

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Dora S. Ilić

HROM-REDUKUJUĆI MIKROORGANIZMI
U BIOREMEDIJACIJI ZEMLJIŠTA
ZAGAĐENOG TEŠKIM METALIMA

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Dora S. Ilić

CHROMIUM-REDUCING
MICROORGANISMS IN
BIOREMEDIATION OF HEAVY METALS
CONTAMINATED SOIL

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

POLJOPRIVREDNI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

MENTOR:

Dr Blažo Lalević, vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Vera Raičević, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Dragan Kiković, redovni profesor u penziji
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kosovskoj Mitrovici

Dr Gordana Gojgić Cvijović, naučni savetnik
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

Dr Igor Kljujev, vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Istraživanja u okviru disertacije su finansirana iz sredstava projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije "Biodiverzitet kao potencijal u ekoremedijacionim tehnologijama oštećenih ekosistema" (TR 31080) i međunarodnog projekta "Advancing Research in Agricultural and Food Sciences at Faculty of Agriculture" (AREA, 316004).

Veliku zahvalnost dugujem mentoru, prof. dr Blaži Laleviću na ukazanoj prilici, razumevanju, motivaciji, nesebičnoj stručnoj pomoći, kao i na uloženom trudu prilikom realizacije doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Veri Raičević na velikoj pomoći i savetima, koji su doprineli unapređenju ove teze.

Zahvalnost dugujem i prof. dr Draganu Kikoviću za sve sugestije tokom pisanja doktorata.

Veliko hvala dr Gordani Gojgić Cvijović na trudu, vremenu i pažnji posvećenoj izradi ove doktorske teze.

Neizmernu zahvalnost dugujem koleginicama sa Katedre za ekološku mikrobiologiju, posebno Veri, Danki, Jeleni i Bojani, bez kojih bi nastanak ove disertacije bio mnogo teži.

Najveću zahvalnost dugujem mom suprugu, deci i roditeljima, kojima ujedno i posvećujem ovaj rad.

Autor

HROM-REDUKUJUĆI MIKROORGANIZMI U BIOREMEDIJACIJI ZEMLJIŠTA ZAGAĐENOG TEŠKIM METALIMA

REZIME

Mnogobrojne industrijske aktivnosti, osim koristi za ljudsku populaciju, imale su za posledicu povećanje sadržaja teških metala i promene diverziteta živih organizama u životnoj sredini. Cilj ovog rada bio je ispitivanje uticaja visokih koncentracija teških metala na mikrobni diverzitet zemljišta i mogućnosti primene ekoremedijacionih tehnologija u cilju saniranja posledica industrijske aktivnosti. Istraživanja su obavljena na području bivše fabrike "Rog" (Ljubljana, Republika Slovenija). Ispitivanje mikrobnog diverziteta obavljeno je primenom standardnih metoda. Rezultati istraživanja ukazuju da je brojnost hrom-rezistentnih bakterija i gljiva bila različita i zavisila je od koncentracije hroma u podlozi, pH vrednosti podloge i lokacije uzorkovanja. Iz kontaminiranih uzoraka zemljišta, ukupno su izolovana 53 izolata hrom-rezistentnih bakterija. Među njima dominiraju gram-pozitivne štapičaste sporogene bakterije. Morfološkom i molekularnom identifikacijom bakterijski izolati su svrstani u rod *Bacillus* sp. Rast hrom-rezistentnih gljiva je zavisio od istih faktora kao i kod hrom-rezistentnih bakterija. Gljive su morfološki identifikovane i svrstane u rodove *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. i *Penicillium* sp. Stepem redukcije Cr(VI) zavisio je od njegove početne koncentracije, bakterijskih izolata i vremena inkubacije. Svi bakterijski izolati su bili sposobni za kompletnu ili delimičnu redukciju različitih početnih koncentracija Cr(VI). Precizno morfološki okarakterisane i molekularno identifikovane mikrobne populacije u interakciji sa biljkama tolerantnim na prisustvo metala, predstavljaju nezamenljive karike bioremedijacionih tehnologija. Rezultati ove doktorske disertacije imaju, osim naučnog, i aplikativni značaj i mogu se primeniti u remedijaciji zemljišta kontaminiranih industrijskim otpadom.

Ključne reči: mikroorganizmi, bioremedijacija, teški metali, hrom

Naučna oblast: Mikrobiologija

Uža naučna oblast: Ekološka mikrobiologija

UDK: 502.174.2:631.466(043.3)

CHROMIUM-REDUCING MICROORGANISMS IN BIOREMEDIATION OF HEAVY METALS CONTAMINATED SOIL

ABSTRACT

The numerous industrial activities, except of the benefits for the human population, resulted in an increase in the content of heavy metals and a change in the diversity of living organisms in the environment. The aim of this dissertation was to examine the influence of high concentrations of heavy metals on the microbial diversity of the soil and the possibility of applying ecoremediation technologies in order to remedy the consequences of industrial activity. The research was carried out on the location of the former factory "Rog" (Ljubljana, Republic of Slovenia). Examination of microbial was carried out with using of standard methods. The results of the study indicate that the number of chromium-resistant bacteria and fungi was different and it depended on the concentration of chromium in the substrate, substrate pH and sampling location. From contaminated soil samples, 53 isolates of chromium-resistant bacteria were isolated. Among them, gram-positive rod-shaped spore-forming bacteria dominate. By morphological and molecular identification, bacterial isolates are classified into the genus *Bacillus sp.* The growth of chromium resistant fungi depend on the same factors as for chromium-resistant bacteria. Fungi have been morphologically identified and classified into the genus *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* and *Penicillium sp.* The degree of reduction Cr (VI) depended on its initial concentration, bacterial isolates and incubation times. All bacterial isolates were capable of complete or partial reduction of different initial concentrations of Cr (VI). Precisely morphologically characterized and molecularly identified microbial populations interacting with plants tolerant to the presence of metals are irreplaceable players in bioremediation technologies. The results of this dissertation have scientific and applicative significance, and can be applied in the remediation of soil contaminated with industrial waste.

Key words: microorganisms, bioremediation, heavy metals, chromium

Scientific field: Microbiology

Scientific discipline: Microbial ecology

UDK: 502.174.2:631.466(043.3)

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature.....	4
2.1. POREKLO HROMA U ŽIVOTNOJ SREDINI	5
2.2. BIOLOŠKI ZNAČAJ HROMA.....	5
2.3. TOKSIČNOST HROMA ZA ŽIVE ORGANIZME.....	6
2.4. TOLERANTNOST MIKROORGANIZAMA NA TEŠKE METALE	8
2.4.1. Uklanjanje metala promenom propustljivosti i biosorpcijom	8
2.4.2. Uklanjanje metala aktivnim transportom	9
2.4.3. Intracelularno kapsuliranje teških metala	9
2.4.4. Ekstracelularno kapsuliranje teških metala	9
2.5. MEHANIZMI MIKROBNE DETOKSIFIKACIJE HROMA	10
2.5.1. Biohemijske i fiziološke osnove uklanjanja hroma i njegovih jedinjenja.....	10
2.5.2. Neenzimska remedijacija.....	11
2.5.3. Enzimska remedijacija.....	11
2.5.4. Aerobna redukcija hroma	12
2.5.5. Anaerobna redukcija hroma.....	13
2.6. HROM-REDUKUJUĆE BAKTERIJE U PROCESIMA BIOREMEDIJACIJE	14
2.7. MIKROBIOLOŠKA REDUKCIJA CR(VI) U PRISUSTVU STIMULATORA I INHIBITORA REDUKCIJE	17
2.8. OPTIMIZACIJA USLOVA ZA MIKROBNU REDUKCIJU CR(VI)	18
2.9. HROM-REDUKUJUĆE GLJIVE U PROCESIMA BIOREMEDIJACIJE.....	20
2.10. TOLERANTNOST BILJAKA PREMA PRISUSTVU HROMA U SUPSTRATU.....	22
2.11. BILJNO-MIKROBNE INTERAKCIJE U REDUKCIJI CR(VI).....	26
3. Cilj istraživanja	29
4. Materijal i metode	31
4.1. ISTORIJAT INDUSTRIJSKIH AKTIVNOSTI I KONTAMINACIJE NA ISPITIVANOM LOKALITETU.....	31
4.2. KLIMATSKE KARAKTERISTIKE.....	33

4.2.1.	Temperatura vazduha	34
4.2.2.	Količina padavina	36
4.2.3.	Relativna vlažnost vazduha	39
4.2.4.	Oblačnost	41
4.3.	OBJEKAT ISTRAŽIVANJA I UZIMANJE UZORAKA ZEMLJIŠTA	44
4.4.	HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA UZORAKA ZEMLJIŠTA	45
4.4.1.	Osnovne hemijske analize	45
4.4.2.	Određivanje sadržaja metala u uzorcima brownfield zemljišta.....	45
4.5.	MIKROBIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA UZORAKA BROWNFIELD ZEMLJIŠTA.....	45
4.5.1.	Određivanje brojnosti hrom-rezistentnih bakterija.....	47
4.5.2.	Određivanje brojnosti hrom-rezistentnih gljiva.....	48
4.6.	IZOLACIJA I DOBIJANJE ČISTIH KULTURA HROM-REZISTENTNIH BAKTERIJA I GLJIVA	48
4.7.	ISPITIVANJE MORFOLOŠKIH OSOBINA HROM-REZISTENTNIH BAKTERIJSKIH IZOLATA	49
4.8.	MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA GLJIVA	49
4.9.	ISPITIVANJE TOLERANTNOSTI BAKTERIJSKIH IZOLATA NA PRISUSTVO HROMA	50
4.10.	ODREĐIVANJE MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJA (MIK) HROMA(VI)	50
4.11.	IDENTIFIKACIJA MIKROORGANIZAMA.....	51
4.11.1.	Identifikacija bakterijskih izolata primenom api-testa	51
4.11.2.	Molekularna identifikacija bakterijskih izolata primenom metode polimeraza lančane reakcije (pcr)	51
4.11.3.	Morfološka identifikacija gljiva	52
4.12.	REDUKCIJA HROMA(VI) POMOĆU BAKTERIJSKIH IZOLATA I PRAĆENJE RASTA BAKTERIJA	52
4.12.1.	Ispitivanje sposobnosti redukcije hroma(vi) pomoću bakterijskih izolata	52
4.12.2.	Bakterijski rast tokom redukcije hroma	53
4.13.	RAST BILJAKA NA ZEMLJIŠTU KONTAMINIRANOM TEŠKIM METALIMA	53
4.14.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	55
5.	Rezultati i diskusija.....	56
5.1.	HEMIJSKE KARAKTERISTIKE ISPITIVANOG ZEMLJIŠTA	56
5.2.	SADRŽAJ METALA U ISPITIVANIM UZORCIMA ZEMLJIŠTA.....	59

5.3. MIKROBNI DIVERZITET UZORAKA ZEMLJIŠTA KONTAMINIRANIH TEŠKIM METALIMA	61
5.4. BROJNOST HROM-REZISTENTNIH MIKROORGANIZAMA	67
5.4.1. Brojnost hrom-rezistentnih bakterija	67
5.4.2. Brojnost hrom-rezistentnih gljiva	68
5.5. IZOLACIJA I MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA HROM-REZISTENTNIH BAKTERIJA	69
5.6. TOLERANTNOST BAKTERIJA NA PRISUSTVO HROMA	72
5.7. MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIK) HROM-REZISTENTNIH BAKTERIJA I GLJIVA	73
5.7.1. Minimalne inhibitorne koncentracije (mik) hrom-rezistentnih bakterija	73
5.7.2. Minimalne inhibitorne koncentracije (mik) hrom-rezistentih gljiva	76
5.8. IDENTIFIKACIJA IZOLOVANIH MIKROORGANIZAMA	77
5.8.1. Identifikacija izolovanih bakterija api metodom	77
5.8.2. Identifikacija izolovanih bakterija pomoću polimeraza lančane reakcije (pcr)	79
5.8.3. Identifikacija gljiva morfološkim metodama	81
5.9. UTICAJ BAKTERIJSKIH IZOLATA NA REDUKCIJU CR(VI)	83
5.10. KINETIKA RASTA BAKTERIJSKIH IZOLATA TOKOM REDUKCIJE CR(VI)	88
5.11. KLIJAVOST SEMENA, BIOMASA I DUŽINA KLIJANACA U SUPSTRATU SA KONTAMINIRANIM ZEMLJIŠTEM	96
5.11.1. Klijavost semena u supstratu sa kontaminiranim zemljištem	96
5.11.2. Biomasa biljaka u prisustvu kontaminiranog zemljišta u supstratu	100
5.11.3. Dužina klijanaca u prisustvu kontaminiranog zemljišta u supstratu	100
6. Zaključak	108
7. Literatura	112

1. UVOD

Tokom čitave svoje istorije, čovek je uticao na promenu kvaliteta životne sredine. Početak iskorišćavanja prirodnih resursa i pojava prvih zagađenja životne sredine su nastali izgradnjom prvih naselja, krčenjem šuma, korišćenjem ruda za izradu predmeta od metala, izgradnjom stambenih objekata i puteva. Ovi problemi su se uvećali nakon nastanka srednjovekovnih gradova, kada se povećavao broj stanovnika, a samim tim su nastali problemi vezani za obezbeđivanje pijaće vode i zbrinjavanje otpadnih voda. To je bio trenutak početka narušavanja kvaliteta životne sredine, što se naročito osetilo tokom nagle industrijalizacije u poslednjih 200 godina. Nijedan proces tokom nastanka moderne civilizacije nije toliko negativno uticao na životnu sredinu kao industrijalizacija. Zato se s pravom smatra da je industrija, od samog njenog nastanka, jedan od najvećih zagađivača životne sredine. Industrijsko-tehnološki rast, kao jedan od stubova razvoja i napretka današnjeg društva, zasnovan je upravo na potrebi za stalnim iscrpljivanjem neobnovljivih prirodnih resursa i degradaciji antroposfere, radi zadovoljavanja potrebe čoveka za stvaranjem materijalnih dobara i praćenjem trendova koje nameće i diktira potrošačko društvo.

U sredini koja nas okružuje, konstantno se povećava broj kontaminiranih lokacija, za šta su odgovorne različite industrijske aktivnosti - ili kao posledica dugogodišnje nebrige i primene zastarelih tehnologija, ili kao rezultat aktuelnih akcidentnih situacija. Jedan od takvih recidiva industrijske prošlosti sa nerešenim statusom se nalazi i u Republici Sloveniji, u starom gradskom jezgru Ljubljane, u Trubarevoj ulici br. 72, na obali reke Ljubljanice. Na toj lokaciji se već oko 150 godina nalazi industrijski objekat. U vreme kada je nastao, 1871. godine, objekat se nalazio na zemljištu koje je pripadalo Šempeterskom predgrađu. Objekat je od prvobitne kožarske radionice prerastao u kožaru. Međutim, 50-ih godina XX veka na ovoj lokaciji su podignuti pogoni Fabrike bicikala „Rog“. Ova fabrika je odigrala značajnu ulogu u privrednom razvoju Republike Slovenije, jer je svoje proizvode plasirala na tržište svih šest republika tadašnje Jugoslavije, ali i izvozila na tržišta drugih zemalja, kao što su SAD i Kina. Za vreme

najuspešnijeg perioda, krajem osamdesetih godina, fabrika je proizvodila 300-350 hiljada bicikala godišnje. Početkom 90-ih godina, nakon smanjenja ekonomske opravdanosti proizvodnje i raspada bivše zajedničke države, proizvodnja u fabrici „Rog“ se polako smanjivala i gasila, tako da je 1994. godine proizvodnja u ovoj fabrici potpuno zaustavljena.

Sve industrijske aktivnosti na ovoj lokaciji, počev od radionice za štavljenje koža pa do fabrike za proizvodnju bicikala, ostavile su traga na okolnom biotopu u vidu višedecenijske kontaminacije različitim teškim metalima, među kojima je najznačajnije zagađenje hromom.

Postupci građenja objekata sredinom 20. veka nisu bili definisani propisima iz oblasti zaštite životne sredine, jer tada takvi propisi nisu ni postojali. Nakon definitivnog napuštanja objekta 90-ih godina 20. veka, objekat je ostao nezaštićen od atmosferskih uticaja i korišćen je kao nelegalno odlagalište komunalnog i infektivnog otpada. Proizvodne linije u suterenu i kade za galvanizaciju sa ostacima tečnosti koje su se koristile u Pogonu za galvanizaciju, su popucale i njihov sadržaj se izlio van zidina objekta. Zbog blizine reke Ljubljanice, to i danas predstavlja izuzetnu opasnost za živi svet reke i okolno stanovništvo. Tragovi izlivanja otpadnih procednih voda iz pogona za galvanizaciju fabrike Rog vidljivi su i sa ulice i obližnjeg parkinga ispred samog objekta, pored reke Ljubljanice. Slivanje atmosferskih voda zagađenih ovim ostacima tečnosti iz Pogona za galvanizaciju već godinama ugrožava floru i faunu rečnog ekosistema Ljubljanice zbog visoke koncentracije hroma(VI), kao i drugih štetnih jedinjenja. Zbog toga je neophodno preduzeti adekvatne mere za zaštitu i sanaciju zagađenog područja.

Podaci i iskustva iz literature i prakse pokazuju da je za ovakve slučajeve idealno rešenje primena postupaka bioremedijacije, odnosno korišćenja autohtonih sojeva mikroorganizama sa samog lokaliteta u cilju „čišćenja“ i revitalizacije zemljišta zagađenog različitim polutantima. U tu svrhu najidealnije je koristiti sojeve koji su rezistentni na prisustvo teških metala (hroma, nikla...), a koji istovremeno imaju sposobnost redukovanja hroma(VI) u njegov manje štetniji Cr(III) oblik. Primena metoda bioremedijacije je pogodnija i efikasnija od hemijskih metoda „čišćenja“ zagađenog zemljišta. Pri korišćenju hemijskih metoda dolazi do sekundarnog zagađivanja prirodne sredine. Za razliku od toga, bioremedijacija je prirodan proces,

koji uključuje delovanje mikroorganizama već prisutnih na kontaminiranim lokacijama. Bioremedijacija takođe predstavlja novu generaciju tzv. zelenih tehnologija, koje su sve popularnije i preporučljivije u razvijenom svetu. Na kraju treba spomenuti i to da su troškovi same tehnologije u poređenju sa ostalim konvencionalnim metodama mnogo niži, što u današnje vreme nije zanemariva činjenica.

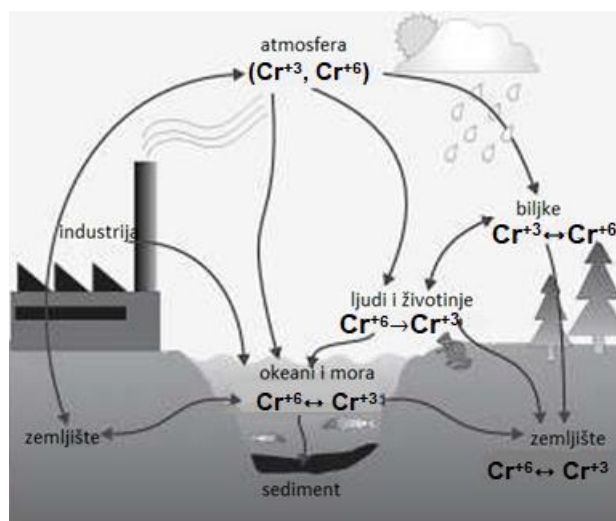
2. PREGLED LITERATURE

Industrijalizacija i tehnološki napredak doveli su do prevelikog opterećivanja životne sredine oslobađanjem ogromnih količina opasnog otpada, teških metala (kadmijuma, hroma i olova) i metaloida (elemenata sa osobinama i tipičnih metala i nemetala, kao što su arsen i antimon) i organskih polutanata koji izazivaju kontaminaciju životne sredine. Poslednjih godina je značajno porasla zabrinutost za globalno javno zdravlje, kao rezultat izloženosti upravo ovim metalima i metaloidima. Takođe, izloženost ljudi dejstvu teških metala je dramatično uvećana, nakon što je njihova upotreba u nekim vrstama industrije, poljoprivredi, domaćinstvima i tehnološkim postupcima doživela svoj eksponencijalni rast (Bradl, 2002). Gomilanje teških metala i metaloida u zemljištu doprinosi ozbiljnoj zabrinutosti globalnih dimenzija, jer ti metali i metaloidi ne mogu biti pretvoreni u netoksične oblike, već i dalje opstaju kao toksični oblici u ekosistemu. Zagađenje životne sredine teškim metalima raste preko preporučenih vrednosti i štetno je za sve oblike života (Gaur et al., 2014, Dixit et al., 2015, Tak et al., 2013). Standardne vrednosti sadržaja teških metala u zemljištu su različite: prema vrednostima relevantnim za Evropsku Uniju za Cd iznosi 3, za Cu 140, za Pb 300, za Zn 300, za Ni 75, a za Cr 150 mg/kg (EU, 2002).

Zagađivanje teškim metalima je trenutno najveći ekološki problem, jer joni metala ostaju prisutni u životnoj sredini zbog njihove nedegradabilne prirode. Toksičnost i tendencija akumulacije teških metala u životnoj sredini je ozbiljna pretnja zdravlju živih organizama. Za razliku od organskih kontaminanata, teški metali ne mogu biti razgrađeni hemijskim ili biološkim procesima; oni mogu biti samo transformisani u manje toksične oblike. Za uklanjanje teških metala u zemljištu primenjuju se različite fizičke, hemijske i biološke metode, ali mnoge od ovih metoda nisu ekonomski održive i ne osiguravaju restauraciju bez rezidualnih efekata.

2.1. Poreklo hroma u životnoj sredini

Hrom je jedan od najtoksičnijih teških metala i veoma je rasprostranjen u prirodi. Jedinjenja hroma koja se nalaze u životnoj sredini su poreklom iz otpada i otpadnih voda koje nastaju kao proizvodi tokom eksploatacije ruda, proizvodnje metala i legura, termonuklearnog oružja, u procesima hromiranja, kožarskoj industriji, industriji papira i boja, impregnaciji drveta i proizvodnji pigmenata. U prirodi je najpostojaniji u oksidacionom stanju +3 i +6. Jedinjenja hroma u kojima se ovaj element nalazi u Cr(VI) obliku su naročito opasna, jer su rastvorljiva u vodi i vrlo mobilna (Slika 1, modifikacija Das et al., 2015). To predstavlja naročitu opasnost za podzemne vode, kao i za otvorene vodotokove. Osim uobičajenih načina, ova jedinjenja hroma dospevaju u prirodu putem poljoprivrednih aktivnosti (Viti et al., 2003), putem organske mase za proizvodnju biogoriva i đubriva, za koje je dokazano da sadrže visoku koncentraciju ovog metala.



Slika 1. Kruženje hroma u zagađenoj sredini (Izvor: modifikacija Das et al., 2015)

2.2. Biološki značaj hroma

Hrom(III) je esencijalni mikroelement za žive organizme, jer učestvuje u metabolizmu glukoze (Vincent, 2000), u stimulaciji enzimskog sistema (Karuppanadandian et al. 2009), u stabilizaciji nukleinskih kiselina povećavanjem aktivnosti DNA-polimeraze (Snow i Xu, 1991). Stearns (2000) i Vincent (2010) su dokazali da je deficit hroma

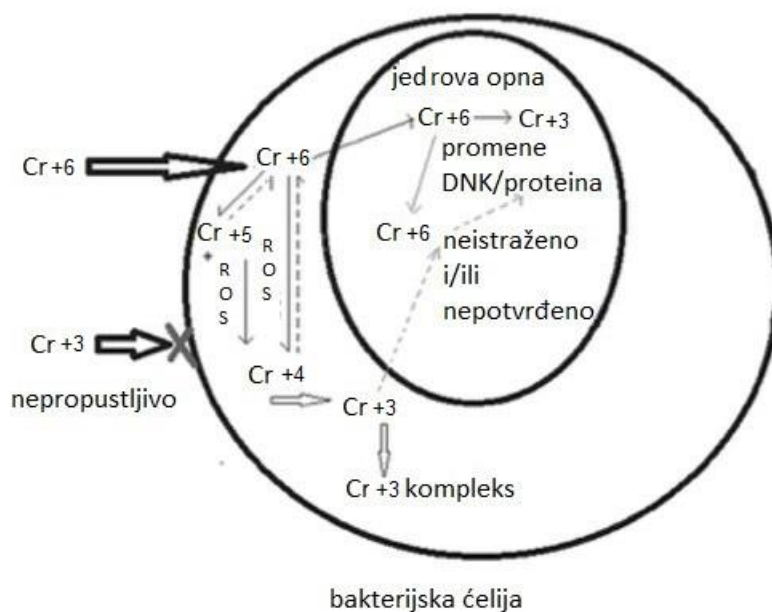
povezan sa smanjenjem tolerancije na glukozu, jer olakšava prelazak glukoze iz krvi u ćelije, ali još uvek nije dokazano da ulazi u sastav kofaktora humanih enzima. Iako se pretpostavlja da igra ulogu u regulaciji metabolizma lipida, regulisanju nivoa holesterola, triglicerida (Zayed i Terry, 2003) i ugljenih hidrata, podaci koji svedoče o nedostatku hroma u telu, ili nekog njegovog kompleksa, kao što je faktor tolerancije glukoze (GTF), su i dalje vrlo diskutabilni, odnosno veoma retki. Bona et al. (2011) smatraju da hrom kod sisara nema definisanu biološku ulogu i klasifikovali su ga kao jedan od neesencijalnih elemenata. Ipak, druga istraživanja ističu da ovaj element treba smatrati esencijalnim za ljudsku populaciju (Anderson, 1997). Ovo ukazuje da naučna javnost nema jasan stav po pitanju statusa hroma u živim sistemima (Vincent, 2013).

2.3. Toksičnost hroma za žive organizme

Metali imaju veoma različito hemijsko i fiziološko dejstvo. Neki od njih su svrstani u grupu elemenata koji su neophodni za žive organizme (Fe, Mo, Co, Cu i Se) zbog njihove uloge u procesima metabolizma. Kada sadržaj ovih elemenata u živim ćelijama premašuje njihove metaboličke potrebe, ovi elementi postaju toksični. Zbog toga se smatraju veoma opasnim zagađivačima životne sredine, a njihov ulazak u procese kruženja materije i biosferu predstavlja rizik za sve žive organizme (Sekulić et al., 2003).

Hrom(III) se pojavljuje u tragovima u hrani i vodi i smatra se benignim (Mertz, 1993). Za razliku od njega, hrom(VI) je veoma toksičan i kancerogen (Codd et al., 2003), mutagen (Puzon et al., 2002) i teratogen (Asmatullah et al., 1998) i klasifikovan je kao primarni polutant (Cheung i Gu, 2007). U vodenim rastvorima se pojavljuje u obliku hromata, koji je vrlo sličan sulfatnom jonu. Zahvaljujući toj sličnosti, dospeva u ćelijski metabolizam preko mehanizama za prenos sulfata (Patra et al., 2010), prelazeći u hrom(V) i formirajući slobodne radikale (Mabbet i Macaskie, 2001). U toku nastanka slobodnih radikala, njegova toksičnost se znatno povećava (Wise et al., 2004) za sve vrste živih organizama, izazivajući oksidativni stres (Ackerley et al., 2006), oštećenja DNK (Mabbet i Macaskie, 2001) i promene u ekspresiji gena (Bagchi et al., 2002). Pod normalnim fiziološkim uslovima, ovaj oblik hroma spontano reaguje sa intracelularnim reduktantima (kao što su to askorbat ili glutation), obrazujući tako intermedijer kratkog životnog veka sa oksidacionim stanjem +5 i/ili +4, slobodne radikale i krajnji proizvod,

hrom(III) (Xu et al., 2005). Oblik Cr(V) ulazi u redoks-ciklus sa jednim elektronom, stvarajući tako ponovo oblik Cr(VI), a elektron se prenosi do kiseonika. U ovom procesu nastaju reaktivne vrste kiseonika (ROS), koja lako reaguje sa kompleksima DNK proteina (Slika 2). Hrom(IV) se takođe može vezati za ćelijski materijal i onemogućiti normalne fiziološke funkcije (Pesti et al., 2000, Cervantes et al., 2001). Kod ljudi, izloženost Cr(VI) obliku hroma dovodi do iritacija disajnih puteva, ulceracija, iritacija kože, raka pluća (Gibb et al., 2000a; Gibb et al., 2000b).



Slika 2. Shematski prikaz transporta Cr(VI) u ćeliju (Izvor: Kamnani et al., 2012)

Kontaminacija životne sredine hromom(VI) dovodi do promena u strukturi mikrobnih zajednica u zemljištu (Zhou et al., 2002, Turpeinen et al., 2004). Redukcija mikrobnog rasta i aktivnosti su povezani sa povećanjem sadržaja hroma(VI) u zemljištu (Mazierski, 1994, Shi et al., 2002). Hrom(VI) utiče na smanjenje klijavosti semena kod biljaka, čak i do 20%, dovodeći i do oštećenja korenova (Towill et al., 1978). Štetan uticaj hroma je evidentiran i u procesima rasta, fotosinteze i enzimske aktivnosti kod algi (Sharma, 2002).

2.4. Tolerantnost mikroorganizama na teške metale

Osnovni preduslov za preživljavanje mikroorganizama na staništima zagađenim teškim metalima je sposobnost rezistencije i tolerancije na prisustvo ovih elemenata. Ova osobina postoji gotovo kod svih bakterijskih vrsta (Ji i Silver, 1995). Iako su ova dva termina u literaturi često smatrana sinonimima, Gefen i Balaban (2009) ukazuju da su za rezistentnost odgovorni geni stečeni horizontalnim transferom gena ili mutacijom. Ovi geni se nasleđuju i obezbeđuju preživljavanje u prisustvu povišenih koncentracija različitih antimikrobnih agenasa. Sa druge strane, tolerancija je prolazni fenotip, koji se ne nasleđuje. Ona je verovatno uzrokovana posebnim fiziološkim stanjem određenih ćelija, koje je reverzibilno i zbog kojeg ove vrste mikroorganizama preživljavaju u prisustvu antimikrobnog agensa. Osnovna podela mehanizama tolerancije bakterija (Ji i Silver, 1995; Nies i Silver, 1995; Nies, 1999), od kojih svaka može imati jedan ili nekoliko njih, obuhvata sledeće procese:

- a) uklanjanje metala promenom propustljivosti i biosorpcijom,
- b) uklanjanje metala aktivnim transportom,
- c) intracelularno kapsuliranje metala
- d) ekstracelularno kapsuliranje metala.

Zahvaljujući ovim mehanizmima, koje ćelije obavezno kombinuju, mikroorganizmima je omogućen život u nepovoljnim životnim uslovima i na staništima zagađenim teškim metalima.

2.4.1. Uklanjanje metala promenom propustljivosti i biosorpcijom

Ovaj tip mehanizma tolerancije bakterija na teške metale predstavlja u stvari promenu konformacije ćelijskog zida ili membrane, koja se dešava usled fiziološke potrebe bakterije da se zaštiti od štetnog dejstva antimikrobnih faktora. Biosorpcija ili usvajanje između pozitivno naelektrisanog teškog metala i negativno naelektrisanog ćelijskog zida je najčešći korišćen metod u biološkim sistemima. Strukturni elementi ćelijskih zidova i ekstracelularne polimerne supstance su kompleksna jedinjenja kao što su lipopolisaharidi, proteini i ugljeni hidrati. Ova hemijska jedinjenja imaju veliki broj funkcionalnih grupa koja pružaju mesta za vezivanje metala i njihovu imobilizaciju.

Proces biosorpcije je pasivan proces koji ne zavisi od ćelijskog metabolizma i može naći primenu u bioremedijaciji.

2.4.2. Uklanjanje metala aktivnim transportom

Mikroorganizmi obično rešavaju problem toksičnosti teških metala korišćenjem dva tipa sistema usvajanja metalnih jona. Jedan je brz, nespecifičan, i pokreće ga hemiosmotski gradijent preko citoplazmatične membrane bakterija (Nies, 1999). Drugi tip sistema usvajanja je visoko specifičan za svaki supstrat, sporiji je i često koristi hidrolizu ATP-a kao izvor energije. Ćelije ga obično koriste kada je to neophodno, i to pri nedostatku hranljivih supstanci ili u specifičnim metaboličkim situacijama (Nies i Silver, 1995). Aktivni transport kao mehanizam uklanjanja metala je u prirodi najrasprostranjeniji. Nies (1992) navodi da mnogi organizmi kao što su vrste rodova *Bacillus*, *Listeria*, *Escherichia* i *Staphylococcus* obezbeđuju toleranciju na teške metale upravo ovim načinom njihovog uklanjanja.

2.4.3. Intracelularno kapsuliranje teških metala

Postupak je poznat pod imenom bioakumulacija i predstavlja akumuliranje metala u citoplazmi u cilju sprečavanja interakcije sa ostalim delovima ćelije pomoću proteina bogatih cisteinom, tzv. metalotioneina. Za razliku od biosorpcije, ovo je aktivan proces i zavisi od metabolizma ćelije. Štetni uticaj metala kao što su cink, nikl i olovo na ovaj način eliminišu rodovi *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Pseudomonas* (Odokuma i Abah, 2003).

2.4.4. Ekstracelularno kapsuliranje teških metala

Ovaj mehanizam se zasniva na ekskreciji jedinjenja koja sa metalima mogu da formiraju komplekse i opisan je kod rodova bakterija *Klebsiella*, *Citrobacter* i nekoliko vrsta kvasaca i gljiva (Scott i Palmer, 1990).

2.5. Mehanizmi mikrobne detoksifikacije hroma

2.5.1. Biohemijske i fiziološke osnove uklanjanja hroma i njegovih jedinjenja

Bioremedijacija podrazumeva upotrebu mikroorganizama u transformaciji štetnih supstanci korišćenjem njihovih metaboličkih puteva. Ovi procesi podrazumevaju biohemijske reakcije odnosno puteve, koji kao krajnji rezultat omogućavaju aktivnost, rast i reprodukciju ovih organizama. U hemijskim reakcijama ovih procesa učestvuju reaktanti, zagađivači, kiseonik ili drugi akceptori elektrona, koji transformišu metabolite u poznate produkte.

Aerobna respiracija je proces u koji su uključeni mikroorganizmi koji koriste kiseonik za oksidaciju izvora ugljenika. Mikroorganizmi koji žive bez kiseonika, koriste anaerobnu respiraciju za metaboličke procese. Za razliku od aerobne respiracije, gde kiseonik služi kao glavni akceptor elektrona, anaerobna respiracija koristi neorganske supstance, kao što su nitrati, sulfati, gvožđe i druge metale kao akceptore elektrona. Neorganski molekuli, kao što su amonijak, nitriti i redukovano gvožđe mogu služiti kao donori elektrona. Kada se jednom pojave kao donori elektrona, oni se oksiduju, a njihovi elektroni se prenose do akceptora elektrona (obično je to kiseonik) zbog proizvodnje energije koja je potrebna za procese biosinteze u ćeliji. Za mikroorganizme čiji je primarni donor elektrona neorganski molekul, izvor ugljenika je ugljen-dioksid. Redukovani metali i ostali oblici donora elektrona postaju bioprodukti anaerobne respiracije. U uslovima kada se metali koriste kao akceptori elektrona kod anaerobnih mikroorganizama, metali se talože, što dovodi do povećanja njihove koncentracije i mobilnosti. Generalno govoreći, pod anaerobnim uslovima, koncentracija akceptora elektrona će rasti. Današnja istraživanja koja se odnose na metale kao zagađivače životne sredine, obuhvataju njihovu transformaciju u oblike koji se mogu lako istaložiti i na taj način odstraniti iz životne sredine. Ovaj proces transformacije teških metala obavljaju mikroorganizmi zahvaljujući svojim enzimima i koenzimima, za koje se vezuju elektroni.

2.5.2. Neenzimska remedijacija

Mehanizmi pomoću kojih mikroorganizmi utiču na prisustvo teških metala i njihovu mobilnost su jedna od fundamentalnih komponenata biogeochemijskih ciklusa.

Dostupnost teških metala veoma zavisi od uslova u životnoj sredini, kao što su pH, alkalitet, redoks-potencijal i aktivnost mikroorganizama (van Hullebusch et al. 2005). Metali u prirodi obično postoje u obliku jona, u obliku sulfata ili hlorida pri $\text{pH} < 7$ (Hietala i Roane, 2009). Dostupnost metala se povećava sa povećanjem kiselosti, što dovodi i do povećanja toksičnosti metala. Na njihovu dostupnost živim organizmima utiče i visok redoks- potencijal (od 800 do 0 mV), koji dovodi do veće rastvorljivosti metala, dok nizak redoks-potencijal utiče na imobilizaciju metala i njihovo taloženje (Hietala i Roane, 2009).

Na taj način mikroorganizmi utiču na sudbinu teških metala, ali ih, nažalost, ne mogu ukloniti aktivnošću svojih metaboličkih puteva, već se može izvršiti konverzija iz jednog oblika u drugi ili se mogu menjati oksidaciona stanja preko reakcija oksidacije i redukcije (Ramasamy et al., 2007).

2.5.3. Enzimska remedijacija

U procesu mikrobne remedijacije teških metala, pa i hroma, svi procesi se odvijaju uz pomoć mikrobnih enzima, bioloških katalizatora, koji ubrzavaju konverziju supstrata u proizvode, obezbeđivanjem povoljnih uslova koji snižavaju energiju aktivacije određene reakcije.

U ovim procesima učestvuju enzimi iz različitih klasifikacionih grupa, među kojima su najbrojnije oksidoreduktaze, oksigenaze (mono- i dioksigenaze) i peroksidaze. Najčešći enzimi koji se pojavljuju u ovim procesima su oksidoreduktaze. Tokom procesa stvaranja energije, bakterije primaju elektrone iz organskih komponenata i koriste metale kao krajnje akceptore elektrona. Kod bakterija koje redukuju hrom(VI), opisani i objašnjeni su mehanizmi delovanja velikog broja enzima, kao što su FADH_2 -zavisna metal reduktaza, nitroreduktaza, c-tip citohromi, hidrogenaze...

2.5.3.1. Direktna enzimska redukcija hroma

Princip redukcione biotransformacije hroma ogleda se u smanjenju njegove mobilnosti i toksičnosti kada je redukovan u niže oksidaciono stanje. U direktnim redukcionim procesima, hrom- i ostali metal-redukujući mikroorganizmi koriste oksidovani oblik hroma Cr(VI) kao akceptor elektrona i transformišu ih u redukovan oblik Cr(III).

2.5.3.2. Indirektna enzimska redukcija hroma

Redukciona biotransformacija se može obavljati i indirektnom imobilizacijom hroma i ostalih teških metala. U ovaj proces su obično uključene metal-redukujuće i sulfat-redukujuće bakterije. Indirektna enzimska redukcija se odvija u sedimentima i podzemnim slojevima zemljišta i voda ili u anaerobnim reaktorima za prečišćavanje otpadnih voda. Najaktivniji redukcionni proizvodi su Fe(II) i H₂S. Fe(II) se koristi kao donor elektrona u redukciji Cr(VI) u Cr(III) uz pomoć gvožđe-redukujućih bakterija, kao što su *Geobacter*, *Desulfomonas*, *Shewanella* i *Pelobacter* (Coates et al., 1996, Wielinga et al., 2001).

2.5.4. Aerobna redukcija hroma

U prisustvu kiseonika, bakterijska redukcija hroma(VI) se obično odvija u dvo- ili trostepenom procesu, preko stvaranja nestabilnih intermedijera sa oksidacionim stanjem od +5 i +4 do stvaranja termodinamički stabilnog proizvoda Cr(III). Još uvek nije poznato da li je redukcija +5 oblika u +4 oblik, kao i +4 u +3 spontana ili se odvija u prisustvu enzima. NADH, NADPH i elektroni iz endogenih rezervi su opisani kao donori elektrona u ovoj reakciji oksido-redukcije (Appenroth et. al. 2000). Hrom(VI)-reduktaza ChrR na kratko redukuje Cr⁺⁶ u Cr⁺⁵ oblik, nakon čega sledi transfer dva elektrona i nastanak oblika Cr⁺³. Deo hrom(V)-intermedijera se spontano reoksiduje gradeći ROS (vrsta reaktivnog kiseonika), koji se vezuje za kompleks DNK-proteina. Tako nastaju modifikatori DNK, kako se često naziva ova vrsta opasnih radikala.

Enzim YieF je jedinstven u živom svetu i katališe direktnu redukciju oblika Cr(VI) u Cr(III), putem prenosa četiri elektrona, od kojih se tri elektrona koriste za redukciju hroma, a jedan se prenosi na kiseonik. Iako je količina ROS-a koja nastaje uz pomoć YieF za vreme redukcije hroma minimalna, smatra se da je ovaj enzim efektivnija

reduktaza od ChrR za proces redukcije hroma. Hrom(VI)⁻reduktaza na membrani ćelije, izolovana iz vrste *Bacillus megaterium* TKW3, koristi NADH kao donora elektrona, ali sama kinetika redukcije hroma nije razjašnjena (Cheung et al. 2006).

2.5.5. Anaerobna redukcija hroma

U procesima transformacije hroma korišćene su i bakterije iz grupe fakultativnih anaeroba, kao što su *Pseudomonas dechromaticans*, *Ps. chromatophila* i *Aeromonas dechromatica* (Cheung i Gu, 2007). Kod ovih bakterija su detektovane obe vrste reduktaza (rastvorene u citoplazmi ili pričvršćene za plazma-membranu). Za razliku od hrom-reduktaza koje su otkrivene kod aeroba, aktivnost hrom-reduktaze anaeroba je povezana sa njihovim sistemom za prenos elektrona za katalizu elektronskih nizova duž respiratornog lanca (Wang i Shen, 1995). Citohromi iz grupe b i c često učestvuju u enzimskoj redukciji hroma.

Prirodni metaboliti anaeroba kao što je H₂S koji produkuju sumpor-redukujuće bakterije, dobra su redukciona sredstva u anaerobnim uslovima (Wielinga et al., 2001). Ranije se smatralo da su ovi procesi slučajni izvor energije za rast mikroorganizama, ali sada se zna da sumpor-redukujuće bakterije koriste proces redukcije hroma kao izvor energije za rast i razvoj. U odsustvu kiseonika, ovaj oblik hroma može služiti kao krajnji akceptor elektrona u respiratornom lancu za čitavu grupu donora elektrona, kao što su ugljeni hidrati, proteini, masti, vodonik, NAD(P)H i endogene rezerve elektrona (Wang, 2000).

