacteria. *International Journal Of Civil Engineering and Environmental*. 2, 191-195.

270. Ravikumar, H.R., Rao, S.S., Karigar, C.S. (2012). Biodegradation of Paints: a Current Status. *Indian Journal of Science & Technology*. 5(1): 1977-1987.
271. Reichhardt, C., Parsek, M. R. (2019). Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Frontiers in microbiology*. 10, 677. doi: 10.3389/fmicb.2019.00677.
272. Ren, W. X., He, N., Li, P. J., Verkhozina, E. V. (2007). Application of heterotrophic microorganisms in metals removal by bioleaching. *Chinese Journal of Ecology*. 26(11), 1835-1841.
273. Reynold, D.M., Ahmad, S.R. (1997). Rapid and Direct Determination of Wastewater BOD Values Using a Fluorescence Technique. *Wat. Res.* 21, 2012-2018.
274. Reynolds, T.B., Fink, G.R. (2001). Bakers` yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*. 291(5505), 878-881.
275. Rezić, T., Rezić, I., Zeiner, M., Šantek, B. (2017). Application of Mixed Microbial Culture Biofilms for Manganese (II), Cobalt (II), and Chromium (VI) Biosorption by Horizontal Rotating Tubular Bioreactor. In: *Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery* (Eds. Robina Farooq and Zaki Ahmad). IntechOpen. DOI: 10.5772/66920.
276. Rezić, T., Zeiner, M., Šantek, B., Novak, S. (2011). Heavy metals removal in a horizontal rotating tubular bioreactor. *Water, Air, & Soil Pollution*. 214, 343-355.
277. Rezza, I., Salinas, E., Elorza, M., Tosetti, M., Donati, E. (2001). Mechanisms involved in bioleaching of an aluminosilicate by heterotrophic microorganisms. *Process Biochem.* 36, 495–500.
278. Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Høiby, N., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L. (2001). N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology (Reading)*. 147(Pt 12):3249-62. doi: 10.1099/00221287-147-12-3249. PMID: 11739757.
279. Ririhena, S.A.J., Astuti, A.D., Fachrul, M.F., Silalahi, M.D.S., Hadisoebroto, R., Rinanti, A. (2018). Biosorption of heavy metal copper (Cu²⁺) by *Saccharomyces cerevisiae*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 106:012090). IOP Publishing.
280. Rodrigues, M.E., Gomes, F., Rodrigues, C.F. (2019). *Candida* spp./Bacteria Mixed Biofilms. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 6(1):5. <https://doi.org/10.3390/jof6010005>.
281. Rodríguez, J., Gallampos, C. M., Timonen, S., Andersson, A., Sinkko, H., Haglund, P., Bergland, Á.M.M., Ripszam, M., Figueroa, Tysklind, M., Rowe, O. (2018). Effects of organic pollutants on bacterial communities under future climate change scenarios. *Frontiers in microbiology*. 9:2926. doi: 10.3389/fmicb.2018.02926.
282. Roling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J., Head, I.M. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5537-5548.
283. Rosado T, Martins MR, Pires M, Mirã o J, Candeias A, Caldeira AT (2013). Enzymatic monitorization of mural paintings biodegra-dation and biodeterioration. *Int. J. Conserv. Sci.* 4:603–612.
284. Ryan, R.P., Fouhy, Y., Garcia, B.F. (2008). Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 68, 75–86.
285. Sáenz-Marta, C.I., Ballinas-Casarrubias, M.L., Rivera-Chavira, B.E., Nevárez-Moorillón, G.N. (2015). Biosurfactants as Useful Tools in Bioremediation. *Advances in*

- Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil, Naofumi Shiomi, IntechOpen, DOI: 10.5772/60751.
286. Safaa, A.A.A. (2013). Removal of heavy metals from synthesis industrial wastewater using local isolated *Candida utilis* and *Aspergillus niger* as Bio-Filter. International Journal of Biotechnology. 2(5), 83-90.
287. Sahoo, N. K., Ramesh, A., Pakshirajan, K. (2012). Bacterial degradation of aromatic xenobiotic compounds: an overview on metabolic pathways and molecular approaches. U: Microorganisms in Environmental Management (Eds. Satyanarayana T., Johri B., Anil Prakash). Springer, Dordrecht. 201-220.
288. Salinas, E., Orellano, M., Rezza, I., Martinez, L., Marchesvky, E., Tosetti, M. (2000). Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solutions by *Rhodotorula rubra*. Bioresour Tech. 72, 107-112.
289. Salvadori, M.R., Ando, R.A., Oller do Nascimento, C.A., Corrêa, B. (2014). Intracellular biosynthesis and removal of copper nanoparticles by dead biomass of yeast isolated from the wastewater of a mine in the Brazilian Amazonia. Plos One. 9(1): e87968. doi: 10.1371/journal.pone.0087968.
290. Sandell, E.B. (1945). Colorimetric determination of traces of metals. Soil Science. 59, 481.
291. Sandrin, T.R., Maier, R.M. (2003). Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. Environ Health Perspect. 111, 1093-1101.
292. Scow, K.M., Hicks, K.A. (2005). Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. Current Opinion in Biotechnology. 16(3), 246-253.
293. Sehar, S., Naz, I. (2016). Role of the Biofilms in Wastewater Treatment. Microbial biofilms – Importance and Applications, 121-144. IntechOpen, DOI: 10.5772/63499.
294. Seo, J.S., Keum, Y.S., Li, Q.X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. Int J Environ Res Pub Health. 6, 278-309.
295. Shah, M.P., Rodrigez Couto, S., Kumar, V. (2021): New Trends in Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewater. Elsevier Inc. ISBN 978-0-12-822965-1.
296. Sharma, D., Misba, L., Khan, A.U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrob Resist Infect Control. 8, 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>.
297. Sharma, I. (2020). Bioremediation Techniques for Polluted Environment: Concept, Advantages, Limitations, and Prospects, Trace Metals in the Environment - New Approaches and Recent Advances, Mario Alfonso Murillo-Tovar, Hugo Saldarriaga-Noreña and Agnieszka Saeid, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.90453. Available from: <https://www.intechopen.com/books/trace-metals-in-the-environment-new-approaches-and-recent-advances/bioremediation-techniques-for-polluted-environment-concept-advantages-limitations-and-prospects>.
298. Shrestha, A. (2013). Specific moving bed biofilm reactor in nutrient removal from municipal wastewater. University of Technology, Sidney. <https://opus.lib.uts.edu.au/bitstream/10453/23553/5/02Whole.pdf>.
299. Simmons, E.L., Bond, M.C., Koskella, B., Drescher, K., Bucci, V., Nadell, C.D., Bordenstein, S. (2021). Biofilm Structure Promotes Coexistence of Phage-Resistant and Phage-Susceptible Bacteria. mSystems. Jun 23;5(3):e00877.
300. Simon, M., Grossart, H.P., Schweitzer, B., Ploug, H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. Aquatic Microbial Ecology. 28, 175-211. <https://www.int-res.com/abstracts/ame/v28/n2/p175-211/>.
301. Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects, J. Biotechnol. Adv. 25, 99–121.

302. Sinsabaugh, R.L., Repert, D., Weiland, T., Golladay, S.W., Linkins, A.E. (1991). Exoenzyme accumulation in epilithic biofilms. *Hydrobiologica*. 222, 29–37.
303. Službeni list Evropske Unije (2008): Direktiva 2008/105/EZ Europskog Parlamenta i vijeća o standardima kvalitete okoliša u području vodne politike. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0105&from=EN>
304. Smith, L.A., Means, J.L., Chen, A., Alleman, B., Chapman, C.C. (1995). Remedial options for metals-contaminated sites. Boca Raton, Florida, Lewis Publishers.
305. Spoering, A. L., & Lewis, K. I. M. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of bacteriology*. 183(23), 6746-6751.
306. Springthorpe, S. K., Dundas, C. M., Keitz, B. K. (2019). Microbial reduction of metal-organic frameworks enables synergistic chromium removal. *Nature communications*. 10(1), 5212. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13219-w>.
307. Stapleton, R.D., Bright, N.G., Sayler, G.S. (2000). Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. *Microb. Ecol.* 39, 211-221.
308. Stapper, A.P., Narasimhan, G., Ohman, D.E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Mathee, K. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*. 53, 679-690.
309. Stewart, P. S. (2003). Diffusion in biofilms. *Journal of bacteriology*. 185(5), 1485-1491.
310. Stillman, M.J., Presta, A. (2000). Characterizing metal ion interactions with biological molecules—the spectroscopy of metallothionein. *Molecular biology and toxicology of metals*. Taylor & Francis, New York. 276-299.
311. Stojanov, A., Ugrinov, D. (2011). Istorijski pregled u tretmanu otpadnih voda. *Zaštita materijala*. 52, 127-133.
312. Subathra, M.K., Immanuel, G., Suresh, A.H. (2013). Isolation and identification of hydrocarbon degrading bacteria from Ennore creek. *Bioinformation*. 9(3), 150-157.
313. Sumner, J.B. and Howell, S.F. (1935). A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.*, 108, 51-54.
314. Sutherland I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading)*. 147(Pt 1):3-9. doi: 10.1099/00221287-147-1-3. PMID: 11160795.
315. Tarekegn, M. M., Salilih, F. Z., Ishetu, A. I. (2020). Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. *Cogent Food & Agriculture*. 6(1), 1783174.
316. Tavares, C.R.G., Santanna Jr., G.L. Capdeville, B. (1995). The effect of air superficial velocity on biofilm accumulation in a three phase fluidized-bed reactor. *Water Resources*. 29, 2293-2298.
317. Tchobanoglous. G., Burton, F.L., Stensel, H.D. (2003). *Waste water engineering: Treatment and reuse*. 4th ed. Metcalf & Eddy, Inc.
318. Teitzel, G.M., Parsek, M.R. (2003). Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 2313-2320.
319. Tekere, M. (2019). Microbial Bioremediation and Different Bioreactors Designs Applied. In: *Biotechnology and Bioengineering*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.83661
320. Thompson, I.P., van der Gast, C.J., Ciric, L., Singer, A.C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ. Microbiol.* 7, 909-915.

321. Tielen, P., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Flemming, H.C., Wingender, J. (2010). Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 156, 2239-2252.
322. Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. A., & Krieg, N. R. (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. U: *Methods for general and molecular microbiology* (Eds. Reddy, C.A., Beveridge, T.J., Breznak, J.A., Marzluf, G.A., Schmidt, T.M., and Snyder, L.R.). Wiley Online Library. 330-393.
323. Trunk, T., Khalil, H. S., Leo, J. C. (2018). Bacterial autoaggregation. *AIMS microbiology*. 4(1), 140–164. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.140>
324. Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., de Carvalho, C.C.C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*. 22, 231–241.
325. Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I., Okuyama, H. (2007). Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1739–1745.
326. Van Hamme, J.D. (2014). Bioavailability and Biodegradation of Organic Pollutants — A Microbial Perspective. U: *Biodegradation and Bioremediation* (Eds. Singh, A., Ward, O.P.). Springer-Verlag, Berlin. 37-56.
327. Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 503-549.
328. Van Houdt, R., Michiels, C.W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology*. 156, 626-633.
329. Van Nguyen, P., Plocek, V., Váchová, L., Palkova. Z. (2020). Glucose, Cyc8p and Tup1p regulate biofilm formation and dispersal in wild *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofilms Microbiomes*. 6, 7. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0118-1>.
330. Vesilind, P. (2003) *Wastewater Treatment Plant Design*. IWA Publishing. Alexandria, VA.
331. Villegas, L. B., Amoroso, M. J., de Figueroa, L. I. (2005). Copper tolerant yeasts isolated from polluted area of Argentina. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*. 45(5), 381-391.
332. Volesky, B. (1990). *Biosorption of heavy metals*. CRC press.
333. Volesky, B. (2003). *Sorption and Biosorption*. (ISBN 0-9732983-0-8) BV-Sorbex, Inc. St. Lambert (Montreal), Quebec, Canada.
334. Völkel, S., Fröls, S., and Pfeifer, F. (2018). Heavy Metal Ion Stress on *Halobacterium salinarum* R1 Planktonic Cells and Biofilms. *Front. Microbiol.* 9:3157. doi: 10.3389/fmicb.2018.03157.
335. Wan, N., Wang. H., Ng, C.K., Mukherjee, M., Ren, D., Cao, B., Tang, Y.J. (2018). Bacterial Metabolism During Biofilm Growth Investigated by ¹³C Tracing. *Front. Microbiol.* 9:2657. doi: 10.3389/fmicb.2018.02657.
336. Wang J., Chen C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology advances*, 24, 427-451.
337. Wang, B.Y., Deutch, A., Hong, J., Kuramitsu, H.K. (2011). Proteases of an early colonizer can hinder *Streptococcus mutans* colonization *in vitro*. *J. Dent. Res.* 90, 501-505.
338. Wang, S., Parajuli, S., Sivalingam, V., Bakke, R. (2019). Biofilm in moving bed biofilm process for wastewater treatment. U: *Bacterial Biofilms* (Eds. Dincer, S., Özdenefe, M.S., Arkut, A.). IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.88520.

