



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE**



Snežana Maletić

**KARAKTERIZACIJA BIODEGRADABILNOSTI NAFTNIH
UGLJOVODONIKA U ZEMLJIŠTU I BIOREMEDIJACIONIH
PROCESA U TOKU TRETMANA BIOGOMILAMA I
POVRŠINSKOM OBRADOM**

- doktorska disertacija -

Novi Sad, 2010. godina

Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom rađena su na Katedri za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Zahvaljujem se Prof. dr Boži Dalmaciji koji je svojim predlozima, savetima i angažovanjem pomogao da se definiše oblast istraživanja, postavi eksperiment i dođe do odgovora na postavljena pitanja.

Zahvaljujem se Doc. dr Srđanu Rončeviću koji mi je nesebično pomogao svojim znanjem i iskustvom da postavim eksperiment i tumačim eksperimentalne rezultate.

Zahvaljujem se Prof. dr Elviri Karlović i Prof. dr Miletu Klašnji na iskazanom interesovanju i podršci.

Zahvaljujem se Svetlani Ugarčini Perović i Prof. dr Olgi Petrović jer su svi prezentovani mikrobiološki parametri njihova zasluga.

Zahvaljujem se svim kolginicama i kolegama sa Katedre za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine koji su na bilo koji način doprineli izradi ove teze.

Neizmerno sam zahvalna svojoj porodici i prijateljima, naročito majci Smilji Radanović, sestri Aniti Zamaklar i ocu Petru Kuzmanoviću na ljubavi, veri i podršci.

Posebno sam zahvalna svom suprugu Nikoli Maletiću koji mi je ukazao veliko poverenje, podržavao me i vraćao osmeh na lice sa mnogo ljubavi i strpljenja kad god je to bilo potrebno, zbog čega sam mu večno zahvalna.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Nafta i životna sredina	3
2.1.1. Poreklo nafte	3
2.1.2. Sastav i fizičko-hemijska svojstva nafte	4
2.1.3. Eksploatacija i prerada nafte	5
2.1.4. Zagađivanje životne sredine naftom	5
2.1.5. Kretanje naftnih ugljovodonika i drugih zagađujućih supstanci u prirodi	7
Voda u zemljištu	8
Zagađujuće supstance.....	9
Faktori koji utiču na transport zagađujućih supstanci.....	12
2.1.6. Toksično delovanje nafte.....	14
2.2. Tehnike uklanjanja naftnih zagađujućih materija iz zemljišta – remedijacija zemljišta.....	17
Prva grupa - prevođenje zagađujuće supstance u čvrsto stanje.....	18
Druga grupa - separacija zagađivača od kontaminiranog medijuma.	19
Treća grupa - biološki procesi ili hemijske reakcije za uklanjanje zagađenja.....	24
2.3. Bioremedijacija.....	30
2.3.1. Mehanizmi i proizvodi razgradnje ugljovodonika.....	31
2.3.2. Kinetika bioremedijacionih procesa.....	40
2.3.3. Faktori koji utiču na procese biodegradacije naftnih ugljovodonika Karakteristike zemljišta.....	41
Karakteristike kontaminanta.....	43
Biodostupnost - Starenje, sekvencijacija i kompleksiranje naftnog zagađenja.....	44
Mikrobijalna populacija i razvoj katabolizma.....	48
2.3.4. Metode za monitoring i razvoj bioremedijacionih procesa.....	51
Hemijske metode za praćenje i razvoj bioremedijacionih procesa	51
Mikrobiološke metode za praćenje i razvoj bioremedijacionih proces.....	55
Testovi biodegradacije u mikrokosmosu.....	57
Biomarker jedinjenja.....	58
Ekološki uticaj i procena toksičnosti.....	60
Molekulske probe.....	60
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	62
3.1. Karakterizacija biodegradacionih i biotransformacionih procesa u zemljištu sa starim naftnim zagađenjem u toku tretmana biogomili i površinskom obradom.....	63
3.1.1. Bioremedijacija u biogomili.....	64
3.1.2. Bioremedijacija površinskom obradom.....	65
3.1.3. Bioaugmentacija biogomile i površinske obrade.....	67

3.1.4. Uzorkovanje, hemijska i mikrobiološka analiza.....	67
3.2. Uticaj koncentracije, biodostupnosti, strukture i starenja zagađujućih materija na procese biodegradacije i biotransformacije kontrolisanim laboratorijskim uslovima.....	68
3.2.1. Zemljište.....	68
3.2.2. Procedura kontaminacije.....	68
3.2.2. Određivanje biodostupnosti ugljovodonika u zemljištu.....	69
3.2.3. Ispitivanje biodegradabilnosti ugljovodonika u zemljištu.....	70
3.3. Metode analize.....	72
3.3.1. Metode analize vode.....	72
3.3.2. Metode analize zemljišta.....	73
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	77
4.1. Rezultati ispitivanja bioremedijacionih procesa u zemljištu u toku tretmana biogomilama i površinskom obradom.....	77
4.1.1. Karakteristike zagađenog zemljišta.....	77
4.1.2. Temperaturni uslovi u toku tretmana zemljišta biogomilama i površinskom obradom.....	78
4.1.3. Ispitivanje procesa bioremedijacije zemljišta u toku tretmana biogomilama.....	78
Vlažnost zemljišta.....	78
Promena pH vrednosti u zemljištu i vodi u toku tretmana.....	79
Sadržaj nutrijenata u zemljištu i vodi u toku tretmana.....	80
Promena organskih materija u zemljištu i vodi u toku tretmana.....	83
Kinetika degradacija ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u toku tretmana.....	86
Degradacija poliaromatičnih ugljovodonika u zemljištu u toku tretmana.....	90
GC-MS kvalitativna analiza zemljišta u toku tretmana.....	92
Procena biodegradacije pojedinih grupa n-alkana i izoalkana u odnosu na biomarker jedinjenja hopana.....	98
Mikrobiološka karakterizacija procesa bioremedijacije.....	101
4.1.1. Ispitivanje procesa bioremedijacije zemljišta u toku tretmana površinskom obradom.....	103
Vlažnost zemljišta.....	103
Promena pH vrednosti u zemljištu i vodi u toku tretmana.....	103
Sadržaj nutrijenata u zemljištu i vodi u toku tretmana.....	104
Promena organskih materija u zemljištu i vodi u toku tretmana.....	106
Kinetika degradacija ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u toku tretmana.....	109
Degradacija poliaromatičnih ugljovodonika u toku tretmana.....	112
GC-MS kvalitativna analiza zemljišta u toku tretmana.....	114
Procena biodegradacije pojedinih grupa n-alkana i izoalkana u odnosu na biomarker jedinjenja hopana.....	117
Mikrobiološka karakterizacija procesa bioremedijacije.....	119
4.1. Ispitivanje uticaja koncentracije, tipa i starenja zagađujućih materija na njihovu biodostupnost i procese biodegradacije u zemljištu.....	121
4.1.1. Ispitivanje uticaja koncentracije, tipa i starenja, zagađujućih materija na njihovu biodostupnost u zemljištu.....	121
Određivanje kritične koncentracije micela (CMC) odabranih surfaktanata.....	122

<i>Optimizacija ekstrakcije ugljovodonika iz zemljišta surfaktantima.....</i>	123
<i>4.1.2. Ispitivanje uticaja koncentracije, tipa i starenja, zagađujućih materija na procese njihove biodegradacije u zemljištu.....</i>	126
<i>Karakteristike zagađenog zemljišta.....</i>	126
<i>Promena pH vrednosti u toku eksperimenta.....</i>	127
<i>Sadržaj nutrijentnih materija u toku eksperimenta.....</i>	128
<i>Respirometrijska merenja u toku eksperimenta.....</i>	128
<i>Degradacija ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u toku eksperimenta.....</i>	131
<i>Mikrobiološka karakterizacija procesa biodegradacije.....</i>	135
<i>GC-MS kvalitativna analiza proba u toku eksperimenta.....</i>	136
<i>Procena biodegradacije pojedinih grupa jedinjenja u odnosu na biomarker jedinjenja terpena.....</i>	143
5. ZAKLJUČAK.....	150
6. LITERATURA.....	154
BIOGRAFIJA	
KLJUČNA DOKUMENTACIJA	

1. UVOD

Razvoj ljudske civilizacije kroz istoriju uticao je na sve veće remećenje prirodne ravnoteže i na pojavu različitih vrsta zagađenja. Ne bi smeli zaboraviti da smo mi kao ljudi dužni da se prilagodimo prirodi u onoj meri u kojoj se ona već prilagodila nama. Narušavanjem higijene okoline, ispuštanjem toksičnih materija u zemljište, vodu i vazduh, narušavamo sopstveno zdravlje. Kontrola i uklanjanje zagađenja, međutim, nisu smatrani neophodnim sve do pred kraj devetnaestog veka. Kontrola je u početku bila usmerena na tradicionalne, tačkaste izvore zagađenja, poput industrijskih dimnjaka i ispusta industrijskih i komunalnih otpadnih voda. U današnjem veku smo na pragu mnogih projekata koji se tiču zaštite životne sredine, i koji su usmereni ka traganju za najefikasnijom i najisplativijom metodom, u zavisnosti da li ona obuhvata sam proces proizvodnje ili se primenjuje kao tehnika za sanaciju nastalog zagađenja.

Nafta je jedna od najvećih izvora energije današnjice, bez koje je teško zamisliti funkcionisanje savremenog društva. Upotreba nafte, kao energenta, dovela je do intenzivnog privrednog razvoja u celom svetu. Velika potreba za ovim izvorom energije dovela je do postepenog iscrpljivanja prirodnih rezervi nafte. Ipak, čovečanstvo će biti svedok posledica primene nafte vekovima nakon prestanka njene primene. Do zagađenja životne sredine i narušavanja prirodne ravnoteže može doći kao rezultat akcidentnih situacija prilikom vađenja, transporta, obrade i primene nafte. Većina komponenata nafte je toksična za čoveka i živi svet uopšte, obzirom da se lako uključuju u lanac ishrane. Ova činjenica povećala je interes naučnika za ispitivanje distribucije, sudbine i ponašanja nafte i njenih derivata u životnoj sredini.

Procenjeno je da oko 5 miliona tona sirove nafte i njenih derivata dospe u životnu sredinu svake godine kao rezultat antropogenih aktivnosti, od kojih 2,3 miliona tona dospeva u mora i okeane (*Hinchee i Kite, 1995*). Primeri akcidentnih izlivanja nafte i derivata u životnu sredinu su brojni, neki od najznačajnijih su: Meksički zaliv (1979, 480.000 tona); Trinidad i Tobago (1979, 287.000 tona); Exxon Valdez-Aljaska (1989, 37.000 tona); Zalivski rat-Persijski zaliv (1991, 1.500.000 tona); Angola (1991, 260.000 tona); Đenova (1991, 144.000 tona); Španija (2002, 63.000 tona) i drugi (http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_oil_spills). Svi ovi akcidenti izazvali su ekstenzivne promene vode, vazduha i zemljišta, a takođe su doveli i do promena i izumiranja nekih biljnih i životinjskih populacija.

Jedan ovakav akcident se desio i kod nas 1999. godine u toku bombardovanja Rafnerija nafte u Novom Sadu i Pančevu. U toku razaranja 1999. godine značajno je oštećena infrastruktura Rafnerije nafte Novi Sad i došlo je do izlivanja velikih količina (oko 74.000 tona) nafte i derivata na tlo Rafnerije. Prostor zagađen benzinima iznosio je oko 8.500 m², sirovom naftom 51.000 m², a ostalim naftnim derivatima oko 35.000 m². Nepotpunim sagorevanjem nafte tokom dugotrajnih i čestih požara nastali su toksični produkti pre svega poliaromatičnog karaktera koji su se taložili na okolnom zemljištu. Deo zagađenog zemljišta, oko 10.000 m³, je smešten u kontrolisani depo. Iako je sprečeno ispiranje zagađenja iz deponovanog zemljišta, dolazi do isparavanja lakoisparljivih toksičnih komponenti u atmosferu, a i neophodno je vršiti stalni nadzor depoa da ne bi došlo do pojave oštećenja i transporta zagađenja u okolinu (*Dalmacija et al., 2000;2003*).

Izlivanje nafte i njenih derivata u životnu sredinu prouzrokuje dugotrajno oštećenje vodenog ekosistema, zemljišnog ekosistema, ljudskog zdravlja i prirodnih izvora. Karakterizacija prolivene nafte i njenih derivata veoma je važna, u cilju predviđanja ponašanja nafte i njenih dugoročnih efekata na životnu sredinu, kao i u cilju odabira odgovarajuće metode čišćenja. Zbog potencijalne opasnosti koju naftni ugljovodnici predstavljaju za čoveka i životnu sredinu, javila se potreba za ispitivanjem i karakterizacijom procesa biodegradacije i biotransformacije zemljišta zagađenog ugljovodnicima, kao i za razvojem bioremedijacionih tehnika za prečišćavanje ovakvog zemljišta do nivoa koji obezbeđuje njegovo bezbedno odlaganje ili ponovno korišćenje.

Za sanaciju i prečišćavanje zemljišta kontaminiranog naftom i njenim derivatima do danas su razvijene različite bioremedijacione tehnike koje su zasnovane na biorazgranji i procesima koji je omogućavaju ili olakšavaju. Od bioremedijacionih tehnika najčešće se primenjuju tehnike površinske obrade i biogomila, s obzirom da su se ove tehnike pokazale kao efikasne za redukovanje koncentracije skoro svih konstituenata naftnih produkata, nehalogenovanih i halogenovanih volatilnih i semivolatilnih organskih jedinjenja i poliaromatičnih ugljovodonika (*Jorgensen et al., 2000*). Velika prednost ove dve tehnike u odnosu na druge bioremedijacione tehnike je njihova ekonomičnost kao i mogućnost tretiranja velikih zapremina kontaminiranog zemljišta.

