

УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ СА ПРИВРЕМЕНИМ  
СЕДИШТЕМ У КОСОВСКОЈ МИТРОВИЦИ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Ивана О. Матовић Пурић

**УПОРЕДНИ ПРЕГЛЕД МЕТАБОЛИЧКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА  
ГЉИВА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ ОТПАДНИХ ВОДА (ВРСТЕ  
РОДОВА *MUCOR*, *ASPERGILLUS*, *PENICILLIUM* И  
*TRICHODERMA*) У ДЕГРАДАЦИЈИ ДЕТЕРЏЕНТА**

Докторска дисертација

Косовска Митровица, 2023.

UNIVERSITY OF PRISTINA TEMPORARY SETTLED  
IN KOSOVSKA MITROVICA

FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS

Ivana O. Matović Purić

**COMPARATIVE STUDY ON THE METABOLIC POTENTIAL  
OF FUNGI ISOLATED FROM WASTEWATER (SPECIES OF  
THE GENERA *MUCOR*, *ASPERGILLUS*, *PENICILLIUM* AND  
*TRICHODERMA*) IN THE DEGRADATION OF DETERGENTS**

Doctoral Dissertation

Kosovska Mitrovica, 2023.

**Ментор:**

**др Татјана Михајилов-Крстев**

редовни професор Природно-математичког факулета, Универзитет у Нишу

**Чланови комисије:**

**Датум одбране:**

*Мојој мајци*

*Пренуци успона неизоставно се деле са онима који су заслужни за постављање темеља истих!*

*Захвалност на данима труда, стручних савета, сугестија и свеукупне несебичне подршке изражавам, пре свега ментору проф. др Патјани Михаилов Крстев, редовном професору ПМФ у Нишу!*

*Заслуге да докторска дисертација поседује резултате прегалачког рада имају стручњаци чије су смернице била моја водиља да теза достигне свој циљ!*

*Стога, благодарно истичем да су моје колеге, БИАИ моји учитељи чија је реч својеврсни печат овог рада.*

*Сходно наведеном захваљујем се:*

- проф. др Браниславу Ранковићу редовном професору ПМФ у Крагујевцу
- проф. др Драгану Ђорђевићу, редовном професору ПМФ у Нишу
- проф. др Владети Стевовићу, редовном професору Агрономског факултета у Чачку
- мр Драгану Ђуровићу, професору Агрономског факултета у Чачку
- проф. др Павлу Машковићу, редовном професору Агрономског факултета у Чачку
- др Мили Илић, вишем научном сараднику, Хемијског факултета у Београду
- др Мирјани Грујовић, научном сараднику Института за информационе технологије у Крагујевцу
- др Весни Шуманов, специјалисти хигијене, Завода за јавно здравље у Чачку
- др Данки Јовановић, специјалисти микробиологије, Завода за јавно здравље у Чачку
- др Јелени Видојевић, специјалисти токсиколошке хемије, Завода за јавно здравље у Чачку.

*Нарочиту благодарност упућујем др Патјани Вујовић научном саветнику Института за воћарство у Чачку, за сваку реч, која је имала своје упориште у науци и делом осведочену подршку.*

*Најзад реч захвалности упутила бих мојим момцима сину Михаилу и супругу Мирославу, чију подршку су осетили срце и ум јер су је непрекидно и безусловно даривали!*

*Мојој Милици, хвала на сагласју написаног са нормираним српским језиком!*

*Аутор*

**Упоредни преглед метаболичког потенцијала гљива изолованих из отпадних вода (врсте родова *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma*) у деградацији детерџента**

**Сажетак:** У пречишћавању отпадних вода значајно место заузима ремедијација помоћу микроорганизама, која се заснива на метаболичкој активности микроорганизама, који посредством својих ензима разрађују токсичне материје до угљен-диоксида и воде. Изучавања биохемијских својстава гљива, као потенцијалних пречистача животне средине, је од суштинског значаја за решавање постојећег проблема загађења водених екосистема детерџентима који се посебно истичу међу органским загађивачима. Стога је циљ ове докторске дисертације био одређивање метаболичког потенцијала микромицета, изолованих из канализационих и индустријских отпадних вода на мести њиховог уливања у реку Западну Мораву, у деградацији комерцијалног детерџента „Мерикс“. Из површинских вода у сливу Западне Мораве изоловане су и идентификоване следеће врсте гљива: *Mucor plumbeus* (изолована из индустријских отпадних вода), *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Penicillium funiculosum* (изоловане из канализационих отпадних вода) и *Trichoderma harzianum*. Испитан је утицај 0,3% комерцијалног детерџента „Мерикс“ на раст, развој, биохемијске карактеристике и продукцију биомасе изолованих микромицета. Способност продукције биомасе је у присуству детерџента утврђена код изолата *A. niger* и *P. canescens*, док су остали изолати показали значајно редуковану производњу биомасе. Редокс потенцијал је био најбољи код *T. harzianum*. Повећана продукција протеина и укупних органских киселина детектована је код *T. harzianum*, *P. canescens* и *A. niger*, док је повећање у продукцији слободних органских киселина забележено код *P. funiculosum* и *T. harzianum*. Повећање активности алкалне фосфатазе је утврђено код *P. canescens* и *P. funiculosum* и *M. plumbeus*, а алкалне инвертазе код *P. canescens*. На основу добијених резултата се може закључити да изолати *P. canescens*, *P. funiculosum* и нарочито *T. harzianum* показују потенцијал за употребу у третману отпадних вода.

**Кључне речи:** индустријске отпадне воде, канализационе отпадне воде, *Mucor plumbeus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma harzianum*, детерцент, биохемијске карактеристике гљива, продукција биомасе

**Научна област:** Биолошке науке

**Ужа научна област:** Микробиологија

**UDC број:**

**Comparative Review of the Metabolic Potential of Fungi Isolated from Wastewater  
(Species of the Genera *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma*) in the  
Degradation of Detergents**

**Abstract:** Remediation using microorganisms (bioremediation) plays an important role in wastewater treatment, which is based on the metabolic activity of microorganisms that use their enzymes to decompose toxic substances into carbon dioxide and water. Study of the biochemical properties of fungi, as potential environmental purifiers, is of essential importance for resolving the existing problems of water ecosystem pollution with detergents, which stand out among organic pollutants. Therefore, the goal of this doctoral dissertation was to determine the metabolic potential of micromycetes, isolated from sewage and industrial wastewater at the point of their inflow into the Zapadna Morava river, in the degradation of the commercial detergent "Meriks". The following fungi species were isolated and identified from surface waters in the Zapadna Morava basin: *Mucor plumbeus* (isolated from industrial wastewater), *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Penicillium funiculosum* (isolated from sewage wastewater) and *Trichoderma harzianum*. The influence of 0.3% commercial detergent 'Meriks' on the growth, development, biochemical characteristics and biomass production of isolated micromycetes was examined. The ability to produce biomass in the presence of detergent was determined in *A. niger* and *P. canescens*, while all other isolates showed significantly reduced biomass production. Redox potential was the highest in *T. harzianum*. Increased production of protein and total organic acids was detected in *T. harzianum*, *P. canescens* and *A. niger*, while an increase in the production of free organic acids was recorded in *P. funiculosum* and *T. harzianum*. An increase in the activity of alkaline phosphatase was determined in *P. canescens* and *P. funiculosum* and *M. plumbeus*, and alkaline invertase only in *P. canescens*. Based on the obtained results, it can be concluded that *P. canescens*, *P. funiculosum* and especially *T. harzianum* show potential for use in wastewater treatment.



**Keywords:** industrial wastewater, sewage wastewater, *Mucor plumbeus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Penicillium funiculosum* *Trichoderma harzianum*, detergents, biochemical characteristics of fungi, biomass production

**Scientific field:** Biological Sciences

**Nerrow scientific field:**

**UDC:**

## С А Д Р Ж А Ј

<b>1. УВОД</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ОПШТИ ДЕО</b> .....	<b>4</b>
2.1. ОТПАДНЕ ВОДЕ.....	4
2.1.1. <i>Комуналне отпадне воде</i> .....	7
2.1.2. <i>Индустријске отпадне воде</i> .....	8
2.1.3. <i>Пољопривредне отпадне воде</i> .....	10
2.2. ОСНОВНИ ПОКАЗАТЕЉИ ЗАГАЂЕНОСТИ ОТПАДНИХ ВОДА.....	13
2.2.1. <i>Физичко-хемијски показатељи загађености воде</i> .....	13
2.2.2. <i>Биолошки – микробиолошки показатељи загађености воде</i> .....	15
2.3. ДЕТЕРЦЕНТИ.....	17
2.3.1. <i>Хемијски састав детерџента</i> .....	18
2.3.2. <i>Остали састојци детерџента</i> .....	22
2.4. БИОРЕМЕДИЈАЦИЈА ДЕТЕРЦЕНТА.....	26
<b>3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	<b>29</b>
<b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	<b>30</b>
4.1. УЗОРКОВАЊЕ ВОДЕ.....	30
4.2. МЕРЕЊЕ ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКИХ И МИКРОБИОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА.....	30
4.2.1. <i>Мерење температуре воде – испитано стандардном методом SRPS H. Z1.106:1970</i> .....	30
4.2.2. <i>Мерење pH вредности воде – испитано стандардном методом ISO 10523:2008</i> .....	30
4.2.3. <i>Мерење концентрације раствореног кисеоника – испитано стандардном методом SRPS ISO 5814:1994</i> .....	31
4.2.4. <i>Мерење биохемијске потрошње кисеоника (после 5 дана) – БПК5, испитано стандардном методом AWWA 5210D</i> .....	31
4.2.5. <i>Мерење хемијске потрошње кисеоника ХПК – испитано стандардном методом SRPS ISO 6060:1994</i> .....	31
4.2.6. <i>Мерење укупног органског угљеника (ТОС) – испитано методом SRPS ISO 8245:2007</i> .....	32
4.2.7. <i>Мерење концентрације укупног азота – испитано методом SRPS EN 25663:2009</i> .....	32
4.2.8. <i>Мерење концентрације нитрата у води – испитано спектрофотометријски методом P-V-31/C:2018</i> .....	32
4.2.9. <i>Мерење концентрације нитрита у води – испитано спектрофотометријски према SRPS EN 26777:2009</i> .....	33
4.2.10. <i>Мерење концентрације укупног фосфора – испитано спектрометријски коришћењем методе са амонијумолибдатом (SRPS EN ISO 6878:2008)</i> .....	33
4.2.11. <i>Мерење концентрације хлорида - испитано методом SRPS ISO 9297/1:2007</i> .....	33
4.2.12. <i>Мерење концентрације сулфата – испитано методом SRPS H.C8.215:1989</i> .....	33

4.2.13. Мерење електропроводљивости – испитано методом SRPS EN 27888:2009.....	33
4.2.14. Мерење концентрације суспензованих материја - испитано методом P-IV-9 - гравиметријска метода.....	34
4.2.15. Број укупних колиформних бактерија и број фекалних колиформних бактерија ( <i>Escherichia coli</i> ) – испитано методом SRPS EN ISO 9308-2:2015 (IDEXX Colilert - 18/Quanti-Tray/2000).....	34
4.2.16. Број фекалних ентерокока – испитано методом IDEXX Enterolert-E/Quanti-Tray/2000.....	35
4.3. ИЗОЛОВАЊЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЈА ГЉИВА ИЗ ОТПАДНИХ ВОДА ЗАПАДНЕ МОРАВЕ.....	35
4.4. ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ДЕТРЕЦЕНТА НА РАСТ, РАЗВОЈ, БИОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ И ПРОДУКЦИЈУ БИОМАСЕ ИЗОЛОВАНИХ ГЉИВА.....	36
4.4.1. Одређивање биомасе гљива.....	37
4.4.2. Одређивање рН вредности и редокс потенцијала.....	37
4.4.3. Одређивање садржаја протеина.....	38
4.4.4. Одређивање концентрација слободних и укупних органских киселина.....	39
4.4.5. Одређивање ензимске активности алкалне фосфатазе.....	40
4.4.6. Одређивање ензимске активности алкалне инвертазе.....	41
4.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	41
<b>5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>42</b>
5.1. РЕЗУЛТАТИ МЕРЕЊА ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКИХ И МИКРОБИОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА ПОВРШИНСКЕ ВОДЕ ЗАПАДНЕ МОРАВЕ НА ТРИ РАЗЛИЧИТА ЛОКАЛИТЕТА.....	42
5.2. РЕЗУЛТАТИ ИДЕНТИФИКАЦИЈЕ ИЗОЛОВАНИХ ВРСТА ГЉИВА ИЗ ИСПИТИВАНИХ УЗОРКА.....	50
5.3. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА УТИЦАЈА ДЕТРЕЦЕНТА НА ПРОДУКЦИЈУ БИОМАСЕ ИЗОЛОВАНИХ ГЉИВА.....	58
5.4. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА УТИЦАЈА ДЕТРЕЦЕНТА НА БИОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЉИВА.....	62
5.4.1. РН вредност.....	62
5.4.2. Редокс-потенцијал.....	67
5.4.3. Концентрација протеина.....	73
5.4.4. Концентрација слободних и укупних органских киселина.....	77
5.4.5. Ензимска активност алкалне фосфатазе.....	86
5.4.6. Ензимска активност алкалне инвертазе.....	90
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>95</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>99</b>
<b>8. БИОГРАФИЈА АУТОРА.....</b>	<b>123</b>
<b>ИЗЈАВЕ АУТОРА.....</b>	<b>124</b>

## ЛИСТА ТАБЕЛА

Табела 1	Садржај тешких метала у отпадним водама из домаћинства и индустријским отпадним водама (Thomton et al., 2001)	4
Табела 2	Врста и количина загађивача на дневном нивоу (Ђукић и сар., 2018)	8
Табела 3	Особине отпадних вода по гранама индустрије (Далмација, 2008)	9
Табела 4	Извори градских загађивача (Sarkar et al., 2019)	11
Табела 5	Упоредна анализа особина отпадних вода из домаћинства и индустријских отпадних вода (Поповић и сар., 1968)	12
Табела 6	Састав типичног детердента (Мићовић, 1967)	18
Табела 7	Сурфактанти одобрени за коришћење у детерцентима у ЕУ („Службени гласник РС“, бр. 94/2010, од 10. 12. 2010. године)	19
Табела 8	Анјонски, катјонски и нејонски сурфактанти	21
Табела 9	Алергени који улазе у састав детердента – према INCI номенклатури (Правилник о детерцентима; Службени гласник РС 40/10)	23
Табела 10	Врсте ензима које се користе у детерцентима (Fariha et al., 2010; Kumari et al., 2019)	24
Табела 11	Најчешћи конзерванси који се користе у средствима за прање – према INCI номенклатури (Правилник о детерцентима, Службени гласник РС 40/10)	25
Табела 12	Физичко-хемијски параметри квалитета површинске воде Западне Мораве	43
Табела 13	Микробиолошки параметри квалитета површинске воде Западне Мораве	49
Табела 14	Биомаса гљива добијена у контролној подлози (К) и на подлози са детерцентом (Д) након 16 дана инкубације	59
Табела 15	Поређење биомасе гљива у контролној подлози (К) и подлози са детерцентом (Д) - $\chi^2$ тест	59
Табела 16	Промене рН вредности ферментационе течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерцентом (Д) током раста и развоја гљива	64
Табела 17	Поређење рН вредности ферментационе течности гљива у контролној подлози (К)	64
Табела 18	Поређење рН вредности ферментационе течности гљива у подлози са детерцентом (Д)	64

Табела 19	Редокс потенцијал ферментационе течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерцентом (Д) током раста и развоја гљива	68
Табела 20	Поређење редокс потенцијала ферментационе течности гљива у контролној подлози (К)	68
Табела 21	Поређење редокс потенцијала ферментационе течности гљива у подлози са детерцентом (Д)	68
Табела 22	Концентрације укупних протеина у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерцентом (Д) током раста и развоја гљива	74
Табела 23	Концентрација слободних органских киселина у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерцентом (Д) током раста и развоја гљива	78
Табела 24	Термини и третмани за сваку гљиву у контролној подлози (К) и подлози са детерцентом (Д)	78
Табела 25	Поређење концентрација слободних органских киселина ферментационе течности гљива у контролној подлози (К)	79
Табела 26	Поређење концентрација слободних органских киселина ферментационе течности гљива у подлози са детерцентом (Д)	79
Табела 27	Концентрација укупних органских киселина у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерцентом (Д) током раста и развоја гљива	82
Табела 28	Термини и третмани за сваку гљиву у контролној подлози (К) и подлози са детерцентом (Д)	82
Табела 29	Поређење концентрација укупних органских киселина ферментационе течности гљива у контролној подлози (К)	83
Табела 30	Поређење концентрација слободних органских киселина ферментационе течности гљива у подлози са детерцентом (Д)	83
Табела 31	Ензимска активност алкалне фосфатазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерцентом (Д) током раста и развоја испитиваних гљива	87
Табела 32	Ензимска активност алкалне инвертазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерцентом (Д) током раста и развоја гљива	90

## ЛИСТА ГРАФИКОНА

Графикон 1.	Стандардна права за одређивање садржаја протеина	38
Графикон 2.	Биомаса тестираних гљива на контролној подлози (К) и на подлози са детергентом (Д) након 16 дана инкубације	60
Графикон 3.	Промене рН вредности ферментационе течности у контролној подлози (К) и подлози са детергентом (Д) током раста и развоја гљива	65
Графикон 4.	Промене редокс потенцијала ферментационе течности у контролној подлози (К) и подлози са детергентом (Д) током раста и развоја гљива	69
Графикон 5.	Концентрација протеина ферментационе течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) раста и развоја гљива	74
Графикон 6.	Концентрација слободних органских киселина у ферментисаној течности контролне (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива	89
Графикон 7.	Концентрација укупних органских киселина у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива	84
Графикон 8.	Ензимска активност алкалне фосфатазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива <i>Penicillium canescens</i> и <i>Penicillium funiculosum</i>	87
Графикон 9.	Ензимска активност алкалне инвертазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива <i>Penicillium canescens</i> и <i>Penicillium funiculosum</i>	91

## ЛИСТА СЛИКА

Слика 1.	Врсте загађивача у отпадним водама (Thornton et al., 2001)	5
Слика 2.	Начин преношења „загађивача у настајању“ до површинских вода (Jari et al., 2022)	6
Слика 3.	Подела отпадних вода	6
Слика 4.	Грађа молекула сурфактанта (Holmberg et. al., 2002)	20
Слика 5.	Типови сурфактаната (Merrettig-Bruns and Jelen, 2003)	20
Слика 6.	Ток анаеробне биодеградације детердџента (Merrettig-Bruns and Jelen, 2009)	28
Слика 7.	Микроскопске карактеристике врсте <i>Mucor plumbeus</i> (фото Ивана Матовић Пурић)	51
Слика 8.	Микроскопске карактеристике врсте <i>Aspergillus niger</i> (фото Ивана Матовић Пурић)	53
Слика 9.	Микроскопске карактеристике врсте <i>Penicillium canescens</i> (фото Ивана Матовић Пурић)	54
Слика 10.	Микроскопске карактеристике врсте <i>Penicillium funiculosum</i> (фото Ивана Матовић Пурић)	55
Слика 11.	Микроскопске и макроскопске карактеристике врсте <i>Trichoderma harzianum</i> (фото Ивана Матовић Пурић)	57

## ЛИСТА ХЕМИКАЛИЈА

- 2,6 диметил фенол
- 4-methyl-umbelliferyl  $\beta$ -D-glucoside,
- 4-аминобензен сулфонамид
- Colilert 18 (дехидрирана гранулирана подлога)
- Enterolert-E (дехидрирана гранулирана подлога)
- Folin-Chicalteau-ов (F-C) реагенс
- N-(1-нафтил)-1,2-диаминоетан дихидрохлорид
- ТОС кит
- $\beta$ -глицерофосфат
- Активни угаљ
- Амонијум хидроксид
- Бакар сулфат пентахидрат 1%;
- Баријумова со
- Борна киселина
- Гликолни пуфер (pH 9,0) са  $Mg^{2+}$
- Говеђи серум (Bovine Serum Albumin – BSA)
- Динитросалицилни реагенс
- Етанол концентровани
- Живин сулфат
- Калијум натријум тартарат 2%
- Калијум дихромат
- Калијум хромат
- Калијум сулфат
- Кромпир декстрозни агар (Potato Dextrose Agar – PDA)
- Малтозни агар (MA)
- Натријум карбонат ( $Na_2CO_3$ ) 2%
- Натријум хидроксид (NaOH) 0,1 М
- Ортофосфорна киселина
- Сахароза 1% (w/v)
- Сребро нитрат
- Сребро сулфат
- Сумпорна киселина
- Сумпорна киселина концентрована
- Трихлоросирћетна киселина (Trichloroacetic acid – TCA)
- Фенолфталеин
- Фосфатни пуфер 0,02 М (pH 8.0)
- Фосфорна киселина
- Хлороводонична киселина
- Чапек-Доксов бујон (Czaprek Dox Broth - CDB)



## ЛИСТА АПАРАТА

- Combo pH/Conductivity/TDS Tester HI98129 (Hanna Instruments Ltd., Woonsocket, Rhode Island).
- Ноеbauer-ова комора
- Водено купатило
- Дигитални електрични пехаметар (PHS-3BW Microprocessor pH/mV/Temperaturemeter) тип Банте са стакленом електродом, модел 65-1
- Електрична тресилица марке Kinetor
- Катјонске и ањонске колоне (Amberlite IR-120),
- pH-метра АМТ-20 (AMTAST, USA)
- УВ лампа са кабинетом (EA 160/FE, 365nm)
- УВ/Вис спектрофотометар (Cary 60, Agilent USA)

**ЛИСТА ИНСТИТУЦИЈА/УСТАНОВА У КОЈИМА ЈЕ РАЂЕН  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО ДОКТОРАТА**

- Департман за хемију ПМФ-а у Нишу
- Завод за јавно здравље, Чачак
- Институт за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу
- Катедра за Алгологију и микологију Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу

## 1. УВОД

У својој историји човек је на различите начине деловао на животну средину. Велики број тих активности био је позитиван, али је већина њих крајње негативна. Интензитет тих промена се повећавао упоредо са развојем науке, технике и употребом нових технологија.

Као последица индустријске револуције, настали су нови типови технологије који су довели до загађења и исцрпљивања природних ресурса. Као резултат развоја фабрика, пољопривреде, електрана, настали су основни загађивачи ваздуха – гасови (угљен-моноксид, угљен-диоксид, сумпор-диоксид) који доводе до глобалног загревања и угрожавања здравља живих бића. Према подацима Светске здравствене организације из 2016. године услед загађења ваздуха бележи се 4,2 милиона смртних исхода на годишњем нивоу (Shaddick et al., 2020).

Kumari et al. су на основу истраживања десет индијских градова, који су међу двадесет најзагађенијих светских градова, утврдили да је током 2020. године опао ниво загађивача ваздуха, угљен-моноксида (2–61%) и азот-диоксида (3–79%) у односу на исти период предходне године. Разлог овог смањења била је примена мера заштите против вируса COVID-19 која се односила на ограничавање у раду индустрије и транспорта (Kumari et al., 2020)

У директној вези са загађењем ваздуха је загађење земљишта и воде. Kumar & Prakash наводе да чврст отпад представља главни узрок загађења земљишта (Kumar & Prakash, 2020), што је глобални проблем, због раста светске популације, урбанизације и индустријализације (Hoornweg et al., 2012).

Загађење земљишта узроковано је великим бројем органских и неорганских загађивача, који настају најчешће антропогеним утицајем. Cachada et al. наводе рударство, атмосферске падавине, одлагање чврстог отпада, агрохемикалије и индустрију као основне загађиваче земљишта (Cachada et al., 2018). Liedekerke et al. су утврдили да је удео различитих типова индустрије у контаминацији земљишта различит: метална индустрија – 13%, хемијска индустрија – 8%, производња енергије и нафтна индустрија – 7%, док је удео кожне, тескилне и папирне индустрије око 5% (Liedekerke et al., 2013).

Узимајући у обзир бројност загађивача животне средине, пред човечанством је озбиљан проблем загађења које директно утиче на здравље и опстанак живих организама. Проблеми загађења животне средине су последњих година све већи услед све веће експлоатације сировина, брзог и неконтролисаног раста људске популације и све веће употребе синтетичких материјала који се не могу разградити помоћу физичких и хемијских метода (пестициди, вештачка ђубрива, адитиви, лекови, детерџенти).

Са научног становишта постоји више дефиниција загађења животне средине од стране различитих научника, али су последице исте – загађење различитих екосистема и урушавање здравља живих организама. Zaghoul et al. дефинишу загађење као последицу уношења енергије и супстанци у одређени екосистем, условљавајући промену његове структуре и аутентичности (Zaghoul et al., 2020). Према Kumar et al. загађење је последица човековог директног или индиректног деловања на животну средину које доводи до промена на нивоу зрачења, енергетског обрасца и повећаног броја организама (Kumar et al., 2016). Загађивачи су гасови, штетне чврсте или течне материје које се у животној средини налазе у већим концентрацијама у односу на концентрације које су дозвољене. Поред ваздуха и земљишта изузетно су загађене и воде. Од укупне количине воде на Земљи само се мали део може непосредно користити. Америчка агенција за заштиту животне средине наводи да је трећина светске воде загађена, док се у извештају Уједињених нација о светском развоју вода од 2015. године тврди да 1,1 милијарди светског становништва не користи здраву пијаћу воду (Tirgar et al., 2020).

Америчка агенција за заштиту животне средине наводи да је Цитарум у Индонезији најзагађенија светска река која је богата тешком металима, нарочито оловом, у концентрацији која је хиљаду пута већа од дозвољене (Marks, 2022).

У Европи на првом месту је река Сарно, која као последицу коришћења непречишчене воде садржи високу концентрацију загађујућих материја, међу којима се посебно истичу тешки метали (De Pippo et al., 2006).

Највећим делом (92%) територија Републике Србије припада Црноморском сливу. Неке од река овог слива као што су Дунав, Сава, Тиса, Дрина, Велика Морава, Јужна Морава и Западна Морава са собом носе велики број загађивача различитог порекла, чиме урушавају здраву животну средину. Основни загађивачи

ових река потичу из отпадних вода домаћинства, пољопривреде и различитих типова индустрије које, уколико нису адекватно пречишћене, представљају опасност за организме водених екосистема.

Загађене отпадне воде у свом саставу садрже различите загађиваче органског, неорганског или комбинованог порекла. Међу органским загађивачима посебно се истичу детерџенти чија се потрошња у индустрији и домаћинству свакодневно повећава. С обзиром да најчешће коришћени детерџенти садрже материје које се, или не разграђују у животној средини, или је тај процес дуготрајан, њихова штетност по здравље људи је немерљиво велика. Стога је неопходно прећи на употребу алтернативних – биоразградивих детерџената.

У пречишћавању отпадних вода значајно место заузима ремедијација помоћу микроорганизама (биоремедијација у ужем смислу), која се заснива на метаболичкој активности микроорганизама који посредством својих ензима разграђују токсичне материје до угљен-диоксида и воде (Раичевић и сар., 2007). У том смислу изучавања биохемијских својстава микроорганизама, а међу њима нарочито гљива, као потенцијалних пречистача животне средине, је од суштинског значаја за решавање постојећег проблема загађења водених екосистема детерџентима.

Kibria et al. указују да коришћење рециклиране воде у пољопривреди и индустрији може представљати једну од мера заштите од загађења вода, чиме би се успоставила равнотежа између воде у корист животне средине и воде која се користи у потрошачке сврхе (Kibria et al., 2013).

## 2. ОПШТИ ДЕО

### 2.1. ОТПАДНЕ ВОДЕ

Са повећањем броја становништва, развојем индустрије, пољопривреде, технологије, стварају се све веће количине отпадних вода које, уколико нису адекватно пречишћене, стварају опасност за организме водених екосистема. Опште прихваћена дефиниција отпадних вода не постоји. Temel et al. дефинишу отпадне воде као разблажену мешавину хетерогеног отпада која води порекло од градских, индустријских и других јавних средина (Temel et al., 2017).

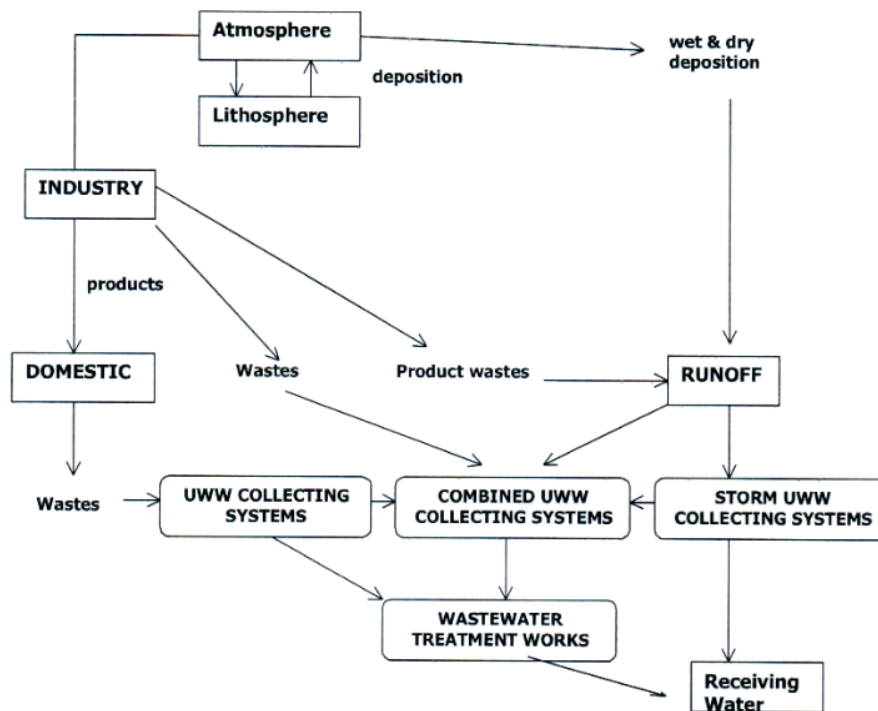
Вода која је коришћена и која захтева пречишћавање пре испуштања у водени екосистем је отпадна вода. Ове воде могу настати комбинацијом индустријских, домаћих или пољопривредних активности (Hunter & Neukelekian, 1965). Вода која је маргиналног квалитета је отпадна вода и може бити незагађена и загађена (Hamdy et al., 2005). Незагађена отпадна вода не садржи токсичне супстанце, а њена биолошка потрошња кисеоника (БПК) износи и до  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (Annonimus, 1976).

Загађене отпадне воде у свом саставу садрже различите загађиваче органског, неорганског и мешовитог порекла (Табела 1; Слика 1.)

Табела 1. Садржај тешких метала у отпадним водама из домаћинства и индустријским отпадним водама (Thornton et al., 2001)

Елемент	Отпадна вода из домаћинства ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Индустријска отпадна вода ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Pb	0,1	$\leq 13$
Cu	0,2	0,04–26
Zn	0,1–1,0	0,03–133
Cd	$< 0,03$	0,003–1,3
Cr	0,03	$\leq 20$
Ni	0,04	$\leq 7,3$

Главни загађивачи у отпадним водама су органске материје које се састоје од комбинације хемијских елемената као што су водоник, кисеоник, али врло често и фосфор, азот и сумпор. Присуство неорганских материје у води, у већим концентрацијама од дозвољених, је последица природног испаравања, при чему се оне задржавају у води (Hubble et al., 2019; Jasmin, 2020).

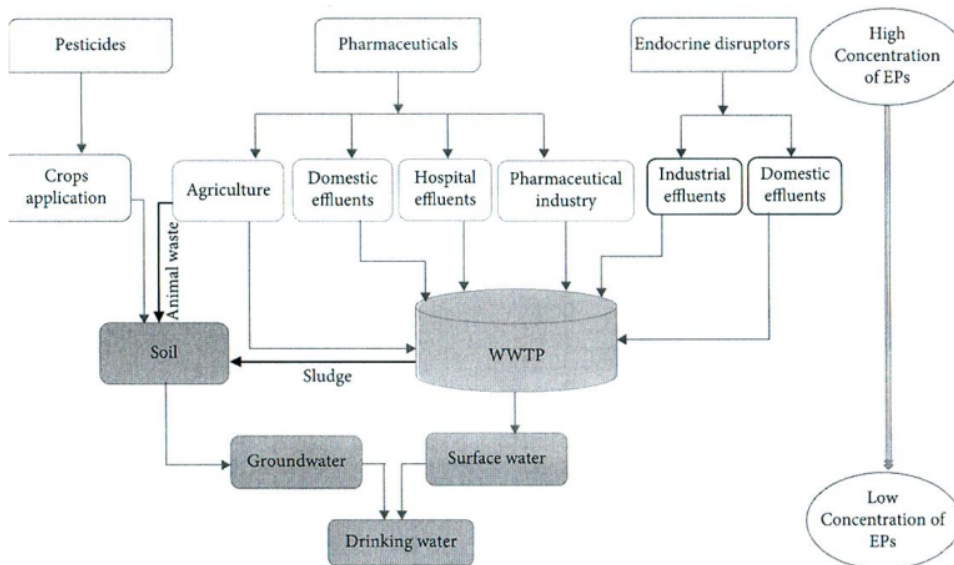


Слика 1. Врсте загађивача у отпадним водама (Thornton et al., 2001)

У отпадним водама су идентификоване постојане органске материје синтетичке природе, које изазивају акутну и хроничну токсичност водених организама и назване су „загађивачи у настајању„ или „загађивачи нових забринутости“ (ЕП) (Vasilachi et al., 2021). Geissen et al. наводе да их има око 700 и сврстане су у 20 класа (антибиотици, конзерванси, површинске активне супстанце, пестициди, хербициди, токсини алги и др.) (Geissen et al., 2015). Настају као последица неконтролисаног раста људске популације, развоја индустрије (нарочито фармацеутске), пољопривреде и других антропогених активности. У водене екосистеме доспевају преко отпадних вода из домаћинства, индустрије, пољопривреде (Слика 2; Jari et al., 2022).

Класификација ЕП је извршена на основу: физичко-хемијских карактеристика као што је врста загађујуће честице (микропластика и наночестице), поларности органских материја које потичу из индустрије, врсте производа из којих потичу (производи који се користе за личну хигијену,

фармацеутски производи, производи који се користе у пољопривреди – хербициди, агарициди, пестициди) (Geissen et al., 2015).



Слика 2. Начин преношења „загађивача у настајању“ до површинских вода (Jari et al., 2022)

У основи отпадне воде се могу поделити у три групе: комуналне отпадне воде; индустријске отпадне воде и отпадне воде агро-комплекса (пољопривредне отпадне воде) (Слика 3).



Слика 3. Подела отпадних вода (Далмација, 2008)



### 2.1.1. Комуналне отпадне воде

Највећи део комуналних вода чине отпадне воде из домаћинства чији је састав у већој мери константан. Реч је о води која се користи за санитарне потребе, потребе прања и кувања. Хетерогеност у саставу загађивача отпадних вода из домаћинства је већа у односу на остале типове отпадних вода. Ове воде садрже 40–50% минералних материја и 50–60% органских материја (Ђукић и сар., 2018).

Најзаступљенију групу органских материја у канализационим отпадним водама чине влакансте материје (20,64%), а мање заступљени су угљени хидрати (10,65%) и протеини (12,38%) (Huang et al., 2010).

Tretyakov et al. наводе високу заступљеност сулфидних једињења и лакоразградивих органских загађивача у отпадним водама из домаћинства (Tretyakov et al., 2012), док су неорганске материје и тешки метали заступљени у мањим концентрацијама (Vysokomornaia et al., 2015).

Због специфичног састава, канализационе отпадне воде из домаћинства представљају најпогоднију средину за развој патогених микроорганизама по чему се издвајају у односу на остале типове отпадних вода. Осим сапротрофа, хетеротрофа, у овим водама се често налазе и патогени микроорганизми, преносиоци заразних болести (Ђукић и сар., 2000).

Истраживања која су пратила анализу присуства фармацеутских производа у комуналним отпадним водама и хемикалија које се користе за личну хигијену, показала су да њихово присуство негативно утиче на репродукцију, узрокује већу учесталост поремећаја у развоју и повећава смртност акватичних организама (Galus et al., 2013).

Naidoo & Olaniran дефинишу отпадне воде из домаћинства као смешу сиве (кухињске воде) и црне воде (воде из тоалета) (Naidoo & Olaniran, 2014). Највећи део (75–90%) отпадних вода из домаћинства чини сива вода (Hernandez Leal et al., 2010). Количина сиве воде која се произведе у домаћинству зависи од доступности воде одређеног подручја, а креће се од 15 до неколико стотина литара по особи на дневном нивоу. Сиве воде су без примеса тоалетне воде, па су самим тим и мање патогене у односу на црну отпадну воду, која садржи урин и фекалије. Састав сиве воде чине биоразградиве органске материје нитрати и

фосфати, а присуство ксенобиотичких органских једињења и тешких метала (Cr, Cu, Hg, Pb) указује да се састав сиве воде временом усложњавао Eriksson et al., 2010; Oteng-Perrah et al., 2018). Оптерећеност загађеним материјама у отпадним водама се изражава стандардним вредностима по становнику.