339. Wang, W, Ballatori, N. (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological function. *Pharmacol Rev.* 50, 335-355.
340. Watnick, P., Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675-2679.
341. Weast, R.C. (1984). *CRC handbook of chemistry and physics*. Boca Raton, Florida, CRC Press.
342. Wei, Q., Yan, J., Chen, Y., Zhang, L., Wu, X., Shang, S., Ma, S., Xia, T., Xue, S., Zhang, H. (2018). Cell surface display of MerR on *Saccharomyces cerevisiae* for biosorption of mercury. *Molecular biotechnology.* 60(1), 12-20.
343. White, C., Gadd, G. M. (1998). Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilms. *Microbiology.* 144, 1407-1415.
344. Whitehouse, B.G. (1984). The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Chem.* 14. 319- 332.
345. Wiesmann, U., Choi, I. S., and Dombrowski, E. M. (2007). Historical development of wastewater collection and treatment. *Fundamentals of Biological Wastewater Treatment*, 1-23.
346. Wingender, J., Neu, T., Flemming, H.-C. (1999a). *Microbial Extracellular Polymer Substances, Characterization, Structure and Function*. Springer: Heidelberg, Germany.
347. Wingender, J., Neu, T., Flemming, H.-C. (1999b). What are bacterial extracellular polymer substances? U: *Microbial Extracellular Polymeric Substances* (Eds. Wingender, J., Neu, T., Flemming, H.-C.). Springer: Heidelberg/Berlin, Germany.
348. Xie, Y., Chen, C., Ren, X., Wang, X., Wang, H., Wang, X. (2019). Emerging natural and tailored materials for uranium-contaminated water treatment and environmental remediation. *Progress in Materials Science.* 103, 180-234.
349. Xu, X., Duan, L., Yu, J., Su, C., Li, J., Chen, D., Zhang, X., Song, H., Pan, Y. (2018). Characterization analysis and heavy metal-binding properties of Cs MTL 3 in *Escherichia coli*. *FEBS Open Bio.* 8(11), 1820-1829.
350. Yamada, M., Ikegami, A., Kuramitsu, H.K. (2005). Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromon gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 250, 271-277.
351. Yero, D., Huedo H., Conchillo-Solé, O., Martínez-Servat S., Mamat, U., Coves, X., Llanas, F., Roca, I., Vila, J., Schaible, U. E., Daura, X., Giber, I. (2020). *Front. Microbiol.* 11:1160. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01160>.
352. Zalewska-Piątek, B., Wilkanowicza, S., Bruździakb, P., Piąteka, R., Kur, J. (2013). Biochemical characteristic of biofilm of uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strains. *Microbiological Research.* 168, 367-378.
353. Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., Zara, S. (2020). Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World journal of microbiology & biotechnology.* 36(9), 134. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>.
354. Zhang, B., Li, Y., Xiang, S-Z., Yan, Y., Yang, R., Lin, M-P., Wang, X-M., Xue. Y-L., Guan, X. Y. (2020). Sediment Microbial Communities and Their Potential Role as Environmental Pollution Indicators in Xuande Atoll, South China Sea. *Frontiers in Microbiology.* 11, 1011. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01011>.
355. Zhang, L., Zhang, B., Zhu, X., Chang, H., Ou, S., Wang, H. (2018). Role of bioreactors in microbial biomass and energy conversion. U: *Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion* (Eds. Liao, Q., Chang, J.S., Hermann, C, Xia, A.). Springer Nature Singapore Pte Ltd. 39-78.
356. Zhao, B., Poh, C.L. (2008). Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics.* 8, 874-881.

357. Zinicovscaia, I., Yushin, N., Abdusamadzoda, D., Grozdov, D., Shvetsova, M. (2020). Efficient Removal of Metals from Synthetic and Real Galvanic Zinc–Containing Effluents by Brewer’s Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Materials*. 13(16), 3624.
358. Zorpas, A.A., Inglezakis, V.J. (2012). Automotive industry challenges in meeting EU 2015 environmental standard. *Technology in Society*. 34, 55-83.
359. Zupančič, J. Raghupathi, P. K., Kurt, H., Burmølle, M., Sørensen, S.J., Gunde-Cimerman, N. (2018). Synergistic Interactions in Microbial Biofilms Facilitate the Establishment of Opportunistic Pathogenic Fungi in Household Dishwashers. *Frontiers in Microbiology*. 9, 21. DOI=10.3389/fmicb.2018.00021. ISSN=1664-302X.
360. Службени гласник РС 135/2004-29, 36/2009-144, 36/2009-115 (др. закон), 72/2009-164 (др. закон), 43/2011-88 (УС), 14/2016-3, 76/2018-3, 95/2018-267 (др. закон). Закон о заштити животне средине.
361. Службени гласник РС 24 (2014). Уредба граничним вредностима приоритетних и приоритетних хазардних супстанци које загађују површинске воде и роковима за њихово достизање.
362. Службени гласник РС бр. 23/94 (1994). Правилник о дозвољеним количинама опасних и штетних материја у земљишту и води за наводњавање и методама њиховог испитивања.
363. Службени гласник РС, бр. 30 од 7. маја 2010, 93 од 28. септембра 2012, 101 од 16. децембра 2016, 95 од 8. децембра 2018, 95 од 8. децембра 2018 - др. закон. Закон о водама.
364. Службени гласник РС, бр. 67 од 13. септембра 2011, 48 од 10. маја 2012, 1. од 6. јануара 2016. Уредба о граничним вредностима емисије загађујућих материја у воде и роковима за њихово достизање.
365. Службени лист града Крагујевца 9/1993. Уредба о МДК вредностима за испуштање отпадне воде у градски колектор.

8. ПРИЛОЗИ

8.1. Спецификације аутоиндистријских боја

SAFETY DATA SHEET



Date of issue/Date of revision : 19 October 2011

SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

1.1 Product identifier

Product name : 455609-03 Wash Primer DPX1828
Product code : A-F107137-MF
Product type : Liquid.
Other means of identification : Not available.

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Product use : Industrial applications, Used by spraying.
Use of the substance/mixture : Not applicable.

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

PPG France Business Support SAS
 3, ZAE "Les Dix Muids"
 B.P. 89
 59583 Marly Cedex
 France
 +33 (0)3 27 19 88 00

- Technical contact : Product Compliance EMEA
 - Tel : +33 (0)3 27 14 97 00
 - Fax : +33 (0)3 27 14 97 08

e-mail address of person responsible for this SDS : EurMsdsContact@ppg.com

1.4 Emergency telephone number

Supplier

Telephone number :
 +33 (0)3 27 14 97 00

SECTION 2: Hazards identification

2.1 Classification of the substance or mixture

Product definition : Mixture

Classification according to Directive 1999/45/EC [DPD]

The product is classified as dangerous according to Directive 1999/45/EC and its amendments.

Classification : F; R11
 Repr. Cat. 3; R63
 Xn; R48/20
 Xi; R41, R38
 R67
 R52/53

Physical/chemical hazards : Highly flammable.

Human health hazards : Possible risk of harm to the unborn child. Harmful: danger of serious damage to health by prolonged exposure through inhalation. Risk of serious damage to eyes. Irritating to skin. Vapours may cause drowsiness and dizziness.

Environmental hazards : Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

SECTION 2: Hazards identification

See Section 16 for the full text of the R phrases or H statements declared above.

See Section 11 for more detailed information on health effects and symptoms.

2.2 Label elements

Hazard symbol or symbols :



Indication of danger : Highly flammable, Harmful

Risk phrases : R11- Highly flammable.
 R63- Possible risk of harm to the unborn child.
 R48/20- Harmful: danger of serious damage to health by prolonged exposure through inhalation.
 R41- Risk of serious damage to eyes.
 R38- Irritating to skin.
 R67- Vapours may cause drowsiness and dizziness.
 R52/53- Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

Safety phrases : S23- Do not breathe vapour or spray.
 S26- In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
 S36/37/39- Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.
 S38- In case of insufficient ventilation, wear suitable respiratory equipment.

Hazardous ingredients : toluene

Supplemental label elements : Not applicable.

Special packaging requirements

Containers to be fitted with child-resistant fastenings : Not applicable.

Tactile warning of danger : Not applicable.

2.3 Other hazards

Other hazards which do not result in classification : Not available.

SECTION 3: Composition/information on ingredients

Substance/mixture : Mixture

Product/ingredient name	Identifiers	%	Classification		Type
			67/548/EEC	Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]	
toluene	EC: 203-625-9 CAS: 108-88-3 Index: 601-021-00-3	15-20	F; R11 Repr. Cat. 3; R63 Xn; R48/20, R65 Xi; R38 R67	Flam. Liq. 2, H225 Skin Irrit. 2, H315 Repr. 2, H361d STOT SE 3, H336 STOT RE 2, H373 Asp. Tox. 1, H304	[1] [2]
1-methoxy-2-propanol	EC: 203-539-1 CAS: 107-98-2 Index: 603-064-00-3	<15	R10 R67	Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H336	[1] [2]
2-methylpropan-1-ol	EC: 201-148-0 CAS: 78-83-1 Index: 603-108-00-1	10-15	R10 Xi; R41, R37/38 R67	Flam. Liq. 3, H226 Skin Irrit. 2, H315 Eye Dam. 1, H318 STOT SE 3, H335 and	[1] [2]

SECTION 3: Composition/information on ingredients

xylene	EC: 215-535-7 CAS: 1330-20-7 Index: 601-022-00-9	5-10	R10 Xn; R20/21 Xi; R38	H336 Flam. Liq. 3, H226 Acute Tox. 4, H312 Acute Tox. 4, H332 Skin Irrit. 2, H315	[1] [2]
n-butyl acetate	EC: 204-658-1 CAS: 123-86-4 Index: 607-025-00-1	<15	R10 R66, R67	Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H336	[1] [2]
propan-2-ol	EC: 200-661-7 CAS: 67-63-0 Index: 603-117-00-0	1-5	F; R11 Xi; R36 R67	Flam. Liq. 2, H225 Eye Irrit. 2, H319 STOT SE 3, H336	[1] [2]
butan-1-ol	EC: 200-751-6 CAS: 71-36-3 Index: 603-004-00-6	3-5	R10 Xn; R22 Xi; R41, R37/38 R67	Flam. Liq. 3, H226 Acute Tox. 4, H302 Skin Irrit. 2, H315 Eye Dam. 1, H318 STOT SE 3, H335 and H336	[1] [2]
4-hydroxy-4-methylpentan-2-one	EC: 204-626-7 CAS: 123-42-2 Index: 603-016-00-1	<10	Xi; R36	Eye Irrit. 2, H319	[1] [2]
2-butoxyethyl acetate	EC: 203-933-3 CAS: 112-07-2 Index: 607-038-00-2	3-7	Xn; R20/21	Acute Tox. 4, H312 Acute Tox. 4, H332	[1] [2]
N-methyl-2-pyrrolidone	EC: 212-828-1 CAS: 872-50-4 Index: 606-021-00-7	<5	Repr. Cat. 2; R61 Xi; R36/37/38	Skin Irrit. 2, H315 Eye Irrit. 2, H319 Repr. 1B, H360Di STOT SE 3, H335i	[1] [2]
trizinc bis(orthophosphate)	EC: 231-944-3 CAS: 7779-90-0 Index: 030-011-00-6	0.25-2.5	N; R50/53	Aquatic Acute 1, H400 Aquatic Chronic 1, H410	[1]
ethylbenzene	EC: 202-849-4 CAS: 100-41-4 Index: 601-023-00-4	1-3	F; R11 Xn; R20	Flam. Liq. 2, H225 Acute Tox. 4, H332	[1] [2]
zinc oxide	EC: 215-222-5 CAS: 1314-13-2 Index: 030-013-00-7	0.25-2.5	N; R50/53	Aquatic Acute 1, H400 Aquatic Chronic 1, H410	[1]
			See Section 16 for the full text of the R-phrases declared above.	See Section 16 for the full text of the H statements declared above.	