Ciljevi ovog rada su:

- (1) da se ispituju procesi koji se odvijaju prilikom bioremedijacije zemljišta zagađenog naftom i derivatima, koje je bilo izloženo nekontrolisanim abiotičkim i biotičkim procesima u toku 8 godina, tehnikama biogomila i površinske obrade na poluindustrijskoj (pilot) skali uz optimizaciju tehnoloških parametara sa ciljem povećanja efikasnosti i efektivnosti biodegradacije ugljovodonika;
- (2) da se ispita uticaj prirode zagađenja (fizičko-hemijske osobine ugljovodonika), koncentracije, kao i ukupni efekat prirodnih procesa kojima zagađenje podleže (starenje), na njegovu sudbinu i ponašanje u zemljištu, tj. na biodostupnost i biodegradabilnost u kontrolisanim laboratorijskim uslovima.

2. OPŠTI DEO

2.1. Nafta i životna sredina

Nafta je jedan od najznačajnijih energetske izvora. U odnosu na čvrsta goriva, hidro i nuklearnu energiju, nafta i prirodni energetski gas su za energetske namene u svetskoj potrošnji zastupljeni sa 60%, i to dve trećine nafta i jedna trećina prirodni gas. Osim toga, nafta i gas su i osnovne polazne sirovine za hemijsku industriju. Na bazi nafte i gasa razvila se sredinom XX veka petrohemijska industrija, koja obuhvata proizvodnju mnogih hemijskih proizvoda.

Istraživanja i eksploatacija nalazišta nafte započeti su u drugoj polovini XIX veka, a brži razvoj usledio je u XX veku. Nagli porast potrošnje nafte je u tesnoj vezi sa razvojem automobilske, a zatim i avionske saobraćaja. Zahvaljujući manjim troškovima proizvodnje i transporta, nafta je u mnogim područjima primene potisnula do tada dominantnu sirovinu - ugljen. Veoma mala cena u prošlosti uticala je na masovno i često neracionalno korišćenje nafte. Nova nalazišta nafte ne pronalaze se onim tempom kojim to svetske potrebe za energijom zahtevaju. Zbog toga je cena nafte na svetskom tržištu ušestostručena u razdoblju od 2000. godine do danas. Pretpostavlja se da će u bliskoj budućnosti proizvodnja nafte doći do vrhunca a do 2050. će biti iscrpljene sve zalihe. Istovremeno se potražnja povećava, posebno zbog velikog privrednog rasta Kine i Indije. Zbog toga bi vrlo brzo moglo doći do krize velikih razmera u svetskoj privredi.

2.1.1. Poreklo nafte

O poreklu nafte postoji više raznih teorija, koje mogu da se svrstaju u dve grupe:

- Teorija o neorganskom (abiogenom) poreklu nafte i
- Teorija o organskom (biogenom) poreklu nafte.

Pristalice abiogenog porekla smatraju da je nafta mogla postati dejstvom vode na metalne karbide na visokoj temperaturi i pritisku u unutrašnjosti Zemlje, pri čemu su nastali oksidi i ugljovodonici. Danas prevladava mišljenje da je nafta nastala od masnih i voštanih supstanci različitih sitnih životinjskih i biljnih morskih organizama - planktona. Pod povoljnim uslovima, koji su vladali u dalekim geološkim dobima, živele su i razmnožavale se u toplim morskim zalivima velike količine tih organizama; uginuvši one su se taložile na morsko dno. U sredini siromašnoj kiseonikom počelo je, zbog delovanja anaerobnih bakterija, razaranje belančevina i drugih lako raspadljivih organskih materija. Otpornije masne i voštane supstance gomilale su se onda u obliku mulja. Taj osnovni materijal morao je posle, nanosom rečnog mulja, biti pokriven zaštitnim slojem. Pod pritiskom zemljanih slojeva, i kod nešto povišene temperature, mast se pretvarala najpre u prabitumen, a onda u naftu.

Prisustvo komplikovanih visokomolekulskih spojeva (holesterola, hormona, hlorofila i dr.) koji nisu mogli nastati jednostavnom sintezom i optička aktivnost nafte dokazuju organsko poreklo nafte. Dok sastav slane vode, koja prati naftu, svedoči o njenom morskom poreklu. S druge strane postoji mišljenje da nafta potiče iz neispitanih i nedovoljno poznatih dubina Zemlje. Tome u prilog govore nalazi nafte u vulkanskim područjima (na Kamčatki), nagomilavanje nafte u velikim dubinama u mineralima kristalastog porekla (Venecuela) i nalazi nafte u pukotinama litosfere u dnu Indijskog okeana.

2.1.2. Sastav i fizičko-hemijska svojstva nafte

Po svom hemijskom sastavu nafta je mešavina velikog broja različitih ugljovodonika (95-98%) i malih količina jedinjenja sumpora (alkil-sulfidi, merkaptani, ciklični sulfidi); kiseonika (naftenske kiseline, alifatične kiseline, fenoli i dr.); azotna jedinjenja (supstituisani piridini, karbozoli, indoli, pirol i amidi) i metaloorganska jedinjenja (organska jedinjenja u čiji sastav ulaze i metali, najčešće Fe, Cu, V i Ni) (Vitorović, 1987). U elementarnom sastavu po procentu mase dominira ugljenik (83-87%), zatim vodonik (10-14%), i kiseonik (0,1-1,5%), sumpor (0,5-6%), azot (0,1-2%) i metali (<1000 mg/l).

Sirova nafta je smeša različitih ugljovodonika, pretežno: parafina - zasićeni ugljovodonici sa ravnim ili razgranatim lancima (15-60%), cikloparafina ili naftena - zasićeni ugljovodonici koji sadrže jedan ili više prstenova (30-60%), aromata - ugljovodonici sa jednim ili više aromatičnih prstenova (3-30%), asfaltnih komponenata (oko 6%). Olefinskih ugljovodonika praktično i nema u sirovoj nafti, ali su zato prisutni u produktima njene prerade. Prema ovim grupama koje sadrže, sve nafte se dele na:

1. Parafinske; preko 75% alkana - USA, Persijski zaliv, naša ležišta;
2. Naftenske; većinom i do 70% naftena - USA, Meksiko, Venecuela, Afrika, Velebit, Kelebija;
3. Parafinsko-naftenske; 60-70% alkana i preko 20% naftena- kontinentalna SAD, Persijski zaliv;
4. Parafinsko-naftenske-aromatske; Kavkaz;
5. Naftensko-aromatske; preko 35% naftena i oko 35% aromata- Kalifornija, Teksas, Burma;
6. Asfaltne; teške nafte sa preko 60% smola i asfaltena- Trinidad;
7. Naftensko-aromatsko-asfaltne; Kalifornija, Teksas.

Karakteristike nafte uslovljene su geološkim uslovima njenog formiranja. U zavisnosti od izvora, konzistencija sirove nafte može varirati od lake, isparljive tečnosti, do viskozne, polučvrste supstance. Svaka sirova nafta sadrži lakše frakcije slične benzinu i teže frakcije katrana i parafina. Gustina nafte je, bez obzira na njeno poreklo uvek manja od gustine vode i kreće se između 670-980 kg/m³. Laki derivati nafte (benzini i mlazna goriva) imaju manju gustinu što je posledica većeg sadržaja lakših ugljovodonika (aromata i olefina). U zavisnosti od sadržaja parafina, viskoznost nafte se kreće u širokom opsegu od 10 do 800 x 10⁻⁶ m²/s. Ova osobina je veoma bitna sa aspekta izlivanja nafte i transporta u podzemlju, obzirom da uslovljava njenu brzinu i način kretanja kroz poroznu sredinu (Veselinović et al., 1995). Molska masa sirove nafte i njenih proizvoda predstavlja srednju vrednost koja zavisi od udela

pojedinih ugljovodonika u smeši i kreće se u opsegu 250-300 g/mol. Temperatura paljenja sirove nafte zavisi od sadržaja lako isparljivih ugljovodonika i kreće se u granicama od 30-70°C.

2.1.3. Eksploatacija i prerada nafte

Naftna ležišta se mogu očekivati u sedimentnim slojevima onih područja gde je u davnim geološkim dobima bilo more. Dubina naftonosnih slojeva je različita; od nekoliko metara do 7600 m i više. Što je veća dubina, veći je i pritisak pod kojim se nafta nalazi. Najdublja do sada postignuta istražna bušotina od 9169 m nalazi se u Oklahomi (SAD).

Nafta i prirodni gas izbijaju na mnogim mestima sami iz zemlje. Ovakva prirodna vrela nisu nimalo važna za proizvodnju nafte. Velike količine nafte dobijaju se danas u svetu iz dubljih slojeva zemlje izlivanjem (eruptiranjem) iz bušotina na principu arteških bunara. Prva bušenja obavljana su nasumice. Danas se pre postavljanja dubinske sonde sprovode geološka i geofizička istraživanja, koja daju podatke o geološkoj strukturi podzemnih slojeva; na taj se način znatno smanjuje broj jalovih bušenja. Savremena tehnika bušenja razvila se iz ručnog bušenja, obavljanog u potrazi za solju i vodom.

Nafta je danas u svetu jedan od najznačajnijih strateških proizvoda (obično se naziva "crno zlato"). Zbog toga zemlje proizvođači nafte imaju veliku moć u geopolitičkim odnosima, a kontrola nad izvoristima nafte jedan je od najznačajnijih uzroka kriza u svetu. Zemlje koje su najveći izvoznici nafte (ali ne uvek i proizvođači) su grupisane u interesnu organizaciju OPEK (Organizacija petroleumskih eksportnih zemalja). Najveći proizvođači nafte su:

1. Saudijska Arabija (10,37 miliona barela godišnje);
2. Rusija (9,27 miliona barela godišnje);
3. Sjedinjene Američke Države (8,69 miliona barela godišnje);
4. Iran (4,09 miliona barela godišnje);
5. Meksiko (3,83 miliona barela godišnje).

Sirova nafta se prerađuje primenom različitih tehnoloških postupaka, pri čemu se dobija veliki broj proizvoda i poluproizvoda, koji mogu da se podele u sledeće grupe:

- Goriva (naftni gas, motorni benzin, mlazno gorivo (kerozin), dizel goriva i lož-ulja);
- Maziva (maziva ulja i masti);
- Sirovine za hemijsku industriju (za farmaceutske proizvode, rastvarače, đubriva, pesticide i plastiku);
- Proizvodi za druge namene (parafin, bitumen i naftni koks).

2.1.4. Zagađivanje životne sredine naftom

Proizvodnja električne energije iz fosilnih goriva se smatra najvećim zagađivačem životne sredine, a zatim slede naftna i hemijska industrija. U ovim fazama delatnosti naftne industrije od israživanja, proizvodnje nafte i prirodnog gasa,

njihove prerade, transporta, do potrošnje naftnih derivata, javljaju se manje ili veće emisije otpadnih tokova sa štetnim i opasnim supstancama koje utiču na životnu sredinu. Priroda i veličina ovih emisija različita je za različite delatnosti u okviru naftne industrije.

Uvaženo je mišljenje da je proces istraživanja i proizvodnje nafte, naročito na moru, a zatim na prekomorskom transportu nafte, u najvećoj meri odgovoran za zagađivanje mora ugljovodonicima. Ukupna količina ugljovodonika, koja se godišnje ispusti u more i okeane, procenjuje se na oko $3,25 \times 10^6$ t/god (Rasulić, 2007).

Činjenica je da je ukupno učešće proizvodnje nafte na moru u njegovom zagađivanju svega 1,54%, ali zagađivanje prouzrokovano transportom nafte, terminalima, havarijama tankera, rafinerijama na obali i celokupni prekomorski i vazdušni saobraćaj iznosi 54,5%, dok zagađivanje iz gradova i ostale industrije iznosi 40% (Rasulić, 2007).

Zagađivanje zemljišta naftom i derivatima je posledica erupcija na bušotinama, prosipanje ugljovodonika po površini zemlje, pucanja ili propuštanja naftovoda, propuštanja rezervoara i druge opreme na naftnim poljima, u rafinerijama, skladištima derivata i na benzinskim pumpama, velikim radionicama, aerodromima i vojnim bazama. Istekla ili oslobođena nafta se kreće kroz zemljište, zagađuje ga i ugrožava podzemne vode i izvore vode za piće, isparava i zagađuje vazduh. Mnoga od ovih zagađivanja se teško uočavaju i veoma je teško kvantifikovati gubitke izazvane na ovaj način.

U cilju smanjenja svih štetnih uticaja na životnu sredinu i zbog sve strožije zakonske regulative, posebna pažnja se danas u naftnoj industriji razvijenih zemalja posvećuje operacijama i procesima u kojima se javljaju emisije zagađujućih supstanci – gasoviti, tečni ili čvrsti otpadni tokovi, proceni njihovog uticaja na životnu sredinu, mehanizmima i putevima kretanja ovih supstanci, postupcima za efikasno upravljanje otpadom uopšte, metodama kojima se smanjuje zapremina i/ili toksičnost otpada, smanjuje pokretljivost pojedinih opasnih supstanci, postupcima odlaganja otpada, metodama za uklanjanje štetnih i opasnih materija sa zagađenih lokaliteta i objekata.

Transport nafte i gasa do korisnika – potrošača naftovodom, odnosno gasovodom, je najbolji sa aspekta zaštite životne sredine. Činjenica je da su i ovde moguća propuštanja na spojevima, da može da dođe do opterećenja i isticanja fluida, da ima čvrstog otpada iz čišćenja cevovoda, ali je to najbezbedniji, najčistiji i najjeftiniji transport. Pored cevnog transporta, nafta može da se do korisnika prenosi tankerima, auto – i vagon-cisternama, u zavisnosti od udaljenosti izvora nafte do rafinerije i na taj način raste broj potencijalnih izvora zagađivanja životne sredine.