Ђукић и сар. (2018) наводе следећу количину загађивача која се дневно унесе у градску канализацију од стране појединца (Табела 2). Правилном употребом комуналних вода ублажавају се последице загађења животне средине.

Табела 2. Врста и количина загађивача на дневном нивоу (Ђукић и сар., 2018)

Врста загађивача	Количина загађивача (g)
Површинске активне материје	2–3
Суспендоване материје	60–70
БПКп бистре воде	35–45
БПКп мутне воде	70–80
Хлориди	8–10
Фосфор (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	2–4
Амонијумове соли	7–9

### 2.1.2. Индустијске отпадне воде

Убрзана индустријализација, нарочито од половине 20. века, довела је до стварања велике количине индустријских отпадних вода које изазивају загађење површинских вода. Индустијске отпадне воде Naidoo & Olaniran дефинишу као смешу петрохемијског и индустријског отпада чији састав варира у зависности од врсте индустрије, врсте и састава загађивача (Табела 3) (Naidoo & Olaniran, 2014).

Основни загађивачи површинских вода су индустрија галванизације целулозе и папира, петрохемијска и хемијска индустрија (Vysokomornaya et al., 2015) и електране (Sazhin et al., 2008).

Најчешће загађујуће материје у индустријским отпадним водама су: феноли, токсични јони метала, детерџенти, масноће, отровне и запаљиве материје, киселине и базе. Посебну забринутост код индустријских отпадних вода чини присуство тешких метала (НМ) – олова (Pb), живе (Hg), никла (Ni) и хрома (Cr), који показују висок степен тосичности на акватичне организме и ниску стопу биоразградивости (Ploms et al., 2020).

Табела 3. Особине отпадних вода по гранама индустрије (Далмација, 2008)

Грана индустрије	Особине отпадних вода
Хемијска, нафтна и петрохемијска индустрија	<p>Велика потрошња воде. Вода се троши за технолошке сврхе, напајање котова и расхлађивање. Састав отпадних вода зависи од врсте сировине, производа и од технолошког поступка. Специфични параметри загађења ове гране су: температура, рН, суспендоване материје, органске материје, азот, фосфор, нитрати, сулфати, калијум, калцијум, флуориди, арсен, никл, хром, хлориди, олово, цинк, бакар, феноли, угљоводоници, цијаниди, титан, силикати, меркаптани, сулфиди, уља, масти, итд.</p>
Прехрамбена индустрија	<p>У овој грани се вода троши за транспорт сировина, излуживање корисних састојака, термичку обраду готових производа, расхлађивање, чишћење опреме и просторија. Најзначајније индустрије које се сврставају у ову грану су: шећеране, пиваре, млекаре, фабрике за прераду воћа и поврћа, индустрија врења, месна индустрија и индустрија кондиторских производа. Карактеристични параметри загађења ове гране су: таложиве материје, суспендоване материје, органске материје, азот, фосфор, уље, масноћа, хлориди и температура.</p>
Индустрија папира	<p>Улога воде у овој индустрији је тако велика да се често сматра као „друга сировина“ поред биљних ткива. Вода служи пре свега код излуживања сировина, а затим код стварања пулпе за пресовање папира. Карактеристични параметри загађења ове гране су: рН, суспендоване материје, органске материје, боје, тешки метали, сулфиди, феноли, азот и фосфор.</p>
Кожарска и текстилна индустрија	<p>Вода се троши за припрему сировине и за дораду производа. Карактеристични параметри загађења ове гране су: температура, пХ, таложиве материје, суспендоване материје, боје, растворене неорганске материје, органске материје, хром, сулфиди, феноли, уља, масноће.</p>
Метално-прерађивачка индустрија	<p>Вода се троши за расхлађивање и у процесу термичке обраде и површинске заштите метала. Количина отпадних вода ове гране је релативно мала, али је загађење специфично и велико. Карактеристични параметри су: пХ, уље, масноћа, хром, олово, цинк, кадмијум и фенол.</p>
Отпадне воде сточарства	<p>Отпадне воде потичу првенствено са сточних фарми са течним изјубривањем. Количина и састав течног стајњака на једној фарми зависи од више фактора, као што су бројно стање, технологија исхране, начин изјубривања и сл. Са тог аспекта влада велико шаренило. Главна карактеристика течног стајњака је високо органско загађење. При томе знатан део присутних органских материја се налази у таложном суспендованом облику. Посебна карактеристика ових отпадних вода је висок садржај амонијака услед чега имају изражен алкални карактер.</p>

Galkina et al. су утврдили да су тешки метали [натријум (Na), магнезијум (Mg), цинк (Zn), калцијум (Ca) и калијум (K)] високо присутни у отпадним водама из индустрије галванизације (Galkina et al., 2008); фенолна једињења и абиетска киселина из индустрије папира и целулозе (Guasakova et al., 2014); нафтни деривати, ацетон, бензин, фенолна и азотна једињења у отпадним водама петрохемијске индустрије (Kirsanov et al., 2009).

Ђукић и Лекић (2016) наводе постојање неколико типова индустријских отпадних вода:

а) Условно чисте отпадне воде чији састав чини 500–1000 mg L<sup>-1</sup> минералних материја, 50 mg L<sup>-1</sup> суспендованих материја, док количина БПК<sub>п</sub> износи мање од 60 mg L<sup>-1</sup>; користе се у облику рециркулационе воде; током процеса производње се мало загађују, или се не загађују.

б) Транспортно-испирајуће индустријске отпадне воде у чијем саставу доминирају минералне материје и растворљиви загађивачи; настају након прања сировина и хидрауличног транспорта.

в) Привредно-комуналне и производно-загађене воде чији састав чине фосфати, минералне и органске материје; загађеније су од привредно-комуналних, што је у складу са наменом, и садрже 600–1000 mg L<sup>-1</sup> минералних материја, 500–600 mg L<sup>-1</sup> суспендованих материја, док количина БПК<sub>п</sub> износи 500–700 mg L<sup>-1</sup>.

Кућне и индустријских отпадне воде су обједињене у урбане отпадне воде. Hamdy et al. дефинишу урбане отпадне воде као мешавину кишнице, кућне и индустријске отпадне воде (Hamdy et al., 2013). Извори загађења урбаних загађивача су различити у зависности од врсте индустрије и хетерогености састава отпадних вода из домаћинства. Sarkar et al. наводе поделу урбаних загађивача на органске (сурфактанти, пестициди) и потенцијално токсичне загађиваче (металоиди и метали) (Табела 4) (Sarkar et al., 2019).

Разлике између комуналних и индустријских отпадних вода приказане су у Табели 5.

### **2.1.3. Пољопривредне отпадне воде**

Пољопривреда представља највећег светског потрошача воде на свету (92%) од којих 70% потиче из река и користи се за наводњавање (Kesari et al., 2021), у зависности од климатских услова и економског развоја.

Табела 4. Извори градских загађивача (Sarkar et al., 2019)

Контаминантна група	Главни загађивачи	Могући извори
Тешки метали и металоиди	Zn, Cu, Cd, Pb, As, Cr	Индустриске и металуршке делатности, поправка аутомобила, штампа и бојење, обрада дрвета, фризерски салон, праоница веша, стоматолошка хирургија.
Фармацеутска једињења	Кодеин, парацетамол, трамадол, венлафаксин, пропранолол, флуоксетин, иопромид, карбамазепин	Лечење уобичајених здравствених проблема (нпр. ублажавање болова, грозница, хипертензија, напади).
	Антибиотици	Лечење бактеријских и вирусних болести.
Ендогени естрогени	17 $\beta$ -естрадиол, естрон	Орална контрацепција.
Бромовани дифенил етери	Вишеструки сродници	Успоривачи горења у електронској роби, намештају и текстилу.
Полихлоровани нафталени	Вишеструки сродници	Спаљивање отпадних материјала.
Адитиви	Ацесулфам	Вештачко заслађивач.
Пестициди	2,4-Д, 3,4-дихлороанилин, карбарил, диурон, 2-метил-4-хлорофенокси-сирћетна киселина, симазин	Хербициди и инсектициди.
Фталати	Диметил фталат, диетил фталат, дибутил фталат, бензилбутил фталат, диетилхексил фталат	Козметика и ПЦП, пластификатор.
Патогени	Бактерије, вируси, гљивице, праживотиње, хелминти	Одлагање трупа, људски отпад
Наночестице	Ag, Fe, Pt, ZnO, SiO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> , CeO <sub>2</sub> , генерални <sub>2</sub> , фулерена	Текстил, козметика, креме за сунчање, боје, премази, медицинска употреба, катализатори горива.
Перфлуорисане површински активне супстанце	Перфлуорисана сулфонска киселина, перфлуорисана октанска киселина	Водене ватрогасне пене.

Табела 5. Упоредна анализа особина отпадних вода из домаћинства и индустријских отпадних вода (Поповић и сар.,1968; цитат преузет од Букић и сар.,2000)

Карактеристика	Отпадне воде из домаћинства	Отпадне воде из индустрије
Настанак	Делатношћу домаћинства, физиолошке излучевине	У индустријским погонима услед процеса производње, уклањања отпада и губитка сировина и производа
Количина	Условљена потрошњом воде која се користи у домаћинству	Условљена потрошњом воде која се користи индустрији у зависности од врсте индустрије
Физичка својства	Равномерна	Различита
Хемијски састав	Приближно хомоген, доминирају биоразградљиве супстанце	Варијабилан, биоразградљиве, неразградљиве, токсичне супстанце
Реакција	Неутрална или слабо алкална	Варијабилна, од изразито алкалне до изразито киселе
Токсичност	Није карактеристична	Постоји у различитом степену
Хигијенски значај	Опште санитарни и епидемиолошки	Најчешће санитаран, неретко токсиколошки, ређе епидемиолошки
Поступак пречишћавања	Биолошки са дезинфекцијом	Хетероген -биолошки механички, физичко-хемијски

Главни загађивачи пољопривредних отпадних вода су резултат антропогених активности – хемијске супстанце које се користе за повећање приноса биљака, вештачка ђубрива која се користе у циљу побољшања квалитета земљишта и поновно коришћење непречишћене отпадне воде за потребе наводњавања.

Пестициди, хербициди, агарициди и фунгициди су хемијске супстанце која се користе у пољопривреди за повећање приноса биљака. Из земљишта доспевају у подземне и површинске воде, у којима њихове високе концентрације угрожавају квалитет воде и опстанак акватичних организама (Zhang & Shen, 2017).

Yang et al. објашњавају еутрофикацију воде која може да поремети унутрашњу равнотежу воденог екосистема, а настаје применом вештачких ђубрива у пољопривреди (Yang et al., 2008). Спирањем пољопривредног земљишта, вештачка ђубрива богата нитратима и фосфатима доспевају у воду и доводе до „цветања воде“ што условљава хипоксију у воденој средини због масовне репродукције алги и

цијанобактерија. Цијанобактерије излучују цијанотоскине, који доводе до акутних и хроничних тровања и морталитета живог света (Carmichael, 2001).

Непречишћене отпадне воде су најзаступљеније у наводњавању пољопривредних усева. Ecosse наводи да се 20 милиона хектара пољопривредног земљишта наводњава непречишћеним отпадним водама што, обзиром на постојање великог броја загађивача, узрокује негативне последице на здравље људи (Ecosse, 2001).

Kesari et al. као основне загађиваче присутне у непречишћеним отпадним водама, наводе тешке метале, пестициде, отпад са депонија, текстилну, папирну индустрију које условљавају ерозије земљишта због повећаног салинитета и таложења натријума (Kesari et al., 2021).

## **2.2. ОСНОВНИ ПОКАЗАТЕЉИ ЗАГАЂЕНОСТИ ОТПАДНИХ ВОДА**

Основни показатељи загађености отпадних вода су физичко-хемијски и биолошки. Избор параметара зависи у коју сврху се вода користи.

### **2.2.1. Физичко-хемијски показатељи загађености воде**

Ова врста показатеља указује на постојаност загађивача у отпадној води и њихов утицај на живи свет воденог екосистема. Основни показатељи су температура воде, рН, растворени кисеоник, биохемијска потрошња кисеоника (БПК), хемијска потрошња кисеоника (ХПК).

Остали физичко-хемијски параметри који указују на загађење воде су боја, мирис, мутноћа, жарени остатак, губитак жарења, електропроводљивост, таложиве материје, суспендоване материје, суви остатак.

#### ***Температура воде***

Температура воде је основни показатељ загађености воде. Контролише брзину свих хемијских реакција које се у њој дешавају. Температура површинске воде варира од 0–30 °С, док у летњим месецима може достићи вредност и до 40 °С (Zaghloul et al., 2019).

Биохемијски и микробиолошки процеси су зависни од температуре воде. Повећана температура воде стимулише раст микроорганизама, чиме се смањује количина раствореног кисеоника, а тиме и опстанак акватичних органама. Садржај минерала у води се повећава са повећањем температуре, промене органолептичких

показатеља воде (мириса, изгледа, мутноће, провидности, боја) су такође условљене променом температурае.

#### ***pH вредност***

pH је важна карактеристика воде и представља концентрацију водоникових јона у раствору. На основу мерења pH вредности утврђује се да ли је вода алкалне (pH веће од 7), или киселе (pH мање од 7) реакције.

Промена pH вредности воде може да утиче на промену „облика“ хемијских елемената у води, чиме се угрожава опстанак акватичних организама. Тешки метали растворени у води у зависности од њене pH вредности могу постати токсични за већину акватичних организама. Хром (Cr) и олово (Pb) се брже растварају у води киселе реакције (DeZuane, 1997). Количина кисеоника сразмерно расте са повећањем pH вредности; ниска вредност pH раствара метале у води. Са друге стране амонијак је отрован за рибе уколико је вода алкалне реакције, док у киселој или неутралној средини не показује тосична дејства (DeZuane, 1997).

#### ***Растворени кисеоник***

Брзину оксидације неорганских и органских једињења у води одређује количина кисеоника – растворени кисеоник. Количина ратвореног кисеоника је промењива током дана и ноћи, али и сезонски. Приликом цветања воде долази до повећане разградње органских материја од стране микроорганизама чиме наступа хипоксија (низак ниво кисеоника).

#### ***Биохемијска потрошња кисеоника (БПК)***

Биохемијска потрошња кисеоника (BOD – Biochemical Oxygen Demand) представља количину кисеоника неопходну микроорганизмима отпадних вода да оксидују органска једињења, у аеробним условима, током одређеног временског периода на температури од 20 °C (БПК<sub>5</sub> – разградња током пет дана, БПК<sub>20</sub> – разградња током 20 дана) (Ђукић и Мандић, 2016; Tuser, 2020).

#### ***Хемијска потрошња кисеоника (ХПК)***

Хемијска потрошња кисеоника (COD – Chemical Oxygen Demand) указује на степен загађења органским материјама. Представља укупну количину кисеоника неопходну за оксидацију органских материја у неорганске. Вредности



ХПК зависе од типа отпадне воде; за канализационе отпадне воде износи 90–100%, обзиром на хетерогеност материја присутних у овим типовима отпадних вода и на њихову способност оксидације (Малиновић и сар., 2013).

Осим наведених, физичко-хемијским показатељима припадаји и боја, мирис, мутноћа, жарени остатак, губитак жарења, електропроводљивост, таложиве материје, суспендоване материје и суви остатак.

### **2.2.2. Биолошки – микробиолошки показатељи загађености воде**

Ова врста показатеља се односи на број укупних колиформних бактерија, број фекалних колиформних бактерија, *Escherichia coli* и број фекалних ентерокока.

Колиформе бактерије су представници фамилије *Enterobacteriaceae*, која укључује непатогене родове *Enterobacte* и *Escherichia*, и повремено патогене *Klebsiella*, *Kluuvera*, *Citrobacter* и неке представнике рода *Serratia* (Figueras & Borrego, 2010).

#### **Укупне колиформне бактерије**

Претстављају штапићасте грам негативне бактерије, факултативно-анаеробне, неспорулујуће, које имају способност да ферментишу лактозу у гас или киселину у подлози са детерцентом на температури  $36 \pm 2$  °C, у периоду 24–48 h (Ashbolt et al., 2001); не чине специфичну флору доњег интерстиналног тракта; нису специфични показатељи фекалног загађења воде (Gaurav Saxena et al., 2015).

#### **Фекалне колиформне бактерије (ФТЦ)**

Бактерије које представљају прецизније индикаторе фекалног загађења воде су ФТЦ јер се налазе у дигестивном тракту људи и топлокрвних животиња. Способне су да расту и ферментишу лактозу на температурама вишим од нормалних (44–45 °C) (Saber et al., 2015a).

ФТЦ су стабилне на високим температурама, њихова телесна температура је виша од температуре већине екосистема, па се назив „термотолерантни колиформи“ све више користи од назива фекалне колиформе. У односу на укупне колиформе имају мању способност размножавања.

Најпозданија (ФТЦ) бактерија, која указује на присуство патогена и представља индикатора фекалног загађења је бактерија *E. coli*. Доминантан је факултативни аеробни коменсал цревног тракта људи и животиња, има способност синтезе  $\beta$ -глукуронидазе и производње индола из триптофана (Gaugav Saxena et al., 2015) као и способност преживљавања у води 4–12 недеља. Углавном је непатогена, али постоје и патогени сојеви. Frigon et al. (2013) истичу да, у зависности где паразитирају, постоје две врсте патогена бактерије *E. coli* – цревни (ЕРЕС) и ванцревни (ЕкРЕС) патогени (Frigon et al., 2013).

Цревни патогени *E. coli* се према Karer et al. деле на неколико подгрупа: ентеропатогене – ЕРЕС, ентероагрегативне – ЕАЕС, ентерохеморагичне – ЕНЕС, ентеротоксигене – ЕТЕС, дифузно спојене (ДАЕС), ентероинвазивне (ЕИЕС) и бактерије које имају способност производње стигма токсина (СТЕС) (Karer et al., 2004).

Исти аутори ванцревне сојеве *E. coli* деле у три подгрупе: МНЕС – која се повезује са настанком менингитиса, УРЕС – урпатогени сој који доводи до ванцревних инфекција и SEPEC – изазивач септикемије (Karer et al., 2005).

#### **Фекалне ентерококе**

Фекалне ентерококе, некада називане фекалне стрептококе, су значајни показатељи фекалног загађења воде. То су грам позитивне бактерије, факултативно анеробне који не формирају споре, расту у рН средини 9,6–10, опстају на температури од 10–45 °С, док на температури од 60 °С могу опстати и до 30 минута (Waideman et al., 2020).

Само неке врсте су патогене – *Enterococci faecalis* и *Enterococci faecium*. Налазе се у мањем броју у односу на остале индикаторске организме и дуже опстају у води, посебно морској. У односу на фекалне колиформне бактерије прецизнији су показатељи фекалног загађења воде (Saxena et al., 2015; Waideman et al., 2020). *E. faecalis* и *E. faecium* имају терапеутски значај у лечењу дијареја, па су саставни део пробиотика (Буарпаналли et al., 2012).

Организми који се користе за процену микробиолошког састава воде се називају индикаторски микорганзми (ИМ). Истовремена анализа више ИМ пружа потпуни увид у присуство патогена у води, самим тим и степен загађења воде (Ashbolt et al., 2001).

### 2.3. ДЕТЕРЦЕНТИ

Средства за прање су од давнина позната у облику сапуна, када су се справљали од масти и пепела. Сапун је био први детерцент који је човек употребљавао. Дуго се сматрало да је сапун најбоље средство за прање, али су временом уочени неки недостаци, попут тога да сапун није постојан у тврдој води, као и киселим растворима. Због тога се много радило на проналажењу нових средстава за прање, а Немачка је била прва држава која је на тржиште пласирала нове синтетичке детерценте. Први детерцент Немачке компаније „Хенкел“ био је „Universal–Waschmittel“ на бази натријум силиката и његова употреба је била ограничена на прање веша.

Назив потиче од латинске речи *detergere* што значи чистити, прати. Џокић дефинише детерценте као „активне супстанце које смањују површински напон, помажу квашење и емулговање, скидају прљавштину и стварају пену, употребљавају се као средства за прање, а која нису обухваћена сапунима (Џокић, 1985).

Неки од предности детерцената у односу на сапуне су: а) ефикасније и брже уклањају нечистоће; б) постојани су у киселој, морској и тврдој води; в) не дају алкалну реакцију приликом растварања у води; г) компоненте за њихово добијање су јефтине.

На нашем тржишту детердценти су се појавили 1956. године и њихова употреба се из године у годину повећава. Током 2003. године укупна вредност производње детерцената у свету је износила 83,3 милијарде долара, при чему је само у САД достигла 3,8 милијарде (Fung et al., 2007), док је укупна тржишна вредност детердцената за веш током 2012. године износила 60,9 милијарди долара (Bianchetti et al., 2015). Према годишњем извештају компаније „Хекел“ Крушевац за 2021. годину оставрен је профит од 6,605 милијарди евра. (Хенкел, 2022).

Детерценти се могу наћи у у различитим формама: течном, прашкастом, у облику пасте за прање, гел–капсула. Састав типичног детерцента је изложен у Табели 6.

Cheng & Khoо наводе које особине треба да испуњава један детерцент. Наиме, детерценти морају имати велику моћ чишћења, брзо и потпуно растварање

у води, постојаност компоненти прања при високим температурама и високу или потпуну биоремедијацију (Cheng & Khoo, 2020).

Табела 6. Састав типичног детердента (Мићовић, 1967)

Компонента	Концентрација (%)
Додецил бензол сулфат	20,0
Натријум триполифосфат	45,0
Натријум силикат	5,0
Натријум карбокси метил целулоза	0,5
Алфатични амиди	25,0
Натријум сулфат	22,0
Влага	5,0

Детерденти су токсични за акватичне организме јер се само делимично разграђују у води. Токсичност зависи од више фактора: концентрација раствореног кисеоника, тврдоћа воде, температура воде и молекуларна структуре детердента (Abel, 1974).

Ово поглавље почиње прегледом токсикологије главних састојака детердента, после чега су истраживана својства самог детердента. Овај приступ је аналоган оном који произвођачи користе у пракси током производње.

### 2.3.1. Хемијски састав детердента

Формулацију детердента чине сурфактанти, заступљени 10–20% (одговорни за уклањање нечистоћа на тканини), и различите врсте адитива који појачавају дејство детердента. Сурфактанти се према пореклу деле на:

- а) биосурфактанте
- б) синтетичке сурфактанте.

#### **Биосурфактанти**

Ову врсту тензида синтетишу микроорганизми, нарочито квасци и бактерије (Soberón-Chavez & Maier, 2010). Исти аутори наводе неке групе биосурфактаната: гликолипиде (синтетишу их квасци), липопептиде (синтетишу бактерије *Bacillus* spp. и *Pseudomonas fluorescens*), рамнолипиди (велику количину ове врсте биосурфактаната синтетише патогена врста *Pseudomonas aeruginosa* и непатогена *Pseudomonas putida*) (Soberón-Chávez et al., 2021).

Биосурфактани у односу на синтетичке сурфактане показују низак степен токсичности, висок степен деградације, производња је јефтинија, еколошки су прихватљиви за животну средину (Soberón-Chávez et al., 2021).

### **Синтетички сурфактанти**

Представљају групу хемијских супстанци, другачије се називају тензиди (површинске активне материје), које чине главни састојак детерџената јер имају способност растварања нечистоће. Стога претстављају основни састојак у формулацијама детерџената. Представљају органске супстанце које снижавају површински напон воде у односу на ваздух или граничну површину са другим материјалима. Због способности њиховог површинског деловања, испољавају своја токсична дејства на акватичне организме (Tai & Nardello-Rataj, 2001), а у воду доспевају директно, или преко отпадних вода. Листа сурфактаната за које је издато одобрење или донет акт којим се одобрава коришћење сурфактанта у детерџенту у ЕУ дата је у Табели 7.

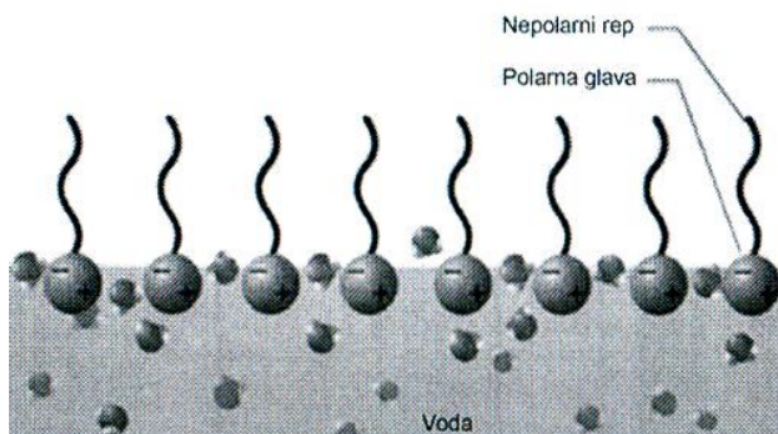
Табела 7. Сурфактанти одобрени за коришћење у детерџентима у ЕУ („Службени гласник РС“, бр. 94/2010, од 10. 12. 2010. године)

Назив према IUPAC номенклатури	CAS број	Примена
Алкохоли, <i>Guerbet</i> , C12 – 20, етоксилувани, n-бутил етар (7-8EO) (полимер)	147993-59-7	Може се користити за индустријску примену за: - прање боца; - прање унутрашњих површина цевовода, индустријских судова, процесне опреме и филтера без растављања опреме; - чишћење металних површина.

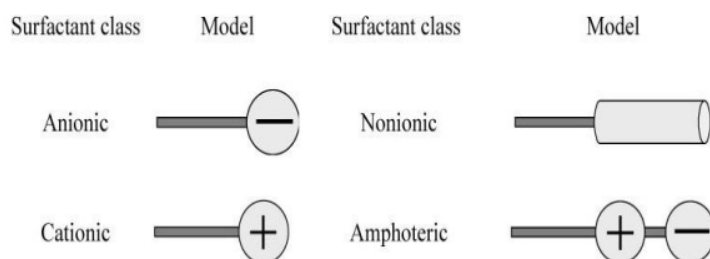
Сурфактанти су амфипатичка једињења, која се састоје из два дела: репа (нерастворљивог у води) – хидрофобни део и главе (растворљивог у води) – хидрофилни део (Слика 4.). Способност прања детерџента зависи од дужине хидрофобног дела суфактанта, док хидрофилни део повећава растворљивост тензида у води (Ash & Ash, 1993).

У зависности од карактера хидроксиних група, извршена је подела сурфактаната на: 1) анијонске; 2) катјонске; 3) нејонске; 4) амфотерне.

Свака група наведених сурфактаната је специфична по одређеним улогама и особинама (Слика 5).



Слика 4. Грађа молекула сурфактанга (Holmberg et. al., 2002)



Слика 5. Типови сурфактаната (Merrettig-Bruns and Jelen, 2003)

*Анијонски сурфактанати* су најзаступљенији сурфактанати, чине 45–50% синтетских сурфактаната. У тврдој води показују високу осетљивост на присуство мултивалентних јона (Cong Cheng et al., 2020). У односу на остале сурфактанте, ова врста ствара већу количину пене; у воденом раствору дисосују дајући електро негативне јоне. Алкилбензен сулфонат (ЛАС) је најпознатији анијонски сурфактант, који се користи као додаток течним детерџентима, представља и важан састојак производа за личну хигијену (Babajanzadeh et al., 2019). Осим ЛАС–а, анијонским тензидима припадају и сапуни (високо осетљиви на тврдоћу воде, употреба ограничена), АЕС – алкил етар сулфати (користе се за машинско прање рубља због пенушавости), АС – алких сулфати (употреба у концентрованим детерџентима) (Merrettig-Bruns & Jelen, 2009).

*Катјонски сурфактанти* се по заступљености налазе на трећем месту (5–6%) (Salager, 2002). У воденом раствору дисосују на површински активан позитиван јон. St. Laurent et al. (2007) наводе да имају велику способност адсорбције на земљиште, па самим тим не претстављају компоненту у детерџентима за прање веша, већ је њихова примена базирана на омекшиваче рубља и балзаме за косу. Неки катјонски сурфактанти показују антибактерицидно дејство, па су саставни делови дезинфекционих средстава и средстава за стерилизацију (Salager, 2002). Примери ове врсте сурфактаната су естерквати и моно алкил кватернарни системи. Обе врсте сурфактаната улазе у састав омекшивача за рубље.

*Нејонски сурфактанти* најчешће коришћени после ањонских сурфактаната. У данашње време достижу 40% производње од свих сурфактаната. Због нераздвојне хидрофилне групе у воденом раствору не дисосују (Salager, 2002). Постојани су у тврдој води, не иритирају кожу, имају високу способност чишћења. Неки сурфактанти из ове групе су етоксилати деривата угљених хидрата (ЦДЕ), алкохолни етоксилати (АЕ), етоксилирани амиди (ЕА) (Cong Cheng et al., 2020). Разлике између ањонских, катјонских и нејонских сурфактаната приказане су у Табела 8.

Табела 8. Ањонски, катјонски и нејонски сурфактанти

<b>Врста сурфактанта</b>		
<b>Ањонски</b>	<b>Катјонски</b>	<b>Нејонски</b>
<b>Особине</b>		
Површински активни агенс који садржи негативно наелекрисану функционалну групу у молекулу	Површински активни агенс који садржи позитивно наелекрисану функционалну групу у молекулу.	Површински активни агенс који нема нето наелектрисање у својој формулацији
<b>Наелектрисање</b>		
Негативно	Позитивно	Неутрално
<b>Функционална група</b>		
сулфонати, фосфати, сулфати и карбоксилати	Амонијум катјон	Ненаелектрисане функционалне групе

*Амфотерни сурфактанти* садрже ањонску и катјонску хидрофилну групу и тиме своју активност испољавају у зависности од рН раствора (неки не реагују у

зависности од рН раствора, док се остали понашају као катјони или анијони). Ретко је заступљена група сурфактаната, јер су скупи, одликују се благом токсичношћу, па се користе у детергентима за ручно прање посуђа, јер не иритирају кожу. Представници ове групе сурфактаната су *N*-алкил деривати простих аминокиселина (бетаин, аминокиселина пропионска киселина, глицин) (Merrettig-Bruns & Jelen, 2009).

### 2.3.2. Остали састојци детерџента

Осим површинских активних супстанци у састав детерџента улазе различите врсте адитива који су специфични у погледу улоге у детерџенту:

*Антимикробни агенси* су саставни делови формулације детерџента и имају циљ да побољшају формулацију детерџента, да инхибирају раст микроорганизама; неки су и алергени обзиром да имају антибактерицидно и антимикробно дејство (Табела 9).

Fung et al. наводе да су јодофори и натријум хипохлорит најчешћи антимикробни агенси (Fung et al., 2007). Натријум хипохлорит је антимикробни агенс на бази натријума, у основи избелјивач, који у састав детерџента улази у малој количини јер у већим количинама оштећује тканину (Bianchetti et al., 2015).

*Фосфати* смањују тврдоћу воде. Додају се у детерџенте за судове и детерџенте за прање веша. Иако су ниске токсичности, преко отпадних вода доспевају у површинске воде где изазивају еутрофикације алги, чиме угрожавају опстанак акватичних организама. Са друге стране Koohsaryan et al. наводе зеолит – једињење која би претстављало адекватну замену за фосфате у детерџенту, јер не изазива еутрофикацију алгу, безбедан је за животну средину и показују високу успешност у погледу прања и чишћења (Koohsaryan et al., 2020).

*Избелјивачи* се користе са циљем уклањања флека и мрља на тканини. Wierrecht et al. наводе да су перборатне соли или перкарбонат најчешће коришћени избелјивачи у детерџентима за прање рубља (Wierrecht et al., 2006), који у воденом раствору ослобађају водоник-пероксид који ефекат избелјивача постиже на температури 60 °C и не оштећује тканину приликом процеса прања (Bianchetti et al., 2015). Друга врста избелјивача, претходно поменути антимикробни агенс – натријум хипохлорит је на бази хлора, захтева опрез у



дозирању, јер у већој количини може довести до оштећења тканине (Smulders et al., 2007; Congheng et al., 2020).

Табела 9. Алергени који улазе у састав детерџента – према INCI номенклатури (Правилник о детерџентима; Службени гласник РС 40/10)

Назив алергена	CAS број
$\alpha$ -амилинамалдехид	122-40-7
Бензил алкохол	100-51-6
Динамил алкохол	104-54-1
Цитрал	5392-40-5
Еугенол	97-53-0
Хидроксицитронелал	107-75-5
Изоеугенол	97-54-1
Амилинамил алкохол	101-85-9
Бензил салицилат	118-58-1
Цинамалдехид	104-55-2
Кумарин	91-64-5
Гераниол	106-24-1
Хидрокси-метилпентил-циклохексен-карбоксиалдехид	31906-04-4
4-метоксибензил алкохол	105-13-5
Бензил-салицилат	118-58-1
Фарнезол	4602-84-0
2-(4-tert-butylbenzil)propionaldehyd	80-54-6
Линалоол	78-70-6
Бензил бензоат	120-51-4
Цитронелол	106-22-9
Хексил-цинамалдехид-	101-86-0
D-лимонен	5989-27-5
Метил хептин карбонат	111-12-6
Алфа-изометил јонон,	127-51-5
Екстракт храста и маховине	90028-68-55
Екстракт дрвећа	90028-67

*Ензими* – биокатализатори који својим присуством у детерџенту повећавају ефикасност његовог деловања. Ензими који улазе у састав детерџента су биолошког порекла. У поређењу са синтетичким детерџентима, детерџенти који садрже ензиме нису штетни по животну средину јер се у потпуности биоразграђују и показују високу ефикасност у процесу прања и чишћења (Fariha

et al., 2010; Kumari et al., 2019). Ito et al. наводе четири врсте ензима који су саставни делови детерџента: протеиназе, липазе, амилазе и целулазе (Ito et al., 1998). Сваки од наведених фермената има одређену улогу (Табела 10). Осим поменутих група ензима у формулацијама детерџената за прање посуђа и веша налазе се и мананазе ензими који су такође ефикасни у уклањању мрља (Kumari et al., 2019).

*Конзерванси* који су саставни делови детерџента проказани су у Табели 11. Pack et al. наводе да је ова врста адитива главни састојак влажних марамица и детерџената за прање посуђа, где се посебно истичу два конзерванса – цетилпиридинијум хлорид (30%) и бензоева киселина (40%) (Pack et al., 2021). Употреба конзерванаса у детерџентима је ограничена јер неки конзерванси у већој концентрацији од дозвољене показују високу токсичност по људско здравље. Gholami et al. наводе формалдехид, чија максимална дозвољена концентрација у формулацији детерџента износи 0,2% (Gholami et al., 2016). Са друге стране, детерџент који саржи и минималну концентрацију формалдехида (0,05%) мора бити обележен од стране произвођача (Gholami et al., 2016).

Табела 10. Врсте ензима које се користе у детерџентима (Fariha et al., 2010; Kumari et al., 2019)

Ензим	Улога
Протеиназе	Ензими који се користе у индустрији детерџената за разлагање протеина, па су ефикасни у уклањању нечистоћа од јаја, млека, крви.
Липазе	Ензими који се користе у индустрији детерџената за разлагање и уклањање мрља од масти биљног и животињског порекла.
Амилазе	Ензими који разлажу угљене хидрате (скроб), уклањају мрља од кромпира, чоколаде, шпагета
Целулазе	Ензими који се додају детерџентима за одржавање мекоће и боје тканине. Ефикасни су у уклањању честица земљишта.
Мананазе	Ензими који хидролизују мрље које се налазе у прехранбеним производима (кечапу, чоколади, сладоледу). Користе се у производњи биоетанола, индустрији папира, фармацеутској индустрији

*Адитиви против корозије* (антикорозиви) су саставни делови детерџената за машинско прање веша; додају се са циљем заштите машине за прање веша од

корозије. Fung et al. истичу да је натријум силикат најчешће коришћен антикорозив (Fung et al., 2007).

Табела 11. Најчешћи конзерванси који се користе у средствима за прање – према INCI номенклатури (Правилник о детергентима, Службени гласник РС 40/10)

CAS број	Назив конзерванса
64-18-6	Мравља киселина
2634-33-5	1,2-бензизотиазол-3(2H)-он
65-85-0	Бензоева киселина
120-32-1	Хлорофен
2372-82-9	N-(3-аминопропил)-N-додецилпропан-1,3-диамин
14548-60-8	(Бензилокси) метанол 1
6440-58-0	1,3-бис (хидроксиметил)-5,5-диметилимидазолидин -2,4-дион
35691-65-7	2-bromo-2-(bromometil)pentandinitril
52-51-7	Бронопол
7492-55-9	Калцијум дихекса-2,4-диеноат
133-06-2	Каптан
123-03-5	Цетилпиридинијум хлорид
1310-73-2	Натријум хидроксид
26172-55-4	Метилхлороизотиазолинон
88-04-0	Хлорксиленол
59-50-7	Хлоркрезол
79-07-2	2-хлороацетамид
1777-82-8	2,4-дихлоробензил- алкохол
97-23-4	Дихлорофен
16731-55-8	Дикалијум-дисулфит
51200-87-4	4,4-диметилорказолидин
7681-57-4	Натријум-мета сулфит
2527-58-4	2,2'-дитиобис [N-метилбензамид]
64-17-5	Етанол
7747-35-5	7а-етилдихидро-1Н,3Н,5Н-оксазол [3,4-с]оксазол
50-00-0	Формалдехид
26172-55-4	Метилхлороизотиазолинон
18472-51-0	Хлорхексидин -диглуконата
107-22-2	Глиоксал
110-44-1	Сорбинска киселина

Адитиви против стварања пене (антипенушавци) се додају детергентима да би се спречило превише стварање пене (коју стварају сурфактанти током

прања), која би ометала уклањање нечистоћа. Fung et al. наводе позитивну страну стварања умерене количине пене, јер се тиме ствара заштитни слој околу одеће и спречава треће са осталим тканинама (Fung et al., 2007). Smulders et al. као пример ове врсте адитива наводе силиконе и сапуне (Smulders et al., 2007).