Iako su otkrivene mnoge hrom-reduktaze, izolovan je i opisan veoma mali broj njih. Ove reduktaze nisu specifične samo za redukciju hroma, već imaju više funkcija. Zbog toga su ove reduktaze važne za razumevanje odnosa strukture i funkcije. Usporedne studije sekvenci pokazuju da aktivnost hrom-reduktaze verovatno nije primarna funkcija ovih enzima. Hrom-reduktaza bakterije *Pseudomonas putida* verovatno pripada flavin-vezujućoj hinon-reduktazi.

Hrom-reduktaza *Pseudomonas ambiguae* je slična nitroreduktazi bakterije *Escherichia coli* koja redukuje Cr(VI) oblik (Ackerley et al., 2004). Enzimi iz metaboličkih puteva razgradnje šećera, kao što je dihidrolipoil-dehidrogenaza, komponenta kompleksa piruvat-dehidrogenaze, takođe redukuju hrom. Zbog toga se može reći da je aktivnost

hrom-reduktaza u stvari sekundarna funkcija ovih enzima sa različitom primarnom katalitičkom funkcijom (Sarangi i Krishnan, 2008).

2.6. Hrom-redukujuće bakterije u procesima bioremedijacije

Konvencionalne metode uklanjanja toksičnog hroma(VI) iz zemljišta zagađenih teškim metalima uključuju hemijsku redukciju sa precipitacijom, izmenjivanjem jona, i apsorpcijom pomoću aktivnog uglja, kaolinita i pepela. Do sada su predlagana rešenja koja su podrazumevala primenu solidifikacije, fizičko-hemijske ekstrakcije, pranje zemlje i iskopavanje (Hawley et al, 2005). Sve ove metode zahtevaju značajna finansijska sredstva i energije, a dovode i do sekundarnog zagađenja (Sen i Ghosh, 2010). Zbog toga se za detoksikaciju zemljišta zagađenih teškim metalima predlaže primena mikroorganizama, kao ekološki i ekonomski najefikasniji i najprihvatljiviji način. Primena mikroorganizama u redukciji toksičnog hroma(VI) ima praktičan značaj, jer biološke strategije omogućavaju primenu zelenih tehnologija, koje su ekonomski isplativije.

Hrom i ostali teški metali nisu degradabilni i njihov štetni uticaj u prirodnim sredinama se može smanjiti samo prelaženjem iz toksičnijeg oblika u manje toksičan. Upravo ta bioremedijaciona strategija se može koristiti za transformaciju Cr(VI) u manje štetni Cr(III) oblik.

Prvi mikroorganizmi sposobni da izvrše bio redukciju Cr(VI) su otkriveni 70-ih godina 20. veka (Romanenko i Korenkov, 1977). Otkriće hrom-redukujućih mikroorganizama je nastavljeno sa velikim entuzijazmom, tako da je izolovan velik broj aerobnih (Garbisu et al., 1998; Ishibashi et al., 1990), anaerobnih (Komori et al., 1989; Pattanapitpasial et al., 2001) ili i anaerobnih i aerobnih (McLean i Beveridge, 2001; Srinath et al., 2001) sojeva koji pripadaju ovoj grupi mikroorganizama.

Od 1977. godine i prvog pronalaska hrom-redukujućih mikroorganizama, istražen je velik broj bakterija iz ove grupe mikroorganizama, kao što su *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. ambigua*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *Achromobacter eurydice*, *Micrococcus roseus*, *Enterobacter cloacae*, *Desulfovibro desulfuricans*, *D. vulgaris* (Lovley, 1994), *D. norvegicum* (Michel et al., 2001), *Providencia* sp. (Thacker et al., 2006), *Aerococcus* sp. (Srinath et al., 2001), *Arthrobacter* sp. i *Bacillus* sp. (Megharaja et al., 2003), *Burkholderia cepacia* (Wani et al., 2007a), *Acinetobacter*

haemolyticus (Zakaria et al., (2007), *Sphaerotilus natans* (Caraveli et al., 2008), *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas sp.* i *Serratia fonticola* (Raičević et al., 2010) itd. Većina ovih vrsta bakterija nije pokazala veliki kapacitet u uklanjanju hroma iz vodenih rastvora. Donati et al. (2003) su opisali zanimljiv slučaj primene bakterije *Thiobacillus ferrooxidans* koja koristi sumpor kao izvor energije. Sposobnost redukcije ove bakterije je povezana sa nastankom sulfita, tiosulfata i politionata sa visokim redukcionim kapacitetom. Za razliku od ostalih hrom-redukujućih mikroorganizama, *T. ferrooxidans* pokazuje veći stepen redukcije hroma pri nižim pH vrednostima.

Okeke (2008) je ispitivao mogućnost primene halotolerantnih bakterija, kao što je *Exiguobacterium sp.* GS1, koja je pokazala visok stepen redukcije Cr(VI). U podlogama sa 1-9% soli, ova bakterija je pokazala značajan nivo redukcije Cr(VI) u velikom temperaturnom rasponu od 18 do 45°C i sa početnom pH vrednošću od 6,0 do 6,8.

Muneer et al. (2009) su istraživali efikasnost tri vrste mikroorganizama koji žive u konzorcijumu (bakterija *Bacillus thuringiensis*, kvasac *Candida etchellsii* i protozoa *Stylonychia mytilus*) i ustanovili da je usvajanje hroma(VI) znatno efikasnije u poređenju sa usvajanjem hroma svakog mikroorganizma pojedinačno ili u kombinaciji sa još jednim mikroorganizmom, što može imati praktičnu primenu u bioremedijaciji. Iako je u najvećem broju radova opisana redukcija Cr(VI) u Cr(III) oblik, Daulton et al. (2007) su ispitivali mikrobnu redukciju Cr(VI) u Cr(II) pomoću bakterija *Shewanella oneidensis*, čija je reduktaza vezana za citoplazmatsku membranu.

Autori su utvrdili da široko rasprostranjena hipoteza da krajnji proizvod u redukciji hroma mora da bude jedinjenje hroma u hrom(III) obliku nije tačna. Pomenuta bakterija redukuje Cr(VI) u Cr(II) oblik u anaerobnim uslovima kada je hromat krajnji akceptor elektrona. Ovaj oblik hroma se deponuje u blizini citoplazmatske membrane, ulazeći i u citoplazmu, što je u skladu sa ranijim istraživanjima o lokalizaciji hrom(VI)-reduktaze. Ovo je bio prvi dokaz o formiranju Cr(II) u biološkim sistemima.

Istraživanja koja su Sundar et al. (2010) sprovedli na jezeru Palar (Indija), ispitujući kontaminaciju poreklom iz kožarske industrije, ukazala su da su bakterijski izolati iz kontaminiranih sedimenata, vode i otpadnih voda tolerantni na visoke koncentracije hroma i na prisustvo drugih teških metala, kao što su nikel, olovo, cink i gvožđe do koncentracije od 100 mg/l i 45% rezistentni na prisustvo kadmijuma. Takođe su ustanovili i toleranciju ovih izolata na povišene koncentracije natrijum-hlorida (9%).

Tolerantnost bakterijskih izolata na oba oblika hroma pokazuje da je, u zavisnosti od životne sredine, dinamička interkonverzija hroma(III) u hrom(VI) u zemljištu, sedimentima i vodenim ekosistemima veoma aktivna, čak i prisustvu jona teških metala i NaCl.

Kombinovanjem bakterijskih procesa redukcije i imobilizacije hroma korišćenjem *Acidithiobacillus thiooxidans* i *Desulfovibrio* sp. se u zatvorenim sistemima može obezbediti čišćenje otpadnih voda zagađenih Cr(VI) i Cr(III) (Viera et al., 2003).

Različiti bakterijski izolati imaju različitu sposobnost redukcije Cr(VI) (Tabela 1).

Tabela 1. Bakterijska redukcija Cr(VI)

(Izvor: modifikacija Kanmani (2012) i Narayani i Shetty (2013))

Vrsta bakterije	Koncentracija hroma koju bakterija može da redukuje
<i>Microbacterium</i> sp. MP-30	100 µM
<i>Thermus scotoductus</i> SA-01	500 µM
<i>Exiguobacterium</i> sp. KCH-5	0,75 mM
<i>Bacillus</i> sp. KCH-3	1,5 mM
<i>Leucobacter</i> KCH-4	
<i>Sphaerotilus natans</i>	1,5 mM
<i>Arthrobacter aureescens</i> P4	1,9 mM
<i>Ochrobactrum</i> sp. CSCr-3	15,3 M
<i>Bacillus</i> sp. CA-M9	50 mg/l
<i>Bacillus</i> sp.	100 mg/l
<i>Ochrobactrum</i> sp.	200 mg/l
<i>Providencia</i> sp.	400 mg/l
<i>Brucella</i> sp.	150 mg/l
<i>Arthrobacter oxydans</i>	50 µg/ml
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	2 mM
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	50 mg/l
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	112,5 mg/l

2.7. Mikrobiološka redukcija Cr(VI) u prisustvu stimulatora i inhibitora redukcije

Pošto se *in-situ* tehnike bioremedijacije obavljaju na mestu nastanka kontaminacije, na otvorenim staništima gde se ne mogu obezbediti idealni laboratorijski uslovi, najveći broj istraživanja je sproveden u cilju ispitivanja uticaja dodavanja materija koje stimulatивно deluju na proces bioremedijacije. Shenbagavalli i Mahimairaja (2012) su ispitivali primenu živinskog đubriva kao sredstva za pospešivanje procesa remedijacije, uz dodavanje čistih kultura bakterije *Pseudomonas fluorescens*. Rezultati su pokazali da je dodavanje živinskog đubriva u značajnoj meri povećalo stepen redukcije hroma(VI), a rezultati su još bili još bolji uz dodavanje pomenute bakterije. Ova laboratorijska ispitivanja su pokazala potencijal životinjskog đubriva u redukciji sadržaja hroma u kontaminiranim zemljištima, što opravdava primenu ovog đubriva u procesima bioremedijacije.

Pal et al. su 2004. godine su proučavali ulogu bakterije *Bacillus sphaericus* u procesima detoksifikacije hroma i ustanovili da toleriše koncentraciju od 800 mg/l i redukuje više od 80% hroma u Cr(VI) obliku tokom svog rasta. Redukcija hroma je mnogo efikasnija u prisustvu donora elektrona kao što su glukoza i ekstrakt kvasca. Smith i Gadd su 2000. godine ispitivali stepen iskorišćavanja laktata kao donora ugljenika i energije u prisustvu sulfata, proučavajući uticaj mešanih kultura sulforedukujućih bakterija u obliku biofilma na redukciju hroma. Ovi biofilmovi sulforedukujućih bakterija su sposobni da obave oko 88% redukcije ukupnog hroma(VI) u periodu od 48 sati. Leita et al. (2011) su proučavali uticaj glukoze na redukciju hroma u zemljištu i zaključili da, iako zemljište poseduje prirodan kapacitet za redukciju hroma, dodavanje glukoze će u značajnoj meri povećati stepen redukcije svojim abiotičkim i biotičkim mehanizmima. Pošto hrom negativno utiče na količinu i aktivnost biomase u zemljištu, glukoza verovatno igra indirektnu ulogu u snižavanju nivoa Cr(VI), promovišući rast autohtonih mikrobioloških vrsta. U Renipetu (Indija) je ispitivana redukcija hroma pod anaerobnim uslovima sa melasom kao donorom elektrona i zaključili da ona u značajnoj meri ubrzava reakciju enzimske redukcije hroma. S obzirom da je kontaminacija životne sredine hromom praćena i kontaminacijom drugim teškim metalima, predmet istraživanja je bio usmeren na efekat drugih teških metala na mikrobnu redukciju hroma. Povećanje gustine populacije mikroorganizama i početne koncentracije hroma

dovode do porasta stepena redukcije hroma, ali joni kao što su Ni, Co, Cd i Pb predstavljaju faktor inhibicije u ovim postupcima (Jeyasingh i Philip, 2005). Bakterija *Pannonibacter phragmitetus* je pokazala izuzetan potencijal u bioremedijaciji zagađenog zemljišta. Takođe je ispitivana autohtona vrsta *Achromobacter* sp. CH-1, za koju je utvrđeno da može da se koristi za detoksifikaciju zemljišta kontaminiranih hromom. Pomoću sken-elektronskog mikroskopa (SEM) je ispitana morfologija ćelija ove bakterije pre i posle redukcije hroma. Registrovan je nastanak proizvoda koji je bio smešten na krajevima ćelija ove vrste bakterija. Korišćenjem tehnika EDX (Energy-Disperzive X-ray) i EPR (Electron Paramagnetic Resonance) utvrđeno je da je glavna komponenta ovog redukcionog produkta hrom(III) (Chai et al., 2010). Sposobnost redukcije hroma(VI) ove vrste bakterije je iznosila više od 90% od početne koncentracije.

Soni et al. (2013) su istraživali sposobnost bakterija izolovanih iz rizosfere biljaka koje su navodnjavane otpadnim vodama iz kožarske industrije. U laboratorijskim uslovima vrste *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus subtilis* i *Bacillus thuringiensis* su pokazale da su u uslovima povišene koncentracije hroma(VI) i prisustva teških metala veoma stabilne. Sa druge strane, prisustvo žive, uree i tiouree smanjuje aktivnost hrom-redukujućih vrsta bakterija.

Sultan i Hasnain (2007) su ispitivali uticaj teških metala na redukciju toksičnog hroma(VI) pomoću bakterije *Ochrobactrum intermedium* i zaključili da redukciju stimuliše prisustvo metala kao što su Cu, Co, Mn i Ni.

2.8. Optimizacija uslova za mikrobnu redukciju Cr(VI)

Pal et al. su 2004. godine ispitivali optimalnu temperaturu i pH vrednost za obavljanje redukcije hroma i ustanovili da optimalna temperatura za redukciju hroma pomoću različitih bakterijskih izolata iznosi 25 °C, a pH vrednost 6,0.

U Tabeli 2 su prikazani rezultati različitih istraživanja koja se odnose na određivanje optimalne temperature i pH vrednosti za bakterijske izolate koji su učestvovali u redukciji hroma(VI). Rezultati pokazuju širi raspon pH vrednosti, od 7 do 10, a optimalna temperatura se kretala od 25 do 40 °C, sa izuzetkom termofilnih vrsta za koje je ta temperatura znatno viša i iznosi od 60 do 80 °C (Narayani et al, 2013).

Tabela 2. Optimalni pH i temperatura za bakterijsku redukciju hroma(VI)

(Izvor: modifikacija Narayani i Shetty, 2013)

Vrsta bakterije	Optimalna pH	Optimalna temperatura (°C)
<i>Bacillus</i> sp.	8,0	37
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	7,0–8,0	30–37
<i>Arthrobacter</i> sp.	7,0	-
<i>Agrobacterium</i> sp.	7,0	-
<i>Brevibacterium casei</i>	7,0	30
<i>Bacillus cereus</i> SJ1	7,0	37
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7-8	
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	7,0	35
<i>Bacillus firmus</i>	8,0–10,0	35
<i>Ochrobactrum</i> sp. CSCr-3	10,0	35
<i>Leucobacter</i> sp. CRB1	9,0	—
<i>Burkholderia cepacia</i> MCMB-821	9,0	35
<i>Brucella</i> sp.	7,0	37
<i>Thermus scotoductus</i> SA-01	7,0	80
<i>Acinetobacter</i> sp.PCP3	7,0	—
<i>Nesterenkonia</i> sp. MF2	8,0	35
<i>Providencia</i> sp.	7,0	37
<i>Micrococcus</i> sp.	7,0	37
<i>Bacillus sphaericus</i>	6,0	25
<i>Bacillus thuringiensis</i>	7,0	30
<i>Arthrobacter crystallopoites</i>	7,0	30
<i>Thiobacillus thioparus</i>	6,0	30
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	7,0	37

Zbog eventualne primene u procesima mikrobne remedijacije u podzemnim slojevima zemljišta, u kojima su uslovi potpuno drugačiji od onih u laboratorijama, ispitan je uticaj niskih temperatura na efikasnost mikrobnih konzorcijuma u redukciji hroma(VI) (Horton et al., 2006). Vrsta koja je identifikovana pomoću sekvencioniranja 16S rDNA izolata P4 je psihrofil *Arthrobacter aurescens* i ta vrsta do tada nije bila poznata kao sposobna da izvrši redukciju hroma pri niskim temperaturama.

Vrlo interesantna studija je izvršena na test-organizmu za detektovanje toksičnosti hroma, bakteriji *Vibrio fisheri*. Kao test-organizam, ova bakterija bi trebalo da bude osetljiva na prisustvo hroma. Međutim, zbog sposobnosti da redukuje Cr(VI) u Cr(III), ona nije osetljiva na prisustvo hroma. Sposobnost redukcije hroma je direktno zavisna od pH vrednosti, vremena inkubacije i prisustva izvora ugljenika. Tako je konstatovano da je glukoza bolji izvor ugljenika u odnosu na glicerol (Fulladosa et al. 2006). Ovi rezultati mogu poslužiti za potencijalni izbor bakterije *Vibrio fisheri* u remedijaciji zemljišta i voda kontaminiranih hromom(VI).

2.9. Hrom-redukujuće gljive u procesima bioremedijacije

Kvasci i filamentozne gljive takođe daju dobru alternativu za bioremedijaciju voda i zemljišta kontaminiranih hromom. Mnoge gljive sadrže hitin, homopolimer N-acetilglukozamina, i hitosan, heteropolimer N-acetilglukozamina i glukozamina, kao integralni deo ćelijskog zida. Transformacija amino grupa u glukozaminu može služiti kao mesto za vezivanje metala (Pillichshammer et al., 1995). Vrste siderofora, poznate kao rizoferin, koje imaju izraženu sposobnost sorpcije Cr(III), identifikovane su kod gljiva iz reda *Mucorales*.

Rizoferin je polikarboksilatna siderofora koja je sposobna da vezuje različite jone metala, uključujući i Cr(III). Hemijski tretiran micelijum vrsta *Mucor mucedo* i *Rhizomucor miehei* efikasno vezuju hrom (Wales i Sagar, 1990). Biomasa izgrađena od vrsta *Rhizomucor arrhizus*, *Candida tropicalis* i *Penicillium chrysogenum* je izuzetan biosorbent za hrom (Volesky i Holan, 1995). *Mucor hiemalis* MP/92/3/4 je takođe sposoban da akumulira značajne količine hroma (Pillichshammer et al., 1995).

Vezivanje Cr(III) je najverovatnije glavni mehanizam u pasivnoj biosorpciji ćelijskog zida, kao intracelularno usvajanje hroma(VI) (Voleski i Holan, 1995). *Sacharomyces cerevisiae* i *Candida utilis* poseduju izuzetnu sposobnost za usvajanje Cr(VI), dok je

kapacitet usvajanja osušenih ćelija mnogo veći nego kod intaktnih ćelija (Rapoport i Muter, 1995). Takođe, kvasac *Candida tropicalis* (4TD1101S) ima visoku sposobnost bioakumulacije bakra (Radić et al., 2017).

U kontekstu bioremedijacije, sposobnost biosorpcije hrom-rezistentnih sojeva može da se kombinuje sa njihovom sposobnošću da redukuju hromate. Hrom-rezistentni sojevi *Aspergillus* spp. (Paknikar i Bhide, 1993) i *Candida* spp. (Ramirez et al., 2000), izolovani sa lokacija kontaminiranih hromom, takođe su pokazali aktivnost u redukciji hroma. Ova istraživanja dokazuju da hrom-rezistentne gljive sa hrom-redukujućim osobinama imaju potencijal za proces bioremedijacije.

Congeevaram et al. (2007) su izvršili eksperimente u vezi sa fungalnom biosorpcijom hroma, pri nižim pH vrednostima (5-5,2). Posmatrani efekti pH vrednosti su uglavnom pripisivani specifičnoj fiziologiji svakog organizma, što je pokazano pozitivnom korelacijom između biomase i uklanjanja teških metala.

U Tabeli 3 su prikazani podaci o sposobnosti redukcije hroma pomoću različitih izolata gljiva.

Tabela 3. Redukcija hroma(VI) pomoću različitih izolata gljiva
(Izvor: modifikacija Garcia-Hernandez, 2017)

Vrsta gljive	Koncentracija hroma koju gljiva može da redukuje (mg/l)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	200
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>tubingensis</i> Ed8	50
<i>Auricularia polytricha</i>	10
<i>Aspergillus flavus</i>	150
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	10
<i>Penicillium chrysogenum</i>	50
<i>Trichoderma inhamatum</i>	470
<i>Rhizopus oryzae</i>	400
<i>Hypocrea tawa</i>	50
<i>Paecilomyces</i> sp.	50

2.10. Tolerantnost biljaka prema prisustvu hroma u supstratu

Za normalan rast i razvoj biljaka je neophodna dovoljna količina vode, sunčeve svetlosti, hranljivih supstanci i makro i mikroelemenata. Ako određeni mikroelement nedostaje u adsorptivnom kompleksu, biljke će ispoljiti različite patološke simptome, što će se odraziti na smanjenje fiziološke aktivnosti biljke.

Za normalan rast i razvoj biljaka je neophodna raznovrsna i bogata rizosfera, odnosno deo zemljišta oko samog korena biljke gusto naseljen mikroorganizmima, koji svojim metabolizmom potpomažu rast i razvoj biljke, a koja njima, na sličan način, pomaže u snabdevanju određenim materijama potrebnim za njihov rast, razvoj i razmnožavanje (Nihorimbere et al., 2011). Ako se u zemljištu, pa samim tim i u rizosferi, nalaze prevelike koncentracije teških metala, doći će do poremećaja biohemijskih i fizioloških procesa u biljci i rizosfernim mikroorganizmima..

Osim toga što je uticaj teških metala veoma štetan za biljku, u prirodi postoji mnogo biljaka koje su sposobne da žive na staništima sa povišenom koncentracijom teških metala. To su obično samonikle biljne vrste, koje tokom svog vegetacionog i reproduktivnog perioda u svom korenu ili u nekom od nadzemnih organa akumuliraju velike količine metala. Takve biljke se nazivaju hiperakumulatori. Količina ovih metala u biljkama može da bude i do 100 puta veća nego kod običnih biljaka (Baker i Brooks, 1989). Istraživanja sproveden u rudniku boksita »Milići«, Bosna i Hercegovina, (Raičević et al., 2010) su pokazala da je u rizosferi biljke *Carduus acanthoides* L. konstatovana ukupna koncentracija hroma od 204,6 mg/kg.

U literaturi su opisana mnoga istraživanja vezana za korišćenje biljaka u procesima bioremedijacije (Ojuederie i Babalola, 2017). Pri primeni hrom-redukujućih mikroorganizama u detoksifikaciji hroma iz kontaminiranog zemljišta postoji potencijalna opasnost od ponovnog povećanja nivoa polutanata u zemljištu zbog sposobnosti hroma(III) da se u prisustvu kiseonika ponovo transformiše u toksičnije oblike (Vajpayee et al., 1999). Ova pojava je rezultat oksido-redukcionih procesa, koji se konstantno obavljaju i u toku kojih hrom konstantno prelazi iz jednog oblika u drugi. Primena biljaka je zbog toga neophodna, kao jedan od načina za uspešno eliminisanje hroma iz zagađenog zemljišta. Akumuliranje hroma se dešava u 90% slučajeva u korenu, tačnije u vakuolama korenskih ćelija, što predstavlja svojevrsnu prirodnu reakciju biljaka na toksičnost (Shanker et al., 2005).

Mei et al. (2002) su ispitivali deset vrsta ekonomski važnih biljaka (*Avena sativa*, *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Tripholium brachycalycinum*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Hordeum vulgare*, *Lemna minor*, *Nicotiana tabacum*, *Pinus taeda*). Zaključili su da *Helianthus annuus* (suncokret) i *Glycine max* (soja) najbolje tolerišu prisustvo hroma u zemljištu. Suncokret je imao veću koncentraciju hroma u korenu, dok je kod soje koncentracija bila veća u listovima i izdancima. Rezultati su takođe pokazali značajnu translokaciju hroma iz korena prema ostalim delovima biljke soje, što može da ukaže na opravdanost potencijalne primene soje u fitoremedijacionim tehnologijama.

Mellem et al. (2012) su ispitivali bioakumulaciju Cr, Hg, As, Pb, Cu i Ni pomoću *Amaranthus dubius*, široko rasprostranjene jestive biljke širom Afrike, Azije i Južne Amerike. Rezultati su pokazali da biljka ima ograničen potencijal u bioakumulaciji Cr, Hg, Pb, Cu i Ni, ali da je veoma dobar hiperakumulator arsena.

Adki et al. (2013) su ispitivali sposobnost hiperakumulacije hroma biljke *Nopalea cochenillifera* Salm. Dyck., koja je pokazala tolerantnost na prisustvo 100 μM K_2CrO_4 u supstratu bez ikakvih značajnih promena u rastu korena nakon perioda inkubacije od 16 dana.

Primena agrotehničkih mera, kao što je đubrenje, može imati značajan uticaj na efikasnost biljaka u redukciji hroma(VI). Molla et al. (2012) su zabeležili značajan stepen redukcije rasta spanaća u zemljištu u kojem je finalna koncentracija Cr(VI) iznosila 50 mg/kg. Međutim, dodavanje organskih đubriva (stajnjaka) i sintetičkih adsorptivnih materijala (zeolit i getit) se pozitivno odrazilo na transfer hroma iz zemljište u biljku.

Usvajanje hroma(VI) bilo je statistički značajnije pri dodavanju stajnjaka u odnosu na sintetičke adsorbente. Autori zaključuju da organska supstanca ima veliki značaj u eliminaciji toksičnosti dodatog Cr(VI) i povećanju sposobnosti spanaća da iz zemljišta ekstrahuje velike količine Cr(VI) u odnosu na sintetičke adsorbente. Osim spanaća, i druge ekonomski značajne biljne vrste se mogu koristiti za apsorpciju hroma iz supstrata (Tabela 4).

Tabela 4. Redukcija hroma(VI) pomoću različitih izolata gljiva
(Izvor: modifikacija Garcia-Hernandez, 2017)

Vrsta biljaka	Koncentracija Cr u supstratu	Način i količina usvojenog Cr
Spanać	0, 5, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 i 135 mg/kg Cr(III) i Cr(VI)	2,8 Cr(III) i 3,14 Cr(VI) µg/g
Lucerka	0, 5, 10, 20 i 40 ppm Cr(IV)	Progresivno povećanje sa većom količinom hroma u korenu nego izdancima
Velika detelina	0, 100, 300, 500, 1000 mg/kg Cr(III)	Mobilni Cr x biljka Cr (r=0,965) Ukupan Cr x biljka Cr (r=0,629)
Pirinač	0,5, 1,5, 25 µg/ml obeleženim ⁵¹ Cr	Progresivno povećanje sa većom količinom hroma u korenu nego izdancima
Paradajz	0, 50, 100 mg/l Cr(III)	Koren usvaja hrom više nego izdanci, dok u plodovima nije detektovan
Suncokret, kukuruz i ptičija grahorica	0–200 mg/kg	Progresivno povećanje sa većom količinom hroma u korenu nego izdancima
Crni luk	0, 5, 50, 150 i 300 µg/ml Cr(III) i Cr(VI)	70–90% akumulacije u korenu
Suncokret	0, 100, 500 Cr(VI) i Cr(VI)	5,8 mg/kg u izdancima i 212 mg/kg u korenu
Karfiol, kelj pupčar, kupus	19,2 µM Cr(VI) i 19,2 µM Cr(III)	350 mg/kg u korenu i 2 mg/kg u izdancima
Soja	0, 0,05, 0,10, 0,50, 1,00 i 5,00 ppm	11,9–32,8 ppm u vrhovima
Karfiol	0. 0,2, 2 i 10 ppm ukupnog Cr	postepeno povećavanje povećanjem koncentracije Cr

Iz tabele se može zaključiti da se veća količina usvojenog hroma nalazila u korenu u odnosu na izdanke i druge nadzemne organe. Međutim, i pored toga što neke biljke tolerišu prisustvo hroma i mogu da rastu na staništima zagađenim hromom, većina biljaka negativno reaguje na njegovo prisustvo. U Tabeli 5 su prikazani fiziološki procesi i efekti koje na određene biljke ima prisustvo hroma(VI), pokazujući značajan poremećaj osnovnih fizioloških procesa i funkcija kod različitih biljaka.

Tabela 5. Uticaj hroma na rast i razvoj biljaka (Izvor: modifikacija Shanker et al., 2005)

Biljka	Fiziološki proces	Efekat
Boranija, detelina, zlatni pasulj, šećerna trska	Klijanje	Redukcija procenta klijanja i nicanja pupoljaka
<i>Salix viminalis</i> , <i>Caesalpinia pulcherrima</i> , zlatni pasulj, pirinač, <i>Sorghum</i> sp.	rast korena	Smanjenje dužine korena i suve mase, smanjenje prečnika korena i korenovih dlačica, proporcionalne varijacije u kortikalnoj zoni i zoni srži
<i>Curcuma sativa</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Panicum miliaceum</i> , <i>Sinapsis alba</i>	rast izdanaka	Redukcija visine biljaka
<i>Albizia lebbek</i> , <i>Acacia holocerica</i> , <i>Leucaena luecocephala</i> , pirinač	rast listova	Redukcija broja listova i biomase. Trifolijarni listovi više ugroženi nego primarni kod leguminoza, uvijanje lisnih vrhova, negativni efekat na mezostrukturu lista do 50%
<i>Portulaca oleracea</i> , karfiol, kupus, rotkvica, boranija, kukuruz, ptičija grahorica	prinos i produkcija suve mase	u usevima redukovan broj cvetova na biljci, redukcija težina zrna i mahune, povećan deformitet semena

2.11. Biljno-mikrobne interakcije u redukciji Cr(VI)

Primena biljaka u uklanjanju hroma iz kontaminirane životne sredine je ekonomičan i ekološki prihvatljiv postupak, koji ima i određene nedostatke.. Ovaj proces je spor i zahteva veliku količinu biljne biomase, odgovarajući rast korena i mobilnost metala u zemljištu, kako bi se dekontaminacija u zemljištima nesmetano odvijala (de-Bashan et al., 2012, Rajkumar et al., 2010). Ovi nedostaci mogu biti otklonjeni kombinovanom primenom biljaka i mikroorganizama, odnosno iskorištavanjem biljno-mikrobne interakcije.

Faisal i Hasnain (2005a) su ispitivali četiri soja hrom-redukujućih bakterija (*Ochrobactrum intermedium*, CrT-2, CrT-3 i CrT-4) prethodno izolovanih sa staništa kontaminiranog hromom. Posle inokulacije semenki suncokreta (*Helianthus annuus* var. SF-187) i porasta klijanaca na supstratu koji je sadržao hromate (300 µg CrCl₃ ili K₂CrO₄ ml/l), konstatovana je redukcija toksičnog Cr(VI) u manje toksični Cr(III) u prisustvu prokljalih semenki suncokreta. Bakterija *O. intermedium* je redukovala 68% početne koncentracije Cr(VI) u Cr(III), dok je efekat redukcije kod neinokulisane kontrole bio samo 3,5%. Inokulacija odabranim bakterijskim sojevima je dovela do boljeg porasta biljaka u poređenju sa neinokulisanom kontrolom nezavisno od prisustva ili odsustva hromata u supstratu. Ovaj efekat se može objasniti činjenicom da mnoge vrste bakterija stimulišu biljke da rastu u uslovima stresa, produkujući posebne supstance koje mogu biti od pomoći u procesima rasta, kao što su bakterije stimulatori biljnog rasta (Plant Growth Promoting Bacteria - PGPB). PGP bakterijski izolati mogu uticati na stimulaciju rast biljaka i u prisustvu organskih zagađivača (PAH, PCB i organokalajna jedinjenja) (Karličić, 2017).

Pomoću hrom-redukujućih bakterija i biljke *Eichornia crassipes*, Faisal i Hasnain (2005b) su ispitivali pri kojim pH vrednostima je stepen redukcije Cr(VI) najveći. Rezultati su pokazali da se proces najintenzivniji pri pH 5. Inokulacija semena ove biljke hrom-redukujućim bakterijama uticala je na znatno veći stepen redukcije Cr(VI) u odnosu na neinokulisane biljke. To pokazuje da je kapacitet biljke *Eichornia crassipes* za redukciju hroma iz rastvora mnogo veći u prisustvu bakterijskih izolata.

Tabela 6. PGPB izolati i biljke u uklanjanju hroma iz kontaminiranih zemljišta (Izvor: modifikacija Ahemad, 2015)

Cr(VI) rezistentne/redukujuće PGPB	Biljna vrsta	Uloga PGPB
<i>Brucella</i> sp. K12	hibiskus	Poboljšavanje rasta biljaka i useva, redukcija Cr(VI) i u zemljištu i u biljnim delovima
<i>Microbacterium</i> sp. SUCR140	grašak, kukuruz	Poboljšavanje rast biljaka, smanjenje toksičnosti Cr(VI) kod biljaka smanjivanjem njegove dostupnosti u zemljištu
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	kukuruz	Povećavanje biljne biomase i stepena usvajanja Cr(VI)
<i>Delftia</i> sp. JD2	lucerka, detelina	Povećanje stepena azotofiksacije
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Ralstonia metallidurans</i>	kukuruz	Poboljšavanje rasta biljaka, podsticanje mobilizacije metala u zemljištu, povećavanje stepena usvajanja Cr(VI)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> MTCC 7905	grašak	Poboljšavanje rasta biljaka na nižim temperaturama
<i>Brevibacterium</i> sp.	suncokret	Povećavanje visine biljaka, količine sveže i suve biomase, sadržaja auksina i procenta klijavosti
<i>Ochrobactrum intermedium</i> C32413	suncokret	Povećavanje dužine klica, sveže i suve mase, fosfatzne aktivnosti, sadržaja auksina
<i>Pseudomonas</i> sp. NBRI 4014	soja	Izduživanje korena i izdanaka

Rezultati prikazanih studija nedvosmisleno pokazuju da kombinacija primene biljaka i rizične mikroflore ima velik potencijal u zameni klasičnih remedijacionih sistema za uklanjanje teških metala, pa i hroma, iz kontaminirane životne sredine. U ovom procesu poseban značaj pripada bakterijama stimulatorima biljnog rasta (eng. plant growth promoting bacteria - PGPB). Njihova primena u kombinaciji sa biljkama dovodi do veće efikasnosti u uklanjanju hroma iz životne sredine, odnosno veće efikasnosti remedijacije (Tabela 6), kao i porasta biljaka (de-Bashan et al., 2012).

Brz rast i razvoj novih PGPB-a sa velikim hrom-redukujućim potencijalom u procesima remedijacije kontaminiranih zemljišta doprinosi smanjenju toksičnosti hroma i povećanju biljne biomase (Maqbool et al., 2014; Soni et al., 2014a; Soni et al., 2014b). Iz ovih sredina su izolovane mnoge vrste PGPB sa sposobnošću redukcije hroma(VI), kao što su *Ochrobactrum* (Faisal i Hasnain, 2005b), *Delftia* (Morel et al., 2011), *Pseudomonas* (Rajkumar et al., 2005), *Bacillus* (Karuppiah i Rajaram, 2011; Wani i Khan, 2010; Wani et al., 2007b), *Cellulosimicrobium* (Chatterjee et al., 2009), *Mesorhizobium* (Wani et al., 2008) i *Rhodococcus* (Trivedi et al., 2007). Sposobnost bakterija za reduktivnu imobilizaciju hroma je posebno važna kao mehanizam redukcije Cr(VI), jer u tim reakcijama dolazi do transformacije toksičnih derivata hroma u proizvode manje štetne za životnu sredinu (Chatterjee et al., 2009; Soni et al., 2013). Biljke inokulisane PGPB izolatima, koji pokazuju sposobnost redukcije Cr(VI), pokazale su bolju adaptaciju tokom rasta na zemljištima koja su kontaminirana hromom, jer ove bakterije dovode do promena u metabolizmu biljaka, kao što su ekstenzivna proliferacija korena, intenzivnija apsorpcija hranljivih supstanci, povećavanje bakterijskog usvajanja gvožđa preko siderofora, povećavanje regulaciju gena uključenih u ublažavanje stresa itd. Zbog toga se i povećava njihova tolerantnost na toksično dejstvo hroma. PGPB povećavaju biodostupnost hroma u zemljištu produkcijom različitih primarnih i sekundarnih metabolita, siderofora i organskih kiselina (Braud et al., 2009; Dimkpa et al., 2009; Gamalero i Glick, 2012). Takođe, bakterijski biosurfaktanti povećavaju dostupnost metala (uključujući i hrom) tako što potpomažu oslobađanje metala koji su snažno vezani za čestice zemljišta (Gamalero i Glick, 2012).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Teški metali su prirodne komponente životne sredine, ali neselektivna upotreba i različite ljudske aktivnosti uticale su na promenu njihovih geohemijskih ciklusa i biohemijsku ravnotežu, što je dovelo do akumulacije ovih polutanata u životnoj sredini. Akumulacija teških metala doprinela je smanjenju kvaliteta životne sredine i povećanju štetnih posledica na zdravlje ljudi. Uloga mikroorganizama i biljaka u biotransformaciji teških metala u netoksične forme se dugo proučava, a razumevanje molekularnih mehanizma dovelo je do brojnih biotehnoloških primena ekoremedijacionih tehnologija. Polazeći od toga, kao i od postavljene hipoteze da zemljišni mikroorganizmi imaju sposobnost da različitim mehanizmima učestvuju u biotransformaciji teških metala, kao i da u procesima najveću efikasnost pokazuju autohtoni izolati, kao osnovni cilj u doktorskoj disertaciji postavljeno je ispitivanje mogućnosti primene ekoremedijacionih tehnologija u cilju saniranja posledica višedecenijske industrijske aktivnosti na području bivše fabrike „Rog“ u Ljubljani (Republika Slovenija). Imajući u vidu rezultate preliminarnih istraživanja na ovoj lokaciji, koji ukazuju na visok sadržaj teških metala, kao i ograničenu efikasnost konvencionalnih metoda, primena ekoremedijacionih tehnologija može predstavljati dobru alternativu konvencionalnim metodama čija primena doprinosi poboljšanju kvaliteta životne sredine. Istraživanja su sprovedena na hemijski dobro okarakterisanim lokalitetima zemljišta.

S obzirom na to da su aktivnosti u fabrici „Rog“ obuhvatali i postupke hromiranja, kao poseban cilj istraživanja je postavljeno ispitivanje brojnosti bakterija i gljiva koje su tolerantne prema različitim koncentracijama hroma(VI).

Sagledavajući značaj mikrobnih populacija koje tolerišu prisustvo Cr(VI) u hranljivoj podlozi, u ekoremedijacionim tehnologijama poseban cilj je bila izolacija i ispitivanje tolerantnosti ovih populacija, prema različitim koncentracijama Cr(VI), kao i ispitivanje minimalne inhibitorne koncentracije hrom-tolerantnih mikroorganizama.

Osnovni korak u praktičnoj primena tolerantnijih bakterijskih populacija u remedijaciji zemljišta kontaminiranih hromom(VI) je ispitivanje biotransformacije Cr(VI) u laboratorijskim uslovima. Zbog toga je testiranje stepena redukcije različitih

koncentracija Cr(VI) pomoću različitih tolerantnih bakterijskih izolata izvršeno u laboratorijskim uslovima.

Precizna karakterizacija i identifikacija mikrobnih populacija je neophodna karika u primeni ekoremedijacionih tehnologija, tako da je jedan od ciljeva bio formiranje kolekcija autohtonih mikrobnih populacija sa visokom efikasnošću u biotransformaciji Cr(VI). Ove populacije, morfološki, fiziološki i molekularno okarakterisane mogu se koristiti i u ekoremedijaciji zemljišta sa povećanim sadržajem Cr(VI).

Višedecenijske industrijske aktivnosti, procesi hromiranja i galvanizacije u objektu bivše fabrike „Rog“ i narušavanje kvaliteta životne sredine i nakon prestanka aktivnosti i napuštanja objekta, uticale su na smanjenje mikrobnog diverziteta i smanjenje opšteg kvaliteta zemljišta. Zbog toga je za važan cilj ovih istraživanja postavljeno i ispitivanje biološke vrednosti kontaminiranog zemljišta i mogućnost da se ono koristi kao supstrat za gajenje biljaka.

Aktivnosti tokom izrade ove doktorske disertacije doprineće realizaciji dva opšta cilja, i to: ispitivanju mogućnosti primene autohtonih mikrobnih populacija u redukciji Cr(VI) u laboratorijskim uslovima i određivanju biološke vrednosti kontaminiranog zemljišta na lokaciji bivše fabrike „Rog“ u Ljubljani.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Istorijat industrijskih aktivnosti i kontaminacije na ispitivanom lokalitetu

Početni materijal u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju uzorci zemljišta uzeti sa lokaliteta bivše fabrike „Rog“ u Ljubljani (Republika Slovenija). Ova lokacija se odlikuje istorijskom kontaminacijom, jer je od osnivanja prvog postrojenja (pre oko 150 godina) do danas nekoliko puta promenjena proizvodna delatnost fabrike. S obzirom da se tokom različitih proizvodnih delatnosti nije vodilo računa o kvalitetu životne sredine, došlo je do stvaranja velike količine toksičnog otpada, koji je uticao i utiče na kvalitet zemljišta i ekosistema u celini.



Slika 3. Satelitski snimak lokacije bivše fabrike Rog (izvor: GoogleMaps)

Kao što je u uvodu spomenuto, objekat (Slika 3) se na spomenutoj lokaciji nalazi već 150 godina. Ivan Janež (Ivan Janesch) je kupio ovaj objekat 1871. godine i sagradio prizemnu zgradu za štavljenje koža. Nekoliko godina kasnije, na mestu starog objekta, vlasnik je sagradio jednospratnu kožarsku radionicu. Posle nekoliko izmena vlasnika,

dograđivanja i renoviranja, radionica je transformisana u fabriku Indus, koja je nakon Drugog svetskog rata konfiskovana i nacionalizovana.