Rafinerijska prerada svojim otpadnim tokovima može da ugrozi vazduh, površinske i podzemne vode i zemljište. Emisije u vazduhu sadrže ugljen-dioksid, ugljen-monoksid, azotne okside, sumpor-dioksid, vodonik-sulfid, markaptane ugljovodonika, naročito isparljiva organska jedinjenja (VOC), čestice čađi i katalizatora i policiklične aromatične ugljovodonike. Površinske vode pored čitavog niza katjona i anjona sadrže i ugljovodonike iz nafte, vodonik-sulfid i fenole. Zemljište se najčešće zagađuje prolivanjem nafte i derivata pri manipulaciji, propuštanjem rezervoara i druge opreme ili neadekvatnim odlaganjem čvrstog otpada, pri čemu se zagađujuće supstance gravitacijom ili spiranjem sa atmosferskom vodom prodiru u zemljište i mogu da dospeju i do podzemnih voda.

Transport derivata od rafinerije do velikih skladišta i benzinski pumpi se kod nas, zbog relativno malih rastojanja, uglavnom obavlja auto- i vagon-cisternama, ali u drugim krajevima sveta to može da bude produktovodima, tankerima ili rečnim baržama do skladišta a zatim auto- i vagon-cisternama do benzinskih pumpi. Utovar i

pretovar nafte i derivata praćen je prosipanjem i zagađivanjem zemljišta ugljovodonicima, a usled njihovog kretanja kroz zemlju i podzemnih voda. Pri skladištenju derivata u rafinerijama, na skladištima, pri punjenju cisterni i punjenju automobilskih rezervoara, oslobađaju se znatne količine isparljivih ugljovodonika.

Najveće emisije u vazduh zagađujućih supstanci poreklom iz nafte, nisu rezultat proizvodnje, prerade i transporta nafte, već potrošnje naftnih derivata. Potrošnja derivata u motorima sa unutrašnjim sagorevanjem, prouzrokuje značajne emisije zagađujućih supstanci. U vazduh se ispuštaju produkti potpunog i nepotpunog sagorevanja goriva – ugljen-dioksid, ugljen-monoksid, azotni oksid, sumpor-dioksid, nagoreli ugljovodonici i čestice čađi sa policikličnim aromatičnim ugljovodonicima. Ove zagađujuće supstance prisutne su duž većih saobraćajnica, ali i u velikim naseljima, gde nisu samo posledica saobraćaja već i grejanja fosilnim gorivom u zimskoj sezoni. Slične emisije javljaju se i u termoelektranama i toplanama koje koriste čvrsta i tečna goriva, kao i u industrijskim i individualnim ložištima.

Procenjeno je da oko 5 miliona tona sirove nafte i njenih derivata dospe u životnu sredinu svake godine kao rezultat antropogenih aktivnosti, od kojih 2,3 miliona tona dospeva u mora i okeane (*Hinchee i Kitte, 1995*). Primeri akcidentnih izlivanja nafte i derivata u životnu sredinu su brojni, neki od najznačajnijih dati su u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Najznačajniji akcidenti sa naftom, mesto njihovog dešavanja i količina izlivena nafte
(http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_oil_spills)

Izliv	Mesto	Godina	Količina (t)
Torrey Canyon	Scilly Isles, UK	1967	119 000
Sea Star	Omanski zaliv	1972	115 000
Urquiola	La Coruña, Španija	1976	100 000
Amoco Cadiz	blizu Aljaske	1978	230 000
Ixtoc I	Meksički zaliv	1979	480 000
AtlanticEmpress	Trinidad i Tobago	1979	287 000
Irenes Serenade	zaliv Navarino, Grčka	1980	100 000
Nowruz oil field	Persijski zaliv	1983	260 000
Castillo de Bellver	Saldanha Bay, S. Afrika	1983	252 000
Odyssey	700 Nm od Nove Škotske, Kanada	1988	113 000
Zalivski rat	Persijski zaliv	1991	1 500 000
ABT Summer	700 NM od Angole	1991	260 000
Amoco Haven	blizu Đenove	1991	144 000
Baraer	Severna obala Škotske	1993	84 000
Sea Empress	Wales, UK	1996	72 000
Erika	Biskajski zaliv, Francuska	1999	25 000
Prestige	Galicija, Španija	2002	63 000
Exxon Valdez	Aljaska	1989	37.000

2.1.5. Kretanje naftnih ugljovodonika i drugih zagađujućih supstanci u prirodi

Emisije ugljovodonika ispuštenih iz tačkastih, površinskih i linijskih izvora, prenose se u vazduh i u njemu se razblažuju ili sakupljaju u zavisnosti od fizičko-

hemijskih svojstava supstance, meteoroloških i topografskih uslova. U vazduhu su ugljovodonici, kao i druge zagađujuće supstance, podložni fizičkim i hemijskim promenama i zato je vreme boravka zagađujućih supstanci u vazduhu i put koje oni prelaze od bitnog značaja za proučavanje zagađenosti vazduha.

Ugljovodonici u vazduhu, u prisustvu azotnih oksida, fotohemijским reakcijama stvaraju komponente smoga koji štetno utiče na zdravlje čoveka, biljni i životinjski svet. Za neke lakše isparljive aromatične ugljovodonike sa jednim prstenom i njihove derivate, registrovani su štetni efekti na zdravlje, a kancerogena svojstva su utvrđena za policiklične aromatične ugljovodonike, najčešće sorbovane na česticama smole i čađi (Rasulić, 2007).

Tečni ugljovodonici zagađuju životnu sredinu izlivanjem pri transportu i manipulaciji, propuštanjem cevovoda, podzemnih i nadzemnih rezervoara, oštećenjem opreme na naftnim poljima, u rafinerijama, na skladištima, kao rezultat havarija pri preradi nafte ili erupcije na naftnim poljima, sa otpadnim vodama iz naftne industrije uopšte i iz ugljovodonicima zagađenog otpada koji se neadekvatno odlaže. Ugljovodonici iz svih ovih izvora zagađuju zemljište, površinske i podzemne vode, a pošto su neki od njih lako isparljivi, mogu se naći u vazduhu. Ali za razliku od direktnog ispuštanja u vazduh gasovitih ugljovodonika, kod zagađenja voda i zemljišta je moguće izvršiti smanjenje zagađenosti-remedijaciju određenog lokaliteta, uklanjajući zagađujuće supstance ili smanjujući njihov sadržaj na dozvoljeni ili prihvatljiv nivo, smanjujući njihovu toksičnost prevodeći ih u druga manje toksična ili netoksična jedinjenja i smanjujući njihovu pokretljivost.

Za pristupanje remedijaciji potrebno je dobro poznavanje kretanja i transformacija ugljovodonika na putu kroz zemljište, da bi se izvršila objektivna procena stepena zagađenosti lokaliteta i prostiranja zagađujućih supstanci na njemu. Praćenje i procena kretanja i transformacije zagađujućih supstanci kroz zemljište u principu zahteva interdisciplinirani pristup zbog kompleksnosti geoloških svojstva zemljišta, njegovog hemijskog sastava, hidrogeoloških svojstva podzemnih i površinskih voda, svojstva zagađujućih supstanci i hemijskih, fizičkih i mikrobioloških procesa kojima su one izložene pri tom kretanju.

Da bi se objasnilo kretanje transformacije ugljovodonika kroz zemljište, potrebno je poznavanje svojstva zemljišta od interesa za transport fluida, ponašanje i kretanje vode i ugljovodonika u zemljištu, odnosno zagađujućih supstanci uopšte, kao i procesa koji se pri tom javljaju.

Voda u zemljištu

Voda je osnovni rastvarač u zemljištu i u principu odgovorna za transport zagađujućih supstanci u zemljištu. Prema tome za razumevanje transporta zagađujućih supstanci kroz zemljište neophodno je poznavanje faktora koji utiču na kretanje vode. Kretanje vode se bitno razlikuje u nezasićenoj zoni zemljišta (vadozna zona), od kretanja u zasićenoj zoni. Stoga će i kretanje zagađujućih supstanci, pokoravajući se zakonima kretanja vode, biti različiti za zasićenu i nezasićenu zonu (Rasulić, 2007).

U nezasićenoj zoni zemljišta razlikuju se tri klase voda u tečnom stanju: *higroskopna voda*, *kapilarna voda* i *slobodna voda*, koje se razlikuju po svom energetsom statusu.

Higroskopna voda je raspoređena po površini čestica zemljišta u tankom sloju od 15 – 20 molekula vode, vezana je adhezionim silama za površinu čvrste faze i ne

uklanja se kompletno prilikom sušenja. Higroskopna voda nije mobilna iako njen sadržaj može da bude od 3 do 16% (vol.) zemljišta. Nemaju svi molekuli vode, koji čine higroskopnu vodu, isti energetski status. Privlačne sile, koje vezuju molekule vode za površinu čestica zemljišta, opadaju sa logaritmom rastojanja od površine čvrste čestice. Sa opadanjem privlačnih sila u sloju vode na čestici zemljišta, raste pokretljivost molekula vode (Rasulić, 2007).

Kapilarana voda takođe egzistira kao film između i oko čestica zemljišta za koje se vezuju adhezionim silama, a kohezionim silama se molekuli vode vezuju međusobno, ali su ove sile znatno slabije u odnosu na iste sile kod higroskopne vode. Zato se kapilarana voda iz zemljišta lakše uklanja sušenjem. Ukupna količina kapilarne vode u zemljištu može da bude od 4 – 18% (vol.) (Rasulić, 2007).

Voda, koja popunjava sav slobodan prostor između čestica zemljišta, iznad sadržaja higroskopne i kapilarne vode i koja može iz nezasićenog zemljišta da se uklanja oticanjem, dejstvom gravitacione sile, naziva se slobodnom vodom. Gravitaciona sila deluje na vodu u zemljištu kao na svako drugo telo i privlači je ka centru zemlje. Ova voda je pokretna i odgovorna za prodiranje zagađujućih supstanci u dubinu zemljišta kroz njegove pore. Migracija vode ne zahteva da pore zemljišta budu potpuno ispunjene vodom. Privlačne sile kojima se slobodna voda vezuje za zemljište su najslabije, što olakšava njeno kretanje. Proces migracije slobodne vode poznat je pod nazivom *protok vodene mase*. Količina slobodne vode u zemljištu može da se kreće od 25 do 35% (vol.) u odnosu na zapreminu zemljišta. U nezasićenoj zoni voda se u principu ne akumulira za duži vremenski period, mada nezasićena zona može da sadrži velike količine vode (Rasulić, 2007).

Zagađujuće supstance

Izvori ugljovodonika, kao zagađujućih supstanci ima svuda. Najznačajniji izvori su naftna i gasna polja, industrijska postrojenja za pripremu nafte i gasa za transport, preradu nafte, proizvodnju maziva, metaloprerađivačka industrija, skladišta sirovina i proizvoda, distributivni centri i benzinske pumpe, servisi i radionice za remont i održavanje vozila, aerodromi, vojne baze, deponije otpadnih ili odloženih materijala sa velikim sadržajem ugljovodonika i otpadne vode. Sve su to potencijalni izvori zagađivanja zemljišta i podzemnih voda ugljovodonicima. Kroz zemljište do podzemnih voda, zagađujuće supstance stižu uglavnom sledećim putevima.

- Ceđenjem iz neobrađenih laguna i jama. Ako su one locirane u zemljištu sa visokim sadržajem gline, onda brzine ceđenja mogu biti oko nule, a u peskovitim zemljištima do 200 cm/dan.
- Spiranjem zagađujućih supstanci sa neodgovarajućih deponija. Spiranjem se rastvaraju i/ili pokreću mnoge organske supstance (svi derivati nafte, benzen i njihovi derivati, različiti rastvarači, hlorovani fenoli), neorganske soli i teški metali i nastavljaju kretanje ka podzemnim vodama.
- Iz neodgovarajućih površinskih i podzemnih deponija. Odlaganje otpada direktno u podzemne vode ili iznad podzemnih voda, u bunare, jame i napuštena rudna okna, može drastično da promeni ili sasvim uništi biljni svet i zagadi površinske vode bujicama.
- Propuštanjem cevovoda, procesne opreme i rezervoara, gde i mala propuštanja, relativno malih količina, ali u dužem vremenskom periodu, mogu da zagade veliku zapreminu zemljišta i podzemnih voda.

- Akcidentima. Akcident može jednostavno da predstavlja drenažu cevovoda za transport ugljovodonika i drugih hemikalija pri zaustavljanju procesa ili pri pripremi opreme za remont, pri propuštanju cevovoda usled nedovoljne kontrole, pri havarijama na cevovodima, opremi i rezervoarima. Ovako ispušteni ugljovodonici i druge hemikalije mogu da dospeju do podzemnih voda preko površine zemljišta i preko pukotina u betonu i asfaltu ili sa površinskim vodenim tokovima koji ih sa ovih površina spiraju na zemljište odakle infiltracijom prodiru u dubinu (*Rasulić, 2007*).

Pošto je voda rastvarač za mnoge zagađujuće supstance, ona ih nosi u obliku rastvora, ako su supstance rastvorene, a nerastvorene nosi u obliku suspenzija, te kretanje vode u principu znači i transport zagađujućih supstanci.

Zagađujuće supstance rastvorene u vodi

Voda se, noseći rastvorene i suspendovane zagađujuće supstance, kreće ka podzemnoj vodi prolazeći kroz nezasićenu do zasićene zone zemljišta. Kretanje kroz nezasićenu zonu, karakterišu isparavanje, transpiracija, infiltracija i perkolacija. Voda, u kojoj su rastvorene zagađujuće supstance, perkolira usled gravitacione sile kroz velike pore u zemljištu i zadržava se u manjim porama dejstvom kapilarnih sila. Brzina perkolacije je funkcija broja i veličine pora u zemljištu ili pornog prostora. Ako ukupna zapremina pora raste, raste i brzina perkolacije. U zavisnosti od veličine pora i njihove distribucije, brzina perkolacije može da iznosi par centimetara na sat ili na godinu (*Rasulić, 2007*).