There are no additional ingredients present which, within the current knowledge of the supplier and in the concentrations applicable, are classified as hazardous to health or the environment and hence require reporting in this section.

Type

[1] Substance classified with a health or environmental hazard

[2] Substance with a workplace exposure limit

[3] Substance meets the criteria for PBT according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII

[4] Substance meets the criteria for vPvB according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII

Occupational exposure limits, if available, are listed in Section 8.

Note - high Concentration Listed is a < Value

SUB codes represent substances without registered CAS Numbers.

SAFETY DATA SHEET



Date of issue/Date of revision : 25 November 2011

SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

1.1 Product identifier

Product name : 2010A00-0S SM B/B PAST HSSB Bianco VR-268/A
Product code : A-F107117-CP
Product type : Liquid.
Other means of identification : Not available.

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Product use : Industrial applications, Used by spraying.
Use of the substance/mixture : Coating.

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

PPG Industries Italia S.p.A.
 Via Serra, N. 1
 15028 Quattordio (AL)
 Italy
 +39 0131 770 1

- Technical contact : DIVISIONE SVILUPPO PRODOTTI VERNICIANTI
 - Tel : +39 0131 770 716
 - Fax : +39 0131 773 731

e-mail address of person responsible for this SDS : EurMsdsContact@ppg.com

1.4 Emergency telephone number

Supplier

Telephone number :
 +39 0131 770 1

SECTION 2: Hazards identification

2.1 Classification of the substance or mixture

Product definition : Mixture

Classification according to Directive 1999/45/EC [DPD]

The product is classified as dangerous according to Directive 1999/45/EC and its amendments.

Classification : R10
 R52/53

Physical/chemical hazards : Flammable.

Environmental hazards : Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

See Section 16 for the full text of the R phrases or H statements declared above.

See Section 11 for more detailed information on health effects and symptoms.

2.2 Label elements

English (GB)

United Kingdom (UK)

1/13

SECTION 2: Hazards identification

Hazard symbol or symbols	: Not applicable.
Indication of danger	: Not applicable.
Risk phrases	: R10- Flammable. R52/53- Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
Safety phrases	: S23- Do not breathe vapour or spray. S38- In case of insufficient ventilation, wear suitable respiratory equipment.
Hazardous ingredients	: Not applicable.
Supplemental label elements	: Not applicable.
Special packaging requirements	
Containers to be fitted with child-resistant fastenings	: Not applicable.
Tactile warning of danger	: Not applicable.

2.3 Other hazards

Other hazards which do not result in classification	: Not available.
--	------------------

SECTION 3: Composition/information on ingredients

Substance/mixture : Mixture

Product/ingredient name	Identifiers	%	Classification		Type
			67/548/EEC	Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]	
1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine, polymer with formaldehyde, butylated methylated n-butyl acetate	CAS: 68036-97-5	2.5-25	R52/53	Aquatic Chronic 3, H412	[1]
	EC: 204-658-1 CAS: 123-86-4 Index: 607-025-00-1	<15	R10 R66, R67	Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H336	[1] [2]
Ligroine : Nota(s) P	EC: 232-453-7 CAS: 8032-32-4 Index: 649-263-00-9	<10	Xn; R65	Flam. Liq. 2, H225 Acute Tox. 4, H332 Asp. Tox. 1, H304	[1]
propan-2-ol	EC: 200-661-7 CAS: 67-63-0 Index: 603-117-00-0	1-5	F; R11 Xi; R36 R67	Flam. Liq. 2, H225 Eye Irrit. 2, H319 STOT SE 3, H336	[1] [2]
2-methylpropan-1-ol	EC: 201-148-0 CAS: 78-83-1 Index: 603-108-00-1	1-5	R10 Xi; R41, R37/38 R67	Flam. Liq. 3, H226 Skin Irrit. 2, H315 Eye Dam. 1, H318 STOT SE 3, H335 and H336	[1] [2]
heptane	EC: 205-563-8 CAS: 142-82-5 Index: 601-008-00-2	0.25-1	F; R11 Xn; R65 Xi; R38 R67 N; R50/53	Flam. Liq. 2, H225 Skin Irrit. 2, H315 STOT SE 3, H336 Asp. Tox. 1, H304 Aquatic Acute 1, H400 Aquatic Chronic 1, H410	[1] [2]

English (GB)

United Kingdom (UK)

2/13

SECTION 3: Composition/information on ingredients

			See Section 16 for the full text of the R-phrases declared above.	See Section 16 for the full text of the H statements declared above.	
--	--	--	---	--	--

There are no additional ingredients present which, within the current knowledge of the supplier and in the concentrations applicable, are classified as hazardous to health or the environment and hence require reporting in this section.

Type

- [1] Substance classified with a health or environmental hazard
- [2] Substance with a workplace exposure limit
- [3] Substance meets the criteria for PBT according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII
- [4] Substance meets the criteria for vPvB according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII

Occupational exposure limits, if available, are listed in Section 8.

Note - high Concentration Listed is a < Value

SUB codes represent substances without registered CAS Numbers.

SECTION 4: First aid measures

4.1 Description of first aid measures

- Eye contact** : Check for and remove any contact lenses. Immediately flush eyes with running water for at least 15 minutes, keeping eyelids open. Seek immediate medical attention.
- Inhalation** : Remove to fresh air. Keep person warm and at rest. If not breathing, if breathing is irregular or if respiratory arrest occurs, provide artificial respiration or oxygen by trained personnel.
- Skin contact** : Remove contaminated clothing and shoes. Wash skin thoroughly with soap and water or use recognised skin cleanser. Do NOT use solvents or thinners.
- Ingestion** : If swallowed, seek medical advice immediately and show the container or label. Keep person warm and at rest. Do not induce vomiting.
- Protection of first-aiders** : No action shall be taken involving any personal risk or without suitable training. It may be dangerous to the person providing aid to give mouth-to-mouth resuscitation.

4.2 Most important symptoms and effects, both acute and delayed

Potential acute health effects

- Eye contact** : May cause eye irritation.
- Inhalation** : Exposure to decomposition products may cause a health hazard. Serious effects may be delayed following exposure.
- Skin contact** : May cause skin irritation.
- Ingestion** : No known significant effects or critical hazards.

Over-exposure signs/symptoms

- Eye contact** : No specific data.
- Inhalation** : No specific data.
- Skin contact** : No specific data.
- Ingestion** : No specific data.

4.3 Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

- Notes to physician** : In case of inhalation of decomposition products in a fire, symptoms may be delayed. The exposed person may need to be kept under medical surveillance for 48 hours.
- Specific treatments** : No specific treatment.

SAFETY DATA SHEET



Date of issue/Date of revision : 30 November 2011

SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

1.1 Product identifier

Product name : 260101-0S reducer for fas
Product code : A-F107119-CN
Product type : Liquid.
Other means of identification : Not available.

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Product use : Industrial applications.
Use of the substance/mixture : Solvent.

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

PPG Industries Italia S.p.A.
 Via Serra, N. 1
 15028 Quattordio (AL)
 Italy
 +39 0131 770 1

- Technical contact : DIVISIONE SVILUPPO PRODOTTI VERNICIANTI
 - Tel : +39 0131 770 716
 - Fax : +39 0131 773 731

e-mail address of person responsible for this SDS : EurMsdsContact@ppg.com

1.4 Emergency telephone number

Supplier

Telephone number :
 +39 0131 770 1

SECTION 2: Hazards identification

2.1 Classification of the substance or mixture

Product definition : Mixture

Classification according to Directive 1999/45/EC [DPD]

The product is classified as dangerous according to Directive 1999/45/EC and its amendments.

Classification : R10
 Xn; R20/21
 Xi; R37/38
 N; R51/53

Physical/chemical hazards : Flammable.

Human health hazards : Harmful by inhalation and in contact with skin. Irritating to respiratory system and skin.

Environmental hazards : Toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

See Section 16 for the full text of the R phrases or H statements declared above.

See Section 11 for more detailed information on health effects and symptoms.

SECTION 2: Hazards identification

2.2 Label elements

Hazard symbol or symbols :



Indication of danger : Harmful, Dangerous for the environment

Risk phrases : R10- Flammable.
R20/21- Harmful by inhalation and in contact with skin.
R37/38- Irritating to respiratory system and skin.
R51/53- Toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

Safety phrases : S36/37- Wear suitable protective clothing and gloves.
S61- Avoid release to the environment. Refer to special instructions/safety data sheet.

Hazardous ingredients : xylene

Supplemental label elements : Not applicable.

Special packaging requirements

Containers to be fitted with child-resistant fastenings : Not applicable.

Tactile warning of danger : Not applicable.

2.3 Other hazards

Other hazards which do not result in classification : Not available.

SECTION 3: Composition/information on ingredients

Substance/mixture : Mixture

Product/ingredient name	Identifiers	%	Classification		Type
			67/548/EEC	Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]	
xylene	EC: 215-535-7 CAS: 1330-20-7 Index: 601-022-00-9	35-50	R10 Xn; R20/21 Xi; R38	Flam. Liq. 3, H226 Acute Tox. 4, H312 Acute Tox. 4, H332 Skin Irrit. 2, H315	[1] [2]
n-butyl acetate	EC: 204-658-1 CAS: 123-86-4 Index: 607-025-00-1	25-35	R10 R66, R67	Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H336	[1] [2]
Solvent naphtha (petroleum), light arom. : Nota(s) P	EC: 265-199-0 CAS: 64742-95-6 Index: 649-356-00-4	15-20	R10 Xn; R65 Xi; R37 R66, R67 N; R51/53	Flam. Liq. 3, H226 Skin Irrit. 2, H315 STOT SE 3, H335 STOT SE 3, H335 and H336i Asp. Tox. 1, H304 Aquatic Chronic 2, H411	[1]
1,2,4-trimethylbenzene	EC: 202-436-9 CAS: 95-63-6 Index: 601-043-00-3	7-10	R10 Xn; R20 Xi; R36/37/38 N; R51/53	Flam. Liq. 3, H226 Acute Tox. 4, H332 Skin Irrit. 2, H315 Eye Irrit. 2, H319 STOT SE 3, H335 Aquatic Chronic 2, H411	[1] [2]
ethylbenzene	EC: 202-849-4	3-7	F; R11	Flam. Liq. 2, H225	[1] [2]

SECTION 3: Composition/information on ingredients

cumene	CAS: 100-41-4 Index: 601-023-00-4 EC: 202-704-5 CAS: 98-82-8 Index: 601-024-00-X	0.25-1	Xn; R20	Acute Tox. 4, H332	[1] [2]
	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51/53		Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H335 Asp. Tox. 1, H304 Aquatic Chronic 2, H411		
			See Section 16 for the full text of the R-phrases declared above.	See Section 16 for the full text of the H statements declared above.	