U periodu od 1951-53. godine, fabrika je renovirana i preuređena, a proces proizvodnje je preusmeren sa kožarstva na proizvodnju bicikala i pisaćih mašina marke „Rog“. Tada je fabrika „Rog“, koja se nalazila u ljubljanskoj gradskoj opštini Vič, zbog povećanog obima proizvodnje, preseljena na lokaciju fabrike Indus (Slika 4). Sve do 1991. godine i raspada SFRJ, fabrika je proizvodila bicikle za celokupno tržište zajedničke države koja je tada imala 22 miliona stanovnika. Pored fabrike „Partizan“ u Subotici, osnovanoj još davne 1888. godine, ova fabrika je bila najznačajniji snabdevač tog velikog tržišta ovim proizvodnim artiklom. Osim tržišta republika bivše Jugoslavije, fabrika „Rog“ je izvozila bicikle i na tržište SAD-a i Kine.



a



b



c

Slika 4. Fabrika „Rog“: a) Upravna zgrada; b) i c) Radionice

Godine 1991. uoči raspada SFRJ, rukovodstvo fabrike „Rog“ je zbog velikih troškova logistike odlučilo da napusti proizvodnju u pogonu u Trubarevoj ulici i da spoji celu proizvodnu delatnost u industrijskoj zoni na Avijatičarskom putu. Godine 1992. je pokrenut postupak izmene prostorskog akta, koji je, između ostalog, predviđao i predlog za zaštitu proizvodne zgrade pored reke Ljubljanice. Godine 1994. je potpuno zaustavljena proizvodnja bicikala na toj lokaciji, nakon čega je objekat napušten.

Nakon napuštanja objekta došlo je do degradacije samog objekta i okolnog ekosistema. Hromiranje u Pogonu za galvanizaciju fabrike „Rog“ se odvijalo u galvanizacionim kadama, gde su potapani određeni delovi ramova bicikala. Pogon koji se sastojao od više etaža, nakon zatvaranja fabrike je ostao nezaštićen, tako da je tečnost koja je u njima ostala ili se nakon nakupljanja atmosferske vode taložila i isticala iz ispucalih betonskih kada, slivala niz zidove pogona prema reci Ljubljanici. Ovaj problem je aktuelan i danas, jer atmosferski talog doprinosi kontinuiranoj kontaminaciji, što potvrđuju i preliminarne hemijske analize izvršene 15 godina nakon zaustavljanja proizvodnog procesa u fabrici „Rog“ (Pavlin et al., 2010). Prema važećim regulativama Republike Slovenije, ovo zemljište je okarakterisano kao veoma zagađeno i dobilo je status opasnog otpada. Zbog neposredne blizine reke Ljubljanice, nametnula se potreba rešavanja ovog aktuelnog problema životne sredine, gde metode bioremedijacije daju najprihvatljivija rešenja.

4.2. Klimatske karakteristike

Klima na ispitivanom području je kontinentalna (Cfb po Koppenovoj klasifikaciji klime), koja se graniči sa suptropskom vlažnom klimom (Cfa po istoj Koppenovoj klasifikaciji klime), sa kontinentalnim karakteristikama, kao što su topla leta i umereno hladne zime. Najtopliji meseci sa fluktuacijama temperature od 25 i 30 °C su jul i avgust, dok je januar najhladniji mesec sa temperaturama koje se kreću uglavnom oko 0 °C. Padavine su relativno ravnomerno raspoređene tokom sva četiri godišnja doba, iako su zima i proleće malo suvlji nego leto i jesen. Za zimu je karakteristična pojava tzv. temperaturne inverzije, pri čemu se hladniji i vlažniji vazduh zadržava u nižim slojevima. Leta su sunčana i relativno topla zbog uticaja sredozemnih vazdušnih strujanja.

4.2.1. Temperatura vazduha

Prosečna godišnja temperatura u periodu 1980-2009. godine je iznosila 10,34 °C. U ovom periodu je najniža prosečna godišnja temperatura zabeležena 1980. godine i iznosila je 9,0 °C, a najviša 2000. godine i iznosila je 12,2 °C (Tabela 7).

Najtopliji mesec u 2010. godini je bio juli, sa prosečnom temperaturom od 22,9 °C. Najhladniji mesec u godini uzorkovanja bio je januar sa prosečnom temperaturom -1,5 °C (Tabela 8). U odnosu na višegodišnji prosek, većina ispitivanih parametara pokazuje nešto veće vrednosti u godini uzorkovanja (ARSO, 2018).

Tabela 7. Prosečna godišnja temperatura vazduha u periodu od 1980-2009. godine

Godina	Prosečna godišnja temperatura (°C)	Prosečna maksimalna temperatura (°C)	Apsolutna maksimalna temperatura (°C)	Prosečna minimalna temperatura (°C)	Apsolutna minimalna temperatura (°C)
1980	9,0	13,8	32,8	4,9	-15,2
1981	9,7	15,1	33,7	5,2	-14,4
1982	10,4	15,2	32,8	6,1	-10,6
1983	10,2	15,6	37,1	5,4	-14,1
1984	9,5	13,9	33,3	5,7	-12,9
1985	9,3	14,3	33,1	5,0	-20,3
1986	9,5	14,5	32,7	5,4	-13,3
1987	9,6	14,4	33,2	5,6	-18,3
1988	10,5	15,4	34,9	6,2	-14,5
1989	10,5	15,5	32,0	6,1	-11,4
1990	10,7	15,7	33,4	5,8	-11,1
1991	10,0	14,9	34,2	5,4	-14,6
1992	11,1	16,1	36,5	6,4	-11,3

1993	10,6	15,6	34,9	6,1	-12,6
1994	11,8	16,7	34,7	7,5	-10,6
1995	10,8	15,6	33,5	6,5	-9,2
1996	9,8	13,9	33,3	6,1	-13,0
1997	10,8	15,6	30,8	6,4	-9,1
1998	11,0	16,0	34,1	6,5	-13,1
1999	11,0	15,6	33,1	7,0	-11,9
2000	12,2	17,3	35,6	7,5	-14,0
2001	11,4	16,2	35,2	7,0	-14,5
2002	11,8	16,4	34,9	7,6	-12,9
2003	11,6	16,9	37,3	6,6	-16,2
2004	10,7	15,2	34,3	6,5	-11,2
2005	10,4	15,0	35,0	6,3	-14,1
2006	11,4	16,2	35,9	7,0	-15,7
2007	12,0	17,1	37,0	7,4	-6,9
2008	11,6	16,2	32,7	7,4	-7,7
2009	11,7	16,5	32,9	7,1	-13,1
Prosek	10,34	15,05	33,06	6,12	-12,51

Tabela 8. Prosečna godišnja temperatura vazduha u 2010. godini

Mesec	Prosečna mesečna temperatura (°C)	Prosečna maksimalna temperatura (°C)	Apsolutna maksimalna temperatura (°C)	Prosečna minimalna temperatura (°C)	Apsolutna minimalna temperatura (°C)
Januar	-1,5	0,4	7,7	-3,0	-11,0
Februar	1,3	4,2	13,3	-1,3	-9,7
Mart	6,2	10,4	18,3	2,4	-5,7
April	11,5	16,9	24,6	6,1	0,5
Maj	15,3	19,8	26,8	11,2	4,9
Jun	20,3	25,5	31,8	14,5	7,9
Jul	22,9	28,9	35,9	17,3	11,9
Avgust	20,3	26,0	31,1	15,5	7,4
Septembar	14,7	19,2	25,1	11,3	7,2
Oktobar	9,5	13,6	18,3	6,1	-1,6
Novembar	8,1	10,3	16,2	6,0	-2,4
Decembar	-0,4	2,4	10,1	-3,3	-11,9
Prosek	10,68	14,8	-	6,9	-

4.2.2. Količina padavina

U periodu 1980-2009. godine prosečna količina padavina je iznosila 1353,69 mm (Tabela 9) i veoma odstupa od količine padavina u godini uzorkovanja, gde je zabeleženo 1797,9 mm padavina (Tabela 10). U tridesetogodišnjem periodu, 2003. godine je zabeležena najmanja količina padavina od 1091 mm. Broj dana sa padavinama je takođe znatno veći u godini uzorkovanja (186) u odnosu na višegodišnji period (u proseku 151,97 dana), uz manju prosečnu dnevnu količinu padavina u godini uzorkovanja (ARSO, 2018).

Tabela 9. Količina padavina u periodu 1980-2009. godine

Godina	Godišnja količina padavina (mm)	Maksimalna dnevna količina padavina (mm)	Broj dana s padavinama (>0,1 mm)
1980	1535,0	91,4	169
1981	1402,3	51,8	152
1982	1418,4	68,5	155
1983	1149,2	47,8	121
1984	1423,7	66,3	169
1985	1610,6	69,6	158
1986	1265,0	54,2	157
1987	1527,8	89,7	166
1988	1178,3	104,4	142
1989	1211,1	76,9	130
1990	1331,3	72,2	134
1991	1181,9	48,0	146
1992	1432,5	78,8	151
1993	1176,5	80,3	150
1994	1406,7	92,5	151
1995	1422,8	66,4	172
1996	1446,4	55,0	179
1997	1229,9	85,6	149
1998	1359,2	105,7	158
1999	1500,7	70,6	156
2000	1363,1	59,4	148

2001	1327,7	79,9	161
2002	1287,8	54,5	161
2003	1091,0	79,2	119
2004	1696,1	86,4	151
2005	1403,3	71,4	162
2006	1140,8	68,2	133
2007	1195,9	66,2	136
2008	1490,2	62,2	158
2009	1405,5	77,7	165
Prosek	1353,69	72,69	151,97

Tabela 10. Količina padavina u 2010. godini

Mesec	Prosečna godišnja količina padavina (mm)	Maksimalna dnevna količina padavina (mm)	Broj dana s padavinama (>0,1 mm)
Januar	124,6	38,6	18
Februar	144,5	41,4	20
Mart	34,6	10,4	11
April	81,9	24,5	16
Maj	102	18,5	19
Jun	123,7	34,6	11
Jul	111,7	53,3	10
Avgust	175,8	29,1	12
Septembar	425,3	139,6	16
Oktobar	105,4	36,3	13

Novembar	186	30,8	21
Decembar	182,4	38	19
Ukupno	1797,9	495,1	186
Prosek	149,83	41,26	15,5

4.2.3. Relativna vlažnost vazduha

U periodu od 1980-2009. godine, prosečna relativna vlažnost vazduha je iznosila 72,81% (Tabela 11), a u godini uzorkovanja 78,08% (Tabela 12). Najviša prosečna relativna vlažnost vazduha u višegodišnjem periodu bila je 1989. godine i iznosila je 79%, a najniža 2003. godine (68%). U godini uzorkovanja, najviša prosečna relativna vlažnost vazduha bila je u septembru, oktobru i decembru (97%), a najmanja u julu i iznosila je 81% (Tabela 12). Apsolutna minimalna relativna vlažnost vazduha znatno je veća u godini uzorkovanja u odnosu na višegodišnji period (Tabele 11 i 12) (ARSO, 2018).

Tabela 11. Relativna vlažnost vazduha u periodu od 1980-2009. godine

Godina	Prosečna relativna vlažnost vazduha (%)	Prosečna relativna vlažnost vazduha u 7h (%)	Prosečna relativna vlažnost vazduha u 14h (%)	Prosečna relativna vlažnost vazduha u 21h (%)	Apsolutna minimalna relativna vlažnost vazduha (%)
1980	78	90	62	81	22
1981	76	90	60	79	19
1982	77	89	62	79	26
1983	75	90	57	78	24
1984	77	89	62	79	22
1985	77	90	61	80	19
1986	78	90	62	81	26

1987	78	90	64	80	28
1988	77	90	62	80	26
1989	79	92	62	83	29
1990	76	90	60	79	22
1991	76	90	59	78	28
1992	76	90	61	77	25
1993	73	86	59	74	24
1994	74	86	60	46	27
1995	74	86	60	75	24
1996	75	86	62	77	24
1997	72	86	57	74	20
1998	72	86	57	73	27
1999	76	88	61	77	27
2000	72	87	56	74	22
2001	73	86	58	74	27
2002	75	88	61	77	23
2003	68	84	52	69	20
2004	76	89	61	78	23
2005	77	92	60	78	20
2006	75	90	58	78	18
2007	74	90	56	76	23
2008	76	90	59	77	22
2009	75	91	57	77	13
Prosek	72,81	85,84	57,68	73,81	22,58

Tabela 12. Relativna vlažnost vazduha u 2010. godini

Mesec	Prosečna relativna vlažnost vazduha (%)	Prosečna relativna vlažnost vazduha u 7h (%)	Prosečna relativna vlažnost vazduha u 14h (%)	Prosečna relativna vlažnost vazduha u 21h (%)	Apsolutna minimalna relativna vlažnost vazduha (%)
Januar	88	93	80	89	30
Februar	86	95	76	89	37
Mart	73	90	56	73	24
April	66	89	46	63	22
Maj	69	83	54	71	27
Jun	65	82	45	67	28
Jul	64	81	46	66	29
Avgust	77	95	56	78	29
Septembar	84	97	64	92	28
Oktoabar	85	97	66	92	38
Novembar	90	95	83	92	49
Decembar	90	97	82	91	45
Prosek	78,08	91,17	62,83	80,25	32,17

4.2.4. Oblačnost

Prosečna oblačnost u periodu 1980-2009. godine je iznosila 61,35% (Tabela 13), a u 2010. godini 67,67% (Tabela 14). Najveća prosečna oblačnost u periodu 1980-2009. godine je iznosila 70% i zabeležena je 1984. i 1996. godine. U 2010. godini prosečna oblačnost je bila najveća tokom januara (88%), a najmanja u julu i iznosila je 42% (Tabela 14). Prosečan broj oblačnih dana u 2010. godini iznosi 12,08 (Tabela 14), odnosno 145 dana na godišnjem nivou, što je više u odnosu na višegodišnji prosek koji iznosi 126,32 dana (Tabela 13) (ARSO, 2018).

Tabela 13. Oblačnost u periodu 1980-2009. godine

Godina	Prosečna oblačnost (%)	Prosečna oblačnost u 7h (%)	Prosečna oblačnost u 14h (%)	Prosečna oblačnost u 21h (%)	Broj oblačnih dana
1980	69	81	67	60	150
1981	63	72	64	52	125
1982	65	77	63	57	138
1983	58	66	58	50	106
1984	70	79	68	62	165
1985	63	74	59	57	137
1986	65	75	61	58	146
1987	66	75	64	60	150
1988	64	73	62	56	128
1989	63	79	59	51	125
1990	59	67	57	52	129
1991	63	70	62	58	133
1992	61	67	60	56	132
1993	63	69	63	57	135
1994	65	70	62	62	132
1995	67	74	65	61	153
1996	70	76	67	66	166
1997	63	71	61	58	135
1998	62	70	59	56	113
1999	67	74	65	61	133
2000	59	66	58	53	104

2001	62	70	62	54	112
2002	65	71	65	59	138
2003	55	60	54	52	89
2004	66	72	66	60	140
2005	64	72	60	58	121
2006	60	67	58	55	112
2007	60	69	56	55	112
2008	63	70	61	58	134
2009	62	69	60	58	123
Prosek	61,35	69,19	59,55	55,23	126,32

Tabela 14. Oblačnost u 2010. godini

Mesec	Prosečna oblačnost (%)	Prosečna oblačnost u 7h (%)	Prosečna oblačnost u 14h (%)	Prosečna oblačnost u 21h (%)	Broj oblačnih dana
Januar	88	92	86	86	23
Februar	85	98	76	82	18
Mart	67	76	71	53	11
April	56	57	60	51	12
Maj	68	68	73	63	9
Jun	51	49	51	52	6
Jul	42	38	47	40	2
Avgust	56	69	56	43	6
Septembar	73	91	63	65	13
Oktoabar	71	83	65	64	13

Novembar	82	92	76	78	18
Decembar	73	81	69	69	14
Prosek	67,67	74,5	66,08	62,17	12,08

4.3. Objekat istraživanja i uzimanje uzoraka zemljišta

Uzorci kontaminiranog brownfield zemljišta (Monserie et al., 2009) u ovim istraživanjima su uzeti sa jugozapadnog dela Pogona za galvanizaciju, u ulici Trubarevoj br. 72 (N: 46°3'44"; E: 14°30'53,43"), na lokalitetu bivše fabrike „Rog“ u Ljubljani (Republika Slovenija), u neposrednoj blizini reke Ljubljanice. Uzorkovanje brownfield zemljišta je obavljeno u julu 2010. godine sa četiri lokacije. Opis lokacija, oznake uzoraka i dubina uzorkovanja predstavljeni su u Tabeli 15 (ARSO, 2018).

Tabela 15. Oznake uzoraka, lokacija i dubina uzorkovanja

Oznaka uzorka	Lokacija uzorkovanja	Dubina uzorkovanja (cm)
1	Pogon za galvanizaciju, površinski uzorak zemljišta	0-20
2	Pogon za galvanizaciju, podpovršinski uzorak	20-40
3	Pored samog objekta, u pravcu reke Ljubljanice, površinski uzorak	0-20
4	Između objekta i reke Ljubljanice, površinski uzorak	0-20

Kontrolni uzorak uzet je iz zemljišta u blizini objekta, iz obližnjeg parka, koji nije izložen kontaminaciji iz objekta bivše fabrike „Rog“ (N: 46°08'16.27" E: 14°51'9.313"). Uzorci su uzeti sondom za uzimanje uzoraka i čuvani su u frižideru na +4 °C do hemijske i mikrobiološke karakterizacije.

U laboratoriji je pripremljen kompozitni uzorak, a zatim su obavljene hemijske i mikrobiološke analize uzoraka brownfield zemljišta.

4.4. Hemijska karakterizacija uzoraka zemljišta

4.4.1. Osnovne hemijske analize

pH vrednost je određena potenciometrijski u suspenziji zemljišta sa vodom i 1M KCl u odnosu 1:2,5, sadržaj CaCO₃ volumetrijski pomoću Scheibler-ovog kalcimetra, sadržaj humusa metodom po Kotzmann-u, ukupni sadržaj azota metodom po Kjeldahl-u, pristupačni fosfor i kalijum AL metodom nakon ekstrakcije amonijum-laktatom (Egner et al., 1960).

Procena reakcije sredine brownfield zemljišta obavljena je na osnovu priručnika Soil Survey Division Staff (1993). Granične vrednosti obezbeđenosti zemljišta ukupnim azotom određene su po Wohltmann-u, pristupačnog fosfora po Egner et al. (1960), kalijuma prema Vukadinović i Vukadinović (2011) i organskog ugljenika prema Gračaninu (1947).

4.4.2. Određivanje sadržaja metala u uzorcima brownfield zemljišta

Za ekstrakciju metala iz zemljišta i mineralizaciju su korišćene jake kiseline i mikrotalasno zračenje (Berghof, Speed wave 4, Nemačka). Digestija je rađena sa 0,5 g suvog uzorka u vremenu od 16h pri 105 °C. Digestija uzoraka obavljena je metodom USEPA 3051B (2007) pomoću 9 ml 98% azotne kiseline, 3 ml 35% hlorovodonične kiseline i 1 ml 30% vodonik-peroksida. Dobijeni ekstrakti su analizirani Spectro Genesis ICP-OES metodom sa Smart Analyzer Vision softverom (SPECTRO Analytical Instruments GmbH, Boschstr. 10. 47533 Kleve, Nemačka). Konstruisanje krive izvršeno je na osnovu individualnih standarda koncentracije 1 g/l (Ultra Scientific U.S.A.) i multistandarda (SPS-SW2, LGC, Velika Britanija) za sledeće elemente: gvožđe (Fe), mangan (Mn), natrijum (Na), cink (Zn), bakar (Cu), hrom (Cr), olovo (Pb), nikl (Ni), kadmijum (Cd), arsen (As), živa (Hg), molibden (Mo), sumpor (S), kalcijum (Ca), magnezijum (Mg), kobalt (Co), antimon (Sb), kalaj (Sn), bor (B), stroncijum (Sr), litijum (Li), aluminijum (Al), barijum (Ba), selen (Se) i vanadijum (V).

4.5. Mikrobiološka karakterizacija uzoraka brownfield zemljišta

Mikrobiološke analize uzoraka zemljišta su izvršene na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u laboratoriji Katedre za ekološku mikrobiologiju. Nakon

razređivanja uzoraka u fiziološkom rastvoru, izvršena je homogenizacija u orbitalnom šejkeru (180 rpm, 25 °C, 20 min). Mikrobiološka aktivnost uzoraka zemljišta je određena ispitivanjem brojnosti bakterija, gljiva i aktinomiceta.

Tabela 16. Sastav hranljive podloge 0,1xTSA

Komponenta podloge	Količina
Tripton	1,5 g
Soja pepton	0,5 g
Agar	1,5 g
NaCl	0,5 g
Destilovana voda	1000 ml

Hranljiva podloga 0,1xTSA (tripton soja agar) korišćena je za određivanje ukupnog broja bakterija (Tabela 16).

Tabela 17. Sastav hranljive podloge Roze bengal streptomycin agar (Peper et al., 1995)

Komponenta podloge	Količina
Agar	15 g
Glukoza	10 g
Pepton	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
Roze bengal	0,033 g
Streptomycin sulfat	0,3 g*
Destilovana voda	1000 ml

* nakon sterilizacije

Ukupan broj gljiva je određen na podlogama roze bengal streptomycin agar (Peper et al., 1995). Sastav ove hranljive podloge prikazan je u Tabeli 17.

Brojnost aktinomiceta je određena na podlozi skrobno-amonijačni agar, čiji je sastav prikazan u Tabeli 18.

Tabela 18. Sastav hranljive podloge Skrobno-amonijačni agar

Komponenta podloge	Količina
Skrob	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
KNO ₃	1 g
CaCO ₃	3 g
Agar	20 g
Destilovana voda	1000 ml

Sve hranljive podloge su sterilisane fizičkom sterilizacijom u autoklavu, pri temperaturi od 120°C u trajanju od 20 minuta. Pre zasejavanja, hranljive podloge su rastopljene i ohlađene na 45 °C. U zavisnosti od grupe mikroorganizama, inokulumom određenog razređenja inokulisane su sterilne hranljive podloge i inkubirane u inkubatoru (Binder, Nemačka).

Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Brojnost mikroorganizama izražena je kao CFU (colony forming units) po gramu suvog zemljišta. Vlažnost uzoraka zemljišta određena je nakon sušenja u sušnici (Binder, Nemačka) na temperaturi od 105 °C u trajanju od 2h.

4.5.1. Određivanje brojnosti hrom-rezistentnih bakterija

Za određivanje brojnosti hrom-rezistentnih bakterija korišćena je agarizovana Lauria-Bertani (LB) podloga (Tabela 19). Ovoj podlozi je podešena pH vrednost na 5, 7 i 9, dodavanjem određenih količina HCl, odnosno NaOH. Reakcija sredine je podešavana pre dodavanja agara i obavljanja procesa sterilizacije. LB podloga je obogaćena različitim koncentracijama kalijum-dihromata (K₂Cr₂O₇), tako da su finalne koncentracije Cr(VI) u LB podlozi iznosile 500, 1000, 1500 i 3000 mg/l. Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Inkubacija je obavljena u inkubatoru (Binder, Nemačka) na 30 °C u trajanju od 5 dana. Brojnost bakterija izražena je kao CFU (colony forming

units) po gramu suvog zemljišta. Vlažnost uzoraka zemljišta je određena na isti način kao u poglavlju 4.5.

Tabela 19. Sastav agarizovane Lauria-Bertani (LB) podloge

Komponenta podloge	Količina
Tripton	10 g
Agar	20 g
NaCl	10 g
Kvaščevev ekstrakt	5 g
Glukoza	0,002 g
Destilovana voda	1000 ml

4.5.2. Određivanje brojnosti hrom-rezistentnih gljiva

Za određivanje brojnosti hrom-rezistentnih bakterija korišćena je podloga roze bengal streptomycin agar (Tabela 17). Ovoj podlozi je podešena pH vrednost na 5, 7 i 9, dodavanjem određenih količina HCl, odnosno NaOH. Reakcija sredine je podešavana pre dodavanja agara i obavljanja procesa sterilizacije. Finalna koncentracija Cr(VI) u ovoj podlozi iznosila je 500 mg/l. Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Inkubacija je obavljena u inkubatoru (Binder, Nemačka) na 25 °C u trajanju od 5 dana. Brojnost gljiva izražena je kao CFU (colony forming units) po gramu suvog zemljišta. Vlažnost uzoraka zemljišta je određena na isti način kao u poglavlju 4.5.

4.6. Izolacija i dobijanje čistih kultura hrom-rezistentnih bakterija i gljiva

U uzorcima zemljišta je nakon određivanja brojnosti hrom-rezistentnih bakterija urađena i njihova izolacija. Višestrukom primenom metode iscrpljivanja na agarizovanoj hranljivoj podlozi LB izolati su prečišćeni i dobijene su čiste kulture. Održavanje čistih kultura izvršeno je na LB podlozi obogaćenoj sa 1 i 2 mM Cr(VI) do daljih istraživanja. Na identičan način, pomoću podloge roze bengal streptomycin agar, rađena je izolacija hrom-rezistentnih gljiva, koje su održavane na isti način kao i hrom-rezistentne bakterije.

4.7. Ispitivanje morfoloških osobina hrom-rezistentnih bakterijskih izolata

Čiste kulture bakterijskih izolata su morfološki okarakterisane ispitivanjem makromorfoloških karakteristika posle rasta na podlozi hranljivi agar (Tabela 20) i mikromorfoloških karakteristika kolonija pomoću mikroskopa Leica DMSL (Nemačka). Nakon morfološke karakterizacije, bakterijski izolati su čuvani u frižideru na +4 °C do ispitivanja njihove tolerantnosti na Cr(VI).

Tabela 20. Sastav hranljive podloge Hranljivi agar (Torlak, Srbija)

Komponenta podloge	Količina
Pepton-1	15 g
Mesni ekstrakt	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar	18 g
Destilovana voda	1000 ml

4.8. Morfološka karakterizacija gljiva

Čiste kulture izolata gljiva su morfološki okarakterisane ispitivanjem makromorfoloških posle rasta na podlogama Roze bengal streptomycin agar (Tabela 17) i Czapekov agar (Tabela 21) i mikromorfoloških karakteristika pomoću mikroskopa Leica DMSL.

Tabela 21. Sastav hranljive podloge Czapekov agar

Komponenta podloge	Količina
Saharoza	30 g
NaNO ₃	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	u tragovima
Agar-agar	15 g
Kvaščev ekstrakt	0,5 – 1 g

4.9. Ispitivanje tolerantnosti bakterijskih izolata na prisustvo hroma

Za ispitivanje tolerantnosti bakterija na prisustvo Cr(VI), korišćeni su morfološki različiti izolati hrom-rezistentnih bakterija. Agarizovana LB hranljiva podloga, kojoj je dodat Cr(VI) u koncentracijama od 100, 500, 750, 1000 i 1500 mg/l je inokulisana tečnim inokulumom prekonoćnih čistih kultura bakterija. U kontrolnoj varijanti, LB hranljiva podloga bez prisustva hroma je inokulisana čistim kulturama bakterija. Inkubacija je obavljena u termostatu (Binder, Nemačka) pri temperaturi od 30 °C u trajanju od 6 dana. Nakon inkubacije, određen je procenat bakterija koje su bile tolerantne na pomenute koncentracije hroma u odnosu na kontrolu. Pod tolerantnošću se smatralo da je bakterijska kultura nakon perioda inkubacije pokrivala minimum 50% površine agarizovane podloge. Ogled je izveden u tri ponavljanja.

4.10. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) hroma(VI)

Za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) hroma(VI) korišćena je modifikovana metoda Mgbemena et al. (2012). Za ovaj ogled korišćeni su morfološki različiti bakterijski izolati hrom-rezistentnih bakterija. Zasejavanje prekonoćnih kultura bakterija metodom uboda je obavljeno na agarizovanoj hranljivoj podlozi LB (pH 7 i 9), kojoj je dodat Cr(VI) do finalnih koncentracija od 100, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 mg/l. Inkubacija je obavljena u inkubatoru (Binder, Nemačka) na temperaturi od 30 °C u trajanju od 6 dana. Kao kontrola, korišćena je agarizovana LB podloga bez dodatog Cr(VI). Eksperiment je postavljen u tri ponavljanja. Karakterizacija rasta bakterija obavljena je na svaka 24 sata; rast je procenjen kao veoma dobar (++++), dobar (+++), osrednji (++) i slab (+), dok je odsustvo rasta označeno kao minus (-). Najtolerantniji izolati su održavani presejavanjem na LB hranljivu podlogu do ispitivanja bakterijske redukcije hroma. Na sličan način ispitane su i MIK za rast gljiva, ali je pH vrednost LB hranljive podloge podešena na 6, kojoj je dodat Cr(VI) do finalnih koncentracija od 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 i 2000 mg/l. Inkubacija je obavljena u inkubatoru (Binder, Nemačka) na temperaturi od 26 °C u trajanju od 5 dana. Kao kontrola, korišćena je agarizovana LB podloga bez dodatog Cr(VI). Eksperiment je postavljen u tri ponavljanja.

4.11. Identifikacija mikroorganizama

4.11.1. Identifikacija bakterijskih izolata primenom API testa

Čiste kulture bakterija identifikovane su primenom API i APIWEB tehnike (Biomerieux Inc., Francuska). Za identifikaciju su, prema uputstvu proizvođača, korišćeni API 50 CH. Pre identifikacije, sve čiste kulture su presejane na podlogu MPA. Za identifikaciju su korišćene kulture starosti 24h. Očitavanje rezultata obavljeno je nakon 48h inkubacije.

4.11.2. Molekularna identifikacija bakterijskih izolata primenom metode Polimeraza lančane reakcije (PCR)

Identifikacija i potvrđivanje pet izolata Cr(VI) redukujućih bakterija (212-9, 342-9, 270-9R, 351-9 i 270-9C) izvršena je molekularnom karakterizacijom. Genomska DNK iz *Bacillus spp.* Izolovana je prema postupku koji je opisao Dimkić et al. 2017. 16S rDNK gen je amplifikovan korišćenjem univerzalnih prajmera UN1_{16s}F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') i UN1_{16s}R (5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3'). Za bolju identifikaciju, tuf gen (kodiranje faktora elucije TU) amplifikovano je prethodno opisanom metodom Caamano-Antelo et al. (2015) i korišćena u radu Draganića et al. (2017). Za amplifikaciju prajmera tuf gena su korišćeni tufGPF (5'-ACGTTGACTGCCAGGACAC-3') i tufGPR (5'-GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA-3'). PCR amplifikacija 16S i tuf gena je izvedena u zapremini od 25 µL reakcione smeše, koja sadrži 1 µL matrične DNK, 1,75 i 2 µL 25 mM MgCl₂ (KAPA Biosystems, USA); 2.5 µL 10 × KAPA Taq pufera; 0.5 µL (10 mM) of dNTP smeše (KAPA Biosystems, USA); 1 µL i 2.5 µL svakog prajmera (10 µM) za 16S i *tuf*; 17.15 i 13.9 µL of ultra-čiste vode bez prisustva enzima DNase/RNase (Gibco, UK) za 16S i *tuf* i 0.1 µL (5U/µL) KAPA Taq polimeraze (KAPA Biosystems, USA). PCR reakcije za 16S rDNK su izvedene početnim korakom denaturacije na 94 °C u trajanju od 5 min, nakon čega je usledilo 30 ciklusa na 94 °C u trajanju od 30 s, 50 °C spajanje primera u trajanju od 1 min, i produženom fazom na 72 °C u trajanju od 30 s, sa terminalnom elongacijom na 72 °C u trajanju od 7 min. Uslovi za PCR amplifikaciju tuf gena su bili sledeći: početni stepen denaturacije na 95 °C u trajanju od 8 min, nakon čega je usledilo 35 ciklusa od 30 s denaturacije na 95 °C, spajanje

prajmera na 55 °C u trajanju od 1 min i 30 s za elongaciju na 72 °C; terminalna elongacija je izvršena na 72 °C u trajanju od 10 min. Proizvodi PCR-a (1500 baznih parova za 16S rDNA i 791 za *tuf*) prečišćeni su korišćenjem kolone QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) i poslani na sekvencioniranje u Macrogen Sequencing Service (Holandija). Kod dobijenih sekvenci je ispitivana homologija sa sekvencionisanim genom u bazi podataka GenBank, korišćenjem BLAST 2.5.0 programa za nukleotide Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (<http://www.ncbi.nih.gov/>). Sve sekvence su složene korišćenjem ClustalW programa i filogenetsko stablo je napravljeno pomoću MEGA 7, metodom spajanja suseda (Neighbour-joining metoda) koja se zasniva na merenju matrične udaljenosti pomoću Kimurinog dvoparametarskog modela zamene nukleotida. Topologija stabala je ocenjena pomoću metode ponovnog uzorkovanja (bootstrap resampling method) sa 1000 replikata i *Clostridium botulinum* je uključen kao spoljašnja grupa.

4.11.3. Morfološka identifikacija gljiva

Identifikacija čistih kultura gljiva obavljena je nakon ispitivanja morfoloških osobina na podlogama Roze bengal streptomycin agar i Czapekov agar. Dobijeni rezultati su upoređeni sa podacima iz ključa za identifikaciju gljiva (Samson et al., 2004).

4.12. Redukcija hroma(VI) pomoću bakterijskih izolata i praćenje rasta bakterija

Nakon određivanja tolerantnosti bakterijskih izolata na različite koncentracije hroma(VI), ispitana je njihova sposobnost redukcije hroma. Tokom ovih oglada, praćen je i rast bakterijskih izolata.

4.12.1. Ispitivanje sposobnosti redukcije hroma(VI) pomoću bakterijskih izolata

Za određivanje sposobnosti redukcije Cr(VI) pomoću bakterijskih izolata, korišćena je sterilna tečna LB hranljiva podloga (sa dodatkom glukoze 10 g/l), koja je inokulisana sa 10% (v/v) bakterijskog 20-očasovnog inokuluma (1×10^8 ćelija/ml), uz dodatak različitih koncentracija $K_2Cr_2O_7$ tako da su finalne koncentracije Cr(VI) u podlozi bile 50, 100,

200, 300, 500 i 1000 mg/l. Inkubacija je obavljena na temperaturi od 30 °C u trajanju od 48h u orbitalnom šejkeru (IKA, IK-3692500, Nemačka) pri 120 rpm/min. Sadržaj preostalog hroma u supernatantu određen je DPC (diphenylcarbazine) metodom (Bartlett and James, 1996) merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 540 nm pomoću spektrofotometra DR 3800 sc VIS Spectrophotometer (Danska). U kontrolnoj varijanti, abiotička redukcija hroma (bez prisustva bakterija) je praćena u tečnoj LB hranljivoj podlozi kojoj su dodate navedene količine hroma. Uzorci za merenje sadržaja hroma uzeti su na početku ogleada, kao i nakon 2, 4, 6, 18, 24 i 48h. Svi eksperimenti su postavljeni u tri ponavljanja. Za ispitivanje sposobnosti redukcije hroma(VI) su odabrani izolati izolati 270-9R, 342-9, 212-9, 351-9 i 270-9C.

4.12.2. Bakterijski rast tokom redukcije hroma

Rast bakterijskih izolata tokom redukcije hroma u tečnoj LB hranljivoj podlozi praćen je spektrofotometrijski merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 600 nm pomoću spektrofotometra DR 3800 sc VIS Spectrophotometer (Danska). Početni sadržaj hroma u LB podlozi, uslovi inkubacije i intervali uzimanja uzoraka za merenje bakterijskog rasta bili su identični kao što je opisano u poglavlju 4.11.1.

4.13. Rast biljaka na zemljištu kontaminiranom teškim metalima

U cilju ispitivanja potencijala kontaminiranog zemljišta kao supstrata za klijanje semena biljaka, postavljen je preliminarni ogled gde su odabrane sledeće biljke: lucerka (*Medicago sativa*), tatula (*Datura stramonium*), zevalica (*Antirrhinum major*), ljubičica (*Viola tricolor*), salata (*Lactuca sativa*), engleski ljulj (*Lolium perenne*), suncokret (*Helianthus annuus*), bosiljak (*Ocimum basilicum*), estragon (*Artemisia dracunculus*) i uljana repica (*Brassica napus*). Sva semena su dobijena od lokalnog distributera. U ovom preliminarnom ogledu korišćena su dva supstrata za klijanje: jedan je bio kontaminirano zemljište iz uzorka 1, a drugi kontaminirano zemljište iz uzorka 1 i kontrolno zemljište u ovim istraživanjima u odnosu 1:4. Hemijski sastav ovih zemljišta prikazan je u Tabelama 23 i 24.

Ogled je postavljen u plastičnim sudovima u staklari Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Vlaženje supstrata je izvršeno po potrebi. Nakon 10 dana ustanovljeno je da kod većine biljnih vrsta nije došlo do klijanja semena, ili je procenat

isklijalnih semena bio veoma nizak, a dužina klijanaca mala. Jedino su semena biljaka suncokreta, bosiljka, estragona i uljane repice pokazala klijala na oba supstrata i korišćena su u daljim istraživanjima.

Pre postavljanja ogleda, semena ovih biljnih vrsta su podvrgnuta ispiranju u 3% rastvoru natrijum hipohlorita (NaClO) u trajanju od 60 sekundi. Ogled je postavljen plastičnim kutijama zapremine 2 litra (24×12×12cm). Eksperiment je obavljen u komori za isključavanje i postavljen na temperaturne, dan/noć (30/20 °C), vremenske (12/12h), i svetlosne (110 - 160 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) uslove isključavanja (ISTA, 1996). Kao supstrat za naklijavanje korišćeni su uzorci kontaminiranog zemljišta sa lokacije 1 i kontrolno zemljište iz parka u centru Ljubljane u različitim odnosima. Hemijske osobine ovih uzoraka prikazane su u Tabelama 23 i 24. U ovom ogledu korišćeno je 4 supstrata koje su činili kontaminirano i kontrolno zemljište u različitim odnosima:

1. 100% zemljište iz parka – kontrola
2. 80% zemljišta iz parka + 10% kontaminiranog zemljišta (tretman 10)
3. 70% zemljišta iz parka + 20% kontaminiranog zemljišta (tretman 20)
4. 60% zemljišta iz parka + 30% kontaminiranog zemljišta (tretman 30)

Tretmanima 10, 20 i 30 dodat je kompost dobijen iz JKP Stari grad Šabac u koncentraciji od 5% (w/w) ukupne mase supstrata. Ovim tretmanima dodata je i suspenzija čistih kultura hrom-redukujućih bakterija 212-9 i 342-9 i bakterijskih izolata 12/2 i 17/6, iz kolekcije Katedre za ekološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, za koje su ustanovljene PGPB karakteristike. Suspenzija bakterija u odnosu 1:1:1:1 je dodata supstratu u koncentraciji od 5% (w/w) ukupne mase supstrata.

Ukupna masa supstrata u svakoj plastičnoj kutiji iznosila je 1000 g. U svaku kutiju zasejano je po 15 semena. Ogled je postavljen u 6 ponavljanja. Na svakih 7 dana zaključno sa 21. danom meren je procenat proklijalih semena. Nakon 3 nedelje po pet reprezentativnih (prosečnih) biljaka iz svakog ponavljanja je odabrano za merenje sveže biomase i dužine klijanaca.

Sadržaj teških metala (hroma) u zemljištu određen je metodom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije na aparatu Shimadzu 7000 AA, a prema uputstvu metode ISO 11047. Prethodna ekstrakcija teških metala (hroma) iz zemljišta urađena je uz korišćenje carske vode po metodi ISO 11466. Sadržaj hroma u zemljištu određen je

na početku i kraju ogleda. Prethodna ekstrakcija teških metala (hroma) iz biljnog materijala urađena je uz korišćenje azotne i perhlorne kiseline (1:2,5). Sadržaj hroma u biljnom materijalu je određen na kraju ogleda.

4.14. Statistička obrada podataka

Statistička značajnost dobijenih rezultata o mikrobnom diverzitetu kontaminiranog zemljišta izražena je pomoću neparametarskog Kruskal-Wallis testa na nivou značajnosti $p > 0,05$.

Analiza varijanse je urađena pomoću Kolmogorov-Smirnovog testa za ispitivanje normalnosti i Levenovog testa za homogenost varijanse. Dobijeni podaci su bili podvrgnuti analizi varijanse (ANOVA) i testiranju najmanje značajne razlike između redukcije Cr(VI) i bakterijskog rasta u različitim koncentracijama odabranih izolata, što je pokazano Tukeyevim HSD testom. Nivo značajnosti je procenjen na $p > 0,05$. Svi eksperimenti su izvedeni dva puta u tri ponavljanja. Statistička analize su izvedene po opštim procedurama STATISTICA v.7 (StratSoft, Inc.) i IBM SPSS Statistic v.20 (SPSS, Inc).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Zemljište može biti kontaminirano teškim metalima i metaloidima iz različitih industrija, eksploatacijom uglja, širenjem otpada sa visokim koncentracijama ovih elemenata, fosilnim gorivima, širokom upotrebom mineralnih đubriva, pesticida, sagorevanje uglja i plastike itd. (Khan et al., 2008; Zhang et al., 2010; Tripathi et al., 2016). Ove aktivnosti su glavni uzroci degradacije i kontaminacije zemljišta i predstavljaju veliki izazov za bezbednost hrane i javno zdravlje (Tripathi et al., 2015). Zbog toga su kontaminacija i degradacija zemljišta važna pitanja sa aspekta životne sredine i poljoprivrede.

Radi primene mera zaštite i obnavljanja životne sredine koja je kontaminirana teškim metalima, neophodna je karakterizacija lokacije (Wuana and Okieimen, 2011). Važeće zakonodavstvo u pogledu zaštite životne sredine i javnog zdravlja je zasnovano na hemijskoj karakterizaciji, a posebno onih parametara koji potencijalno mogu imati ulogu u lancu ishrane (Kabata-Pendias i Pendias, 2001). Karakterizacija zemljišta pruža značajne informacije o specifičnosti i biodostupnosti teških metala, a istraživanja o remedijaciji zemljišta kontaminiranih teškim metalima se oslanjaju na poznavanje izvora kontaminacije, osnovnih hemijskih karakteristika zemljišta i posledica izazvanih prisustvom teškim metalima u životnoj sredini. Ovakav pristup omogućava donošenje odluke o unapređenju kvaliteta životne sredine i javnog zdravlja (Zhao i Kaluarachchi, 2002). Povećana kontaminacija zemljišta i vodenih ekosistema zahteva razvijanje strategija remedijacije, gde bioremedijacione tehnologije zauzimaju značajno mesto.