*Градитељи детерџента* су важна компонента, а имају улогу да „омекшају“ воду везивањем за катјоне магнезијума и калцијума, чиме се повећава дејство детерџента. Градитељи одржавају алкалност воде, па самим тим се понашају као пуфери. Натријум триполифосфат, као градитељ, показује високу примену, ниску токсичност, али са друге стране преко отпадних вода, доспевајући у површинске воде, може да изазове еутрофикацију и самим тим смањену доступност кисеоника акватичним организмима. Smulders et al. као градитеље, наводе зеолит А и натријум силикат (Smulders et al., 2007).

У састав детерџента осим претходно наведених улазе и парфема (дају карактеристичан мирис детерџенту) и везива (имају улогу у везивњу свих компоненти детерџента у компактну целину).

#### **2.4. БИОРЕМЕДИЈАЦИЈА ДЕТЕРѢНТА**

Watanabe наводи да биоремедијација представља технологију која се заснива на чишћењу загађене животне средине путем метаболичке активности микроорганизама (Watanabe, 2001). Са друге стране Merrettig-Bruns & Jelen сматрају да је „биоремедијација микробна деградација органских супстанци“ (Merrettig-Bruns & Jelen, 2009). Balson & Felix дефинишу биоремедијацију као „способност микроорганизама да уништи хемикалије својом метаболичком активношћу“ (Balson & Felix, 1995).

Биоремедијација зависи од врсте микроорганизама, врсте загађивача и локалитета (USEPA, 1996). Mudrack & Kunst сматрају да су осим поменутог битни и следећи фактори (Mudrack & Kunst, 1994):

- а) расположивост органског супстрата који подлеже биоремедијацији;
- б) укупан број и врсте микроорганизама који су метаболички активни;
- в) услови средине – садржај воде, температура, рН, растворени кисеоник (висока температура и аеробни услови средине повољно утичу на процес биоремедијације) (Sukanya & Swarnalatha, 2015).

Од микроорганизама укључених у процес биоремедијације посебно се истичу бактерије и гљиве. Sukanya & Swarnalatha су на основу истраживања закључили да велику способност биоремедијације имају врсте бактерија *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp*, *Staphylococcus albus* (Sukanya & Swarnalatha, 2015). Sushma et al. наводе да бактерије истог рода, различите врсте имају различиту способност биоремедијације. *Bacillus subtilis* има већу способност биоремедијације коју постиже у року од 24 сата инкубације у подлози са детергентом у односу на врсту *Bacillus cereus* којој је потребно време од 72 сата (Sushma et al., 2015).

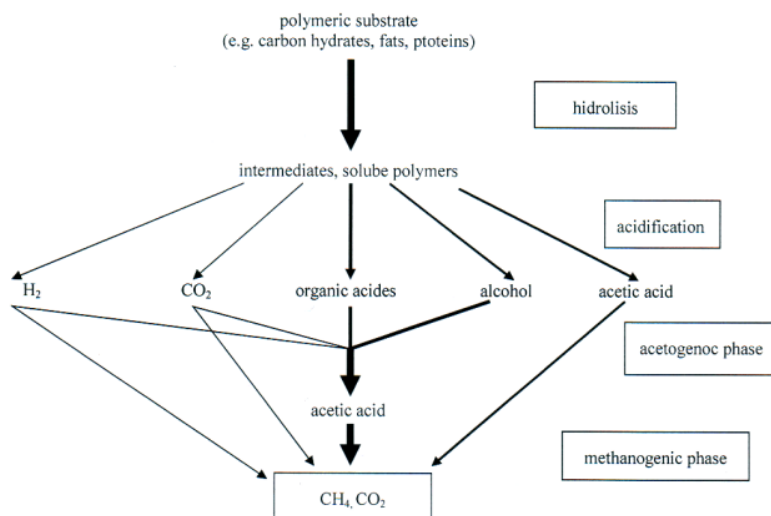
За разлику од великог броја врста бактерија које показују способност биоремедијације, мањи је број врста гљива које у потпуности доводе до разградње, што указује да су бактерије у предности у односу на гљиве и друге микроорганизме. Amiy et al. наводе да детерџенти се за прање веша у потпуности разградјују од стране водених гљива (Amiy et al., 2013). Са друге стране Јаковљевић и Врвић указују на јасну разлику у деградацији детерџента од стране различитих водених гљива. Највећу способност разградње детерџента имају врсте *M. racemosus* и *T. harzianum*, што је очекивано обзиром на локалитет одакле су изоловане (индустријске отпадне воде фабрике за производњу детерџената Хенкел–Крушевац). За разлику од њих врсте гљива *A. niger*, *P. cyclopium* показале су мањи степен деградације, јер су изоловане са других локалитета (Јаковљевић и Врвић, 2016).

Биоремедијација детерџента може бити:

а) *Примарна* – подразумева разградњу сурфактанта под утицајем ензима микроорганизама, што условава промену молекула сурфактанта и губљење његовог активног својства (Merrettig-Bruns & Jelen, 2009). Уколико сурфактант у детерџенту подлеже само примарној биоремедијацији, а не подлеже потпуној биоремедијацији може бити коришћен само у индустријске сврхе (Службени Гласник РС бр 40/10).

б) *Дефинитивна биоремедијација* – означава се као минерализација и односи се на потпуну разградњу сурфактанта од стране микроорганизама до неорганског сулфата, угљен диоксида и воде, стварајући сопствену биомасу (Merrettig-Bruns & Jelen, 2009; Јаковљевић, 2014).

в) *Аеробна биоремедијација* – подразумева разградњу органских материја у воденој средини у присуству кисеоника под утицајем једне врсте микроорганизама (Merrettig-Bruns & Jelen, 2009). Pedro & Walter наводе да током овог типа биоремедијације микроорганизми од органског полутанта користе угљеник и енергију, са једне стране, а са друге стране органски полутант им користи као супстрат, чиме је деградација потпуна, што се означава као кометаболизам (Alvarez & Illman, 2006).



Слика 6. Ток анаеробне биодградације детердента (Merrettig-Bruns & Jelen, 2009)

г) *Анаеробна биоремедијација* – обавља се у одсуству кисеоника, уз учешће различитих врста микроорганизама (Merrettig-Bruns & Jelen, 2009). Представља сложен процес (Слика 6); примењује се у случају да су полутанти и даље присутни у животној средини и ни једним типом биоремедијације нису уклоњени.

### **3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**

Постављени циљеви истраживања докторске дисертације су:

- 1) Утврђивање физичко-хемијских и микробиолошких параметара површинске воде Западне Мораве на одређеним локалитетима (од улива градског колектора – узводно и низводно) где се изливају отпадне воде (канализационе, индустријске);
- 2) Изоловање и идентификација микромицета површинских вода у сливу Западне Мораве на одабраним локалитетима;
- 3) Испитивање утицаја 0,3%-не концентрације комерцијалног детерџента „Мерикс“ на раст, развој, биохемијске карактеристике и продукцију биомасе изолованих микромицета;
- 4) Одређивање метаболичког потенцијала изолованих микромицета у пречишћавању отпадних вода.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

### 4.1. УЗОРКОВАЊЕ ВОДЕ

Током истраживања на територији општине Чачак обављено је узорковање речне воде средњег тока Западне Мораве са три различита профила:

1. Профил I (N 43° 54' 26,82" / E 20° 13' 54,48") се налази на 500 m низводно од бране ХЕ „Међувршје“, на 182 km речног тока.
2. Профил II (N 43° 53' 57,59" / E 20° 20' 28,0") се налази код С.Р.Ц „Младост“, на 170 km речног тока.
3. Профил III (N 43° 53' 07,61" / E 20° 22' 47,77") се налази испод моста на кружном путу око Чачка, на 169 km речног тока.

Узорковање, транспорт узорка и анализе површинске воде на терену рађени су према захтевима SPRS ISO 5667-1:2008; SRPS EN ISO 5667-3:2017; SRPS EN ISO 5667-6:2017. Узорци воде су транспортовани у лабораторију на даље анализе изузев за оне који су морали бити одређени на месту узорковања. За микробиолошку анализу, узорци су сакупљени у стерилне боце од 500 mL, а затим на 4 °C транспортовани и чувани до даљих анализа.

### 4.2. МЕРЕЊЕ ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКИХ И МИКРОБИОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА

Мерење физичко-хемијских и микробиолошких параметара квалитета узорака површинске воде Западне Мораве, обављена су у лабораторијама Завода за јавно здравље у Чачку стандардним методама, три пута (шест) у току године. У истраживањима су коришћене следеће стандардне методе:

#### 4.2.1. Мерење температуре воде – испитано стандардном методом SRPS H. Z1.106:1970

Температура воде је измерена одмах на месту узорковања воде уроњањем живиног термометра у воду и прочитана је тек када се температура на термометру усталила.

#### 4.2.2. Мерење рН вредности воде – испитано стандардном методом ISO 10523:2008

Мерење рН вредности је базирано на мерењу разлике потенцијала на електрохемијској ћелији коришћењем рН-метра СТ-6023 одмах на месту узорковања воде.



#### **4.2.3. Мерење концентрације раствореног кисеоника – испитано стандардном методом SRPS ISO 5814:1994**

Концентрација раствореног кисеоника се мери уз помоћ електроде галванског типа. У воду која се испитује је уроњена електрода галванског типа (нпр. олово/сребро) која садржи електролит и две металне мембране. Струја која се ствара директно је пропорционална брзини транспорта кисеоника кроз мембрану и спој електролита, а стога и парцијалном притиску кисеоника у узорку на датој температури. Да би се израчунао проценат zasiћења узорка у контакту са атмосфером, неопходно је укључити ефективни притисак. Ово је може или извести, или се одређује тако што се укључи сензор за компензацију притиска. Салинитет такође може имати утицаја на резултате.

#### **4.2.4. Мерење биохемијске потрошње кисеоника (после 5 дана) – БПК<sub>5</sub>, испитано стандардном методом AWWA 5210D**

Респирометријска метода омогућава директно мерење кисеоника конзумираног од стране микроорганизама из ваздуха или кисеоником засићене средине у затвореним судовима под условима константне температуре. Узорци воде су сакупљени у стаклене боце су пре анализе промућкани да би се обезбедило да се њихов садржај добро хомогенизује када се узима део узорка за испитивање. Након тога узорци се центрифугирају а пре почетка испитивања узорци се термостатирају на  $20 \pm 1$  °C. Петодневна биохемијска потрошња кисеоника (БПК<sub>5</sub>) се одређује као разлика концентрација кисеоника одређена одмах на месту узорковања и кисеоника после петодневне инкубације у мраку на  $20 \pm 1$  °C.

#### **4.2.5. Мерење хемијске потрошње кисеоника ХПК – испитано стандардном методом SRPS ISO 6060:1994**

За мерење хемијске потрошње кисеоника, узорци воде су сакупљени у пластичне или стаклене боце након чега су конзервирани додатком 10 mL 4 mol сумпорне киселине на 1 L узорка. Најпоузданији резултати се добијају ако се узорак анализира што је пре могуће а најкасније у року од 5 дана. Аналит је одређиван спектрофотометријски комерцијалним китовима. Оксидабилне супстанце реагују са сумпорном киселином-калијум дихроматом у присуству

сребро сулфата као катализатора. Сметње услед присуства хлорида су уклањане живиним сулфатом. Редукција до жутог обојења хрома  $\text{Cr}^{+6}$  је била видљива.

#### **4.2.6. Мерење укупног органског угљеника (TOC) – испитано методом SRPS ISO 8245:2007**

Коришћењем ове методе, одређивана је концентрација органски везаног угљеника у води. Концентрација укупног органског угљеника је одређивана мерењем концентрације  $\text{CO}_2$  насталог оксидацијом органског угљеника а мерена је уз помоћ ТОС-кита, спектрофотометријски. Овај параметар је мера контаминације воде органским материјама и степена биодеградације органских материја приступних на површини и у отпадним водама.

#### **4.2.7. Мерење концентрације укупног азота – испитано методом SRPS EN 25663:2009**

Укупни Kjeldal-азот представља збир органског азота и  $\text{NH}_4$ , нитрата ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) и нитрита ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ). Прво је вршена минерализација узорка до амонијум-сулфата из којег је ослобођен амонијак. За превођење азотних једињења у амонијум-сулфат коришћена је минерализација узорка сумпорном киселином уз присуство високе концентрације калијум-сулфата. Ослобађање амонијака из амонијум-сулфата постигнуто је додатком алкалије и дестилацијом у раствору борне киселине/индикатора. Амонијум јон је одређиван у дестилату, титрацијом са стандардном киселином. Алтернативно, амонијум јон се може одредити директно у минерализованом узорку спектрофотометријски на 655 nm.

#### **4.2.8. Мерење концентрације нитрата у води – испитано спектрофотометријски методом P-V-31/C:2018**

За ову методу, узорак воде је сакупљен у пластичној боци а резултати су читавани најкасније након три сата од узорковања. Аналит је одређиван спектрофотометријски на 220 nm. Нитратни јони у раствору који садржи сумпорну и фосфорну киселину реагују са 2,6 ди-метил фенолом до формирања 4-нитро-2,6 диметилфенола. Пошто растворене органске супстанце могу такође апсорбовати на 220 nm, а нитрати не апсорбују на 275 nm, друго мерење је вршено на 275 nm да би се кориговала вредност за нитрате.

**4.2.9. Мерење концентрације нитрита у води – испитано спектофотометријски према SRPS EN 26777:2009**

Принцип мерења се заснива на реакцији нитрита са реагенсом 4-аминобензен сулфонамидом у присуству ортофосфорне киселине при рН вредности 1,9, када настаје diazонијум со која формира ружичасту боју са N-(1-нафтил)-1,2-диаминоетан дихидрохлоридом. Интензитет боје је мерен на УВ/Вис спектрофотометру на таласној дужини од 540 nm.

**4.2.10. Мерење концентрације укупног фосфора - испитано спектрометријски коришћењем методе са амонијумолибдатом (SRPS EN ISO 6878:2008)**

За ову анализу, узорци воде су прикупљени у стакленим боцама. Реакцијом ортофосфатних јона са киселим раствором који садржи молибдат и јоне антимиона формира се антимион-фосфо-молибдатни комплекс. Редукцијом комплекса са аскорбинском киселином формира се интензивно плаво обојен молибденски комплекс. Мерењем апсорбанце овог комплекса одређена је концентрација присутних ортофосфата.

**4.2.11. Мерење концентрације хлорида - испитано методом SRPS ISO 9297/1:2007**

Ова метода се користи за одређивање концентрације хлоридних јона уз помоћ титрације са сребро нитратом. Крајња тачка титрације настаје када се сви хлоридни јони исталоже и када јони сребра одреагују са хроматним јонима индикатора калијум хромата уз формирање црвено-браон талога од сребро хромата. Концентрација хлорида је пропорционална количини утрошеног сребро-нитрата за титрацију.

**4.2.12. Мерење концентрације сулфата – испитано методом SRPS H.C8.215:1989**

Принцип методе се заснива на гравиметријском одређивању концентрације сулфата где је као таложни реагенс коришћен водени раствор баријумове соли.

**4.2.13. Мерење електропроводљивости – испитано методом SRPS EN 27888:2009**

За ову методу, узорци воде су сакупљени у полиетиленске боце које су напуне до врха и снажно затворене (стаклене боце се не могу користити). Мерење

проводљивости се врши што је брже могуће, посебно ако постоји могућност измене гасова као што су угљендиоксид и амонијак са атмосфером, или могућност биолошке активности. Узорци су остављани да се уравнотеже на референтну температуру од 20 °C, пре мерења проводљивости. Мерење је извршено апаратом Combo pH/Conductivity/TDS Tester HI98129 (Hanna Instruments Ltd., Woonsocket, Rhode Island).

#### **4.2.14. Мерење концентрације суспензованих материја - испитано методом P-IV-9 - гравиметријска метода**

За узорковање и складиштење воде могу се користити пластичне боце (канистери) као и боце од борсиликатног стакла. Концентрација суспендованих материја је одређивана гравиметријском методом филтрацијом стандардним филтром од стаклених микровлакана и сушењем на 105 °C до константне тежине.

#### **4.2.15. Број укупних колиформних бактерија и број фекалних колиформних бактерија (*Escherichia coli*) – испитано методом SRPS EN ISO 9308-2:2015 (IDEXX Colilert - 18/Quanti-Tray/2000)**

Овом методом се симултано детектује бројност укупних колиформних бактерија и број фекалних колиформних бактерија (*E.coli*) у води. Метода се заснива на технологији дефинисаног супстрата (DST). Када колиформи метаболишу ONPG (нутријент индикатор Colilerta) узорак се обоји у жуту боју. У случају да *E. coli* метаболише нутријент индикатор, MUG, који се такође налази у Colilert-у, узорак флуоресцеира под UV лампом. На Colilert 18 (дехидрирана гранулирана подлога), детектују се наведене бактерије при концентрацији од 1 CFU/100 mL.

Стерилна тест посуда је напуњен са 90 mL стерилне дестиловане воде у коју је додат садржај једног Colilert-18 снар паковања. Посуда је затворена и благо промућкана док се реагенс није растворио. У другу бочицу је додато 9,8 mL стерилне дестиловане воде, а затим 0,2 mL добро промешаног узорка. Садржај друге бочице је добро хомогенизован и сипан у тест бочицу. Садржај тест бочице је пресипан у Quanti-Tray тацну (паковање од 100 тацница) и тацна је заварена у Quanti-Tray Sealer-у, који је остављен у инкубатор на 36 °C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) током 18 до 22 часова. Након инкубације, избројани су позитивни велики и мали базенчићи и на MPN табели (која иде уз Quanti-Tray тацне) је пронађена MPN вредност. Очитана MPN вредност је помножена са 500, колико износи разблажење узорка. Тако је

добijена вредност за укупне колиформне бактерије. Затим је тацна стављена у УВ кабинет, укључена је УВ лампа и посматрана појава плаве флуоресценције. Бројани су позитивни велики и мали базенчићи који су флуоресцеирали плаво и читавана MPN вредност. Читана MPN вредност је била помножена са 500, колико износи разблажење узорка. Тако је добијена вредност за бројност *E. coli*. Резултати који су били негативни су после 18 сати враћани на поновну инкубацију до 22 сата, а затим поново читавани. Позитивни резултати пре 18 сати и негативни после 22 сата су такође валидни.

#### **4.2.16. Број фекалних ентерокока – испитано методом IDEXX Enterolert-E/Quanti-Tray/2000**

Enterolert-E (дехидрирана гранулирана подлога) се користи за детекцију ентерококе као што су *E. faecium* и *E. faecalis* у узорку површинске воде. Заснива се на IDEXX-овој патентираној технологији дефинисаног супстрата (Defined Substrate Technology® - DST®). Када ентерококе користе свој ензим  $\beta$ -glucosidazu да би метаболисале нутријент индикатор Enterolerta-E, 4-methyl-umbelliferyl  $\beta$ -D-glucoside, узорак флуоресцира. Enterolert-E детектује ентерококе у броју CFU на 100 mL узорка у току 24 часа.

Стерилна тест посуда је напуњена са 97,5 mL стерилне дестиловане воде и у њу је додат садржај једног Enterolert-E snap паковања. Посуда је затворена и благо промућкана док се реагенс није растворио. У њу је потом додато 2,5 mL добро промешаног узорка и све је хомогенизовано. Садржај тест бочице је сипан у Quanti-Tray и тацну и затворен у Quanti-Tray Sealer-у. Тако припремљен узорак у тацни је стављан у инкубатор на 41 °C ( $\pm$  0,5 °C) током 24 до 28 часова. Након инкубације, тацна је стављана у УВ кабинет, укључена лампа снаге 6 W таласне дужине 365 nm, и бројани су позитивни велики и мали базенчићи који флуоресцирају плаво. На MPN табели која је обезбеђена уз Quanti-Tray је пронађена MPN вредност, која је помножена са 40, колико износи разблажење узорка. Тако се добија вредност за фекалне ентерококе

#### **4.3. ИЗОЛОВАЊЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЈА ГЉИВА ИЗ ОТПАДНИХ ВОДА ЗАПАДНЕ МОРАВЕ**

Прикупљени узорци отпадних вода су засејани (1 mL) у стерилним Петри посудама са стерилном подлогом, малтозним агаром (МА) који је, ради

инхибирања бактеријског раста, садржао антибиотик стрептомицин. Засејани узорци су инкубирани на собној температури ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), у трајању од 5 дана. Након тога је, на стерилисаном кромпир декстрозном агару (Potato Dextrose Agar – PDA) без стрептомицина, извршено изоловање чистих култура развијених гљива. Добијене чисте монокултуре гљива су идентификоване на катедри за Алгологију и микологију Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу, према кључевима за детерминацију коју су описали Samson & Frisvard (2004a, 2004b) и Pitt & Hocking (2009). Приликом идентификације, праћене су макроморфолошке (пречник колоније, боја, текстура, пигментација, наличје колоније, ексудати) и микроморфолошке (метуле, фијалиде, конидије, хифе итд., и њихова дужина, пречник, величина и облик) карактеристике гљива (Samson & Frisvard, 2004a, 2004b; Pitt & Hocking, 2009; Kocić-Tanackov, 2012).

#### 4.4. ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ДЕТЕРЦЕНТА НА РАСТ, РАЗВОЈ, БИОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ И ПРОДУКЦИЈУ БИОМАСЕ ИЗОЛОВАНИХ ГЉИВА

Изоловане различите врсте гљива су гајене <sup>2</sup> на косом PDA до спорулације, на собној температури ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), у трајању од 5–7 дана.

Након тога су од развијених спора гљива припремљене суспензије у 10 mL стерилне дестиловане воде. Споре су бројане под микроскопом, помоћу Neubauer-ове коморе у три понављања, а њихова финална концентрација је била подешена на  $10^6$  спора/mL.

Од припремљене суспензије сваке испитиване гљиве је засејан по 1 mL у два стерилна ерленмајера која су садржала по 200 mL стерилног Чапек-Доксовог бујона (Czaprek Dox Broth - CDB) модификованог хемијског састава (вредност pH подлоге је подешена на pH 4,7 помоћу раствора 1 mol/L хлороводоничне киселине (HCl)).

Након тога је у један од два ерленмајера додат детерцент (Д), тако да је његова финална концентрација била 0,3% (w/v), а други ерленмајер је коришћен као контрола (К).

Оба ерленмајера са узорцима су инкубирана током 16 дана, на собној температури ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), и на електричној тресилици марке Kinetor, подешеној на 250 обртаја у минути. Узорци за даљу анализу су узимани након 3, 6, 9, 12 и 16 дана од почетка инкубације.

Из сваког ерленмајера је одмерено по 10 mL течности, која је ради уклањања трагова мицелије, филтрирана кроз филтер папир Whatman, а затим центрифугирана на 10.000 обртаја, у трајању од 10 минута, на +4 °C. Оглед је рађен у три понављања.

У добијеним узорцима идентификованих родова гљива, су одређени следећи параметри:

- биомаса гљива,
- рН вредност,
- редокс потенцијал,
- концентрација протеина,
- концентрација слободних органских киселина,
- концентрација укупних органских киселина,
- активност алкалне фосфатазе,
- активност алкалне инвертазе.

#### **4.4.1. Одређивање биомасе гљива**

Биомаса гљива је одређена на крају огледног периода, након 16 дана од почетка експеримента. Филтрирање мицелија гљива је извршено кроз филтер папир Whatman No 1. Мицелије су затим сушене у сушници на температури 80 °C током 24 сата, и у ексикатору, изнад концентроване H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, до константне тежине.

Биомаса гљива је одређивана као разлика масе филтер папира са мицелијом и масе празног филтер папира (маса папира је измерена пре филтрирања мицелије). Вредности биомасе су изражене у грамима по милилитру ферментационе течности (g/mL).

#### **4.4.2. Одређивање рН вредности и редокс потенцијала**

рН вредност и редокс потенцијал (изражен у mV) су мерени истовремено. Наведени параметри су праћени и мерени након 3, 6, 9, 12 и 16 дана од почетка експеримента. Мерења су обављена дигиталним електричним пехаметром (PHS-3BW Microprocessor pH/mV//Temperaturemeter) тип Банте (Bante) са стакленом електродом, модел 65-1.

Вредности су очитаване непосредно пре инокулације течних подлога спорама (0-тог дана), и у различитим фазама развоја гљива, односно након 3, 6, 9, 12 и 16 дана од почетка експеримента.

#### 4.4.3. Одређивање садржаја протеина

За одређивање концентрације протеина је коришћена Lowry-ева метода (Lowry et al., 1951), која подразумева припрему следећих реагенаса и раствора:

Реагенс 1: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1 mol/L (0,1 M) NaOH 2% K-Na-тартарат;

Реагенс 2: 1%  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ;

Реагенс 3: 2% K-Na-тартарат;

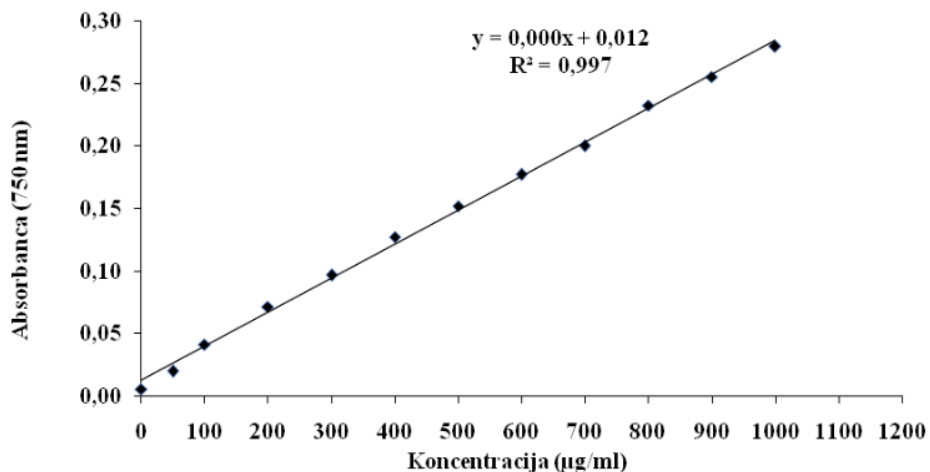
Реагенс 4: смеша од по 1 mL реагенса 2 и 3, и 98 mL реагенса 1;

Реагенс 5: Folin-Chicalteau-ов (F-C) реагенс: 10 mL F-C реагенса и 20 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

Припремљен је алкални реагенс који садржи 2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  растворен у 0,1 mol/L NaOH, 1% (w/v)  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  и 2% (w/v) раствор K-Na-тартарата.

Раствор непознате концентрације – проба (епрувета 1): у 0,2 mL узорка филтрата је додато 3 mL реагенса 4. Садржај епрувете је промешан и након 10 min је додато 0,6 mL F-C реагенса, промешано и остављено 30 min до појаве плаве боје.

Раствори познатих концентрација – контрола (епрувете 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9): у 0,2 mL говеђег серума BSA (Bovine Serum Albumin), различитих концентрација (0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,85) је додато 0,2 mL дестиловане воде и 3 mL реагенса 4. Садржај епрувете је промешан и након 10 min је додато 0,6 mL F-C реагенса, промешано и остављено 30 min до појаве плаве боје.



Графикон 1. Стандардна права за одређивање садржаја протеина



Слепа проба (бланк), епрувета 10: 3 mL реагенса 4 и 0,2 mL дестиловане воде, садржај епрувете је промешан и након 10 min је додато 0,6 mL (F-C) реагенса, промућкано и остављено 30 min до појаве плаве боје.

Садржај протеина у узорку је одређиван спектрометријски, апсорбанца је читавана на 750 nm. За конструисање стандардне криве коришћен је говеђи серум (BSA). Калибрациони дијаграм је приказан на Графикону 1.

#### 4.4.4. Одређивање концентрација слободних и укупних органских киселина

Количина слободних и укупних органских киселина је одређивана методом титрације етанолског екстракта ферментационе течности и његовим пропуштањем кроз јоноизмењивачке колоне – катјонске и анјонске (Amberlite IR-120).

Потребан материјал:

- катјонске и анјонске колоне (Amberlite IR-120),
- концентровани етанол,
- фенолфталеин,
- активни угаљ,
- 0,1 mol/L NaOH,
- HCl.

За одређивање концентрације слободних органских киселина је узето 10 mL узорка, коме је додато 50 mL етанола (70%). Након мешања, смеша је инкубирана у воденом купатилу на температури од 70 °C, у трајању од 90 min. Добијена смеша је затим филтрирана кроз гуч, који је испран са 10 mL дестиловане воде. Узорак је затим упараван на температури од 50-60 °C и под притиском од 25 mm Hg (3.33306 GPa), док се запремина смеше није смањила за половину.

У нормалан суд (запремине 100 mL) је сипана кашичица активног угља и додат упарени узорак, а затим је инкубиран у воденом купатилу у трајању од 45 min на температури од 70 °C. Након тога је, у други нормалан суд од 100 mL, извршена филтрација узорка кроз филтер папир са плавом траком, а активни угаљ је испран дестилованом водом до запремине нормалног суда (100 mL).

Од тако добијеног узорка је у ерленмајер одмерено 10 mL, додато 2–3 капи индикатора фенолфталеина (0,1%) и затим вршена титрација. Титрација је вршена

помоћу 0,1 М NaOH до промене боје. Концентрација слободних органских киселина је одређена на основу концентрације утрошеног 0,1 М NaOH.

За одређивање концентрације укупних органских киселина је неопходно извршити активацију катјонске јоноизмењивачке колоне. У дестилованој води је током 24 сата остављена смола да бубри, након чега је вода одливена до 1 mL изнад смоле, и додато је 10 mL HCl-а (кап по кап), до појаве црвене боје. Да би дошло до неутрализације индикатора (појаве жуте боје), неопходно је испирање колоне дестилованом водом. Додавањем 10 mL NaOH, индикатор постаје плаве боје. Дестилованом водом је извршена неутрализација до појаве жуте боје, након чега је додавано 10 mL HCl до промене боје индикатора у црвено. Потом, је вршена неутрализација као у предходном случају до појаве жуте боје.

Кроз активiranу катјонску јоноизмењивачку колону је пропуштено преосталих 90 mL узорка, у нормалан суд (250 mL). Смола задржава аминокиселине, пропушта органске киселине (слободне и везане) и угљене хидрате. Колоне се испирају дестилованом водом до ознаке нормалног суда.

За одређивање концентрације укупних органских киселина, из нормалног суда запремине 250 mL, је одмерено 25 mL узорка, додато 2 капи фтенолфталеина и титрирано до појаве ружичасте боје са 0,1 М NaOH. Концентрација укупних органских киселина је одређена на основу концентрације утрошеног 0,1 М NaOH.

На катјонској смоли су остале везане аминокиселине које су елуиране са 4 mol/L NH<sub>4</sub>OH до алкалне реакције (плава боја на индикатору). Добијени елуат је затим концентрован на 60 °C под сниженим притиском до запремине од 1–2 mL.

#### 4.4.5. Одређивање ензимске активности алкалне фосфатазе

Ензимска активност алкалне фосфатазе је одређивана Allen-овом методом на основу концентрације неорганског фосфора (Allen, 1940). Ензимска активност је мерена у реакционој смеши која је садржала 1 mL гликолног пуфера (pH 9,0) са Mg<sup>2+</sup>, 1 mL ензимског екстракта и 1 mL β-глицерофосфата (супстрата). Епрувете са реакционом смешом су инкубиране на 37 °C у трајању од 30 min. После инкубације је ензимска реакција прекинута додавањем 3 mL 10%-ног раствора трихлоросирћетне киселине (Trichloroacetic acid - TCA). Затим су епрувете стављене на лед да се охладе око 15 min, након чега је њихов садржај филтриран и филтрат сакупљен. Контролне епрувете су припремљене на исти начин, с тим што

није вршена инкубација, већ је одмах додат ТСА, након чега су епрувете држане на леду и после 15 min је извршено филтрирање.

#### 4.4.6. Одређивање ензимске активности алкалне инвертазе

Ензимска активност алкалне инвертазе је одређена методом Sumner-а и Howell-а (Sumner & Howell, 1935).

За одређивање активности алкалне инвертазе у ферментационој течности гљива је припремљена реакциона смеша која је садржала 0,5 mL сировог ензимског екстракта, 0,5 mL 0,02 mol/L фосфатног пуфера (pH 8.0) и 1 mL 1% (w/v) сахарозе.

У првој епрувети (проба) садржај је мешан и инкубиран у воденом купатилу на 37 °C у трајању од 15 min. У другу контролну епрувету су додати сви састојци као у пробну епрувету, а затим је епрувета стављена на лед до краја инкубације. Након тога је одмерено по 1 mL од садржаја из обе епрувете и додато по 2 mL динитросалицилног реагенса. Пробне епрувете су инкубиране на 100 °C у трајању од 5 min. Епрувете су затим охлађене на собној температури и након тога је спектрофотометријски на 540 nm одређивана концентрација ослобођених редукујућих шећера (Miller, 1959).

#### 4.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Резултати свих експеримената су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. За статистичку анализу коришћен је Mann–Whitney-ев тест, који је спроведен коришћењем SPSS (Chicago, IL) статистичког софтверског пакета (SPSS for Windows, v. 13, 2004). Коефицијент корелације је тестиран на нивоу значајности 0,05, 0,01 и 0,001.

## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 5.1. РЕЗУЛТАТИ МЕРЕЊА ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКИХ И МИКРОБИОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА ПОВРШИНСКЕ ВОДЕ ЗАПАДНЕ МОРАВЕ НА ТРИ РАЗЛИЧИТА ЛОКАЛИТЕТА

Квалитет <sup>1</sup> воде у животној средини се може оценити на основу анализе абиотичких параметара, на пример температуре, рН вредности, електропроводљивости, садржаја анјона и катјона и др., али и биотичких параметара. Познато је да свака врста водених организама има одређене преференције према квалитету воде, односно може да толерише већи, или мањи степен загађења (Simić & Simić <sup>1</sup> 2012). Оцена квалитета површинских вода вршена је на основу Правилника о параметрима еколошког и хемијског статуса површинских вода и параметрима хемијског и квантитативног статуса подземних вода (Sl. glasnik RS 74/11).

Мерење физичко-хемијских параметара квалитета површинске воде Западне Мораве, која су обављена у лабораторијама Завода за јавно здравље у Чачку стандардним методама, три пута (шест) у току године дато је у Табели 12.

Температура површинске воде Западне Мораве је измерена коришћењем стандардизоване методе (SRPS H.Z1.106:1970) и у тренутку узорковања је износила 12,1 °C (Табела 12). Температура отпадне воде је параметар који утиче на промену растворљивости гасова, брзину хемијских реакција и биолошку активност у водопријемнику. Са повећањем температуре водопријемника се интензивирају биохемијске реакције, чиме се смањује концентрација раствореног кисеоника, односно долази до негативних последица по живи свет у води. Поједине индустријске отпадне воде (нарочито расхладна вода) имају значајно повишену температуру (Tejaswini et al., 2020).

Мерење рН вредности површине воде Западне Мораве је утврђено стандардном методом (ISO 10523:2008). За температуру воде од 22 °C, измерена вредност рН је износила 7,9 (Табела 12). <sup>1</sup> У природи, изузетно висок или низак ниво рН вредности воде се често доводи у везу са недостатком <sup>1</sup> храњивих материја, токсичношћу метала и другим проблемима везаним за живот у води.

Висока рН вредност воде чини амонијак токсичним. Ниска рН вредност воде повећава растворљивост већине тешких метала као што су цинк и бакар.

Табела 12. Физичко-хемијски параметри квалитета површинске воде Западне Мораве

Параметри испитивања	Добијене вредности	Класа еколошког статуса				
		I	II	III	IV	V
Температура	12,1 °C					
рН вредност 22,0 °C	7,9	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	< 6,5; < 8,5
Растворени кисеоник	7,9 mg O <sub>2</sub> /L	8,5	7,0	5	4	< 4
БПК <sub>5</sub>	6 mg O <sub>2</sub> /L	1,8	4,5	7	25	> 25
ХПК	11,2 mg O <sub>2</sub> /L	10	15	30	125	> 125
Укупни органски угљеник	2,4 mg/L	2,0	5,0	15	50	> 50
Укупни азот	3,3 mg N/L	1	2	8	15	> 15
Нитрати	2,3 mg/L	1,5	3,0	6	15	> 15
Нитрити	0,08 mg/L	0,01	0,03	0,12	0,3	> 0,3
Укупни фосфор	0,05 mg/L	0,05	0,20	0,4	1	> 1
Хлориди	12,8 mg/L	50	100	150	250	> 250
Сулфати	20,6 mg/L	50	100	200	300	> 300
Електропроводљивост	379 μS/cm	<1000	1000	1500	3000	> 3000
Суспензоване материје	12 mg/L	25	25	/	/	/

БПК<sub>5</sub>-биолошка потрошња кисеоника после 5 дана; ХПК-хемијска потрошња кисеоника

<sup>1</sup> Природне воде често одсликавају рН вредност земљишта преко/кроз које се крећу. Индустијске, комуналне и воде са пољопривредних површина могу имати значајно вишу или нижу рН вредност. Током цветања алги, њихова фотосинтеза утиче на повишење рН воде. Ово је посебно карактеристично за стагнантне или споротекуће воде, зато што алге апсорбују биокарбонате, из којих при фотосинтези користе CO<sub>2</sub> и том приликом излучују хидроксилни јон који повећава рН воде. У екстремним случајевима она може прећи рН 10, изазивајући низ хемијских реакција које се негативно одржавају на живе организме (Wesley, 1999).