There are no additional ingredients present which, within the current knowledge of the supplier and in the concentrations applicable, are classified as hazardous to health or the environment and hence require reporting in this section.

Type

- [1] Substance classified with a health or environmental hazard
- [2] Substance with a workplace exposure limit
- [3] Substance meets the criteria for PBT according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII
- [4] Substance meets the criteria for vPvB according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII

Occupational exposure limits, if available, are listed in Section 8.

Note - high Concentration Listed is a < Value

SUB codes represent substances without registered CAS Numbers.

SECTION 4: First aid measures

4.1 Description of first aid measures

- Eye contact** : Check for and remove any contact lenses. Immediately flush eyes with running water for at least 15 minutes, keeping eyelids open. Seek immediate medical attention.
- Inhalation** : Remove to fresh air. Keep person warm and at rest. If not breathing, if breathing is irregular or if respiratory arrest occurs, provide artificial respiration or oxygen by trained personnel.
- Skin contact** : Remove contaminated clothing and shoes. Wash skin thoroughly with soap and water or use recognised skin cleanser. Do NOT use solvents or thinners.
- Ingestion** : If swallowed, seek medical advice immediately and show the container or label. Keep person warm and at rest. Do not induce vomiting.
- Protection of first-aiders** : No action shall be taken involving any personal risk or without suitable training. It may be dangerous to the person providing aid to give mouth-to-mouth resuscitation.

4.2 Most important symptoms and effects, both acute and delayed

Potential acute health effects

- Eye contact** : May cause eye irritation.
- Inhalation** : Harmful by inhalation. Irritating to respiratory system.
- Skin contact** : Harmful in contact with skin. Irritating to skin.
- Ingestion** : Irritating to mouth, throat and stomach.

Over-exposure signs/symptoms

- Eye contact** : No specific data.
- Inhalation** : Adverse symptoms may include the following:
respiratory tract irritation
coughing
- Skin contact** : Adverse symptoms may include the following:
irritation
redness
- Ingestion** : No specific data.

SAFETY DATA SHEET



Date of issue/Date of revision : 13 December 2011

SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

1.1 Product identifier

Product name : 2021A00-0S SM B/B MET HSSB Rosso VR-108/B
Product code : A-F107107-CN
Product type : Liquid.
Other means of identification : Not available.

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Product use : Industrial applications, Used by spraying.
Use of the substance/mixture : Coating.

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

PPG Industries Italia S.p.A.
 Via Serra, N. 1
 15028 Quattordio (AL)
 Italy
 +39 0131 770 1

- Technical contact : DIVISIONE SVILUPPO PRODOTTI VERNICIANTI
 - Tel : +39 0131 770 716
 - Fax : +39 0131 773 731

e-mail address of person responsible for this SDS : EurMsdContact@ppg.com

1.4 Emergency telephone number

Supplier

Telephone number :
 +39 0131 770 1

SECTION 2: Hazards identification

2.1 Classification of the substance or mixture

Product definition : Mixture

Classification according to Directive 1999/45/EC [DPD]

The product is classified as dangerous according to Directive 1999/45/EC and its amendments.

Classification : R10
 R67
 R52/53

Physical/chemical hazards : Flammable.

Human health hazards : Vapours may cause drowsiness and dizziness.

Environmental hazards : Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

See Section 16 for the full text of the R phrases or H statements declared above.

See Section 11 for more detailed information on health effects and symptoms.

2.2 Label elements

English (GB)

United Kingdom (UK)

1/13

SECTION 2: Hazards identification

- Hazard symbol or symbols** : Not applicable.
- Indication of danger** : Not applicable.
- Risk phrases** : R10- Flammable.
R67- Vapours may cause drowsiness and dizziness.
R52/53- Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
- Safety phrases** : S23- Do not breathe vapour or spray.
S38- In case of insufficient ventilation, wear suitable respiratory equipment.
- Hazardous ingredients** : n-butyl acetate
- Supplemental label elements** : Contains 2-ethylhexyl acrylate. May produce an allergic reaction.
- Special packaging requirements**
- Containers to be fitted with child-resistant fastenings** : Not applicable.
- Tactile warning of danger** : Not applicable.

2.3 Other hazards

- Other hazards which do not result in classification** : Not available.

SECTION 3: Composition/information on ingredients

Substance/mixture : Mixture

Product/ingredient name	Identifiers	%	Classification		Type
			67/548/EEC	Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]	
n-butyl acetate	EC: 204-658-1 CAS: 123-86-4 Index: 607-025-00-1	15-20	R10 R66, R67	Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H336	[1] [2]
1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine, polymer with formaldehyde, butylated methylated Lignoine : Nota(s) P	CAS: 68036-97-5	2.5-25	R52/53	Aquatic Chronic 3, H412	[1]
1-pentanol	EC: 232-453-7 CAS: 8032-32-4 Index: 649-263-00-9	<10	Xn; R65	Flam. Liq. 2, H225 Acute Tox. 4, H332 Asp. Tox. 1, H304	[1]
2-methylpropan-1-ol	EC: 200-752-1 CAS: 71-41-0 Index: 603-200-00-1	5-7	R10 Xn; R20 Xi; R37/38	Flam. Liq. 3, H226 Acute Tox. 4, H332 Skin Irrit. 2, H315 STOT SE 3, H335	[1]
2,6-dimethylheptan-4-one	EC: 201-148-0 CAS: 78-83-1 Index: 603-108-00-1	1-5	R10 Xi; R41, R37/38 R67	Flam. Liq. 3, H226 Skin Irrit. 2, H315 Eye Dam. 1, H318 STOT SE 3, H335 and H336	[1] [2]
heptane	EC: 203-620-1 CAS: 108-83-8 Index: 606-005-00-X	<10	R10 Xi; R37	Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H335	[1] [2]
Solvent naphtha	EC: 205-563-8 CAS: 142-82-5 Index: 601-008-00-2	1-2.5	F; R11 Xn; R65 Xi; R38 R67 N; R50/53	Flam. Liq. 2, H225 Skin Irrit. 2, H315 STOT SE 3, H336 Asp. Tox. 1, H304 Aquatic Acute 1, H400 Aquatic Chronic 1, H410	[1] [2]
Solvent naphtha	EC: 265-199-0	<0.25	R10	Flam. Liq. 3, H226	[1]

SECTION 3: Composition/information on ingredients

(petroleum), light arom. : Nota(s) P	CAS: 64742-95-6 Index: 649-356-00-4	Xn; R65 Xi; R37 R66, R67 N; R51/53 See Section 16 for the full text of the R-phrases declared above.	Skin Irrit. 2, H315 STOT SE 3, H335 STOT SE 3, H335 and H336i Asp. Tox. 1, H304 Aquatic Chronic 2, H411 See Section 16 for the full text of the H statements declared above.
---	--	---	--

There are no additional ingredients present which, within the current knowledge of the supplier and in the concentrations applicable, are classified as hazardous to health or the environment and hence require reporting in this section.

Type

- [1] Substance classified with a health or environmental hazard
- [2] Substance with a workplace exposure limit
- [3] Substance meets the criteria for PBT according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII
- [4] Substance meets the criteria for vPvB according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII

Occupational exposure limits, if available, are listed in Section 8.

Note - high Concentration Listed is a < Value

SUB codes represent substances without registered CAS Numbers.

SECTION 4: First aid measures

4.1 Description of first aid measures

- Eye contact** : Check for and remove any contact lenses. Immediately flush eyes with running water for at least 15 minutes, keeping eyelids open. Seek immediate medical attention.
- Inhalation** : Remove to fresh air. Keep person warm and at rest. If not breathing, if breathing is irregular or if respiratory arrest occurs, provide artificial respiration or oxygen by trained personnel.
- Skin contact** : Remove contaminated clothing and shoes. Wash skin thoroughly with soap and water or use recognised skin cleanser. Do NOT use solvents or thinners.
- Ingestion** : If swallowed, seek medical advice immediately and show the container or label. Keep person warm and at rest. Do not induce vomiting.
- Protection of first-aiders** : No action shall be taken involving any personal risk or without suitable training. It may be dangerous to the person providing aid to give mouth-to-mouth resuscitation.

4.2 Most important symptoms and effects, both acute and delayed

Potential acute health effects

- Eye contact** : May cause eye irritation.
- Inhalation** : Vapours may cause drowsiness and dizziness. Exposure to decomposition products may cause a health hazard. Serious effects may be delayed following exposure.
- Skin contact** : May cause skin irritation.
- Ingestion** : No known significant effects or critical hazards.

Over-exposure signs/symptoms

- Eye contact** : No specific data.
- Inhalation** : Adverse symptoms may include the following:
nausea or vomiting
headache
drowsiness/fatigue
dizziness/vertigo
- Skin contact** : No specific data.
- Ingestion** : No specific data.



SAFETY DATA SHEET

Date of issue/Date of revision : 12 March 2015

SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/ undertaking

1.1 Product identifier

Product name : 553500-00 Primer Black for Two-Tone cycle

Product code : A-F107486-FH

**Other means of
identification** : Not available.

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Product use : Industrial applications, Used by spraying.

Use of the substance/mixture : Coating.

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

PPG Industries Italia S.r.l.,

Via Serra, N. 1

15028 Quattordio (AL)

Italy

+39 0131 770 1

- Technical contact : DIVISIONE SVILUPPO PRODOTTI VERNICIANTI

- Tel : +39 0131 770 716

- Fax : +39 0131 773 731

**e-mail address of
person
responsible for this SDS** : EurMsdsContact@ppg.com

1.4 Emergency telephone number Supplier

Telephone number :

+39 0131 770 1 (0800-1700)

SECTION 2: Hazards identification

2.1 Classification of the substance or mixture

Product definition : Mixture

Classification according to Directive 1999/45/EC [DPD]

The product is classified as dangerous according to Directive 1999/45/EC and its amendments.

Classification R10

Xn; R20

Xi; R36/38

R43

R52/53

:

**Physical/chemical
hazards**

: Flammable.

Human health hazards : Harmful by inhalation. Irritating to eyes and skin. May cause sensitisation by skin contact.

2.1 Classification of the substance or mixture

Product definition : Mixture

Classification according to Directive 1999/45/EC [DPD].

Code : A-F107486-FH Date of issue/Date of revision : 12 March 2015
553500-00 Primer Black for Two-Tone cycle

SECTION 2: Hazards identification

Indication of danger : Harmful
Risk phrases : R10- Flammable.
R20- Harmful by inhalation.
R36/38- Irritating to eyes and skin.
R43- May cause sensitisation by skin contact.
R52/53- Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment

Safety phrases : S23- Do not breathe vapour or spray.
S24- Avoid contact with skin.
S37- Wear suitable gloves.
S38- In case of insufficient ventilation, wear suitable respiratory equipment.

Hazardous ingredients reaction product: bisphenol-A-(epichlorhydrin); epoxy resin
Supplemental label elements Contains epoxy constituents. See information supplied by the manufacturer. This information is provided by the present Safety Data Shee

See Section 16 for the full text of the R phrases or H statements declared above.
See Section 11 for more detailed information on health effects and symptoms.