5.1. Hemijske karakteristike ispitivanog zemljišta

Visok sadržaj teških metala kao što su hrom, olovo, kadmijum i arsen uzrokuju promene svojstava zemljišta kao što su pH, sadržaj hranjivih supstanci (Hansda et al., 2014), čime se značajno utiče na plodnost zemljišta, kvalitet mikrobnih zajednica, status vegetacije kao i zdravstveni rizik na različitim nivoima lanca ishrane kroz dobro

uspostavljen proces bioakumulacije (Upadhyay et al., 2016). pH vrednost zemljišta, odnosno reakcija sredine zemljišnog rastvora, veoma je važan hemijski parametar, jer je zemljišni rastvor bogat azotom, fosforom i kalijumom, koji su neophodni biljkama. Ove supstance su potrebne biljkama za normalan rast i razvoj a njihova pristupačnost je često vezana i za reakciju sredine. pH u KCl-u se kretala od 6,88 u uzorku 1 do 7,73 u uzorku 4, dok se pH u H₂O kretala od 7,52 u uzorku 1 do 8,03 u uzorku 3. Na osnovu ovih rezultata može se konstatovati da je pH vrednost uzoraka neutralna do blago alkalna. Brady i Weil (2002) konstatuju da je pH vrednost između 6,5 i 7,5 povoljna za pristupačnost hranljivih supstanci biljaka i oporavak oštećenih zemljišta, što je u skladu sa našim rezultatima.

Organski ugljenik se može koristiti kao parametar produktivnosti oštećenih zemljišta kao i za procenu količina ugljenika koje su akumulirane u zemljištu nakon raspadanja biljnih i životinjskih ostataka (Dekka et al., 2008). Količine organskog ugljenika koje su veće od 0,8% ukazuju na dobar kvalitet prirodnih ili oštećenih zemljišta, dok se lošim kvalitetom smatra zemljište sa sadržajem organskog ugljenika ispod 0,4% (Ghosh et al., 1983).

Tabela 22. Osnovne hemijske analize ispitivanih uzoraka

Parametar	Jedinica	1	2	3	4	kontrola
pH u KCl	-	6,88	7,41	7,60	7,73	7,03
pH u H ₂ O	-	7,52	7,97	8,03	8,00	7,53
CaCO ₃	%	0,99	1,83	2,39	2,25	1,83
Organski C	%	1,84	2,22	2,67	2,61	4,87
Ukupni N	%	0,16	0,19	0,23	0,23	0,42
P ₂ O ₅	mg/100 g	15,93	38,75	47,78	48,10	23,15
K ₂ O	mg/100 g	26,10	24,00	25,60	28,40	30,50

Plodnost zemljišta, kao parameter kvaliteta zemljišta utiče na fizičke (npr. strukturu zemljišta), hemijske (npr. pH, C: N odnos itd.) i biološke, odnosno mikrobiološke karakteristike koje zajedno regulišu rast biljaka. Sa druge strane nepovoljni uslovi u

zemljištu mogu onemogućiti rast vegetacije. Shodno iznetim vrednostima, može se konstatovati da ispitivani uzorci zemljišta imaju visok sadržaj organskog ugljenika (Tabela 22). Prema Gračaninu (1947) dobijeni rezultati za kontaminirane uzorke zemljišta odgovaraju klasi „dosta humozno zemljište“, dok kontrolno zemljište pripada klasi „jako humozno zemljište“. Azot je glavni limitirajući hranljivi element za rast biljaka. Azot iz oštećenih zemljišta koji biljke koriste vodi poreklo od organske supstance zemljišta, primene đubriva i setve leguminoza (Maiti et al., 2002). Plodnost zemljišta odslikava status zemljišta u pogledu pristupačnih hranljivih supstanci za ishranu biljaka. U površinskom sloju zemljišta sadržaj azota je najveći i smanjuje se sa dubinom zemljišnog profila, što je povezano sa trendom opadanja sadržaja organskog ugljenika (Prasuna Rani et al., 1992). Uzorci 1 i 2 se mogu okarakterisati kao dobro obezbeđeni azotom, uzorci 3 i 4 kao bogati azotom, a kontrolni uzorak kao vrlo bogat azotom (Tabela 22).

Fosfor je elemenat koji se u prirodi nalazi u sastavu Zemljine kore, vode i svih živih organizama. To je jedan od elemenata koji su neophodni za rast biljaka (Mullins, 2009). I pored njegovog nesumnjivog značaja za rast biljaka i metabolizam, fosfor je svakako najmanje pristupačan hranljivi element u zemljištu. Njegova niska rastvorljivost je uslovljena stvaranjem kompleksa sa katjonima Al i Fe pri kiseloj pH vrednosti zemljišnog rastvora, odnosno Ca i Mg pri alkalnoj pH vrednosti (Balemi i Negisho, 2012). Stepenn iskorišćenosti fosfora u zemljištu je izuzetno visok, tako da, prema nekim procenama, u zemljištima posle 2050. godine rezerve fosfora će potpuno nestati (Vance et al., 2003; Cordell et al., 2011). Sadržaj pristupačnog fosfora je najmanji u uzorku 1 i iznosi 15,93 mg/100 g a najveći u uzorku 4 (48,10 mg/100 g apsolutno suvog zemljišta). U uzorku 1 sadržaj pristupačnog fosfora je nizak, u uzorku 2 visok a u uzorcima 3 i 4 veoma visok. U kontrolnom zemljištu zastupljenost pristupačnog fosfora je dobra (Tabela 22).

Kalijum je esencijalni hranljivi elemenat za biljke i ima značajnu ulogu u proceni kvaliteta zemljišta. Od najvažnijih hranljivih supstanci, kalijum je najzastupljeniji u zemljištu i čini 1,9% Zemljine kore (Tisdale et al., 1985). U zemljištu se može naći u različitim oblicima, od kojih su neke rastvorljive, a druge nisu. U rastvorenom obliku je veoma mobilan i translocira se kroz delove biljke, izlučuje preko korena u zemljište, tako da je veoma teško proceniti njegovu količinu u zemljištu (Sekhon, 1999). Sadržaj

kalijuma u uzorcima zemljišta ne pokazuje velika odstupanja. U svim uzorcima se zastupljenost pristupačnog kalijuma može označiti dobrom (Tabela 22).

5.2. Sadržaj metala u ispitivanim uzorcima zemljišta

Na osnovu preporučenih vrednosti Ministarstva građevinarstva, prostornog planiranja i životne sredine Holandije (Dutch Sediment Quality Standards, 2000), može se konstatovati da u ispitivanim uzorcima (Tabela 23) sadržaj arsena (As) ne prelazi maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK). Sadržaj antimona (Sb) u uzorku 1 je ispod granice MDK, u uzorku 4 na granici MDK, a u uzorcima 2 i 3 iznad granice MDK. Sadržaj kadmijuma (Cd), molibdena (Mo) i cinka (Zn) se nalazi između MDK i remedijacionih vrednosti (RV). Sadržaj kobalta (Co) u uzorcima 2 i 3 je na granici RV, dok u uzorcima 1 i 4 prevazilazi RV. Sadržaj barijuma (Ba), hroma (Cr), bakra (Cu), olova (Pb) i nikla (Ni) su znatno veći od RV.

Na osnovu preporuka Kanadskog saveta ministara za životnu sredinu (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2007), može se zaključiti da je sadržaj barijuma (Ba), kadmijuma (Cd), žive (Hg) i vanadijuma (V) ispod granica MDK, dok je sadržaj hroma (Cr), bakra (Cu), olova (Pb), nikla (Ni) i cinka (Zn) veći od MDK. Ispod granice RV je sadržaj antimona (Sb), kobalta (Co), molibdena (Mo) i kalaja (Sn), dok je sadržaj bora (B) i sumpora (S) veći od granice RV. Kontrolni uzorak se može okarakterisati kao nekontaminiran, jer po preporukama Kanadskog saveta ministara za životnu sredinu (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2007) nijedan parametar ne prelazi granične vrednosti, dok prema vrednostima Ministarstva građevinarstva, prostornog planiranja i životne sredine Holandije (Dutch Sediment Quality Standards, 2000) je jedino sadržaj vanadijuma iznad MDK.

Dobijeni rezultati ukazuju na kontaminaciju ispitivanih uzoraka teškim metalima, što se može povezati za višedecenijskom industrijskom proizvodnjom bicikala i postupcima galvanizacije i hromiranja.

Rezultati nedvosmisleno ukazuju na neophodnost sanacije lokaliteta. Postoji niz tradicionalnih i konvencionalnih tehnologija koje su široko prihvaćene, međutim, ovi pristupi su dugotrajni i obično stvaraju složen sekundarni otpad. U kontekstu obnavljanja svojstava zemljišta kroz primenu remedijacionih tehnologija uz najniži potencijalni trošak i bez neželjenih efekata početna aktivnost je ispitivanje mikrobnog

diverziteta i selekcija populacija koje efikasno mogu učestvovati u procesima bioremedijacije.

Tabela 23. Sadržaj metala u uzorcima

Parametar	jedinica	uzorak				
		1	2	3	4	kontrola
Fe	g/kg	142,07	143,90	135,02	168,67	26,9
Mn	mg/kg	501,2	458,9	407,8	571,1	1343,4
Na	mg/kg	5177,0	5454,0	5319,0	5348,0	55,3
Zn	mg/kg	535,3	453,3	644,7	497,7	128,8
Cu	mg/kg	1956,0	1470,6	1828,8	1650,9	20,8
Cr	mg/kg	9457,8	9519,0	9796,8	12144,2	28,7
Pb	mg/kg	1317,9	1218,7	1249,5	1277,0	76,0
Ni	mg/kg	21690,3	19536,3	19886,5	25219,1	32,4
Cd	mg/kg	1,66	1,15	1,00	1,21	0,00
As	mg/kg	11,22	7,34	7,54	9,10	15,6
Hg	mg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mo	mg/kg	4,45	4,45	4,44	5,86	0,00
S	mg/kg	884,4	805,8	871,9	981,2	86,1
Ca	mg/kg	16584,6	16291,4	16516,7	16031,8	31508,8
Mg	mg/kg	2515,7	3183,6	2737,0	2334,2	9189,6
Co	mg/kg	274,02	236,65	233,26	291,84	7,3
Sb	mg/kg	2,5	3,3	6,3	3,0	3,42
Sn	mg/kg	147,42	137,37	141,65	179,62	0,00
B	mg/kg	559,58	960,19	949,23	1182,78	0,6
Sr	mg/kg	183,5	187,6	190,8	216,3	0,00
Li	mg/kg	4,2	4,9	4,5	4,3	18,6
Al	mg/kg	2062,7	1738,9	1758,2	1880,4	22399,1
Ba	mg/kg	1445,14	1522,78	1523,61	1343,75	124,9
Se	mg/kg	0,32	0,33	0,27	0,33	0,00
V	mg/kg	19,86	19,86	21,37	27,51	46,8

5.3. Mikrobni diverzitet uzoraka zemljišta kontaminiranih teškim metalima

Znanja o prokariotskim mikroorganizmima, i pored nesumnjivog napretka i primene savremenih tehnologija, nepotpuna su i vrlo često kontroverzna (Pires, 2010). Zbog njihove velike zastupljenosti i diverziteta, imaju značajnu ulogu u biohemijским procesima kao što su primarna produkcija organske supstance, kruženje hranljivih supstanci u kopnenim i vodenim ekosistemima, azotofiksaciji i biljno-mikrobnim interakcijama (Madigan et al., 2003; Doney et al., 2004). Procenjuje se da ukupan broj prokariotskih vrsta na planeti iznosi oko 10^{30} (Dykhuisen, 1998; Whitman et al., 1998). Prosečan broj prokariotskih ćelija po gramu zemljišta, iznosi oko 10^{10} , dok u jednom mililitru morske vode ima oko 10^6 ćelija (Pires, 2010). Iz ovih podataka jasno se vidi da više od polovine ukupne biomase na Zemlji pripada prokariotskim organizmima (Whitman et al., 1998).

Mikrobne zajednice u životnoj sredini egzistiraju u vidu grozdova (engl. cluster) većeg ili manjeg broja vrsta mikroorganizama, gde svaka ima različitu i specifičnu ulogu (Torsvik i Ovreas, 2002). Karakteristike koje neki organizam ispolji u laboratoriji u *in vitro* uslovima, više ili manje odslikava njegove stvarne osobine u životnoj sredini. Mnogi autori ukazuju da na bakterijske zajednice, njihov diverzitet i strukturu utiču prostorni i vremenski faktori kao što su temperatura (Panswad et al., 2003), salinitet (Bernhard et al., 2005), pH, prisustvo hranljivih supstanci (Mills et al., 2003) i kontaminacija različitim polutantima (Li et al., 2006).

U globalnom smislu, životna sredina kontaminirana teškim metalima predstavlja opšti i veoma opasan problem za životnu sredinu i zdravlje ljudi, čije rešavanje zahteva značajna finansijska ulaganja (Pires, 2010). Mnoge industrijske i aktivnosti u poljoprivredi dovele su do oslobađanja velikih količina teških metala u životnu sredinu (Ansari i Malik, 2007).

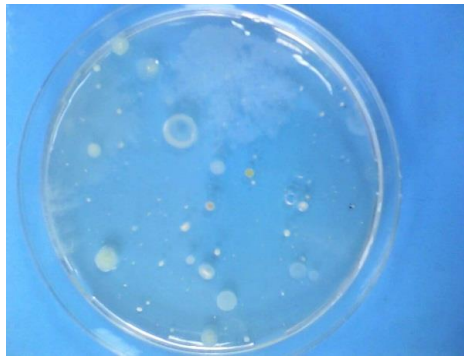
Mikroorganizmi su najznačajnija komponenta biološke faze zemljišta. Akumulacija polutanata, smanjenje biodiverziteta i redoks-statusa može da se prati preko brojnosti mikrobnih populacija kao važnog indikatora plodnosti zemljišta, kao i njegovog sanitarnog statusa. Zastupljenost mikroorganizama, njihov međusobni odnos i dinamika enzima je odraz biološke aktivnosti (biogenosti) određenog ekosistema. Metali kao veoma važni abiotički faktori su takođe značajan parametar ekosistema i njihova koncentracija uglavnom zavisi od bioloških i geoloških procesa (Erlich, 2002). U

podgrupi teških metala nalaze se elementi, čije je prisustvo neophodno za živi svet (mikroelementi), ali su takođe prisutni i elementi čija fiziološka uloga još nije razjašnjena (Lenart-Boron i Boron, 2014). Kako će teški metali uticati na žive organizme i ćelijske procese koji se u njima odvijaju, zavisi od njihove koncentracije. Neki od njih su u malim koncentracijama neophodni za metaboličke procese, dok su u visokim koncentracijama toksični (Appenroth, 2010). Osim na ćelijskom nivou, upravo olovo i hrom su jedni od najčešćih teških metala koji izazivaju veoma ozbiljne posledice po životnu sredinu (Hu et al., 2007).

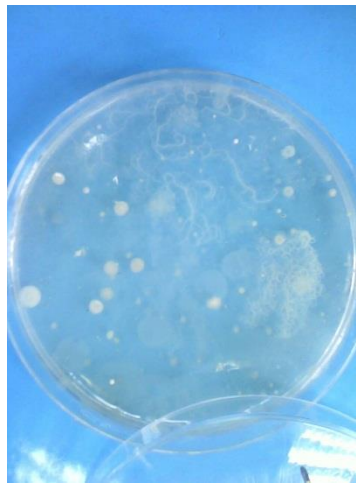
Dokazano je da dugogodišnja kontaminacija zemljišta ovom grupom metala ima negativne posledice na mikrobiološku aktivnosti zemljišta, pogotovo na mikrobnu respiraciju (Doelman i Haanstra, 1984, Sobolev i Begonia, 2008). Štetno delovanje teških metala na aktivnost mikroorganizama u zemljištu je zapaženo preko smanjenja intenziteta transformacije organskih supstanci, redukcije zemljišnog disanja i inhibicije aktivnosti određenih enzima u zemljištu (Tyler, 1974). Zapažene su i proučavane i promene koje nastaju u morfologiji mikroorganizama, u procesima kruženja hranljivih supstanci i pigmentaciji (Hafengurg i Kothe, 2007).

U cilju proučavanja i boljeg razumevanja uticaja teških metala na žive organizme, hemijske analize su ukazivale na stepen kontaminacije određenog lokaliteta, ali na žalost nisu odslikavale posledice uticaja ovih metala na najvažnije metaboličke procese koji se odvijaju u zemljištu (Lenart i Wolny-Koladka, 2013). Tako su mnoga istraživanja ukazala na činjenicu da i male količine teških metala mogu imati štetan efekat na celokupni živi svet, transformaciju organskih supstanci i kruženje hranljivih elemenata (Hu et al., 2007). S obzirom na to da su za funkcionisanje ekosistema nezamenljivi članovi i pripadnici mikrobnog diverziteta, veoma je važno da su zemljište i voda odgovarajućeg kvaliteta i čistoće. Povećanje koncentracije teških metala dovodi do selektivne inhibicije mikrobiološke aktivnosti, koja je jedan od indikatora kvaliteta zemljišta (Hu et al., 2007). Zbog toga je uloga mikroorganizama u biogeochemijskim ciklusima teških metala u ekosistemima u životnoj sredini veoma važna (Lenart-Boron i Boron, 2014), pa su tako istraživanja ovog mikrobnog diverziteta od fundamentalnog značaja za selekciju i primenu najpogodnijih remedijacionih tehnika na kontaminiranim područjima (Gremion et al., 2004).

Ukupan broj bakterija je važan parametar biogenosti zemljišta, kao jedne od njegovih najvažnijih bioloških osobina (Mandić et al., 2005). Rezultati u ovom istraživanju pokazuju da je mikrobni diverzitet zavisio od lokacije i prisustva/odsustva kontaminacije. Ukupan broj bakterija je bio najveći u kontrolnom uzorku ($17,45 \times 10^6$ CFU/g), dok je u kontaminiranim uzorcima broj bakterija znatno manji (Slike 5 i 6, Tabela 24).



Slika 5. Rast bakterija na podlozi 0,1xTSA (uzorak 3)



Slika 6. Rast bakterija na podlozi 0,1XTSA (uzorak 4)

Tabela 24. Ukupan broj bakterija u ispitivanim uzorcima

Oznaka uzorka	Ukupan broj bakterija (x 10 ⁶ CFU/g)
1	3,35
2	6,88
3	1,21
4	5,08
Kontrola	17,45

Ovi rezultati obrađeni su deskriptivnom statistikom i ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika između lokacija ($H=12,433(4, N=15), p>0.05$).

Razlike u brojnosti bakterija u ispitivanim uzorcima bi se mogle objasniti korelacijom sa karakteristikama zemljišta. Prethodna istraživanja su ukazivala na to da je, u zavisnosti od mehaničkog sastava zemljišta, ukupan broj bakterija uglavnom bio veći u nekontaminiranom zemljištu u odnosu na kontaminirano (Chen et al., 2014). Kontaminacija teškim metalima utiče na smanjenje intenziteta respiracije zemljišta i mikrobne biomase (Baath et al., 1998).

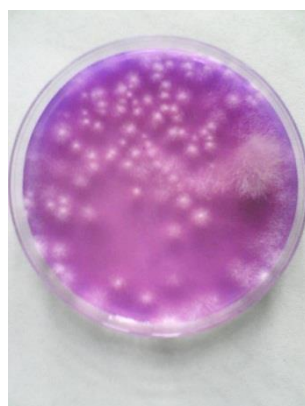
U prethodnim istraživanjima je potvrđena i pozitivna korelacija između kontaminacije teškim metalima i usporavanja procesa transformacije organske supstance (Berg et al., 1991), što je svakako glavni uzrok redukcije mikrobiološke aktivnosti zemljišta. Razlog smanjenja bakterijskog diverziteta u zemljištima zagađenih teškim metalima leži u toksičnom uticaju tih elemenata na mikrobni diverzitet zemljišta. Zato dobro poznavanje funkcionisanja zemljišnih ekosistema i uloge mikroorganizama koje oni u njima igraju svakako doprinose otkrivanju novih potencijalnih mogućnosti za njihovu implementaciju u bioremedijacionim tehnikama.

Gljive su sistematska grupa mikroorganizama koja, zahvaljujući raznovrsnoj enzimskoj aktivnosti, aktivno učestvuje u razlaganju organskih jedinjenja i usvajanju hranljivih elemenata (Hoorman, 2011).

Tabela 25. Ukupan broj gljiva u ispitivanim uzorcima

Oznaka uzorka	Ukupan broj gljiva ($\times 10^3$ CFU/g)
1	30,3
2	5,03
3	10,99
4	2,23
Kontrola	54,02

Od kontaminiranih lokacija, najveća brojnost gljiva bila je u uzorku 1 ($30,3 \times 10^3$ CFU/g), a najmanja u uzorku 4 ($2,23 \times 10^3$ CFU/g). Kruskal-Wallis-ov test pokazuje da postoje statistički značajne razlike između lokacija u ukupnom broju gljiva ($H=15,1665(4, N=15), p>0,05$). Slično kao i kod ukupnog broja bakterija, najveća brojnost među uzorcima bila je u kontrolnom uzorku (Slika 7) i iznosila je $54,02 \times 10^3$ CFU/g (Tabela 25). Radovi drugih autora takođe potvrđuju da je ukupan broj gljiva bio manji u kontaminiranom zemljištu u odnosu na nekontaminirano (Chen et al., 2014). Istraživanja pojedinih autora su pokazala i da je promena broja plesni u zemljištu zavisna od koncentracije i vrste metala (Ilić-Baus et al., 2015).



Slika 7. Rast gljiva na podlozi RBSA - kontrolni uzorak

Filamentozne gljive su prisutne u različitim supstratima i ekosistemima kao, saprotrofi, paraziti biljaka, životinja ili kao simbioanti fototrofnim organizama, cijanobakterijama,

algama i biljkama. Saprotofne gljive razgrađuju mnoge vrste organskih i neorganskih supstrata, aktivno učestvujući u procesima biodegradacije i kruženja hranljivih supstanci, čime doprinose održavanju i funkcionisanju ekosistema. Sposobnost gljiva da tolerišu visoke ili niske temperature, i druge abiotičke faktore, ukazuje na to da postoje različiti adaptivni mehanizmi koji im omogućavaju opstanak u ekstremnim okruženjima.

Brojnost gljiva u zemljištu zavisi od udaljenosti od izvora kontaminacije i sezone uzorkovanja. Sposobnost gljiva da tolerišu visoke ili niske temperature u ekstremnim okruženjima ukazuje na to da postoje vrste sa adaptivnim mehanizmima koji mogu biti zaduženi za smanjivanje uticaja stresa. Takvi enzimi, pronađeni u kod različitih termofila i psihrofila su proučavani u biotehnoške i farmaceutske svrhe (Kubicek et al., 2007). Akhtar et al. (2013) opisali su rezistenciju nekih filamentoznih gljiva na prisustvo nekih teških metala, što ukazuje na mogućnost njihove primene u bioremedijaciji kontaminiranih lokacija. Uloga gljiva kao eukariotskih organizama koji žive u svim tipovima zemljišta je svakako veoma značajna u svim biohemijskim procesima, a posebno u razgradnji složenih organskih molekula (Imberger i Chiu, 2002).

U degradaciji organskih supstanci, jedne od glavnih učesnica su i aktinomicete (Seong et al., 2001), koje nepristupačna jedinjenja transformišu u pristupačne hranljive supstance (Miletić i Radulović, 2005). Aktinomicete pripadaju heterotrofnim mikroorganizmima, uglavnom saprofita, sa malim brojem patogenih vrsta. Igraju značajnu ulogu u procesima humifikacije i mineralizacije organskih supstanci.

Tabela 26. Ukupan broj aktinomiceta u ispitivanim uzorcima

Oznaka uzorka	Ukupan broj aktinomiceta (x 10³ CFU/g)
1	381,82
2	318,24
3	366,30
4	302,15
Kontrola	481,91

Od kontaminiranih lokacija, najveća brojnost aktinomiceta bila je u uzorku 1 ($381,82 \times 10^3$ CFU/g). Slično kao i kod ukupnog broja bakterija i gljiva, najveća brojnost među uzorcima konstatovana je u kontrolnom uzorku $481,91 \times 10^3$ CFU/g (Tabela 26), što je potvrđeno i u istraživanjima drugih autora (Vitezova, 2013).

I kod ove sistematske grupe mikroorganizama prisutne su statistički značajne razlike u brojnosti između ispitivanih lokacija ($H=10,83(4, N=15), p>0,05$). Kao i kod brojnosti bakterija i gljiva, u uzorku sa lokacije 1 broj aktinomiceta bio je najveći. Ukupno smanjenje zastupljenosti mikrobnih populacija u kontaminiranim uzorcima u odnosu na kontrolni iznosila su za bakterije 60,6-93,0%, za gljive 43,9-98,0% i za aktinomicete 20,8-37,3%. U prethodnim istraživanjima konstatovana je redukcija broja aerobnih heterotrofnih bakterija za 47-67% u odnosu na nekontaminirano zemljište (Oliveira i Pampulha, 2006). Isti autori ukazuju na manju osetljivost aktinomiceta prema prisustvu teških metala u zemljištu (stepen redukcije 20,2-31,3%), što je u skladu i sa rezultatima dobijenim u ovim istraživanjima.

5.4. Brojnost hrom-rezistentnih mikroorganizama

5.4.1. Brojnost hrom-rezistentnih bakterija

Mikrobni diverzitet zemljišta je tesno povezan sa kvalitetom životne sredine; svako pogoršanje kvaliteta životne sredine neminovno utiče i na aktivnost mikroorganizama u zemljištu (Pečiulyte i Dirginčiute-Volodkiene, 2009). Sama sredina kontaminirana teškim metalima može ubrzati adaptaciju i selekciju mikroorganizama otpornih na teške metale (Clausen, 2000).

Preživljavanje mikroorganizama u zemljištima koja su kontaminirana teškim metalima zavisi od biohemijskih, fizioloških i/ili genetičkih adaptacija, koje uključuju transformacije oblika metala, odnosno prevođenje iz lako dostupnog toksičnog oblika u nerastvorni oblik (Abou-Shanab et al., 2007).

Mnogobrojna istraživanja o uticaju teških metala na zemljišne bakterije pokazale su da kratkotrajno delovanje teških metala na bakterije dovodi do selekcije rezistentnih sojeva za veoma kratko vreme, čak i manje od nedelju dana, dok duže delovanje dovodi do sporije selekcije bakterija. Dugo delovanje teških metala, sa druge strane, vodi ka selekciji/adaptaciji mikrobnih zajednica, koje se dalje razvijaju u kontaminiranom

zemljištu (Perez-de-Mora et al., 2006; Dell'Amico et al., 2008, Chien et al., 2008). Ali, generalno posmatrano zemljišta koja sadrže teške metale su potencijalni izvori bakterija otpornih na toksične metale (Rahman et al., 2015). Istovremeno prisustvo različitih metala ima štetnije dejstvo na mikrobnu biomasu/aktivnost i diverzitet u odnosu na lokacije sa jednim teškim metalom iznad dozvoljenih vrednosti (Renella et al., 2005).

Dobijeni rezultati ukazuju da je broj hrom-rezistentnih bakterija različit u zavisnosti od koncentracije hroma, pH vrednosti podloge i lokacije uzorkovanja (Tabela 27). Najveći broj hrom-rezistentnih bakterija bio je u uzorku 2, a najmanji u uzorcima 1 i 4.

Najveći broj hrom-rezistentnih bakterija konstatovan je u uzorku 2, pri koncentraciji hroma od 1000 i pH vrednosti 7 ($127,1 \times 10^4$ CFU/g) i koncentraciji 1500 mg/l pri pH vrednosti 9 ($126,3 \times 10^4$ CFU/g). Pri pH vrednosti podloge od 5 u skoro svim varijantama oglada bakterijski rast nije zabeležen. Optimalni uslovi za rast hrom-rezistentnih bakterija u uzorku 3 su koncentracija hroma od 1500 mg/l. Na najvećoj ispitivanoj koncentraciji hroma od 3000 mg/l rast hrom-rezistentnih bakterija bio je izuzetno slab.

Tabela 27. Brojnost hrom-rezistentnih bakterija ($\times 10^4$ CFU/g)

Uzorak	Koncentracija Cr(VI) (mg/l)											
	500			1000			1500			3000		
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
1	0,0	0,4	2,9	0,0	0,7	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	53,2	0,4	1,1	127,1	16,5	0,0	0,0	126,3	0,0	0,4	0,1
3	0,1	1,9	2,1	0,2	1,0	1,9	12,3	37,1	13,6	0,0	0,3	0,1
4	0,0	0,5	27,5	0,0	0,0	23,5	0,0	0,9	0,0	0,0	0,4	0,2

5.4.2. Brojnost hrom-rezistentnih gljiva

Istraživanja pokazuju da je tolerancija filamentoznih gljiva na metale povezana sa njihovim mestom izolacije, toksičnosti ispitivanog metala, njegovom koncentracijom i karakteristikama izolata (Oladipo et al., 2018).

Rezultati ukazuju na različit broj hrom-rezistentnih gljiva u zavisnosti od uzorka i pH vrednosti podloge (Tabela 28). Najveća brojnost hrom-rezistentnih gljiva bila je u uzorku 1 ($11,8 \times 10^3$ CFU/g), a najmanja u uzorku 4 ($0,2 \times 10^3$ CFU/g). Kontaminirane

lokacije poznate su kao glavni izvori metal-rezistentnih filamentoznih vrsta gljiva (Munoz et al., 2012). Osim u uzorku 1, ne postoje velike razlike u rastu hrom-rezistentnih gljiva na podlozi čija je pH vrednost 5 i 7.

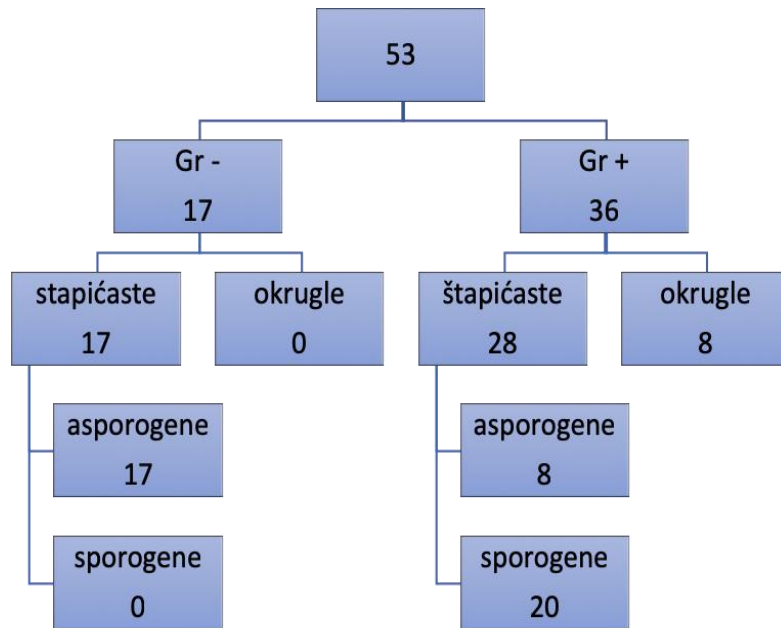
Odsustvo rasta gljiva zabeleženo je na podlozi čija je pH vrednost 9. I drugi autori ukazuju da se gljive odlikuju visokom rezistencijom pri kiseloj pH vrednosti podloge (Joshi, 2014). Fukuda et al. (2008) su konstatovali da najveći stepen rasta gljiva konstatovan pri pH između 3 i 6. Generalno, u ovom eksperimentu, diverzitet vrsta gljiva nije bio izražen: svega nekoliko morfološki različitih vrsta je uočeno tokom inkubacije. Ovi izolati su i korišćeni za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije Cr(VI).

Tabela 28. Brojnost hrom-rezistentnih gljiva ($\times 10^3$ CFU/g)

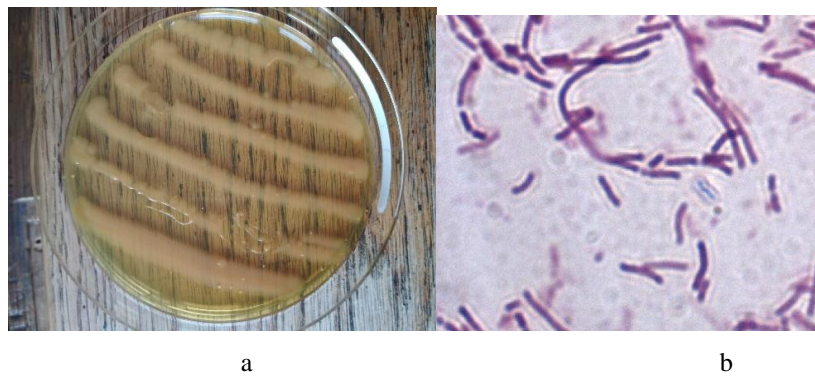
uzorak	pH vrednost podloge		
	5	7	9
1	11,8	9,5	0,0
2	1,2	1,2	0,0
3	4,5	4,4	0,0
4	0,2	0,3	0,0

5.5. Izolacija i morfološka karakterizacija hrom-rezistentnih bakterija

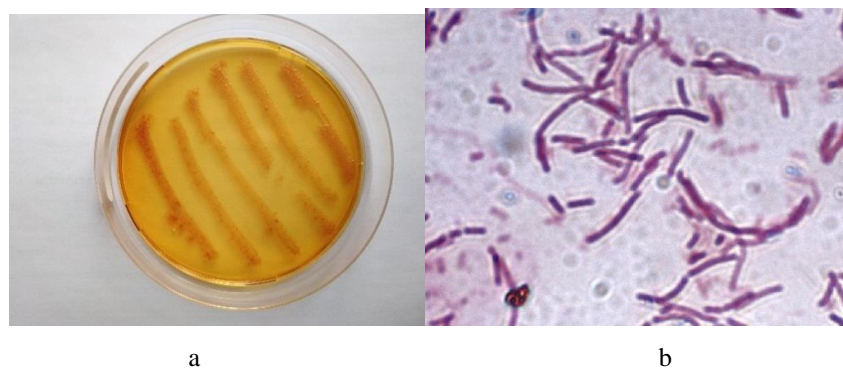
Ukupno su izolovana 53 izolata hrom-rezistentnih bakterija (Dijagram 1). Među njima dominiraju gram pozitivne štapićaste sporogene bakterije (Slike 8, 9, 10, 11 i 12).



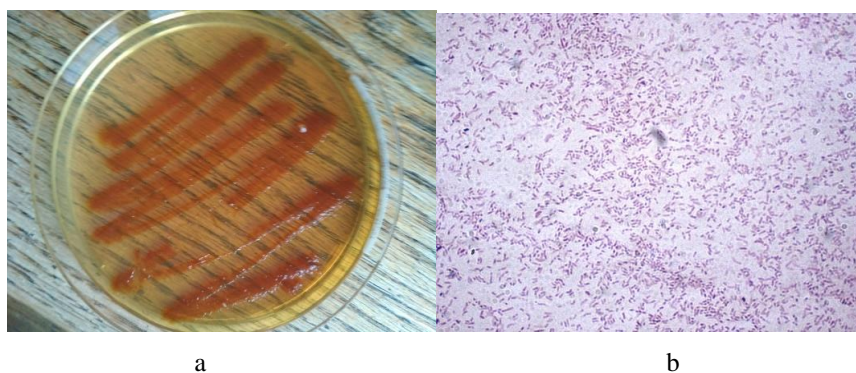
Dijagram 1. Morfološke karakteristike bakterijskih izolata



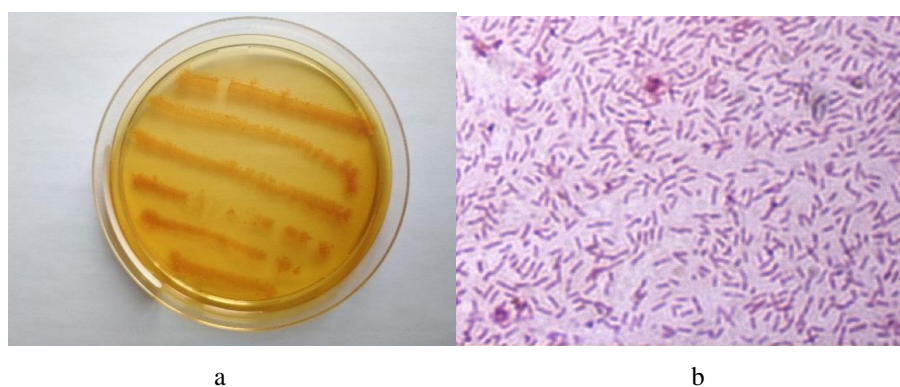
Slika 8. Čista kultura (a) i mikroskopski preparat (b) gram-pozitivnog bakterijskog izolata 212-9



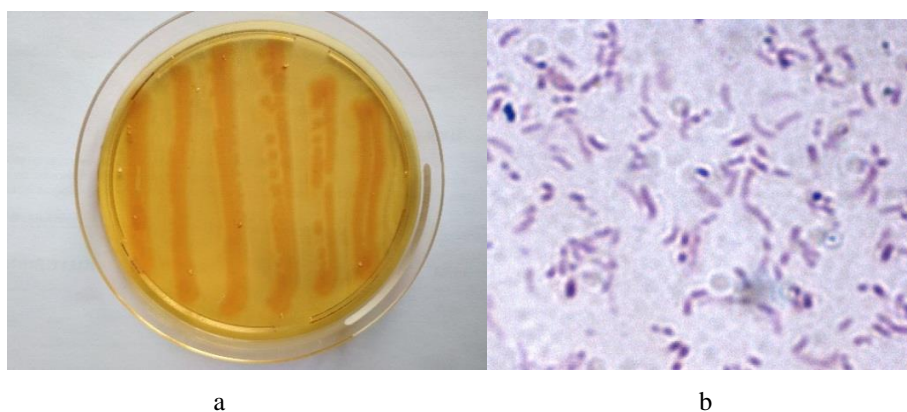
Slika 9. Čista kultura (a) i mikroskopski preparat (b) gram pozitivnog bakterijskog izolata 342-9



Slika 10. Čista kultura (a) i mikroskopski preparat (b) gram pozitivnog bakterijskog izolata 270-9R



Slika 11. Čista kultura (a) i mikroskopski preparat (b) gram negativnog bakterijskog izolata 351-9



Slika 12. Čista kultura (a) i mikroskopski preparat (b) gram negativnog bakterijskog izolata 270-9C

Viti et al. (2003) i Mishra et al. (2010) potvrđuju dominaciju gram pozitivnih bakterija na lokacijama koje su kontaminirane teškim metalima, što je potvrđeno u ovim istraživanjima. Međutim, Dey i Paul (2013) ukazuju na veću zastupljenost gram negativnih bakterija u sličnim istraživanjima.

5.6. Tolerantnost bakterija na prisustvo hroma

Relativna tolerantnost izolovanih bakterijskih vrsta na hrom je ispitivana korišćenjem agarizovane LB podloge u koju je dodat Cr(VI) do finalnih koncentracija od 100 do 1500 mg/l. Dobijeni i prikazani rezultati pokazuju da sa porastom koncentracije Cr(VI) u LB podlozi, broj hrom-tolerantnih bakterijskih izolata opada (Tabela 30).

Tabela 29. Tolerantnost bakterijskih izolata na različite koncentracije Cr(VI)

Uzorak	Koncentracija Cr(VI) (mg/l)											
	0		100		500		750		1000		1500	
	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%
1	17	100	8	47,1	5	29,4	1	5,9	0	0,0	0	0,0
2	13	100	7	53,8	5	38,5	4	30,8	3	23,1	3	23,1
3	9	100	6	66,7	3	33,3	2	22,2	1	11,1	1	11,1
4	14	100	11	78,6	5	35,7	2	14,3	1	7,1	1	7,1

U poređenju sa kontrolom, dodavanje 100 mg/l hroma izazvalo je redukciju bakterijskog rasta. Na toj koncentraciji, u zavisnosti od uzorka, 47,1 do 78,6% izolata je bilo sposobno za rast. Ipak, rast bakterijskih izolata na 500 mg/l Cr(VI) je veoma redukovan u poređenju sa kontrolom. Stepentolerantnosti bakterija je bio od 29,4 do 38,5% izolata. Još intenzivnija redukcija bakterijske tolerantnosti na 750 mg/l Cr(VI) u poređenju sa kontrolom je uočena u svim uzorcima (od 5,9% u uzorku 1 do 30,8% u uzorku 2). Pri koncentracijama većim od 1000 mg/l Cr(VI), bakterijski rast nije uočen u uzorku 1. U drugim uzorcima, samo nekoliko izolata je tolerisalo ovu koncentraciju i to tri izolata (270-9C; 270-9R i 342-9) iz uzorka 2, jedan izolat (351-9) iz uzorka 3 i jedan izolat (212-9) iz uzorka 4. Sličan stepen redukcije bakterijskog rasta je uočen i tokom drugih studija. Ur Rahman et al. (2007) su uočili da je samo 12% bakterija sposobnih da

rastu na podlozi sa 500 mg/l Cr(VI) takođe imalo sposobnost rasta i pri koncentraciji od 1000 mg/l Cr(VI). Isti autori konstatuju razlike u bakterijskom rastu pri koncentracijama od 1200 do 1500 mg/l Cr(VI). Ipak, Dey et al. (2014) su otkrili da je stepen redukcije bakterijskog rasta bio oko 50% na koncentracijama Cr(VI) od 600 mg/l u poređenju sa kontrolom, što je slično rezultatima dobijenim u ovim istraživanjima. Zbog visoke tolerancije na koncentracijama od 1000 i 1500 mg/l Cr(VI), pet izolata (270-9C, 270-9R, 342-9, 351-9 i 212-9) je odabrano za naredna istraživanja vezana za redukciju hroma.

Karakteristike ovih bakterijskih izolata su predstavljene u Tabeli 29.

Tabela 30. Makro- i mikromorfološke karakteristike izolata tolerantnih na prisustvo različitih koncentracija hroma

Broj uzorka	Oznaka izolata	Kolonija				Ćelija		
		Oblik	Veličina	Boja	Bojenje po Gramu	Oblik	Veličina	Formiranje spora
2	270-9C	nepravilno sferičan	Velika	krem	+	Štapić	0,7 µm	-
2	270-9R	Sferičan	Velika	žućkasta	+	Štapić	0,6x1,6 µm	+
2	342-9	Sferičan	Mala	bela	+	Štapić	0,6x1,1 µm	+
3	351-9	Sferičan	Mala	bela	+	Štapić	0,8 µm	-
4	212-9	nepravilno sferičan	Mala	bela	+	Štapić	1x3,5 µm	+

5.7. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) hrom-rezistentnih bakterija i gljiva

Jedan od važnih zadataka pri ispitivanju bioremedijacionog potencijala mikroorganizama je i određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) elementa ili jedinjenja koje je neophodno transformisati ili ukloniti iz životne sredine.