У оквиру испитивања површинске воде Западне Мораве, мерење концентрације раствореног кисеоника је извршено применом стандардне методе (SRPS ISO 5814:1994). Резултати су показали да је вода на 22 °C садржала 7,9

mg/L раствореног кисеоника (Табела 12). Добијена вредност указује да испитана вода спада у II (другу) класу еколошког статуса (Гргинчевић и Пујин, 1998). Концентрација раствореног кисеоника представља један од основних показатеља квалитета воде. У воденим екосистемима, на концентрацију раствореног кисеоника највише утиче активност водених организама. Поред тога, његова концентрација варира у зависности од мноштва чинилаца, међу којима су најважнији температура воде, салинитет воде, осветљеност водене површине и бројност и активност фотосинтетичких организама (Simić & Simić, 2012).

Биолошка потрошња кисеоника (БПК) је концентрација кисеоника искоришћена од стране бактерија и других микроорганизама потребна да се изврши биолошка оксидација присутних биолошки разградивих састојака воде (Sopawane et al., 2020). Мерење биолошке потрошње кисеоника у води Западне Мораве после 5 дана (исказане као БПК<sub>5</sub>) је извршено стандардном методом (AWWA 5210D). Према расположивим подацима Завода за јавно здравље Чачак, регистровано је одступање квалитета воде од Правилника захтевне класе воде у односу на граничну вредност БПК<sub>5</sub>. Добијена вредност за површинску воду Западне Мораве је износила 6 mg O<sub>2</sub>/L (Табела 12). Ово одступање указује да се ова вода не налази конкретно ни у једној класи еколошког статуса, већ између II и III класе. **Аеробне бактерије у води врше интензивно разлагање органских материја и при томе троше значајне концентрације раствореног кисеоника. Ови процеси се одвијају како у површинским, тако и у отпадним водама. Недостатак кисеоника негативно утиче на све водене организме који од њега зависе, те је неопходно мерити биолошку потрошњу кисеоника (БПК) и предузети мере ради повишења концентрација кисеоника и заштите организама** (Tintometer, 2016).

Хемијска потрошња кисеоника (ХПК) је концентрација кисеоника која је потребна да се изврши оксидација свих оксидабилних материја хемијским путем (Hu & Grasso, 2005). Мерење ХПК је вршено стандардном методом (SRPS ISO 6060:1994). Вредност овог параметра је износила 11,2 mg O<sub>2</sub>/L (Табела 12), што ову воду сврстава у I класу еколошког статуса. ХПК је скоро два пута већа од БПК измерене у испитиваној површинској води Западне Мораве. У случају биоразградивих органских материја, ХПК је нормално у опсегу од 1,3 до 1,5 пута већа од БПК. Када је резултат ХПК више од два пута већи од БПК, постоји добар

разлог за сумњу да значајан део органске материје у узорку није биоразградив од стране аеробних микроорганизама (Woodard & Curran, 2006).

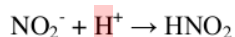
Укупни органски угљеник (TOC) је одређен уз помоћ стандардне методе (SRPS ISO 8245:2007) а мерена је концентрација CO<sub>2</sub> насталог оксидацијом органског угљеника. Концентрација TOC-а је износила 2,4 mg/L (Табела 12), што површинску воду Западне Мораве сврстава такође у I класу еколошког статуса.

Испитивање концентрације укупног азота је вршено помоћу стандардне методе (SRPS EN 25663:2009). Концентрација укупног азота у површинској води Западне Мораве је износила 3,3 mg N/L (Табела 12), што ову воду сврстава у II класу еколошког статуса. Повећане концентрације азота повољно утичу на развој фитопланктона, што није погодна карактеристика јер доводи до еутрофизације воде (Simić & Simić, 2012).

Концентрација нитрата у површинској води Западне Мораве је испитана спектрофотометријски и износила је 2,3 mg/L (Табела 12), што указује да на основу овог параметра, вода спада у I класу еколошког статуса. Нитрати представљају један од облика азота и основни су биљни нутријент. Користе се као минерално ђубриво и уколико су додати у вишку испирају се са обрадивих површина, доспевају у подземне воде, а затим и у површинске воде (Simić & Simić, 2012). Осим тога, из других облика азота – амонијака и нитрита, нитрификујуће бактерије процесом нитрификације доводе до формирања нитрата (Johnston et al., 2019). У текућим и стајаћим површинским водама нитрати представљају хранљиве материје за водене фотосинтетске организме. Међутим, уколико су присутни у вишку долази до претераног раста и бујања, било фитопланктона или водених алги и биљака и до појаве еутрофних процеса воде (Simić & Simić, 2012). При овим процесима не долази само до бујања водене вегетације, већи до промене структуре биоценозе. Мења се и биохемијски састав воде (нпр. изразитије дневне промене концентрације кисеоника и рН вредности) воде (Simić & Simić, 2012). Повишена концентрација нитрита може довести до хипоксије и изазвати токсичне ефекте за топлокрвне животиње при концентрацијама вишим од 10 mg/L (Simić & Simić, 2012).

Концентрација нитрита у површинској води Западне Мораве испитана је применим стандардне методе (SRPS EN 26777:2009) и износила је 0,08 mg/L (Табела 12). На основу овог параметра, испитивани узорци вода се могу сврстати

у II класу еколошког статуса. Нитритни јон ( $\text{NO}_2^-$ ) и нејонизована нитритна (азотаста) киселина ( $\text{HNO}_2$ ) су у међузависности кроз хемијску равнотежу:



Релативна концентрација нитритних јона и азотасте киселине зависе од рН вредности воде, тако да када се вредност рН повећа, концентрација нитритних јона такође расте, док концентрација азотасте киселине опада. Концентрација азотасте киселине је четири до пет пута нижа у односу на нитритне јоне у опсегу рН вредности од 7,5 до 8,5 (Ziouane & Leturcq, 2018). Оба облика могу допринети токсичности нитрита на животиње у воденој средини (Simić & Simić, 2012). Поред тога, азотаста киселина може бити токсична за неке врсте бактерија што доводи до заустављања процеса нитрификације и резултира у накупљању оба облика нитрита и појачане токсичности за бактерије, али и за водене животиње (Simić & Simić, 2012; Albina et al., 2019). Пошто је концентрација јона нитрита много нижа од азотасте киселине они се сматрају основним изазивачима токсичних ефеката на водене животиње. У слатководним срединама нитрити пореклом из антропогених извора могу бити изазивачи помора риба, док су морски организми толерантни на повишена концентрација нитрита (Гргинчевић и Пујин, 1998).

За испитивање концентрације фосфата површинске воде Западне Мораве, коришћена је SRPS EN ISO 6878:2008 стандардна метода. Концентрација фосфата је износила 0,05 mg/L (Табела 12), што је одличан резултат, јер се на основу њега вода може сврстати у I класу еколошког статуса. Фосфор представља есенцијални елемент за живе организме пошто улази у састав информационог материјала, деоксирибонуклеинске (ДНК) и рибонуклеинске киселине (РНК), аденозинтрифосфата (АТФ) тј. молекула одговорног за пренос енергије на ћелијском нивоу), али гради и друге молекуле у живим организмима. Извори фосфора могу бити природног или антропогеног порекла. За разлику од азота, фосфор нема гасну фазу, тако да нема атмосферног обогаћивања фосфатима. Уколико се фосфати заједно са нитратима нађу у вишку у водотоцима долази до еутрофикације. Пошто се у водотоцима налази у малим концентрацијама обично су фосфати ти који представљају ограничавајући фактор настанку еутрофикације (Simić & Simić, 2012). Тако да, уколико дође до малог повећања концентрације долази до појаве нежељених ефеката у виду убрзаног развоја водене вегетације и фитопланктона, смањења



концентрације кисеоника и на крају угињавања бескичмењака, риба и других водених организама (US EPA, 2013).

Концентрација хлорида у испитиваном узорку површинске воде Западне Мораве је одређена применом SRPS ISO 9297/1:2007 методе и износила је 12,8 mg/L (Табела 12). На основу овог резултата, вода се може сврстати у I класу еколошког статуса. Хлориди у копненим водама обично нису присутни у високим концентрацијама (Simić & Simić, 2012), што је потврђено и резултатима ове докторске дисертације. Појављују се у малим концентрацијама у природним водама углавном услед растварања планинских стена које садрже хлориде а увек су присутни у већим концентрацијама у комуналним отпадним водама и неким индустријским водама (Simić & Simić, 2012).

Концентрација сулфата у испитиваном узорку површинске воде Западне Мораве одређена је SRPS H.C8.215:1989 методом, а износила је 20,6 mg/L (Табела 12). На основу овог резултата, вода се може сврстати у I класу еколошког статуса. Сулфати у воду доспевају услед растварања гипсаних стена, оксидацијом сулфида, сумпора и других органских једињења која садрже сумпор, али и услед атмосферских падавина ако је атмосфера услед загађења богата сулфитима (Simić & Simić, 2012).

Електропроводљивост испитиване воде Западне Мораве је испитана применом SRPS EN 27888:2009 методе и износила је 379  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Табела 12). На основу овог резултата, вода се може сврстати у I класу еколошког статуса. Електропроводљивост представља способност воде да проводи електричну струју. Температура утиче на брзину кретања јона, а тиме и на електропроводљивост. Кретање позитивних и негативних јона у раствору ствара електричну струју. Веза између проводљивости и концентрације јона зависи од врсте и релативне концентрације присутних јона. Електропроводљивост је општи индикатор концентрације мешавине јона, а не мера неке појединачне супстанце. Она зависи од квалитета воде за многе растворљиве загађиваче. Према томе, проводљивост се може користити да би се утврдило да постоји проблем загађења, али не и да се утврди ком загађивачу се ради (US EPA, 2022).

Концентрација суспендованих честица у узорку воде је одређивана P-IV-9 методом, и износила је 12 mg/L (Табела 12). Укупне суспендоване материје

обухватају све честице суспендоване у води које немогу да прођу кроз филтер папир. Суспендоване материје у водотоцима воде порекло из расутих извора загађења као што су спирање са пољопривредних и урбаних површина и градилишта, али и концентрисаних које најчешће предствалају индустријске и канализационе отпадне воде. Повишене концентрације суспендованих честица у води се негативно одражавају на организме који живе у води. Ове честице апсорбују топлоту пореклом од сунчевог зрачења што утиче и на повишење температуре водотока, а тиме и на снижење концентрације раствореног кисеоника (Amerian et al., 2019). Поједине врсте риба карактеристичне за хладније водене средине (на пример пастрмке) посебно су осетљиве на промене концентрације кисеоника. Поред тога, интензитет фотосинтезе је смањен пошто мање светлости продире кроз воду. Алге и водене биљке производе мање кисеоника, што представља још један узрок опадања концентрације кисеоника. Када се исталоже на дну, ове суспендоване материје могу угрозити и станишта риба и других организама. Уколико ове честице обложе јаја риба и водених инсеката приликом излегања рибље млађи и ларви инсеката може доћи до гушења (Alam et al., 2022). Повишене концентрације суспендованих честица могу негативно утицати и на одрасле јединке загушивањем шкрга, што доводи до смањења интензитета раста и отпорности на болести (Berry et al., 2021). Промене у воденој средини одражавају се кроз смањење извора хране и њеном отежаном проналажењу (Tintometer, 2016). Осим тога, миграције популација водених организама могу бити поремећене (Kjelland et al., 2015). С обзиром на поменуто, неопходно је предузети одговарајуће мере како би се концентрација суспендованих честица svela на прописани ниво.

Поред физичко-хемијских параметара воде, значајни показатељи квалитета воде су и њене микробиолошке карактеристике. Микробиолошка анализа воде указује нам на врсту и интензитет загађења, али и на ефекат одређених загађивача (Петровић и сар., 1998; Fries et al., 2006). Постојање фекалне контаминације се испитује кроз укупан број колиформних бактерија и број колиформних бактерија фекалног порекла (Coca et al., 1996).

Резултати испитивања микробиолошких параметара квалитета површинске воде Западне Мораве, која су обављена у лабораторијама Завода за јавно здравље

у Чачку стандардним методама, три пута (шест) у току године, су приказани у Табели 13.

Табела 13. Микробиолошки параметри квалитета површинске воде Западне Мораве

Микробиолошки параметри	Добијена вредност MPN/100 mL	Границе између класа еколошког статуса			
		I-II	II-III	III-IV	IV-V
Укупне колиформне бактерије	1000	500	10000	100000	1000000
Фекалне колиформне бактерије – <i>E. Coli</i>	< 500	100	1000	10000	100000
Фекалне ентерококе	< 40	40	400	4000	40000

На основу микробиолошке анализе укупног броја колиформних бактерија и броја фекалних колиформних бактерија (*E. coli*) (Табела 13), испитивани узорци воде Западне Мораве се могу сврстати између добре (II) и умерене (III) класе еколошког статуса. На основу броја фекалних ентерокока, вода Западне Мораве се може сврстати у одличну (I) класу еколошког статуса.

Непречишћене отпадне воде пореклом из хемијске, нафтне и прехранбене индустрије, као и комуналне отпадне воде, се испуштају најчешће непречишћене у природне реципијенте, због чега су водотокови углавном загађени. Таква вода је одличан пут за преношење инфекција ако се конзумира или користи у рекреативне сврхе. Заштита вода од загађења је уређена Законом о водама и Законом о заштити животне средине. Управљање квалитетом вода се спроводи кроз мониторинг површинских вода кроз испитивање физичко-хемијских, микробиолошких и биолошких параметара. Резултати микробиолошког испитивања воде Западне Мораве су указали да је вода умерено оптерећена фекалном контаминацијом. Ово је важан податак обзиром да се вода из Западне Мораве користи у индустрији и пољопривреди али и у рекреативне сврхе. Сличне резултате су добили Јурић и сар. (1994), који су анализирали утицај температуре и других фактора на квалитет вода притока Западне Мораве. Међутим, познато је да бројност бактерија, а нарочито ентерокока, може да варира. На пример, од површине па до дна воде, бројност ентерокока варира услед дисперзије коју контролише концентрација градијента и брзина кретања воде. На бројност такође утиче и таложење/мешање воде, интеракције са другим бактеријама и хемијским

честицама у води, затим сунчева енергија (присуство светлости или таме) и многи други фактори (Grujović et al., 2022).

## 5.2. РЕЗУЛТАТИ ИДЕНТИФИКАЦИЈЕ ИЗОЛОВАНИХ ВРСТА ГЉИВА ИЗ ИСПИТИВАНИХ УЗОРКА

Узорци отпадних вода су прикупљени помоћу стерилних стаклених боца са три различита локалитета на територији општине Чачак. Након инкубације на МА са стрептомицином, појединачне колоније су пребачене на PDA, на коме је извршено изоловање гљива у чисте културе. Изоловане врсте гљива су идентификоване уз помоћ кључева за идентификацију на катедри за Алгологију и микологију Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу и Биолошком факултету у Београду.

У узорцима воде, прикупљених са прва два локалитета, изоловане су и идентификоване следеће врсте гљива: *Mucor plumbeus* (изолована из индустријских отпадних вода), *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Penicillium funiculosum* (изоловане из канализационих отпадних вода) и *Trichoderma harzianum*. На трећем локалитету ни једна од поменутих врста гљива није изолована, што указује да је тај локалитет умерено загађен, за разлику од прва два локалитета.

У даљем тексту приказане су најзначајније морфолошке и систематске карактеристике и дат је осврт на значај изолованих врста гљива за људе.

### 2 1. *Mucor plumbeus* Bonord 1864

царство: Fungi

раздео: Zygomycota

класа: Zygomycetes

ред: Mucorales

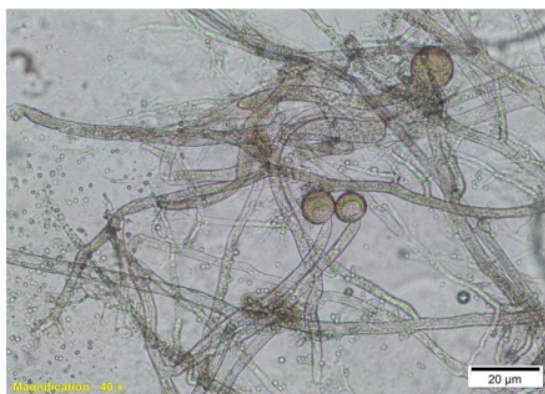
фамилија: Mucoraceae

род: *Mucor*

врста: *Mucor plumbeus* Bonord 1864

*M. plumbeus* производи колумелу са карактеристичним, тамно пигментираним апикалним избочинама налик прстима. Спорангиофоре (структуре које носе асексуалне споре - спорангиоспоре) показују симподијално и моноподијално гранање. Спорангиоспоре су сферне, у пречнику од 5–7 до 8–10

µm. Зигоспоре су такође тамно обојене, мада много веће од спорангиоспора са просечним пречником од приближно 85 µm. Зигоспоре су украшене кратким звездастим бодљама (дужине 3 µm). Боја колонија је тамно сива, пречник колоније је < 50 mm. Боја мицелије је бела, боја наличја колоније је бледа а текстура колоније је флокозна, густа. Од микроскопских карактеристика, приликом идентификације се издавају несептиране хифе, сиве до браон спорангије и сферичне спорангиоспоре (Слика 7) (Samson & Frisvard, 2004a; Pitt & Hocking, 2009; Kocić-Tanackov, 2012; Žugić-Petrović, 2022).



Слика 7. Микроскопске карактеристике врсте *Mucor plumbeus* (фото И. Матовић Пурић)

*M. plumbeus* је филаментозна гљива које обично живи као сапрофит у земљишту, а може се наћи и на биљкама, трулом воћу и поврћу, у мармеладама или соковима (Ranković, 2003). Ова врста углавном контаминира производе животињског порекла (млечни производи, сир, месо, укључујући прерађене или смрзнуте производи, димљено-сушену рибу) или производе биљног порекла (нпр. воће (чак и складиштено у хладњачама) орахе, пасуљ, житарице, какао) (Morin-Sardin et al., 2017). *M. plumbeus* се користи за биотрансформацију монотерпеноида, дитерпеноида и сесквитерпеноида како би се појачала њихова биолошка активност а такође показује способност да синтетише међупроизводе молекула у неопходнох за синтезу сложенијих молекула (de Oliveira Silva et al., 2013). Ова врста гљиве показује потенцијал за примену у индустрији и биотехнологији. Mohamed et al. (2022) су указали да је *M. plumbeus* врста која продукује липиде а нарочито гама-линолеинску киселину (ГЛК). Исти аутори су показали да ова врста гљиве, у кокултури са *Bacillus subtilis*, показује велики

потенцијал за индустријску производњу микробних липида нарочито богатих са ГЛК али и перспективу у биосинтези нових производа. Carvalho et al. (2011) су указали да ова врста гљиве ефикасно разграђује пентакlorофенол, инсектицид и хербицид који се користи широм света.

Доказано је да ова врста гљиве производи метаболите који показују појачан цитотоксичан ефекат у терапији леукемије код људи и побољшавају биорасположивост 20(C)-протопанаксатриола, молекула који припада компонентама гинсенозида изолованог из *Panax ginseng* (Morin-Sardin et al., 2017). Такође се користи за генерисање ефикасних деривата дитерпеноида из неоандрографолида, али и лактона који се користи као антиинфламаторни, антивирусни и антипиретички лек (Wang et al., 2011).

## 2. *Aspergillus niger* Van Tieghem 1867

царство: Fungi

раздео: Ascomycota

класа: Ascomycetes

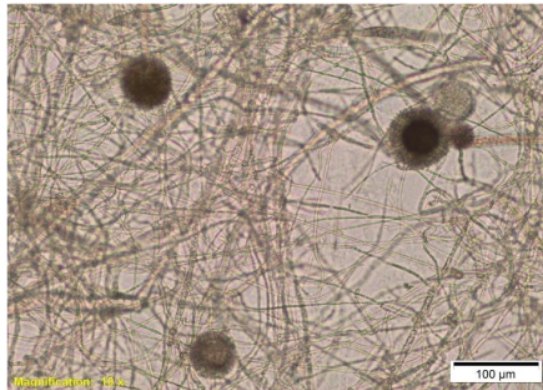
ред: Eurotiales

фамилија: Trichocomaceae

род: *Aspergillus*

врста: *Aspergillus niger* Van Tieghem 1867

Ова врста је једна од најчешћих из рода *Aspergillus*. Конидиофори ове врсте су једноћелијски, неразгранати, са лоптастим проширењем на врху које се зове везикула. Конидијалне главице су мрке, округле и радијалне. Везикула је такође округла. Код младих конидијалних главица су присутне само фијалиде, а код старијих фијалиде и профијалиде. Конидиофори су дуги око 3 mm. Конидије су округле и храпаве, дужине око 3,5 – 5  $\mu\text{m}$  (Ranković, 2003). Врста продукује црне колоније дијаметра < 60 mm. Боја наличја колонија је бледо-жута, а боја мицелије је бела. Структура колоније је велутиозна. Од микроскопских карактеристика за идентификацију издвајају се септиране хифе, конидофоре асексуалне структуре, збијене метуле и фијалиде, лоптасте везикуле и сферичне конидије (Слика 8) (Samson & Frisvard, 2004a; Pitt & Hocking, 2009; Kocić-Tanackov, 2012; Žugić-Petrović, 2022). Познато је да ова врста продукује микотоксине (Ranković, 2003).



Слика 8. Микроскопске карактеристике врсте *Aspergillus niger* (фото И. Матовић Пурић)

Врста је космополитски распрострањена. Изолована је из ваздуха, сувих семена, плодова, текстила. Присутна је у земљишту и биљном материјалу који је у фази распада. Продукује различите ензиме, као што су амилазе и аминоклукозидазе; продукује оксалне и фумаричне киселине а често се користи у индустрији за разлагање целулозе и пластике. Чест је узрочник кварења хране, лако контаминира месо и млеко (Ellis & Ellis, 1997). У индустрији се користе за добијање фермената, органских киселина и антибиотика. Може да изазове болести човека или животиња познате као аспергилозе (Ranković, 2003).

### 3. *Penicillium canescens* Sopp, O.J. 1912

2 царство: Fungi

раздео: Ascomycota

класа: Ascomycetes

ред: *Eurotiales*

фамилија: *Trichocomaceae*

род: *Penicillium*

врста: *Penicillium canescens* Sopp, O.J. 1912

Гљиве из рода *Penicillium* формирају конидијски апарат који се састоје од вишећелијског, понекад разгранатог стабла, означеног као стипе (стипе – стабло). На њему се налази једно или двоструко разгранати *penicillus*-и (*penicillus* – четкица). Разгранати део конидиофора се састоји од грана (раме) које се налазе у једном или више нивоа. Оне носе фијалиде (флашасте ћелије) на чијим се врховима налазе низови конидија (Слика 9) (Ranković, 2003). Репродуктивна

структура врста из рода *Penicillium* је карактеристична и одређује примарну таксономску поделу рода у подродове (Pitt & Hocking, 2009). *P. canescens* формира фино храпаве, лоптасте конидије дужине 2  $\mu\text{m}$ , цилиндричне фијалиде (8  $\mu\text{m}$ ) и цилиндричне метуле (10-16  $\mu\text{m}$ ) (Abastabar et al., 2016)



Слика 9. Микроскопске карактеристике врсте *Penicillium canescens* (фото И. Матовић Пурић)

*Penicillium* spp. је један од економски најважнијих родова међу плеснима (Silva et al., 2018). Врсте рода *Penicillium* су јако распрострањене и у погледу исхране ове гљиве нису захтевне, па могу да расту у скоро сваком окружењу. Познато је да *Penicillium* spp. кваре храну, производе микотоксине и често се јављају као узрочници болести код људи и животиња (Pitt & Hocking, 2009).

*P. canescens* расте у земљишту и може разградити биљну материју јер продукује велике концентрације ксиланазе и глукозидазе. *P. canescens* је умерени солубилизатор калцијум фосфата, али показује потенцијал ослобађања органског фосфата кроз своје метаболичке активности услед деградације биљаног материјала. Veignie & Rafin (2022) су указали на да је ова врста показала велики потенцијал за коришћење у техникама биоремедијације које доводе до смањења загађености земљишта полицикличним ароматичним угљоводоницима велике молекулске тежине, уз истовремено очување интегритета тла. Производи антибиотик канесцин (Brian et al., 1953).

#### 2 4. *Penicillium funiculosum* Thom 1910

царство: Fungi

раздео: Ascomycota



класа: Ascomycetes

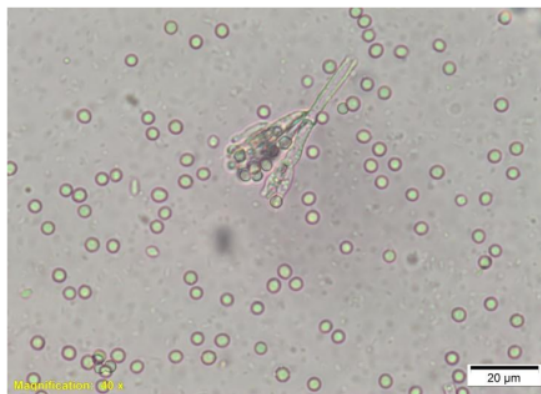
ред: Eurotiales

фамилија: Trichosomaceae

род: *Penicillium*

врста: *Penicillium funiculosum* Thom, 1910

Стабло ове врсте је разгранато, састоји се од дужих и краћих грана (од 25-150  $\mu\text{m}$ ). Метуле су дужине од 2-3  $\mu\text{m}$ . Фијалиде су дужине 2  $\mu\text{m}$ . Конидије варирају од округлих до елипсоидних или цилиндричних, дужине 2-3  $\mu\text{m}$  и углавном су глатких зидова (Слика 10). Колоније ове врсте достижу пречник од 30-52 mm за недељу дана на 25°C. Боја мицелијума варира, од беле преко жуте, ружичасте или бледо жућкасте. Споре су сиве, зелене до жуто зелене (Van Reenen-Hoekstra et al. 1990).



Слика 10. Микроскопске карактеристике врсте *Penicillium funiculosum* (фото И. Матовић Пурић)

*P. funiculosum* се налази у земљишту и на усевима. Конидије су узрочници инфекције и захтевају једноставне угљене хидрате, које добијају као продукте метаболизма полисахарида. Због тога се ова врста користи као извор ензима ксиланазе и бета-глукозидазе који врше хидролизу полисахарида (Roberto Nobuyuki Maeda et al., 2011). Утврђено је да хеленин, метаболички продукт *P. funiculosum* за који је познато да показује протективни ефекат против неколико вируса код експерименталних животиња *in vivo*, стимулише стварање инхибитора формирања вирусног плака у ћелијским културама код мишева (Rytel et al., 1966). Такође је познато да продукује антибиотик (Singh et al., 1986).

**2 5. *Trichoderma harzianum* Rifai 1969**

царство: Fungi

раздео: Ascomycota

класа: Sordariomycetes

ред: Нурокреале

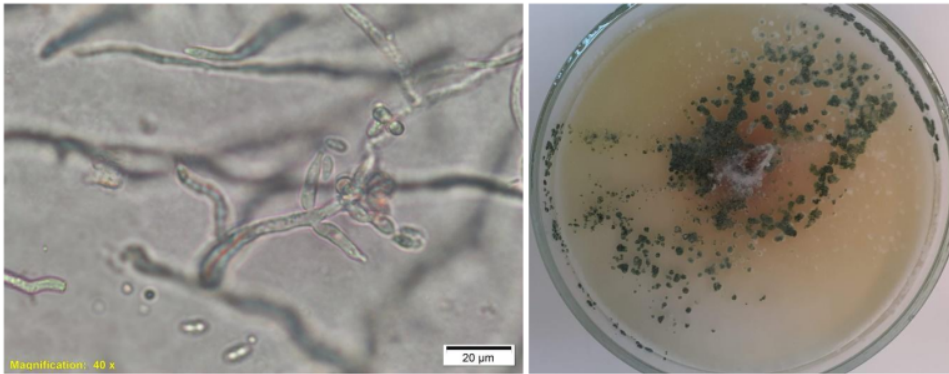
фамилија: Нурокреае

род: *Trichoderma*врста: *Trichoderma harzianum* Rifai 1969

Основна градивна јединица гљива из рода *Trichoderma*, која представља развојну јединицу мицелијума је хифа. Специјализоване хифе из којих настају споре се називају конидиофоре које се гранају и веома их је тешко дефинисати и измерити услед формирања компактне структуре у различитим концентричним круговима. Главне гране конидиофора, које су најдуже од врха, производе бочне гране које могу додатно да се гранају. Бочне гране настају на или близу 90° у односу на главну грану и њихова величина је од 5 до 10  $\mu\text{m}$ . Типичне *Trichoderma* конидиофоре са спареним гранама су пирамидалног облика. Главне гране, у зависности од врсте, могу да се завршавају дугим, једноставним или разгранатим, равним или кривудавим септама или спорама. Фијалиде, које представљају први иницијални развој конидија у апикалном (горњем) смеру, могу имати различит положај у односу на главну грану. Обично су проширене у средини и могу бити цилиндричне или суб-глобусног облика. Такође, могу бити густо груписане на главној грани или појединачне. Врсте из рода *Trichoderma* формирају белу мицелију сунђерасте конзистенције који се шири по целој плочи и формира два до три концентрична прстена, жуто-зелене боје (конидије) (Слика 11) (Matas-Vaca et al., 2022).

Род *Trichoderma* је један од највише проучаваних родова гљива и широко се користи у биолошкој контроли јер укључује врсте које су разноврсне, прилагодљиве различитим окружењима и којима је лако манипулисати у генетичком смислу (Duarte-Leal et al., 2017). Доказано је да продукују велики број ензима (целулазе, естеразе, протеазе, хитиназе, Н-ацетил- $\beta$ -глукозаминидазе) и секундарних метаболита (поликетида, пирона, терпена) (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1988). Врсте из овог рода се често користе у контроли биљних

патогена посто поседују бројне механизме заштите, укључујући антибиозу, микопаразитизам и компетицију за простор и хранљиве материје (Harman et al., 2004, Bailey et al., 2008). Поред тога, када је у интеракцији са кореном, врсте из рода *Trichoderma* подстичу раст и повећавају отпорност и раст биљке услед стимулације производње хормона који регулишу раст. Стимулишу примарно меристематско ткиво код младих делова биљака (Candelerio et al., 2015).



Слика 11. Микроскопске и макроскопске карактеристике врсте *Trichoderma harzianum* (фото И. Матовић Пурић)

*Trichoderma harzianum* је позната као космополитна и опште присутна врста која се може наћи на различитим подлогама као што су земљиште, корени биљака, гајилишта печурака и недавно је једна од најчешће изолованих ендوفита са тропског дрвећа (Chaverri et al., 2003; Jaklitsch, 2009; Hoyos-Carvajal et al., 2009). Иако постоје поједини подаци да је *T. harzianum* сапрофитни организам биљака, новија истраживања показују и сугеришу да врсте у овом комплексу су или микопаразити или су биоконтролни агенси (Chaverri & Samuels, 2013). Врста продукује велики број ензима, нарочито целулазне ензиме, као што су  $\beta$ -глюкозидаза и ендоцелулаза (García-Kirchner et al., 2005; de Castro et al., 2010). Такође је утврђено да продукују значајне концентрације лигнификајућих ензима типа лаказе и лигнин пероксидазе (Hölker et al., 2002). Због тога је могућност употребе ове занимљиве врсте у биотехнологији данас је предмет великог броја научних студија.

*T. harzianum* је примењивана у пољопривреди за третирање загађених земљишта и главни је састојак неколико комерцијално доступних биолошких

препарата који се користе за унапређење раста и производње биљака (Hanson, 2005; Druzhinina et al., 2010). Примена врсте *T. harzianum* позитивно утиче на производњу и квалитет јагода услед модификације физиолошких процеса биљке (Lombardi et al., 2020). Abo-Elyousr et al. (2022) су показали да фолијална примена ове врсте на стабљику парадајиза, поред стимулације раста биљке и плода, штити биљку од *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (који доводи до увенућа парадајиза). Ова врста се користи као фунгицид за заштиту усева јер инхибира раст врсте *Botrytis cinerea* (Mousumi Das et al., 2021). Претпоставља се да је продукција молекула пептаибола који, у комбинацији са производњом хидролитичких ензима, снажно инхибирају раст гљивичних биљних патогена најважнији параметар за употребу *T. harzianum* у биолошкој контроли микроорганизама (Schirmböck et al., 1994). Изложеност људи врстама из рода *Trichoderma* се најчешће дешава током употребе препарата који садрже врсту *T. harzianum* у биолошкој контроли патогена (Peltola et al., 2004). Исти аутори су доказали способност продукције одређених токсина штетних за људе, па су потребна детаљнија истраживања о утицају продуката ове врсте на људе.

### **5.3. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА УТИЦАЈА ДЕТЕРЦЕНАТА НА ПРОДУКЦИЈУ БИОМАСЕ ИЗОЛОВАНИХ ГЉИВА**

Све изоловане гљиве су гајене до спорулације, припремљене су суспензије спора у дестилованој води у концентрацији од  $10^6$  спора/mL, извршено је њихово засејавање у Чапек-Доксов бујону модификованог хемијског састава, без детерцента (контрола (К)) и са 0,3% (w/v) детерцента (Д), а затим инкубација током 16 дана под одговарајућим условима. Биомаса гљива је одређена на крају огледног периода, а вредности биомасе су изражене у грамама по милилитру ферментационе течности (g/mL). Измерене биомасе гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum*, добијене на контролној подлози (К) и на подлози са детерцентом (Д) су приказане у Табели 14.

Статистичком анализом је испитана разлика у биомаси тестираних гљива раслих у контролној подлози (К) и подлози са детерцентом (Д). Пошто се није могло извести поређење за сваку гљиву (по један податак за контролу и детерцент) разлике између гљива у контроли и детерценту могле би бити наведене

као процентуалне, јер се гљиве разликују у степену у коме је детергент утицао на смањење биомасе. Промене у биомаси се разликују у контролној подлози (К) и подлози са детергентом (Д) код свих тестираних гљива. Највећа сличност је забележена у биомаси гљива *M. plumbeus* и *P. funiculosum* ( $p < 0,05$ ; Табела 15).

Табела 14. Биомаса гљива добијена у контролној подлози (К) и на подлози са детергентом (Д) након 16 дана инкубације

Гљива	Подлога/дан инкубације	
	К/16	Д/16
<i>Mucor plumbeus</i>	0,7501 ± 0,0003	0,1915 ± 0,0005
<i>Aspergillus niger</i>	0,6852 ± 0,0004	0,3823 ± 0,0006
<i>Penicillium canescens</i>	0,5614 ± 0,0003	0,3746 ± 0,0006
<i>Penicillium funiculosum</i>	0,9089 ± 0,0002	0,2142 ± 0,0005
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,9226 ± 0,0003	0,3627 ± 0,0006

Биомаса приказана као средња вредност ± стандардна девијација изражене у g/mL ферментационе течности; контролној подлози – К; подлози са детергентом – Д

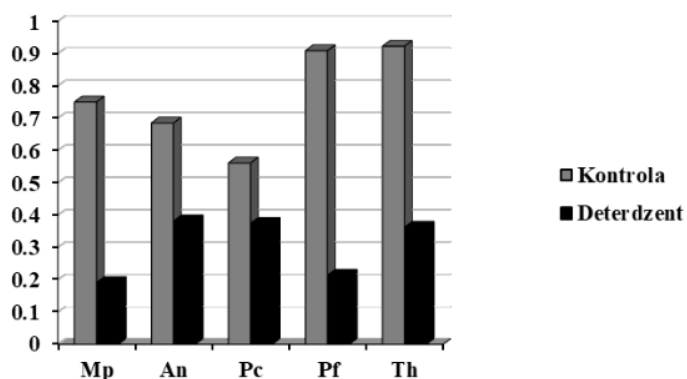
$\chi^2$  тест указује на сагласност у промени биомасе у контролној подлози (К) и подлози са детергентом (Д) између тестираних гљива. Ако се смањење биомасе изрази у процентима и ти проценти се међусобно упореде, може се закључити да процентуално смањење варира у широким границама код свих гљива. У случајевима где је та несагласност најмање изражена је сличнија процентуална вредност смањења биомасе. То је случај код гљива *M. plumbeus* и *P. funiculosum* услед сличног смањења процентуалне вредности биомасе, мада је и та разлика значајна на нивоу 0,05.