2.2 Label elements

Hazard symbol or symbols :



Special packaging requirements

Containers to be fitted : Not applicable.

with child-resistant fastenings

Tactile warning of danger : Not applicable

2.3 Other hazards

Other hazards which donot result in classification : None known

Code : A-F107486-FH

Date of issue/Date of revision : 12 March 2015

553500-00 Primer Black for Two-Tone cycle

SECTION 3: Composition/information on ingredients

Substance/mixture :
Mixture

Product/ingredient name	Identifiers	%	67/548/EE C	Classification	
				Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]	Type
n-butyl acetate	REACH #: 01-2119485493-29 EC: 204-658-1 CAS: 123-86-4 Indeks: 607-025-00-1	≥11 - <20	R10 R66, R67	Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H336	[1] [2]
barium sulfate	EC: 231-784-4 CAS: 7727-43-7	≥10 - <25	Not classified.	Not classified	[2]
xylene	REACH #: 01-2119488216-32 EC: 215-535-7 CAS: 1330-20-7 Indeks: 601-022-00-9	≥5 - <10	R10 Xn; R20/21 Xi; R38	Flam. Liq. 3, H226 Acute Tox. 4, H312 Acute Tox. 4, H332 Skin Irrit. 2, H315	[1] [2]
Solvent naphtha (petroleum), light arom. : Nota(s) P	EC: 265-199-0 CAS: 64742-95-6 Indeks: 649-356-00-4	≥5 - <6	R10 Xn; R65 Xi; R37 R66, R67 N; R51/53	Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H335 STOT SE 3, H336 Asp. Tox. 1, H304 Aquatic Chronic 2, H411	[1]
1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine, polymer with formaldehyde, butylated	CAS: 68002-25-5	≥3 - <5	R53	Aquatic Chronic 4, H413	[1]
Hydrocarbons, C9, aromatics	REACH #: 01-2119455851-35 EC: 918-668-5 CAS: 64742-95-6	≥3 - <3.8	R10 Xn; R65 Xi; R37 R66, R67 N; R51/53	Flam. Liq. 3, H226 STOT SE 3, H335 STOT SE 3, H336 Asp. Tox. 1, H304 Aquatic Chronic 2, H411	[1]
1,2,4-trimethylbenzene	EC: 202-436-9 CAS: 95-63-6 Indeks: 601-043-00-3	≥2 - <3	R10 Xn; R20 Xi; R36/37/38 N; R51/53	Flam. Liq. 3, H226 Acute Tox. 4, H332 Skin Irrit. 2, H315 Eye Irrit. 2, H319 STOT SE 3, H335 Aquatic Chronic 2, H411	[1] [2]
butan-1-ol	REACH #: 01-2119484630-38 EC: 200-751-6	≥2.3 - <3	R10 Xn; R22	Flam. Liq. 3, H226 Acute Tox. 4, H302	[1] [2]

Code : A-F107486-FH Date of issue/Date of revision : 12 March 2015
 553500-00 Primer Black for Two-Tone cycle

SECTION 3: Composition/information on ingredients

2-butoxyethyl acetate	CAS: 71-36-3 Indeks: 603-004-00-6 REACH #: 01-2119475112-47 EC: 203-933-3 CAS: 112-07-2 Indeks: 607-038-00-2	≥1 - <3	Xi; R41, R37/38 R67 Xn; R20/21	Skin Irrit. 2, H315 Eye Dam. 1, H318 STOT SE 3, H335 STOT SE 3, H336 Acute Tox. 4, H312 Acute Tox. 4, H332	[1] [2]
2-butoxyethanol	REACH #: 01-2119475108-36 EC: 203-905-0 CAS: 111-76-2 Indeks: 603-014-00-0	≥1 - <3	Xn; R20/21/22 Xi; R36/38	Acute Tox. 4, H302 Acute Tox. 4, H312 Acute Tox. 4, H332 Skin Irrit. 2, H315 Eye Irrit. 2, H319 Acute Tox. 4, H332	[1] [2]
2-ethylhexan-1-ol	REACH #: 01-2119487289-20 EC: 203-234-3 CAS: 104-76-7	≥1 - <2	Xn; R20 Xi; R36/37/38	Acute Tox. 4, H332 Skin Irrit. 2, H315 Eye Irrit. 2, H319 STOT SE 3, H335 Not classified.	[1]
titanium dioxide	REACH #: 01-2119489379-17 EC: 236-675-5 CAS: 13463-67-7	≥1 - <3	Not classified.	Not classified.	[2]
epoxy resin (MW ≤ 700)	REACH #: 01-2119456619-26 EC: 500-033-5 CAS: 25068-38-6 Indeks: 603-074-00-8	≥1 - <2	Xi; R36/38 R43 N; R51/53	Skin Irrit. 2, H315 Eye Irrit. 2, H319 Skin Sens. 1, H317 Aquatic Chronic 2, H411 Flam. Liq. 2, H225	[1]
ethylbenzene	REACH #: 01-2119489370-35 EC: 202-849-4 CAS: 100-41-4 Indeks: 601-023-00-4	≥1 - <3	F; R11 Xn; R20	Flam. Liq. 2, H225 Acute Tox. 4, H332	[1] [2]
2-methoxy-1-methylethyl acetate	REACH #: 01-2119475791-29 EC: 203-603-9 CAS: 108-65-6 Indeks: 607-195-00-7	≥1 - <3	R10	Flam. Liq. 3, H226	[2]

There are no additional ingredients present which, within the current knowledge of the supplier and in the concentrations applicable, are classified as hazardous to health or the environment and hence require reporting in this section.

Type

[1] Substance classified with a health or environmental hazard

[2] Substance with a workplace exposure limit

[3] Substance meets the criteria for PBT according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII

[4] Substance meets the criteria for vPvB according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Annex XIII

Occupational exposure limits, if available, are listed in Section 8.

SUB codes represent substances without registered CAS Numbers.

Биографија кандидата

Сандра Грујић је рођена 24.02.1989. године у Крагујевцу. Средњу медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу завршила је 2004. године. Упоредо је завршила дипломске академске студије Биологије и Екологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу и дипломирала 2011/2012. године, чиме је стекла звање биолог/еколог. Мастер академске студије биологије је уписала школске 2012/2013. године, које је завршила 2014/2015. године са просечном оценом 9,47. Докторске академске студије биологије уписала је 2014/2015. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу и положила све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 9.83. У звање истраживач-приправник за научну област Биологија у Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу је изабрана 12.01.2015. године. У току свог научно-истраживачког рада стекла је знања у области изоловања и идентификације микроорганизама, формирању и испитивању отпорности индивидуалних и мешовитих биофилмова у присуству тешких метала, а истраживања су проширена и на примену биофилмова у уклањању тешких метала из отпадних вода.

Аутор је и коаутор 14 научних публикација – четири рада у међународним часописима са SCI листе (M22-2, M23-2), једног рада у водећем часопису националног значаја (M51), три рада у домаћем часопису националног значаја (M52), два саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34-2), два саопштења са скупа националног значаја штампано у изводу (M34) и два саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64).

Познаје рад на рачунару у OS Microsoft Windows и MS Office програму, програмском пакету IBM SPSS и у интернет програмима. Поседује знање енглеског језика.

Библиографија

Резултати ове докторске дисертације публиковани су у виду 11 библиографских јединица, и то три рада у научним часописима са SCI листе (M22-2, M23-1), три рада у националним часописима (M51-1, M52-2), једног саопштења на међународном скупу штампано у целини (M33), два саопштења на националном скупу штампано у целини (M63) и два саопштења на анционалним скуповима штампаним у изводу (M64).

1. Рад у истакнутом међународном часопису (M22)

1.1. Radojević, I.D., **Grujić, S.M.**, Ranković, B.R., Čomić, Lj.R., Ostojić, A.M. (2019): Single-species biofilms from autochthonous microorganisms: biotechnological potential in automotive wastewater treatment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, DOI.org/10.1007/s13762-019-02265-y. ISSN 1735-1472. M22, IF (2019) = 2.540.

1.2. **Grujić, S. M.**, Radojević, I. D., Vasić, S. M., Čomić, L. R., Ostojić, A. (2017). Comparison of the *Rhodotorula mucilaginosa* biofilm and planktonic culture on heavy metal susceptibility and removal potential. *Water Air and Soil Pollution*, 228:73, DOI 10.1007/s11270-017-3259-y. ISSN 0049-6979. IF (2016) = 1.702.

2. Рад у међународном часопису (M23)

2.1. **Grujić, S. M.**, Radojević, I. D., Vasić, S. M., Čomić, L. R., Ostojić, A. (2017). Heavy metal tolerance and removal potential in mixed-species biofilm. *Water, science and technology* 76(4), 806-812, DOI: 10.2166/wst.2017.248. ISSN 0273-1223. IF (2016) = 1.197.

3. Рад у водећем часопису националног значаја (M51)

3.1. **Grujić, S.M.**, Radojević, I.D., Vasić M. Sava, Čomić, Lj.R., Ostojić, A.M. (2018): Heavy metal tolerance and removal efficiency of the *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces boulardii* planktonic cells and biofilm. *Kragujevac Journal of Science*, 40, 217-226. ISSN 1450-9636. UDC 579.26:582.285.2+.232: 546.47+.48+.74

4. Научни рад објављен у часопису националног значаја (M52)

4.1. **Grujić, S. M.**, Radević, S., Radojević, I. D., Čomić, L. R., Ostojić, A. (2017). Difference in influence of commercial industrial paints on microbial biofilms and planktonic cells. *Kragujevac Journal of Science*, 39, 145-156. ISSN 1450-9636.

4.2. Buzejić, A., **Grujić, S.M.**, Radojević, I.D., Ostojić, A., Čomić, L.R., Vasić, S.M. (2016). Pb and Hg heavy metal tolerance of single- and mixed-species biofilm (*Rhodotorula mucilaginosa* and *Escherichia coli*). *Kragujevac Journal of Science*, 38, 115-124. ISSN 1450-9636.

5. Саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34)

5.1. **Grujić, S.**, Radojević, I., Ostojić, A., Čomić Lj., Vasić, S. (2016). Heavy metal tolerance of single and mixed-species biofilms. *Biofilms 7*, Poster session 2 (Topic: Biofilms, Industry and Energy) P2: 10. 26-28 June 2016. Porto, Portugal. *Biofilms7* –

Microbial Works of Art, Book of abstracts; pp. 87; Publisher: Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biologica; ISBN: 978-989-97478-7-6.

6. Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M63)

6.1. Ostojić, A., **Grujić, S.**, Simić, Z., Radojević, I. (2020): Uticaj odabranih teških metala na plankton i biofilmove mikroorganizama izolovanih iz otpadnih voda. Zbornik radova XXV Savetovanja o biotehnologiji, sa međunarodnim učešćem, 119-124. Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku. ISBN 978-86- 87611-73-3.

6.2. **Grujić, S.**, Radojević, I., Čomić, Lj., Ostojić, A. (2017). Izolacija, identifikacija i sposobnost formiranja biofilma mikroorganizama iz postrojenja za preradu otpadnih voda. Zbornik radova Konferencije „Zaštita voda 2017“, 343-35. Vršac. ISBN 978-86-916753-4-9. UDK: 628.316:579.836(497.113).

7. Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

7.1. Radojević, I., Ostojić, A., Čomić, Lj., Simić, Z., **Grujić, S.** (2018): Tolerancija i potencijal za uklanjanje teških metala biofilmova mikroorganizama izolovanih iz postrojenja za preradu otpadnih voda. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija 25-30.09.2018. Zbornik radova, Izdavač Srpsko biološko društvo, Beograd 325 str., str 107

7.2. **Grujić, S.**, Vasić, S., Radojević, I., Čomić, Lj., Ostojić, A. (2015). Uticaj teških metala na rast i toleranciju slobodnoživećih ćelija i biofilma odabranih vrsta kvasaca. Knjiga apstrakata Okrugli sto „Značaj studija zaštite životne sredine u zaštiti voda“ WWF 2015, 19-20. Univerzitet u Novom Sadu, PMF Novi Sad.