5.7.1. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) hrom-rezistentnih bakterija

Dobijeni rezultati ukazuju da rast bakterijskih kolonija pri pH 7 zavisi od bakterijskog izolata, koncentracije hroma u podlozi i vremena inkubacije (Tabela 31).

Pri koncentraciji hroma od 100 mg/L, zabeležen je brz rast kolonija svih bakterijskih izolata tokom perioda inkubacije. Pri ovoj koncentraciji prisutno je konstantno povećanje bakterijskog rasta od početka do završetka inkubacionog perioda. Pri višim koncentracijama hroma, bakterijski rast je kod većine izolata znatno slabiji.

Tabela 31. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) hrom-rezistentnih bakterija pri rastu na podlozi sa različitom koncentracijom Cr(VI) pri pH 7

Izolat	Vreme (h)	Koncentracija hroma (mg/l)					kontrola
		100	500	1000	1500	2000	
270-9C	24	+	+	+	+	-	+
	48	++	+	+	+	-	++
	72	++	+	+	+	-	++
	96	++	++	+	+	-	+++
342-9	24	+	+	+	+	-	+
	48	++	+	+	+	-	++
	72	++	+	+	+	-	+++
	96	+++	+	+	+	-	++++
212-9	24	+	+	+	+	-	+
	48	+	++	+	+	-	++
	72	+	++	+	+	-	+++
	96	++	++	+	+	-	+++
270-9R	24	++	+	+	+	-	++
	48	++	+	+	+	-	+++
	72	++	+	+	+	-	+++
	96	+++	++	++	+	-	++++
351-9	24	+	++	+	++	-	+
	48	+	+++	++	++	-	++
	72	++	++++	++	+++	-	+++
	96	++	++++	++	+++	-	++++

++++ veoma dobar rast, +++ dobar, ++ osrednji, + - slab, - odsustvo rasta

Rezultati ukazuju na brzu adaptaciju pojedinih bakterijskih izolata na prisustvo različitih koncentracija hroma u podlozi. Kod izolata 270-9C identičan je rast kolonija u kontrolnoj i varijanti sa 100 mg/l hroma u podlozi nakon 24, 48 i 72 h, dok je na kraju

inkubacije u kontrolnoj varijanti rast izraženiji. Kod izolata 212-9 bakterijski rast u kontroli je bio veći u odnosu na varijante sa dodatnim hromom tokom trajanja inkubacije, osim nakon 24h inkubacije. Slični rezultati su dobijeni i za izolat 342-9 i 270-9R. Kod izolata 351-9 veći je prečnik kolonija zabeležen u varijanti sa 500 mg hroma po litru u odnosu na ostale ispitivane varijante (Tabela 31). Na kraju inkubacije, rast ovog izolata bio je identičan u kontroli i varijanti sa 500 mg Cr(VI) u podlozi.

Tabela 32. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) hrom-rezistentnih bakterija pri rastu na podlozi sa različitom koncentracijom Cr(VI) pri pH 9

Izolat	Vreme (h)	Koncentracija hroma (mg/l)					Kontrola
		100	500	1000	1500	2000	
270-9C	24	+	+	+	+	-	+
	48	++	++	+	+	-	++
	72	++	++	+	+	-	++
	96	++	++	++	+	-	+++
342-9	24	++	++	++	+	-	++
	48	+++	++	++	+	-	+++
	72	+++	++	++	+	-	+++
	96	++++	+++	++	+	-	++++
212-9	24	+	+	+	+	-	+
	48	++	+	++	+	-	+
	72	++	+	+++	+	-	++
	96	+++	+++	+++	++	-	++++
270-9R	24	++	++	+	+	-	++
	48	++	++	+	+	-	++
	72	++	++	+	+	-	+++
	96	+++	+++	+++	++	-	++++
351-9	24	++	+	+	+	-	++
	48	++	+	+	+	-	++
	72	++	+	+	+	-	+++
	96	+++	++	++	+	-	++++

++++ veoma dobar rast, +++ dobar, ++ osrednji, + - slab, - odsustvo rasta

Jasno se vidi da se rast bakterija uglavnom povećava tokom perioda inkubacije (Tabela 32). Sa povećanjem sadržaja hroma u podlozi pri pH=9, u većini slučajeva se bakterijski rast usporava. Kod bakterijskog izolata 342-9, identični karakteri rasta su konstatovani u kontrolnoj i varijanti sa 100 mg/l hroma u podlozi tokom perioda inkubacije. U kontrolnom i tretmanu sa 100 mg/l hroma u podlozi, zabeležen je sličan rast izolata 270-9R i 351-9 u prvih 48h inkubacije, dok je u kasnijim fazama inkubacije intenzivniji rast konstatovan u kontroli.

Kod svih izolata, najslabiji rast je zabeležen pri koncentraciji hroma od 1500 mg/l. Bez obzira na pH vrednost, pri koncentraciji hroma od 2000 mg/l, bakterijski rast nije konstatovan. Do sličnih rezultata došli su i Nazeema i Nirmala (2017). Ganguli i Tripathi (2002) zaključuju da tolerantnost mikroorganizama prema hromu(VI) ima praktični značaj i predstavlja osnovu za selekciju organizama, koji bi se potencijalno mogli koristiti u detoksifikaciji životne sredine kontaminirane hromom.

5.7.2. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) hrom-rezistentih gljiva

Kao i kod hrom-rezistentnih bakterija, rast hrom-rezistentnih gljiva je zavisio od koncentracija hroma u podlozi, vremena inkubacije i izolata. Povećanje vremena inkubacije je uglavnom uticalo na povećanje stepena rasta gljiva. Do sličnih rezultata došli su i Congeevaram et al. (2007) koji su koristili gljivu *Aspergillus* sp. i konstatovali porast gljive tokom inkubacionog perioda.

U kontrolnoj varijanti, najbolji rast pokazali su izolati 248-7 i 121-7. Kod izolata 248-7 može se konstatovati slična dinamika rasta gljive u kontroli i tretmanima sa koncentracijom hroma od 25 do 100 mg/l. Kod izolata 101-7 je tokom inkubacije rast u kontroli i tretmanima sa koncentracijom hroma do 1500 mg/l bio slab, dok je na kraju inkubacije rast izraženiji u kontroli. Izolat gljive 222-7 je pokazao bolji rast na podlozi sa koncentracijama hroma od 25 do 250 mg/l u odnosu na kontrolnu varijantu (Tabela 33). Kao i kod bakterijskih izolata, ni gljive nisu imale sposobnost rasta pri koncentraciji hroma od 2000 mg/l. Shriram et al. (2014) su ispitivali MIK za 22 izolata gljiva koji su izolovani iz industrijskih otpadnih voda u provinciji Gudžarat (Indija) i konstatovali da se vrednosti kreću od 400-2200 mg/l. Sa porastom koncentracije hroma(VI) u podlozi smanjuje se i rast gljive *Paecilomyces* sp., ali je ova gljiva imala

sposobnost rasta i pri koncentraciji hroma od 2000 mg/l (Cardenas-Gonzales i Acosta-Rodriguez, 2010).

Tabela 33. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) hrom-rezistentnih gljiva

Izolat	Vreme (h)	Koncentracija hroma (mg/l)								Kontrola
		25	50	100	250	500	1000	1500	2000	
248-7	48	++	++	++	+	++	++	+	-	++
	72	+++	+++	++	+	++	++	+	-	+++
	120	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	++++
	144	++++	++++	++++	++	++	++	+	-	++++
121-7	48	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	72	++	++	++	++	++	++	+	-	++
	120	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++
	144	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	++++
101-7	48	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	72	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	120	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	144	++	++	++	+	+	+	+	-	+++
222-7	48	++	++	++	+	+	+	+	-	+
	72	++	++	++	+	+	+	+	-	+
	120	+++	+++	+++	+	+	+	+	-	+
	144	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	++

++++ veoma dobar rast, +++ dobar, ++ osrednji, + - slab, - odsustvo rasta

5.8. Identifikacija izolovanih mikroorganizama

5.8.1. Identifikacija izolovanih bakterija API metodom

Sve štapićaste bakterije (izolati 270-9R, 342-9, 212-9, 351-9 i 270-9C) identifikovane su pomoću API 50 CH sistema.

Očitavanjem dobijenih rezultata pomoću sistema APIWEB konstatovano je da su čiste kulture izolata 270-9R i 342-9 najbližije vrsti *Bacillus pumilis* (stepen sličnosti od 99,7%). Za izolate 270-9R i 342-9 je dobijena pozitivna reakcija na glicerol, L-arabinozu, D-ribozu, D-ksilozu, D-galaktozu, D-glukozu, D-fruktozu, D-manozu, D-

manitol, metil- α -D-manopiranozid, N-acetilglukozamin, amigdalin, arbutin, eskulin feri citrat, salicin, D-celobiozu, D-laktozu, D-saharozu, D-trehalozu, D-rafinozu i geniobiozu. Negativna reakcija je dobijena na eritrol, D-arabinozu, L-ksilozu, D-adonitol, metil- β -D-ksilopiranozid, L-sorbozu, L-ramnozu, dulcitol, inozitol, D-sorbitol, metil- α -D-glukopiranozid, D-maltozu, D-melibiozu, inulin, D-melecitozu, amidon (skrob), glikogen, ksilitiol, D-turanozu, D-liksozu, D-taganozu, D-fukozu, D-arabitol, L-arabitol, kalijum-glukonat, kalijum 2-ketoglukonat, kalijum 5-ketoglukonat.

Primena API 50 CH sistema pokazuje da je bakterijski izolat 212-9 je najbližiji vrsti *Brevibacillus laterosporus* (stepen sličnosti 67,1%), uz napomenu da postoji verovatnoća da se radi o vrsti *Bacillus thuringiensis*. Za izolat 212-9 je dobijena pozitivna reakcija za D-ribozu, D-glukozu, D-fruktozu, D-manozu, N-acetilglukozamin, arbutin, eskulin feri citrat, salicin, D-celobiozu, D-trehalozu i D-maltozu. Negativna reakcija je dobijena za glicerol, eritrol, D-arabinozu, D-ksilozu, L-ksilozu, D-adonitol, metil- β -D-ksilopiranozid, D-galaktozu, L-sorbozu, L-ramnozu, dulcitol, inozitol, D-manitol, D-sorbitol, metil- α -D-manopiranozid, metil- α -D-glukopiranozid, amigdalin, D-laktozu, D-melibiozu, D-saharozu, inulin, D-melecitozu, D-rafinozu, glikogen, ksilitiol, gentiobiozu, D-turanozu, D-liksozu, D-taganozu, D-fukozu, L-fukozu, D-arabitol, L-arabitol, kalijum-glukonat, kalijum 2-ketoglukonat i kalijum 5-ketoglukonat.

Čiste kulture izolata 351-9 i 270-9C primenom API 50 CH sistema pokazuju da su one najbližije vrsti *Bacillus subtilis* (stepen sličnosti 95,3%). Za izolate 351-9 i 270-9C je dobijena pozitivna reakcija na glicerol, L-arabinozu, D-ribozu, D-ksilozu, D-glukozu, D-fruktozu, D-manozu, inozitol, D-manitol, D-sorbitol, metil- α -D-glukopiranozid, amigdalin, arbutin, eskulin feri citrat, salicin, D-celobiozu, D-maltozu, D-melibiozu, D-saharozu, D-trehalozu, inulin, D-rafinozu, amidon (skrob), glikogen, gentiobiozu i D-turanozu. Negativna reakcija je dobijena na eritrol, D-arabinozu, L-ksilozu, D-adonitol, metil- β -D-ksilopiranozid, D-galaktozu, L-sorbozu, L-ramnozu, dulcitol, metil- α -D-manopiranozid, N-acetilglukozamin, D-laktozu, D-melecitozu, ksilitiol, D-liksozu, D-taganozu, D-fukozu, D-arabitol, L-arabitol, kalijum-glukonat, kalijum 2-ketoglukonat, kalijum 5-ketoglukonat.

5.8.2. Identifikacija izolovanih bakterija pomoću polimeraza lančane reakcije (PCR)

Zbog visoke tolerancije na koncentracije Cr(VI) od 1000 i 1500 mg/L, za dalju identifikaciju i ispitivanje stepena redukcije je odabrano 5 izolata. Izolati 270-9C, 270-9R, 212-9, 351-9 i 342-9, koji su pokazali sposobnost redukcije različitih početnih koncentracija Cr(VI), bili su gram-pozitivni, kratki sporogeni štapići, koji su formirali kremaste kolonije na LB podlozi. Filogenetska rekonstrukcija zasnovana na 16S rDNK i tuf-nukleotidnim sekvencama ispitivanih izolata pokazana je na Dijagramu 2. Rezultati nakon sekvenciranja 16S rDNK nedvosmisleno pokazuju da je identifikacija na ovom nivou nedovoljno diskriminatorna. (Dijagram 2A).

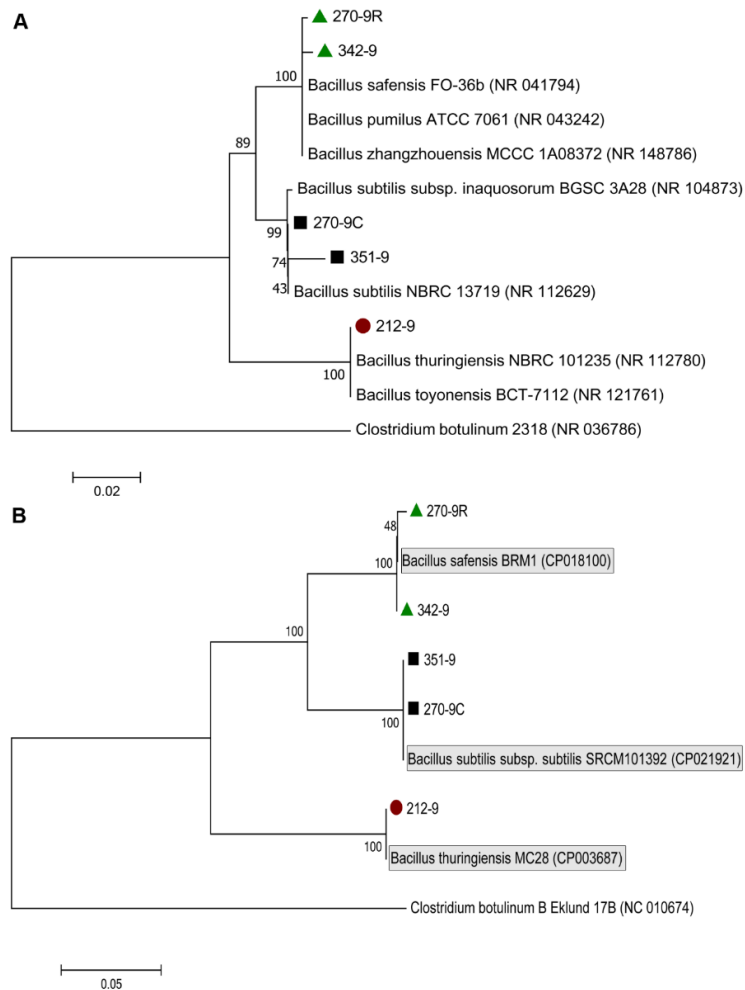
BLAST rezultati su za dva izolata, 270-9R i 342-9, pokazali 99,87% identičnost sa vrstama *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilis* i *Bacillus zhangzhouensis* (maksimalna i ukupna vrednost 1382; Q. preklapanje 100%, E. vrednost 0,0). Izolati 270-9C i 351-9 su pokazivali najveću sličnost sa vrstama *Bacillus subtilis* sa identičnošću od 99,89% (maksimalna i ukupna vrednost 1664; Q. preklapanje 100%; E. vrednost 0,0) kao i *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* sa malo nižim stepenom identičnosti od 99,78% (maksimalna i ukupna vrednost 1659; Q. preklapanje 100%; E. vrednost 0,0).

Slično zapažanje je uočeno i kod izolata 212-9, koje je potkrepljeno visokim vrednostima bootstrap-a i koje ukazuje na pripadnost vrstama *Bacillus thuringiensis* i *Bacillus toyonensis* sa identičnošću od 99,34% (maksimalna i ukupna vrednost 2204; Q. preklapanje 100%; E. vrednost 0,0). Iako je 16S rDNK bio moćan alat za identifikaciju i filogenetske studije na nivou roda, njegova upotreba je dovedena u pitanje na nivou vrste, naročito za razlikovanje određenih vrsta iz roda *Bacillus* (Böhme et al., 2011).

Ipak, u ovoj studiji su korišćeni tufGPF i tufGPR univerzalni prajmeri (Dijagram 2B), čija je primena potvrđena u identifikaciji svih *Bacillus spp.* (Caamano-Antelo et al., 2015). Za razliku od dobijenih rezultata nakon 16S rDNK amplifikacije, sekvencioniranje tuf gena nedvosmisleno određuje izolate čak i ispod nivoa vrste, pokazujući svoju visoku diskriminatornu sposobnost.

Za izolate 270-9R i 342-9 je dokazano da imaju visok tuf bootstrap vrednost i da su nesumnjivo veoma povezane sa *B. safensis* (CP018100), dok su izolati 270-9C i 351-9 potvrđeni kao *B. subtilis subsp. subtilis* (CP021921). Izolat 212-9 je formirao jednu granu i bio je najbliži *B. thuringiensis* (CP003687), kao što je prikazano na

Dijagramu 2B. Sekvence nastale nakon tuf PCR amplifikacije za izolate 212-9, 342-9, 270-9R, 351-9 i 270-9C, deponovane su u bazi NCBI GenBank sa pristupnim brojevima MH122621, MH122622, MH122623, MH122624 i MH122625. Može se reći da su tuf geni dobri targeti za diferencijalnu karakterizaciju *B. subtilis* i *B. cereus* grupe od drugih blisko povezanih vrsta, jer takva diferencijacija ne može biti postignuta 16S rDNK sekvencioniranjem (Caamano-Antelo et al., 2015).



Dijagram 2. Filogenetsko stablo bazirano na 16S r DNK (A) i sekvencama tuf gena (B) (1500 and 791 bp) pokazuje vezu između ispitivanih izolata (212-9, 342-9, 270-9R, 351-9 i 270-9C) i povezanih referentnih sojeva roda *Bacillus*. *Clostridium botulinum* (NR_036786 i NC_010674) su korišteni kao spoljašnja grupa. Bootstrap vrednosti (izražene kao procenat od 1000 ponavljanja) su prikazane kao tačke grananja. Horizontalni stupci pokazuju na genetičku udaljenost od 0.02 za 16S rDNA i 0,05 za *tuf* gen.

5.8.3. Identifikacija gljiva morfološkim metodama

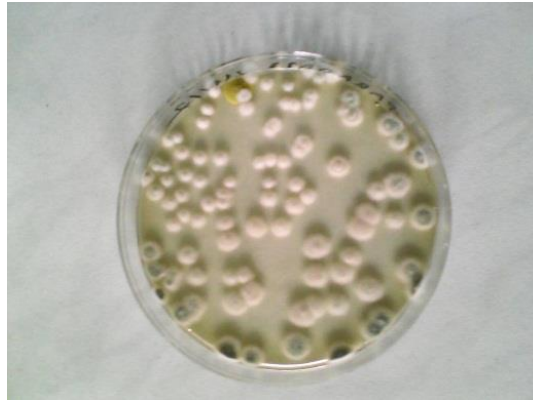
U ovim istraživanjima, izolovana su i morfološki okarakterisana četiri izolata gljiva. Izolat 248-7 identifikovan je kao *Alternaria spp.* Veličina kolonija varira (od 3 do 8 cm u prečniku). Kolonije su ravne, paperjaste i vunaste, prekrivene sivkastim, kratkim, vazdušastim hifama. Površina kolonija je na početku sivobela, a kasnije tamni i postaje zelenkastocrna ili maslinastobraon sa svetlim rubovima. Donja strana je tipično braon do crne boje sa produkcijom pigmenta. Hife ove gljive su septirane, braon boje, konidiofore septirane, braon boje, ponekad u cik-cak obliku. Grade jednostavne ili razgranate duge konidije, sa uzdužnim i poprečnim pregradama. Mogu se videti kao pojedinačne ili kao akropetalni lanci, a mogu nastati i germinacione cevčice. Ovalnog su oblika, tamnog pigmenta, pravilno raspoređene, glatke ili hrapave. Krajevi konidija blizu konidiofore su zaobljeni. Konidije imaju specifičan kruškolik oblik.



Slika 13. Rast *Fusarium verticillioides* na Czapek podlozi

Izolat 121-7 identifikovan je kao *Fusarium verticillioides*. Ovu gljivu karakteriše brz rast. Kolonije su sa gornje strane bele, kremaste, žute, crvene, ružičaste ili ljubičaste boje, dok sa donje mogu biti bezbojne, crvene, tamno ljubičaste ili braon (Slika 13). Konidiofore su septirane, fjalide cilindrične, pojedinačne ili sa kompleksnim sistemom grananja. Formiraju monofjalide (kao glavice) i polifjalide (u obliku lanaca). Makrokonidije su velike od 3-8 x 11-70 µm i nastaju kao proizvod fjalida na nerazgranatim ili razgranatim konidioforama. Mikrokonidije su velike 3-4 x 7 5-9 µm i nastaju na dugačkim ili kratkim konidioforama.

Izolat 101-7 je identifikovan kao *Penicillium spp.* Kolonije su veličine 1-3 cm, u početku beličaste a kasnije zelenkaste do zelene boje (Slika 14). Hife su uglavnom kratke, konidiofore razgranate i završavaju se grozdovima fijalida oblika boce. Fijalide mogu biti pojedinačne, u grupi ili nastaju grananjem metula. Imaju cilindričan bazalni deo. Spore nastaju na vrhovima fijalida. Mlađe spore se nalaze bliže osnovi fijalida i najčešće su zelene boje.



Slika 14. Rast *Penicillium spp.* na Czapek podlozi

Izolat 222-7 identifikovan je kao *Penicillium digitatum*. Ova gljiva sporo raste na Czapek podlozi (Slika 15). Kolonije su u početku žućkaste do braon, a zatim postaju maslinastozelene. Konidije su krte i nastaju od potpovršinskih ili vazdušnih hifa. Nepravilno se granaju. Na njima se nalaze metule, koje se završavaju sa najčešće 3-6 fijalida, koje su uglavnom pojedinačne i cilindričnog oblika. Konidije imaju glatke zidove. Najčešće su elipsoidnog ili cilindričnog oblika, veličine 4-7 x 3-3,5 μm .



Slika 15. Rast *Penicillium digitatum* na Czapek podlozi

5.9. Uticaj bakterijskih izolata na redukciju Cr(VI)

Od kad je opisan *Pseudomonas dechromaticans* kao prvi mikroorganizam sposoban za redukciju hroma(VI) (Romanenko i Korenkov, 1977), veliki broj istraživanja u ovoj oblasti doprineo je razvoju laboratorijskih metoda za redukciju hroma i njihovoj praktičnoj primeni na kontaminiranim lokacijama (Kanmani et al., 2012). Tako su danas dostupne brojne informacije o bakterijama koje efikasno mogu redukovati hrom(VI) (He et al., 2011; Upadhyay et al., 2017).

Rezultati pokazuju da stepen redukcije hroma zavisi od početne koncentracije, bakterijskih izolata i vremena inkubacije (Tabela 34). Praćenje redukcije Cr(VI) je pokazalo da su svi bakterijski izolati bili sposobni za redukciju različitih početnih koncentracija Cr(VI).

Redukcija hroma je u većini uzoraka bila završena obezbojavanjem tečne podloge. Od pet bakterijskih izolata, četiri su bila sposobna za kompletnu redukciju 50 mg/l Cr(VI): jedan od njih (342-9) nakon inkubacije od 6h, jedan izolat (270-9R) nakon inkubacije od 18h, jedan izolat (212-9) nakon 24h inkubacije i jedan izolat (351-9) nakon 48h inkubacije.

Slična početna koncentracija je takođe efikasno redukovana u drugim istraživanjima. Izolati SUK 1201 i SUK 1205 pokazuju kompletnu redukciju 0,1 mM Cr(VI) u inkubacionom periodu od 48h (Dey et al., 2014). Takođe, *Nesterenkonia* sp. MF2 je pokazala maksimalnu efikasnost redukcije 0,2 mM Cr(VI) u periodu od 24h (Amoozegar et al., 2007). Stepen redukcije 50 mg/l Cr(VI) izolata 270-9C je bio veći od 99%.

Tabela 34. Redukcija različitih koncentracija Cr(VI) pomoću autohtonih bakterijskih populacija

Konc. Cr (mg/l)	Izolat	Vreme (h)						
		0	2	4	6	18	24	48
50	270-9C	3,31 ^a ± 0,02	1,23 ^a ± 0,02	0,70 ^a ± 0,01	0,22 ^b ± 0,01	0,13 ^d ± 0,01	0,09 ^b ± 0,01	0,01 ^b ± 0,00
	342-9	0,33 ^d ± 0,01	0,07 ^e ± 0,01	0,05 ^f ± 0,01	0,00 ^e ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^b ± 0,00
	212-9	1,35 ^b ± 0,01	0,35 ^b ± 0,01	0,20 ^c ± 0,01	0,07 ^d ± 0,01	0,01 ^d ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^b ± 0,00
	270-9R	0,41 ^c ± 0,01	0,21 ^{cd} ± 0,01	0,10 ^e ± 0,01	0,01 ^e ± 0,00	0,00 ^b ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^b ± 0,00
	351-9	0,28 ^d ± 0,01	0,18 ^d ± 0,01	0,14 ^d ± 0,01	0,11 ^c ± 0,01	0,09 ^e ± 0,01	0,04 ^c ± 0,01	0,00 ^b ± 0,00
	Kontrola	0,28 ^d ± 0,01	0,26 ^c ± 0,00	0,26 ^b ± 0,00	0,29 ^a ± 0,00	0,27 ^a ± 0,00	0,30 ^a ± 0,00	0,28 ^a ± 0,01
	270-9C	2,81 ^a ± 0,01	1,60 ^a ± 0,02	1,04 ^a ± 0,01	0,67 ^a ± 0,01	0,12 ^b ± 0,01	0,08 ^b ± 0,01	0,01 ^b ± 0,00
100	342-9	0,28 ^e ± 0,01	0,10 ^f ± 0,01	0,04 ^e ± 0,00	0,00 ^f ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^b ± 0,00
	212-9	1,51 ^b ± 0,02	0,88 ^b ± 0,01	0,61 ^b ± 0,01	0,15 ^d ± 0,01	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^b ± 0,00
	270-9R	0,84 ^c ± 0,01	0,58 ^c ± 0,02	0,30 ^{cd} ± 0,01	0,04 ^e ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^b ± 0,00
	351-9	0,55 ^d ± 0,01	0,45 ^d ± 0,01	0,34 ^c ± 0,02	0,23 ^c ± 0,01	0,08 ^e ± 0,01	0,05 ^c ± 0,01	0,00 ^b ± 0,00
	Kontrola	0,27 ^e ± 0,00	0,26 ^c ± 0,00	0,27 ^d ± 0,00	0,28 ^b ± 0,00	0,28 ^a ± 0,00	0,29 ^a ± 0,00	0,27 ^a ± 0,00
	270-9C	3,26 ^a ± 0,01	3,03 ^a ± 0,01	2,56 ^a ± 0,03	1,71 ^a ± 0,01	0,46 ^a ± 0,02	0,20 ^b ± 0,01	0,02 ^b ± 0,00
	342-9	0,85 ^e ± 0,00	0,43 ^c ± 0,01	0,20 ^d ± 0,01	0,17 ^e ± 0,00	0,06 ^{cd} ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^c ± 0,00
200	212-9	2,90 ^b ± 0,01	1,77 ^b ± 0,02	1,00 ^b ± 0,01	0,26 ^d ± 0,01	0,07 ^e ± 0,00	0,01 ^d ± 0,00	0,00 ^c ± 0,00
	270-9R	1,82 ^c ± 0,01	1,23 ^c ± 0,01	0,98 ^b ± 0,01	0,12 ^f ± 0,01	0,01 ^d ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^c ± 0,00
	351-9	1,10 ^d ± 0,02	1,05 ^d ± 0,02	0,97 ^b ± 0,04	0,71 ^b ± 0,01	0,47 ^a ± 0,02	0,14 ^c ± 0,01	0,02 ^b ± 0,00
	Kontrola	0,35 ^f ± 0,01	0,37 ^f ± 0,00	0,36 ^c ± 0,00	0,38 ^c ± 0,00	0,35 ^b ± 0,00	0,35 ^a ± 0,01	0,33 ^a ± 0,00
	270-9C	3,46 ^a ± 0,03	3,34 ^a ± 0,01	2,37 ^a ± 0,02	2,92 ^a ± 0,03	0,73 ^b ± 0,02	0,43 ^b ± 0,01	0,15 ^c ± 0,02
	342-9	1,70 ^d ± 0,02	0,87 ^e ± 0,01	0,15 ^e ± 0,01	0,07 ^f ± 0,01	0,00 ^e ± 0,00	0,00 ^f ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00
	212-9	3,31 ^b ± 0,02	2,95 ^b ± 0,01	1,70 ^c ± 0,01	1,22 ^c ± 0,01	0,55 ^c ± 0,02	0,20 ^e ± 0,01	0,00 ^d ± 0,00
300	270-9R	2,69 ^c ± 0,01	2,28 ^c ± 0,01	2,00 ^b ± 0,01	1,62 ^b ± 0,01	1,30 ^a ± 0,01	1,00 ^a ± 0,01	0,57 ^a ± 0,01
	351-9	1,70 ^d ± 0,02	1,70 ^d ± 0,01	1,67 ^c ± 0,01	1,11 ^d ± 0,01	0,62 ^c ± 0,02	0,24 ^d ± 0,01	0,13 ^c ± 0,01
	Kontrola	0,41 ^e ± 0,00	0,40 ^f ± 0,00	0,39 ^d ± 0,00	0,40 ^e ± 0,00	0,40 ^d ± 0,00	0,39 ^e ± 0,00	0,38 ^b ± 0,00
	270-9C	3,21 ^b ± 0,01	3,11 ^c ± 0,01	2,16 ^c ± 0,02	1,50 ^d ± 0,02	0,55 ^d ± 0,01	0,42 ^c ± 0,00	0,26 ^d ± 0,01

Dora Ilić: Hrom-redukujući mikroorganizmi u bioremedijaciji zemljišta zagađenog teškim metalima
REZULTATI I DISKUSIJA

Konc, Cr	Izolat	Vreme (h)						
1000	342-9	1,80 ^d ± 0,01	0,75 ^e ± 0,01	0,68 ^e ± 0,01	0,21 ^f ± 0,00	0,15 ^f ± 0,02	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^e ± 0,00
	212-9	3,49 ^a ± 0,01	3,48 ^a ± 0,01	3,49 ^a ± 0,01	2,43 ^b ± 0,01	1,98 ^b ± 0,01	1,10 ^b ± 0,06	0,50 ^e ± 0,02
	270-9R	3,47 ^a ± 0,00	3,34 ^b ± 0,01	3,30 ^b ± 0,01	3,15 ^a ± 0,02	2,70 ^a ± 0,02	2,51 ^a ± 0,01	2,12 ^a ± 0,01
	351-9	2,89 ^e ± 0,02	2,61 ^d ± 0,02	1,81 ^d ± 0,01	1,59 ^e ± 0,01	1,30 ^e ± 0,01	1,02 ^b ± 0,02	0,76 ^b ± 0,02
	Kontrola	0,45 ^e ± 0,00	0,47 ^f ± 0,00	0,46 ^f ± 0,00	0,44 ^e ± 0,00	0,45 ^e ± 0,01	0,44 ^e ± 0,01	0,44 ^e ± 0,01
	270-9C	3,12 ^c ± 0,01	2,98 ^c ± 0,02	2,60 ^c ± 0,01	3,34 ^b ± 0,03	1,59 ^d ± 0,02	1,20 ^c ± 0,01	0,92 ^c ± 0,01
	342-9	1,93 ^d ± 0,01	1,50 ^d ± 0,02	0,89 ^d ± 0,01	0,20 ^e ± 0,01	0,16 ^f ± 0,01	0,10 ^f ± 0,00	0,00 ^f ± 0,00
	212-9	3,41 ^b ± 0,01	3,50 ^a ± 0,00	3,47 ^a ± 0,01	3,49 ^a ± 0,01	3,48 ^a ± 0,00	3,43 ^a ± 0,02	3,10 ^a ± 0,02
	270-9R	3,48 ^a ± 0,01	3,47 ^a ± 0,01	3,49 ^a ± 0,01	3,33 ^b ± 0,01	3,20 ^b ± 0,01	3,02 ^b ± 0,01	2,92 ^b ± 0,01
	351-9	3,50 ^a ± 0,00	3,39 ^b ± 0,01	3,10 ^b ± 0,01	2,98 ^c ± 0,02	2,80 ^c ± 0,02	0,83 ^d ± 0,02	0,30 ^e ± 0,01
	Kontrola	0,50 ^e ± 0,00	0,52 ^e ± 0,01	0,49 ^e ± 0,00	0,48 ^d ± 0,00	0,47 ^e ± 0,01	0,49 ^e ± 0,01	0,49 ^d ± 0,01

^a Srednje vrednosti (n=3) redukcije Cr(VI) pomoću čistih kultura bakterija i standardna devijacija

* Prema Tukey HSD testu, vrednosti sa istim slovnim oznakama unutar kolona, pojedinačno za svaku koncentraciju Cr(VI), nisu statistički značajne (P < 0,05)

Početna koncentracija 100 mg/l Cr(VI) je takođe uspešno redukovana pomoću bakterijskih izolata. Efikasnost izolata 270-9C je bila veća od 99%, dok su četiri ostala izolata kompletno redukovala Cr(VI): izolat 342-9 za 6 h, 212-9 i 270-9R u toku 18h, a 351-9 na kraju inkubacionog perioda. Slični rezultati za izolat 270-9C su uočeni pri početnoj koncentraciji Cr(VI) od 200 mg/l, dok izolat 351-9, za razliku od početne koncentracije od 100 mg/l, nije imao sposobnost kompletne redukcije Cr(VI). Ostali izolati su pokazali maksimalnu efikasnost kao u prethodnim eksperimentima, ali u toku 24h (izolati 342-9 i 270-9R) i 48h (izolat 212-9). Isto tako, slična sposobnost redukcije hroma je detektovana i kod *Exiguobacterium* sp. ZM-2, sa redukcijom 0,5 mM Cr(VI) za 56h (Alam i Malik, 2008), i za *Arthrobacter* sp. SUK 1201, sa stepenom redukcije od 75% za 800 µM Cr(VI) u periodu od 48h (Dey et al., 2014).

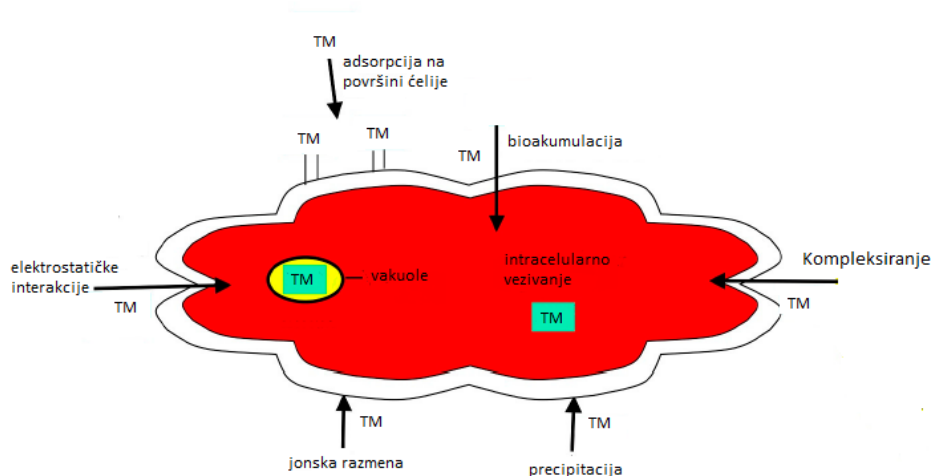
Na višim početnim koncentracijama Cr(VI), stepen redukcije je bio manji u poređenju sa prethodnim eksperimentima. Stepen redukcije 300, 500 i 1000 mg/l Cr(VI) pomoću izolata 270-9C je bila 96, 92 i 70%.

Smanjivanje stepena redukcije sa povećanjem sadržaja Cr(VI) u tečnim podlogama je takođe primećena u čistoj kulturi izolata 270-9R. Korišćenjem izolata 351-9, uočen je visok stepen redukcije, posebno pri koncentraciji 300 i 1000 mg/l (oko 92%). Očigledno je da je sposobnost redukcije hroma snažno uslovljena početnom koncentracijom Cr(VI), što je dokazano u prethodnim radovima (Alam i Ahmad, 2012; He et al., 2009; He et al., 2011). Kod većine bakterija, pri početnim koncentracijama od 300 i 500 mg/l Cr(VI), početna slaba redukcija je nakon 6h praćena naglim padom optičke gustine. S druge strane, izolat 342-9 je pokazao maksimalnu efikasnost u redukciji svih proučavanih početnih koncentracija Cr(VI), kao i izolat 212-9 pri 300 mg/l Cr(VI). Kao što se može videti u Tabeli 34, primećena je nekompletna redukcija početne koncentracije hroma od 1000 mg/l kod četiri od pet korišćenih izolata. Ovi rezultati su u skladu sa drugim istraživanjima (Megharaj et al., 2003; Dey i Paul, 2012). Za sve periode inkubacije, u neinokulisanoj tečnoj podlozi nije došlo do promene u koncentraciji hroma (Tabela 34).

U najvećem broju uzoraka postoji veoma izražena statistički značajna razlika između abiotičke, sa jedne strane, i biotičke redukcije Cr(VI), sa druge strane. Pri početnim koncentracijama Cr(VI) od 50 i 100 mg/l na kraju inkubacionog perioda, bakterijski izolati su uglavnom pokazali maksimalnu efikasnost redukcije, tako da ne postoje

statistički značajne razlike između izolata. Međutim, pri višim početnim koncentracijama Cr(VI), tokom inkubacije su izražene statistički značajne razlike između redukcione sposobnosti bakterija, a na kraju inkubacije su razlike prisutne između izolata koji se odlikuju sposobnošću kompletne redukcije Cr(VI), sa jedne strane, i izolata koji delimično redukuju Cr(VI), sa druge strane.

Osim biotransformacije, zahvaljujući ćelijskoj strukturi mikroorganizama, može se desiti da metalni joni budu zarobljeni i sorbovani na određenim mestima na ćelijskom zidu (Malik, 2004). Ovaj proces je poznat pod imenom biosorpcija ili pasivno usvajanje i odvija se nezavisno od ćelijskog metabolizma (Ayangbenro i Babalola, 2017). Količina usvojenih metala zavisi od mnogih faktora. Mehanizmi uključuju nekoliko procesa, kao što su elektrostatička interakcija, jonska razmena, precipitacija, redoks proces, površinska kompleksacija (Slika 16).



Slika 16. Mehanizmi usvajanja teških metala pomoću mikroorganizama

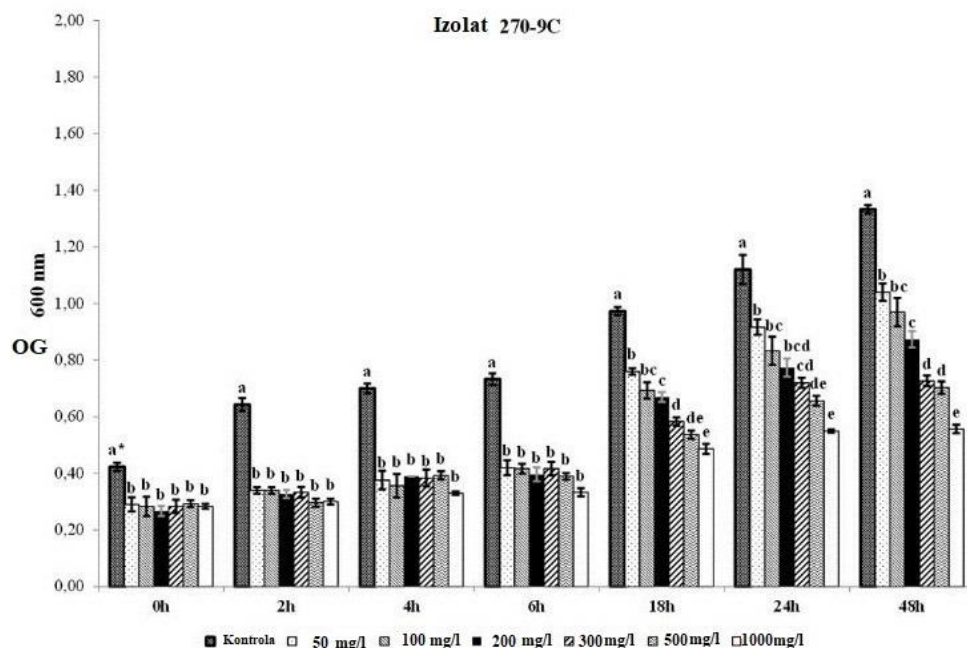
(Izvor: Ayangbenro i Babalola, 2017)

Ovi procesi su veoma brzi i obavljaju se u vremenskom intervalu od nekoliko minuta. Biosorpcija se obavlja pomoću fragmenata ćelija ili tkiva, mrtve ili žive ćelijske biomase kroz pasivno usvajanje i kompleksiranje na ćelijskom zidu i drugim spoljašnjim slojevima (Fomina i Gadd, 2014). Postoje i drugi procesi, u kojima joni teških metala prolaze kroz ćelijsku membranu i dolaze do citoplazme. Ovaj proces je poznat pod imenom bioakumulacija ili aktivno usvajanje. To je proces koji obavljaju

žive ćelije i zavisi od različitih fizičkih, hemijskih i bioloških faktora. Organizmi koji mogu da akumuliraju teške metale se odlikuju tolerancijom prema visokim koncentracijama jednog ili većeg broja metala, transformišući njihove toksične oblike u manje toksične ili netoksične, uz njihovo istovremeno skladištenje (Mosa et al., 2016). Analiza Raman spektroskopijom ukazala je da kod izolata kvasaca koji obavlja bioakumulaciju bakra *Candida tropicalis* dolazi do promene na spektru ukazuju na prisustvo CuS i/ili Cu_{2-x}S mineralnog kompleksa kao i na indukovanu sintezu metalotioneina u vidu Cu-tioneina (Radić, 2017).