Табела 15. Поређење биомасе <sup>2</sup> гљива у контролној подлози (К) и подлози са детергентом (Д) -  $\chi^2$  тест

	<i>A. niger</i>	<i>P. canescens</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>T. harzianum</i>
<i>M. plumbeus</i>	$\chi^2$ 586,4 p <0.0001***	862,6 <0.0001***	5.12 0.0237*	180,17 <0.0001***
<i>A. niger</i>	$\chi^2$ p	37.40 <0.0001***	773.18 <0.0001***	155.05 <0.0001***
<i>P. canescens</i>	$\chi^2$ p		1096.29 <0.0001***	339.67 <0.0001***
<i>P. funiculosum</i>	$\chi^2$ p			274.79 <0.0001***

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Ради боље прегледа резултата, биомаса гљива у ферментисаној течности контролне (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum* након 16 дана, су приказана на Графикону 2.



Графикон 2. Биомаса тестираних гљива на контролној подлози (К) и на подлози са детергентом (Д) након 16 дана инкубације

Генерално посматрано, биомаса гљива је била већа у контролној подлози (К), него у подлози са детергентом (Д) након 16 дана инкубације. *T. harzianum* је имала највећу биомасу (0.9226 g/mL ферментационе течности) од свих тестираних гљива у контролној подлози (К), док је у подлози са детергентом (Д) њена биомаса смањена за скоро три пута (0.3627 g/mL ферментационе течности). *P. funiculosum* је имала биомасу сличну као *T. harzianum* (0.9089 g/mL ферментационе течности) у контролној подлози (К), док је у подлози са детергентом (Д) њена биомаса смањена више од четири пута (0.2142 g/mL ферментационе течности). *A. niger* и *P. canescens* су имале нешто мању биомасу (0.6852 и 0.5614 g/mL ферментационе течности) у контролној подлози (К), док је у подлози са детергентом (Д) њихова појединачна биомаса смањена за скоро два пута (0.3823 и 0.3746 g/mL ферментационе течности). *M. plumbeus* се показала као најосетљивија на присуство детергента у подлози. Њена биомаса у подлози са детергентом (Д) се смањила седам пута (0.1915 g/mL ферментационе течности) у односу на контролну подлогу (0.7501 g/mL ферментационе течности). Добијени резултати указују да присуство детергента утиче инхибиторно на добијену

биомасу гљива у односу на контролну подлогу (К), али да је тај утицај завистан од врсте. Најмању осетљивост на присуство детерцента су показале врсте *A. niger* и *P. canescens*.

Jakovljević & Vrgić су испитивали утицај детерцента у концентрацији од 0,3% на инхибицију биомасе врста *A. niger*, *T. harzianum*, *P. chrysogenum*, *P. cyclospium* и *M. racemosus*. Доказали су да је, у односу на контролну подлогу (К), биомаса врсте *A. niger* инхибирана 51,42%, док је биомаса врсте *T. harzianum* инхибирана 20,0% (Jakovljević & Vrgić, 2017). Приказани резултати за врсту *A. niger* су у складу са резултатима добијеним у оквиру ове докторске дисертације. Stojanović et al. су указали да додавање детерцента у концентрацији од 1% делује инхибиторно на биомасу гљиве *Trichothecium roseum* (Stojanović et al., 2011a)

На укупну биомасу и раст и развој гљива утиче хемијски састав хранљиве подлоге. Према Иванковићу, у зависности од врсте детерцента, концентрације и врсте гљива, утврђено је да детерцент који се налази у хранљивој подлози, може утицати на активност гљива инхибиторно (смањује активност) или синергистички (повећава активност) (Иванковић, 2009). Инхибиција раста тестираних врста у присуству детерцента може се објаснити токсичним дејством неких састојака детерцента или производа разградње и аутолизе (Jakovljević & Vrgić, 2017). Адсорпција различитих отпадних материја које се налазе у природи показала се најефикаснија помоћу биомасе гљива (Das et al., 2008). Добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације указују на могућу примену теститаних гљива у процесу биоремедијације.

Током конвенционалне биолошке обраде отпадних вода настају велике концентрације муља (углавном бактеријске биомасе) мале вредности, али који захтева велике трошкове збрињавања. Како се гљиве користе за производњу низа корисних производа, интеграција ремедијације отпадних вода и обнављања вредних ресурса употребом гљива могла би представљати економски исплативо, тј. одрживо господарење отпадом (Sankaran et al., 2010.). Истраживања која су се бавила обрадом отпадних вода помоћу гљива имала су различите циљеве који се могу сврстати у два сегмента: обрада отпадних вода с циљем разградње тешко биоразградљивих сојева и обрада отпадних вода током које се спроводи истовремена разградња и издвајање нус производа микробног метаболизма

(Sankaran et al., 2010). Отпадна вода при томе представља јефтин и доступан супстрат за раст гљива. Основне предности кориштења биомасе гљива у обради отпадних вода су следеће:

1. ефикасније одвајање биомасе гљива од пречишћене воде након завршеног процеса обраде;
2. ефикаснија разградња сложених органских сојева присутних у отпадној води због деловања фунгалних ензима;
3. могућност издвајања вредних нус продуката који настају током обраде као резултат метаболизма гљива (Sankaran et al., 2010).

Одвајање, обрада и збрињавање вишка активног (бактеријског) муља велики је еколошки и финансијски проблем. Вишак биомасе гљива пуно се једноставније одваја од прочишћене воде и дехидрира у односу на бактеријску биомасу (Truong et al., 2004). При субмерзном узгоју гљиве могу расти у облику распршених мицелијских филамената или у облику пелета, испреплетене компактне мицелијумске масе. Због своје компактности пелети имају потенцијалну примену као систем имобилизованих ћелија па не захтевају примену имобилизацијских техника попут унакрсног везања или умрежавања (Truong et al., 2004). Ванћелијски фунгални ензими при томе остају затворени унутар компактне структуре пелета, где учествују у реакцијама. Биомаса гљива у облику пелета још се једноставније одваја од пречишћене воде на крају процеса било таложењем или помоћу финих решетки (Jin et al., 1999).

#### **5.4. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА УТИЦАЈА ДЕТЕРЦЕНТА НА БИОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЉИВА**

Током истраживања су праћени следећи биохемијски параметри:

##### **5.4.1. рН вредност**

Важан параметар који, са редокс потенцијалом, утиче на раст и развој, биохемијска својства и морфолошке карактеристике микроорганизама, је рН вредност хранљиве подлоге. За клијање спора рН вредност мора бити изнад 5, док се за раст гљива рН креће од 4,5 до 6 (Turgeman et al., 2016). Приликом усвајања јона из подлоге, гљиве могу да мењају рН вредност средине у којој расту (Griffin,



1994; Moore-Landecker, 1996), а резултат метаболичке активности гљива је промена рН вредности хранљиве подлоге (Orlowski, 1990).

Промене рН вредности ферментационе течности, у контролној подлози (К) и у подлози са детергентом (Д), током раста и развоја гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum* у периоду од 16 дана су приказане су у Табели 16.

Статистичком обрадом података је утврђено да код гљива *M. plumbeus*, *P. canescens* и *T. harzianum* постоји статистички значајна разлика у рН вредности између контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) ( $p < 0,01$ ,  $z = -2,61116$ ; Табела 17).

У контролној подлози доказана је статистички значајна разлика у рН вредности ферментационе течности између следећих врста: *M. plumbeus* и *A. niger*; *A. niger* и *P. canescens*; и *A. niger* и *T. harzianum* ( $p < 0,01$ ,  $z = -2,61116$ ). У подлози са детергентом није уочена статистички значајна разлика у рН вредности ферментационе течности тестираних гљива (Таб. 18).

Ради боље прегледа резултата, промене рН вредности ферментационе течности контролне (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum* од момента инокулације до 16. дана, приказани су на Графикону 3.

Када је реч о рН вредности у контролној подлози (К) гљиве *M. plumbeus*, највеће промене су се десиле у периоду између 3. и 6. дана (рН се је са 4,76 смањила на 3,95), а затим је дошло до знатног смањења у периоду од 6. до 9. дана (смањење рН вредности са 3,95 на 3,41), док је у периоду од 9. до 12. дана уочен благи пораст рН вредности (са 3,41 на 3,43). На крају, од 12. до 16. дана, рН вредност је наставила да се смањује. У подлози са детергентом (Д), рН вредност се смањивала од 3. до 6. дана, и тада је забележена највећа промена (са 9,19 на 6,20). Од 6. до 9. дана је уочен благи пораст рН вредности (са 6,20 на 6,33), а затим од 9. до 16. дана константан пад. Уочено је да је у контролној подлози (К) рН вредност свих 16 дана била нижа у односу на рН вредност у подлози са детергентом (Д).

Табела 16. Промене рН вредности ферментационе течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива

Гљива	Подлога/дан инкубације									
	К/3	Д/3	К/6	Д/6	К/9	Д/9	К/12	Д/12	К/16	Д/16
<i>M. plumbeus</i>	4,76 ± 0,03	9,19 ± 0,06	3,95 ± 0,06	6,20 ± 0,11	3,41 ± 0,13	6,33 ± 0,17	3,43 ± 0,20	6,15 ± 0,22	3,19 ± 0,25	5,88 ± 0,28
<i>A. niger</i>	6,13 ± 0,03	9,10 ± 0,05	6,70 ± 0,08	6,93 ± 0,10	6,89 ± 0,13	6,22 ± 0,16	7,17 ± 0,18	6,20 ± 0,21	7,39 ± 0,24	6,25 ± 0,28
<i>P. canescens</i>	5,51 ± 0,02	9,04 ± 0,04	4,37 ± 0,06	6,31 ± 0,09	3,60 ± 0,12	5,91 ± 0,15	3,47 ± 0,18	5,28 ± 0,21	3,52 ± 0,23	5,56 ± 0,26
<i>P. funiculosum</i>	5,21 ± 0,03	8,43 ± 0,05	6,67 ± 0,08	6,62 ± 0,12	6,89 ± 0,06	5,92 ± 0,04	7,12 ± 0,01	5,41 ± 0,03	2,40 ± 0,31	5,60 ± 0,34
<i>T. harzianum</i>	3,71 ± 0,04	9,01 ± 0,08	3,58 ± 0,11	8,92 ± 0,14	2,62 ± 0,16	5,86 ± 0,19	2,42 ± 0,21	5,97 ± 0,24	2,36 ± 0,27	5,19 ± 0,30

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација; контролна подлога – К; подлога са детергентом – Д

Табела 17. Поређење рН вредности ферментационе течности гљива у контролној подлози (К)

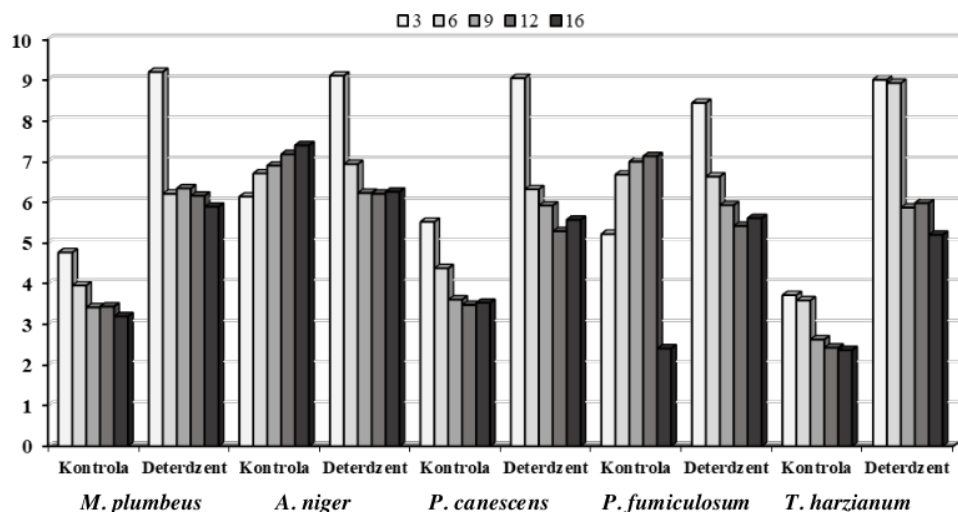
	A.	P.	P.	T.	
<i>A. niger</i>	<i>canescens</i>	<i>funiculosum</i>	<i>harzianum</i>		
<i>M.</i>	z	-2,61116	-0,731126	-1,56670	1,357806
<i>plumbeus</i>	p	0,009024**	0,464780	0,117186	0,174526
<i>A.</i>	z	2,611165	1,148813	2,611165	
<i>niger</i>	p	0,009024**	0,250593	0,009024**	
<i>P.</i>	z	-1,56670	0,117186	1,148913	
<i>canescens</i>	p	0,117186	0,350593		
<i>P.</i>	z	1,775592			
<i>funiculosum</i>	p	0,075801			

\*\* p < 0,01

Табела 18. Поређење рН вредности ферментационе течности гљива у подлози са детергентом (Д)

	A.	P.	P.	T.
<i>M.</i>	z	-	0,838116	
<i>plumbeus</i>	p	0,401996	0,347208	0,464703
<i>A.</i>	z	1,148913	1,148913	0,940019
<i>niger</i>	p	0,250593	0,250593	0,347208
<i>P.</i>	z	-0,313340	0,754023	0,916815
<i>canescens</i>	p	0,754023		
<i>P.</i>	z	-0,522233		
<i>funiculosum</i>	p	0,601509		

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001



Графикон 3. Промене рН вредности ферментационе течности у контролној подлози (К) и подлози са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива

Код раста гљиве *A. niger*, рН вредност контролне подлоге (К) је константно расла од 3. до 16. дана (са 6,13 на 7,39), са највећом променом од 3. до 6. дана (са 6,13 на 6,70). У подлози са детерџентом (Д), рН вредност је опадала од 3. до 12. дана (са 9,10 на 6,20), где је највећи пад забележен између 3. и 6. дана. На крају, од 12. до 16. дана рН вредност је благо расла. Ако упоредимо ове две подлоге, у контролној подлози (К) гљиве *A. niger* рН вредност 3. и 6. дана је била мања од рН вредности 3. и 6. дана у подлози са детерџентом (Д). Међутим, у контролној подлози (К) 9., 12. и 16. дана је рН вредност је била већа него рН вредност у подлози са детерџентом (Д).

Код гљиве *P. canescens*, рН вредност контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) је константно опадала до 12. дана (са највећим падом од 3. до 6. дана), док се на самом крају експеримента рН вредност обе подлоге незнатно повећала. Према томе, рН вредност у контролној подлози (К) је до краја инокубације (16. дана) била мања од рН вредности у подлози са детерџентом (Д).

Вредност рН контролне подлоге (К) за гљиву *P. funiculosum* је расла од 3. до 12. дана (са 5,21 на 7,12), а затим се, од 12. до 16. дана, нагло спустила (до 2,40). Што се тиче подлоге са детерџентом (Д) уочено је да је рН вредност опала и то у периоду од 3. до 12. дана (са 8,43 на 5,41), док се од 12. до 16. дана бележи њено

лагано повећање. Поређење ове две подлоге варира, односно рН вредност у контролној подлози (К) је мања од рН вредности у подлози са детерцентом (Д) само 3. дан култивације. У периоду од 6. до 16. дана инкубације, рН вредност у контролној подлози(К) је била већа од рН вредности у подлози са детерцентом (Д).

Што се тиче контролне подлоге (К) код гљиве *T. harzianum*, рН вредност се смањивала од 3. до 16. дана (са 3,71 до 2,36), са највећим променама између 6. и 9. дана (са 3,58 до 2,62). Код подлоге са детерцентом (Д), рН вредност се смањивала од 3. до 9. дана, затим се од 9. до 12. дана повећавала. На крају, од 12. до 16. дана опет је дошло до смањења рН вредности. Ако упоредимо обе подлоге, може се закључити да је рН вредност у контролној подлози (К) била нижа од рН вредности у подлози са детерцентом (Д).

Иницијална рН вредност забележене у контролној подлози (К) била је 4,8, док је у подлози са детерцентом (Д) била 9,35 Током периода од 16 дана инкубације, рН вредности у контролној подлози (К) и подлози са детерцентом (Д) су се мењале у односу на њихов састав, врсту гљива и фазу раста. Ове промене су се дешавале под утицајем усвајања анијона или катјона из медијума од стране ћелија гљива и излучивања органских киселина у медијум (Jakovljević & Vrvic, 2017). Током периода од 16 дана инкубације у контролној подлози (К) у којој су расле врсте *M. plumbeus*, *P. canescens* и *T. harzianum* дошло је до смањења иницијале рН вредности подлоге која је ишла према снажно киселој. Супротно томе, код врста *A. niger* и *P. funiculosum* иницијална рН вредности контролне подлоге је расла према благо киселом до неутралном опсегу. У подлози са детерцентом (Д), иницијална рН вредност подлоге се константно смањивала током периода инкубације од 16 дана. Сличне резултате су добили Jakovljević & Vrvic на тестираним изолатима гљива *A. niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium cyclopium*, *T. harzianum* и *Mucor racemosus*, изолованих из општинске канализације и индустријске отпадне воде. Ове значајне промене у смислу снижавања рН вредност подлоге могу се тумачити интензивним метаболизмом тестираних гљива (Jakovljević & Vrvic, 2017).

Као што је већ речено, благо кисела средине (рН између 4.5–5.0) је неопходна за оптималан раст већине гљива. С друге стране, рН вредност између 6.5 и 8.5 је оптимална за процесе биоразградње у већини водених и копнених система, док се рН вредности између 5,0 и 9,0 сматрају прихватљивим за ове процесе

(Jakovljević & Vrvic, 2017). Резултати добијени у овој дисертацији указују да тестиране гљиве показују потенцијал за коришћење у биодеградацији детерџента јер толеришу базну средину која је настала додавањем детерџента у подлогу и чак показују способност раста и редукцију рН вредности подлоге. Литературни податци указују да гљиве могу да одговоре на алкалну рН путем два до сада описана механизма: протеолитичка активација РасС транскрипционих фактора (на пример *A. niger*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*) и метаболичких путева посредованих калцијумом (Peñalva et al., 2002; Hervas-Aguilar et al., 2010; Menon et al., 2019).

#### 5.4.2. Редокс-потенцијал

Као што је већ речено, поред рН вредности, редокс потенцијал такође утиче на активности ензима и укупну биомасу гљива путем регулације одређених ензима укључених у метаболизам скроба (Ballicora et al., 2000; Hendriks et al., 2003), активност и везивање  $\alpha$ -гљукана, дикиназе (SEX1) у гранулама скроба (Mikkelsen et al., 2005) и највероватније активност  $\beta$ -амилазе (Balmer et al., 2003). Највеће промене редокс потенцијала се дешавају током експоненцијалне фазе раста, када се одвијају најинтензивнији метаболички процеси (Kukec et al., 2002). У току раста микроорганизама праћење редокс потенцијала даје приказ о оксидативном статусу у подлози.

Током раста гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum*, промене редокс потенцијала у контролној подлози (К) и у подлози са детерџентом (Д) су мерене дигиталним електричним пехаметром 3., 6., 9., 12. и 16. дана од почетка експеримента (Табела 19).

Статистичком обрадом података утврђене су статистички значајне разлике редокс потенцијала ферментационе течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) код врста *M. plumbeus* и *T. harzianum* ( $p < 0,01$ ) као и код *P. canescens* ( $p < 0,05$ ) (Табела 20 и 21).

Статистички значајне разлике у редокс потенцијалу у контролној подлози (К) су присутне између *A. niger* и *M. plumbeus*; *P. canescens* и *A. niger*; *P. funiculosum* и *M. plumbeus*; *T. harzianum* и *A. niger*; *T. harzianum* и *P. canescens* и *T. harzianum* и *P. funiculosum* ( $p < 0,01$ ); као и између *P. funiculosum* и *P. canescens* ( $p < 0,05$ ). У подлози са детерџентом (Д) нема статистички значајне разлике у редокс потенцијалу између тестираних гљива (Табела 21).

Табела 19. Редокс потенцијал ферментационе течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива

Гљива	Подлога/дан инкубације									
	К/3	Д/3	К/6	Д/6	К/9	Д/9	К/12	Д/12	К/16	Д/16
<i>M. plumbeus</i>	131 ± 2,83	123 ± 2,83	176 ± 2,83	44 ± 2,83	194 ± 2,12	37 ± 2,83	193 ± 3,54	56 ± 2,83	200 ± 2,12	66 ± 3,54
<i>A. niger</i>	51 ± 2,83	118 ± 3,54	18 ± 2,83	4 ± 2,83	4 ± 1,41	43 ± 2,83	11 ± 2,83	53 ± 2,83	23 ± 2,83	46 ± 2,83
<i>P. canescens</i>	88 ± 3,18	115 ± 2,83	152 ± 3,54	38 ± 2,83	182 ± 2,83	61 ± 2,83	190 ± 2,83	104 ± 2,83	183 ± 2,83	84 ± 2,83
<i>P. funiculosus</i>	104 ± 2,83	81 ± 2,83	15 ± 2,83	21 ± 2,83	1 ± 1,43	60 ± 2,83	1 ± 1,43	96 ± 2,83	92 ± 1,42	81 ± 2,83
<i>T. harzianum</i>	191 ± 2,83	112 ± 2,83	197 ± 2,83	106 ± 2,83	236 ± 2,83	63 ± 2,83	243 ± 2,83	66 ± 2,83	244 ± 2,83	104 ± 2,83

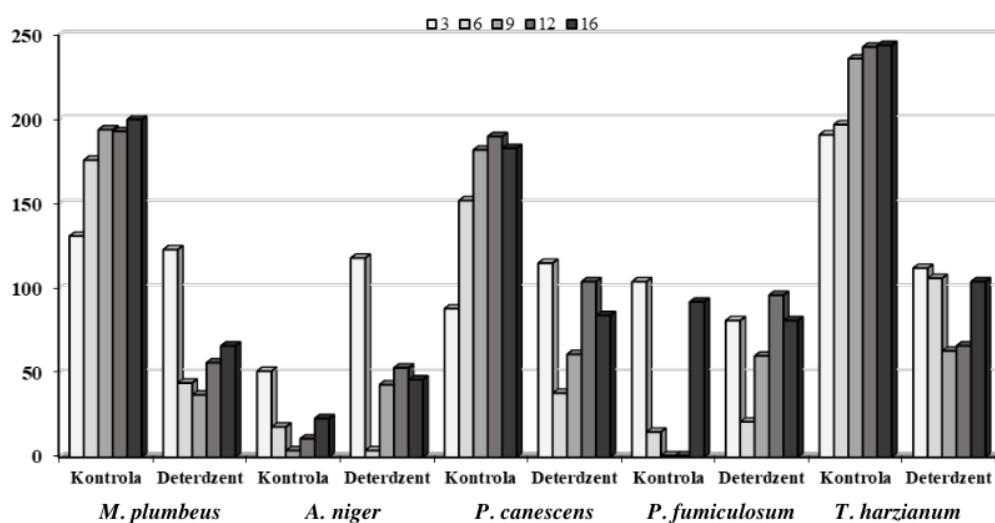
Вредности редокс потенцијала изражене у (mV) су приказане као средња вредност ± стандардна девијација; контролна подлога – К; подлога са детерџентом – Д

Табела 20. Поређење редокс потенцијала ферментационе течности

		гљива у контролној подлози (К)			гљива у подлози са детерџентом (Д)		
		A.	P.	T.	A.	P.	T.
		<i>niger</i>	<i>canescens</i>	<i>funiculosum</i>	<i>niger</i>	<i>canescens</i>	<i>funiculosum</i>
<i>M.</i>	<i>z</i>	2,611165	1,148913	2,619114	-1,77559	-0,731126	-1,25717
<i>plumbeus</i>	<i>p</i>	0,009024**	0,250593	0,008816**	0,075801	0,464703	0,208691
<i>A.</i>	<i>z</i>	-2,61116	0,104765	-2,61116	1,148913	-0,942881	-1,56670
<i>niger</i>	<i>p</i>	0,009024**	0,916563	0,009024**	0,250593	0,345743	0,117186
<i>P.</i>	<i>z</i>	2,200055	-2,61116	-2,61116	0,942881	0,628587	0,628587
<i>canescens</i>	<i>p</i>	0,027804*	0,009024**	0,009024**	0,345743	0,529620	0,529620
<i>P.</i>	<i>z</i>	-2,61911					1,361939
<i>funiculosum</i>	<i>p</i>	0,008816**					0,173218

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01

Ради боље прегледа резултата, промене редокс потенцијала ферментационе течности контролне (К) и подлоге са детергентом (Д) током 16 дана инкубације гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum*, су приказани и на Графикону 4.



Графикон 4. Промене редокс потенцијала ферментационе течности у контролној подлози (К) и подлози са детергентом (Д) током раста и развоја гљива

Редокс потенцијала у контролној подлози (К) за гљиву *M. plumbeus* је 3. дана био 131 mV, док је вредност редокс потенцијала у подлози са детергентом (Д) била 123 mV. Редокс потенцијал у контролној подлози (К) се интензивно повећавао до краја експеримента са изузетком од 9. до 12. дана, када је забележен незнатан пад. Најзначајније промене редокс потенцијала за ову гљиву, у контролној подлози (К) забележене су од 6. до 9. дана (са 176 mV на 194 mV). Вредност редокс потенцијала у подлози са детергентом (Д) се смањивала од 3. до 9. дана, док је од 9. до 16. дана забележена нагла промена. До 9. дана редокс потенцијал је износио 37 mV, а затим је дошло до повећања, па је 12. и 16. дана вредност редокс потенцијала била 56 mV и 66 mV. Најзначајнија промена редокс потенцијала се десила у периоду између 3. и 6. дана (са 123 mV на 44 mV). Ако се упореде ове две подлоге, редокс потенцијал у контролној подлози (К) је до краја инкубације (16. дан) био већи од редокс потенцијала у подлози са детергентом (Д).

Вредности редокс потенцијала контролне подлоге (К) за гљиву *A. niger* се смањивала у почетку, између 3. и 9. дана (са 51 mV на 4 mV), где је највеће снижење редокс потенцијала забележено у периоду од 3 до 6. дана (са 51 на 18). Од 9. дана инкубације редокс потенцијал у контролној подлози (К) се повећавао, тако да је у 12. дану износио 11 mV, а у 16. дану 23 mV. Са друге стране, када се ради о подлози са детергентом (Д), 3. дана је забележена највећа вредност редокс потенцијала од 118 mV. Од 3. дана вредност редокс потенцијала се нагло смањивала, и у 6. дану је износила само 4 mV. У периоду између 3. и 6. дана је забележено највеће снижење редокс потенцијала. Од 9. до 12 дана је дошло до благог повећања редокс потенцијала у подлози са детергентом (Д) (са 43 mV на 53 mV), док је од 12. до 16. дана измерено поновно снижење. Поређењем редокс потенцијала на обе подлоге, може се закључити да је редокс потенцијал у контролној подлози (К) само 9. дана био већи у односу на редокс потенцијал у подлози са детергентом (Д). Осталих дана инкубације, редокс потенцијал у контролној подлози (К) је био мањи од редокс потенцијала у подлози са детергентом (Д).

Када је реч о гљиви *P. canescens*, вредност редокс потенцијала у контролној подлози (К) се повећавала од 3. до 12. дана (са 88 mV на 190 mV), а највећа промена вредности је забележена између 3. и 12. дана (са 88 mV на 152 mV). Од 12. до 16. дана се вредност редокс потенцијала у контролној подлози (К) смањивала, без значајних промена. У подлози са детергентом (Д), вредност редокс потенцијала се смањивала од 3. до 6. дана, када је забележена и највећа промена редокс потенцијала (са 115 mV на 38 mV). Редокс потенцијал се повећавао од 6. до 9. дана док је од 12. до 16. дана дошло до поновног смањења. Ако поредимо редокс потенцијал са ове две подлоге, може се закључити да је редокс потенцијал у контролној подлози (К) само 3. дана био нижи од редокс потенцијала у подлози са детергентом (Д), док је од 6. дана до краја инкубације (16. дана) редокс потенцијал у контролној подлози (К) био већи од редокс потенцијала у подлози са детергентом (Д).

Када је реч о гљиви *P. funiculosum*, вредност редокс потенцијала у контролној подлози (К) је имала тенденцију опадања од 3. до 12 дана. Највеће смањење је измерено између 3. и 6. дана (са 104 mV на 15 mV). Занимљиво је то да је вредност редокс потенцијала између 9. и 12. дана остала непромењена тј., за



четири дана није дошло ни до повећања ни до смањења редокс потенцијала, па је и 9. и 12. дана вредност редокс потенцијала била 1 mV. Затим се десила нагла промена, што је имало за последицу да вредност редокс потенцијала између 12. и 16. дана нагло скочи (са 1 mV на 92 mV). Редокс потенцијал подлоге са детерцентом (Д) се смањивала између 3. и 6. дана (са 81 mV на 21 mV), а затим је дошло до нагле промене па је од 6. до 12. дана када је редокс потенцијал растао (са 21 mV на 96 mV). Највеће промене у вредности редокс потенцијала су се десиле између 3. и 6. дана, при чему се редокс потенцијал у подлози са детерцентом (Д) смањивао са 81 mV на 21 mV. На крају, од 12. до 16. дана је забележено само незнатно смањење редокс потенцијала. Ови резултати указују да је редокс потенцијал у контролној подлози (К) 3. дана био већи од редокс потенцијала у подлози са детерцентом (Д). Затим је 6., 9. и 12. дана редокс потенцијал у контролној подлози (К) био мањи од редокс потенцијала у подлози са детерцентом (Д), док је на крају, 16. дана инкубације, редокс потенцијал у контролној подлози (К) опет био већи од редокс потенцијала у подлози са детерцентом (Д).

Вредност редокс потенцијала контролне подлоге (К) за гљиву *T. harzianum* се повећавала од почетка до краја култивације гљиве. У контролној подлози (К) уочен је константан раст редокс потенцијала од 3. до 16. дана, где је највећа промена вредности забележена у периоду од 6. до 9. дана (са 197 mV на 236 mV). Када је реч о подлози са детерцентом (Д), од 3 до 9. дана редокс потенцијал је имао тенденцију опадања, док се од 9. до 16. дана нагло повећао. Највећа промена редокс потенцијала је забележена у периоду од 6. до 9. дана (са 106 mV на 63 mV). Поређењем редокс потенцијала на ове две подлоге, закључује се да је до краја инкубације (16. дан) редокс потенцијал у контролној подлози (К) био већи од редокс потенцијала у подлози са детерцентом (Д).

Сахароза присутна у контролној подлози (К) хидролизује дејством инвертаза на глукозу и фруктозу које се транспортују у ћелију фосфотрансферазним системом и катаболизују до пирувата чија даља судбина зависи од присуства кисеоника. Са акцептором електрона, NADH створен у гликолизи и ТСА циклусу може да се оксидује оксидативном фосфорилацијом. У одсуству кисеоника или другог погодног акцептора електрона, ферментација је одговорна за продукцију АТФ супстратним нивоом фосфорилације (Jakovljević, 2014).

Иницијална вредност редокс потенцијала у контролној подлози (К) износила је 340 mV, док је у подлози са детерцентом (Д) износила 80 mV. Од инокулације до 16. дана инкубације промене вредности редокс потенцијала у контролној подлози (К) и подлози са детерцентом (Д) биле су различитог интензитета у односу на врсту подлоге, врсте гљива и фазу раста. Вредност редокс потенцијала у контролној подлози (К) је опала након иницијалне, затим је расла код врста *M. plumbeus*, *P. canescens* и *T. harzianum* до краја инкубације, док је код врста *A. niger* и *P. funiculosum* опадала до деветог, односно 12. дана, након чега је благо порасла.

У подлози са детерцентом, (Д) вредност редокс потенцијала се повећала у току трећег дана инкубације за све тестиране врсте, а затим је опадала до шестог дана инкубације. До краја инкубације, вредности редокс потенцијала су се мењале и расле у односу на шести дан инкубације. Мерењем 16. дана инкубације, врсте *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum* су имале вредности редокс потенцијала веће него иницијалне, али мање него трећег дана инкубације, са изузетком врсте *P. funiculosum* чији редокс потенцијал је био као трећег дана инкубације. Вредности редокс потенцијала у опсегу од 100 до 350 mV указују на добре аерисане услове који су оптимални за процесе биоразградње. Међутим, након 16. дана инкубације у контролној подлози (К), једино су *M. plumbeus* (200 mV), *P. canescens* (183 mV) и *T. harzianum* (244 mV) показале оптималне вредности редокс потенцијала неопходне за процес биоразградње. Додавање детерцента у подлогу изазвало је значајно смањење вредности редокс потенцијала након трећег дана инкубације. Након 16. дана инкубације у подлози са детерцентом (Д), једино је врста *T. harzianum* имала вредност редокс потенцијала већу од 100 mV (104 mV). Може се закључити да присуство детерцента у подлози значајно смањује редокс потенцијал тестираних гљива.

Друга истраживања су показала да редокс потенцијал врста *A. niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium cyclopium*, *T. harzianum* и *Mucor racemosus*, изолованих из општинске канализације и индустријске отпадне воде, расте у току периода инкубације у подлози са детерцентом (Jakovljević, 2014; Jakovljević & Vrvic, 2017). Ови резултати нису потпуности у складу са резултатима ове

докторске дисертације, али то се може објаснито различитим пореклом изолата и великом разноврсношћу особина сојева у оквиру изолата.

### 5.4.3. Концентрација протеина

Протеини представљају за живе системе најзначајније органске молекуле, који се састоје од различитих аминокиселина. Тешко је издвојити неку функцију у организму или ћелији, а да се она одвија без помоћи протеина. Протеини обављају веома важне и бројне улоге у организму. Према улози можемо разврстати у две категорије:

1. структурни или градивни – улазе у грађу цитоплазме, ћелијске мембране (они контролишу полупропустљивост ћелијске мембране)
2. функционални – учествују у регулацији метаболичких процеса. У ову групу спадају ензими, хормони, пигменти (хемоглобин (транспортје кисеоник)), антитела (штите организам од страних материја) и др.

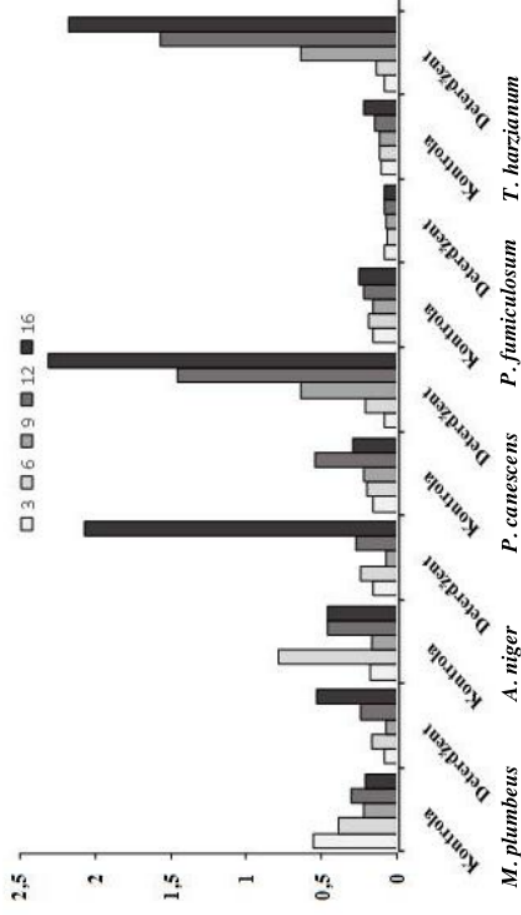
Највећу класу чине ензими. Ензими (ферменти) су биокатализатори који усмеравају ток хемијске реакције у ћелији (Chouhan et al., 2013). Последњих година се за производњу индустријских ензима, органских киселина, антибиотика и многих других производа све чешће примењују филаментозне гљиве захваљујући бројним особинама које поседују (Papaiani, 2004). Најважнија у овом смислу је способност да експримирају и секретују велике концентрације протеина. Гљиве из рода *Aspergillus* се највише користе у продукцији индустријских ензима зато што продукују највећу концентрацију хидролитичких ензима, пре свега амилаза и протеаза, затим продукују и глукозо-оксидазе, каталазе, пектиназе, липазе, фитазе и ксиланазе које се користе у индустрији хране, текстилној и папирној индустрији (Lubertozzi & Keasling, 2009; Fleissner & Dersch, 2010). Гљиве из рода *Trichoderma* су највише познате по продукцији целулаза, ензима који разграђују целулозу до моносахарида (García-Kirchner et al., 2005; de Castro et al., 2010).

На секрецију протеина јако утичу морфологија гљива (пелети и слободни филаменти) и услови храњиве подлоге (рН, температура, употреба адитива итд.) (Metz & Kossen, 1977). У зависности од концентрације и врсте гљива присуство детерџента и активних компоненти алкохола може деловати синергистички или инхибиторно на продукцију протеина (Стојановић, 1989).