Single-species biofilms from autochthonous microorganisms: biotechnological potential in automotive wastewater treatment

I. D. Radojević¹ · S. M. Grujić¹ · B. R. Ranković¹ · L. R. Čomić¹ · A. M. Ostojić¹

Received: 25 October 2018 / Revised: 28 January 2019 / Accepted: 6 February 2019
© Islamic Azad University (IAU) 2019

Abstract

This study monitors the influence of basic automotive paints on plankton and biofilms of selected microorganisms isolated from the wastewater of an automotive factory. Minimum Biofilm Eradication Concentration-High Throughput Plates system was used for the simultaneous tolerance testing. Minimal inhibitory concentration and minimal lethal concentration of the tested substances were determined for both planktonic cells and their biofilms. The resistance level of biofilms was also tested in standard 96 microtiter plates, whereby the results for bacteria and yeasts were confirmed by the fluorescence microscopy. The results were mutually compared for both plankton and biofilms, as well as for plankton and biofilm of the same microorganisms. In no case, the resistance of the planktonic form was higher than the biofilm for the same microorganism. *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-F7 in the presence of basic color, as well as *Rhodotorula mucilaginosa* PMFKG-F8 in the presence of the thinner for rinsing paint, shows high sensitivity in planktonic form, whereby the same species are the most resistant in the form of biofilm for the same substances. The highest resistance to all test substances was shown by the biofilm of *R. mucilaginosa* PMFKG-F8, as well as *Candida utilis* PMFKG-F9 which was significantly resistant in both tested forms. The obtained results suggest that autochthonous microorganisms that form biofilms can significantly improve the process of removing car paints from the wastewater and being thus new grounds for the development of new biotechnologies.

Keywords Autochthonous microorganisms · Automotive paint · Biofilms · Biotechnological potential · Wastewater treatment

Introduction

In the production process, the automotive industry uses a lot of natural sources, especially water, producing in the same time various types of waste (Rivera and Reyes-Carrillo 2014). The primary source of hazardous waste products in the car production plant is the car painting process (Mildenberger and Khare 2000; Rivera and Reyes-Carrillo 2014). By applying the paint with a sprayer, the paint is scattered

and collected as a semi-hard, heterogeneous silt (Rivera and Reyes-Carrillo 2014). The European Union laws do not allow sludge to be stored in landfills due to the high content of organic carbon found in colors. The sludge is classified by EU code for waste disposal 080113 and is considered as a waste with hazardous characteristics (Salihoglu and Salihoglu 2016). Incineration of waste paints and varnishes is also not adequate due to the release of volatile substances that have a toxic effect (Cho et al. 2017). Most car colors, excluding those with metal ions, contain elements of organic origin that are susceptible to biological treatment (Ghosh et al. 2015).

New research, related to the degradation of color originating from the wastewater of different branches of industry, was based on the synthesis and characterization of nanoparticles of different oxide metals in photocatalyst and indicate their great potential (Divya et al. 2013; Gnanasekaran et al. 2016; Alhaji et al. 2017; Gnanasekaran et al. 2017; Salehi et al. 2017; Qin et al. 2017; Saravanan et al. 2018a, b; Mohd Adnan et al. 2019). So far, some low-cost materials, like

Editorial responsibility: R Saravanan.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13762-019-02265-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ I. D. Radojević
ivana@kg.ac.rs

¹ Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia



Comparison of the *Rhodotorula mucilaginosa* Biofilm and Planktonic Culture on Heavy Metal Susceptibility and Removal Potential

Sandra Grujić · Sava Vasić · Ivana Radojević ·
Ljiljana Čomić · Aleksandar Ostojić

Received: 21 September 2016 / Accepted: 10 January 2017 / Published online: 24 January 2017
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Abstract This study compares the effect of heavy metals (Hg^{2+} , Cu^{2+} , and Pb^{2+}) on the *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces boulardii* biofilm and planktonic cells. A MBECTM-HTP assay was used to test the levels of tolerance to heavy metals. The minimum inhibitory concentration (MICp) and minimum lethal concentration (MLCp) of the *R. mucilaginosa* and *S. boulardii* planktonic cells were determined, as well as minimum biofilm eradication concentration (MBEC). Metal removal efficiency was determined by batch biosorption assay. Previous studies had focused on heavy metal tolerance and removal efficiency of planktonic cells from *Rhodotorula* species only. Hence, our study presents and compares results for metal tolerance and removal efficiency of the *R. mucilaginosa* planktonic cells and biofilm. Biofilm tolerance was higher than the planktonic cells. The *R. mucilaginosa* planktonic cells showed the tolerance in the presence of Hg^{2+} (MICp 0.08 mM), Cu^{2+} (MICp 6.40 mM), and Pb^{2+} (MICp 3.51 mM), while the *S. boulardii* planktonic cells only tolerated Pb^{2+} (MICp 0.43 mM). The *R. mucilaginosa* biofilm showed the highest tolerance in the presence of Hg^{2+} (MBEC >0.31 mM), Cu^{2+} (MBEC >12.81 mM), Pb^{2+} (MBEC >7.12 mM), and obtained results were confirmed by fluorescence microscopy. *S. boulardii* did not show

potential in biofilm formation. The *R. mucilaginosa* biofilm exhibited better efficiency in removal of all tested metals than the planktonic cells. Metal removal efficiency was in the range from 4.79–10.25% for planktonic cells and 91.71–95.39% for biofilm.

Keywords *Rhodotorula mucilaginosa* · *Saccharomyces boulardii* · Biofilm · Planktonic cells · Heavy metal

1 Introduction

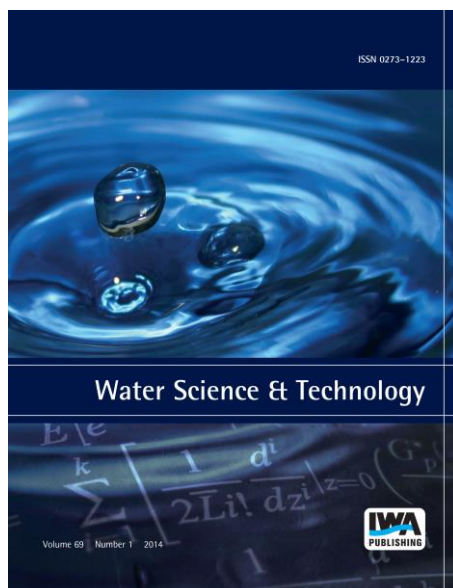
The environmental pollution by metals is a serious problem which negatively affects natural ecosystems (Chipasa 2003). On the other hand, it represents great potential for studying the interactions between microorganisms and metals (Gadd 2004). Heavy metal polluted environments are a source of undiscovered microbial diversity and specific microbial strains and understanding the processes which are involved in natural biogeochemical cycles, already fundamental for environmentally friendly biotechnologies (Pieper and Reineke 2000; Gadd 2010).

Microbes and metals interact at all spatial scales for centuries (Ehrlich 1997; Gadd 2004). Metals support microbial growth by providing essential nutrients, microbial activity alters metal solubility and their oxidation state (Ehrlich 1997). Nowadays, when our reliance on metals increases, also does their amount in the environment and living systems. The dichotomy between metabolic requirements for metals by microorganisms and the potential associated toxicity has created an

S. Grujić (✉) · S. Vasić · I. Radojević · L. Čomić ·
A. Ostojić
Department of Biology and Ecology, Faculty of Science,
University of Kragujevac, Kragujevac 34000, Republic of Serbia
e-mail: sandragrujic89vp@gmail.com

ELECTRONIC OFFPRINT

Use of this pdf is subject to the terms described below



This paper was originally published by IWA Publishing. The author's right to reuse and post their work published by IWA Publishing is defined by IWA Publishing's copyright policy.

If the copyright has been transferred to IWA Publishing, the publisher recognizes the retention of the right by the author(s) to photocopy or make single electronic copies of the paper for their own personal use, including for their own classroom use, or the personal use of colleagues, provided the copies are not offered for sale and are not distributed in a systematic way outside of their employing institution. **Please note that you are not permitted to post the IWA Publishing PDF version of your paper on your own website or your institution's website or repository.**

If the paper has been published "Open Access", the terms of its use and distribution are defined by the Creative Commons licence selected by the author.

Full details can be found here: <http://iwaponline.com/content/rights-permissions>

Please direct any queries regarding use or permissions to wst@iwap.co.uk

Heavy metal tolerance and removal potential in mixed-species biofilm

Sandra Grujić, Sava Vasić, Ljiljana Čomić, Aleksandar Ostojić and Ivana Radojević

ABSTRACT

The aim of the study was to examine heavy metal tolerance (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} and Cu^{2+}) of single- and mixed-species biofilms (*Rhodotorula mucilaginosa* and *Escherichia coli*) and to determine metal removal efficiency (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+}). Metal tolerance was quantified by crystal violet assay and results were confirmed by fluorescence microscopy. Metal removal efficiency was determined by batch biosorption assay. The tolerance of the mixed-species biofilm was higher than the single-species biofilms. Single- and mixed-species biofilms showed the highest sensitivity in the presence of Cu^{2+} (*E. coli*-MIC 4 mg/ml, *R. mucilaginosa*-MIC 8 mg/ml, *R. mucilaginosa/E. coli*-MIC 64 mg/ml), while the highest tolerance was observed in the presence of Zn^{2+} (*E. coli*-MIC 80 mg/ml, *R. mucilaginosa*-MIC 161 mg/ml, *R. mucilaginosa-E. coli*-MIC 322 mg/ml). The mixed-species biofilm exhibited better efficiency in removal of all tested metals than single-species biofilms. The highest efficiency in Cd^{2+} removal was shown by the *E. coli* biofilm (94.85%) and *R. mucilaginosa* biofilm (97.85%), individually. The highest efficiency in Cu^{2+} (99.88%), Zn^{2+} (99.26%) and Pb^{2+} (99.52%) removal was shown by the mixed-species biofilm. Metal removal efficiency was in the range of 81.56%–97.85% for the single- and 94.99%–99.88% for the mixed-species biofilm.

Key words | biofilms, *Escherichia coli*, heavy metal, mixed-, *Rhodotorula mucilaginosa*, single-

Sandra Grujić (corresponding author)
Sava Vasić
Ljiljana Čomić
Aleksandar Ostojić
Ivana Radojević
University of Kragujevac,
Faculty of Science,
Radoja Domanovića 12,
Kragujevac 34000,
Serbia
E-mail: sandragrujic89vp@gmail.com

INTRODUCTION

In the natural environment, biofilms have a great impact on our daily life (Elias & Banin 2012). Our current understanding of the physiology and complexity of the mixed-species biofilms are still in progress. Although the mixed-species biofilms represent the dominant form in the environment (Elias & Banin 2012), previous studies were still based mainly on the studies of the individual laboratory biofilms (Hall-Stoodley *et al.* 2004; Høiby *et al.* 2010).

The single-species biofilms were up to 65 times more tolerant to the influence of heavy metals than planktonic cells (Harrison *et al.* 2005b, 2006). The mixed-species biofilm were more tolerant to stressors such as antibiotics, disinfectants, heavy metals etc., than the single-species biofilm (Golby *et al.* 2014; Jahid & Ha 2014). The ability of microbial communities to cooperate and survive the impact of antimicrobial agents explains the tolerance in the mixed-species biofilms (Elias & Banin 2012). This ability turns the mixed-species biofilm into a practical tool that has potential

in bioremediation of contaminated environments (Golby *et al.* 2014).