5.10. Kinetika rasta bakterijskih izolata tokom redukcije Cr(VI)

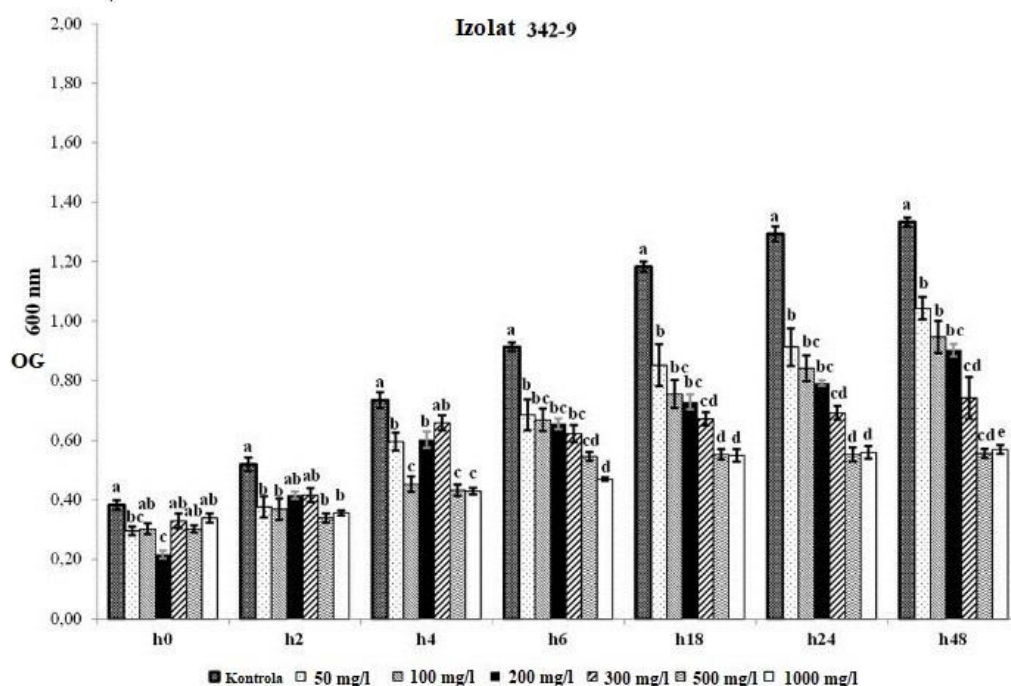
Svi bakterijskih izolati su bili sposobni za rast u tečnoj LB podlozi u koju su dodate različite početne koncentracije Cr(VI). U većini uzoraka stepen rasta je opadao sa povećanjem koncentracije Cr(VI) u podlozi (Grafik 1, 2, 3, 4 i 5).



Grafik 1. Kinetika rasta bakterijskog izolata 270-9C

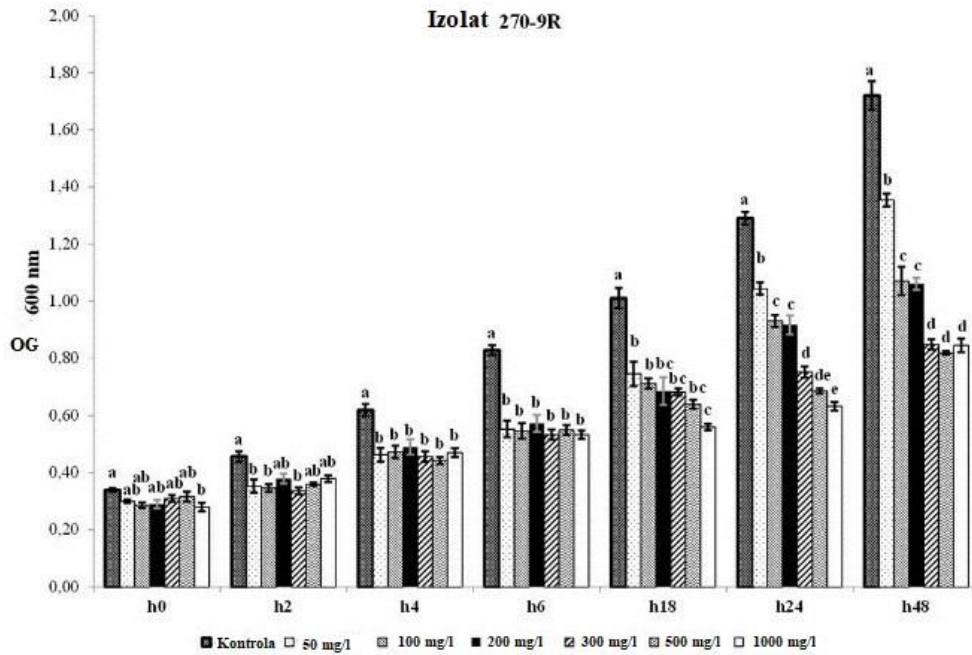
Sporiji rast je primećen kod izolata 270-9C (Grafik 1): u većini uzoraka lag-faza je trajala do 18 h (izuzev pri početnoj koncentraciji hroma od 200 mg/l), nakon koje je

usledila log-faza koja je trajala do kraja perioda inkubacije, izuzev kod početnih koncentracija hroma od 200 i 1000 mg/l, gde je početak stacionarne faze uočen na kraju perioda inkubacije. Slična kinetika rasta je postignuta i na početnoj koncentraciji Cr(VI) od 50, 100 i 200 mg/l korišćenjem izolata 342-9 (Grafik 2), dok je na većim početnim koncentracijama hroma početak stacionarne faze bio registrovan, uglavnom posle 24h inkubacije.

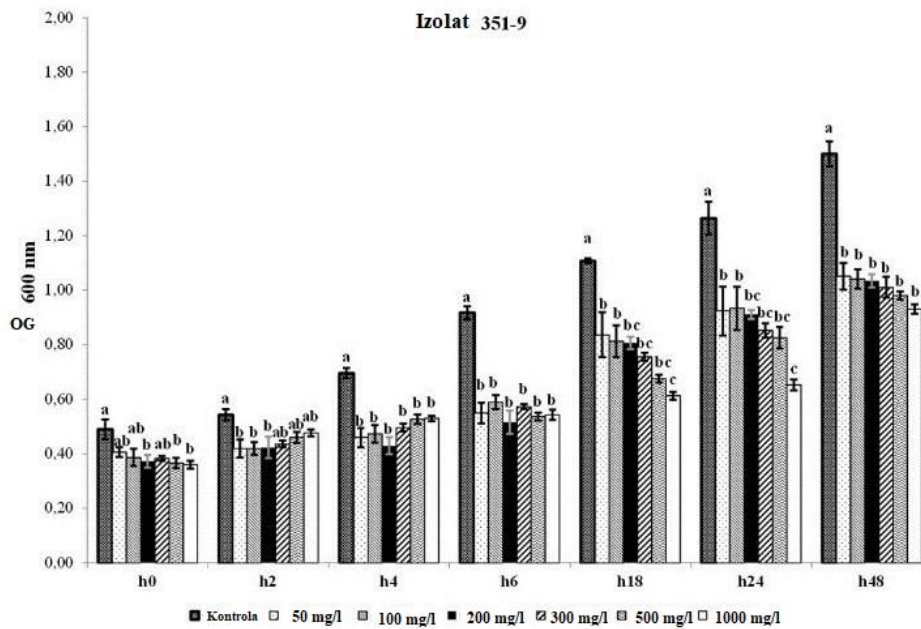


Grafik 2. Kinetika rasta bakterijskog izolata 342-9

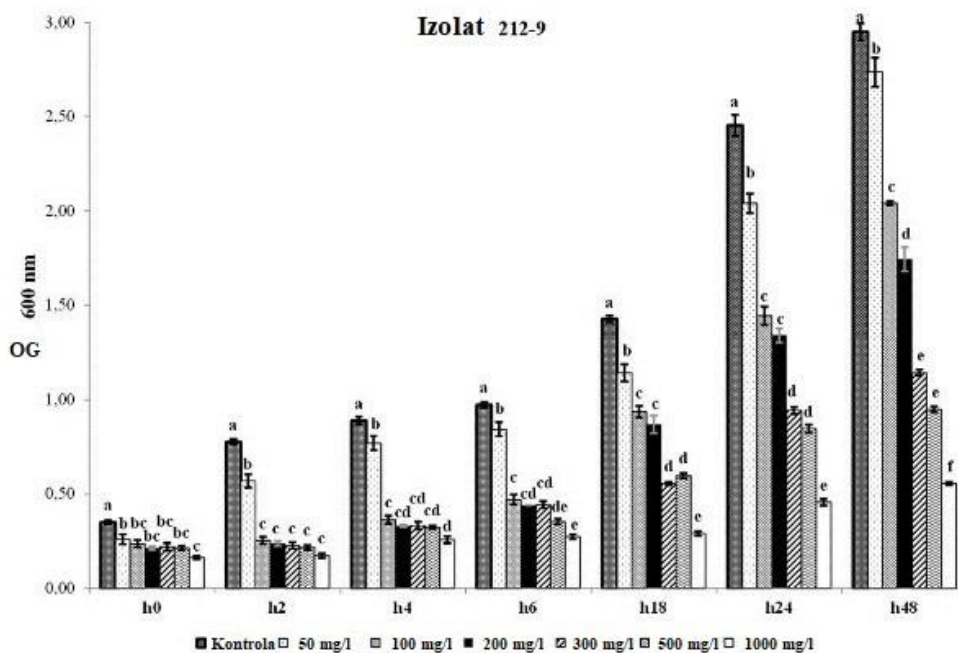
Histogrami rasta bakterijskih izolata 270-9C (Grafik 1), 342-9 (Grafik 2), 270-9R (Grafik 3) i 351-9 (Grafik 4) pokazuju malu promenu vrednosti optičke gustine posle 24 i 48h inkubacije sa koncentracijama od 300 do 1000 mg/l Cr(VI), izuzev izolata 351-9 za koji nije zapaženo statistički značajno smanjenje rasta na kraju inkubacionog perioda i svim ispitivanim koncentracijama.



Grafik 3. Kinetika rasta bakterijskog izolata 270-9R



Grafik 4. Kinetika rasta bakterijskog izolata 351-9



Grafik 5. Kinetika rasta bakterijskog izolata 212-9

Korišćenje hrom-rezistentnog bakterijskog soja KKF, Mistry et al. (2010) su zapazili da je stacionarna faza počela nakon 18h inkubacije. Slična kinetika rasta sa rezultatima dobijenim u ovim istraživanjima opisana je u istraživanjima koja su obavili Dey i Paul (2014), koji su primetili da broj ćelija izolata SUK 1201 i SKPD 1204 raste do 40h inkubacije. Kao što se može videti iz rezultata prikazanih u ovoj disertaciji, u većini uzoraka, visok stepen redukcije hroma je ostvaren tokom log-faze. To verovatno može biti povezano sa eventualnom produkcijom H_2S (Fude i Shigui, 1992). Istraživanja ukazuju da bakterije iz mnogih rodova imaju sposobnost redukcije različitih početnih koncentracija Cr(VI). *Klebsiella pneumoniae* MS 1.5, odnosno *Mangrovibacter yixingensis* MS 2.4 pokazale su sposobnost redukcije 80 mg/l, odnosno 100 mg/l Cr (Sanjay et al., 2018). Gupta et al. (2018) ukazuju da *Klebsiella* sp. ima sposobnost sinteze hrom-reduktaze, što objašnjava njenu efikasnost u redukciji Cr(VI). *Cellulosimicrobium* sp. (KX710177) je pokazao visoku efikasnost (96,98-99,33%) u uklanjanju Cr(VI) u koncentracijama 50, 100, 200 i 300 mg/L (Bharagava i Mishra, 2018).

Svi ispitivani bakterijski izolati su bili sposobni da redukuju različite koncentracije hroma u tečnoj podlozi, što može ukazivati da se $Cr(OH)_3$ akumulira oko bakterijskih

ćelija i štiti ih od štetnog uticaja hroma, koji je prethodno potvrđen korišćenjem *Pseudomonas sp.* za redukciju hroma (Ur Rahman et al., 2007).

Mnogi autori ukazuju na sposobnost redukcije hroma(VI) pomoću bakterijskih vrsta iz roda *Bacillus sp.* Upadhyay et al. (2017) su iz oštećenih zemljišta u okviru rudnika uglja izolovali bakteriju *Bacillus subtilis* MNU16, za koju su ustanovili sposobnost produkcije indol-sirćetne kiseline, siderofora, solubilizacije fosfata i aktivnost ACC-deaminaze. Ispitivajući njenu multirezistentnost na različite teške metale, konstatovali su da je u toku 72h ova bakterija za 75% redukovala početnu koncentraciju Cr(VI) od 50 mg/l. Wani et al. (2007b) su iz rizosfernog zemljišta izolovali tri vrste iz roda *Bacillus sp.* i ispitali njihov rast pri različitim koncentracijama Cr(VI). Sojevi su bili sposobni da tolerišu koncentracije Cr(VI) od 400-550 µg/ml.

Iste bakterije su imale i sposobnost kompletne ili delimične redukcije Cr(VI) u zavisnosti od početne koncentracije Cr(VI) i bakterijskog soja: početna koncentracija Cr(VI) od 50 µg/ml je kompletno redukovana, koncentracija od 100 µg/ml za oko 70-80% a koncentracija od 150 µg/ml za 50-60% za vreme od 120h. Chen et al. (2012) su opisali mehanizme redukcije Cr(VI) pomoću bakterije *Bacillus cereus* i konstatovali da je početna koncentracija od 104 mg/l kompletno redukovana tokom nekoliko časova inkubacije na LB podlozi. Tanu et al. (2016) takođe konstatuju da bakterija *Bacillus cereus* veoma efikasno redukuje Cr(VI) u laboratorijskim uslovima. Minimalna inhibitorna koncentracija Cr(VI) za izolat ove bakterije PGBw4 iznosila je između 1050 i 1450 µg/ml u zavisnosti od hranljive podloge. Stepenn redukcije početne koncentracije Cr(VI) od 100 µg/ml iznosio je oko 70% a koncentracije od 500 µg/ml oko 42% nakon 48h inkubacije. Sharma i Adholeya (2012) su opisali kompletnu redukciju 1,24 mg/l Cr(VI) i delimičnu redukciju Cr(VI) u koncentracijama od 50, 100 i 200 mg/l pomoću tri bakterije iz roda *Bacillus sp.* koje su izolovane iz otpadnih voda kožarske industrije. Ova sposobnost bakterija iz roda *Bacillus sp.* se često povezuje sa aktivnošću hrom-reduktaze (Conceição et al., 2009). I bakterija *Bacillus amyloliquefaciens* CRB-36, izolovana iz otpadnih voda iz kožarske industrije, pokazala je rezistentnost prema koncentraciji Cr(VI) od 500 mg/l, kao i visok stepenn redukcije ovog oblika hroma (Sakthivel et al., 2016). Ovi autori su izvršili optimizaciju uslova za što efikasniju redukciju Cr(VI) i zaključili da se dodavanjem skroba i peptona kao izvora ugljenika i azota, pri pH vrednosti 7,0 i inkubacionoj temperaturi od 30°C postiže najveći stepenn

redukcije toksičnog hroma. Basu et al. (2014) su iz zemljišta kontaminiranog hromom, olovom i živom izolovali bakteriju *Bacillus subtilis* i ispitali mogućnost redukcije Cr(VI) pomoću ove bakterije. Ustanovili su da je nakon 24h stepen redukcije početnih koncentracija Cr(VI) od 2,5, odnosno 5,0 µg/l iznosio 97, odnosno 90%.

Ogled je izveden na temperaturi od 30°C pri pH 7,0 a zapremina inokuluma bila je 5% u odnosu na ukupnu zapreminu. I *Bacillus circulans* izolovan iz mokrih polja (wetland) pokazao je sposobnost redukcije hroma. Minimalna inhibitorna koncentracija Cr(VI) za ovu bakteriju bila je 1050-1100 mg/l a stepen redukcije početne koncentracije Cr(VI) od 500 mg/l je nakon 4 dana iznosila 48%, a nakon 5 dana 65% (Khanafari et al., 2008). Bakterija *Bacillus coagulans*, izolovana iz zemljišta kontaminiranog hromom, pokazala je visok potencijal redukcije Cr(VI), čak i pri početnoj koncentraciji ovog oblika hroma od 3000 mg/l. Povećanje inicijalne gustine bakterijskih ćelija uticalo je na povećanje stepena redukcije Cr(VI). U prisustvu donora elektrona (NADH, NADPH i malata) stepen redukcije je značajno povećan (Philip et al., 1998). Liu et al. (2006) su izolovali pet hrom-redukujućih sojeva iz zemljišta kontaminiranog hromom i dva od njih, XW-2 i XW-4 su identifikovana kao *Bacillus* sp. Soj XW-4 je odabran za ispitivanje rezistentnosti na Cr(VI) i redukcije ovog oblika hroma. Uočeno je da je ispitivani soj bio tolerantan na prisustvo hroma u koncentraciji Cr od 100 mg/l, ali je i uočen uticaj na rast ćelija u prisustvu hroma(VI), pogotovo pri koncentraciji hroma od 100 mg/l. Eksperimenti su takođe pokazali da je toksični Cr(VI) efikasno redukovan u manje toksični Cr(III) pomoću soja *Bacillus* sp., XW-4, i da je bakterijska redukcija hroma(VI) značajno povećana dodavanjem glukoze.

Početna pH vrednost u ovom ogledu bila je različita i kretala se u rasponu od 4 do 10, a krajnja pH vrednost je bila između 5 i 6. Istraživanja su pokazala da optimalna početna pH vrednost za efikasnu redukciju Cr(VI) iznosi 9. Bakterijske ćelije su efikasnije redukovale Cr(VI) na pri inkubacionoj temperaturi od 37 °C u poređenju sa eksperimentima na temperaturi od 20 i 47 °C. Pri identičnom trajanju perioda inkubacije, sukcesivno povećanje početne koncentracije Cr(VI) od 10 do 80 mg/l je bilo upravo srazmerno povećanju količine redukovanog Cr(VI). Prisustvo NO₃⁻ i SO₄²⁻ nisu imali uticaja na bakterijsku redukciju hroma(VI). Wani et al. (2018) ukazuju da je *Bacillus* sp. MAI3 znacajno redukovao koncentracije od 50 i 100 µg/ml Cr(VI) pri temperaturama od 25 i 35 °C.

Xiao et al. (2017) su izolovali dva bakterijska izolata koji su pokazali veliku sposobnost redukcije hroma(VI). Izolati su bili izolovani sa kontaminiranih lokacija, odnosno efluenata iz pogona za galvanizaciju i kožarske industrije. Identifikacijom je ustanovljeno da izolati pripadaju rodovima *Bacillus* i *Arthrobacter*. Rezultati su pokazali da i *Bacillus* sp. FY1 i *Arthrobacter* sp. WZ2 tolerišu koncentraciju hroma do 1000 mg/l i da su bili sposobni da redukuju od 78-85%, odnosno 75-82% hroma(VI) (pri početnim koncentracijama od 100–200 mg/l) u toku 24h. Stepenn redukcije hroma(VI) je opadao sa povećanjem njegove koncentracije (od 200 do 1000 mg/l). Optimalna pH vrednost za redukciju hroma(VI) je bila između 7 i 8, temperatura 30-35 °C i koncentracija inokuluma od 1×10^8 ćelija/ml. Najnoviji dokazi bioremedijacionog potencijala *Bacillus* sp. FY1 i *Arthrobacter* sp. WZ2 govore o visokom redukcionom kapacitetu različitih početnih koncentracija Cr(VI). Stepenn redukcije početne koncentracije Cr(VI) od 100 mg/l u kontaminiranom zemljištu iznosio je 83-91%, 200 mg/l 78-85% i 500 mg/l 71-78% u periodu od 7 dana. Ova otkrića potvrđuju visok potencijal *Bacillus* sp. FY1 i *Arthrobacter* sp. WZ2 za korišćenje u procesima bioremedijacije zemljišta kontaminiranih Cr(VI).

Bakterija *Bacillus thuringiensis* je poznata kao dobar remedijacioni agens (Babu et al., 2013). Oves et al. (2013) su izolovali *Bacillus thuringiensis* soj OSM29 iz rizosfernog zemljišta gde je gajen karfiol, a navodnjavan je kontaminiranom vodom sa povećanim sadržajem teških metala. Ovi autori su ispitivali optimalnu pH vrednost za uklanjanje teških metala i ustanovili da je za Ni i Cr optimalna pH 7 a za Cd, Cu i Pb 6. Stepenn biosorpcije hroma bio je najveći (89,4%) kod najmanje početne koncentracije Cr (25 mg/l) i smanjivao se sa porastom početne koncentracije, tako da je kod najveće koncentracije (150 mg/l) iznosio 80,8%. Ovaj soj je pokazao i sposobnost redukcije Cd, Cu, Pb i Ni. Rathnayake et al. (2009) su potvrdili tolerantnost bakterije *Bacillus thuringiensis* na prisustvo različitih koncentracija Cd, Cu i Zn. Jahan et al. (2016) su izolovali bakteriju *Bacillus thuringiensis* soj Cr-S1 iz industrijskih otpadnih voda i ispitali njenu sposobnost redukcije hroma. Ova bakterija je pri različitim početnim koncentracijama hroma imala sposobnost konstantnog rasta tokom 24 časa inkubacije. Osim toga, redukovala je početnu koncentraciju od 100 µg/ml za 87,04% za vreme od 24 časa. Iz zemljišta kontaminiranog uranom Huang et al. (2014) su izolovali bakteriju *Bacillus thuringiensis* soj BRC-ZYR2 koja je početnu Cr(VI) koncentraciju od 25 do 75

mg/l kompletno redukovala pri pH 9,0 i temperaturi od 40 °C za vreme od 24 časa. Sa porastom početne koncentracije Cr(VI), stepen redukcije se smanjivao. Dodavanje glukoze uticalo je na smanjenje stepena redukcije, ali ovo smanjenje nije bilo statistički značajno. Međutim, Wang i Xiao (1995) i Garbisu et al. (1998) ukazuju da dodavanje glukoze stimuliše bakterijsku redukciju Cr(VI). Soni et al. (2013) su ispitivali redukciju Cr(VI) pomoću bakterije *Bacillus thuringiensis* soj JN674184 i utvrdili da ova bakterija može da kompletno redukuje Cr(VI) u koncentraciji od 0,2 mM za vreme od 120 časova. Dodavanje 0,1 mM NADH ubrzava redukciju Cr(VI) pomoću ovog izolata.

Sojevi bakterije *Bacillus safensis* su sposobni da produkuju industrijske enzime, kao što su amilaza (Kothari et al., 2013), celulaza (Khianngam et al., 2014), proteaza (Berrada et al., 2012), keratinaza (Lateef et al., 2015a) itd. Takođe se može koristiti i kao biokontrolni agens (Berrada et al., 2012), za promociju rasta biljaka (Kothari et al., 2013), probiotik (Nath et al., 2012) i za bioremedijaciju (Motesharezadeh i Savaghebi-Firoozabadi, 2011). Zbog toga se *Bacillus safensis* smatra idealnim mikroorganizmom za različite aplikacije u biotehnologiji (Lateef et al., 2015b). Iako su Raja i Omine (2012), odnosno Mathe et al. (2012) opisali izolate *Bacillus safensis* MS11, odnosno BBN7, koji su imali sposobnost rezistencije i tolerancije na prisustvo različitih teških metala (među kojima i hrom), redukcija hroma pomoću ove bakterije, prema dostupnim podacima iz svetske literature, ovo je tek drugo navođenje sposobnosti bakterije *Bacillus safensis* u redukciji hroma (Shafique et al., 2016). Bakterijski izolat 342-9 je, za razliku od jedinog do sada opisanog izolata bakterije *Bacillus safensis* MX-3 sa maksimalnim stepenom redukcije od 150 µg Cr(VI), pokazao kompletnu redukciju Cr(VI) u podlozi sa koncentracijom hroma od 1000 mg/l. *Bacillus safensis* je u istraživanjima korišćen za redukciju drugih supstanci koje narušavaju kvalitet životne sredine. Iz otpadnih voda fabrike za proizvodnju čeličnih žica izolovana je bakterija koja je identifikovana kao *Bacillus safensis*. Soj ove bakterije LAU 13 je korišćen kao biosorbent za uklanjanje teških metala iz otpadnih voda iz kojih je izolovan. Nakon perioda inkubacije od 48h, procenat uklanjanja kobalta iznosio je 100%, mangana 82,2-98,97%, bakra, gvožđa i cinka između 44 i 55% a hroma oko 10% (Ojoawo et al., 2017). Priyalaxmi et al. (2014) su ispitivali redukciju i sorpciju kadmijuma pomoću bakterije *Bacillus safensis*. Ustanovili su da je stepen redukcije i sorpcije Cd veći pri početnoj koncentraciji Cd od 40 ppm u odnosu na 60 ppm. Najveći stepen redukcije bio

je pri pH 7, a sorpcije pri pH 7 i 8. Bakterija *Bacillus safensis* KTSMBNL 26, izolovana iz zemljišta kontaminiranog eksplozivima, korišćena je za sorpciju aluminijuma u bioreaktoru (Dhanarani et al., 2016). Autori su konstatovali da je za sorpciju početne koncentracije Al od 100 mg/l optimalna pH 6,0 i temperatura 35 °C.

5.11. Klijavost semena, biomasa i dužina klijanaca u supstratu sa kontaminiranim zemljištem

Poznato je da u prirodnim i agroekosistemima dolazi do raznovrsnih interakcija između biljaka i zemljišta. Biljkama zemljište predstavlja podlogu, odnosno supstrat za rast i razviće, iz koga koriste mnoge hranljive supstance (West, 2015), dok, sa druge strane, prisustvo korenovog sistema utiče na poboljšanje fizičkih, hemijskih i bioloških osobina zemljišta. Biljke su, takođe, sposobne da usvajaju određene materije iz podloge/zemljišta, koji imaju nepoznatu biološku ulogu, ili su, čak i u vrlo niskim koncentracijama, toksični (Peralta-Videa et al., 2009). Zemljišne bakterije koje kolonizuju koren i poboljšavaju rast biljaka u degradiranom zemljištu, mogu da ublaže biotički i abiotički stres, oslobađajući fitohormone (npr., IAA, etilen), solubilizujući minerale i proizvodnjom siderofora (Ahemad, 2015).

5.11.1. Klijavost semena u supstratu sa kontaminiranim zemljištem

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da semena sve četiri ispitivane vrste klijaju u visokom procentu u kontrolnom tretmanu (Tabela 35). Najveći procenat iskljalih semena je kod suncokreta i iznosio je 100% nakon 7 dana inkubacije. Kod ostalih biljnih vrsta procenat klijavosti semena se povećava tokom inkubacije. Kod bosiljka je stepen klijavosti (80%) veći u odnosu na seme estragona i uljane repice tokom 15 dana inkubacije, ali je nakon 21. dana inkubacije procenat klijavosti veći kod estragona (88%). U kontrolnoj varijanti, procenat klijavosti je bio najmanji kod uljane repice nezavisno od vremena inkubacije (Slika 17).

Tabela 35. Procenat klijavosti semena (%) u kontroli

Vreme/biljka	Suncokret (<i>Heliantus annuus</i>)	Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i>)	Estragon (<i>Artemisia dranunculus</i>)	Uljana repica (<i>Brassica napus</i>)
Nakon 7 dana	100,0	70,0	66,0	60,0
Nakon 15 dana	100,0	80,0	75,0	66,7
Nakon 21 dana	100,0	84,4	88,0	77,8



Slika 17. Rast uljane repice (*Brassica napus*) u kontrolnom tretmanu nakon 15 dana inkubacije

U odnosu na kontrolu, procenat klijavosti semena u tretmanu 10 je identičan kod suncokreta i takođe nakon 7 dana inkubacije iznosi 100%. Kod ostalih biljnih vrsta uglavnom je došlo do smanjenja procenta klijavosti semena. Iako je stepen klijavosti bosiljka posle 7 i 15 dana inkubacije niži u odnosu na kontrolu, na kraju inkubacionog perioda je zabeležen identičan procenat klijavosti kao u kontrolnom tretmanu (84,4%). Seme estragona je pokazalo veliku osetljivost na prisustvo kontaminiranog zemljišta u supstratu za klijanje tako da je nakon tronedeljne inkubacije procenat klijavosti iznosio 46,7% (Tabela 39). Kod uljane repice ne postoje velika odstupanja u procentu klijavosti između kontrole i tretmana 10, tako da je na kraju inkubacije iznosio 68,9%.

Tabela 36. Procenat klijavosti semena (%) u tretmanu 10

Vreme/biljka	Suncokret (<i>Heliantus annuus</i>)	Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i>)	Estragon (<i>Artemisia dranunculus</i>)	Uljana repica (<i>Brassica napus</i>)
Nakon 7 dana	100,0	33,0	5,0	42,2
Nakon 15 dana	100,0	75,0	25,6	60,0
Nakon 21 dan	100,0	84,4	46,7	68,9

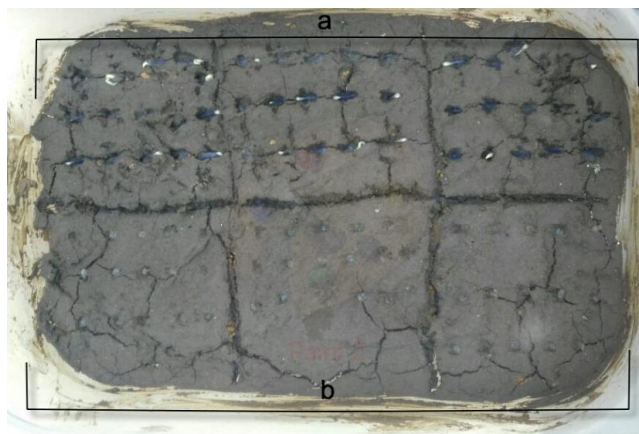
U tretmanu 20 dolazi do daljeg smanjenja procenta klijavosti, izuzev kod semena bosiljka, gde je klijavost veća nakon 7 dana inkubacije (40%) u odnosu na tretman 10 (33%). Sa povećavanjem dužine trajanja inkubacije, kod svih biljnih vrsta dolazi do povećanja procenta klijavosti semena. Kod suncokreta dolazi do drastičnog pada procenta klijavosti nakon 7 dana inkubacije (33%), ali je na kraju inkubacije procenat klijavosti veoma visok (88,9%). Kod bosiljka ne postoje veća odstupanja u procentu klijavosti između tretmana 10 i 20. Međutim, seme estragona i uljane repice je pokazalo veliku osetljivost na prisustvo veće količine kontaminiranog zemljišta u supstratu, tako da je procenat klijavosti drastično redukovano. Posle 7 dana inkubacije semena ovih biljnih vrsta nisu uopšte klijala a na kraju inkubacije procenat klijavosti semena estragona bio je 4,4% a uljane repice 17,8% (Tabela 37).

Tabela 37. Procenat klijavosti semena (%) u tretmanu 20

Vreme/biljka	Suncokret (<i>Heliantus annuus</i>)	Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i>)	Estragon (<i>Artemisia dranunculus</i>)	Uljana repica (<i>Brassica napus</i>)
Nakon 7 dana	33,0	40,0	0,0	0,0
Nakon 15 dana	66,0	62,0	2,0	6,7
Nakon 21 dana	88,9	71,1	4,4	17,8

Dalje smanjenje procenta klijavosti semena je zabeleženo u tretmanu 30 (Tabela 38). Seme estragona i uljane repice nije uopšte klijalalo ni posle tronedeljne inkubacije, dok se klijavost semena suncokreta i bosiljka povećavala tokom inkubacije (Slika 18). Na kraju inkubacije, procenat klijavosti semena bosiljka je bio za oko 50% manji u odnosu na

klijavost u tretmanu 20. Suncokret je zadržao relativno dobru klijavost i u tretmanu 30, tako da je na kraju inkubacije stepen klijavosti iznosio 62,2% (Slika 19).



Slika 18. Klijanje semena suncokreta (a) i bosiljka (b) u tretmanu 30 nakon 5 dana inkubacije



Slika 19. Rast suncokreta (a) i bosiljka (b) u tretmanu 30 nakon 15 dana

Tabela 38. Procenat klijavosti semena (%) u tretmanu 30

Vreme/biljka	Suncokret (<i>Heliantus annuus</i>)	Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i>)	Estragon (<i>Artemisia dranunculus</i>)	Uljana repica (<i>Brassica napus</i>)
Nakon 7 dana	15,0	0,0	0,0	0,0
Nakon 15 dana	50,0	16,6	0,0	0,0
Nakon 21 dana	62,2	37,8	0,0	0,0

5.11.2. Biomasa biljaka u prisustvu kontaminiranog zemljišta u supstratu

Biomasa biljaka se nakon tronedeljne inkubacije razlikovala u zavisnosti od biljne vrste i tretmana (Tabela 39). Kod suncokreta, bosiljka i estragona se sveža biomasa smanjivala sa povećanjem sadržaja kontaminiranog zemljišta u supstratu za klijanje. U svim varijantama oglada najveća sveža biomasa bila je kod suncokreta, zatim uljane repice i bosiljka, dok je najmanja bila kod estragona. Kod uljane repice je najveća sveža biomasa bila u tretmanu 10.

Tabela 39. Ukupna sveža biomasa 30 reprezentativnih klijanaca nakon inkubacije (g)

Vreme/biljka	Suncokret (<i>Heliantus annuus</i>)	Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i>)	Estragon (<i>Artemisia dranunculus</i>)	Uljana repica (<i>Brassica napus</i>)
Kontrola	127,92	5,48	3,42	6,24
10	81,60	3,12	2,16	9,96
20	76,2	1,65	1,32	5,16
30	20,70	0,78	0,00	0,00

5.11.3. Dužina klijanaca u prisustvu kontaminiranog zemljišta u supstratu

Dužine klijanaca su takođe pokazale razlike u zavisnosti od biljne vrste i tretmana (Tabela 46). Najduži klijanci bili su u kontrolnom tretmanu kod svih biljnih vrsta, a sa dodavanjem kontaminiranog zemljišta supstratu za klijanje dolazi do smanjivanja dužine klijanaca. U većini tretmana najveća prosečna dužina klijanaca bila je kod

suncokreta. Najmanja prosečna dužina klijanaca u kontroli i tretmanima 10 i 20 bila je kod bosiljka (Tabela 40).

Tabela 40. Prosečna dužina 30 reprezentativnih klijanaca nakon inkubacije (cm)

Vreme/biljka	Suncokret (<i>Heliantus annuus</i>)	Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i>)	Estragon (<i>Artemisia dranunculus</i>)	Uljana repica (<i>Brassica napus</i>)
Kontrola	14,1	4,34	7,28	10,3
10	8,12	3,17	3,96	9,14
20	5,62	2,78	2,92	5,16
30	1,58	0,65	0,00	0,00

Rezultati iz Tabela 35, 36 i 37 nedvosmisleno ukazuju da su procenat klijavosti semena, sveža biomasa i prosečna dužina klijanaca bili najveći u kontroli, a da je prisustvo zemljišta kontaminiranog teškim metalima u supstratu uticalo na smanjenje vrednosti ovih parametara. Ovaj zaključak bi se mogao povezati sa nepovoljnim delovanjem teških metala na porast biljaka, ali i potencijalnom akumulacijom teških metala u tkivu biljaka, što takođe nepovoljno utiče na porast biljaka.

Prisustvo teških metala otežava obavljanje biohemijskih procesa kod biljaka, kao što je produkcija enzima i antioksidanasa, mobilizacija proteina i fotosinteza. Hidrolitički enzimi imaju veoma važnu ulogu u klijanju semena. Kisele fosfataze, proteaze i α -amilaze potpomažu klijanje semena i porast klijanaca putem mobilizacije hranljivih supstanci u endospermu. Međutim, u prisustvu teških metala dolazi do imobilizacije skroba a hranljive supstance postaju slabije dostupne biljkama. Takođe, dolazi i do redukcije aktivnosti proteolitičkih enzima, uz povećanje sadržaja proteina i aminokiselina kao rezultat stresa izazvanog prisustvom teških metala. Proces fotosinteze se narušava destabilizacijom enzima, fotosistema 2 i uništavanjem elektron transportnog sistema i metabolizma hranljivih supstanci (Seneviratne et al., 2017).

Mnogi autori ukazuju da je primena biljaka na zemljištima sa povećanim sadržajem teških metala ekološki i ekonomski prihvatljiva tehnika (Rizwan et al., 2016).

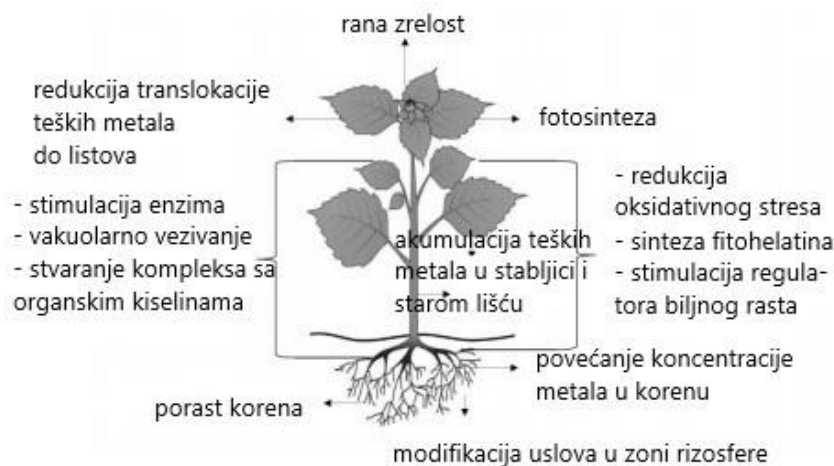
Uspeh ove tehnike zavisi od biljne vrste, koja može da toleriše prisustvo teških metala. Do danas je veliki broj biljaka ispitivanih u cilju potencijalne remedijacije zemljišta

koja su opterećena teškim metalima (Afshan et al., 2015; Meers et al., 2010; Tauqeer et al., 2016; Zaheer et al., 2015). U našim istraživanjima, najveći procenat klijavosti, najveća sveža biomasa i najveća dužina klijanaca bila je kod suncokreta u poređenju sa ostalim ispitivanim biljkama. Mnogi istraživači su upravo suncokret svrstali u kandidate za bioakumulaciju teških metala i potencijalnu remedijaciju kontaminiranih zemljišta (Cornu et al., 2016; Laporte et al., 2015; Shaheen i Rinklebe, 2015). Suncokret je istovremeno i jedna od najproučavanijih biljnih vrsta za remedijaciju zemljišta kontaminiranih teškim metalima (Boonyapookana et al., 2005; Niu et al., 2007) a dobijeni rezultati u ovoj oblasti potvrđuju njegov potencijal u usvajanju teških metala u poređenju sa drugim biljnim vrstama kao što su kukuruz (Gajdos et al., 2012), ricinus, slačica, lucerka (Niu et al., 2007) i druge. Mnoge studije ukazuju da se stepen apsorpcije metala i njihova translokacija povećava sa porastom koncentracije teških metala u supstratu za rast (Chaves et al., 2011; Cornu et al., 2016; Lee et al., 2013).

Primarni efekat teških metala u supstratu ispoljava se na klijanju semena. Prisustvo arsena značajno smanjuje procenat klijavosti suncokreta, pri čemu niže koncentracije arsena utiču na smanjenje dužine korena a veće dužinu klijanaca u poređenju sa kontrolom (Imran et al., 2013). Prisustvo kadmijuma takođe utiče na smanjenje procenta klijavosti semena (Junior et al., 2016). Pri sličnim koncentracijama nekih teških metala, procenat klijavosti semena suncokreta bio je veći u odnosu na druge biljne vrste (Lee et al., 2013), što je u skladu sa našim istraživanjima.

Iz dobijenih rezultata se može videti da je klijavost u tretmanu 10 suncokreta bila maksimalna, odnosno kao u kontroli. Takođe, na kraju inkubacije u istim tretmanima, klijavost semena bosiljka bila je identična, dok je seme uljane repice pokazalo mala odstupanja u stepenu klijavosti u navedenim tretmanima. Boros i Micle (2015) konstatuju da je u kontroli i supstratima koji su bili kontaminirani bakrom u koncentraciji od 1 i 10 ppm klijavost semena suncokreta bila maksimalna, ali uz znatne razlike u dužini podzemnog i nadzemnog dela između kontrole i tretmana sa koncentracijom bakra u supstratu od 1 ppm, sa jedne strane, i koncentracija iznad 10 ppm, sa druge strane. Takođe, prisustvo nekih teških metala u supstratu (kadmijuma u koncentraciji od 50 mg/l, nikla u koncentraciji od 100 mg/l i cinka u koncentraciji od 300 mg/l) nije statistički značajno uticalo na smanjenje procenta klijavosti suncokreta (Zhao et al., 2016). Isti autori ukazuju da prisustvo teških metala u supstratu značajno

utiče na dužinu korena klijanaca, ali ne i dužinu nadzemnog dela klijanaca pri koncentracijama od 150 mg/l Cd, 100 mg/l Ni, 1500 mg/l Pb i 50 i 300 mg/l Zn. Istraživanja pokazuju da biljke mogu da tolerišu određene koncentracije teških metala pomoću različitih mehanizama na fiziološkom i molekularnom nivou (Slika 20).



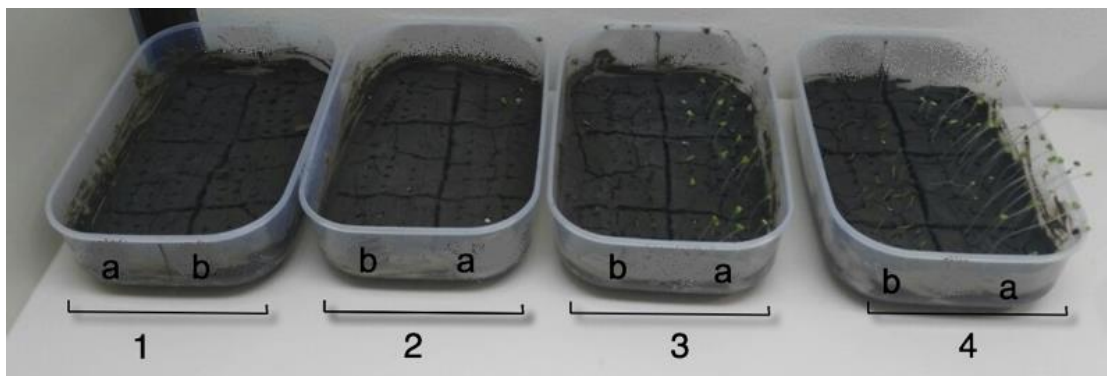
Slika 20. Potencijalni mehanizmi tolerancije suncokreta prema teškim metalima (Izvor: Rizwan et al., 2016)

Mnoge biljne vrste imaju veoma razvijen antioksidativni sistem (Azpilicueta et al., 2007; Groppa et al., 2012). Nehnevajova et al. (2012) ukazuju na povećanje aktivnosti monodehidroaskorbat-reduktaze, dehidroaskorbat-reduktaze, askorbat-peroksidaze, glutation-reduktaze i glutation-S-transferaze u uslovima stresa izazvanog prisustvom teških metala. Aktivnost ovih enzima uglavnom je bila izraženija kod mladih biljaka. Saber et al. (1999) ukazuju na porast sadržaja jabučne i limunske kiseline u podzemnim i nadzemnim delovima suncokreta usled većeg sadržaja teških metala, dok su Singh et al. (2004) detektovali povećanje sadržaja prolina i askorbinske kiseline pri sličnim uslovima. Međutim, tolerancija na prisustvo teških metala nije beskonačna. Azevedo et al. (2005) su istraživali uticaj kadmijuma u koncentracijama 50, odnosno 500 mM na porast suncokreta i ustanovili sušenje 90, odnosno 100% biljaka.