Табела 22. Концентрације укупних протеина у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива

Гљива	Подлога/дан инкубације															
	К/3	Д/3	К/6	Д/6	К/9	Д/9	К/12	Д/12	К/16	Д/16						
<i>M. plumbeus</i>	0,555±0,003	0,086±0,002	0,387±0,003	0,166±0,003	0,224±0,003	0,076±0,003	0,309±0,003	0,239±0,003	0,208±0,003	0,539±0,003						
<i>A. niger</i>	0,177±0,003	0,160±0,003	0,785±0,003	0,245±0,003	0,171±0,003	0,076±0,003	0,457±0,003	0,269±0,003	0,458±0,003	2,066±0,003						
<i>P. sapescens</i>	0,157±0,003	0,091±0,003	0,202±0,003	0,207±0,003	0,220±0,003	0,640±0,003	0,543±0,003	1,456±0,003	0,292±0,003	2,309±0,003						
<i>P. funiculosus</i>	0,161±0,003	0,090±0,003	0,193±0,003	0,064±0,003	0,158±0,003	0,080±0,003	0,218±0,003	0,081±0,003	0,251±0,003	0,085±0,003						
<i>T. harzianum</i>	0,105±0,003	0,085±0,003	0,119±0,003	0,142±0,003	0,118±0,003	0,634±0,003	0,153±0,003	1,570±0,003	0,226±0,003	2,171±0,003						

Концентрација укупних протеина (у mg/mL) приказана је као средња вредност ± стандардна девијација; контролна подлога – К; подлога са детергентом – Д



Графикон 5. Концентрација протеина ферментационе течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) раста и развоја гљива

Концентрација укупних протеина (mg/mL) у ферментисаној течности гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum*, су мерене у контролној подлози (К) и у подлози са детергентом (Д) током 16 дана инкубације. Добијени резултати су приказани у Табели 22.

Ради боље прегледа резултата, концентрација протеина у ферментационој течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) током 16 дана инкубације гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum*, су приказани и на Графикону 5.

Концентрација протеина продукованих од стране гљиве *M. plumbeus* у контролној подлози (К) је опадала од 3. до 9. дана (са 0,555 mg/mL на 0,224 mg/mL), а највећа промена је забележена између 3. и 6. дана. Концентрација протеина у контролној подлози (К) у наредним данима је варирала - од 9. до 12. дана је измерено повећање концентрације протеина у подлози (са 0,224 mg/mL на 0,309 mg/mL), а затим од 12. до 16. дана је дошло до наглог снижавања. Концентрација протеина је такође варирала и у подлози са детергентом (Д), тако да се од 3. до 6. дана значајно повећавала (са 0,086 mg/mL на 0,166 mg/mL), затим се, у периоду између 6. и 9. дана, значајно снижавала, и на крају од 9. дана па до краја инкубације је уследило велико повећање концентрације протеина, са највећом променом између 12. и 16. дана (са 0,239 mg/mL на 0,539 mg/mL). Поређење концентрације протеина из ове две подлоге је указало на то да је код гљиве *M. plumbeus* концентрација протеина у контролној подлози (К) до 12. дана била већа од концентрације протеина у подлози са детергентом (Д). На крају, 16. дана инкубације концентрација протеина у подлози са детергентом (Д) (0,539 mg/mL) је била већа од концентрације протеина у контролној подлози (К) (0,208 mg/mL).

Концентрација протеина продукованих од стране гљиве *A. niger* у контролној подлози (К) у периоду од 3. до 6. дана се повећавала (са 0,177 mg/mL на 0,785 mg/mL), затим од 6. до 9. дана је опадала (са 0,785 mg/mL на 0,171 mg/mL), док је од 9. до 16. дана поново забележено повећање (са 0,171 mg/mL на 0,458 mg/mL). Највећа промена у концентрацији протеина је забележена између 9. и 12. дана (са 0,171 mg/mL на 0,457 mg/mL). Исти тренд је запажен на подлози са детергентом, с тим што је од 12. до 16. дана измерено изразито велико повећање

(са 0,269 mg/mL на 2,066 mg/mL). Код гљиве *A. niger* је уочена иста ситуација као код гљиве *M. plumbeus*, односно концентрација протеина у контролној подлози (К) је до 12. дана била већа од концентрације протеина у подлози са детергентом, док је 16. дана концентрација протеина у подлози са детергентом (Д) била већа (2,066 mg/mL) од концентрације протеина у контролној подлози (К) (0,458 mg/mL).

Концентрација протеина продукованих од стране гљиве *P. canescens* у контролној подлози (К) се повећавала од 3. до 12. дана (са 0,157 mg/mL на 0,543 mg/mL), са највећом променом између 9. и 12. дана, док је у периоду од 12. до 16. дана уочен нагли пад (са 0,543 mg/mL на 0,292 mg/mL). Када је реч о подлози са детергентом (Д), уочен је велики распон раста концентрације протеина од 3. до 16. дана (са 0,091 mg/mL на 2,309 mg/mL). Концентрација протеина у контролној подлози (К) је била већа од концентрације протеина у подлози с детергентом (Д) само 3. дана култивације, док је у осталим данима концентрација протеина у подлози са детергентом (Д) била већа од концентрације протеина у контролној подлози (К).

Концентрација протеина продукованих од стране гљиве *P. funiculosum* у контролној подлози (К) се повећавала од 3. до 6. дана (са 0,161 mg/mL на 0,193 mg/mL), па је између 6. и 9. дана уследио благи пад (са 0,193 mg/mL на 0,158 mg/mL), а затим се до 16. дана инкубације концентрација протеина поново повећавала. У подлози са детергентом (Д) је уочена обрнута ситуација – концентрација протеина у истим данима је најпре опадала, затим се повећавала, и на крају поново опадала. Концентрација протеина у контролној подлози (К) је све до краја инкубације (16. дан) била већа од концентрације протеина у подлози са детергентом (Д).

Концентрација протеина продукованих од стране гљиве *T. harzianum* у контролној подлози (К) се од 3. до 6. дана повећавала (са 0,105 mg/mL на 0,119 mg/mL), затим занемарљиво опала између 6. и 9. дана (са 0,119 mg/mL на 0,118 mg/mL), и на крају наставила да се повећава од 9. до 16. дана (са 0,118 mg/mL на 0,0,226 mg/mL), без наглих промена. У подлози са детергентом (Д) је уочено константно и нагло повећање концентрације протеина од 3. до 16. дана (са 0,105 mg/mL на 2,171 mg/mL). Концентрација протеина у контролној подлози (К) је

само 3. дана инкубације била већа од концентрације протеина у подлози са детергентом (Д), док је надаље до краја инкубације концентрација протеина у подлози са детергентом (Д) била већа од концентрације протеина у контролној подлози (К).

Највећу концентрацију протеина на крају инкубације (16. дана) у контролној подлози (К) је продуковала гљива *A. niger* (0,458 mg/mL), док је најмању продуковала *M. plumbeus* (0,208 mg/mL). Када је реч о подлози са детергентом (Д) на крају инкубације највећу концентрацију протеина је продуковала *P. canescens* (2,309 mg/mL), док је најмању концентрацију протеина продуковала *P. funiculosum* (0,085 mg/mL). На основу свих резултата, може се закључити да је додавање детергента у подлогу стимулативно деловало на продукцију протеина свих тестираних гљива, нарочито на врсте *P. canescens* (2,309 mg/mL), *T. harzianum* (2,171 mg/mL) и *A. niger* (2,066 mg/mL) након 16 дана инкубације у односу на контролну подлогу (К). Сличне резултате су добили Stojanović et al., који су утврдили да је биопродукција протеина гљиве *Trichothecium roseum* била стимулирана у медијуму који је садржао детергент (Stojanović et al., 2011a). Додавање 1% детергента у подлогу је стимулативно деловало на продукцију аминокиселина (лизин, хистидин, аргинин, аспаргинска киселина, тренин, серин, глутаминска киселина, пролин, глицин, аланин, валине, леуцин, тирозин и фенилаланин) врсте *A. niger* (Stojanović et al., 2011b). Повећана производња протеина у случају *P. canescens*, *T. harzianum* и *A. niger* у присуству детергента доводи до потребе за даљим истраживањима ових врста јер резултати указују да су то организми који се потенцијално могу користити за биоразградацију детергента и компоненти детергента које се могу наћи у отпадним водама и у природним пловним путевима.

#### 5.4.4. Концентрација слободних и укупних органских киселина

Органске киселине су секундарни метаболити, произведени деградацијом угљених хидрата, масти и протеина и углавном укључују оксалну, мрављу, лимунску, фумарну, јабучну, ћилибарну, сирћетну и фосфорну киселину као и многе друге који настану у мањем износу (Rivasseau et al., 2006). У овој докторској дисертацији, вршено је мерење концентрације слободних органских киселина (mg/mL) у контролној течной подлози (К) и у подлози са детергентом

(Д) **ТОКОМ** раста гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum* у периоду од шест до девет дана (Табела 23).

Табела 23. Концентрација слободних органских киселина у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива

Гљива	Подлога/дан инкубације			
	К/6	Д/6	К/9	Д/9
<i>M. plumbeus</i>	0,068 ± 0,001	0,125 ± 0,003	0,075 ± 0,003	0,150 ± 0,003
<i>A. niger</i>	0,150 ± 0,003	0,100 ± 0,003	0,525 ± 0,003	0,175 ± 0,003
<i>P. canescens</i>	0,058 ± 0,003	0,100 ± 0,003	0,190 ± 0,003	0,150 ± 0,003
<i>P. funiculosum</i>	0,131 ± 0,003	0,075 ± 0,003	0,035 ± 0,003	0,100 ± 0,003
<i>T. harzianum</i>	0,208 ± 0,003	0,125 ± 0,003	0,112 ± 0,003	0,150 ± 0,003

Концентрација слободних органских киселина (у mg/mL) је приказана као средња вредност ± стандардна девијација; контролна подлога – К; подлога са детергентом – Д

Промене у концентрацији слободних органских киселина у контролној подлози (К) и подлози са детергентом (Д) биле су сразмерне једино код *M. plumbeus* шестог и деветог дана инкубације, док код осталих гљива постоји изражена несагласност у промени концентрације слободних органских киселина (Табела 24). Другим речима, код *P. funiculosum* и *T. harzianum* концентрација слободних органских киселина је била значајно већа у шестог дана контролној подлози (К) у поређењу са деветим даном, док је у подлози са детергентом (Д) ситуација била обрнута. Са друге стране, код гљива *A. niger* и *P. canescens*, концентрација слободних органских киселина је била значајно већа у контролној подлози (К) деветог дана у односу на шести дан. Иста ситуација је забележена и у подлози са детергентом (Д).

Табела 24. Термини и третмани за сваку гљиву у контролној подлози (К) и подлози са детергентом (Д)

	$\chi^2$	P
<i>M. plumbeus</i>	0,09	0,7605
<i>A. niger</i>	19,43	<0.001***
<i>P. canescens</i>	15,10	= 0.001***
<i>P. funiculosum</i>	44,82	<0.001***
<i>T. harzianum</i>	22,14	<0.001***

\*\*\* p < 0,001



Табела 25. Поређење концентрација слободних органских киселина ферментационе течности гљива у контролној подлози (К)

		<i>A. niger</i>	<i>P. canescens</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>T. harzianum</i>
<i>M. plumbeus</i>	$\chi^2$	37,45	23,16	31,61	11,78
	<b>p</b>	0.001***	0.001***	0.001***	0.001***
<i>A. niger</i>	$\chi^2$		0,08	189,94	170,61
	<b>p</b>		0,7714	0.001***	0.001***
<i>P. canescens</i>	$\chi^2$			121,35	95,50
	<b>p</b>			0.001***	0.001***
<i>P. funiculosum</i>	$\chi^2$				9,38
	<b>p</b>				0,0022**

\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

Промене концентрације слободних органских киселина су сразмерне у контролној подлози (К) шестог и деветог дана инкубације једино код *A. niger* и *P. canescens* ( $\chi^2 = 0,08$ ,  $p > 0,05$  или  $p = 0,7714$ ; Табела 25). У свим осталим међусобним поређењима постоје велике несагласности у концентрацији слободних органских киселина шестог и деветог дана инкубације ( $p < 0,001$ ), које су нешто мање изражене код поређења концентрације слободних органских киселина гљива *T. harzianum* и *P. funiculosum* ( $p < 0,01$ ).

Несагласности у концентрацијама слободних органских киселина гљива у подлози са детерцентом (Д) су детектоване у поређењу *A. niger* и *M. plumbeus* и *A. niger* и *P. canescens* ( $\chi^2 = 4,33$ ,  $p < 0,05$  или  $p = 0,0374$ ; Табела 26), шестог и деветог дана инкубације.

Табела 26. Поређење концентрација слободних органских киселина ферментационе течности гљива у подлози са детерцентом (Д)

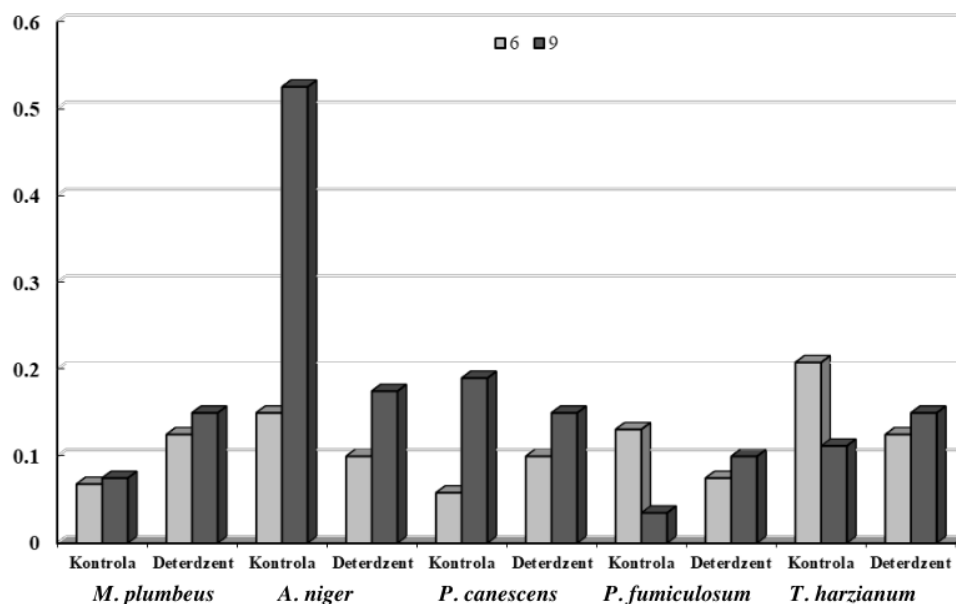
		<i>A. niger</i>	<i>P. canescens</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>T. harzianum</i>
<i>M. plumbeus</i>	$\chi^2$	4,33	1,38	0,20	0,01
	<b>p</b>	0,0374*	0,2408	0,6576	0,9318
<i>A. niger</i>	$\chi^2$		0,59	1,63	4,33
	<b>p</b>		0,4431	0,2012	0,0374*
<i>P. canescens</i>	$\chi^2$			0,24	1,38
	<b>p</b>			0,6249	0,2408
<i>P. funiculosum</i>	$\chi^2$				0,20
	<b>p</b>				0,6576

\* p < 0,05

Ради боље прегледа резултата, концентрација слободних органских киселина у ферментисаној течности контролне (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum* у периоду од шестог до деветог дана, приказани су на Графикону 6.

Концентрација слободних органских киселина у контролној подлози (К) и подлози са детерџентом (Д) гљиве *M. plumbeus* је била повећана деветог дана инкубације. Ако упоредимо ове две подлоге, концентрација слободних органских киселина је била мања у контролној подлози (К) од концентрације слободних органских киселина у подлози са детерџентом (Д).

Концентрација слободних органских киселина у контролној подлози (К) гљиве *A. niger* се знатно повећала од 6. до 9. дана (са 0,150 mg/mL на 0,525 mg/mL), док се у подлози са детерџентом (Д) концентрација слободних органских киселина такође повећава (са 0,100 mg/mL на 0,175 mg/mL), али у мањој размери. Концентрација слободних органских киселина је у оба дана била већа у контролној подлози (К), него у подлози са детерџентом (Д).



Графикон 6. Концентрација слободних органских киселина у ферментисаној течности контролне (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива

Концентрација слободних органских киселина у контролној подлози (К) гљиве *P. canescens* се повећала три пута (са 0,058 mg/mL на 0,190 mg/mL), за разлику од концентрације органских киселина у подлози са детергентом (Д), где је тенденција раста била мање приметна (са 0,100 mg/mL на 0,150 mg/mL). Концентрација слободних органских киселина у контролној подлози (К) је трећега дан била већа од концентрације слободних органских киселина у подлози са детергентом (Д). Шестог дана концентрација слободних органских киселина у подлози са детергентом (Д) је била већа него у контролној подлози (К).

Концентрација слободних органских киселина у контролној подлози (К) гљиве *P. funiculosum* се значајно смањила (са 0,131 mg/mL на 0,035 mg/mL), за разлику од подлоге са детергентом (Д), код које је уочен благи пораст концентрације слободних органских киселина (са 0,075 mg/mL на 0,100 mg/mL).

Концентрација слободних органских киселина у контролној подлози (К) гљиве *T. harzianum* се значајно смањила (са 0,208 mg/mL на 0,112 mg/mL), за разлику од подлоге са детергентом (Д), код које је уочен благи пораст концентрације слободних органских киселина (са 0,125 mg/mL на 0,150 mg/mL).

У контролној подлози (К) највећа концентрација слободних органских киселина је измерена у ферментационој течности гљиве *A. niger* (0,525 mg/mL) деветог дана инкубације, а најмања концентрација је измерена у ферментационој течности гљиве *P. funiculosum* (0,100 mg/mL). Концентрација слободних органских киселина гљива *A. niger* и *P. canescens* у подлози са детергентом (Д) је била мања од концентрације слободних органских киселина у контролној подлози (К) деветог дана инкубације, па се може закључити да је детергент показао инхибиторно дејство на лучење слободних органских киселина код ових врста. Сличне резултате су добили Stojanović et al., који су указали да је интензитет продукције слободних органских киселина гљиве *T. roseum* је значајно смањен у подлози са детергентом (Д) (Stojanović et al., 2011a). Jakovljević et al. истичу да је концентрација слободних органских киселина гљиве *F. oxysporum* је била смањена у подлози са 1% детергента (Д) у поређењу са контролном подлогом (К) (Jakovljević et al., 2014a). Продукција слободних органских киселина врста *M. plumbeus*, *P. funiculosum* и *T. harzianum* је била стимулирана у присуству детергента у подлози (Д) у односу на контролну подлогу (К) деветог дана

инкубације, што значи да присуство детерџента стимулативно дејство на продукцију слободних органских киселина.

Концентрација укупних органских киселина (mg/mL) у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) је праћена током раста и развоја гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum* у периоду од 6. до 9. дана (Табела 27).

Табела 27. Концентрација укупних органских киселина у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива

Гљива	Подлога/дан инкубације			
	К/6	Д/6	К/9	Д/9
<i>M. plumbeus</i>	0,110 ± 0,003	0,200 ± 0,003	0,126 ± 0,003	0,300 ± 0,003
<i>A. niger</i>	0,550 ± 0,003	0,250 ± 0,003	0,210 ± 0,003	0,300 ± 0,003
<i>P. canescens</i>	0,125 ± 0,003	0,200 ± 0,003	0,340 ± 0,003	0,300 ± 0,003
<i>P. funiculosum</i>	0,163 ± 0,003	0,150 ± 0,003	0,332 ± 0,003	0,350 ± 0,003
<i>T. harzianum</i>	0,291 ± 0,003	0,200 ± 0,003	0,057 ± 0,003	0,160 ± 0,003

Вредности концентрација слободних органских киселина (у mg/mL) су приказане као средња вредност ± стандардна девијација; контролна подлога – К; подлога са детерџентом – Д

Статистичком обрадом података је утврђена велика несагласнаост у промени концентрација укупних органских киселина у контролној подлози (К) и подлози са детерџентом (Д) шестог и девог дана инкубације код *A. niger*, *P. canescens* и *T. harzianum* ( $p < 0,001$ ; Табела 28).

Табела 28. Термини и третмани за сваку гљиву у контролној подлози (К) и подлози са детерџентом (Д)

	$\chi^2$	P
<i>M. plumbeus</i>	2,61	0,1063
<i>A. niger</i>	96,09	<0.001***
<i>P. canescens</i>	17,98	<0.001***
<i>P. funiculosum</i>	0,86	0,3541
<i>T. harzianum</i>	64,26	<0.001***

\*\*\*  $p < 0,001$

У контролној подлози (К) су биле јако изражене несагласности у концентрацији укупних органских киселина шестог и девог дана инкубације ( $p < 0,001$ ), са изузетком поређења концентрација укупних органских киселина

гљива *P. canescens* и *P. funiculosum*, где је несагласност врло близу границе значајности ( $p = 0,0485$ ) (Табела 29). Код гљиве *P. canescens* у контролној подлози (К) је забележена преко два пута већа концентрација укупних органских киселина деветог дана у односу на шести дан, а код *T. harzianum* неколико пута већа концентрација укупних органских киселина шестог у односу на девети дан.

Табела 29. Поређење концентрација укупних органских киселина ферментационе течности гљива у контролној подлози (К)

		<i>A. niger</i>	<i>P. canescens</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>T. harzianum</i>
<i>M. plumbeus</i>	$\chi^2$	52,30	26,46	12,21	87,82
	p	0.001***	0.001***	0.001***	0.001***
<i>A. niger</i>	$\chi^2$		239,44	188,43	15,91
	p		0.001***	0.001***	0.001***
<i>P. canescens</i>	$\chi^2$			3,89	254,18
	p			0,0485*	0.001***
<i>P. funiculosum</i>	$\chi^2$				209,25
	p				0.001***

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Статистичком обрадом података концентрације укупних органских киселина у подлози са детерџентом (Д) и међусобном поређењу гљива шестог и деветог дана инкубације, утврђено је да постоји сагласност код поређења *M. plumbeus* и *A. niger*; *M. plumbeus* и *P. canescens* и код *A. niger* и *P. canescens*, док је код осталих комбинација несагласност јако изражена ( $p < 0,001$ ; Табела 30).

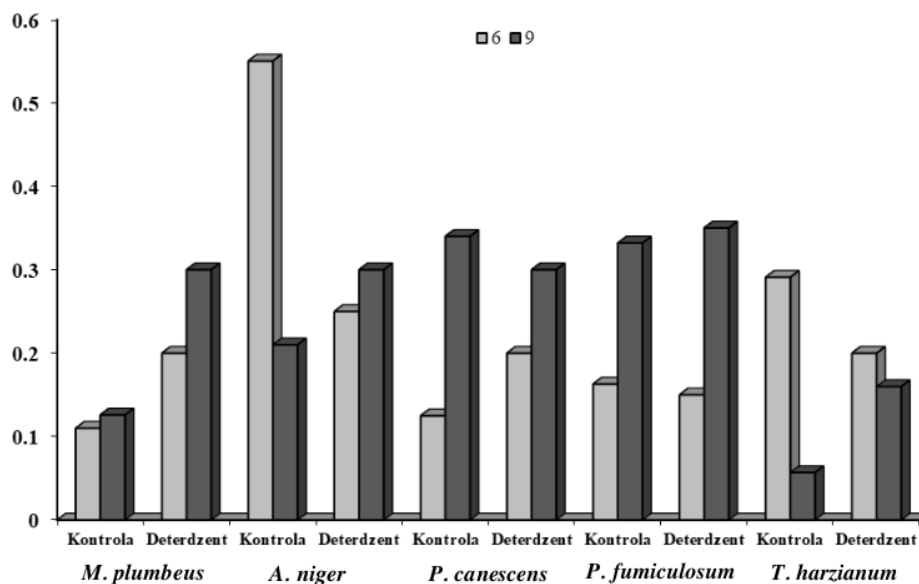
Табела 30. Поређење концентрација слободних органских киселина ферментационе течности гљива у подлози са детерџентом (Д)

		<i>A. niger</i>	<i>P. canescens</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>T. harzianum</i>
<i>M. plumbeus</i>	$\chi^2$	2,96	0,00	10,55	19,74
	p	0,0852	0,9485	0,0012**	<0.001***
<i>A. niger</i>	$\chi^2$		2,96	25,87	8,48
	p		0,0852	<0.001***	0,0036**
<i>P. canescens</i>	$\chi^2$			10,55	19,74
	p			0,0012**	<0.001***
<i>P. funiculosum</i>	$\chi^2$				55,58
	p				<0.001***

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Ради боље прегледа резултата, концентрације укупних органских киселина у ферментисаној течности контролне (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива *M. plumbeus*, *A. niger*, *P. canescens*, *P. funiculosum* и *T. harzianum* периоду од шестог до деветог дана, приказани су на Графикону 7.

Концентрација укупних органских киселина у контролној подлози (К) гљиве *M. plumbeus* се минимално повећала од 6. до 9. дана (са 0,110 mg/mL на 0,126 mg/mL) док је у подлози са детерџентом (Д) забележен већи пораст концентрације слободних органских киселина (са 0,200 mg/mL на 0,300 mg/mL). Концентрација укупних органских киселина у контролној подлози (К) је била мања од концентрације укупних органских киселина у подлози са детерџентом (Д) оба тестирана дана.



Графикон 7. Концентрација укупних органских киселина у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива

Концентрација укупних органских киселина у контролној подлози (К) гљиве *A. niger* је била дупло мања од концентрације органских киселина у подлози са детерџентом (Д) шестог дана инкубације (са 0,550 на 0,250). Деветог дана инкубације, концентрација укупних органских киселина је била већа у

подлози са детерџентом (Д) (0,300 mg/mL) у односу на контролну подлогу (К) (0,210 mg/mL).

Концентрација укупних органских киселина гљиве *P. canescens* је била повећана шестог дана инкубације у подлози са детерџентом (Д) (0,200 mg/mL) у поређењу са контролном подлогом (К) (0,125 mg/mL). Деветог дана инкубације, концентрација укупних органских киселина у контролној подлози (К) (0,340 mg/mL) је била већа од концентрације укупних органских киселина у подлози са детерџентом (Д) (0,300 mg/mL).

Концентрација укупних органских киселина гљиве *P. funiculosum* у контролној подлози (К) шестог дана је била већа (0,163 mg/mL) од концентрације слободних органских киселина у подлози са детерџентом (Д) (0,150 mg/mL), док је деветог дана концентрација слободних органских киселина била већа у подлози са детерџентом (Д) (0,350 mg/mL) него у контролној подлози (К) (0,332 mg/mL).

Концентрација укупних органских киселина гљиве *T. harzianum* у контролној подлози (К) (0,291 mg/mL) шестог дана је била већа од концентрације слободних органских киселина у подлози са детерџентом (Д) (0,200 mg/mL). Деветог дана инкубације, концентрација слободних органских киселина је знатно била већа у подлози са детерџентом (Д) (0,160 mg/mL) него у контролној подлози (К) (0,057 mg/mL).

На крају периода инкубације у контролној подлози (К), највећу концентрацију укупних органских киселина има гљива *P. canescens* (0,340 mg/mL), а најмању гљива *T. harzianum* (0,057 mg/mL), док у подлози са детерџентом (Д) највећу концентрацију укупних органских киселина има гљива *P. funiculosum* (0,350 mg/mL) а најмању гљива *T. harzianum* (0,160 mg/mL). Генерално посматрано, све тестиране гљиве, осим *P. canescens* су деветог дана инкубације продуковале већу концентрацију укупних органских киселина у подлози која је садржала детерџент (Д) у поређењу са контролном подлогом (К). У подлози са детерџентом (Д), све гљиве осим *T. harzianum* су продуковале већу концентрацију укупних органских киселина деветог дана инкубације у поређењу са шестим даном, што указује да детерџент делује стимулативно на продукцију органских киселина гљива. Јаковљевић et al. су указали да гљива *F. oxysporum* продукује већу концентрацију укупних органских киселина у подлози са 1%

детергента (Д) у поређењу са контролном подлогом (К), што је у складу са резултатима добијеним у оквиру ове докторске дисертације (Jakovljević et al., 2014a)

Производња органских киселина зависи и од врсте гљиве и врсте подлоге у којој се она гаји. Истраживачи су приметили да акумулација оксалне киселине у цитоплазми утиче на регулацију рН вредности цитоплазме. Strasser et al. су приметили да *Aspergillus niger* у својој цитоплазми продукује оксалну киселину ван Крепсовог циклуса. Хемијски састав комерцијалних детергената је веома сложен и састоји се од мешавине активних компоненти, фосфата, избељивача, итд. Свака од ових компоненти може да реагује са активним центром ензима, што доводи до њихове инхибиције или активације, која се одражава на раст и развој гљива (Strasser et al., 1994). С друге стране, појединачне компоненте детергента многе гљиве могу да користе као супстрат за исхрану (Jakovljević et al., 2014a).

Најзначајнији део алкалне толеранције чине органске киселине. Разликујемо спољашњу и унутрашњу рН вредност. У случају када је унутрашња рН вредност виша од спољашње, органске киселине се манифестују у дисосованом облику у цитоплазми и то као за последицу даје повећање унутрашње киселости, а потом те киселине смањују спољашњу рН вредност, због њиховог излучивање у екстрацелуларно средину. Титрациону киселост, односно концентрацију слободних органских киселина, можемо израчунати тако што уз помоћ јаких база неутралишемо протоне који одговарају управо тим слободним органским киселинама. Поред слободних, органске киселина се јављају и у везаном облику. Када саберемо везане и слободне органске киселине добијамо укупну концентрацију органских киселина. За време алкалног стреса повећава се концентрација свих органских киселина (Straser et al., 1994). Органске киселине се више таложи због смањења концентрације неорганских анјона (Wang et al., 1999).

#### **5.4.5. Ензимска активност алкалне фосфатазе**

Алкалне фосфатазе су групно-специфични ензими који катализирају хидролизу моноестера фосфатне киселине и алкохола. Оптимални рН за деловање ензима је између 9,8 и 10,5, а активност такође зависи и од врсте супстрата и врсте пуфера. Ова група ензима показује најјачу активност у алкалном подручју, зато се и назива алкална фосфатаза.



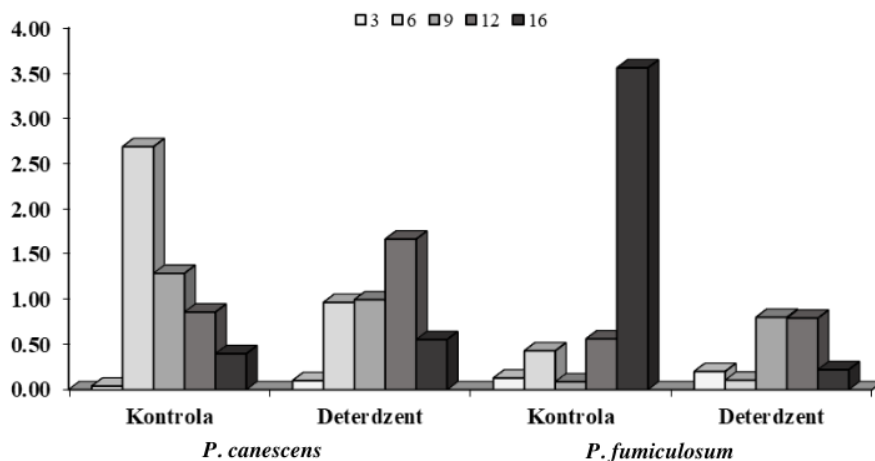
Ензимска активност алкалне фосфатазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) је мерена од момента инокулације до 16. дана инкубације гљива *P. canescens* и *P. funiculosum* (Табела 31).

Табела 31. Ензимска активност алкалне фосфатазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја испитиваних гљива

Гљива	Подлога/дан инкубације									
	К/3	Д/3	К/6	Д/6	К/9	Д/9	К/12	Д/12	К/16	Д/16
<i>P. canescens</i>	0,040 ± 0,003	0,101 ± 0,004	2,687 ± 0,003	0,965 ± 0,003	1,287 ± 0,003	0,995 ± 0,003	0,858 ± 0,003	1,665 ± 0,003	0,398 ± 0,004	0,555 ± 0,003
<i>P. funiculosum</i>	0,129 ± 0,003	0,202 ± 0,003	0,430 ± 0,003	0,106 ± 0,003	0,088 ± 0,003	0,801 ± 0,003	0,563 ± 0,003	0,791 ± 0,003	3,558 ± 0,003	0,222 ± 0,003

Ензимска активност алкалне фосфатазе (у IU/mL) приказана као средња вредност ± стандардна девијација; контролна подлога – К; подлога са детерџентом – Д

Ради боље прегледа резултата, ензимска активност алкалне фосфатазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива *P. canescens* и *P. funiculosum* од момента инокулације до 16. Дана инкубације је приказана на Графикону 8.



Графикон 8. Ензимска активност алкалне фосфатазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива *Penicillium canescens* и *Penicillium funiculosum*

Активност алкалне фосфатазе гљиве *P. canescens* у контролној подлози (К) се од 3. до 6. дана интензивно повећавала и тада је забележена највећа промена активности фосфатазе (са 0,040 IU/mL на 2,687 IU/mL). Међутим, од 6. до 16. дана, активност фосфатазе се значајно смањила (са 2,687 IU/mL на 0,398 2,687 IU/mL). У подлози са детерцентом (Д), активност алкалне фосфатазе се константно повећавала од 3. до 12. дана (са 0,101 IU/mL на 1,665 IU/mL), да би вредност 16. дана инкубације пала на 0,555 IU/mL. Поређењем активности алкалне фосфатазе са ове две подлоге може се закључити да је активност алкалне фосфатазе у контролној подлози (К) трећег дана инкубације била мања од активности алкалне фосфатазе у подлози са детерцентом (Д). Међутим, шестог и деветог дана инкубације, активност алкалне фосфатазе је била мања у подлози са детерцентом (Д) у поређењу са контролном подлогом, док је 12. и 16. дана инкубације активност алкалне фосфатазе у подлози са детерцентом (Д) била већа него у контролној подлози (К).

Активност алкалне фосфатазе гљиве *P. funiculosum* у контролној подлози (К) се повећавала од 3. до 6. дана (са 0,129 IU/mL на 0,430 IU/mL). У периоду од шестог до деветог дана инкубације, забележен је нагли пад активности алкалне фосфатазе (са 0,430 IU/mL на 0,088 IU/mL), да би се од 9. до 16. дана активност алкалне фосфатазе знатно повећала, и на крају 16. дана износила 3,558 IU/mL. У подлози са детерцентом (Д) забележена су блага варирања – од 3. до 6. дана активност алкалне фосфатазе се смањивала (са 0,202 IU/mL на 0,106 IU/mL), затим се од 6. до 9. дана повећавала (са 0,106 IU/mL на 0,801 IU/mL) да би се до 16. дана инкубације наставила смањивати (до 0,222 IU/mL). Поређењем активности алкалне фосфатазе са ове две подлоге може се закључити да је активност алкалне фосфатазе је у контролној подлози (К) трећег дана инкубације била је мања од активности алкалне фосфатазе у подлози са детерцентом (Д). Међутим, шестог дана инкубације се ситуација окренула, да би деветог дана инкубације дошло до великог скока активности алкалне фосфатазе у подлози са детерцентом (Д), па је активност алкалне фосфатазе била чак девет пута већа него у контролној подлози (К). Активност алкалне фосфатазе је 12. дана, такође, била већа у подлози са детерцентом (Д) него у контролној подлози (К), али је разлика била доста мања. На крају инкубације (16. дана), активност алкалне фосфатазе је била мања у подлози са детерцентом (Д) него у контролној подлози (К).

Поређењем активност алкалне фосфатазе ове две гљиве на крају периода инкубације у контролној подлози (К), може се закључити да је *P. funiculosum* имала већу активност алкалне фосфатазе него гљива *P. canescens*. Међутим, у подлози са детергентом (Д), *P. funiculosum* је показала мању активност алкалне фосфатазе него гљива *P. canescens*. Добијени резултати су указали да присуство детергента у подлози инхибиторно делује на активност алкалне фосфатазе код гљиве *P. funiculosum*, док код гљиве *P. canescens*, присуство детергента делује стимулативно да активност алкалне фосфатазе.

Улога фосфатаза је да хидролизује естре анхидрид и фосфорне киселине. Фосфатазе су саставни део различитих процеса као што су ћелијски циклус, диференцирање, итд. Већина алкалних фосфатаза специфично делује на супстрат. Аутори су испитивали способност гљива да продукују алкалне фосфатазе на подлогама које су садржале веће и мање концентрације фосфата. Закључено је да најбољу активност алкалне фосфатазе показују гљиве које су расле на подлогама са мањом концентрацијом фосфата (Schmidt et al., 1956; Yoshiyuki et al., 1968).

Познато је да алкална фосфатаза хидролизује фосфомоноестре из реда органских молекула, као што су рибонуклеотиди, деоксирибонуклеотиди, протеини, алкалоиди, фосфати, естри и анхидриди фосфорне киселине (Mahesh et al., 2010). Ова група ензима је укључена у различите биолошке процесе (нпр. ћелијски циклус, диференцијација, итд.) и има примену у индустрији (Rani et al., 2012). Не постоји много истраживања о продукцији или активности алкалне фосфатазе продуковане од стране гљива. Најчешће је проучавана продукција и активност алкалне фосфатазе продуковане од стране бактерија (Mahesh et al., 2010; Grujović et al., 2020; Mladenović et al., 2020). Jakovljević & Vrgić су испитивали утицај детергента у концентрацији од 0,3% на активност алкалне фосфатазе врста *A. niger*, *T. harzianum*, *P. chrysogenum*, *P. cyclopium* и *M. racemosus*. Они су указали да је додавање детергента деловало мање или више инхибиторно на активност алкалне фосфатазе *P. cyclopium* (81,18%), *P. chrysogenum* (26, 86%) и *M. racemosus* (61,33%) у поређењу са контролном подлогом (К) (Jakovljević & Vrgić, 2017). Исти аутори су истакли да је активност алкалне фосфатазе врста *A. niger* и *T. harzianum* била благо (за 12,70%) и значајно (за 156,86%) појачана у присуству детергента. Инхибиција активност алкалне

фосфатазе у присуству детергента се може објаснити саставом медијума за раст и специфичним деловањем ензима на  $\beta$ -глицерофосфату (Jakovljević et al., 2014b; 2014c).