One of the most serious environmental problems has been heavy metal pollution. Conventional methods of metal removal have proved to be ineffective when the concentration of the metal ions was low (1–100 mg/l) (Wang & Chen 2006). Biosorption presents a modern low-cost method that uses bacteria, algae, yeasts, filamentous fungi, etc. (planktonic form) (Fu & Wang 2011), but the use of biofilms is still in the process of evaluation. A successful bioremediation process relies on understanding the interactions between microbes and contaminants (Zhang *et al.* 1995). Biofilms that live in contaminated environments have usually developed effective multiple defence mechanisms for survival (Harrison *et al.* 2007). Regardless of the fact that heavy metals cause toxic effects, tolerance to heavy metals is a natural phenomenon that depends on the various conditions in which biofilms develop (Harrison

HEAVY METAL TOLERANCE AND REMOVAL EFFICIENCY OF THE *Rhodotorula mucilaginosa* AND *Saccharomyces boulardii* PLANKTONIC CELLS AND BIOFILM

Sandra M. Grujić, Ivana D. Radojević*, Sava M. Vasić,
Ljiljana R. Čomić, Aleksandar M. Ostojić

University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology,
Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

*Corresponding author; E-mail: ivana@kg.ac.rs

(Received March 11, 2018; Accepted May 12, 2018)

ABSTRACT. The impact of heavy metals, cadmium (Cd^{2+}), zinc (Zn^{2+}) and nickel (Ni^{2+}) on planktonic cells and biofilm of *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces boulardii* was examined. The metal tolerance testing was performed by MBECTM-HTP assay. The minimum inhibitory concentration (MIC_p) and minimum lethal concentration (MLC_p) were determined as well as the minimum biofilm eradication concentration (MBEC). Biofilm was more tolerant on the presence of heavy metals than the planktonic cells. The planktonic cells of *R. mucilaginosa* were tolerant to high concentrations of Cd^{2+} , Zn^{2+} and Ni^{2+} , while the planktonic cells of *S. boulardii* tolerated Zn^{2+} , exclusively. The *R. mucilaginosa* biofilm was tolerant to all of the tested metal concentrations and the obtained results were confirmed by fluorescence microscopy. *S. boulardii* did not show ability of biofilm formation. Metal removal efficiency of the *R. mucilaginosa* planktonic cells and biofilm were also tested. The *R. mucilaginosa* biofilm showed higher efficiency in metals removing compared to the planktonic cells. Until now, the heavy metal tolerance and the removal efficiency (Cd^{2+} , Zn^{2+} and Ni^{2+}) analyzes were performed solely on planktonic cells of *Rhodotorula* species. In this study, we investigated the metal removal efficiency of *R. mucilaginosa* planktonic cells and biofilm and compared the obtained results.

Keywords: biofilm, metals, tolerance, removal, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces boulardii*.

INTRODUCTION

An understanding of the nature of heavy metals, their relationships and toxicity or deficiency problems associated with them, is important for environmental protection. As more and more analytical data become available in the world literature, it is evident that considerable areas in many parts of the world have been contaminated with heavy metals, which present potential toxicity problems (ALLOWAY, 1995).

DIFFERENCE IN INFLUENCE OF COMMERCIAL INDUSTRIAL PAINTS ON MICROBIAL BIOFILMS AND PLANKTONIC CELLS

Sandra M. Grujić*, Stefan D. Radević, Ivana D. Radojević, Ljiljana R. Čomić,
Aleksandar M. Ostojić

University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34000
Kragujevac, Republic of Serbia

*Corresponding author: sandragrujic89vp@gmail.com

(Received March 12, 2017; Accepted May 5, 2017)

ABSTRACT. This study compares the effect of commercial industrial paints on the *Escherichia coli* PMFKG-F2, *Proteus mirabilis* PMFKG-F4 and *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-F6 planktonic cells and biofilms. A MBECTM-HTP assay and standard 96 microtiter plate assay were used to test the levels of resistance of planktonic cells and biofilms. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) of the tested substances, which affects planktonic cells and biofilms, were determined and the results were confirmed by fluorescence microscopy.

Results obtained for planktonic cells were compared between them and with the results obtained for biofilms. Noticeable difference in the resistance between the biofilms and the planktonic cells on paints, was observed. The *E. coli* PMFKG-F2 planktonic cells showed the highest resistance in the presence of the tested substance 2 (MIC_p 2.5 µl/ml), while the *P. mirabilis* PMFKG-F4 planktonic cells showed the highest resistance in the presence of the tested substance 2 (MIC_p 5 µl/ml). The *S. cerevisiae* PMFKG-F6 planktonic cells showed the same level of resistance in the presence of the tested substances 1, 2 and 5 (MIC_p 0.62 µl/ml). The *E. coli* PMFKG-F2, *P. mirabilis* PMFKG-F4 and *S. cerevisiae* PMFKG-6 biofilms showed the highest resistance in the presence of the tested substance 5 (MIC_b 125 µl/ml, MIC_b 125 µl/ml and MIC_b 62.5 µl/ml).

The obtained results suggest that the biofilm may have a potential to be used in bioremediation of wastewater contaminated with industrial paints.

Key words: planktonic cells, biofilm, industrial paint, resistance.

INTRODUCTION

Industrial production process results in production of different types of waste. Main source of dangerous waste matters in production facility, emerges during process of painting vehicles (GEFFEN and ROTHENBERG, 2000). PAPASAVVA *et al.* (2001) quote that industrial paints have the biggest impact on environment, whereby around 80% of all environmental problems comes directly from an automotive assembly plant (paint shop) and similar operational units (LOWELL *et al.*, 1993). The major environmental impacts of the automotive assembly plant (paint shop) are air emissions of regulated chemicals, including volatile organic compounds (VOCs) and hazardous pollutants. Paint and coating impact was reported

Pb AND Hg HEAVY METAL TOLERANCE OF SINGLE- AND MIXED-SPECIES BIOFILM (*Rhodotorula mucilaginosa* AND *Escherichia coli*)

**Anica Buzejić*, Sandra Grujić, Ivana Radojević, Aleksandar Ostojić,
Ljiljana Čomić, Sava Vasić**

*Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac,
Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia*

*Corresponding author; E-mail: anicabuzejic@gmail.com

(Received March 25, 2016)

ABSTRACT. The aim of this study was to examine heavy metal tolerance (lead (Pb^{2+}) and mercury (Hg^{2+})) of single- and mixed-species biofilms, formed by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* and bacteria *Escherichia coli* LM1. Single- and mixed-species biofilms were quantified by crystal violet test and the absorbance was measured using microplate reader (OD_{570}). The minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal lethal concentration (MLC) were determined and the results were confirmed by fluorescence microscopy.

The significant difference in lead tolerance was observed between the mixed- and the single-species biofilms. The MIC of lead (Pb^{2+}) for the examined biofilms (*E. coli* LM1, *R. mucilaginosa* and *R. mucilaginosa* / *E. coli*) was recorded at concentrations of 4000 $\mu g/ml$, 4000 $\mu g/ml$ and 16000 $\mu g/ml$, respectively. The MIC of mercury (Hg^{2+}) for the biofilms was noticed at concentrations of 31.25 $\mu g/ml$, 250 $\mu g/ml$ and 250 $\mu g/ml$, respectively. Standard antibiotics (amphotericin B and tetracycline) were used as positive control. Results obtained for single-species biofilms were compared in between and with the results obtained for mixed-species biofilm.

The tolerance of the mixed- species biofilm was higher in comparison to the single-species biofilms and the results were confirmed by a fluorescence microscope. The obtained results suggest that the *R. mucilaginosa* / *E. coli* biofilm may have a potential to be used in bioremediation of wastewaters contaminated with lead and mercury.

Key words: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Escherichia coli*, biofilm, mixed-species, heavy metals, tolerance.

INTRODUCTION

The increase of heavy metal concentration in wastewaters is a consequence of industrial development (AHLUWALIA and GOYAL, 2007). Heavy metals present a major problem for the environment and the human health. They are easily accumulated in body cells which leads to an increase of their concentration throughout the food chain (AHLUWALIA and GOYAL, 2007). Typical physical-chemical methods used for the removal of heavy metals from waste waters are inadequate, expensive and produce large quantities of harmful chemical sludge. Bioremediation is considered more suitable and cost-effective method because it involves the use of microorganisms for the purpose of removing heavy metals from wastewater (AHLUWALIA and GOYAL, 2007).

P2: 10

Heavy metal tolerance of single and mixed-species biofilms

Sandra Grujić, Ivana Radojević, Aleksandar Ostojić, Ljiljana Čomić, Sava Vasić

Faculty of science, University of Kragujevac, Serbia, Serbia; sandragrujic89vp@gmail.com

A study was undertaken to examine the tolerance of single and mixed biofilms for yeast *Rhodotorula* sp. and bacteria *Escherichia coli* LM1 (isolated from environment) on the presence of heavy metals (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} and Hg^{2+}). Single and mixed biofilms were quantified by crystal violet assay. Minimal inhibitory (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) for single and mixed biofilms were determined and results were confirmed by fluorescent microscopy. The largest difference in tolerance was observed in the presence of Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} and Cu^{2+} . MIC for Cd^{2+} for biofilms (*E. coli* LM1, *Rhodotorula* sp. and mixed biofilm) was noticed at a concentration of 26 057 $\mu\text{g/ml}$, 52 115 $\mu\text{g/ml}$ and 208 462 $\mu\text{g/ml}$, respectively. MIC for Zn^{2+} for biofilms was noticed at a concentration of 80 625 $\mu\text{g/ml}$, 161 250 $\mu\text{g/ml}$ and 322 500 $\mu\text{g/ml}$, respectively. MIC for Ni^{2+} for biofilms was noticed at a concentration of 38 437 $\mu\text{g/ml}$, 76 875 $\mu\text{g/ml}$ and 307 500 $\mu\text{g/ml}$, respectively. MIC for Cu^{2+} for biofilms was noticed at a concentration of 4000 $\mu\text{g/ml}$, 8000 $\mu\text{g/ml}$ and 64 000 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Difference in biofilms tolerance in the presence of Pb^{2+} (4000 $\mu\text{g/ml}$, 4000 $\mu\text{g/ml}$, 16 000 $\mu\text{g/ml}$) and Hg^{2+} (31.25 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$) was lower. The results of single biofilms were compared with each other and with the results obtained for mixed biofilm. Mixed biofilm tolerance to the presence of heavy metals was larger in comparison to single biofilms. Obtained results open up the possibility of potential use of mixed biofilms in bioremediation of waste water.

UTICAJ ODABRANIH TEŠKIH METALA NA PLANKTON I BIOFILMOVE MIKROORGANIZAMA IZOLOVANIH IZ OTPADNIH VODA

Aleksandar Ostojić¹, Sandra Grujić¹, Zoran Simić¹, Ivana Radojević¹

Izvod: U radu je ispitan uticaj jona metala (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} i Hg^{2+}) na plankton i biofilm bakterija i kvasaca izolovanih iz otpadnih voda postrojenja za prečišćavanje voda. Uticaj je izražen kao minimalna inhibitorna i minimalna letalna koncentracija jona metala za plankton i biofilme mikroorganizama. Rezultati pokazuju da najveći uticaj ima prisustvo Hg^{2+} na većinu mikroorganizama u formi planktona. Pojedine bakterije pokazuju osetljivost samo prema Cd^{2+} . Kvasci u planktonu su tolerisali samo niske koncentracije Hg^{2+} , a na uticaj drugih teških metala su pokazivali značajnu otpornost. Biofilm svakog mikroorganizma je znatno otporniji na prisustvo svih testiranih teških metala.