Osim suncokreta, i neke biljke iz familije *Brassicaceae* se mogu koristiti u cilju uklanjanja polutanata iz zemljišta (Belouchrani et al., 2016). One su sposobne da akumuliraju određene koncentracije teških metala (Duquéne et al., 2009; Koopmans et al., 2008; Ben Ghnaya et al., 2009). Uljana repica (*Brassica napus* L.) pripada pomenutoj familiji i predstavlja značajnog akumulatora teških metala (Purakayastha et al., 2008).

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazuju da nije došlo do velikih razlika u procentu klijavosti semena između kontrole i tretmana 10, dok povećanje procenta kontaminiranog zemljišta u supstratu dovodi do drastičnog smanjenja procenta klijavosti (Slika 21). Na sličan način smanjuje se i prosečna dužina klijanaca, s tom što u tretmanu 30 semena uljane repice nisu klijala. Moosavi et al. (2012) takođe konstatuju smanjenje procenta klijavosti semena uljane repice, pšenice i kukuruza sa porastom koncentracije metala (Bi, Cd, Zn, Sr) u supstratu. Autori konstatuju da povećanje sadržaja kadmijuma u supstratu ima najveći uticaj na procenat klijavosti semena, što se može objasniti inhibitornim dejstvom ovog elementa na životnu sposobnost semena, energiju klijanja, sintezu nukleinskih kiselina i proteina (John i van-Laerhoven, 1976). Takođe, kadmijum je ispoljio statistički značajan uticaj i na redukciju dužine podzemnog i nadzemnog dela klijanaca, dok ostali metali nisu imali statistički značajan uticaj na ispitivane parametre rasta ovih biljnih vrsta. Belouchrani et al. (2016) navode da uljana repica intenzivno raste na zemljištima kontaminiranim cinkom, što se odražava na parametre rasta ove biljke.

Nakon dve nedelje rasta, ovi autori su ustanovili veću dužinu podzemnog i nadzemnog dela klijanaca pri koncentracijama cinka od 350-500 mg/kg u supstratu u odnosu na kontrolu. Razlike u količini biomase primećene su 6 nedelja nakon postavljanja ogleda pri čemu su u kontroli i tretmanu sa 450 mg/kg Zn zabeležene najmanje biomase. U našim istraživanjima, u tretmanu 10 nakon 3 nedelje inkubacije, biomasa uljane repice je bila veća u poređenju sa kontrolom. Mehrpanah et al. (2009) su ispitivali rast uljane repice u uslovima prisustva Cd, Cu, Pb i Zn u koncentracijama od 10 do 50 ppm u supstratu i konstatovali da značajan uticaj na smanjenje procenta klijavosti imaju koncentracija 40 ppm kadmijuma i 50 ppm bakra i olova, a da je rast ove biljke stimulisan prisustvom 10 ppm bakra, olova i cinka. I u drugim istraživanjima konstatovano je da je biomasa nekih biljaka veća u uslovima kontaminacije. Boros i Micle (2015) su utvrdili veću prosečnu svežu i suhu biomasu kukuruza gajenog u supstratu koji je sadržao bakar u koncentraciji od 1 ppm u odnosu na kontrolu.



Slika 21. Rast uljane repice (*Brassica napus* L.) (a) i estragona (*Artemisia dranunculus* L.) (b) nakon 7 dana inkubacije: 1-tretman 30; 2-tretman 20; 3-tretman 10; 4-tretman K

Mnogi autori ukazuju na opravdanost primene medicinskog i aromatičnog bilja u rešavanju problema kontaminacije zemljišta teškim metalima (Gales et al., 2009; Padurariu et al., 2010), jer se uglavnom koriste za dobijanje nekih sekundarnih produkata kao što su ulja, a gajenjem na kontaminiranom supstratu se sprečava dalja kontaminacija zemljišnog ekosistema. Jedna od takvih biljaka je i bosiljak (*Ocimum basilicum* L.), čiji sekundarni proizvodi imaju primenu u parfimeriji, medicinskoj industriji (Simon et al., 1999), proizvodnji insekticida i dezinfekcionih sredstava (Silva et al., 1999). Zbog širokog spektra sekundarnih proizvoda (flavonoidi, fenilpropanoidi, kumarini itd.), sličnu upotrebu ima i estragon (*Artemisia dracunculus* L.), naročito u farmaceutskoj industriji (Obolskiy et al., 2011). Dok su o estragonu podaci o procentu klijavosti semena, dužini klijanaca i biomasi u svetskoj literaturi veoma oskudni, o parametrima rasta bosiljka na kontaminiranom zemljištu postoji veliki broj podataka. Naši rezultati ukazuju da sa povećanjem sadržaja kontaminiranog zemljišta u supstratu dolazi do smanjenja dužine klijanaca bosiljka i biomase.

Stepen klijavosti semena nakon tronedeljne inkubacije je identičan u kontroli i tretmanu 10 i smanjuje se u tretmanima 20 i 30. Pallag et al. (2014) ukazuju na inhibitorno delovanje cinka na procenat klijavosti semena čak i pri niskim koncentracijama ovog elementa. Olovo takođe pokazuje inhibitorni efekat, ali samo pri visokim koncentracijama. Međutim, Gales et al. (2009) konstatuju da povećanje sadržaja olova nije uticalo na promenu stepena klijavosti semena, ali je došlo do redukcije dužine korena, što je u skladu sa našim rezultatima. Gharebaghi et al. (2017) ukazuju na inhibitorno delovanje kadmijuma na procenat klijavosti semena, visinu biljaka i dužinu

korena. Ovi autori takođe ukazuju na razliku u inhibitornom delovanju u zavisnosti od varijeteta bosiljka. Szczodrowska et al. (2016) su pratili akumulaciju metalnih jona iz zemljišta u biljkama iz familija *Lamiaceae* i *Brassicaceae* i ustanovili da sa povećanjem koncentracije teških metala u supstratu dolazi do povećanja sadržaja metala u biljci. Autori su konstatovali da se u tkivima bosiljka akumulira statistički značajno veća količina cinka, bakra i nikla u poređenju sa kontrolom.

Koncentracija hroma u supstratu i podzemnom i nadzemnom delu suncokreta nakon inkubacije zavisila je od početnog sadržaja hroma u supstratu (Tabela 41).

Tabela 41. Sadržaj hroma u supstratu i nadzemnom delu i korenu suncokreta
 (*Helianthus annuus* L.)

Materijal	Varijanta	Sadržaj hroma (mg/kg)		Stepen redukcije (%)
		Početak ogleda	Kraj ogleda	
Supstrat	30	1901,23	1147,77	39,6
	20	1357,79	899,49	33,7
	10	723,44	597,35	17,4
	kontrola	28,7	24,8	
Biljka	30	-	26,71	-
	20	-	21,50	-
	10	-	20,50	-
	kontrola	-	1,23	-

Iz Tabele 41 jasno se vidi da je sadržaj hroma u supstratu redukovan za 17,4 do 39,6%, pri čemu je najmanje smanjenje bilo u tretmanu 10 a najveće u tretmanu 30. Slični rezultati su dobijeni i ispitivanjem sadržaja hroma u podzemnom i nadzemnom delu biljaka. U tretmanu 10, sadržaj hroma u biljkama iznosio je 20,50 mg/kg, u tretmanu 20 iznosio je 21,50 mg/kg, dok je najveći sadržaj hroma bio u tretmanu 30. Ove rezultate potvrđuju i drugi istraživači. Suncokret je biljka koja se često koristi za bioakumulaciju teških i toksičnih metala (Lopes et al., 2015). Atta et al. (2013) su ustanovili da sa povećanjem sadržaja hroma sa 50 na 500 mg/kg zemljišta dolazi i do povećanja sadržaja hroma u podzemnom delu suncokreta sa 25,14 na 189,61 ppm, dok u listovima sadržaj hroma iznosi od 1,46 do 6,97 ppm. Slab intenzitet fotosinteze usled inhibicije elektron

transportnog sistema, nepravilnosti fotohemijskog procesa i niži sadržaj hlorofila imaju za posledicu usporen rast biljaka, što je povezano sa ubrzanom akumulacijom hroma u biljkama (Van Assche i Clijsters, 1983; Singh i Agarwal, 2007; Tang et al., 2012). Mohanty i Patra (2016) su pratili akumulaciju Cr(VI) u podzemnom i nadzemnom delu suncokreta i ustanovili da se ovaj element više akumulira u nadzemnom delu.

Nakon 45 dana rasta klijanaca, ovi autori su utvrdili da se najveća količina Cr(VI) u podzemnom delu akumulira pri početnoj koncentraciji od 50 mg/kg suvog zemljišta, dok se u nadzemnom delu najviše akumulira pri najvećoj početnoj koncentraciji od 200 mg/kg, što je u saglasnosti sa našim istraživanjima. Mahimairaja i Shenbagavalli (2010) su takođe konstatovali porast akumulacije hroma u podzemnom i nadzemnom delu suncokreta sa povećanjem koncentracije hroma u supstratu, ali je stepen akumulacije bio veći u korenu u odnosu na listove ili stabljiku. Otpadna biomasa suncokreta se takođe može koristiti za sorpciju teških metala. Jain et al. (2016) su ispitivali efikasnost adsorbenata proizvedenih od otpadne mase suncokreta u sorpciji Ni(II), Cd(II) i Cr(VI). Ustanovili su da su adsorbenti bili efikasni u uklanjanju ovih metala, ali da se efikasnost smanjuje ukoliko se u sistemu nalaze dva ili tri metala istovremeno. Dodavanje organskih oplemenjivača takođe može da utiče na stepen uklanjanja hroma iz zemljišta. Choppala et al. (2013) su ispitivali efikasnost suncokreta u uklanjanju hroma iz zemljišta koje su dodati kravlji stajnjak, biougalj proizveden od pilećeg stajnjaka i crni ugalj. U odnosu na kontrolno zemljište, nakon 16 dana inkubacije došlo je do značajne akumulacije hroma u biljnom materijalu, dok se biomasa suncokreta značajno smanjila. U ovom eksperimentu, primena uglja imala je najveću efikasnost u uklanjanju hroma iz zemljišta. Altundogan (2005) je konstatovao da dodavanje pulpe šećerne repe utiče na smanjenje koncentracije Cr(VI).

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da se suncokret potencijalno može koristiti u cilju remedijacije zemljišta kontaminiranih teškim metalima. Međutim, neophodna su dalja istraživanja kako bi se ustanovio uticaj različitih teških metala na klijavost semena biljaka, a posebno u realnim uslovima kontaminacije. Razumevanje ovih uticaja može doprineti ublažavanju stresa i određenim manipulacijama na biohemijskom i molekularnom nivou dovesti do uspešnog uklanjanja teških metala iz kontaminiranih zemljišta.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih tokom ovih istraživanja, može se zaključiti sledeće:

1. Svi uzorci zemljišta sa lokacije bivše fabrike „Rog“ se mogu smatrati kontaminiranim. Zbog sadržaja većine ispitivanih metala iznad maksimalno dozvoljenih koncentracija, a, u zavisnosti od korišćenih standarda, sadržaj pojedinih elemenata (Ba, Cr, Cu, Pb, Ni, B i S) je i iznad remedijacionih vrednosti. U kontrolnom uzorku, samo sadržaj vanadijuma blago prelazi maksimalno dozvoljenu koncentraciju, dok je sadržaj ostalih elemenata ispod graničnih vrednosti korišćenih standarda. Ovi rezultati nedvosmisleno ukazuju da su industrijska proizvodnja bicikala, postupci galvanizacije i hromiranja uticali na kontaminaciju zemljišta i pogoršanje kvaliteta životne sredine što ukazuje na potrebu za izborom odgovarajuće remedijacione tehnologije
2. Ispitivano zemljište pokazuje neutralnu do blago alkalnu reakciju sredine, visok sadržaj organskog ugljenika, dobro, bogato i vrlo bogato je sadržajem ukupnog azota, siromašno, dobro ili vrlo dobro obezbeđeno sadržajem pristupačnog fosfora i dobro obezbeđeno kalijumom. Rezultati osnovnih hemijskih analiza ukazuju da je ovo sredina pogodna za rast različitih biljnih vrsta čime se ispunjavaju preduslovi za primenu ekoremedijacionih tehnologija baziranih na biljno-mikrobnim interakcijama.
3. Mikrobnii diverzitet zemljišta zavisio je od lokacije uzorkovanja, kao i prisustva/odsustva kontaminacije. Ukupan broj bakterija, gljiva i aktinomiceta je veći u kontrolnom uzorku. Smanjenje zastupljenosti mikrobnih populacija u kontaminiranim uzorcima u odnosu na kontrolni iznosila su za bakterije 60,6-93,0%, za gljive 43,9-98,0% i za aktinomicete 20,8-37,3%. Između ispitivanih lokacija prisutne su statistički značajne razlike u brojnosti svih grupa mikroorganizama. Ali, rezultati ukazuju da brojnost i diverzitet mikrobnih populacija u ispitivanom zemljištu pruža osnovu za primenu ekoremedijacionih tehnologija i ukazuje na potencijal autohtonih populacija za bioremedijacionu tehnologiju.

4. Brojnost hrom-rezistentnih bakterija i gljiva bila je različita i zavisila je od koncentracije hroma u podlozi, pH vrednosti podloge i lokacije uzorkovanja. Najveći broj hrom-rezistentnih bakterija konstatovan je u uzorku 2, pri koncentraciji hroma od 1000 mg/l i pH vrednosti 7 ($127,1 \times 10^4$ CFU/g) i koncentraciji 1500 mg/l pri pH vrednosti 9 ($126,3 \times 10^4$ CFU/g). Pri pH vrednosti podloge od 5 u većini varijanti ogleđa, bakterijski rast nije zabeležen. Takođe, pri koncentraciji hroma od 3000 mg/l rast hrom-rezistentnih bakterija bio je izuzetno slab. Najveća brojnost hrom-rezistentnih gljiva bila je u uzorku 1 ($11,8 \times 10^3$ CFU/g) a najmanja u uzorku 4 ($0,2 \times 10^3$ CFU/g). Generalno, diverzitet vrsta hrom-rezistentnih gljiva nije bio izražen: tokom inkubacije je uočeno svega nekoliko morfološki različitih vrsta.
5. Iz kontaminiranih uzoraka zemljišta, ukupno su izolovana 53 izolata hrom-rezistentnih bakterija. Među njima dominiraju gram pozitivne štapičaste sporogene bakterije (28 izolata, procenat oko 52%), dok su gram negativni asporogeni štapići slabije zastupljeni.
6. Relativna tolerantnost bakterijskih izolata na prisustvo hroma(VI) zavisi od njegove koncentracije u podlozi. Sa porastom koncentracije Cr(VI) u LB podlozi, broj hrom-tolerantnih bakterijskih izolata opada. U poređenju sa kontrolom, 47,1% do 78,6%, odnosno 29,4 do 38,5% izolata je bilo sposobno za rast u prisustvu 100, odnosno 500 mg/l Cr(VI) u LB podlozi. Pri koncentraciji od 750 mg/l Cr(VI), u poređenju sa kontrolom, svega 5,9% do 30,8% izolata je bilo sposobno za rast, dok je pri koncentracijama od 1000 i 1500 mg/l samo 5 izolata (270-9C; 270-9R, 342-9, 351-9 i 212-9) imalo sposobnost rasta. Svi izolati su bili štapičastog oblika, sporogeni i gram-pozitivni. Ovi izolati su korišćeni za ispitivanje minimalnih inhibitornih koncentracija Cr(VI) i redukcije Cr(VI).
7. Morfološkom, fiziološkom i molekularnom identifikacijom bakterijski izolati su svrstani u rod *Bacillus* spp. Sekvenciranje 16 S r DNK nije se pokazalo kao dovoljno diskriminatorska metoda, dok je sekvenciranje tuf gena pokazalo da su izolati 270-9R i 342-9 najbliži vrsti *Bacillus safensis*. Izolat 212-9 je bio najbliži vrsti *Bacillus thuringiensis*, dok su izolati 270-9C i 351-9 potvrđeni kao *B. subtilis subsp. subtilis*. Na osnovu odgajivačkih i morfološki

- karakteristika filamentozne gljive su svrstane u rodove *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. i *Penicillium* sp.
8. Rast hrom tolerantnih izolata bakterija zavisi od koncentracije Cr(VI) u podlozi i vremena inkubacije. Porast koncentracije Cr(VI) u podlozi uticao je na smanjenje rasta bakterija. Pri početnim koncentracijama od 100 i 500 mg/l Cr(VI), sa porastom dužine inkubacije, uglavnom dolazi do povećanja rasta bakterija, dok pri većim koncentracijama uglavnom ne dolazi do većih promena u rastu bakterija. Pri koncentraciji hroma od 2000 mg/l, bakterijski rast nije konstatovan. Rast hrom-rezistentnih gljiva je zavisio od istih faktora kao i kod hrom-rezistentnih bakterija.
 9. Stepen redukcije Cr(VI) zavisio je od njegove početne koncentracije, bakterijskih izolata i vremena inkubacije. Eksperiment je pokazao da su svi bakterijski izolati bili sposobni za kompletnu ili delimičnu redukciju različitih početnih koncentracija Cr(VI). Od pet bakterijskih izolata, četiri (342-9, 270-9R, 212-9 i 351-9) su bila sposobna za kompletnu redukciju početnih koncentracija od 50 i 100 mg/l Cr(VI). Kod ovih koncentracija, na kraju inkubacije, ne postoje statistički značajne razlike između izolata. Na višim početnim koncentracijama Cr(VI), stepen redukcije je bio manji u poređenju sa prethodnim eksperimentima, tako da se većina izolata odlikovala delimičnom redukcijom Cr(VI); na kraju inkubacije su statistički značajne razlike prisutne između izolata koji se odlikuju sposobnošću kompletne redukcije Cr(VI), sa jedne strane, i izolata koji delimično redukuju Cr(VI), sa druge strane. Izolat 342-9 je pokazao maksimalnu efikasnost u redukciji svih proučavanih početnih koncentracija Cr(VI), kao i izolat 212-9 pri 300 mg/l Cr(VI).
 10. Dobijeni rezultati, kao i podaci iz svetske literature, potvrđuju potencijal bakterija *Bacillus subtilis*, *Bacillus safensis* i *Bacillus thuringiensis* u redukciji Cr(VI).
 11. Svi bakterijskih izolati su pokazali rast u tečnoj LB podlozi u koju su dodate različite koncentracije Cr(VI). Kod većine izolata stepen rasta je opadao sa povećanjem koncentracije Cr(VI) u podlozi. Najsporiji rast je primećen kod izolata 270-9C, identifikovanog kao *Bacillus subtilis subsp. subtilis*, a najbrži

- kod izolata 212-9, identifikovanog kao *Bacillus thuringiensis*. Početak i trajanje faza rasta izolata takođe je zavisilo od početnih koncentracija Cr(VI).
12. Suncokret (*Helianthus annuus* L.), bosiljak (*Ocimum basilicum* L.), estragon (*Artemisia dracunculus* L.) i uljana repica (*Brassica napus* L.) imaju sposobnost rasta na supstratu koji sadrži zemljište kontaminirano metalima. Dodavanjem kontaminiranog zemljišta, stepen klijavosti semena uglavnom opada kod svih biljnih vrsta, a tokom inkubacije stepen klijavosti uglavnom raste. Suncokret ima maksimalnu klijavost u tretmanu 10, a u ostalim tretmanima klijavost semena ove biljne vrste je relativno visoka. Estragon i uljana repica nisu klijali u tretmanu 30.
 13. Biomasa i dužina klijanaca su najveći kod suncokreta, a zatim kod uljane repice (u tretmanima 10 i 20). Zbog visokog stepena klijavosti, biomase i dužine klijanaca, suncokret se može preporučiti kao jedno od rešenja za poboljšanje kvaliteta životne sredine na lokaciji bivše fabrike „Rog“.
 14. Dobijeni rezultati potvrđuju toksičan efekat hroma na rast klijanaca suncokreta, ali i ukazuju da se suncokret može uspešno koristiti za uklanjanje hroma iz zemljišta. Istovremeno, ovi rezultati ukazuju na neophodnost daljih istraživanja u vezi sa optimizacijom uslova za redukciju Cr(VI) u zemljištu.

Precizno morfološki okarakterisane i molekularno identifikovane mikrobne populacije predstavljaju nezamenljive karike bioremedijacionih tehnologija. Takođe, istraživanja su pokazala da se kontaminirano zemljišta na lokaciji bivše fabrike „Rog“ u Ljubljani može iskoristiti kao supstrat za rast biljnih vrsta tolerantnih na prisustvo metala. Ovakav pristup, baziran na iskorištavanju složenih biljno-mikrobnih interakcija predstavlja dobru osnovu za praktičnu primenu bioremedijacionih tehnologija, koje će doprineti poboljšanju kvaliteta životne sredine ugrožene visokih koncentracijama metala.

Ovo ukazuje na aplikativni značaj disertacije i moguću primenu u remedijaciji zemljišta kontaminiranih industrijskim otpadom. Formirana kolekcija mikrobnih populacija može poslužiti i za dalja naučna istraživanja.

7. LITERATURA

1. Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum, P. Angle, J.S. (2007): Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68: 360-367.
2. Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S.V., Curtin, J., Matin, A. (2006): Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 188: 3371-3381.
3. Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Keyhan, M., Blake, R., Matin, A. (2004): Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environmental Microbiology* 6: 851-860.
4. Adki, V.S., Jadhav, J.P., Bapat, V.A. (2013): *Nopalea cochenillifera*, a potential chromium (VI) hyperaccumulator plant. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 1173-1180.
5. Afshan, S., Ali, S., Bharwana, S.A., Rizwan, M., Farid, M., Abbas, F., Ibrahim, M., Mehmood, M.A., Abbasi, G.H. (2015): Citric acid enhances the phytoextraction of chromium, plant growth, and photosynthesis by alleviating the oxidative damages in *Brassica napus* L. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 11679-11689.
6. Ahemad, M. (2015): Enhancing phytoremediation of chromium-stressed soils through plant-growth-promoting bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13(1): 51-58.
7. Akhtar, S., Mahmood-ul-Hassan, M., Ahmad, R., Suthor, V., Yasin, M. (2013): Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. *Soil and Environment* 32(1): 55-62.

8. Alam, M.Z., Ahmad. S. (2012): Toxic chromate reduction by resistant and sensitive bacteria isolated from tannery effluent contaminated soil. *Annals of Microbiology* 62: 113-121.
9. Alam, M.Z., Malik, A. (2008): Chromate resistance, transport and bioreduction by *Exiguobacterium* sp. ZM-2 isolated from agricultural soil irrigated with tannery effluent. *Journal of Basic Microbiology* 48(5): 416-420.
10. Altundogan, H.S. (2005): Cr(VI) removal from aqueous solution by iron(III) hydroxide-loaded sugar beet pulp. *Process Biochemistry* 40: 1443-1452.
11. Amoozegar, M.A., Ghasemi, A., Razavi, M.R., Naddaf, S.R. (2007): Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, *Nesterenkonia* sp. strain MF2. *Process Biochemistry* 42(10): 1475-1479.
12. Anderson, R.A. (1997): Chromium as an essential nutrient for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 26 (1 Pt 2): S35-S41.
13. Ansari, M.I., Malik, A. (2007): Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Technology* 98: 3149-3153.
14. Appenroth, K.J. (2010): Definition of "heavy metals" and their role in biological systems. In: Sherameti, I., Varma, A. (Eds.), *Soil heavy metals, Soil Biology*. Springer, Berlin, pp. 19-29.
15. Appenroth, K.J., Bishoff, M.B., Gabrys, H., Stoeckel, J., Swartz, H. M. (2000): Kinetic of chromium (V) formation and reduction in fronds of the duckweed *Spirodella polyrhiza* a low frequency EPR study. *Journal of Inorganic Biochemistry* 78: 235-242.
16. ARSO (2018): Dokumentacija hidrometeorološkog zavoda RS. <http://www.arso.gov.si/>
17. Asmatullah, Qureshi S.N., Shakoori, A.R. (1998): Hexavalent chromium induced congenital abnormalities in chick embryos. *Journal of Applied Toxicology* 18(3):167-171.
18. Atta, M.I., Bokhari, T.Z., Malik, S.A. (2013): Assessing some emerging effects of hexavalent chromium on leaf physiological performance in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *International Journal of Scientific and Engineering Research* 4(8): 945-949.

19. Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O. (2017): A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14: 94.
20. Azevedo, H., Gomes, C., Pinto, G., Santos, C. (2005): Cadmium effects in sunflower: Membraneporability and changes in catalase and peroxidase activity in leaves and calluses. *Journal of Plant Nutrition* 28: 2233-2241.
21. Azpilicueta, C.E., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., Gallego, S.M. (2007): Mechanism of CAT A3 induction by cadmium in sunflower leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 589-595.
22. Baath, E., Diaz-Ravina, M., Frostegard, A., Campbell, C.D. (1998): Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 238-245.
23. Babu, A.G., Kim, J., Oh, B. (2013): Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDb-1. *Journal of Hazardous Materials* 250-251: 447-483.
24. Bagchi, D., Stohs, S.J., Downs, B.W., Bagchi, M., Preuss, H.G. (2002): Cytotoxicity and oxidative mechanism of different forms of chromium. *Toxicology* 180: 5-22.
25. Baker, A.J.M., Brooks, R.R. (1989): Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1(2): 81-126.
26. Balemi, T., Negisho, K. (2012): Management of soil phosphorus and plant adaptation mechanisms to phosphorus stress for sustainable crop production: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12(3): 547-562.
27. Bartlett, R.J., James, B.R. (1996): Chromium in methods of soil analysis. *Chemical methods book, Part 3, No. 5. Madison, WI: SSSA, pp. 683-701.*
28. Basu, S., Dasgupta, M., Chakraborty, B. (2014): Removal of chromium (VI) by *Bacillus subtilis* isolated from East Calcutta wetlands, West Bengal, India. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 4(1): 7-10.
29. Belouchrani, A.S., Mameri, N., Abdi, N., Grib, H., Lounici, H., Drouiche, N. (2016): Phytoremediation of soil contaminated with Zn using Canola (*Brassica napus L.*). *Ecological Engineering* 95: 43-49.

30. Ben Ghnaya, A., Gilbert, C., Hourmant, A., Hamida, J.B. (2009): Physiological behaviour of four Canola cultivar (*Brassica napus L.*) submitted of metal stress. *Comptes Rendus Biologies* 332: 363-370.
31. Berg, B., Ekbohm, G., Soderstrom, B., Staaf, H. (1991): Reduction of decomposition rates of scots pine needle litter due to heavy-metal pollution, *Water, Air and Soil Pollution* 59: 165-177.
32. Bernhard, A.E., Colbert, D., McManus, J., Field, K.G. (2005): Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries. *FEMS Microbiology Ecology* 52: 115-128.
33. Berrada, I., Benkhemmar, O., Swings, J., Bendaou, N., Amar, M. (2012): Selection of halophilic bacteria for biological control of tomato gray mould caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 625-630.
34. Bharagava, N.R., Mishra, S. (2018): Hexavalent chromium reduction potential of *Cellulosimicrobium* sp. isolated from common effluent treatment plant of tannery industries. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147: 102-109.
35. Böhme, K., Fernandez-No, I.C., Barros-Velazquez, J., Gallardo, J.M., Cañas, B., Calo-Mata, P. (2011): Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 32: 2951-2965.
36. Bona, K.R., Love, S., Rhodes, N.R., McAdory, D., Sinha, S.H., Kern, N., Kent, J., Strickland, J., Wilson, A., Beaird, J., Ramage, J., Rasco, J. F., Vincent, J.B. (2011): Chromium is not an essential trace element for mammals: Effects of a "low-chromium" diet. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16(3): 381-390.
37. Boonyapookana, B., Parkpian, P., Techapinyawat, S., DeLaune, R.D., Jugsujinda, A. (2005): Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiveria zizanioides*). *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 40: 117-137.
38. Boros, M. N., Micle, V. (2015): Copper influence on germination and growth of sunflower (*Helianthus Annuus*). *Studia Universitatis Babeş-Bolyai* 40(1-2): 23-30.

39. Bradl, H. (2002): Heavy metals in the environment: origin, interaction and Remediation. Volume 6. Academic Press, London.
40. Brady, N., Weil, R. (2002): The nature and properties of soils. 13th ed. Prentice Hall, NJ.
41. Braud, K.J, Bazot, S., Lebeau, T. (2009): Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 74: 280-286.
42. Caamaño-Antelo, S., Fernández-No, I.C., Böhme, K., Ezzat-Alnaki, M., Quintela-Baluja, M., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P. (2015): Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus spp.* based on three housekeeping genes. *Food microbiology* 46: 288-298.
43. Canadian Council of Ministers of the Environment (2007): Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Summary tables.
44. Caravelli, A.H., Giannuzzi, L., Zaritzky, N.E. (2008): Reduction of hexavalent chromium by *Sphaerotilus natans* a filamentous microorganism present in activated sludges. *Journal of Hazardous Materials* 156(1-3): 214-222.
45. Cárdenas-González, J.J., Acosta-Rodríguez, I. (2010): Hexavalent chromium removal by a *Paecilomyces* sp. fungal strain isolated from environment. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, Volume 2010, Article ID 676243.
46. Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J.C., Moreno-Sanchez, R., (2001): Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 335-347.
47. Chai, L.Z., Wang, Y.Y., Yang, Z.H., Wang, Q.W., Wang, H.Z. (2010): Detoxification of chromium-containing slag by *Achromobacter* sp. CH-1 and selective recovery of chromium. *The Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 20: 1500-1504.
48. Chatterjee, S., Sau, G.B., Mukherjee, S.K. (2009): Plant growth promotion by a hexavalent chromium reducing bacterial strain, *Cellulosimicrobium cellulans* KUCr3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 1829-1836.

49. Chaves, L.H.G., Estrela, M.A., De Souza, M.S. (2011): Effect on plant growth and heavy metal accumulation by sunflower. *Journal of Phytology* 3: 4-9.
50. Chen, J.H., He, F., Zhang, X.H., Sun, X., Zheng, J.F., Zheng, J.W. (2014): Heavy metal pollution decreases microbial abundance, diversity and activity within particle-size fractions of a paddy soil, *FEMS Microbiology Ecology* 87: 164-181.
51. Chen, Z., Huang, Z., Cheng, Y., Pan, D., Yu, M., Pan Z., Lin, Z. Guan, X. (2012): Cr(VI) uptake mechanism of *Bacillus cereus*. *Chemosphere* 87(3). 211-216.
52. Cheung, K.H., Lai, H.Y., Gu, J.D. (2006): Membrane-associated hexavalent chromium reductase of *Bacillus megaterium* TKW 3 with induced expression. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 855-862.
53. Chien, C., Kuo, Y., Chen, C., Hung, C., Yeh, C., Yeh, W. (2008): Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* 20: 359-363.
54. Choppala, G., Bolan, N., Seshadri, B. (2013): Chemodynamics of chromium reduction in soils: implications to bioavailability. *Journal of Hazardous Materials* 261: 718-724.
55. Clausen, C.A. (2000): Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. *Waste Management Research* 18: 264-268.
56. Coates, J.D., Phillips, E.J.P., Lonergan, D.J., Jenter, H., Lovley, D.R. (1996): Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1531-1536.
57. Codd, R., Irwin, J.A., Lay, P.A. (2003): Sialoglycoprotein and carbohydrate complexes in chromium toxicity. *Current Opinion in Chemical Biology* 17(2): 213-219.
58. Conceição, D.P., Tavares dos Passos, C., Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Simonetti, A.B., Camargo, F.A.O. (2009): A novel chromate reductase from *Bacillus* sp. ES29: characterization and partial purification. *Revista Ciências Exatas e Naturais* 11(2): 237-256.

59. Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin M., Thamaraiselvi, K. (2007): Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials* 146: 270-277.
60. Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., Thamaraiselvi, K. (2007): Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials* 146: 270-277.
61. Cordell, D., Rosemarin, A., Schroder, J.J., Smit, A.L. (2011): Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere* 84: 747-758.
62. Cornu, J.Y., Bakoto, R., Bonnard, O., Bussiere, S., Coriou, C., Sirguy, C., Sterckeman, T., Thunot, S., Visse, M.I., Nguyen, C. (2016): Cadmium uptake and partitioning during the vegetative growth of sunflower exposed to low Cd²⁺ concentrations in hydroponics. *Plant Soil* 404(1-2): 263-275.
63. Das, M., Nigam, N., Chauhan, S., Pandey, P., Swati, P., Yadav, M., Tiwaru, A. (2015): Microbial chromium degradation: biological evolution, mitigation and mechanism. *Advances in Applied Science Research* 6(5): 6-12.
64. de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Bashan, Y. (2012): The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology* 61: 171-189.
65. Dekka, R.M., Baruah, B.K., Kalita, J., (2008): Physico chemical characteristics of soils of kapla beel, a fresh water wetland in Barpeta, Assam. *Pollution Research* 27(4): 695-698.
66. Dell'Amico, E., Mazzocchi, M., Cavalca, L., Allievi, L., Andreoni, V. (2008): Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted exvineyard soil. *Microbiological Research* 163: 671-683.
67. Dey, S., Pandit, B., Paul, A.K. (2014): Reduction of hexavalent chromium by viable cells of chromium resistant bacteria isolated from chromite mining environment. *Journal of Mining* 2014: Article ID 941341.
68. Dey, S., Paul, A.K. (2012): Optimization of cultural conditions for growth associated chromate reduction by *Arthrobacter* sp. SUK 1201 isolated from chromite mine overburden. *Journal of Hazardous Materials* 213-214: 200-206.

69. Dey, S., Paul, A.K. (2013): Hexavalent chromium reduction by aerobic heterotrophic bacteria indigenous to chromite mine overburden. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(1): 307-315.
70. Dhanarani, S., Viswanathan, E., Piruthiviraj, P., Arivalagan, P., Kaliannan, T. (2016): Comparative study on the biosorption of aluminum by free and immobilized cells of *Bacillus safensis* KTSMBNL 26 isolated from explosive contaminated soil. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 69: 61-67.
71. Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatos, A., Buchel, G., Kothe, E. (2009): Metal—induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 154-162.
72. Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U.B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B.P., Rai, J.P., Sharma, P.K., Lade, H. (2015): Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability* 7: 2189-2212.
73. Doelman, P., Haanstra, L. (1984): Short-term and longterm effects of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn on microbial respiration in relation to abiotic soil factors, *Plant and Soil* 79: 317-321.
74. Donati, E., Oliver, C., Curutchet, G. (2003): Reduction of chromium(VI) by the indirect action of *Thiobacillus thioparus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 20: 69-73.
75. Doney, S.C., Abbot, M.R., Cullen, J.J., Karl, D.M., Rothstein, L. (2004): From genes to ecosystems: the ocean's new frontier. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2: 457-466.
76. Draganić, V., Lozo, J., Biočanin, M., Dimkić, I., Garalejić, E., Fira, D., Stanković, S., Berić, T. (2017): Genotyping of *Bacillus* spp. isolate collection from natural samples. *Genetika* 49(2): 445-456.
77. Duquéne, L.V., Vandenhove, H., Tack, F., Meers, E., Baeten, J., Wannijn, J. (2009): Enhanced phytoextraction of uranium and selected heavy metals by Indian mustard and rayegrass using biodegradable soil amendments. *Science of Total Environment* 407: 1496-1505.

78. Dutch Sediment Quality Standards (2000): Ministry of housing, spatial planning and environment. Directorate, general for environmental protection. The Netherlands.
79. Dykhuizen, D.E. (1998): Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 25-33.
80. Egner, H., Riehm, H., Domingo, W. (1960): Untersuchungen über die chemische bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Boden: II. Chemische Extraktionsmethoden zur Phosphor- und Kaliumbestimmung. *Kungliga Kantrbrukshogskolans Annaler* 26: 199-215.
81. Ehrlich, H.L. (2002): *Geomicrobiology*. Fourth edition. Marcel Dekker, New York.
82. European Union (2002): Heavy metals in wastes, European Commission on environment,
<http://www.ec.europa.eu/environment/waste/studies/pdf/heavymetalsreport.pdf>
83. Faisal, M., Hasnain, S. (2005a): Bacterial Cr(VI) reduction concurrently improves sunflower (*Helianthus annuus L.*) growth. *Biotechnology Letters* 27: 943-947.
84. Faisal, M., Hasnain, S. (2005b): Beneficial role of hydrophytes in removing Cr(VI) from wastewater in association with chromate-reducing bacterial strains *Ochrobactrum intermedium* and *O. brevibacterium*. *International Journal of Phytoremediation* 7: 271-277.
85. Fomina, M., Gadd, G.M. (2014): Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology* 160: 3-14.
86. Fude, L., Shigui, L. (1992): Microbial removal and recovery of chromium(VI) from electroplating waste water. *Journal of Sichuan University Natural Science Edition* 2: 266-273.
87. Fukuda, T., Tsutsumi, K., Ishino, Y., Satou, T., Ogawa, A., Morita, H. (2008): Removal of hexavalent chromium *in vitro* and from contaminated soils by chromate-resistant fungi from chromium deposits. *Journal of Environmental Biotechnology* 8(2): 111-118.

88. Fulladosa, E., Murat, J.C., Martinez, M., Vilaescusa, I. (2006): Effect of pH on arsenate and arsenite toxicity to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*). Archives of Environmental Contamination and toxicology 46(2): 176-182.
89. Gajdos, E., Levai, L., Veres, S., Kovacs, B., Eva, G., Levai, L., Szilvia, V., Bela, K. (2012): Effects of biofertilizers on maize and sunflower seedlings under cadmium stress. Communications in Soil Science and Plant Analysis 43: 272-279.
90. Gales, R., Ivănescu, L., Zamfirache, M.M., Burducea M. (2009): Effect of lead on seed germination and seedling development in some medicinal plants. Analele științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași 55(2): 27-31.
91. Gamalero, E., Glick, B.R. (2012): Plant growth-promoting bacteria, and metals phytoremediation. In: Anjum, N.A., Pereira, M.E., Ahmad, I., Duarte, A.C., Umar, S., Khan, N.A. (Eds.). Phytotechnologies: remediation of environmental contaminants. CRC Press, pp. 361-376.
92. Ganguli, A., Tripathi, A.K. (2002): Bioremediation of toxic chromium electroplating effluent by chromate reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2chr in two bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology 58: 416-420.
93. Garbisu, C., Alkorta, I., Llama, M., Serra, J.L. (1998): Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. Biodegradation 9: 133-141.
94. Garcia-Hernandez, M.A., Villarreal-Chiu J.F., Garza-Gonzales, M.T. (2017): Metallophilic fungi research: an alternative for its use in the bioremediation of hexavalent chromium, International Journal of Environmental Science and Technology 14(9): 2023-2038.
95. Gaur, N., Flora, G., Yadav, M., Tiwari, A. (2014): A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. Environmental Science: Process and Impacts 16: 180-193.
96. Gefen, O., Balaban, N.Q. (2009): The importance of being persistent: heterogeneity of bacteria populations under antibiotic stress. FEMS Microbiology Reviews 33(4): 704-717.
97. Gharebaghi, A., Alborzi Haghghi, M.H., Arouiee, H. (2017): Effect of cadmium on seed germination and earlier basil (*Ocimum Basilicum* L. and *Ocimum*

- Basilicum* var. *Purpurescens*) seedling growth. *Trakia Journal of Sciences* 1: 1-4.
98. Ghosh, A.B., Bajaj, J.C., Hassan, R., Singh, B. (1983): Soil and water analysis – a laboratory manual. Division of soil science and agricultural chemistry. IARI, New Delhi, pp. 1-48.
99. Gibb, H.J., Lees, P.S., Pinsky, P.F., Rooney, B.C. (2000a): Lung cancer among workers in chromium chemical production. *American Journal of Industrial Medicine* 38: 115-126.
100. Gibb, H.J., Lees, P.S., Pinsky, P.F., Rooney, B.C. (2000b): Clinical findings of irritation among chromium chemical production workers. *American Journal of Industrial Medicine* 38: 127-131.
101. Gračanin, M. (1947): *Pedologija, Fiziografija tala*. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb.
102. Gremion, F., Chatzinotas, A., Kaufmann, K., Sigler, W.V., Harms, H. (2004): Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment, *FEMS Microbiology Ecology* 48: 273-283.
103. Groppa, M.D., Ianuzzo, M.P., Rosales, E.P., Vazquez, S.C., Benavides, M.P. (2012): Cadmium modulates NADPH oxidase activity and expression in sunflower leaves. *Biologia Plantarum* 56: 167-171.
104. Gu, J.D., Cheung, K.H. (2001): Phenotypic expression of *Vogesella indigofera* upon exposure to hexavalent chromium, Cr⁺⁶. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 475-480.
105. Gupta, P., Vipin, K., Usmani, Z., Rani, R., Chandra, R. (2018): Phosphate solubilization and chromium (VI) remediation potential of *Klebsiella* sp. strain CPSB4 isolated from the chromium contaminated agricultural soil. *Chemosphere* 192: 318-327.
106. Hafeburg, G., Kothe, E. (2007): Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology* 47: 453-467.
107. Hansda A., Kumar V., Anshumali A., Usmani Z. (2014): Phytoremediation of heavy metals contaminated soil using plant growth promoting rhizobacteria

- (PGPR): a current perspective. *Recent Research in Science and Technology* 6: 131-134.
108. Hawley, E.L., Deeb, R.A., Kavanaugh, M.C., Jacobs, J.A. (2005): Treatment technologies for chromium(VI). In: Guertin, J., Jacobs, J.A., Avakian, C.P. (Eds.), *Chromium(VI) handbook*. CRC Press, Boca Raton, pp. 275-309.
109. He, M., Li, X., Liu, H., Miller, S.J., Wang, G., Rensing, C. (2011): Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *Journal of Hazardous Materials* 185: 682-688.
110. He, Z., Gao, F., Sha, T., Hu, Y., He, C. (2009): Isolation and characterization of a Cr(VI) reduction *Ochrobactrum* sp. strain CSCr-3 from chromium landfill. *Journal of Hazardous Materials* 163(2-3): 869-873.
111. Hietala, K.A., Roane, T.M. (2009): Microbial remediation of metals in soils, In: Singh, A., Kuhad, R.C., Ward, O.P. (Eds.), *Advances in applied bioremediation*. Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 201-220,
112. Hoorman, J.J. (2011): The role of soil fungus. *Agriculture and natural resources*, SAG-14-11. The Ohio State University, 1-6.
113. Horton, R.N., Apel, W.A., Thompson, V.S., Sheridan, P.P. (2006): Low temperature reduction of hexavalent chromium by a microbial enrichment consortium and a novel strain of *Arthrobacter aurescens*. *BMC Microbiology* 6: 5.
114. Hu, Q., Qi, H.Y., Zeng, J.H., Zhang, H.X. (2007): Bacterial diversity in soils around a lead and zinc mine. *Journal of Environmental Sciences* 19: 74-79.
115. Huang, T.P., Xiao, Y., Pan, J.R., Chen, Z., Li, L.F., Xu, L., Zhang, L.L., Guan, X. (2014): Aerobic Cr(VI) reduction by an indigenous soil isolate *Bacillus thuringiensis* BRC-ZYR2. *Pedosphere* 24(5): 652-661.
116. Ilić-Baus, Đ., Ilić, V., Karaman M. (2015): Uticaj Ni, Cu i Cd na brojnost filamentoznih gljiva u zemljištu sa zasadima klonova topole M1, PE19/66 i B229. *Zaštita materijala* 56(4): 447-456.
117. Imberger, K.T., Chiu, C.Y. (2002): Topographical and seasonal effects on soil fungal and bacterial activity in subtropical, perhumid, primary and regenerated montane forests. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 711-720.