Закључци истраживања које су спровели Jakovljević & Vrvic се поклапају са закључцима произашлим из резултата ове докторске дисертације, а то је да се гљиве узгајајане у примењеним експерименталним условима могу сматрати значајним извором алкалне фосфатазе. Додавање комерцијалног детергента у течни медијум се може користити као стратегија за побољшање активности ензима код одређених врста (Jakovljević & Vrvic, 2017). Резултати добијени у овој дисертацији доприносе малобројним сазнањима о примени гљива у биотехнологији и управљању отпадом, и пружају добру основу за даља истраживања ове теме.

#### 5.4.6. Ензимска активност алкалне инвертазе

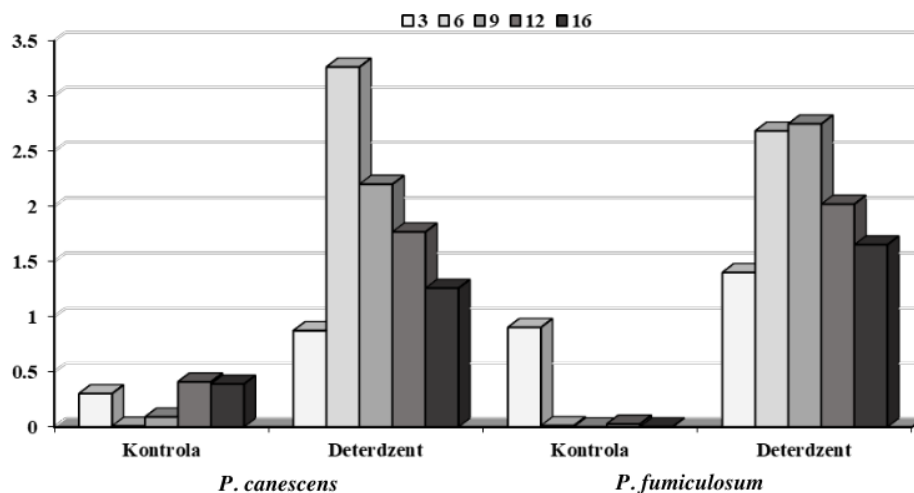
Ензимска активност алкалне инвертазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) је мерена од момента инокулације до 16. дана инкубације гљива *P. canescens* и *P. funiculosum* (Табела 32).

Табела 32. Ензимска активност алкалне инвертазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива

Гљива	Подлога/дан инкубације									
	К/3	Д/3	К/6	Д/3	К/9	Д/9	К/12	Д/12	К/16	Д/16
<i>P. canescens</i>	0,303 ± 0,003	0,873 ± 0,003	0,009 ± 0,003	3,262 ± 0,003	0,091 ± 0,003	2,200 ± 0,003	0,410 ± 0,003	1,768 ± 0,003	0,390 ± 0,003	1,258 ± 0,003
<i>P. funiculosum</i>	0,903 ± 0,003	1,400 ± 0,003	0,013 ± 0,003	2,683 ± 0,003	0,002 ± 0,001	2,747 ± 0,003	0,028 ± 0,003	2,020 ± 0,003	0,003 ± 0,003	1,652 ± 0,003

Ензимска активност алкалне инвертазе (у IU/mL) приказана као средња вредност ± стандардна девијација; контролна подлога – К; подлога са детергентом - Д

Ради боље прегледа резултата, ензимска активност алкалне инвертазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детергентом (Д) током раста и развоја гљива *P. canescens* и *P. funiculosum* од момента инокулације до 16. дана инкубације приказана је на Графикону 9.



Графикон 9. Ензимска активност алкалне инвертазе у ферментисаној течности контролне подлоге (К) и подлоге са детерџентом (Д) током раста и развоја гљива *Penicillium canescens* и *Penicillium funiculosum*

Активност алкалне инвертазе гљиве *P. canescens* у контролној подлози (К) се знатно смањила од 3. до 6. дана култивације (са 0,303 IU/mL на 0,009 IU/mL), затим се од 6. до 12. дана нагло повећала (са 0,009 IU/mL на 0,410 IU/mL), док се 16. дана поновно смањила на 0,390 IU/mL. Активност алкалне инвертазе у подлози са детерџентом (Д) се знатно повећала између 3. и 6. дана инкубације, када је забележен и највећи раст (са 0,873 IU/mL на 3,262 IU/mL). Од 6. до 16. дана инкубације, активност алкалне инвертазе се константно смањивала (са 3,262 IU/mL на 1,258 IU/mL). Ако се упореди активност алкалне инвертазе ове две подлоге до краја инкубације, може се закључити да је активност алкалне инвертазе у контролној подлози (К) била мања од активности алкалне инвертазе у подлози са детерџентом (Д).

Активност алкалне инвертазе гљиве *P. funiculosum* у контролној подлози (К) се од 3. до 9. дана нагло снижавала (са 0,903 IU/mL на 0,002 IU/mL). Затим је примећен благи раст од 9. до 12. дана (са 0,002 IU/mL на 0,028 IU/mL) а 16. дана инкубације поново пад активности алкалне инвертазе на 0,003 IU/mL. У подлози са детерџентом (Д), активност алкалне инвертазе је расла од 3. до 9. дана (са 1,400 IU/mL на 2,747 IU/mL), а затим се од 9. до 16. дана смањивала (са 2,747 IU/mL на 1,652 IU/mL). Ако се упореди активност алкалне инвертазе ове две подлоге до

краја инкубације, може се закључити да је активност алкалне инвертазе у контролној подлози (К) била мања од активности алкалне инвертазе у подлози са детергентом (Д).

Гљива *P. canescens* на крају инкубационог периода показује већу активност алкалне инвертазе у контролној подлози (К) у поређењу са гљивом *P. funiculosum*. Активност алкалне инвертазе код обе врсте гљиве је била статистички значајно већа у подлози са детергентом (Д) у поређењу са контролном подлогом (К) ( $p < 0,01$ ) па се може закључити да присуство детергента стимулативно делује на активност алкалне инвертазе код тестираних врста гљива.

Инвертазе припадају значјној групи ензима која има улогу у разградњи сахарозе на моносахариде, односу на глюкозу и фруктозу. Највећи део гљива поседује и интрацелуларне и екстрацелуларне инвертазе (Gillespie et al., 1952; Crewther et al., 1953). Оне се могу налазити у различитим деловима ћелије (цитоплазма, вакуоле, ћелијски зид), разликују се и по растворљивости, оптималној рН вредности (киселој, неутралној и базној) и такође по изелектричној тачки. На активност овог ензима утиче како врста подлоге тако и сама фаза развића гљиве. Инвертазе су детектоване код гљива из различитих родова (*Aspergillus*, *Neurospora*, и др.) али пре свега из рода *Penicilium* (*P. canescens* и *P. funiculosum*) (Poonawalla, 1965; Ashok Kumar et al., 2001; Guimaraes et al., 2009), што је у складу са резултатима добијеним у оквиру ове докторске дисертације. Слични резултати су добијени у истраживању Јаковљевић, где је указано на потенцијал гљива из рода *Penicilium* (*P. chrysogenum* и *P. cyclopium*) да продукују инвертазе у контролној подлози (К), али и подлози са 0,3% детергента (Д) (Јаковљевић, 2014). Међутим, ове две врсте су показале мању активност алкалне инвертазе у поређењу са врстама тестираним у оквиру ове докторске дисертације.

---

Различите врсте гљива показују различит метаболички потенцијал у присуству 0,3% детергента и другачије се понашају у односу на параметре испитане у оквиру ове докторске дисертације. Генерално посматрано, резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације указују на значајан метаболички потенцијал изолованих гљива и на способност коришћења изолата у третману отпадних вода које садрже детергенте. Међутим, треба нагласити да су резултати добијени у лабораторијским условима, па је неопходно спровести тестове и у реалним условима како би се потврдио потенцијал ових гљива да се користе у биотехнологији и третману отпадних вода. У даљем тексту је дат општи осврт на добијене резултате метаболичког потенцијала тестираних гљива.

Изолат *A. niger* је у присуству детергента показао способност продукције биомасе; редокс потенцијал је био смањен као и продукција слободних органских киселина, док је продукција протеина и укупних органских киселина била повећана.

Изолат *P. canescens* је у присуству детергента показао способност продукције биомасе; редокс потенцијал је био смањен као и продукцију слободних и укупних органских киселина, док је продукција протеина и активност алкалне фосфатазе и алкалне инвертазе била повећана.

Изолат *P. funiculosum* је у присуству детергента показао редуковану продукцију биомасе; редокс потенцијал је био смањен као и продукцију протеина и активност алкалне инвертазе, док је продукција слободних и укупних органских киселина и активност алкалне фосфатазе била повећана.

Изолат *M. plumbeus* је у присуству детергента показао значајно редуковану продукцију биомасе; редокс потенцијал је био смањен као и продукција протеина, док је продукција слободних и укупних органских киселина била повећана.

Изолат *T. harzianum* је у присуству детергента показао редуковану продукцију биомасе. Међутим, редокс потенцијал је био најбољи од свих тестираних гљива, док је продукцију протеина, слободних и укупних органских киселина била повећана.

На основу испитаних метаболичких активности тестираних гљива, може се закључити да сви изолати тестираних гљива показују потенцијал за употребу у третману отпадних вода у мањој или већој мери. Нарочито се истичу изолати *T.*

*harzianum*, *P. funiculosum* и *P. canescens*. Поређењем свих изолата гљива, може се закључити да изолат *T. harzianum* показује највећи потенцијал за даља истраживања и примену обзиром да је показао повећану метаболичку активност у присуству детерџента у подлози (Д) у поређењу са контролном подлогом (К). Као што је већ наглашено, ова врста већ има широку употребу у пољопривреди и контроли патогена, а њен потенцијал за употребу у биотехнологији се увелико испитује. Познато је да је врста *T. harzianum* продукује широк опсег ензима и да је метаболички врло активна. Али њен потенцијал у третману отпадних вода до сада није истраживан, тако да резултати о оквиру ове дисертације дају полазну основу за даља истраживања о примени ове врсте у биолошком третману отпадних вода које садрже детерџенте.



## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу свих спроведених истраживања у оквиру ове докторске дисертације, могу се извести следећи закључци:

Физичко-хемијски параметри површинске воде Западне Мораве указују да се ради о води која спада у прву или другу еколошку класу и то:

1. Температура воде у тренутку узорковања је износила 12,1 °C, док је рН воде измерена на 22 °C била 7,9.
2. Узорци воде на 22 °C су садржали 7,9 mg/L раствореног кисеоника, што указује да испитана вода спада у II (другу) класу еколошког статуса по овом параметру.
3. Биолошка потрошња кисеоника у води Западне Мораве после 5 дана (исказане као БПК<sub>5</sub>) је износила 6 mg O<sub>2</sub>/L, што водусврстава између II и III класе.
4. Хемијска потрошња кисеоника (ХПК) је износила 11,2 mg O<sub>2</sub>/L, што ову воду сврстава у I класу еколошког статуса.
5. Укупни органски угљеник је износио је 2,4 mg/L, што површинску воду Западне Мораве сврстава такође у I класу еколошког статуса.
6. Концентрација укупног азота у површинској води Западне Мораве је износила 3,3 mg N/L, што ову воду сврстава у II класу еколошког статуса.
7. Концентрација нитрата у површинској води Западне Мораве је износила је 2,3 mg/L, што указује да на основу овог параметра, вода спада у I класу еколошког статуса.
8. Концентрација нитрита у површинској води Западне Мораве је износила је 0,08 mg/L, што ову воду сврстљвљ у II класу еколошког статуса.
9. Концентрација фосфата је износила 0,05 mg/L, што ову воду сврстава у I класу еколошког статуса.
10. Концентрација хлорида у површинској води Западне Мораве је износила 12,8 mg/L, што воду сврстава у I класу еколошког статуса.
11. Концентрација сулфата у испитиваном узорку површинске воде Западне Мораве је износила 20,6 mg/L, што воду сврстава у I класу еколошког статуса.
12. Електропроводљивост испитиване воде Западне Мораве је износила је 379 μS/cm, што ову воду сврстава у I класу еколошког статуса.

13. Концентрација суспендованих честица у узорку воде је износила 12 mg/L, што је у оквиру дозвољених граничних вредности.

Поред физичко-хемијских параметара воде, значајни показатељи квалитета воде су и њене микробиолошке карактеристике. Резултати микробиолошке анализе површинске воде Западне Мораве су показали:

1. На основу анализе броја укупних колиформних бактерија и броја фекалних колиформних бактерија (*E. coli*), испитивани узорци воде Западне Мораве се могу сврстати између добре (II) и умерене (III) класе еколошког статуса.
2. На основу броја фекалних ентерокока, вода Западне Мораве се може сврстати у у одличну (I) класу еколошког статуса.

У узорцима воде, прикупљених са прва два локалитета, изоловане су и идентификоване следеће врсте гљива: *Mucor plumbeus* (изолована из индустријских отпадних вода), *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Penicillium funiculosum* (изоловане из канализационих отпадних вода) и *Trichoderma harzianum*. На трећем локалитету ни једна од поменутих врста гљива није изолована.

Додавање 0,3% комерцијалног детерџента „Мерикс“ показало је утицај на биомасу испитиваних гљива, и то:

1. *T. harzianum* је имала највећу биомасу (0.9226 g/mL ферментационе течности) од свих тестираних гљива у контролној подлози (К), док је у подлози са детерџентом (Д) њена биомаса смањена за скоро три пута (0.3627 g/mL ферментационе течности).
2. *P. funiculosum* је имала биомасу сличну као *T. harzianum* (0.9089 g/mL ферментационе течности) у контролној подлози (К), док је у подлози са детерџентом (Д) њена биомаса смањена више од четири пута (0.2142 g/mL ферментационе течности).
3. *A. niger* и *P. canescens* су имале нешто мању биомасу (0.6852 и 0.5614 g/mL ферментационе течности) у контролној подлози (К), док је у подлози са детерџентом (Д) њихова појединачна биомаса смањена за скоро два пута (0.3823 и 0.3746 g/mL ферментационе течности).
4. *M. plumbeus* се показала као најосетљивија на присуство детерџента у подлози. Њена биомаса у подлози са детерџентом (Д) се смањила седам пута (0.1915

g/mL ферментационе течности) у односу на контролну подлогу (0.7501 g/mL ферментационе течности).

5. На основу свих резултата, може се закључити да присуство детергента у подлози утиче инхибиторно на добијену биомасу гљива у односу на контролну подлогу (К), али је тај утицај завистан од врсте. Најмању осетљивост на присуство детергента су показале врсте *A. niger* и *P. canescens*.

Додавање 0,3% комерцијалног детергента „Мерикс“ показало је утицај на биохемијске карактеристике испитиваних гљива, и то:

1. На иницијалну рН вредност подлоге, која се константно смањивала током периода инкубације од 16 дана код свих тестираних гљива од базне ка неутралној. Ове значајне промене у смислу снижавања рН вредност подлоге могу се тумачити интензивним метаболизмом тестираних гљива.
2. На редокс потенцијал, који се значајно смањивао након додавања детергента у подлогу већ трећег дана инкубације. Након 16 дана инкубације у подлози са детергентом (Д), једино је врста *T. harzianum* имала вредност редокс потенцијала већу од 100 mV (104 mV). Може се закључити да присуство детергента у подлози значајно смањује редокс потенцијал тестираних гљива у односу на контролну подлогу (К).
3. На концентрацију протеина, која је након 16 дана инкубације била стимулирана код свих тестираних гљива, нарочито врста *P. canescens* (2,309 mg/mL), *T. harzianum* (2,171 mg/mL) и *A. niger* (2,066 mg/mL) у односу на контролну подлогу (К).
4. На концентрацију слободних органских киселина, која је код гљива *A. niger* и *P. canescens* у подлози са детергентом (Д) била нижа од концентрације слободних органских киселина у контролној подлози (К) деветог дана инкубације, па се може закључити да је детергент показао инхибиторно дејство на лучење слободних органских киселина код ових врста. Код врста *M. plumbeus*, *P. funiculosum* и *T. harzianum*, продукција слободних органских киселина је била стимулирана у присуству детергента у подлози (Д) у односу на контролну подлогу (К) деветог дана инкубације, што значи да присуство детергента стимулативно дејство на продукцију слободних органских киселина.

5. На концентрацију укупних органских киселина, где је примећено да су све тестиране гљиве, осим *P. canescens*, деветог дана инкубације продуковале већу концентрацију укупних органских киселина у подлози која је садржала детерцент (Д) у поређењу са контролном подлогом (К).
6. На активност алкалне фосфатазе, где је утврђено да присуство детерцента у подлози инхибиторно делује на активност алкалне фосфатазе код гљиве *P. funiculosum*, док код гљиве *P. canescens*, присуство детерцента делује стимулативно да активност алкалне фосфатазе.
7. На активност алкалне инвертазе, где је утврђено да присуство детерцента у подлози стимулативно делује на активност алкалне инвертазе код врста *P. funiculosum* и *P. canescens*.

На основу свих испитаних параметара, може се дати оцена метаболичког потенцијала тестираних гљива које су расле у подлози са детерцентом (Д):

1. У лабораторијским условима, тестиране гљиве у присуству детерцента у подлози показују значајну метаболичку активност која доводи до снижавања рН вредности подлоге.
2. Повећана је производња протеина у случају *P. canescens*, *T. harzianum* и *A. niger* у присуству детерцента.
3. Повећана је продукција слободних органских киселина код врста *M. plumbeus*, *P. funiculosum* и *T. harzianum*.
4. Повећана је продукција укупних органских киселина код свих тестираних врста изузев *P. canescens*.
5. Повећана је активност алкалне фосфатазе код гљиве *P. canescens*, дој је активност алкалне инвертазе била повећана код *P. funiculosum* и *P. canescens*.

Резултати добијени у овој докторској дисертацији доприносе малобројним сазнањима о примени гљива у биотехнологији и управљању отпадом, и пружају добру основу за даља истраживања ове теме. Свеобухватна тумечења резултата указују да су гљиве организми који се потенцијално могу користити за биоразградацију детерцента и компоненти детерцента које се могу наћи у отпадним водама и у природним пловним путевима.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

- Abastabar, M., H. Mirhendi, M.T. Hedayati, T. Shokohi, A. Rezaei-Matehkolaei, R. Mohammadi, H. Badali, M. Moazeni, I. Haghani, A. Ghojoghi, J. Akhtari, „Genetic and morphological diversity of the genus *Penicillium* from Mazandaran and Tehran provinces“. *Iranian Journal of Microbiology* vol. 9, (2016): e28280. doi: 10.5812/ijm.28280.
- Abel P.D, „Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates“, *Journal of fish Biology* vol. 6 (1974): 279–298.
- Abo-Elyousr, K.A.M., N. Marei Almasaudi, „Application of *Trichoderma harzianum* strain KABOFT4 for management of tomato bacterial wilt under greenhouse conditions“. *Gesunde Pflanzen* vol. 74, (2022): 413–421 <https://doi.org/10.1007/s10343-021-00618-7>
- Alam, M.J., K. Date, H. Arakawa, „Influence of suspended inorganic particles (kaolinite) on eggs and larvae of the pelagic shrimp *Lucensosergia lucens*“. *Scientific Reports* vol. 12, (2022): 14085. doi: 10.1038/s41598-022-18373-8.
- Alvarez, J.P., A.W. Illman, *Bioremediation and Natural Attenuation: Process Fundamentals and Mathematical Models*. New York: Wiley-Interscience, 2006.
- Albina, P., N. Durban, A. Bertron, A. Albrecht, J.C. Robinet, B. Erable, „Influence of hydrogen electron donor, alkaline ph, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: A Review“. *International Journal of Molecular Science* vol.20, (2019): 5163. doi: 10.3390/ijms20205163.
- Allen, R.J.L. „The estimation of phosphorus“. *Biochemistry Journal*, vol. 34 (1940): 858-865.
- Amiy, C., K.L. Tiwari, “Effect of household detergent degraded through aquatic fungi”. *Recent Research in Science & Technolog* vol. 5 (2013): 12–16.
- Amerian, T., R. Farnood, S. Sarathy, D. Santoro, „Effects of total suspended solids, particle size, and effluent temperature on the kinetics of peracetic acid decomposition in municipal wastewater“. *Water Science and Technology* vol. 80 (2019): 2299–2309. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.047>
- Anonimys, „Article III – industrial waste discharges, Sec. 114-91. – Definitions, Code, (1976): 34–51.

- Ash, M., I. Ash, *Handbook of Industrial Surfactants*. London: Routledge, 1993.
- Ashbolt, N.J., O.K. Grabow, M. Snozzi, „Indicators of microbial water quality”, *Water Quality: Guidelines, Standards and Health* (2001): 289–316.
- Ashbolt, N.J., O.K. Grabow, M. Snozzi, „Indicators of microbial water quality”. In *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*, L. Fewtrell, J. Bartram (ed.), 289-315. World Health Organization, London: IWA Publishing, 2001.
- AWWA 5210D. Одређивање биохемијске потрошње кисеоника БПК5 (респирометријска метода).
- Babajanzadeh, B., S. Sherizadeh, H. Ranji, „Detergents and surfactants: a brief review”, *Open Access Journal of Science* vol. 3(3) (2019): 94–99.
- Babajanzadeh, B., S. Sherizadeh, H. Ranji, „Detergents and surfactants: a brief review”. *Med Crave* vol. 3, iss. 3 (2019): 94–99.
- Bailey A., H. Bae, M. Strem, J. Crozier, S. Thomas, G. Samuels, B. Vinyard, K. Holmes, „Antibiosis, mycoparasitism and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*”. *Biocontrol* vol. 46, (2008): 24-35. <http://doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
- Ballicora, M.A., et al., „Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin”. *Journal of Biological Chemistry* vol. 275 (2000): 1315–1320.
- Balmer, Y., A. Koller, G. Del Val, W. Manieri, P. Schürmann, B.B. Buchanan, „Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 100, (2003): 370-375.
- Balson, T., M.S.B. Felix, „The biodegradability of non-ionic surfactants”. In *Biodegradability of Surfactants*, D. R. Karsa, M. R. Porter (eds.), 204–230, Berlin, Heidelberg: Springer Science+Business Media Dordrecht, 1995.
- Berry, K.L.E., S. Hess, T.D. Clark, A.S. Wenger, M.O. Hoogenboom, A.P. Negri, „Effects of suspended coal particles on gill structure and oxygen consumption rates in a coral reef fish”. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 169, (2021): 112459. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112459>.
- Bianchetti, G.O, C.L. Devlin, K.R. Seddon, „Bleaching systems in domestic laundry detergents”, *RSC Advances* 5 (2015): <https://doi.org/10.1039/C5RA05328E>.

- Brian, P.W., H.G. Hemming, J.S. Moffatt, C.H. Unwin, „Canescin, an antibiotic produced by *Penicillium canescens*“. *Transactions of the British Mycological Society* vol 36, (1953): 243-247. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(53\)80009-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(53)80009-4).
- Byappanahalli, M.N. et al., „Enterococci in the Environment“, *Microbiol and Molecular Biology Reviews*, vol. 76(4) (2012): 685–706.
- Van Reenen-Hoekstra, E.S., J.C. Frisvad, R.A. Samson, A.C. Stolk, „The *Penicillium funiculosum* complex - well defined species and problematic taxa“. *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification* (1990): 173–192. doi:10.1007/978-1-4899-3579-3\_15
- Vasilachi, I.C. et al., „Occurrence and Fate of Emerging Pollutants in Water Environment and Options for Their Removal“. *Water*, vol. 13, iss. 2 (2021), <https://www.mdpi.com/2073-4441/13/2/181/html> (преузето), <https://doi.org/10.3390/w13020181>.
- Veignie, E., C. Rafin, „Efficiency of *Penicillium canescens* in dissipating PAH in industrial aged contaminated soil microcosms and its impact on soil organic matter and ecotoxicity“. *Processes* vol. 10, (2022): 532. <https://doi.org/10.3390/pr10030532>
- Vysokomornaya, O.V., E.Yu. Kurilenko, A.A. Shcherbinina, „Major contaminants in industrial and domestic wastewater“, *MATEC Web of Conferences* vol. 23 (2015), [https://www.matec-conferences.org/articles/mateconf/abs/2015/04/mateconf\\_tsotr2015\\_01041/mateconf\\_tsotr2015\\_01041.html](https://www.matec-conferences.org/articles/mateconf/abs/2015/04/mateconf_tsotr2015_01041/mateconf_tsotr2015_01041.html) (преузето), <https://doi.org/10.1051/mateconf/20152301041>.
- Galkina, Y.M., N.F. Tarchigina, Energy saving and water treatment 3 (2008) (in Russian).
- Galus, M. et al., „Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish“, *Aquatic Toxicology* vol. 132–133 (2013): 212–222.
- Gholami, A., A. Mohsenikia, S. Masoum, „Determination of Very Low Level of Free Formaldehyde in Liquid Detergents and Cosmetic Products Using Photoluminescence Method“. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Vol. 2016 (2016): 1-8.

- García-Kirchner O., M. Segura-Granados, P. Rodríguez-Pascual, "Effect of media composition and growth conditions on production of beta-glucosidase by *Aspergillus niger* C-6". *Applied Biochemistry and Biotechnology* vol. 121–124, (2005): 347.
- Geissen, V. et al., „Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management”. *International soil and water conservation research abbreviation* vol. 3 (2015): 57–65.
- Gillespie, J. M., M. A. Jermyn, E. F. Woods, „Multiple Nature of the Enzymes of *Aspergillus Oryzae* and of Horse-Radish: Enzymes of *Aspergillus oryzae*”. *Nature* Vol. 169 (1952): 487-488.
- Гргинчевић, М., В. Пујин, *Хидробиологија – Приручник за студенте и последипломце*, 3. издање, Нови Сад: Еколошки покрет града Новог Сада, 1998.
- Griffin, D. W, K. Bartholomew, „Models of the self and other: Fundamental dimensions underlying measures of adult attachment”. *Journal of Personality and Social Psychology* vol. 67, iss. 3 (1994): 430–445.
- Grujović, M., K. Mladenović, V. Jakovljević, Lj. Čomić, „Detection of enzymes produced by lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian cheese and their role in the formation of its specific flavor“. *Acta Agriculturae Serbica* vol. 25, (2020): 165–169.
- Grujović, M., K. Mladenović, S. Marković, N. Đukić, J. Stajić, A. Ostojić, N. Zlatić, „Chemical, radiological and microbiological characterization of a drinking water source: a case study“. *Letters in Applied Microbiology* (2022): DOI: 10.1111/lam.13778
- Guasakova, M.A., K.G. Bogolitsyn, *Water: chemistry and ecology* 6 (2014) (in Russian).
- Guimaraes, L.H.S. et al., „Production of fructofuranosidase by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose”. *Process Biochemistry* vol. 44, iss. 2 (2009): 237–241.
- Das, N., R. Vimala, P. Karthika, „Biosorption of heavy metals-an overview”. *Indian Journal of Biotechnology* vol. 7, iss. 2 (2008): 159–169.



- de Castro, A. M., K.C.N.R. Pedro, J.C. Da Cruz, M.C. Ferreira, S.G.F. Leite, N.J. Pereira, "Trichoderma harzianum IOC-4038: A promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant  $\beta$ -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin". *Applied Biochemistry and Biotechnology* vol. 162 (2010): 2111–2122.
- de Oliveira Silva, E., N.A.J.C. Furtado, J. Aleu, I.G. Collado, „Terpenoid biotransformations by *Mucor* species“. *Phytochemistry Reviews* vol. 12, (2013): 857-876.
- De Pippo, T., C. Donadio, M. Guida, C. Petrosino, „The Case of Sarno River (Southern Italy). Effects of geomorphology on the environmental impacts“. *Environmental Science and Pollution Research* vol. 13, (2006): 184–191.
- De Zuane, J., *Handbook of Drinking Eater Quality*. 2<sup>nd</sup> edition, New York: John Wiley & Sons, 1997.
- Druzhinina, I.S., C.P. Kubicek, M. Komoń-Zelazowska, et al. "The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages". *BMC Evolutionary Biology* vol. 10, (2010): 94 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-94>
- Duarte, A.C, A. Cachada, T. Rocha-Santos, ed. „Soil and Pollution: An Introduction to the Main Issues. In *Soil Pollution From Monitoring to Remediation*, 1–28. Cambridge: Academic Press, 2017.
- Duarte-Leal, Y., A. Lamz-Piedra, B. Martínez-Coca, „Antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg frente a *Sclerotium rolfsii* Sacc“. *Revista de Protección Vegetal* vol. 32, (2017): 1-11.
- Далмација, Б., „Отпадне воде, емисиони стандарди и критеријуми за одабир технологије за водотоке са ниским еколошким потенцијалом“. Центар изврности за хемију околине и процену ризика, <http://www.cecra.dh.pmf.uns.ac.rs/pdfww2008/Otpadne%20vode-emisinoni%20standardi%20i%20odabir%20tehnologije%20za%20vodotoke%20sa%20niskim%20ekoloskim%20potenciojal.pdf> (преузето 22.11.2021 год.).
- Ђукић, Д. и др., *Еколошка биотехнологија*. књ. 1, Чачак: Агрономски факултет; Београд: Балкански научни центар Руска академије природних наука, 2018.

- Ђукић, Д., Ј. Мандић, *Микробиолошко пречишћавање отпадних вода*. Чачак: Агрономски факултет, 2016.
- Ђукић, Д., С. Гајин, С. Матавуљ, Ј. Мандић, *Микробиологија вода*. Београд: Просвета, 2000.
- Ecosse, D., „Alternative techniques in order to meet the shortage of water in the world”, *Mem DESS Quality and Management of Water*, Fac. Science, Amiens 62.
- Ellis, M.B., J.P. Ellis, „Microfungi on land plants: an identification handbook“. The Richmond Publishing Co. Ltd Slough, UK, 1997.
- Eriksson, E., S. Srigirisetty, A.M. Eilersen, „Organic matter and heavy metals in grey-water sludge”. *Water SA* vol. 36, no. 1 (2010): 139–142.
- Žugić-Petrović, T. „Mikrobiota autohtonog fermentisanog proizvoda sjenička ovčija stelje“. *Doktorska disertacija*, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, 2022.
- Zaghloul, A. et al., „Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems”, *Bulletin of the National Research Centre*, vol. 44, numb. 127 (2020), <https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-020-00385-x> (преузето).
- Zaghloul, A., M. Saber, C. El-Dewany, „Chemical indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems”, *Bulletin of the National Research Centre*, vol. 43, no. 156 (2019), <https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-019-0203-x>, (преузето), <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0203-x>.
- Ziouane, Y., G. Leturcq, „New modeling of nitric acid dissociation function of acidity and temperature“. *ACS Omega* vol. 3, (2018): 6566–6576. doi: 10.1021/acsomega.8b00302.
- Zhang, Y., Y. Shen, „Wastewater irrigation: Past, present, and future”. *Wires Water* Vol. 6, Issue 3 (2017), <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wat2.1234> (preuzeto 4.11.2022), [doi.org/10.1002/wat2.1234](https://doi.org/10.1002/wat2.1234).
- ISO 10523:2008. Квалитет воде – Одређивање рН.
- Ito, S. et al., „Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures”. *Extremophiles: life under extreme conditions* vol. 2(3) (1998): 185–190.
- Homs, E. et al., „Investigating Industrial Effluent Impact on Municipal Wastewater Treatment Plant in Vaal”. *International Journal of Environmental Research and*

- Public Health* vol. 17(1096) (2020), [https://www.researchgate.net/publication/339135557\\_Investigating\\_Industrial\\_Effluent\\_Impact\\_on\\_Municipal\\_Wastewater\\_Treatment\\_Plant\\_in\\_Vaal\\_South\\_Africa](https://www.researchgate.net/publication/339135557_Investigating_Industrial_Effluent_Impact_on_Municipal_Wastewater_Treatment_Plant_in_Vaal_South_Africa) (преузето), doi:10.3390/ijerph17031096.
- Ivankovic, T., J. Hrenovic, I. Gudelj, „Toxicity of commercial surfactants tophosphate accumulating bacterium”. *Acta Chimica Slovenica* vol. 56, iss. 4 (2009): 1003–1009.
- Jaklitsch, W.M. „European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species“. *Studies in Mycology* vol. 63, (2009): 1-91. doi: 10.3114/sim.2009.63.01
- Јаковљевић, В., „Биохемијске карактеристике изабраних врста гљива у функцији биодеградације детерџента”. Докторска дисертација, Природно-математички факултет, Крагујевац, 2014.
- Jakovljević, V.D., J.M. Milićević, J.D. Stojanović, „Detergent-like stressor and nutrient in metabolism of *Penicillium chrysogenum*“. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* vol. 28, (2014b): 41-53. DOI: 10.1080/13102818.2014.901674
- Jakovljević, V.D., J.M. Milićević, J.D. Stojanović, M.M. Vrvic, „The ability of fungus *Mucor racemosus* Fresenius to degrade high concentration of detergent“. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* vol. 20, (2014c): 587-595. DOI: 10.2298/CICEQ130922002J
- Jakovljević, V.D., J.M. Milićević, J.D. Stojanović, S.R. Solujić, M.M. Vrvic, „The influence of detergent and its components on metabolism of *Fusarium oxysporum* in submerged fermentation“. *Hemijska Industrija* vol. 68, (2014a): 465–473. doi: 10.2298/HEMIND130620071J
- Jakovljević, V.D., M. M. Vrvic, „The effect of ethoxylated oleyl-cetyl alcohol on metabolism of some fungi and their potential application in mycoremediation“. *Hemijska industrija* Vol. 70, Issue 3 (2016): 277–286.
- Jakovljević, V.D., M.M. Vrvic, “The potential application of selected fungi strains in removal of commercial detergents and biotechnology”. In: *Application and characterization of surfactants*, N. Reza, (ed), 233-258. IntechOpen, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68184>
- Jari, Y. et al., „Emerging Pollutants in Moroccan Wastewater: Occurrence, Impact, and Removal Technologies”. *Journal of Chemistry* vol. 2022 (2022),

- <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2022/9727857/> (преузето), <https://doi.org/10.1155/2022/9727857>.
- Jin, B., H. J. van Leeuwen, B Patel, H.W Doelle et al., „Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater”. *Process Biochemistry* Vol. 34, Issue 1 (1999): 59-65,
- Jin, B., X.Q. Yan, Q. Yu, J. van Leeuwen, „A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation”. *Advances in Environmental Research* vol. 6, iss. 2 (2002): 179–189.
- Johnston, J., T. LaPara, S. Behrens, „Composition and dynamics of the activated sludge microbiome during seasonal nitrification failure”. *Scientific Reports*, vol. 9, (2019): 4565. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40872-4>
- Jurišić, I., D. Đukić, G. Marković, L. Mandić, V. Pajović, S. Simović, „Kvalitet i primarna produkcija reke Zapadne Morave”. *Međunarodna konferencija "Kvalitet voda `1994"* Čačak, (1994): 407-413.
- Kaper, J.B, J.P. Nataro, H.L.T. Mobley, „Pathogenic *Escherichia coli*”, *Nature Reviews Microbiology* vol. 2 (2004): 123–140.
- Kaper, J.B., „Pathogenic *Escherichia coli*”, *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 295 (2005): 355–356.
- Kirsanov, V.V., K.N. Nikitin, A.A. Malova, Environmental protection in the oil and gas sector I (2009) (in Russian).
- Kjelland, M.E., C.M. Woodley, T.M. Swannack, et al., „A review of the potential effects of suspended sediment on fishes: potential dredging-related physiological, behavioral, and transgenerational implications”. *Environment Systems and Decisions* vol. 35, (2015): 334–350. <https://doi.org/10.1007/s10669-015-9557-2>
- Kocić-Tanackov, S. „Uticaj ekstrakata začina na rast plesni i biosintezu mikotoksina”. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1–182. 2012.
- Koohsaryan, E., M. Anbia, M. Maghsoodlu, „ Application of zeolites as non-phosphate detergent builders: A review”. *Journal of Environmental Chemical Engineering* Vol. 8, Issue 5 (2020): 104-287.