Fizička i hemijska svojstva vode (gustina, viskoznost, površinski napon, i dr.), ne utiču bitno na brzinu perkolacije, ako je sadržaj zagađujućih supstanci u vodi velik, onda se menjaju svojstva vode i zemljišta, što utiče i na brzinu perkolacije. U vodi su najčešće prisutni katjoni kalcijuma, magnezijuma i natrijuma i njihov uticaja raste sa porastom sadržaja koloidnih čestica u zemljištu. Bubrenje zemljišta, prouzrokovano porastom saliniteta, smanjuje hidrauličku provodljivost. Glineni materijali bubre i šire se na račun pora, čime se smanjuje provodljivost.

Zemljište obično sadrži pore različite površine. Međutim, u zemljištu postoje i slojevi fine gline sa sitnim porama, okruženi grubim peskom sa velikim porama. U takvim slučajevima, slojevi sa malim porama usporavaju brzinu perkolacije. Kad rastvor zagađujućih supstanci dospe do podzemne vode, on nastavlja kretanje u smeru kretanja podzemne vode, formirajući „tok zagađene vode“ ili „struju zagađenog rastvora“ unutar slojeva podzemne vode (*Rasulić, 2007*).

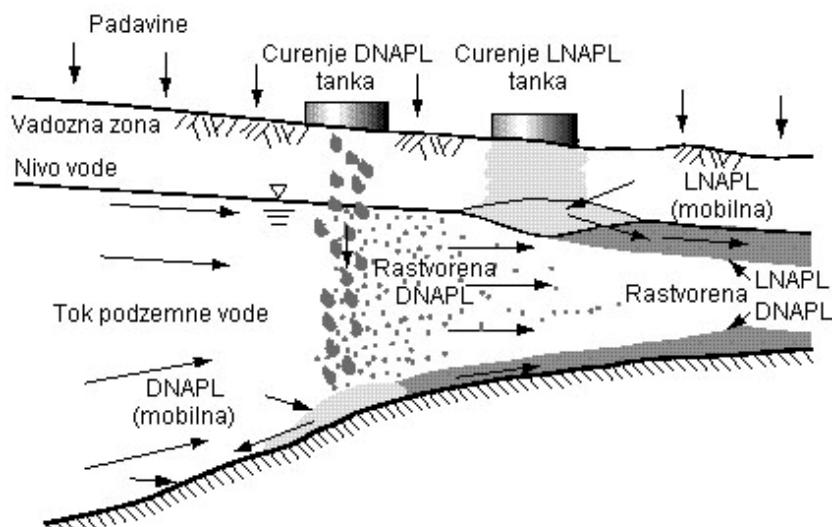
Zagađujuće supstance nerastvorne u vodi i njihovo kretanje kroz zemljište

Nevodenu tečnu fazu (NAPLs – *Nonaqueous Phase Liquids*) čine uglavnom ugljovodonici, koji se javljaju kao zagađujuće supstance nemešljive sa vodom i/ili vazduhom, tako da na mestu zagađenja čine četvrtu fazu. To su obično multikomponente smeše jedinjenja različitih po hemijskom sastavu, rastvorljivosti u vodi i različite gustine. Nevodena tečna faza se najčešće deli na laku nevodenu tečnu fazu (LNAPLs – *Light Nonaqueous Phase Liquids*, uglavnom nafta i njeni derivati) čija je gustina manja od vode i težu (DNAPLs – *Dense Nonaqueous Phase Liquids*, najčešće hlorovani ugljovodonici i policiklični aromatični ugljovodonici) čija je gustina veća od gustine vode.

Slično vodi, nevodena tečna faza ispuštena na površinu zemljišta, prodire kroz površinu putevima sa najmanjim otporom. Ova faza može privremeno da se zadrži na površini šireći se najpre u svim pravcima kao film konstantne debljine, naročito ukoliko zemljište ima veći sadržaj gline i malu propustljivost. Nevodena tečna faza se zatim infiltrira nadole kroz nezasićenu zonu zemljišta pod dejstvom gravitacije i kapilarnih sila uz zasićavanje svih pora na svom putu. Na peskovitim zemljištima infiltracija je uglavnom brza. Viskoznost nevodene tečne faze takođe utiče na brzinu infiltracije: teži ugljovodnici se infiltriraju sporije u odnosu na benzin i kerozin.

Laku tečnu nevodenu fazu, koja je često zagađujuća materija u podzemnim vodama i zemljištu, čine ugljovodnici benzinskih frakcija. Komponente benzinskih frakcija imaju različitu rastvorljivost u vodi. Benzen, tuluen, etilbenzen i ksileni su lako rastvoreni u vodi. Benzin može da sadrži i razne aditive, kod kojih su neki, kao što je metiltercijarnibutiletar, veoma rastvoreni u vodi (Rasulić, 2007).

Na slici 2.1. je prikazan model migracije nevodene tečne faze kroz zemljište. Posle ispuštanja, nevodena tečna faza se kreće vertikalno nadole pod dejstvom gravitacije. Male, ispuštene količine se zadržavaju u porama i pukotinama nezasićene zone. Prilikom infiltracije, voda rastvara ostatke tečne nevodene faze i nosi ih do podzemne vode, formirajući zagađeni tok, koji se kreće zajedno sa podzemnom vodom. Prilikom infiltracije nevodene tečne faze kroz nezasićenu zonu zemljišta se izdvajaju pare isparljivih jedinjenja, koje se kreću pod pravim uglom u odnosu na tok tečnosti kroz slojeve koji imaju veću propustljivost. Ako se radi o većem izvoru tečne nevodene faze, ona infiltracijom stiže do vodenog ogledala podzemne vode, prolazi kroz kapilarni sloj rastvara se u podzemnoj vodi i tok zagađene vode nastavlja da se kreće zajedno sa vodom. Nerastvoreni deo nevodene tečne faze, kao lakši od vode pliva po vodi i kreće se zajedno sa njom razarajući kapilarni sloj (slika 2.1).



Slika 2.1. Kretanje nevodene tečne faze kroz zemljište

Osnovni principi koji se koriste za tumačenje migracije lake nevodene tečne faze u nezasićenoj zoni zemljišta, primenjuju se i na migraciji teške nevodene tečne faze. Teška nevodena tečna faza će se kretati nadole pod dejstvom gravitacionih i kapilarnih sila, rastvarajući se, popunjavajući pore, adsorbivaće se i ispariti, ali kad

dospe do vodene površine podzemne vode, prodreće kroz nju i kretaće se kroz zasićenu zonu dok nestigne do nepropustljivog sloja. Ovde se nevodena faza najpre skuplja, delimično rastvara, a zatim počinje da se kreće prema nagibu nepropustljivog sloja, što ne mora da bude i u smeru kretanja podzemne vode, dok se „tok rastvorene faze“ kreće zajedno sa podzemnom vodom (slika 2.1). Nepropustljivi sloj na koji naiđe nevodena tečna faza može da bude nepropustljiv za vodu, ali za nevodenu tečnu fazu, koja tada može da prođe kroz sloj do sledećeg nepropustljivog sloja koji će je zadržati (Rasulić, 2007).

Prilikom migracije nevodene tečne faze kroz nezasićenu zonu, manji deo ove tečne faze zaostaje vezan kapilarnim silama za čestice zemljišta. Ovaj deo nevodene tečne faze se naziva *zaostalo zasićenje* ili *zaostalo zagađenje*. To je ono zasićenje pri kojem nevodena faza postaje diskontinualna i nepokretna usled dejstva kapilarnih sila. Maksimalna količina koju zemljište može da zadrži naziva se *kapacitet zaostalog zasićenja*. Ovo zasićenje može godinama da ostane u zemljištu. Ako je ispuštena količina nevodene faze relativno mala, onda ukupna količina može da bude zadržana u nezasićenoj zoni i da se zaustavi dalja od migracija na dole (Rasulić, 2007).

Nevodena tečna faza u zemljištu može da egzistira u četiri oblika: kao slobodna nevodena tečna faza, vodeni rastvor, gasovita faza i adsorbovana za čvrste čestice zemljišta ili vodenog sloja. U kojoj fazi, i u kojoj količini će se naći supstance tečne nevodene faze zavisi od: hemijskih osobina supstance, isparljivosti i koeficijenta raspodele (Rasulić, 2007).

Faktori koji utiču na transport zagađujućih supstanci

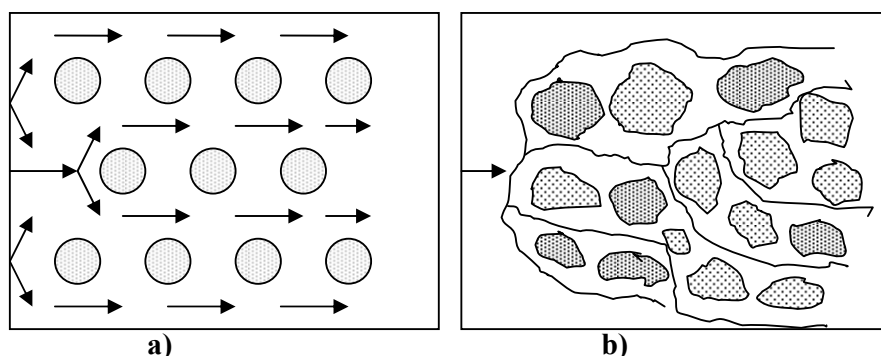
Transport zagađujućih supstanci u zasićenoj zoni zemljišta

Kretanje rastvorenih zagađujućih supstanci u podzemnoj vodi javlja se kad postoji razlika u sadržaju rastvorene supstance kao proces molekularne difuzije – kretanje rastvorenih molekula iz oblasti većeg sadržaja u oblast manjeg, čak i u odsustvu kretanja podzemne vode. Kapljica, ili tok vode sa zagađujućom supstancom, teži da se difuzijom širi u svim pravcima uklanjajući oštru granicu između zagađenog toka i čiste podzemne vode. Drugi proces, koji prouzrokuje širenje zagađenog toka, je disperzija, koja nastaje kada rastvor zagađujuće supstance pri svom kretanju nailazi na čestice zemlje koje predstavljaju prepreku i menjaju smer kretanja rastvora, odnosno razbijaju osnovni tok na više struja. Disperzija zapravo predstavlja proces mešanja zagađene sa čistom vodom, tj. proces razblaživanja i ima efekat turbulencije. Pošto difuzija i disperzija teže da uklone granice između zagađenog toka i čiste podzemne vode, često se povezuju i jednostavno tretiraju zajedno kao hidrodinamička disperzija. Zbog prisustva disperzije, kriva promene sadržaja zagađujuće supstance u funkciji vremena ima S-oblik.

Advekcija je proces kretanja rastvorenih, ali nereaktivnih supstanci u istom smeru i istom prosečnom brzinom kojom se kreće čista podzemna voda. Na slici 2.2 prikazano je kretanje rastvorenih supstanci u podzemnoj vodi procesima advekcije (slika 2.2.a) i disperzije (slika 2.2.b), (Rasulić, 2007).

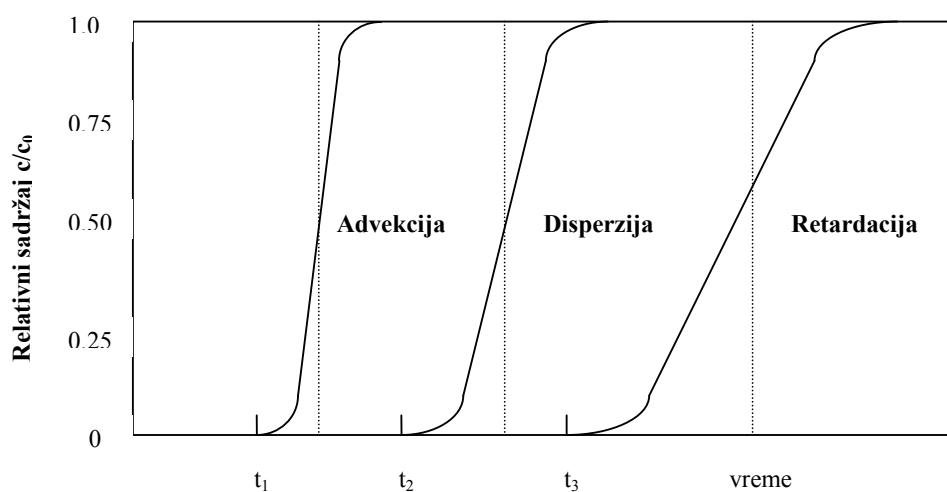
Ako se prati prostiranje zagađujućih supstanci sa podzemnom vodom, od mesta gde je zagađujuća supstanca ušla u podzemnu vodu, i dobijeni rezultati predstave grafički kao promena relativnog sadržaja u funkciji vremena, dobija se kriva predstavljena na slici 2.3. relativan sadržaj pokazuje najpre postepeni, a zatim nagli rast u funkciji vremena i ima oblik S krive. Da nema fizičkih procesa koji utiču

na transport rastvora zagađujućih supstanci u podzemnoj vodi dijagram promene sadržaja u vremenu pokazao bi skokovit porast (tačkasta skokovita promena, slika 2.3.). Na kretanje rastvorenih supstanci u podzemnoj vodi utiču procesi: advekcije, disperzije i retardacije. Dejstvo ovih procesa, promena sadržaja pokazuje postepen porast sa vremenom (advekcija i disperzija). Dejstvom retardacije dobija se slična zavisnost, ali je kriva pomerena ka većim vrednostima u vremenu u dijagramu, zbog zadržavanja zagađujućih supstanci (Rasulić, 2007).