Ključne reči: teški metali, otpadne vode, mikroorganizmi, plankton, biofilm

Uvod

Razvoj društva i industrijalizacija su doveli do oslobađanja zagađujućih materija, poput teških metala u životnu sredinu, naročito vode. Najčešće vrste teških metala koje se mogu naći u zagađenim staništima su arsen, barijum, kadmijum, hrom, olovo, živa, nikl i cink (Conrad et al., 2007). Tokom vremena razvijen je veliki broj tehnika za tretman otpadnih voda, počevši od tradicionalnih, dobro poznatih metoda, koje se zasnivaju na procesima hemijske precipitacije krečom ili procesima oksido-redukcije, koagulacije i flotacije (Fu and Wang, 2011). Mnoge od metoda, iako efikasne, su i veoma skupe, a zahtevaju veliki utrošak energije, taloži se velika količina toksičnog mulja, pri čemu su se pokazale neefikasnim kada su u pitanju niske koncentracije jona metala ($1\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$) (Wang and Chen, 2006). Zato je mogućnost korišćenja živih mikroorganizama privukla pažnju istraživača (Fu and Wang, 2011). Za razliku od fizičko-hemijskih metoda, primena bioloških metoda je dovela kako do pristupačnije cene, tako i veće efikasnosti u uklanjanju i visokih i niskih koncentracija jona metala (Wang and Chen, 2006).

Do skoro su mikrobiolozi bili fokusirani na slobodno-plivajuće mikroorganizme (plankton) odgajane u vidu čistih laboratorijskih kultura. Brojna istraživanja su već rađena na temu tolerancije slobodno-plivajućih bakterija u prisustvu metala (Rathnayake et al., 2010). U prirodi većina bakterija živi u formi biofilma, koja predstavlja zajednicu u kojoj se fenotip ćelija razlikuje od fenotipa planktona (Fu and Wang, 2011). Iz tog razloga u istraživanjima se često uticaj jona teških metala uporedo testira i na plankton i biofilm različitih mikroorganizama

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (aleksandar.ostojic@pmf.kg.ac.rs);

IZOLACIJA, IDENTIFIKACIJA I SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMA MIKROORGANIZAMA IZ POSTROJENJA ZA PRERADU OTPADNIH VODA

Sandra Grujić, Ivana Radojević, Ljiljana Čomić,
Aleksandar Ostojić

*Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića
12., 34000, Srbija, email: sandragrujic89vp@gmail.com*

REZIME

Izolacija i identifikacija mikroorganizama iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda u Cvetujevcu (Kragujevac), izvršena je u cilju izolacije mikroorganizama i njihove selekcije u odnosu na sposobnost formiranja biofilma. Preliminarna karakterizacija izvršena je upotrebom komercijalnih testova. Primenom Mikrogen testa identifikovane su tri vrste enterobakterija: *Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Proteus mirabilis*. Primenom selektivnih podloga izolovan je rod *Bacillus* i po dve vrste iz rodova *Staphylococcus* i *Streptococcus*. *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-CV1 i *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-CV2 identifikovane su primenom API 20 C AUX. Svi testirani mikroorganizmi su pokazali sposobnost formiranja biofilma, dok je produkcija biofilma bila najbolja kod *P. mirabilis* i *S. cerevisiae* PMFKG-CV1.

KLJUČNE REČI: otpadne vode, bakterije, kvasci, biofilm, identifikacija.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND BIOFILM FORMATION OF MICROORGANISMS FROM PLANT FOR WASTEWATER TREATMENT

ABSTRACT

Isolation and identification of microorganisms from the wastewater treatment plant in Cvetujevac (Kragujevac) was performed in order to isolate microorganisms with the ability to form a biofilm. Preliminary characterization was carried out using different commercial assays. Three strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Proteus mirabilis* were identified by Mikrogen assay. *Bacillus*, and two species each from genus *Staphylococcus* and *Streptococcus* were isolated using selective media. *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-CV1 and *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-CV2 were identified by API 20 C AUX. All microorganisms showed potential for biofilm formation, while the biofilm production was the best with *P. mirabilis* and *S. cerevisiae* PMFKG-CV1.

KEY WORDS: wastewater, bacteria, yeast, biofilm, identification.

Tolerancija i potencijal za uklanjanje teških metala biofilmova mikroorganizama izolovanih iz postrojenja za preradu otpadnih voda

Ivana Radojević¹, Aleksandar Ostojić¹, Ljiljana Čomić¹, Zoran Simić², Sandra Grujić¹

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Kragujevac, Srbija, ivana.radojevic@pmf.kg.ac.rs

²Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Institut za hemiju, Kragujevac, Srbija

Mikroorganizmi (*Enterobacter cloacae*, *Serratia odorifera* i *Saccharomyces cerevisiae* PMFKG-CV22) su izolovani iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda (Kragujevac, Srbija). Testirana je njihova sposobnost da formiraju pojedinačne i mešovite biofilme, kao i njihova tolerancija na prisustvo izabranih teških metala (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn). Formiranje biofilmova i njihova tolerancija na izabrane teške metale je izvršena u polistirenskim mikrotitarskim plejtovima (SARSTEDT) po metodi Adam i saradnika¹ sa određenim modifikacijama, dok je kvantifikacija izvršena pomoću kristal violet (CV) testa.² Spektrofotometrijskim očitavanjem na mikroplejt čitaču (OD₆₅₀) određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna letalna koncentracija (MLK) biofilmova. Rezultati pokazuju da *S. odorifera* individualno pokazuje najveću toleranciju na prisustvo izabranih teških metala, sa izuzetkom Ni i Zn u čijem prisustvu je tolerantna i *S. cerevisiae* PMFKG-CV22. Dvospecijski biofilm *E. cloacae/S. cerevisiae* PMFKG-CV22 u prisustvu svih testiranih metala, izuzev Cu, pokazuje značajno veću toleranciju od biofilma *E. cloacae/S. odorifera*. Biofilm, koga su formirale vrste *E. cloacae/S. cerevisiae/S. odorifera*, pokazao je najveću osetljivost na prisustvo svih testiranih metala. Kod testiranih vrsta nije uočena značajno veća tolerancija na teške metale kod mešovitih biofilmova u odnosu na individualne biofilme.

1. Adam, B., Baillie, G.S. Douglas, L.J., 2002, J. Med. Microbiol. 51:344-349.

2. Almeida, C., Azevedo, N.F., Santos, S., et al., 2011, PLoS One 6:e14786.

Zahvalnica: Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, projekat III41010.



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

**Departman za hemiju, biohemiju
i zaštitu životne sredine**

**Udruženje za unapređenje zaštite
životne sredine „Novi Sad“**

i

**Fondacija Docent dr Milena
Dalmacija**



WW 2015

**Okrugli sto “Značaj studija zaštite životne
sredine u zaštiti voda”**

23-25.09.2015. Novi Sad

KNJIGA APSTRAKATA



<http://milenadalmacija.com>

Uticaj teških metala na rast i toleranciju slobodnoživećih ćelija i biofilma odabranih vrsta kvasaca

Sandra Grujić^{1*}, Sava Vasić¹, Ivana Radojević¹, Ljiljana Čomić¹ i Aleksandar Ostojić¹

¹*Prirodno matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republika Srbija.*

*Autor. E-mail: sandragrujic89vp@gmail.com

Sažetak

Teški metali predstavljaju česte zagađivače vodene životne sredine. Uobičajne fizičko-hemijske metode koje se koriste za uklanjanje teških metala iz životne sredine često su neefikasne, mogu biti veoma skupe, najčešće stvaraju veliku količinu toksičnih intermedijera i remete prirodne procese u sredini. Bioremedijacija, biološka metoda koja podrazumeva upotrebu mikroorganizama u svrhu uklanjanja zagađivača, predstavlja alternativnu metodu kako sa ekološkog tako i sa ekonomskog stanovišta. Formiranje biofilma kod kvasaca povećava njihovu toleranciju na kompleksna zagađenja životne sredine. Stoga, potencijal kvasaca za primenu u bioremedijaciji zavisi od njihove sposobnosti da tolerišu prisustvo različitih teških metala i da formiraju biofilm. Cilj ovog rada je analiza potencijala kvasaca vrsta *Rhodotorula* sp. i *Saccharomyces bulardii* da tolerišu visoke koncentracije teških metala, kako bi se kasnije ispitala njihova primena u bioremedijaciji zagađenih voda.

Za ispitivanje uticaja teških metala na rast i toleranciju slobodnoživećih ćelija i biofilma odabranih vrsta kvasaca, korišćen je MBECTM - HTP test model pri čemu je korišćena mikrotitarska ploča sa 96 otvora (1). Određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna letalna koncentracija (MLKp) slobodnoživećih ćelija vrsta *Rhodotorula* sp. i *Saccharomyces bulardii* kao i minimalna suzbijajuća koncentracija biofilma (MBEK). Testirane koncentracije odabranih jona metala (Pb^{2+} i Cu^{2+}) poreklom iz $Pb(NO_3)_2$ i $CuSO_4$, bile su 20 puta veće u odnosu na maksimalne koncentracije dozvoljene Pravilnikom o štetnim materijama Ministarstva životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja (2). Slobodnoživeće ćelije i biofilm *Rhodotorula* sp. i *Saccharomyces bulardii* bojani su akridin oranž bojom koja se koristi za detektovanje i određivanje ukupnog broja ćelija kvasaca a zatim posmatrani na fluorescentnom mikroskopu. Rast slobodnoživećih ćelija i biofilma meren je i očitavanjem apsorbancije na 620 nm (OD_{620}) pomoću čitača ELISA microplate reader.

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj studiji, slobodnoživeće ćelije *Rhodotorula* sp. pokazale su rast u prisustvu visokih koncentracija Pb^{2+} (5.27 mM) i Cu^{2+} (9.61 mM) u odnosu na slobodnoživeće ćelije *Saccharomyces bulardii* kod koga je detektovan rast samo u prisustvu jona metala Pb^{2+} (0.43 mM).

Testirana je tolerancija biofilma *Rhodotorula* sp. i *Saccharomyces bulardii* prema Pb^{2+} i Cu^{2+} i na osnovu rezultata pokazano je da je samo biofilm *Rhodotorula* sp. tolerantan na sve testirane koncentracije Pb^{2+} i Cu^{2+} , nakon 48 h izlaganja dejstvu ovih metala. Raspon koncentracija za Pb^{2+} bio je: 0.21, 0.43, 0.87, 1.75, 3.51, 5.27, 7.03 mM, dok je za Cu^{2+} bio: 0.40, 0.81, 1.60, 3.20, 6.40, 9.61, 12.81 mM. Biofilm *Saccharomyces bulardii* nije pokazao potencijal u formiranju biofilma ni na jednoj testiranoj koncentraciji.

Takođe, rezultatima ove studije pokazano je i da je biofilm *Rhodotorula* sp. na prisustvo teških metala tolerantniji u odnosu na slobodnoživeće ćelije, u poređenju sa biofilmom *Saccharomyces bulardii* kod koga to nije slučaj.

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Сандра М. Грујић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БИОФИЛМОВА И ПРОЦЕНА ЊИХОВЕ
ЕФИКАСНОСТИ У УКЛАЊАЊУ ПОЛУТАНАТА У БИОЛОШКОМ
ТРЕТМАНУ ОТПАДНИХ ВОДА

која је одбрањена на Природно-математичком факултету у Крагујевцу Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 27.7.2021. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Сандра М. Грујић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БИОФИЛМОВА И ПРОЦЕНА ЊИХОВЕ
ЕФИКАСНОСТИ У УКЛАЊАЊУ ПОЛУТАНАТА У БИОЛОШКОМ
ТРЕТМАНУ ОТПАДНИХ ВОДА

која је одбрањена на Природно-математичком факултету у Крагујевцу Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 27.7.2021. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>