- Kukec, A., M. Berovič, Š. Čelan, M. Wondra, „Redox potential measurement in sauvignon blanc fermentation”. *Food Technology and Biotechnology* vol. 40, iss. 1 (2002): 49–55.
- Kumar, Kesari, K. et al., „Wastewater Treatment and Reuse: a Review of its Applications and Health Implications”. *Water, Air, & Soil Pollution* vol. 232, no. 208 (2021), <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-021-05154-8#citeas> (преузето), <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05154-8>.
- Kumar, M., V. Prakash, „A Review on Solid Waste: Its Impact on Air and Water Quality”. *Journal of Pollution Effects & Control* vol. 8, iss. 4, no. 252 (2020), <https://www.longdom.org/open-access/a-review-on-solid-waste-its-impact-on-air-and-water-quality.pdf>.
- Kumari, S., A. Lakhani, K.M. Kumari, „COVID-19 and Air Pollution in Indian Cities: World’s Most Polluted Cities”, *Aerosol and Air Quality Research*, vol. 20, Issue 12 (2020): 2592–2603.
- Kumari, U. et al., „Validation of leaf enzymes in the detergent and textile industries: launching of a new platform technology”. *Plant Biotechnology Journal* vol. 17(6) (2019): 1167–1182.
- Kesari, K.K., R. Soni, , Q.M.S. Jamal et al., „Wastewater Treatment and Reuse: a Review of its Applications and Health Implications”. *Water Air Soil Pollut* Vol. 232, Article number 208 (2021), [doi.org/10.1007/s11270-021-05154-8](https://doi.org/10.1007/s11270-021-05154-8)
- Kibria, G., Chief Editor, *Climate Change and Agricultural Food Production: Impacts, Vulnerabilities and Remedies*. New Delhi: New India Publishing Agency, 2013.
- Kumari, D., Xin Yi Qian, Xiangliang Pan, Varenayam Achal et al., „Microbially-induced Carbonate Precipitation for Immobilization of Toxic Metals”, *Advances in Applied Microbiology* Vol. 94 (2016), 79-108.
- Kumar, A.B., N. Kayalvizhi, P. Gunasekaran, „Optimization of media for a-fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid statefermentation”. *Process Biochemistry* vol. 37 (2001): 331–338.
- Компанија Хенкел, „Хенкел објавио годишње резултате за 2021. и подигао агенду за сврсиходни раст на нови ниво, Компанија Хенкел, <https://www.henkel.rs/odnosi-s-javnosc/saopstenja-za-javnost-i-pres->

- materijal/2022-02-23-henkel-objavio-godisnje-rezultate-za-2021-i-podigao-agendu-za-svrishodni-rast-na-novi-nivo-1619344 (преузето).
- Laurén, S., „What are surfactants and how do they work?“, Blog Biolin Scientific, Jun 26. 2018, <https://www.biolinscientific.com/blog/what-are-surfactants-and-how-do-they-work>.
- Laurent, JB St., F de Buzzaccarini, K. De Clerck, H Demeyere et al., „Laundry cleaning of textiles“. In *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces*, ed. I. Johansson, P. Somasundaran, 57-102. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- Lewis, R.E., G. Liao, W. Wang, R.A. Prince, „Voriconazole pre-exposure selects for breakthrough mucormycosis in a mixed model of *Aspergillus fumigatus*-*Rhizopus oryzae* pulmonary infection“. *Virulence* vol. 2, (2011): 248-355. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.2.4.17074>
- Liedekerke, P Van, B. Smeets, T. Odenthal, E. Tijssens et al., „Solving microscopic flow problems using Stokes equations in SPH“, *Computer Physics Communication* Vol. 184, Issue 7 (2013), 1686-1696.
- Lombardi, N., S. Caira, A.D. Troise, A. Scaloni, P. Vitaglione, F. Vinale, R. Marra, A.M. Salzano, M. Lorito, S.L. Woo, „*Trichoderma* applications on strawberry plants modulate the physiological processes positively affecting fruit production and quality“. *Frontiers in Microbiology* vol. 11, (2020): 1364. doi: 10.3389/fmicb.2020.01364
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, „Protein measurement with the Folin phenol reagent“. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 193, (1951): 265-275.
- Lubertozzi, D., J.D. Keasling, „Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression“. *Biotechnology Advances* vol. 27, (2009): 53-75. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.001.
- Magdić, M., „Uпотреба gljiva u obradi otpadnih voda“. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Osijek, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2015.
- Maeda, R. N., V. I. Serpa, V. A. L. Rocha, R. A. A. Mesquita et al., „Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases“, *Process Biochemistry* Vol. 46, Issue 5 (2011): 1196-1201.

- Mahesh, M., N. Guleria, T.S. Rajesh, R. Somashekhar, E.T. Puttaiah, „Isolation and characterization of extracellular thermostable alkaline phosphatase enzyme from *Bacillus spp*“. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* vol. 1, (2010): 21-33. <http://imsear.hellis.org/handle/123456789/157626>
- Marks, K., „What Are The 16 Most Polluted Rivers in the World“, Soapboxie, <http://kosmo.hubpages.com/hub/What-Are-the-10-Most-Polluted-Rivers-in-the-World#> (преузето).
- Matas-Baca, M.A., C. Urías García, S. Pérez-Álvarez, M.A. Flores-Córdova, C.M. Escobedo-Bonilla, M.A. Magallanes-Tapia, E. Sánchez Chávez, „Morphological and molecular characterization of a new autochthonous *Trichoderma* sp. isolate and its biocontrol efficacy against *Alternaria* sp.“. *Saudi Journal of Biological Sciences* vol. 29, (2022): 2620-2625, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.12.052>.
- Малиновић, Б. и сар., „Смањење ХПК-вриједности орпадних вода анодном оксидацијом у индустрији полудисперзија и дисперзија “. *Заштита материјала* вол. 54, бр. 1 (2013): 31–36.
- Merrettig-Bruns, U., Jelen, E. „Anaerobic Biodegradation of Detergent Surfactants“. *Materials (Basel)* Vol. 2, Issue 1 (2009): 181-206.
- Miller, G.L., „Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar“. *Journal of Analytical Chemistry* Vol. 31 (1959): 426–428.
- Mehta, J. et al., „Impact of carbon & nitrogen sources on the *Trichoderma viride* (Biofungicide) and *Beauveria bassiana* (entomopathogenic fungi)“. *European Journal of Experimental Biology* vol. 2, iss. 6 (2012): 2061–2067.
- Menon, R.R., J. Luo, X. Chen, et al., „Screening of fungi for potential application of self-healing concrete. *Scientific Reports* vol. 9, (2019): 2075. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39156-8>
- Merrettig-Bruns, U., E. Jelen, „Anaerobic Biodegradation of Detergent Surfactants“. *Materials (Basel)* vol. 2(1) (2009): 181–206.
- Metz, B., N.W.F. Kossen, „Biotechnology review: The growth of molds in the form of pellets-a literature review“. *Biotechnology and Bioengineering* vol. 19, (1977): 781–799.

- Мићовић, В.М., Д.К. Виторовић, А.О. Матејић, *Хемијска читанка*. Београд: Завод за уџбенике, 1968.
- Mikkelsen, R., К.Е. Mutenda, A. Mant, P. Schurmann, A. Blennow, „Alpha-glucan, water dikinase (GWD): a plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 102, (2005): 1785–1790.
- Mladenović K, M. Grujović, V. Jakovljević, Lj. Čomić, „Broth depending production of extracellular enzymes by enterobacteria isolated from diary food (Serbian cheese)“. *Kragujevac Journal of Science* vol. 42, (2020): 123–134.
- Mohamed, H., M.F. Awad, A.M. Shah, et al., „Coculturing of *Mucor plumbeus* and *Bacillus subtilis* bacterium as an efficient fermentation strategy to enhance fungal lipid and gamma-linolenic acid (GLA) production“. *Scientific Reports* vol. 12, (2022): 13111 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17442-2>
- Moore-Landecker, M.E., *Fundamentals of the fungi*, 4<sup>th</sup> edition, New Jersey: Benjamin Cummings, 1996.
- Morin-Sardin, S., P. Nodet, E. Coton, J.-L. Jany, „*Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications“. *Fungal Biology Reviews* vol. 31, (2017): 12–32. doi:10.1016/j.fbr.2016.11.002
- Mousumi Das M., C.N. Aguilar, M. Haridas, A. Sabu, „Production of bio-fungicide, *Trichoderma harzianum* CH1 under solid-state fermentation using coffee husk“. *Bioresource Technology Reports*, vol. 15, (2021): 100708, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100708>.
- Mudrack, K., S. Kunst, *Biologie der Abwasserreinigung*. 4th ed., Stuttgart; Jena, New York: Gustav Fischer Verlag, 1994.
- Naidoo, S., A.O. Olaniran, „Treated Wastewater Effluent as a Source of Microbial Pollution of Surface Water Resources“, *Public Health* vol. 11(1) (2014): 249–270.
- Nair, S.S., K. Swarnalatha, „Biodegradation of laundry wastewater“. *International Research Journal of Engineering and Technology* vol. 2, iss. 7 (2015): 789–793.
- Nešković, N. et al., „Bioavailability and biological activity of wheat-bound chlorpyrifos-methyl residues in rats“. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, vol. 27, iss. 4 (1992): 387–397.



- Nobuyuki Maeda, R., V.I. Serpa, V. Alves Lima Rocha, R. Aparecida Alves Mesquita, L.M. Melo Santa Anna, A.M. de Castro, C.E. Driemeier, N. Pereira, I. Polikarpov, „Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases“. *Process Biochemistry* vol. 46, (2011): 1196-1201, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.022>.
- Orlowski, M., The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* vol. 29, iss. 45 (1990): 10289–10297.
- Oteng-Peprah, M., M.A. Acheampong, N.K. deVries, „Greywater Characteristics, Treatment Systems, Reuse Strategies and User Perception“. *Water Air Soil Pollution* vol. 229 no. 255 (2018), <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-018-3909-8> (преузето), doi: 10.1007/s11270-018-3909-8.
- P-IV-9 (PP1990). Одређивање суспендованих материја у води - Гравиметријска метода.
- P-V-31/C:2018. УВ спектрофотометријско одређивање нитрата у води.
- Panagos, P. et al., „Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network“. *Journal of Environmental and Public Health Special Issue* (2013), <https://www.hindawi.com/journals/jeph/2013/158764/> (преузето), <https://doi.org/10.1155/2013/158764>.
- Papagianni, M. „Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes“. *Biotechnology Advances* vol. 22, (2004): 189-259. doi: 10.1016/j.biotechadv.2003.09.005.
- Pack, E. C., H. G. Lee, D. Y. Jang, H. Sun Sin et al., „Probabilistic risk assessment of preservatives in dishwashing detergents and wet wipes for Korean consumers“. *Science of The Total Environment* Vol. 782 (2021) <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969721018994> (Preuzeto 17.10. 2022), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146829>
- Patrao, S., A. Acharya, S. Nishmitha, M. Sequiera, “Degradation of anionic surfactants by *Bacillus subtilis* & *Bacillus cereus*“. *Journal of Pharmacy and Biological Science* vol. 3, iss. 1 (2012): 42–45.
- Pedrazzani, R. et al., „Biodegradability, toxicity and mutagenicity of detergents: Integrated experimental evaluations“, *Ecotoxicology and Environmental Safety* vol. 84 (2012): 274–281.

- Peltola, J., A. Ritieni, R. Mikkola, P.A. Grigoriev, G. Pócsfalvi, M.A. Andersson, M.S. Salkinoja-Salonen, „Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells“. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 70, (2004): 4996-5004. doi: 10.1128/AEM.70.8.4996-5004.2004.
- Peñalva, M.A., H.N. J. Arst, „Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts“. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* vol. 66, (2002): 426-446. doi: 10.1128/MMBR.66.3.426-446.2002.
- Pitt, I.J., D.A. Hocking, “Methods for isolation, enumeration and identification”. In: *Fungi and Food Spoilage. 3rd ed.*, I.J. Pitt, D.A. Hocking, (ed.), 21-57. Springer Science, Business Media, LLC., Dordrecht Heidelberg, London, New York, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6391-4>
- Poonawalla, F.M, K.L. Patel, M.R.S. Iyengar, „Invertase production by *Penicillium chrysogenum* and other fungi in submerged fermentation“. *Applied Microbiology* vol. 13, iss. 5 (1965): 749–754.
- Prasertsan, P., A.H. Kittikul, J. Maneesri, S. Oi, „Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application“. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* vol. 13, iss. 5 (1997): 555–559.
- Петровић, О. и др., *Микробиолошко испитивање квалитета површинских вода*. Нови Сад: Институт за биологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, 1998.
- Правилник о детерџентима, Службени гласник Републике Србије, број 40/10
- Раичевић, В. и сар., „Микроорганизми у биоремедијацији земљишта и вода“. *Заштита материјала* вол.48, но. 2 (2007): 49–52.
- Rani, K., S. Datt, R. Rana, „Brief review on alkaline phosphatases: An overview“. *International Journal of Microbiology and Bioinformatics* vol. 2, (2012): 1-4. [http://bretjournals.com/sites/default/files/issues-pdf/ijmb201504605\\_1428121897.pdf](http://bretjournals.com/sites/default/files/issues-pdf/ijmb201504605_1428121897.pdf)
- Ranković, B. „Sistematika gljiva“. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2003.
- Rivasseau, C, A-M. Boisson, G. Mongélard, G. Couram et al., „Rapid analysis of organic acids in plant extracts by capillary electrophoresis with indirect UV

- detection: Directed metabolic analyses during metal stress". *Journal of Chromatography A* Vol. 1129, Issue 2 (2006): 283-290.
- Rivasseau, C. et al., „Accumulation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in illuminated plant leaves at supraoptimal temperatures reveals a bottleneck of the prokaryotic methylerythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis". *Plant, Cell & Environment* vol. 32, iss. 1 (2009): 82–92.
- Rytel, M.W., R.E. Shope, E.D. Kilbourne, „An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*. V. Induction of interferon by helenine“. *Journal of Experimental Medicine* vol. 123, (1966): 577-584. doi: 10.1084/jem.123.4.577.
- Saber, M. et al., „Chemical characterization of sewage effluent repetitively used in arid soilsirrigation". Paper presented on 12<sup>th</sup> International Phytotechnology Conference, Manhattan, Kansas, USA, 27–30 September, 2015.
- Salager, J.L., *Surfactants, Types and uses*. Mérida: Facultad de ingeniería, 2002.
- Samson, R.A., E.S., Hoekstra, J.C. Frisvad, „Introduction to foodand airborne fungi“. In: *Introduction to foodand airborne fungi, 7th edition*, R.A., Samson, E.S., Hoekstra, J.C. Frisvad (ed), 389. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands, 2004b.
- Samson, R. A., E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, *Interduction to food – and airborne fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2004.
- Sukanya, S.N., K. Swarnalatha, „Biodegradation of laundry wastewater". *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)* Vol. 2, Issue 7 (2015): 789–793.
- Sumner, J.B., S.F. Howell, „A method for determination of Saccharase activity". *Journal of Biological Chemistry* Vol. 108, Issue 1 (1935): 51–54.
- Sushma, P., A. Anvita, S. Nishmitha, S. Melwyn, „Degradation of anionic surfactants by *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*". *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* Vol. 3 (2015): 42–45.
- SRPS ISO 5814:1994. Kvalitet vode - Određivanje sadržaja rastvorenog kiseonika - Metoda sa jon-selektivnom elektrodom erials (identičan sa ISO 5814:1990)
- Silva, L.F., K. T. L. S. Freire, G. R. Araújo-Magalhães, et al., „*Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and theirpotential for L-asparaginase

- production". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34, Article number 162 (2018). <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-018-2547-z> (preuzeto 12. 10. 2021), <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2547-z>
- Schmidt-Nielsen, K., B. Schmidt-Nielsen, S. A. Jarnum, T. R. Houpt, „Body Temperature of the Camel and Its Relation to Water Economy". *American Journal of Physiology* Vol. 188, Number 1 (1956). <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajplegacy.1956.188.1.103> (preuzeto 4.10.2022), <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1956.188.1.103>
- Samson, R.A., J.C. Frisvard, „*Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites". *Studies in Mycology* vol. 49, (2004a): 1–174.
- Sankaran, S. et al., „Use of filamentousfungi for wastewater treatment and production of high value fungal byproducts: A review". *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* vol. 40, iss. 5 (2010): 400–449.
- Sarkar Binoy, S. et al., „Sustainable sludge management by removing emerging contaminants from urban wastewater using carbon nanotubes". In *Industrial and Municipal Sludge*, ed. Majeti Narasimha Vara Prasad, 553–571. Amsterdam: Elsevier, 2019.
- Saxena, G. et al., „Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment", *Journal of Water & Health* vol. 13 (2) (2015): 319–339.
- Sazhin, V.B, I. Saldinas, O.S. Kochetova et al., *Advances in Chemistry and Chemical, Technology* 11, 22 (2008) (in Russian).
- Simić, S., V. Simić, „Ekologija kopnenih voda". Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2012. ISBN: 978-86-7078-090-3
- Singh, P.D., J.H. Johnson, C.A. Aklonis, J. O'Sullivan, „SQ30,957, a new antibiotic produced by *Penicillium funiculosum*. Taxonomy, fermentation, isolation, structure determination, synthesis and antibacterial activity". *The Journal of Antibiotics* vol. 39, (1986): 1054–1058. doi:10.7164/antibiotics.39.1054
- Singh, S.K. et al., „Air pollution tolerance index of plants", *Journal of Environmental Management* vol. 32, Issue 1 (1991): 45–55.

- Sivasithamparam, K., E.L. Ghisalberti, „Secondary metabolism *Trichoderma* and *Gliocladium*.“ In: *Trichoderma and Gliocladium, Volume I*, C.P. Kubicek, G.E. Harman, (ed.), 139-191. Taylor and Francis Ltd. London, 1998.
- „Службени гласник Републике Србије“ 74/11. Правилник о параметрима еколошког и хемијског статуса површинских вода и параметрима хемијског и квантитативног статуса подземних вода.
- „Службени гласник Републике Србије“ - Одлука о изради Просторног плана подручја посебне намене слива акумулације „Првонек“, бр. 94/2010, од 10. 12. 2010. године.
- Службени гласник Републике Србије, „Листа сурфактаната за које је издато одобрење или донет акт којим се одобрава коришћење сурфактанта у детергенту у ЕУ“, бр. 94/2010 од 10.10.2010, 43
- Smulders, E. et al., „Laundry detergents“. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-WCH, 2007.
- Soberón-Chávez, G., R. Hausmann, E. Déziel, „Biosurfactants: New Insights in Their Biosynthesis“. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 9 (2021): 5–8.
- Soberón-Chávez, G., R.M. Maier, „Biosurfactants: A General Overview“. *Microbiology Monographs* vol. 20 (2010), [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-14490-5\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-14490-5_1) (преузето), [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_1).
- Sonawane, J., C. Ezugwu, P. Ghosh, „Microbial fuel cell-based biological oxygen demand sensors for monitoring wastewater: state-of-the-art and practical applications“. *American Chemical Society* vol.5, (2020): 2297–2316. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01299>
- SRPS EN 25663:2009. Квалитет воде – Одређивање садржаја азота по Kjeldalu – Метода после минерализације селеном.
- SRPS EN 26777:2009. Квалитет воде – Одређивање садржаја нитрита – метода молекуларноапсорпцијске спектрометрије
- SRPS EN ISO 5667-1:2008. Квалитет воде - узимање узорака - део 1: Смернице за израду програма узимања узорака и поступке узимања узорака.
- SRPS EN ISO 5667-3:2017. Квалитет воде - узимање узорака - део 3: Заштита узорака и руковање узорцима воде.

- SRPS EN ISO 5667-6:2017. Квалитет воде - узимање узорака - део 6: Смернице за узимање узорака из река и потока.
- SRPS EN ISO 5814:2014. Квалитет воде – Одређивање садржаја раствореног кисеоника – Метода са јон-селективном електродом.
- SRPS EN ISO 6878:2008. Квалитет воде - Одређивање фосфора - Спектрометријска метода са амонијумлибдатом.
- SRPS EN ISO 9308-2:2015. Квалитет воде – Пребројавање *E. coli* и колиформних бактерија – део 2 – метода највероватнијег броја
- SRPS H. Z1.106:1970. Квалитет воде – Мерење температуре воде.
- SRPS H.C8.215:1989. Пигменти - Базни цинк-калијум-хромат и цинк-тетрахидрокси-хромат - Одређивање садржаја сулфата растворљивих у води (као SO<sub>4</sub>) - Гравиметријска метода
- SRPS ISO 6060:1994. Одређивање хемијске потрошње кисеоника спектрофотометријски са HACH KIT LCK 314 HACH Dr Lange Methods.
- SRPS ISO 8245:2007. Квалитет воде – смернице за одређивање укупног органског угљеника (TOC) и раствореног органског угљеника (DOC).
- SRPS ISO 9297/1:2007. Одређивање садржаја хлорида – титрација сребро-нитратом уз хроматни индикатор (метода по Мору)
- SRPS EN 27888:2009. Квалитет воде - Одређивање електролитичке проводљивости.
- Стојановић, Ј., „Утицај детерџената на биохемијске процесе неких гљива *in vitro*”, Докторска дисертација, Природно-математички факултет, Крагујевац, 1989.
- Stojanović, J., J. Milićević, O. Gajović, V. Jakovljević, I. Matović, Z. Mijušković, T. Nedeljković, „The effects of detergent, sodium tripoly-phosphate and ethoxylated oleyl-cetyl alcohol on metabolic parameters of the fungus *Trichothecium roseum* link“. *Archives of Biological Sciences* vol. 63, (2011a): 1001–1006. doi:10.2298/abs1104001s
- Stojanović, J., V. Jakovljević, I. Matović, O. Gajović, Z. Mijušković, T. Nedeljković, „Analysis of the amino acids of some types of fungi cultivated in the presence of detergent“. *Acta Veterinaria* vol. 61, (2011b): 423–428. doi:10.2298/avb1104423s

- Strasser, H., W. Burgstaller, F. Schnner, „High-yield production of oxalic acids for metal leaching process by *Aspergillus niger*“. *FEMS Microbiology Letters* vol. 119, (1994): 365–370.
- Shatanawi, M., A. Hamdy, H., Smadi, „Urban wastewater: problems, risks and its potential use for irrigation“. In *The use of non conventional water resources*, Hamdy A. (ed.), 15–44. Bari: CIHEAM / EU DG Research, 2005.
- Schirmböck, M., M. Lorito, Y.-L. Wang, C. K. Hayes, I. Arisan-Atac, F. Scala, G. E. Harman, C. P. Kubicek. „Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi“. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 60, (1994): 4364-4370
- Shaddick, G., Thomas, M.L., Mudu, P. *et al.*, „Half the world’s population are exposed to increasing air pollution“, *npj Climate and Atmospheric Science* 3, number 23 (2020), <https://doi.org/10.1038/s41612-020-0124-2>.
- Tan Tai, L. H., V. Narello-Rataj, „Detergents - Detergents The main surfactants used in detergents and personal care products“. *Oillsids & fats Crops and Lipids* Vol. 8, Number 2 (2001): 141-144.
- Temel, F. A., E. Avci, Y. Ardali, „Full scale horizontal subsurface flow constructed wetlands to treat domestic wastewater by *Juncus acutus* and *Cortaderia selloana*“. *International Journal of Phytoremediation* Vol. 20, Issue 3 (2018): 264-273.
- Tejaswini, E., G. Uday Bhaskar Babu, A. Seshagiri Rao, "Effect of temperature on effluent quality in a biological wastewater treatment process" *Chemical Product and Process Modeling* vol. 15, no. 1, (2020): 20190018. <https://doi.org/10.1515/cppm-2019-0018>
- Tintometer GmbH, Lovibond, „Water Testing“, Lovibond, [www.lovibond.com/water-testing](http://www.lovibond.com/water-testing) (преузето).
- Tirgar, A. et al., „A glance at one decade of water pollution research in Iranian environmental health journals“. *International Journal of Food Contamination* vol. 7, no. 2 (2020) <https://foodcontaminationjournal.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s40550-020-00080-9.pdf> (преузето), <https://doi.org/10.1186/s40550-020-00080-9>.

- Tretyakov, S.Y., A.G. Melekhin, „Technology of Sulfides Neutralization in Household Sewage”. *Ecology and Industry of Russia*, no. 1 (2012): 12–16.
- Truong, Q.T., N. Miyata, K. Iwahori, „Growth of *Aspergillus oryzae* during the treatment of cassavastarch wastewater with high content of suspended solids”. *Journal of Bioscience and Bioengineering* vol. 97, iss. 5 (2004): 329–335.
- Turgeman, T., A. Shatil-Cohen, M. Moshelion, P. Teper-Bamnolker, C.D. Skory, A. Lichter, D. Eshel, “The role of aquaporins in pH-dependent germination of *Rhizopus delemar* spores”. *PLoS One* vol. 11, (2016): e0150543. doi: 10.1371/journal.pone.0150543.
- Tuser, C., „What is Biological Oxygen Demand (BOD)?”, *Water & Wastes digest*, <https://www.wwdmag.com/instrumentation/instrumentation-bod/article/10938701/what-is-biological-oxygen-demand-bod> (преузето).
- Thornton, I. et al., *Pollutants in urban waste water and sewage sludge: Final Report*. London: ICON, IC Consultants Ltd, 2001.
- UNESCO World Water Assessment Programme, „Water for People, Water for people”. The paper is presented on 3rd World Water Forum in Kyoto, Shiga & Osaka, Japan, 16 – 23. March, 2003.
- US Environmental Protection Agency – US EPA, „Indicators Used in the National Aquatic Resource Surveys“. 2022. Available at: <https://www.epa.gov/national-aquatic-resource-surveys/indicators-used-national-aquatic-resource-surveys>
- US Environmental Protection Agency – US EPA, „Water Quality Conditions”, Chapter 5, United States government, <https://www.epa.gov/wqc> (преузето).
- US Environmental Protection Agency, US Solid waste and EPA. 542-F-96-007: 1–4, 1996.
- Fayza A.N. et al., *Chemical Industry Wastewater Treatment*, Water Pollution Research department, National Research Centre, Cairo, Egypt, Faculty of Engineering, Cairo University, Cairo, Egypt, 2004.
- Figueras, M.J, J.J. Borrego, „New perspectives in monitoring drinking water microbial quality”, *Internaciona. Journal of Environmental Resarch and Public Health* vol. 7(12) (2010): 4179–4202.
- Fleissner, A. P. Dersch, „Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*“. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 87, (2010): 1255-1270. doi: 10.1007/s00253-010-2672-6



- Fries, J.S. et al., „Attachment of fecal indicator bacteria to particles in the Neuse river Estuary”. *Journal of Environmental Engineering* vol. 132, iss. 10 (2006), <https://ascelibrary.org/doi/10.1061/%28ASCE%290733-9372%282006%29132%3A10%281338%29> (преузето), [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2006\)132:10\(1338\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2006)132:10(1338)).
- Frigon, D. et al., „Biological and Physicochemical Wastewater Treatment Processes Reduce the Prevalence of Virulent *Escherichia coli*”, *American society for microbiology*, vol. 79(3) (2013): 835–844.
- Fung H., C. Wibowo, K. M. Ng, „Product-centered process synthesis and development: detergents”. *Computer-Aided Chemical Engineering* Vol. 23 (2007): 239–274.
- Hamdy A., M. Shatanawi, H. Smadi, „Urban wastewater problems, risks and its potential use for irrigation. In *The use of non-conventional water resources*, ed.A. Hamdy, 15-44. Bari: CIHEAM/EU-DG Research, 2005.
- Hanson, J.R. “The chemistry of the bio-control agent, *Trichoderma harzianum*”. *Science Progress* vol. 88, (2005): 237-248. doi:10.3184/003685005783238372,
- Harman G., C. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito, „*Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts“. *Natural Reviews in Microbiology* vol. 2, (2004): 43-56. <http://dx.doi:10.1038/nrmicro797>
- Hasan, F., A. Ali Shah, „Enzymes used in detergents: Lipases”. *African Journal of Biotechnology* vol. 9(31) (2010): 4836–4844.
- Hendriks, J.H.M. et al., „ADP-glucosepyrophosphorylase is activated by posttranslation redox-modification in response to light and to sugar in leaves of *Arabidopsis* and other plant species”. *Plant Physiology* vol, 133, iss. 2 (2003): 838–849.
- Hernandez, L.L, H. Temmink, G. Zeeman, C. Buisman, „Comparison of three systems for biological greywater treatment”. *Water* vol. 2(2) (2010): 155–169.
- Hervas-Aguilar, A., A. Galindo, M.A. Penalva, „Receptor-independent ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF“. *Journal of Biological Chemistry* vol. 285, (2010): 18095–18102.
- Ho Tan Tai, L., V. Nardelo-Rataj, „Detergents The main surfactants used in detergents and personal care products”, *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* Vol. 8, num. 2 (2001): 141–144, <https://www.ocl-journal.org/articles/oclj/pdf/2001/02/oclj200182p141.pdf>.

- Hölker U., J. Dohse, M. Höfer, „Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*“. *Folia Microbiologica* vol. 47, (2002): 423.
- Holmberg, K. et al., *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. 2nd ed. Chichester: Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- Hoorweg, D., P. Bhada-Tata, *What a waste: A global review of solid waste management*. Washington: Urban development series, knowledge papers, World Bank, 2012.
- Hoyos-Carvajal, L., S. Orduz, J. Bissett, „Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions“. *Fungal Genetics and Biology* vol. 46, (2009): 615-631. doi: 10.1016/j.fgb.2009.04.006.
- Hrvatska enciklopedija, „Biorazgradljivost“, Leksikografski zavod „Miroslav Krleža“, <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=7797> (npeyzero).
- Hu Z., D. Grasso, „Water analysis - Chemical Oxygen Demand“. In: *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, P., Worsfold, A., Townshend, C., Poole (ed), 325-330. Elsevier, 2005. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00663-4>.
- Huang, M., Y. Li, G. Gu, „Chemical composition of organic matter in domestic wastewater“. *Desalination* vol. 262, iss. 1-3 (2010): 36-42.
- Hubble, R., I.N.C. Clark, *Project plan for wastewater treatment plant upgrades*. Michigan: Bloomfield Hills, 2019.
- Hunter, J.V, H. Heukelekian, „The Composition of Domestic Sewage Fractions“, *Journal (Water Pollution Control Federation)* vol. 37, no. 8 (1965): 1142-1163.
- Candelero D.J., A.J. Cristobal, R.A. Reyes, S.J.M. Tun, A.M.M. Gamboa, S.E. Ruiz, „*Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagónicas contra *Meloidogyne incógnita*“. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* vol. 84 (2015): 113-119
- Carmichael, W.W., „Health effects of toxin-producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”. *Human and Ecological Risk Assessment* vol. 7, iss. 5 (2001): 1393-1407.
- Carvalho, A.K.F., J.D. Rivaldi, J.C. Barbosa, H.F. de Castro, „Degradation pathway of pentachlorophenol by *Mucor plumbeus* involves phase II conjugation and oxidation-reduction reactions“. *Journal of Hazardous Materials* vol. 198, (2011): 133-142.

- Cachada, A, Teresa Rocha-Santos, Armando C. Duarte, „An Introduction to the Main Issues”. In *Soil and Pollution - From Monitoring to Remediation*, ed. Armando C. Duarte, Anabela Cachada and Teresa Rocha-Santos (Cambridge, Massachusetts: Academic Press, 2018), 1-28.
- Chaverri, P., G.J. Samuels, „Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology“. *Evolution* vol. 67-10, (2013): 2823–2837. doi:10.1111/evo.12169
- Chaverri, P., L.A. Castlebury, G.J. Samuels, D.M. Geiser, “Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex”. *Molecular Phylogenetics and Evolution* vol. 27, (2003): 302-313. doi: 10.1016/s1055-7903(02)00400-1.
- Cheng K.C. et al., „Design and performance optimisation of detergent product containing binary mixture of anionic-nonionic surfactants”, *Helyon* vol. 6(5) (2020): <https://doi.org/10.1016%2Fj.heliyon.2020.e03861> (преузето), doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03861.
- Chouhan, P.K., D. Prakash, „Comparative study of amino acids production by *Aspergillus wentii* in different culture media”. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* vol 5, iss. 4 (2013): 33–36.
- Coca, C. et al., „Chemical and microbiologic indicators of faecal contamination in the Guadalquivir (Spain)”. *European Water Pollution Control* vol. 6, iss. 3 (1996): 7–13.
- Cong Cheng, K. et al., „Design and performance optimisation of detergent product containing binary mixture of anionic-nonionic surfactants”, *Helyon* 6 (2020): <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03861>.
- Crewther, W.G, F.G. Lennox, „Enzymes of *Aspergillus oryzae*. III. The sequence of appearance and some properties of the enzymes liberated during growth”. *Australian Journal of Biological Sciences* vol 6, iss. 3 (1953): 410–427.
- Џокић, Д., *Површинске активне материје*. Београд: Научна књига, 1985.
- Waideman, M.A. et al., „Enterococci used as complementary indicator of fecal contamination to assess water quality from public schools in the city of Curitiba, Paraná, Brazil”, *Brazilian Journal for Food and Technology*, vol. 23 (2020),

- [http://old.scielo.br/scielo.php?pid=S1981-67232020000100464&script=sci\\_arttext](http://old.scielo.br/scielo.php?pid=S1981-67232020000100464&script=sci_arttext),  
(npeyzero), <https://doi.org/10.1590/1981-6723.15519>.
- Wang, Q.H, M. Kuninobu, H. I. Ogawa, Y. Kato, „Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion”. *Biomass Bioenerg*s vol. 16, iss. 6 (1999): 407–416.
- Watanabe, K., „ Microorganisms Relevant to Bioremediation”. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 12, no. 3 (2001): 237–241.
- Watanabe, T., A. Ishibashi, Y. Ariga, M. Hashimoto et al., „Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline hitin hydrolysis by *Bacillus circulans chitinase A1*”. *FEBS Letters* Vol. 494, Issue 1-2 (2001): 74–78.
- Wesley, J, *Getting Started with TMDL's*, YSI Incorporated, 1999.
- Wieprecht, T. et al., „Design and application of transition metal catalysts for laundry bleach”. *Comptes Rendus Chimie* vol. 10 (2007): 326–340.
- Woodard, Curran, Inc., „5 - Waste Characterization“. *Industrial Waste Treatment Handbook (Second Edition)*, Woodard & Curran, Inc. (ed), 83-126. Butterworth-Heinemann, 2006. <https://doi.org/10.1016/B978-075067963-3/50007-2>.
- Yang, X. et al., „Mechanisms and assessment of water eutrophication”, *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* vol. 9, iss. 3 (2008): 197–209.
- Yoshiyuki, O, I. Katsuhiko, U. Seinosuke, „Production of phosphatase by *Aspergillus awamori* var. *kawachii* in a low phosphate medium”. *Applied Microbiology* vol. 16, iss. 7 (1968): 973–980.

## **8. БИОГРАФИЈА АУТОРА**

Ивана О. Матовић-Пурић је рођена 10. 02. 1978. године у Чачку где је завршила основну и средњу медицинску школу. Основне студије биологије завршила је школске 2004/2005 године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, Универзитета у Крагујевцу и стекла назив дипломирани биолог. На докторске студије биологије се уписала 2016/17. године.

Од 1. 09. 2004. године запослена у средњој Медицинској и Машинско-саобраћајној школи у Чачку. Од 15. 10. 2004. године предавач Агрономског факултета у Чачку (Регионални центар за младе таленте).

Учестовала на пројектима "Едукативна стаза Каблара". (2016. године), "Учионица у природи" (2017. године) и "Одрживи развој"(2019. године).

Током професионалног рада остварила резултате са ученицима на окружним и републичким такмичењима, која реализује Министарство науке и технолошког развоја (2006, 2007) и Регионални центар за таленте Београд (2004-2022).

Аутор и коаутор више научних радова. Служи се енглеским језиком. Удата, има сина Михаила.

Образац 5.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Матовић Пурић

број индекса 7/16

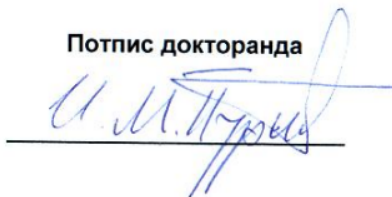
### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

*УПОРЕДНИ ПРЕГЛЕД МЕТАБОЛИЧКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ГЉИВА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ  
ОТПАДНИХ ВОДА (ВРСТЕ РОДОВА *MUCOR*, *ASPERGILLUS*, *PENICILLIUM* И  
*TRICHODERMA*) У ДЕГРАДАЦИЈИ ДЕТЕРЖЕНТА*

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

Потпис докторанда



\_\_\_\_\_

У Косовској Митровици, \_\_\_\_\_

Образац 6.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Ивана Матовић Пурић

Број индекса 7/16

Студијски програм Биологија

Наслов рада УПОРЕДНИ ПРЕГЛЕД МЕТАБОЛИЧКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ГЉИВА ИЗОЛОВАНИХ  
ИЗ ОТПАДНИХ ВОДА (ВРСТЕ РОДОВА MUCOR, ASPERGILLUS, PENICILLIUM И  
TRICHODERMA) У ДЕГРАДАЦИЈИ ДЕТЕРѢНТА

Ментор Татјана Михајлов – Крстев

Потписани/а Ивана Матовић Пурић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.**

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

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Потпис докторанда



У Косовској Митровици, \_\_\_\_\_

Образац 7.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици унесе моју докторску дисертацију под насловом:

УПОРЕДНИ ПРЕГЛЕД МЕТАБОЛИЧКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ГЉИВА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ ОТПАДНИХ ВОДА (ВРСТЕ РОДОВА MUCOR, ASPERGILLUS, PENICILLIUM И TRICHODERMA) У ДЕГРАДАЦИЈИ ДЕТЕРЦЕНТА

која је моје ауторско дело.

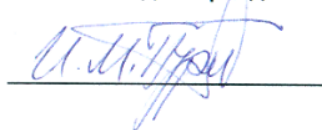
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

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

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

Потпис докторанда



У Косовској Митровици, \_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора



или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

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

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

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

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

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