Slika 2.2. Ilustracija kretanja rastvorene supstance u podzemnoj vodi; (a) pod dejstvom advekcije, (b) pod dejstvom disperzije

Ukoliko rastvor podleže hemijskim reakcijama, njegova prosečna brzina može da bude značajno manja od brzine podzemne vode. Usporavanje brzine kretanja rastvora u odnosu na kretanje čiste podzemne vode usled hemijskih reakcija, naziva se *retardacija*. Ove hemijske reakcije uključuju taloženje, adsorpciju, jonsku izmenu, kao i raspodelu zagađujuće organske supstance između organske materije zemljišta i rastvarača.



Slika 2.3. Promena sadržaja zagađujuće supstance u vodi u funkciji vremena

Transport zagađujućih supstanci u nezasićenoj zoni

Nezasićena zona često sadrži veću količinu organske materije i oksida metala, nego zasićena zona. Zagađujuće supstance mogu da se adsorpcijom vežu za ove supstance i tad je njihova brzina kretanja znatno manja nego u zasićenoj zoni. Aktivnost mikroorganizama u nezasićenoj zoni je obično znatno veća nego ispod vodenog ogledala, a u isto vreme ona predstavlja put za izdvajanje gasova i isparljivih organskih supstanci iz zasićene zone. Ova svojstva nezasićene zone mogu da budu značajna za transport zagađujućih supstanci kroz nju.

Transport zagađujućih supstanci u gasovitoj fazi

Transport gasova i zagađujućih supstanci kroz nezasićenu zonu može da bude od velikog značaja za neke konkretne lokalitete. Neke organske supstance rastvorene u vodi, mogu se u skladu sa Henrijevim zakonom da ispare iz tečne i da pređu u gasovitu fazu koja se kreće kroz nezasićenu zonu i da difunduju u atmosferu. Na kretanje ovih gasova utiču procesi difuzije i advekcije, pri čemu je značaj difuzije mnogo veći. Ovome doprinosi veliki difuzioni koeficijent gasova (10^{-5} m²/s) u odnosu na difuzioni koeficijent rastvora zagađujućih supstanci (10^{-9} m²/s) (Rasulić, 2007).

Neka isparljiva organska jedinjenja mogu da povećaju gustinu gasovite faze, tako da se ovakve gasne smeše kreću ka zasićenoj zoni i zadržavaju se iznad kapilarnog sloja. Pored fizičkih procesa, gasovi koji se transportuju podležu i hemijskim procesima, posebno adsorpciji i biodegradaciji, kojima može da se smanji sadržaj gasova ispod granice detekcije.

Transport nevodene tečne faze

Ponašanje ove faze u prirodi, a posebno u zemljištu, je vrlo interesantno zbog njihove postojanosti i mogućnosti da zagade velike količine podzemnih voda i voda uopšte. Kad se tečna nevodena faza kreće kroz geološku formaciju ona u njoj može da zameni vodu i vazduh. Voda u ovakvom sistemu predstavlja kvaseću fazu te se povlači prevlačeći površine zrna i pora. Nevodena faza, kao hidrofobna, teži da se kreće kroz centrlani deo pora, ni jedna od ovih faza, ni voda, ni nevodena faza, ne popunjavaju potpuno pore. Zbog toga je propustljivost sloja različita u odnosu na isti sloj čije su pore popunjene kompletno jednom od ovih faza.

Relativna propustljivost za nevodenu tečnu fazu ponaša se na sličan način. Pri 100% zasićenju nevodenu tečnom fazom relativna propustljivost je 1, a sa opadanjem procenta zasićenja opada i relativna propustljivost. Kada se količina tečne nevodene faze svede na nepokretan ostatak, zaostalo zasićenje (S_m), relativna propustljivost za ovu fazu je 0. Sa aspekta remedijacije, ova zaostala, nepokretna, nevodena tečna faza se veoma teško uklanja iz pora izuzev rastvaranjem u vodi prilikom njenog proticanja, sa kojom rastvorene supstance dospevaju do podzemne vode. Zato tečna nevodena faza, kad uđe u podpovršinski sloj zemljišta, može u njemu da se zadrži decenijama, da dugo predstavlja izvor zagađivanja i može da zagadi velike količine podzemne vode (Rasulić, 2007).

2.1.6. Toksično delovanje nafte

Mnoge sirovine, proizvodi i otpadni tokovi iz svih delatnosti naftne industrije mogu potencijalno da utiču na životnu sredinu. Da li će uopšte imati uticaj, ili u kolikoj meri taj uticaj može da ugrozi životnu sredinu, zavisi od vrste supstance, njene

količine i sadržaja pri ispuštanju, kao i od biotičke zajednice koja je izložena ovom dejstvu. Ugljovodonici iz nafte se lancem ishrane prenose na sve organizme nezavisno od načina njihovog dospevanja u životnu sredinu. Posebno značajni u pogledu toksičnosti su hlorovani, aromatični i policiklični aromatični ugljovodonici (Harvey, 1991, 1997; Cerniglia, 1992).

Kada se govori o opasnosti, kojoj su živi organizmi, a posebno ljudi, izloženi u dodiru sa opasnom supstancom, najčešće se misli na opasnost koju predstavlja njena toksičnost. Živi organizam je sastavljen od ćelija u kojima se, da bi živelo i da bi obavljale svoje funkcije, odvija veliki broj hemijskih reakcija. Strana supstanca uneta u ćeliju može da smeta jednoj ili većem broju reakcija, što dovodi do smetnji u funkcijama ćelije.

Izvedena su brojna ispitivanja uticaja sirove nafte na ekosisteme kao celine, na život i rast biljaka i na čoveka. Rezultati ovih ispitivanja nisu jednoznačno pokazali da dugotrajno izlaganje dejstvu ugljovodonika utiče na produktivnost ekosistema. Samo neki od rezultata ukazuju da ispušteni u prirodu, ugljovodonici utiču na ekosisteme. Ali svi ispitani slučajevi pokazuju da se po uklanjanju ugljovodonika ekosistem regeneriše, iako proces uklanjanja može da traje i nekoliko godina. Međutim, registrovana je akumulacija ugljovodonika u nekim životinjskim vrstama (Rasulić, 2007).

Ugljovodonici, ispušteni na zemlju prodiru i rizosferu gde se nalazi korenov sistem biljaka i deluju na njih. Već nekoliko procenata ovih jedinjenja u zemljištu sprečava rast biljaka. Veoma je značajan uticaj ugljovodonika na mikrofaunu. Međutim, ovaj efekat se gubi posle nekoliko meseci, ukoliko se ukloni izvor ispuštanja ugljovodonika. Oslobođeni ugljovodonici pri erupcijama na bušotinama, česta prosipanja na velikim skladištima nafte i derivata, ili u rafinerijama, prouzrokuju dugoročnije usporavanje rasta četinarskih šuma u krugu od 2 km oko izvora zagađivanja (Rasulić, 2007).

Sirova nafta sadrži stotine različitih tipova molekula ugljovodonika. Toksičnost i potencijalni uticaj na životnu sredinu različitih molekula je vrlo različit. Izveden je čitav niz bioloških testova da bi se odredila toksičnost različitih ugljovodonika, proizvoda i otpadnih tokova nafte idustrije na biljni i životinjski svet, kao i na čoveka. Rezultati ispitivanja na morskim životinjama su pokazali da se različiti ugljovodonici ponašaju različito i da neke generalizacije teško da mogu da se izvedu. Ipak uočeno je da na toksičnost utiče molska masa, pripadnost određenoj grupi ugljovodonika, vrsta organizma koji su izloženi dejstvu ugljovodonika i životni ciklus u kojem se nalazi organizam izložen dejstvu ugljovodonika (jaje, larva, mlad organizam, zrelo doba), (Rasulić, 2007).

Za ugljovodonike koji pripadaju istoj grupi, toksičnost pokazuje tendenciju porasta sa smanjenjem molske mase. Lakše sirove nafte ili produkti rafinacije dobijeni iz nje su toksičniji od težih sirovih nafti odgovarajućih derivata, jer ove druge imaju veću prosečnu molsku masu. Kod ugljovodonika slične molske mase, toksičnost se razlikuje za različite grupe ugljovodonika. Toksičnost raste u nizu: alkani, alkeni, cikloalkani, aromati i policiklični aromatični ugljovodonici (Rasulić, 2007).

Najtoksičniji ugljovodonici su aromati sa niskom temperaturom ključanja, posebno benzen, toluen, etilbenzeni ksileni (BTEX). Ovi ugljovodonici u isto vreme pokazuju najveću rastvorljivost u vodi. Velika rastvorljivost čini molekule ovih jedinjenja lako dostupnim biljkama i životinjama. Uticaj ugljovodonika zavisi od oblika u kojem se nalazi – da li su oni rastvoreni u vodi, dispergovani u njoj ili su u suspenziji (Marković et al., 1996).

Toksičnost ugljovodonika zavisi od organizma na koji deluje. Mnogi faktori mogu da utiču na toksičnost, od kojih je jedan i zdravstveno stanje organizma. Ako je organizam u stanju stresa, onda je toksičnost ugljovodonika veća. Salinitet vode, povišena ili snižena temperatura, višak ili nedostatak hrane mogu da dovedu morske organizme u stanje stresa. Tako toksičnost može da bude dva puta veća u morskoj, nego u slatkoj vodi, da raste sa smanjenjem temperature i da se znatno menja u prisustvu drugih toksičnih supstanci zbog sinergističkog efekta. Dopušteni sadržaj sirove nafte u vodi je različit za različite organizme i kreće se u granicama od 0,01 do 5 mg/l (*Rasulić, 2007*).

Uticaj ugljovodonika na zdravlje čoveka zavisi od načina njihovog unošenja u organizam: oralno, udisanjem ili u kontaktu sa kožom, kao i vremena izlaganja, koje može biti kratkotrajno ili dugotrajno. Akutni efekat oralnog unošenja ugljovodonika može da bude iritacija sluzokože usta, ždrela, želuca i creva i poremećaj ili oštećenje digestivnog trakta. Hronično izlaganje dejstvu ugljovodonika prouzrokuje oštećenje bubrega, jetre, aritmije srca. Dugotrajno ili često ponavljano izlaganje aromatima, naročito benzenu, može da prouzrokuje promene u krvi, uključujući i leukemiju. Neki aromatični ugljovodonici, čak relativno manje toksični, u organizmu podlažu promenama pri čemu nastaju produkti koji imaju mutageni ili kancerogeni efekat na čoveka. Dejstvo policikličnih aromatičnih ugljovodonika povezuje se sa karcinomom kože i pluća (*Marković et al., 1996; Rasulić, 2007*).

Pare zasićenih ugljovodonika deluje nadražujuće na sluzokožu, a pri većim koncentracijama deluju kao blagi anestetici. Jedinjenja sa većom molskom masom prouzrokuju depresivna stanja, neuroze ili iritiraju razne organe i kožu (pentan, heksan, oktan, nonan). Ugljovodonici sa više od 10 ugljenikovih atoma iritiraju kožu i prouzrokuju dermatitis pri produženom ili intenzivnom kontaktu (kada je izložena površina veća). Simptomi trovanja su mučnina, povraćanje, kašalj, nadražaj pluća, ošamućenost, koma i smrt. Najteži oblici trovanja se javljaju pri unosu od 1-2 ml ugljovodonika/kg telesne mase. Dugotrajna izloženost heptanu i heksanu dovodi do pojave polineuropatije (*Rasulić, 2007*).

Alkeni pokazuju u principu ista svojstva kao i alkani, ali imaju jače izraženo dejstvo za jedinjenja sa istim brojem ugljovodonikovih atoma. Tako je etilen jači anestetik od etena, hepten i heksen od heptana i heksana. Cikloalkani pokazuju slična svojstva kao i alkani. Aromatični ugljovodonici pokazuju veći uticaj na čoveka u poređenju sa alifatičnim ili alicikličnim ugljovodonicima iste ili slične molske mase. Odmašćujući kožu oni prouzrokuju najpre dermatitis, i sa produženim dejstvom i hemijske opekotine. Udisanjem dovode do edema pluća i hemijskih oštećenja pluća. Kad su apsorbirani, započinje njihova cirkulacija kroz organizam. Benzen utiče na promene u mišićnom tkivu i u organima u kojima nastaju krvna zrnca (kičmena moždina). Hronično izlaganje smanjuje broj crvenih krvnih zrnaca za 50% ali se takođe snižava broj belih krvnih zrnaca, što često dovodi do specifičnog oblika leukemije. Benzen se svrstava u kancerogene supstance čiji je efekat dokazan (*Rasulić, 2007*).

Mnogi policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) su svrstani u liste supstanci za koje se predpostavlja da su kancerogene za čoveka. U toku procesa razgradnje nekih od njih, nastaju produkti koji reaguju sa DNK i koji su kancerogeni i mutageni. Za ova jedinjenja karakteristična je i njihova akumulacija u organizmu, odnosno u pojedinim organima. Pri većim dozama su toksični i dovode do degenerativnih oštećenja bubrega i jetre. Američka agencija za zaštitu životne sredine (*United States Environmental Protection Agency; US EPA*) i Evropska unija (*European Union; EU*) su odlučili da se određenih 16 PAH nađu na listi prioritarnih

polutanata, a to su: *naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, benzo[a]antracen, krizen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]perilen i indeno[1,2,3-cd]piren* (Kornmüller i Wiesmann, 1999; Keith i Telliard, 1979).

Najtoksičniji PAH je *benzo[a]piren* (3,4-benzopiren). Nastaje nepotpunim sagorevanjem drveta i fosilnih goriva. U ogranizam čoveka pored ostalih izvora dospeva i preko životnih namirnica u koje ulazi iz zemljišta, vode, vazduha, ambalaže, tokom prerade i pripreme hrane kao i sintezom u namirnicama (Marković *et.al.*, 1996).