118. Imran, M.A., Nawaz, Ch.M., Khan, R.M., Ali, Z. (2013): Toxicity of arsenic (As) on seed germination of sunflower (*Helianthus annuus L.*). International Journal of Physical Sciences 8: 840-847.
119. Ishibashi, Y., Cervantes, C., Silver, S. (1990): Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. Applied and Environmental Microbiology 56: 2268-2270.
120. ISO 11047 (1998): Soil quality — Determination of cadmium, chromium, cobalt, copper, lead, manganese, nickel and zinc in aqua regia extracts of soil — Flame and electrothermal atomic absorption spectrometric methods.
121. ISO 11466 (1994): Soil quality - Extraction of trace elements soluble in aqua regia. Determination of elements in aqua regia and nitric acid digests by flame atomic absorption spectrometry.
122. Jahan, N., Idrees, M., Zahid, M.T., Ali, N.M., Hussain, M. (2016): Molecular identification and characterization of heavy metal resistant bacteria and their role in bioremediation of chromium. British Microbiology Research Journal 13(6): 1-11.
123. Jain, M., Garg, V.K., Kadirvelu, K., Sillanpa, M. (2016): Adsorption of heavy metals from multi-metal aqueous solution by sunflower plant biomass-based carbons. International Journal of Environmental Science and Technology 13: 493-500.
124. Jeyasingh, J., Philip, L. (2005): Bioremediation of chromium contaminated soil: optimization of operating parameters under laboratory conditions. Journal of Hazardous Materials 118(1-3): 113-120.
125. Ji, G., Silver, S. (1995): Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. Journal of Industrial Microbiology 14: 61-67.
126. John, M.K., van-Laerhoven, C.J. (1976): Differential effects of cadmium on Lettuce varieties. Environmental Pollution 10(3): 163-173.
127. Joshi, B.H. (2014): Evaluation and characterization of heavy metal resistant fungi for their prospects in bioremediation. Journal of Environmental Research and Development 8(4): 876-882.
128. Junior, C.A.L., Oliveira, S.R., Mazzafera, P., Arruda, M.A.Z. (2016): Expanding the information about the influence of cadmium on the metabolism

- of sunflowers: Evaluation of total, bioavailable, and bioaccessible content and metallobiomolecules in sunflower seeds. *Environmental and Experimental Botany* 125: 87-97.
129. Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001): Trace metals in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2nd edition.
130. Kanmani, P., Aravind, J., Preston, D. (2012): Remediation of chromium contaminants using bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology* 9: 183-193.
131. Karličić, V. (2017): Bakterije stimulatori rasta biljaka kao potencijal u ekoremedijaciji oštećenih zemljišta. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
132. Karuppanapandian, T., Sinha, P.B., Kamarul, H.A, Manoharan, K. (2009): Chromium induced accumulation of peroxide content, stimulation of antioxidative enzyme and lipid peroxidation in green gram (*Vigna radiata L*) leaves. *African Journal of Biotechnology* 8(3): 475- 479.
133. Karuppiah, P., Rajaram, S. (2011): Exploring the potential of chromium reducing *Bacillus sp.* and there plant growth promoting activities. *Journal of Microbiological Research* 1: 17-23.
134. 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* 152(3): 686-692.
135. Khanafari, S., Eshghdoost, A., Mashinchian, B. (2008): Removal of lead and chromium from aqueous solution by bacillus circulans biofilm. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering* 5(3): 195-200.
136. Khianggam, S., Pootaeng-on, Y., Techakriengkrai, T., Tanasupawat, S. (2014): Screening and identification of cellulose producing bacteria isolated from oil palm meal. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4: 90-96.
137. Komori, K., Wang, P.C., Toda, K., Ohtake, H. (1989): Factors affecting chromate reduction in *Enterobacter cloacae* strain HO1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31: 567-570.

138. Koopmans, G.F., Römkens, P.F., Fokkema, M.J., Song, J., Luo, Y.M., Japenga, J., Zhao, F.J. (2008): Feasibility of phytoextraction to remediate cadmium and zinc contaminated soils. *Environmental Pollution* 156: 905-914.
139. Kothari, V.V., Kothari, R.K., Kothari, C.R., Bhatt, V.D., Nathani, N.M., Koringa, P.G., Joshi, C.G., Vyas, B.R.M. (2013): Genomic sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain VK, isolated from saline desert area of Gujarat, India. *Genome A* 1: e00671-13.
140. Kubicek, S., O`Sullivan, R.J., August, E.M., hickey, E.R., Zhang, Q., Teodoro, M.L., Rea, S., Mechtler, K., Kowalski, J.A., Homon, C.A., Kelly, T.A., Jenuwein, T. (2007): Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the FG9a histone methyltransferase. *Molecular Cell* 25(3): 473-481.
141. Laporte, M.A., Sterckeman, T., Dauguet, S., Denaix, L., Nguyen, C. (2015): Variability in cadmium and zinc shoot concentration in 14 cultivars of sunflower (*Helianthus annuus L.*) as related to metal uptake and partitioning. *Environmental and Experimental Botany* 109: 45-53.
142. Lateef, A., Adelere, I.A., Gueguim-Kana, E.B. (2015a): *Bacillus safensis* LAU 13: a new novel source of keratinase and its multi-functional biocatalytic applications. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 29: 54-63.
143. Lateef, A., Adelere, I.A., Gueguim-Kana, E.B. (2015b): The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia* 70: 411-419.
144. Lee, K.K., Cho, H.S., Moon, Y.C., Ban, S.J., Kim, J.Y. (2013): Cadmium and lead uptake capacity of energy crops and distribution of metals within the plant structures. *KSCE Journal of Civil Engineering* 17: 44-50.
145. Leita, L., Margon, A., Sinicco, T., Mondini, C. (2011): Glucose promotes the reduction of hexavalent chromium in soil. *Geoderma* 164(3-4), 122-127.
146. Lenart, A., Wolny-Koladka, K. (2013): The effect of heavy metal concentration and soil pH on the abundance of selected microbial groups within ArcelorMittal Poland steelworks in Crakow. *Bulletin of Environmental Contamination and toxicology* 90(1): 85-90.
147. Lenart-Boron, A., Boron, P. (2014): The effect of industrial heavy metal pollution on microbial abundance and diversity in soils - a review. In:

- Hernandez-Soriano, M.C. (Ed.), Environmental risk assessment of soil contamination. Intech open science, pp. 759-784.
148. Li, Z., Xu, J., Tang, C., Wu, J., Muhammad, A., Wang, H. (2006): Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu, Zn, and Cd contaminated paddy soils. *Chemosphere* 62: 1374-1380.
149. Liu, Y.G., Xu, W.H., Zeng G.M., Li, X., Gao, H. (2006): Cr(VI) reduction by *Bacillus* sp. isolated from chromium landfill. *Process Biochemistry* 41: 1981-1986.
150. Lopes, C.A. Junior, Barbosa, H.D.S., Galazzi, R.M., Koolen F.H.H., Gozzo, F.C., Arruda, M.A.Z. (2015): Evaluation of proteome alterations induced by cadmium stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*) cultures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119: 170-177.
151. Lovley, D.R. (1994): Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. *Advances in Agronomy* 54: 175-231.
152. Mabbett, A.N., Macaskie, L.E. (2001): A novel isolate of *Desulfovibrio* sp. with enhanced ability to reduce Cr (VI). *Biotechnological Letters* 23: 683-687.
153. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2003): Brock biology of microorganisms 10th Ed. Upper Sadle River, USA. Pearson Education, Inc.
154. Mahimairaja, S., Shenbagavalli, S. (2010): Remediation of chromium contaminated soils: Potential for phyto and bioremediation. Proceedings of 19th world congress of soil science, soil solutions for a changing world. Brisbane, Australia, pp. 212–214.
155. Maiti, S.K., Karmakar, N.C., Sinha, I.N. (2002): Studies on some physical parameters aiding biological reclamation of mine spoil dump a case study from Jharia coalfield. *IME Journal* 41(6): 20-23.
156. Malik, A. (2004): Metal bioremediation through growing cells. *Environmental International* 30: 261-278.
157. Mandić, L., Djukić ,D., Stevović, V. (2005): The number of microorganisms in the soil under different grassleguminous mixtures. *Biotechnology in Animal Husbandry* 21(5-6): 175-179.

158. Maqbool, Z., Asghar, H.N., Shahzad, T., Hussain, S., Riaz, M., Ali, S., Arif, M.S., Maqsood, M. (2014): Isolating, screening and applying chromium reducing bacteria to promote growth and yield of okra (*Hibiscus esculentus* L.) in chromium contaminated soils *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114: 343-349.
159. Mathe, I., Benedek, T., Tancsics, A., Palatinszky, M., Lanyi, S., Marialigeti, K. (2012): Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania). *International Biodeterioration and Biodegradation* 73: 41-49.
160. Mazierski, J. (1994): Effect of chromium (Cr^{+6}) on the growth rate of denitrifying bacteria. *Water Research* 28: 1981-1985.
161. McLean, J., Beveridge, T. J. (2001): Chromate reduction by a *Pseudomonad* isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1076-1084.
162. Meers, E., Van Slycken, S., Adriaensen, K., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Du Laing, G., Witters, N., Thewys, T., Tack, F.M.G. (2010): The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for “phytoattenuation” of heavy metals on moderately contaminated soils: A field experiment. *Chemosphere* 78: 35-41.
163. Megharaja, M., Avudainayagam, S., Naidu, R. (2003): Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Current Microbiology* 47: 51-54. ^[11]_[SEP]
164. Mei, B., Jeffrey D., Puryear, J.D., Newton, R.J. ^[11]_[SEP] (2002): Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species. *Plant and Soil* 247: 223-231.
165. Mellem, J.J., Baijnath, H., Odhav, B. (2012): Bioaccumulation of Cr, Hg, As, Pb, Cu and Ni with the ability for hyperaccumulation by *Amaranthus dubius*. *African Journal of Agricultural Research* 7(4): 591-596.
166. Mertz, W. (1993): Chromium in human nutrition: a review. *Journal of Nutrition* 123 (4): 626-633.
167. Mgbemena, C.I., Nnokwe, J.C., Adjero L.A., Onyemekara N.N. (2012): Resistance of bacteria isolated from Otamiri River to heavy metals and some

- selected antibiotics. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4: 551-556.
168. Michel, C., Brugna, M., Aubert, C., Bernadac, A., Bruschi, M. (2001): Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 95-100.
169. Miletić, Z., Radulović, Z. (2005): Biogenost organske prostirke različitih šumskih kultura na deposolima REIK "Kolubara", *Šumarstvo* 4: 11-20.
170. Mills, D.K., Fitzgerald, K., Litchfield, C.D., Gillevet, P.M. (2003): A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *Journal of Microbiology Methods* 54: 57-74.
171. Mishra, V., Samantaray, D.P., Dash, S.K., Mishra, B.B., Swain, R.K. (2010): Study on hexavalent chromium reduction by chromium resistant bacterial isolates of Sukinda mining area. *Our Nature* 8: 63-71.
172. Mistry, K., Desai, C., Patel Ashok, K. (2010): Chromate reduction by *Vogococcus* sp. isolated from Cr (VI) contaminated industrial effluent. *Electronic Journal of Biology* 6(1): 6-12.
173. Mohanty, M., Patra, H.K. (2016): Tolerance potential and physiological responses of *Helianthus annuus* L. exposed to varying doses of hexavalent chromium. *Journal of Materials and Environmental Science* 7(6): 2221-2228.
174. Molla, K., Dimirkou, A., Antoniadis, V. (2012): Hexavalent Chromium Dynamics and Uptake in Manure-Added Soil. *Water, Air and Soil Pollution* 223: 6059-6067.
175. Monserie, M.F., Watteau, F., Villemin, G., Ouvrard, S., Morel, J.L. (2009): Technosol genesis: identification of organo-mineral associations in a young Technosol derived from coking plant waste materials. *Journal of Soils Sediments* 9: 537-546.
176. Morel, M.A., Ubalde, M.C., Brana, V., Castro-Sowinski, S. (2011): *Delftia* sp. JD2: A potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity. *Archives of Microbiology* 193: 63-68.

177. Mosa, K.A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., Dhankher, O.P. (2016): Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-14.
178. Motesharezadeh, B., Savaghebi-Firoozabadi, G.R. (2011): Study of the increase in phytoremediation efficiency in a nickel polluted soil by the usage of native bacteria: *Bacillus safensis* FO.036b and *Micrococcus roseus* M2. *Caspian Journal of Environmental Sciences* 9: 133-143.
179. Mullins, G. (2009): Phosphorus, agriculture and the environment. Publication 424-029. Communications and marketing, College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University.
180. Muneer, B., Rehman, A., Shakoori, F.R., Shakoori, A.R. (2009): Evaluation of consortia of microorganisms for efficient removal of hexavalent chromium from industrial wastewater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 597-600.
181. Munoz, A.J, Ruiz, E., Abriouel, H., Gálvez, A., Ezzouhri, L., Lairini, K., Espínola, L. (2012): Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewater: Identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chemical Engineering Journal* 210: 325-332.
182. Narayani, M., Shetty, K.V. (2012): Chromium-resistant bacteria and their environmental condition for hexavalent chromium removal: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43(9): 955-1009.
183. Narayani, M., Shetty, K.V. (2013): Chromium-resistant bacteria and their environmental condition for hexavalent chromium removal: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43: 955-1009.
184. Nath A., Ghosh, S., Chowdhury, R., Bhattacharjee, C. (2012): Can whey-based *Bacillus safensis* JUCHE 1 become a food supplement? Growth kinetics, probiotic activity, sensitivity to natural and synthetic antibiotics and synergy with prebiotics and natural antioxidants. *Proceedings of ICRASE 2012*, Hyderabad, AndhraPradesh, India, pp. 51-55.
185. Nazeema, M., Nirmala, T. (2017): Isolation and characterization of chromium tolerant bacteria from tannery effluent at Dindigul district, Tamilnadu, India. *LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences* 3(1): 35-48.

186. Nehnevajova, E., Lyubenova, L., Herzig, R., Schroeder, P., Schwitzguebel, J.P., Schmulling, T. (2012): Metal accumulation and response of antioxidant enzymes in seedlings and adult sunflower mutants with improved metal removal traits on a metal-contaminated soil. *Environmental and Experimental Botany* 76: 39-48.
187. Nies, D.H. (1992): Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid* 27: 17-28.
188. Nies, D.H. (1999): Microbial heavy metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 730-750.
189. Nies, D.H., Silver, S. (1995): Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology* 14: 186-199.
190. Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., Thonart, P. (2011): Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 15(2): 327-337.
191. Niu, Z.X., Sun, L.N., Sun, T.H., Li, Y.S., Wang, H. (2007): Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Sciences* 19: 961-967.
192. Obolskiy, D., Pischel, I., Feistel, B., Glotov, N., Heinrich, M. (2011): *Artemisia dracunculus* L. (Tarragon): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 11367-11384.
193. Odokuma, L.O., Abah, A.E. (2003): Heavy metal biosorption by three bacteria isolated from a tropical river. *Global Journal of Environmental Science* 2(2): 98-101.
194. Ojoawo, S.O., Lateef, A., Oyeniran, F.A., Kupoluyi, O.T., Opatola, O.S., Daramola, J.O. (2017): Bioaccumulation of heavy metals in steel processing industrial effluents using *Bacillus safensis* LAU 13. *Journal of Environment and Biotechnology Research* 6(1): 58-63.
195. Ojuederie, O., Babalola, O. (2017): Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14(12), E1504.

196. Okeke, B.C. (2008): Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(12): 1571-1579.
197. Oladipo, O.G., Awotoye, O.O., Olayinka, A., Bezuidenhout, C.C., Maboeta, M.S. (2018): Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Brazilian Journal of Microbiology* 49: 29-37.
198. Oliveira, A., Pampulha, M.E. (2006): Effects of longterm heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(3): 157-161.
199. Oves, M., Khan, M.S., Zaidi, A. (2013): Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20: 121-129.
200. Padurariu, C., Burducea, M., Zamfirache, M.M., Gales, R., Ivanescu, L., Toma, C. (2010): Research regarding the germination process in *Ocimum basilicum* L. in an experimental environment. *Studia Universitatis "Vasile Goldiș", Seria Științele Vieții* 20(3): 55-57.
201. Paknikar, K.M., Bhide, J.V. (1993): Aerobic reduction and bio-sorption of chromium by a chromate resistant *Aspergillus* sp. In: Torma, A.E., Apel, M.L., Brierley, C.L. (Eds.), *Biohydrometallurgical technologies. The minerals, metals and materials society*. Warrendale, PA, pp. 237-244.
202. Pal, A., Datta, S., Paul, A.K. (2004): Hexavalent chromium reduction by immobilized cells of *Bacillus sphaericus* AND 303. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56(3): 505-512.
203. Pallag, A., Pașca, B., Gîtea, D., Bungău, S., Tit, D.M. (2014): The influence of some microelements on germination and chlorophyll quantity in *Ocimum basilicum* L. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului* 23: 873-880.
204. Panswad, T., Doungchai, A., Anotai, J. (2003): Temperature effect on the microbial community of enhanced biological phosphorus removal system. *Water Research* 37: 409-415.

205. Patra, R.C., Malik, B., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. (2010): Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1857-1863.
206. Pattanapitpaisal, P., Brown, N. L., Macaskie, L.E. (2001): Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr (VI) contaminated site. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(1–2): 257-261.
207. Pavlin, S., Neveda, L., Ilić, D. (2010): Studija sanacije bivše fabrike Rog. Nacrt upravljanja građevinskim otpadom, E-Net Okolje d.o.o. i Ekologija d.o.o.
208. Pečiulytė, D., Dirginčiutė-Volodkienė, V. (2009): Effect of long-term industrial pollution on microorganisms in soil of deciduous forests situated along a pollution gradient next to a fertilizer factory 2. Abundance and diversity of soil fungi. *Ekologija* 55(2): 133-141.
209. Peper, I.L., Gerba, C.P., Brendencke, J.W. (1995): *Environmental microbiology*. Acad. Press, San Diego, 11-33.
210. Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J. (2009): The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41: 1665-1677.
211. Perez-de-Mora, A., Burgos, P., Madejón, E., Cabrera, F., Jaeckel, P., Schloter, M. (2006): Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 327-341.
212. Pesti, M., Gazdag, Z., Belagyi, J., (2000): *In vivo* interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane as revealed by EPR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters* 182: 375-380.
213. Philip, L., Iyengar, L., Venkobachar, C. (1998): Cr(VI) reduction by *Bacillus coagulans* isolated from contaminated soils. *Journal of environmental engineering* 124(12): 1165-1170.

214. Pillichshammer, M., Pumpel, T., Poder, R., Eller, K., Klima, J., Schinner, F. (1995): Biosorption of chromium to fungi. *BioMetals* 8: 117-121.
215. Pires, D. (2010): Bacteria in heavy metal contaminated soil: diversity, tolerance and use in remediation systems. PhD thesis. Cranfield University, pp. 1-229.
216. Prasuna Rani, P., Pillai, R.N., Bhanu Prasad, V., Subbaiah, G.V. (1992): Nutrient status of some red and associated soils of Nellore district under Somasila Project in Andhra Pradesh. *The Andhra Journal* 39: 1-5.
217. Priyalaxmi, R., Murugan, A., Raja, P., Raj, K.D. (2014): Bioremediation of cadmium by *Bacillus safensis* (JX126862), a marine bacterium isolated from mangrove sediments. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(12): 326-335.
218. Purakayastha, T.J., Thulasi, V., Bhadraray, S., Chhonkar, P.K., Adhikari, P.P., Suribabu, K. (2008): Phytoextraction of zinc, copper, nickel and lead from a contaminated soil by different species of *Brassica*. *International Journal of Phytoremediation* 10: 61-72.
219. Puzon, G.J., Petersen, J.N., Roberts, A.G., Kramer, D.M., Xun, L. (2002): A bacterial flavin reductase system reduces chromates (III)–NAD complex. *Biochemical and Biophysical Research* 294(1): 76-81.
220. Radić D. (2017): Biodiverzitet kvasaca u zemljištu i njihov značaj u održivoj poljoprivredi. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
221. Radić D., Pavlović V., Jovičić-Petrović J., Karličić V., Lalević B., Raičević V. (2017): Copper-tolerant yeasts: Raman spectroscopy in determination of bioaccumulation mechanism. *Environmental Science and Pollution Research* 24(27): 21885-21893.
222. Rahman, A., Nahar, N., Nawani, N., Jass, J., Hossain, K., Saud, Z.A., Saha, A.K., Ghosh, S., Olsson, B., Mandal, A. (2015): Bioremediation of hexavalent chromium (VI) by a soil borne bacterium, *Enterobacter cloacae* B2- DHA. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 50(11): 1136-1147.
223. Rai, A.K., Paul, B., Singh, G. (2011): A study on physico-chemical properties of over- burden dump materials from selected coal mining areas of Jharia

- coalfields, Jharkhand, India. *International Journal of Environmental Sciences* 1(6): 1350-1360.
224. Raičević, V., Golić, Z., Lalević, B., Jovanović, L., Kiković, D., Antić, S. (2010): Isolation of chromium resistant bacteria from a former bauxite mine area and their capacity for Cr (VI) reduction, *African Journal of Biotechnology* 9(40): 6727-6732.
225. Raja, C.E., Omine, K. (2012): Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil. *African Journal of Biotechnology* 11: 2267-2275.
226. Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V., Freitas, H. (2010): Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* 28: 142-149.
227. Rajkumar, M., Nagendran, R., Lee, K.J. Lee, W.H. (2005): Characterization of a novel Cr⁺⁶ reducing *Pseudomonas sp.* with plant growth-promoting potential. *Current Microbiology* 50: 266-271.
228. Ramasamy, K., Kamaludeen and Banu, S. P. (2007): Bioremediation of metals: microbial processes and techniques, In: Singh. S.N., Tripathi, R.D. (Eds.), *Environmental bioremediation technologies*. Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 173-187.
229. Ramirez-Ramirez, R., Calvo-Mendez, C., Avila-Rodriguez, M., Gutierrez-Corona, J. F. (2000): Chromate resistance and reduction in a yeast strain isolated from industrial waste discharges. In: Raynal, J.A., Nuckols, J.R., Reyes, R., Ward M., (Eds.), *Environmental engineering and health sciences*, Section 4: Environmental engineering application. Water Resources Publication, LCC, Englewood, CO, USA, pp. 437-445.
230. Rapoport, A.I., Muter, O.A. (1995): Biosorption of hexavalent chromium by yeast. *Process Biochemistry* 30: 145-149.
231. Rathnayake, V.N., Megharaj, M., Bolan, N., Naidu, R. (2009): Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences* 3(5): 270-274.

232. Renella, G., Mench., M., Gelsomino, A., Landi, L., Nannipieri, P. (2005): Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1498-1506.
233. Rizwan, M., Ali, S., Rizvi, H., Rinklebe, J., Tsang, D.C.W., Meers, E., Ok, Y.S., Ishaque, W. (2016): Phytomanagement of heavy metals in contaminated soils using sunflower: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 46: 1498-1528.
234. Romanenko, V.I., Korenkov, V.N. (1977): A pure culture of bacterial cells assimilating chromates and bichromates as hydrogen acceptors when grown under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya* 46: 414-417.
235. Saber, N.E., Abdel-Moneim, A.M., Barakat, S.Y. (1999): Role of organic acids in sunflower tolerance to heavy metals. *Biologia Plantarum* 42: 65-73.
236. Sakthivel, M., Ayyasamy, P.M., Hemalatha, N. (2016): Biotransformation of chromium (Cr-VI to Cr III) from tannery effluent using bacteria and fungi. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 3(11): 68-79.
237. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. (2004): Introduction to food-acid airborne fungi. Seventh edition. CBS, Utrecht, The Netherlands.
238. Sanjay, M.S., Sudarsanam, D., Raj, G.A., Baskar, K. (2018): Isolation and identification of chromium reducing bacteria from tannery effluent. Author links open overlay panel. *Journal of King Saud University Science*, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.001>
239. Sarangi, A., Krishnan, C. (2008): Comparison of *in vitro* Cr(VI) reduction by CFEs of chromate resistant bacteria isolated from chromate contaminated soil. *Bioresource Technology* 99: 4130-4137.
240. Scott, J.A., Palmer, S.J. (1990): Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33: 221-225.
241. Sekhon, G.S. (1999): Potassium in indian soils and crops. *PINSA* B65(3-4): 83-108.
242. Sekulić, P., Kastor, R., Hadžić, V. (2003): Zaštita zemljišta od degradacije. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad: 160-162.

243. Sen, M., Ghosh, D.M. (2010): Chromium removal using various biosorbents. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering* 7(3): 182-190.
244. Seneviratne, M., Rajakaruna, N., Rizwan, M., Madawala, H.M.S.P., Ok, Y.S., Vithanage, M. (2017): Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. *Environmental Geochemistry and Health* 12: 1-19.
245. Seong, C.N., Choi, J.H., Baik, K.S. (2001): An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. *The Journal of Microbiology* 39(1): 17-23.
246. Shafique, M., Jawaid, A., Rehman, Z. (2016): As(V) reduction, As(III) oxidation, and Cr(VI) reduction by multi-metal-resistant *Bacillus subtilis*, *Bacillus safensis*, and *Bacillus cereus* species isolated from wastewater treatment plant. *Geomicrobiology Journal* 34: 687-694.
247. Shaheen, S.M., Rinklebe, J. (2015): Phytoextraction of potentially toxic elements by Indian mustard, rapeseed, and sunflower from a contaminated riparian soil. *Environmental Geochemistry and Health* 37, 953-967.
248. Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005): Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31: 739-753.
249. Sharma, K. (2002): Microbial Cr(VI) reduction: role of electron donors, acceptors and mechanisms, with special emphasis on *Clostridium spp.* PhD thesis. University of Florida.
250. Sharma, S., Adholeya, A. (2012): Hexavalent chromium reduction in tannery effluent by bacterial species isolated from tannery effluent contaminated soil. *Journal of Environmental Science and Technology* 5(3): 142-154.
251. Shenbagavali, S., Mahimairaja, S. (2012): Biotransformation and bioavailability of chromium contaminated soil and the effect of poultry manure and *Pseudomonas*. *International Journal of plant, animal and environmental sciences* 2(1): 190-196.
252. Shi, W., Becker, J., Bischoff, M., Turco, R.F., Konopka, A.E. (2002): Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3859-3866.

253. Shriram, P., Nikita, D., Prashant, K., Anju, K. (2014): Isolation and molecular characterization of chromium resistant fungi having competence to degrade anthracene from industrial effluent of South Gujarat. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 8(1): 30-37.
254. Silva, M.G.V., Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Machado, M.I.L., Alencar, J.W. (1999): Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia* 70: 32-34.
255. Simon, J.E., Quinn, J., Murray, R. (1999): Basil, A source of essential oils. In: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), *Advanced in new crops*. Timber Press, Portland, OR, pp. 484-489.
256. Singh, R.P., Agrawal, M. (2007): Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. *Chemosphere* 67: 2229-2240.
257. Singh, S., Saxena, R., Pandey, K., Bhatt, K., Sinha, S. (2004): Response of antioxidants in metal accumulation potential. *Chemosphere* 57: 1663-1673.
258. Smith, W.L., Gadd, G.M. (2000): Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 88(6): 983-991.
259. Snow, E.T., Xu, L.S. (1991): Chromium (III) bound to DNA templates promotes increased polymerase processivity and decreased fidelity during replication *in vitro*. *Biochemistry* 30(47): 11238-11245.
260. Sobolev, D., Begonia, M.F.T. (2008): Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 5(5): 450-456.
261. Soil Survey Division Staff (1993): *Soil survey manual*. Chapter 3, selected chemical properties. Oil, Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 18.
262. Soni, S. K., Singh, R., Awasthi, A., Singh, M., Kalra, A. (2013): *In vitro* Cr(VI) reduction by cell-free extracts of chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil. *Environmental Science and Pollution Research* 20(3): 1661-1674.

263. Soni, S.K., Singh, M., Awasthi, A., Wasnik, K., Singh, R., Kalra, A. (2014b): Pretreatment of Cr(VI)-amended soil with chromate-reducing rhizobacteria decreases plant toxicity and increases the yield of *Pisum sativum*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 66: 616-627.
264. Soni, S.K., Singh, R., Awasthi, A., Kalra, A. (2014a): A Cr(VI)-reducing *Microbacterium* sp. strain SUCR140 enhances growth and yield of *Zea mays* in Cr(VI) amended soil through reduced chromium toxicity and improves colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. Environmental Science and Pollution Research 21: 1971-1979.
265. Srinath, T., Khare, S., Ramteke, P.W. (2001): Isolation of hexavalent chromium-reducing facultative anaerobes from tannery effluent. The Journal of General and Applied Microbiology 47: 307-312.
266. Stearns, D.M. (2000): Is chromium a trace essential metal? BioFactors 11(3): 149-162.
267. Sultan, S., Hasnain, S. (2007): Reduction of toxic hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* strain SDCr-5 stimulated by heavy metals. Bioresource Technology 98: 340-344.
268. Sundar, K., Vidya, R., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2010): High chromium tolerant bacterial strains from Palar River basin: impact of tannery pollution. Research Journal of Environmental Earth Science 2: 112-117.
269. Szczodrowska, A., Kulbat, K., Smolińska, B., Leszczyńska, J. (2016): Accumulation of metal ions in selected plants from *Brassicaceae* and *Lamiaceae* families. Biotechnology and Food Sciences 80(1): 29-42.
270. Tak, H.I., Ahmad, F., Babalola, O.O. (2013): Advances in the application of plant growth-promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 223: 33-52.
271. Tang, J., Xu, J., Wu, Y., Li, Y., Tang Q. (2012): Effects of high concentration of chromium stress on physiological and biochemical characters and accumulation of chromium in tea plant (*Camellia sinensis* L.). African Journal of Biotechnology 11(9): 2248-2255.

272. Tanu, F.Z., Hakim, A., Hoque, S. (2016): Bacterial tolerance and reduction of chromium (VI) by *Bacillus cereus* isolate PGBw4. *American Journal of Environmental Protection* 5(2): 35-38.
273. Tauqeer, H.M., Ali, S., Rizwan, M., Ali, Q., Saeed, R., Iftikhar, U., Ahmad, R., Farid, M., Hassan, G. (2016): Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: Growth and physiological response. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126: 138-146.
274. Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., Madamwar, D. (2006): Hexavalent chromium reduction by *Providencia sp.* *Process Biochemistry* 41: 1332-1337.
275. Tisdale, S.L., Nelson, W.L., Beaton, J.D. (1985): *Soil fertility and fertilizers* (4th edition), Macmillan.
276. Torsvik, V., Ovreas, L. (2002): Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 240-245.
277. Towill, L.E., Shriner, C.R., Drury, J.S. (1978): *Reviews of the environmental effects of pollutants. III Chromium.* National Academy Press, Cincinnati, OH.
278. Tripathi, A., Tripathi, D.K., Chauhan, D.K., Kumar, N. (2016): Chromium (VI)-induced phytotoxicity in river catchment agriculture: evidence from physiological, biochemical and anatomical alterations in *Cucumis sativus* (L.) used as model species. *Chemistry and Ecology* 32: 12-33.
279. Tripathi, D.K., Singh, V.P., Prasad, S.M., Chauhan, D.K., Kishore, D.N., Rai, A.K. (2015): Silicon-mediated alleviation of Cr(VI) toxicity in wheat seedlings as evidenced by chlorophyll fluorescence, laser induced breakdown spectroscopy and anatomical changes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 133-144.
280. Trivedi, P., Pandey, A., Sa, T. (2007): Chromate reducing and plant growth promoting activities of psychrotrophic *Rhodococcus erythropolis* MTCC 7905. *Journal of Basic Microbiology* 47: 513-517.
281. Turpeinen, R., Kairesalo, T., Haegglom, M.M. (2004): Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper- contaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 39-50.
282. Tyler, G. (1974): Heavy metal pollution and soil enzymatic activity. *Plant and Soil* 41: 303-311.

283. Upadhyay, N., Verma, S., Singh, A.P., Devi, S., Vishwakarma, K., Kumar, K. (2016): Soil ecophysiological and microbiological indices of soil health: a study of coal mining site in Sonbhadra, Uttar Pradesh. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 6: 778-800.
284. Upadhyay, N., Vishwakarma, K., Singh, J., Mishra M., Kumar, V., Rani, R., Mishra, R., Chauhan, D., Tripathi, D., Sharma, S. (2017): Tolerance and reduction of chromium(VI) by *Bacillus* sp. MNU16 isolated from contaminated coal mining soil. *Frontiers in Plant Science* 8: 778.
285. Ur Rahman, M., Gul, S., Ul Haq, M.Z. (2007): Reduction of chromium(VI) by locally isolated *Pseudomonas* sp. C-171. *Turkish Journal of Biology* 31: 161-166.
286. USEPA 3051A (2007): Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, and oils. U.S. Government Print Office, Washington, DC.
287. Vajpayee, P., Sharma, S.C., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Yunus, M. (1999): Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* gaertn. *Chemosphere* 39: 2159-2169.
288. Van Assche, F., Clijsters, H. (1983): Multiple effects of heavy metals on photosynthesis. In: Marcelle, R., Clijsters, H., van Poucke, H. (Eds.), *Effects of stress on photosynthesis*. Springer Netherlands, pp. 371-382.
289. Van Hullebusch, E.D., Utomo, S., Zandvoort, M.H., Lens, P.N.L. (2005): Comparison of three sequential extraction procedures to describe metal fractionation in anaerobic granular sludges. *Talanta* 65: 549-558.
290. Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D. (2003): Phosphorus acquisition and use: critical adaptation by plants for securing non-renewable resources. *New Phytologist* 15: 423-447.
291. Viera, M., Curutchet, G., Donati, E. (2007): A combined bacterial process for the reduction and immobilization of chromium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52: 31-34.
292. Vincent, J.B. (2000): The biochemistry of chromium. *Journal of Nutrition* 130(4): 715-718.

293. Vincent, J.B. (2010): Chromium: celebrating 50 years as an essential element? Dalton Transactions, Cambridge.
294. Vincent, J.B. (2013): Chromium: Is It Essential, Pharmacologically Relevant, or Toxic? In: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. (Eds.), Interrelations between essential metal ions and human diseases. Metal ions in life sciences. Chapter 6. Springer, pp. 171-198.
295. Vitezova, M. (2013): Characterisation of actinomycetes community from the heavy metalpolluted soil, Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis 61(5): 1471-1478.
296. Viti, C., Pace, A., Giovannetti, L. (2003): Characterization of Cr(VI) resistant bacteria isolated from chromium contaminated soil by tannery activity. Current Microbiology 46: 1-5.
297. Volesky, B., Holan, Z.R. (1995): Biosorption of heavy metals. Biotechnology Progress 11: 235-250.
298. Vukadinović, V., Vukadinović, V. (2011): Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet, Osijek
299. Wales, D.S., Sagar, B.F. (1990): Recovery of metal ions by microfungus filters. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 49: 345-355.
300. Wang, Y.T. (2000): Microbial reduction of chromate. In: Lovley, D.R. (Ed.), Environmental microbe-metal interactions. American Society for Microbiology Press, Washington DC. [L]
[SEP]
301. Wang, Y.T., Shen, H. (1995): Bacterial reduction of hexavalent chromium. Journal of Industrial Microbiology 14: 159-163.
302. Wang, Y.T., Xiao, C.S. (1995): Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria. Water Research 29: 2467-2474.
303. Wani, P.A., Khan, M.S. (2010): Bacillus species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. Food Chemistry and Toxicology 48: 3262-3267.
304. Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A. (2007b): Chromium reduction, plant growth-promoting potentials, and metal solubilization by *Bacillus* sp. isolated from alluvial soil. Current Microbiology 54(3): 237-243.

305. Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A. (2008): Chromium-reducing and plant growth-promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium-amended soil. *Biotechnology Letters* 30: 159-163.
306. Wani, P.A., Wahid, S., Singh, R., Kehinde, A.M. (2018): Antioxidant and chromium reductase assisted chromium (VI) reduction and Cr (III) immobilization by the rhizospheric *Bacillus* helps in the remediation of Cr (VI) and growth promotion of soybean crop. *Rhizosphere* 6: 23-30.
307. Wani, R., Kodam, K.M., Gawai, K.R., Dhakephalkar, P.K. (2007a): Chromate reduction by *Burkholderia cepacia* MCMB-821, isolated from the pristine habitat of alkaline crater lake. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 627-632.
308. West, M.A.G. (2015): Investigating the seed germination and phytoremediation potential of New Zealand native plants in metal contaminated soils. Master thesis. University of Canterbury, New Zealand.
309. Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 6578-6583.
310. Wielinga, B., Mizuba, M.M., Hansel, C.M., Fendorf, S. (2001): Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Environmental Science and Technology* 35: 522-527.
311. Wise, S.S., Elmore, L.W., Holt, S.E., Little, J.E., Antonucci, P.G., Bryant, B.H., Pierce, W.S.J. (2004): Telomerase mediated lifespan extension of human bronchial cells does not affect hexavalent chromium induced cytotoxicity or genotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry* 255(1-2): 103-112.
312. Wuana, R.A., Okieimen, F.E. (2011): Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* 2011: article ID 402647.
313. Xiao, W., Ye, X., Yang, X., Zhu, Z., Sun, C., Zhang, Q., Xiao, P.X. (2017): Isolation and characterization of chromium(VI)-reducing *Bacillus* sp. FY1 and *Arthrobacter* sp. WZ2 and their bioremediation potential. *Bioremediation Journal* 21(2): 100-108.

314. Xu, X.R., Li, H.B., Gu, J.D., Li, X.Y. (2005): Kinetics of the reduction of chromium (VI) by vitamin C. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1310-1314.
315. Zaheer, I.E., Ali, S., Muhammad, R., Farid, M., Shakoor, M.B., Gill, R.A., Najeeb, U., Iqbal, N., Ahmad, R. (2015): Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120: 310-317.
316. Zakaria, Z.A., Zakaria, Z., Surif, S., Ahmad, W.A. (2007): Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy-metal contaminated wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 146: 30-38.
317. Zayed, A.M., Terry, N. (2003): Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant Soil* 249: 139-156.
318. Zhang, M.K., Liu, Z.Y., Wang, H. (2010): Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 41(7): 820-831.
319. Zhao, Q., Kaluarachchi, J.J. (2002): Risk assessment at hazardous waste-contaminated sites with variability of population characteristics. *Environment International* 28(1-2): 41-53.
320. Zhao, X., Joo, J.C., Kim, D., Lee, J.K., Kim, J.Y. (2016): Estimation of the seedling vigor index of sunflowers treated with various heavy metals. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* 7: 353.
321. Zhou, J., Xia, B., Treves, D.S., Wu, L.Y., Marsh, T.L., O'Neill, R.V., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M. (2002): Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 326-334.

BIOGRAFIJA

Dora Ilić je rođena u 24.12.1974. godine u Zrenjaninu. Osnovnu školu je završila u Melencima, a Gimnaziju “Koča Kolarov” u Zrenjaninu. Diplomirala je na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, na Departmanu za biologiju. Magistarske studije je završila na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Podgorici, R Crna Gora, na Odseku za biologiju, studijski program Ekologija i zaštita životne sredine. Godine 2010. upisala je doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu, studijski program Zemljište i melioracije, uža naučna oblast Ekološka mikrobiologija.

Trenutno živi i radi u Ljubljani, R Slovenija. Udata je i majka dvoje dece.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Dora S. Ilić

Broj indeksa: 10/42

IZJAVLJUJEM

da je doktorska disertacija pod naslovom: **HROM-REDUKUJUĆI MIKROORGANIZMI U BIOREMEDIJACIJI ZEMLJIŠTA ZAGAĐENOG TEŠKIM METALIMA**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Dora S. Ilić

Broj indeksa: 10/42

Studijski program: Zemljište i melioracije

Naslov doktorske disertacije: **HROM-REDUKUJUĆI MIKROORGANIZMI U
BIOREMEDIJACIJI ZEMLJIŠTA ZAGAĐENOG TEŠKIM METALIMA**

Mentor: prof. dr Blažo Lalević, vanredni profesor

Potpisana: Dora Ilić

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

HROM-REDUKUJUĆI MIKROORGANIZMI U BIOREMEDIJACIJI ZEMLJIŠTA
ZAGAĐENOG TEŠKIM METALIMA,

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima sam predala u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo** – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo** - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo** - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo** – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo** - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.