Posebno su interesantni rezultati Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC) u vezi ugljovodonika. Prema rezultatima ove agencije krajem osamdesetih godina, sirova nafta i mlazna goriva nisu svrstana u kancerogene materije. Sličan zaključak bio je i za bitumen pri uobičajenim uslovima rukovanja ovim proizvodom. Postojalo je dovoljno dokaza da laki i teški vakuum destilat, laki i teški destilat iz katalitičkog krekinga i ostatak iz vakuum destilacije utiču na pojavu raka kod životinja, ali nije moglo pouzdano tvrditi da oni imaju isti efekat kod čoveka, bar ne u istoj meri. Međutim postojalo je dovoljno dokaza da se tvrdi da benzen i netretirana ili blago tretirana mineralna ulja imaju kancerogeni efekat i na čoveka.

Novija ispitivanja iste agencije (krajem XX veka) proširila su liste kancerogenih supstanci za čoveka na korišćenja i nova mineralna ulja, a na listi potencijalnih uzročnika raka svrstani su benzo(a)antracen, benzopiren, izduvni gasovi motora sa unutrašnjim sagorevanjem na dizel gorivo, acetaldehid kao i bitumeni, dizel gorivo, lož ulja i benzini.

Teški metali kao što su hrom, kobalt, bakar, gvožđe, mangan, molibden, nikl, vanadijum i cink, kao i jod, selen i silicijum, pri vrlo malim sadržajima imaju veoma velik značaj na osnovne aktivnosti živih ćelija. Pri velikim sadržajima ti isti elementi mogu biti toksični. Njihovo dejstvo se manifestuje kroz reakciju sa enzimima, čime onemogućavaju normalni biohemijski procesi u ćeliji životinja i čoveka. To prouzrokuje oštećenje jetre, bubrega, utiče na reproduktivnost, formiranje krvi i na nervni sistem (Rasulić, 2007).

2.2. Tehnike uklanjanja naftnih zagađujućih materija iz zemljišta – remedijacija zemljišta

Postoji više podela remedijacionih tehnika ali se one grubo mogu podeliti na *in situ* i *ex situ* tehnike. *In situ* remedijacione tehnike ne zahtevaju eskavaciju zemljišta, ovoj grupi pripadaju tehnike kao što su spontana bioremedijacija (pasivna remedijacija), produvanje vazduha (*air sparging*), pasivni/reaktivni tretman u bunarima, produvanje vazduha uz dodatak nutrijenata (*biosparging*), bioprovetravanje (*bioventing*), ispiranje zemljišta, fitoremedijacija. Za razliku od *in situ*, *ex situ* tehnika zahteva eskavaciju kontaminiranog zemljišta, u ovu grupu tehnika spadaju: vakum ekstrakcija, ispumpaj i tretiraj tehnika, obrada zemljišta (*landfarming*), primena biogomila, pranje zemljišta itd. (Li *et al.*, 2004).

Preciznije se remedijacione tehnike mogu podeliti u tri grupe prema procesima na kojima se zasnivaju:

1. **Prvu grupu** čine tehnike koje podrazumevaju prevođenje zagađujuće supstance u čvrsto stanje, njenu stabilizaciju i sve potrebne procese da se izbegne širenje

- površine zahvaćene zagađivačem kao što je na primer naftna mrlja. U ovu grupu se ubrajaju tehnike kao što su: asfaltna obrada, vitrifikacija, postavljanje nepokretnih reaktivnih barijera, postavljanje prekrivača i slabo propusnih zidova i dr.
- 2. Drugu grupu** čine metode i tehnike koje obuhvataju separaciju zagađivača od kontaminiranog medijuma, njihovu mobilizaciju i ekstrakciju. U ovu grupu spadaju: ispiranje zemljišta, pranje zemljišta, crpljenje nevodnog sloja tečnosti, vakum ekstrakcija, ispumpaj i tretiraj tehnika, produvanje vazduha, produvanje pare, termalna desorpcija i dr.
 - 3. Treću grupu** metoda čine one koje koriste biološke procese ili hemijske reakcije za uklanjanje zagađenja i to putem njihove degradacije ili transformacije. Tehnike zasnovane na hemijskim reakcijama su: oksidacija, incineracija, barijera od elementarnog gvožđa, termalna redukcija i dr. Tehnike zasnovane na biološkim reakcijama su spontana bioremedijacija, bioremedijacija u suspenziji, biostabilizacija, bioprovetravanje i bioproduvanje, postavljanje reaktivnih nepokretnih barijera, kompostiranje, površinska obrada zemljišta, fitoremedijacija, primena biogomila i dr. (*Dalmacija et al., 2004*).

Prva grupa - prevođenje zagađujuće supstance u čvrsto stanje

Solidifikacija/stabilizacija

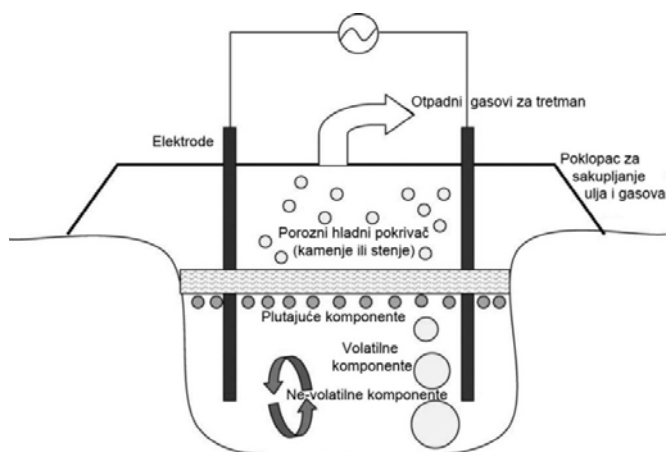
Solidifikacija/stabilizacija je tehnika koja koristi fizičke i hemijske metode za fiksaciju otpadnog materijala, redukciju mobilnosti hazardnih i zagađujućih supstanci u životnoj sredini (*Sherwood i Qualls, 2001; Malviya i Chaudhary, 2006b*). Stabilizacija je zapravo proces konvertovanja hazardnih supstanci i zagađujućih materija u manje rastvorne, manje mobilne i manje toksične forme, čime se smanjuje rizik od zagađenja životne sredine. Reakcije taloženja zagađujućih komponenti podešavanjem pH (za remedijaciju zemljišta zagađenog metalima) ili dodatka drugih hemikalija (npr., kreča za taloženje anjona) se uglavnom koriste za ovu tehniku remedijacije (*Batchelor, 2006*). Solidifikacija je proces kapsuliranja otpadnih materijala u čvrste materijale visokog strukturnog integriteta (*Batchelor, 2006*). Solidifikacija organskog i neorganskog otpada postiže se dodatkom industrijskih nusprodukata kao što su leteći pepeo, kreč i portland cement, ili kombinacije ovih materijala (*Hassan et al., 2005*). *In situ* i *ex situ* solidifikacija/stabilizacija se obično primenjuje za zemljišta zagađena teškim metalima, neorganskim jedinjenjima (*Camacho i Munson, 2006; Malviya i Chaudhary, 2006a*) i radioaktivnim jedinjenjima (*Shi i Jimenez, 2006*). Od svih postojećih solidifikaciono/stabilizacionih tehnika za remedijaciju zemljišta zagađenog organskim jedinjenjima i pesticidima najefikasnije su asfaltiranje i vitrifikacija, tokom kojih dolazi do degradacije većine prisutnih organskih zagađujućih materija. Nakon završetka solidaciono/stabilizacionog procesa potreban je dugoročni monitoring da bi se utvrdilo da su kontaminanti imobilisani, naime organski kontaminanti se mogu imobilisati samo pri izuzetno visokim temperaturama u suprotnom može doći do njihove migracije i do značajnog porasta zapremine zagađenja (*Khan et al., 2004*).

Asfaltiranje je *ex-situ* solidifikacioni/stabilizacioni metod za remedijaciju zemljišta zagađenog ugljovodonicima i teškim metalima. Proces podrazumeva inkorporaciju naftom zagađenog zemljišta u vruću asfaltu smešu kao deo zemene za samlevene kamene agregate, nastala smeša se najčešće koristiti za pokrivanje puteva.

Na osnovu brojnih istraživanja pokazano je da se kvalitet ovako dobijenog asfalta ne razlikuje standardnog asfalta (Taha et al., 2004; Hassan et al., 2005). Zagađeno zemljište se pre asfaltiranja može podvrci termalnom predtretmanu u cilju uklanjanja volatilnih organskih jedinjenja koja se oslobađaju tokom inkorporacionog procesa zbog zagrevanja smeše. Preostale komponente se inkorporiraju u asfaltnu smešu tokom hlađenja, čime se samnjuje njihova mobilnost. Nakon dovoljnog vremena hlađenja, rezultujući čvrsti asfalt ima uniformno raspoređene zagađujuće komponente i nepropusan je za vodu (Khan et al., 2004; Hassan et al., 2005).

Vitrifikacija je solidifikaciono/stabilizacioni metod koji koristi velike količine energije za topljenje zemljišta ili drugih zemljanih materijala na ekstremno visokim temperaturama (1600-1200°C). Prilikom zagrevanja u procesu pirolize dolazi do degradacije organskih komponenti imobilizacije većine neorganskih komponenti. Tokom procesa vitrifikacije dolazi do redukcije zapremine zagađenog zemljišta za oko 20-40%, prilikom ovog procesa većina zagađujućih materija inicijalno prisutnih u zemljištu isparava, dok se ostatak prevodi u hemijski inertni, staklasti i kristalni produkt čime se postiže redukcija njihove toksičnosti i mobilnosti (Hamby, 1996). Vitrifikacija je tehnika koja se efikasno primenjuje za remedijaciju zemljišta zagađenog organskim jedinjenjima, teškim metalima i radioaktivnim jedinjenjima. Tehnika je takođe efikasna za sve tipove zemljišta, a može se primeniti i za remedijaciju voda (Hamby, 1996; Dermatas i Meng, 2003; Ju i Jou, 2006). Postoje tri osnovna načina vitrifikacije:

1. *Električni proces: in situ* aplikacija električne energije preko grafitnih elektroda insertovanih u zemlju (slika 2.4)
2. *Termalni proces:* zahteva spoljašnji izvor toplote i tipičan reaktor
3. *Plazma proces:* mogu se očekivati temperature preko 5000°C usled električnog pražnjenja (Khan et al., 2004).



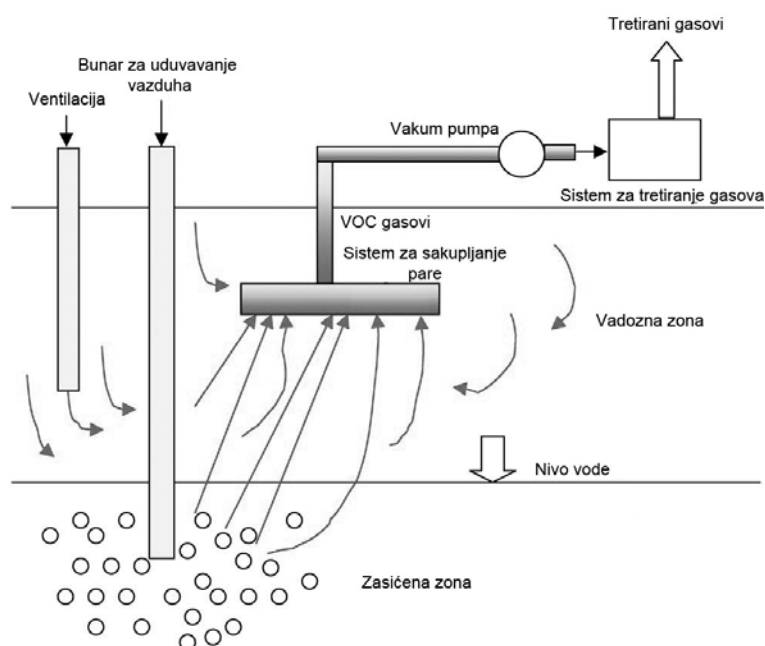
Slika 2.4. Šematski prikaz procesa vitrifikacije (Khan et al., 2004)

Druga grupa - separacija zagađivača od kontaminiranog medijuma

Vakum ekstrakcija (Soil vapour extraction)

Vakum ekstrakcija (*Soil vapor*) - SVE poznata još pod nazivom provetravanje zemljišta, je *in situ* tehnika za remedijaciju nesaturisanog zemljišta kontaminiranog

sa volatilnim i semivolatilnim organskim jedinjenjima (Zhan i Park, 2002; Halmemies et al., 2003; Gidda et al., 2006). SVE obuhvata instaliranje vertikalnih i horizontalnih bunara u području kontaminiranog zemljišta. Vakum se ostvaruje kroz bunare, pri čemu se kroz zemljište stvara negativni gradijent pritiska koji uzrokuje kretanje volatilnih zagađujućih materija kroz ekstrakcione bunare (slika 2.5). Vazduh koji izlazi iz ekstrakcionih bunara sadrži volatilna organska jedinjenja, zbog čega je neophodan njegov tretman pre ispuštanja u atmosferu (USEPA, 1996b; Halmemies et al., 2003).



Slika 2.5. Tipični sistem za vakum ekstrakciju

Kao što je već rečeno SVE je efikasan za uklanjanje volatilnih i semivolatilnih organskih jedinjenja, međutim ova tehnika se može primeniti i za teže frakcije nafte kao što su dizel gorivo, ulja za zagrevanje i kerozin, ali se za uklanjanje ovih zagađujućih materija mora injektovati topao vazduh čime se povećava isparljivost ovih jedinjenja, međutim ovo zahteva veći utrošak energije za zagrevanje vazduha pa se ove zagađujuće materije najčešće uklanjaju alternativnim tehnikama. SVE tehnika nije efikasna za uklanjanje težih frakcija nafte, ali podpomaže njihovu biodegradaciju (USEPA 1995; USEPA, 1998a; Zhan i Park, 2002; Halmemies et al., 2003; Chua et al., 2004).

SVE tehnika ima nekoliko prednosti: oprema potrebna za SVE je dostupna i laka za instaliranje, skoro da ne dolazi do narušavanja životne sredine, vreme tretmana je relativno kratko i kreće se u opsegu od 6 do 24 meseca, lako se može kombinovati sa drugim tehnikama (npr. bioremedijacija i *air sparging*) i može se koristiti za remedijaciju zemljišta ispod zgrada ili drugih objekata bez eskavacije zemljišta. Tehnika ima i nekoiko nedostataka: teško se postiže efikasnost veća od 90%, efikasnost je manja za zemljišta sa malom permeabilnošću, potrebni su dodatne tehnike za tretman otpadnih gasova što poskupljuje ovu tehniku, nije efikasna za

zemljišta sa velikom vlažnošću zbog smanjenog transfera vazduha kroz zemljište (USEPA 1995; USEPA 1996b; Zhan and Park, 2002).

Termalna desorpcija

Termalna desorpcija je nova *ex situ* tehnika koja se sastoji od eskavacije prosejavanja i zagrevanja kontaminiranog zemljišta u cilju uklanjanja naftnih ugljovodonika (USEPA, 1995). Proces termalne desorpcije podrazumeva zagrevanje zemljišta u temperaturnom opsegu od 100-600°C, tokom zagrevanja jedinjenja sa tačkom ključanja u ovom opsegu isparavaju sa zemljišta. Zagađujuće materije koje su prešle u gasovitu fazu se sakupljaju i tretiraju drugim tehnikama (USEPA, 1996d; Dermatas i Meng, 2003). Često dolazi do mešanja pojmova termalne desorpcije i incineracije: cilj termalne desorpcije nije da degradira organske materije već da promeni njihovu formu kako bi se one mogle lakše tretirati, dok incineracija ima za cilj degradaciju organskih komponenti. Na osnovu radne temperature operacionog reaktora termalna desorpcija se može podeliti na termalnu desorpciju na niskim i visokim temperaturama (Khan et al., 2004).

Termalna desorpcija se primenjuje uglavnom za remedijaciju zemljišta zagađenog ugljovodonicima, međutim efikasnost zavisi od tipa prisutnih organskih jedinjenja (USEPA, 1995; Nicholl i Talley, 2006). U pogledu metala tehnika je nefikasna osim u slučaju žive. Ostali metali zaostaju u zemljištu nakon završene termalne desorpcije i potrebno ih je tretirati drugim dostupnim tehnikama. Primenom većih temperatura neki metali mogu preći u gasnu fazu čime se komplikuje tretman organskih komponenti u gasovitoj fazi (Liu et al., 2006). Niskotemperaturna termalna desorpcija se uglavnom koristi za tretiranje volatilnih organskih jedinjenja i različitih goriva, dok se visokotemperaturna desorpcija uglavnom koristi za remedijaciju zemljišta zagađenog sa PAH, PCB i pesticidima (Thurnau, 1996; Kaštanek i Kaštanek, 2005).

Termalna desorpcija u odnosu na druge tehnike ima nekoliko prednosti: efikasnost desorpcije može biti veća od 95%, nije zavisna od prisutne koncentracije zagađujućih materija u zemljištu, nema veliki uticaj na životnu okolinu kao druge tehnike. Međutim i pored navedenih prednosti termalna desorpcija ima i neke nedostatke: nije podjednako efikasna za sve tipove zemljišta, prisustvo vode smanjuje efikasnost (najveći deo prisutne vode isparava), velike količine gline i mulja ometaju proces (vazduh nastao zagrevanjem gline i mulja reaguje sa opremom za tretman otpadnih gasova), gusto upakovana zemljišta ne omogućavaju penetraciju toplote kroz zemljište (USEPA, 1996d).

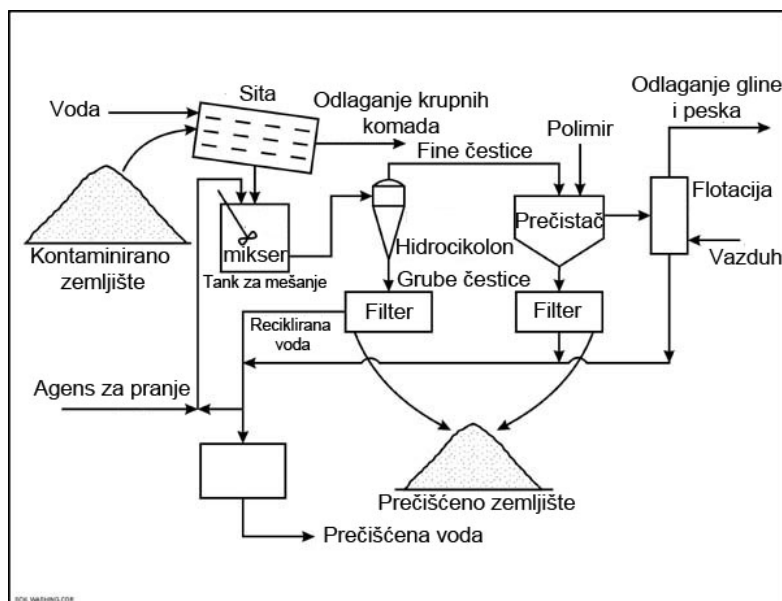
Pranje zemljišta

Pranje zemljišta je *ex situ* tehnika koja koristi kombinaciju tečnosti (obično vode, ili smeše vode i nekog rastvarača) i mehaničkog procesa za remedijaciju zemljišta. Selekcija rastvarača zasniva se na njihovoj sposobnosti da solubilizuju specifične zagađujuće materije, i na njihovom uticaju na zdravlje i životnu sredinu. Često je za kompleksne smeše otpada potrebna kombinacija rastvarača (Feng et al., 2001; Chu i Chan, 2003). Prilikom pranja zemljišta dolazi do separacije finih čestica zemljišta (gline i prašine) od krupnih čestica zemljišta (peska i šljunka). S obzirom da ugljovodonici imaju tendenciju da se vezuju za manje čestice zemljišta kao što su glina i prah, razdvajanje finih od krupnih čestica zemlje dovodi do smanjenja zapremine zagađenog zemljišta. Dobijena manja zapremina zemljišta koja se uglavnom sastoji od gline i praha se dalje može tretirati drugim metodama kao što su incineracija i bioremedijacija, ili se može odlagati na deponije u skladu sa državnim

regulativom. Tehnika pranja zemljišta se obično koristi u kombinaciji sa drugim remedijacionim tehnikama (USEPA, 1996a; Chu i Chan, 2003). Šematski prikaz tehnike pranja zemljišta dat je na slici 2.6.

Pranje zemljišta se koristi za remedijaciju zemljišta zagađenog semivolatilnim organskim jedinjenjima, ostacima nafte i goriva, teškim metalima, PCB, PAH i pesticidima. Tehnika omogućava remedijaciju metala i prečišćavanja zemljišta od širokog opsega organskih i neorganskih zagađujućih materija (Feng et al., 2001; Park et al., 2002).

Organske zagađujuće materije imaju hidrofobne osobine i veliku sposobnost da se čvrsto vezuju za čestice zemljišta (naročito za čestice gline). Da bi se postigla željena efikasnost ove tehnike pranja zemljišta zagađenog organskim materijama se peru rastvorima različitih surfaktanata. Surfaktanti povećavaju rastvorljivost organskih materija na dva načina: (1) Smanjuju površinski napon i kapilarne sile koje zadržavaju rezidue organskih materija u česticama zemljišta. Rezultat ovoga je manja saturacija i veća mobilnost organskih jedinjenja. (2) Surfaktanti imaju osobinu da iznad određene kritične koncentracije (CMC – kritična koncentracija micela) stvaraju micelle, hidrofobni kraj ovih molekula okružuje organske molekule dok se hidrofilni deo orjentiše prema vodi, ova pojava je poznata pod nazivom solubilizacija (Cheah et al., 1998; Mann, 1999). Tokom procesa pranja nastaju određene količine otpadne vode koje se moraju tretirati drugim tehnikama pre njihovog ispuštanja u okolinu, a takođe je potrebna posebna lokacija za odlaganje preostalog zemljišta nakon završenog pranja, obzirom da tokom ovog procesa ne dolazi do degradacije zagađujućih materija (Khan et al., 2004).



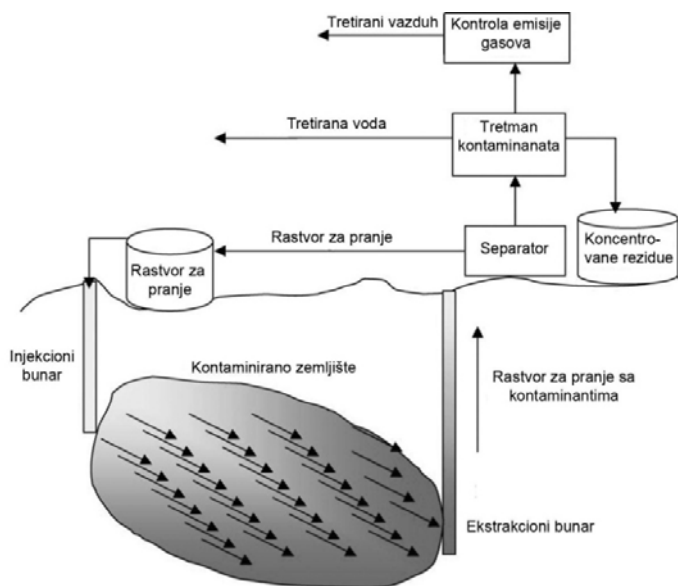
Slika 2.6. Šematski prikaz tehnike pranja zemljišta

Ispiranje zemljišta

Ispiranje zemljišta je nova *in situ* tehnika remedijacije zagađenog zemljišta koja obuhvata transfer zagađujućih materija u tečnu fazu kroz procese desorpcije i solubilizacije (USEPA 1996c; Otterpohl, 2002; Logsdon et al., 2002; Di Palma et al.,

2003). Ispiranje zemljišta se postiže prolaskom ekstrakcionog fluida kroz zemljište injekcionim ili infiltracionim procesom, prilikom ovog procesa dolazi do desorpcije/solubilizacije zagađujućih materija koje se zajedno sa rastvorom za ispiranje odvođe na dalji tretman (slika 2.7), (Otterpohl, 2002). Tehnika ispiranja zemljišta može se koristiti za sve vrste zagađenja zemljišta i najčešće se koristi u konjukciji sa drugim remedijacionim tehnikama, na primer sa bioremedijacijom. Tehnika ispiranja zemljišta koristi iste principe kao i tehnika pranja zemljišta, međutim u slučaju ispiranja zemljišta nije potrebna eskavacija i transport zagađenog zemljišta (Khan et al., 2004).

Tehnika se najčešće koristi za remedijaciju zemljišta zagađenog neorganskim jedinjenjima uključujući i radioaktivne zagađujuće materije, a takođe se može koristiti za trtiranje volatilnih i semivolatilnih organskih jedinjenja, goriva, pesticida, ali je skuplja od alternativnih tehnika za ovu grupu zagađujućih materija. Naime uklanjanje hidrofobnih organskih zagađujućih materija kao i kod tehnike pranja zemljišta zahteva dodatak surfaktanata ili organskih rastvarača da bi se postigla željena efikasnost tretmana što znatno povećava cenu ove tehnike (Logsdon et al. 2002; Alter et al., 2003).



Slika 2.7. Šematski prikaz tehnike ispiranja zemljišta (Khan et al., 2004)

Ispiranje zemljišta se najbolje pokazalo na poroznim, visoko permeabilnim zemljištima sa konduktivitetom većim od $1,0 \times 10^{-3}$ cm/s u odnosu na zemljišta sa malom permeabilnošću i konduktivitetom manjim od $1,0 \times 10^{-3}$ cm/s (Khan et al., 2004). Tehnika ispiranja zemljišta je neefektivna za zemljišta koja sadrže glinu i mulj, zbog toga što rastvor za ispiranje ne može do prođe kroz njih, a samim tim smanjen je kontakt između zagađujućih materija i rastvora za ispiranje (USEPA, 1996c).

Vreme potrebno za remedijaciju je obično dugo, zbog sporog procesa difuzije zagađujućih materija u tečnu fazu. Tehnika zahteva kontrolu podzemnih voda da bi se sprečilo širenje kontaminacije. Za ovu tehniku takođe je potreban dodatan tretman za nastalu otpadnu vodu i vazduh ukoliko se vrši ispiranje volatilnih organskih jedinjenja (Otterpohl, 2002).

Treća grupa - biološki procesi ili hemijske reakcije za uklanjanje zagađenja

Fitoremedijacija

Fitoremedijacija se može definisati kao primena zelenih biljaka za uklanjanje zagađujućih materija i drugih štetnih komponenti iz životne sredine. Važno je napomenuti da je ovo *in situ* tehnika za remedijaciju vode, zemljišta, sedimenta i vazduha. U ovom procesu specijalno odabrane biljke koriste se za ekstrakciju teških metala, radionuklida i toksičnih organskih supstanci iz zemlje i vode. Proces je zasnovan na osobini biljaka da usvajaju, akumuliraju, i/ili degradiraju konstituente prisutne u vodi, zemlji i sedimentu. Za proces fitoremedijacije koriste se različite biljke od višegodišnjih (kao što su topole i vrbe) pa do jednogodišnjih biljaka (kao što su trave, mahunarke i akvatično bilje). Neke biljke poznate su kao hiperakumulatori, zbog sposobnost da skladište velike količine toksičnih metala iako ih ne koriste u svojim metaboličkim procesima, najpoznatiji predstavnici ovih biljaka su suncokret i Indijska slačica (Macek *et al.*, 2000; Vouillamoz i Mike, 2001).

Postoje pet osnovnih tipova fitoremedijacije:

1. Rizofiltracija – tehnika remedijacije vode u kojoj se kontaminanti asimiliraju kroz koren biljke.
2. Fitoekstrakcija – podrazumeva asimiliranje zagađujućih materija iz zemlje.
3. Fitotransformacija – primenjiva je i za zemljište i za vodu podrazumeva degradaciju kontaminanata preko metabolizma biljaka.
4. Fitostimulacija – (bioremedijacija podpomognuta biljkama) podrazumeva stimulaciju mikrobijalne degradacije kroz aktivnost biljke u zoni korena.
5. Fitostabilizacija – koristi biljke za redukciju migracije kontaminacije kroz zemljište (Macek *et al.*, 2000).

Na osnovu brojnih istraživanja na maloj skali pokazano je da fitoremedijacija može biti efikasna za remedijaciju zemljišta zagađenog razilčitim zagađujućim materijama kao što su: teški metali (Arduini *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2006; Zheljaskov *et al.*, 2006); radionuklidi (Eapen *et al.*, 2006; Soudek *et al.*, 2006), hlorovani rastvarači, naftni ugljovodonici, a naročito oni iz grupe PAH i PCB (Escalante *et al.*, 2005; Merkl *et al.*, 2005; Joner *et al.*, 2006), organofosforni insekticidi, eksplozivi i surfaktanti (Pulford i Watson, 2003). Liste i Felgentreu (2006) su pokazali da žitarice mogu veoma uspešno da se koriste za remadijaciju zemljišta zagađenog naftnim ugljovodicima, a naročito sa PAH. Međutim, da bi se fitoremedijacija mogla koristiti u širokim razmerama potrebna su dalja istraživanja i razvoj ove tehnike (USEPA, 1996e; Alkorta i Garbisu, 2001; Rai i Singhal, 2003).

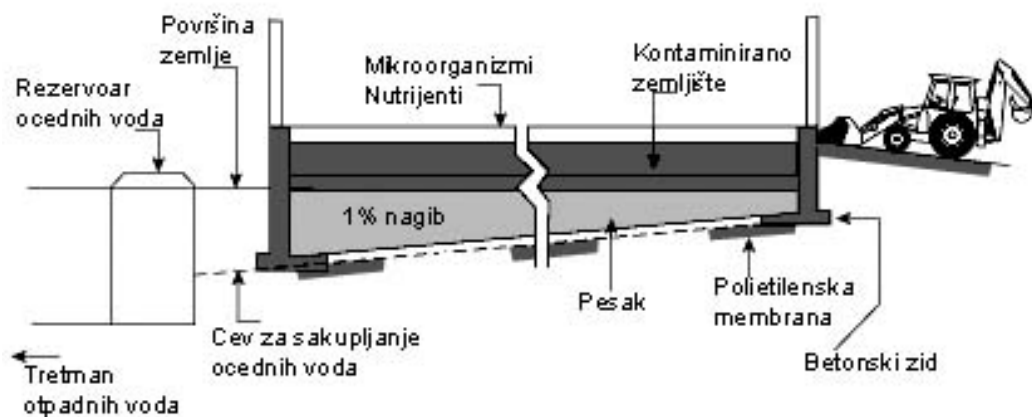
Fitoremedijacija ima nekoliko prednosti: znatno je jeftinija od drugih remedijacionih tehnika, može se postići ista efikasnost kao i kod drugih tehnika, ne dolazi do narušavanja životne sredine, nije potrebna eskavacija i transport zagađenog zemljišta, nastajanje sekundarnog otpada je minimalno, zemljište nakon tretmana može da ostane na tretiranoj lokaciji (nema potrebe za njegovim uklanjanjem ili izolacijom) i može se koristiti u poljoprivredi, koristi solarnu energiju, organski konstituenti sa transformišu u ugljen-dioksid i vodu, a ne u druga toksična jedinjenja, isplativa je za velike površine kontaminacije (sa niskom koncentracijom kontaminanata), asimilacija zagađujućih materija iz podzemne vode smanjuje njihovu migraciju (Alkorta i Garbisu, 2001).

Tehnika fitoremedijacije ima nekoliko nedostataka: remedijacija zehteva duži vremenski period od jedne sezone rasta, klimatski i hidrološki uslovi kao što su suše i poplave mogu ograničiti rast biljaka i vrstu biljaka koje će se koristiti, zagađujuće

materije mogu da uđu u lanac ishrane preko životinja koje se hrane ovim biljkama, zahteva specijalno odlaganje biljaka (Alkorta i Garbisu, 2001).

Površinska obrada zemljišta (Landfarming)

Površinska obrada zemljišta je *ex situ* remedijaciona tehnika koja se koristi širom sveta već 100 godina. Ova tehnika koristi procese bioremedijacije za redukovanje koncentracije naftnih ugljovodonika prisutnih u zemljištu. Tehnika površinske obrade zemljišta podrazumeva rasprostiranje zagađenog zemljišta u tankom sloju iznad površine zemlje i simultanu mikrobiološku aktivnost podstaknutu aeracijom i/ili dodatkom nutrijenata, minerala i vode (slika 2.8.), (USEPA, 1998b; Hejazi et al., 2003). Površinska obrada zemljišta može da bude i *in situ* tehnika ukoliko dubina zagađenog zemljišta nije veća od 1,5 m (USEPA, 1998b). Selekcija mikroorganizama za ovaj proces zasniva se na njihovoj sposobnosti da degradiraju pojedine ugljovodonike. Giasi i Morelli, (2003) dali su pregled vrsta mikrobijalne populacije u zavisnosti od tipa organske supstance koju ovi mikroorganizmi mogu da metabolizuju. Mikroorganizmi kao što su protozoe, bakterije, gljive, alge i aktinomicete obično su prisutne u zemljištu i od njihove količine zavisi efikasnost tretmana, da bi tretman bio efikasan sadržaj mikroorganizama mora biti veći od 2000 CFU/g suvog zemljišta (Atagana, 2004).



Slika 2.8. Šematski prikaz tehnike obrade zemljišta

Tehnika površinske obrade zemljišta se koristi za tretiranje zemljišta zagađenog naftnim derivatima kao što su: volatilne organske komponente (*VOC – volatile organic compound*), benzin, ulja za zagrevanje i podmazivanje itd. (USEPA, 1998b). Lakši naftni derivati uključujući i komponente benzina uglavnom se uklanjaju isparavanjem tokom procesa aeracije, a manji deo se degradira mikroorganizmima (USEPA, 1998b; Hejazi et al., 2003). Za razliku od lakših frakcija, teže frakcije nafte ne isparavaju tokom aeracije već se uglavnom degradiraju mikroorganizmima prisutnim u zemljištu. Ove teže frakcije naftnih konstituenata kao što su ulja za podmazivanje, dizel gorivo i dr. zahtevaju duži vremenski period za degradaciju. Tehnika površinske obrade zemljišta se takođe može primeniti za remedijaciju zemljišta zagađenog sa velikim količinama PAH. Brzina i efikasnost degradacije zavisi od broja prisutnih aromatičnih prstenova - što je broj aromatičnih prstenova

veći efikasnost i brzina degradacije su manji. Efikasnost degradacije PAH zavisi i od njihove biodostupnosti. Naime, ova jedinjenja zbog svoje hidrofobnosti imaju tendenciju da se vezuju za čestice zemljišta, što ova jedinjenja čini nedostupnim za mikroorganizme, zbog čega dolazi do smanjenja efikasnosti tretmana (Guerin, 1999; Picado et al., 2001; Hansen et al., 2004).

Efikasnost tehnika površinske obrade zemljišta zavisi od nekoliko faktora: prisutnih mikroorganizama u zagađenom zemljištu, koncentracije prisutnih zagađujućih materija, pH, vlage, temperature, količine dostupnog kiseonika i količine nutrijenata i minerala.

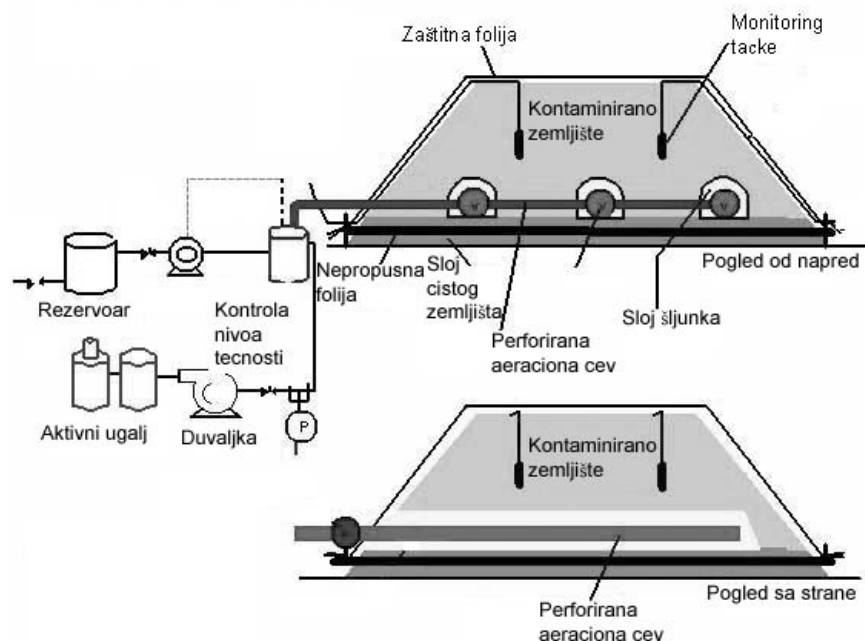
U poređenju sa brojnim drugim bioremedijacionim tehnikama površinska obrada se smatra najekonomičnijom i ima nekoliko prednosti u odnosu na druge tehnike: potrebno je manje vremena i novca za remedijacione operacije, dolazi do kompletne destrukcije zagađujućih materija, pogodna je za tretiranje velikih zapremina kontaminiranog zemljišta (Picado et al., 2001). I pored navedenih prednosti tehnika ima i nekoliko nedostataka: potrebne su velike površine zemljišta, postoji mogućnost migracije kontaminacije u okolinu (iz ovog razloga se zagađeno zemljište postavlja na zaštitnu foliju), (Hejazi et al., 2003), teško je očekivati redukciju koncentracije zagađujućih materija veću od 95%.

Biogomile

Biogomile (biočelije) predstavljaju *ex situ* remedijacionu tehniku koja koristi bioremedijacione procese za redukciju organskih zagađujućih materija prisutnih u zemljištu (USEPA, 1998c; Jorgensen et al., 2000). Proces biodegradacije odvija se kroz simultanu aerobnu mikrobijalnu aktivnost poboljšanu aeracijom, dodatkom minerala, nutrijenata i vlage (USEPA, 1998c; Filler et al., 2001). Konstrukcija biogomila podrazumeva formiranje zagađenog zemljišta u obliku zarubljene kupe (gomile), kroz zemljište se postavljaju perforirane cevi za aeraciju biogomila kao što je prikazano na slici 2.9. U cilju poboljšanja transporta kiseonika i zadržavanja vode zemljištu se može dodati neki kompost materijal kao što je piljevina, seno, kukuruzna kumuša, đubrivo ili druge organske materije. Kompost materijal služi i kao kosubstrat mikroorganizmima tokom razgradnje zagađujućih materija (Laine i Jorgensen, 1997; Kirchmann i Ewnetu, 1998; Jorgensen et al., 2000; Semple et al., 2001). Da bi se sprečilo širenje kontaminacije ispod biogomila se obično postavlja nepropusan materijal kao što je guma ili različite plastične folije. Ovaj nepropusan materijal se može koristiti i za prekrivanje biogomila čime se sprečava isparavanje volatilnih organskih jedinjenja, bolja kontrola vlage u biogomilama i bolje iskorišćenje solarne energije za zagrevanje biogomila. Vreme tretmana je obično kratko, pod optimalnim uslovima tretmana se kreće od 6 meseci do 2 godine (USEPA, 1998c; Jorgensen et al., 2000; Filler et al., 2001).

Biogomile se koriste u cilju remedijacije zemljišta zagađenog naftnim produktima (USEPA, 1998c; Mohn et al., 2001), nehalogenovanim i halogenovanim volatilnim i semivolatilnim organskim jedinjenjima (Laine i Jorgensen, 1997; Waltera et al., 2005) i PAH (Juteau et al., 2005). Lakše frakcije nafte kao što je benzin uglavnom se uklanjaju u procesu aeracije zbog velike količine volatilnih organskih jedinjenja. Srednje frakcije nafte (kao što su dizel ili kerozin) i teže frakcije nafte (kao što su ulja za zagrevanje i podmazivanje) sadrže manje količine volatilnih organskih jedinjenja, i oni se uglavnom uklanjaju procesom biodegradacije. Za srednje i teže frakcije nafte potrebno je duže vreme za biodegradaciju u odnosu na lakše frakcije nafte (USEPA, 1998c).

Efikasnost ovog procesa mnogo zavisi i od karakteristika zagađenog zemljišta kao što su: tekstura, permeabilnost, vlažnost zemljišta i gustina. Zemljišta sa niskom permeabilnošću su obično slepljena i otežavaju distribuciju i transport vlage, nutrijenata i vazduha, zbog neuniformne distribucije biogomile konstruisane od ovakvog zemljišta je potrebno prevrtati i prekopavati da bi se postigli optimalni uslovi za biodegradaciju. Mikroorganizmi zahtevaju određeni sadržaj vlage za njihov rast, međutim prevelika količina vlage može otežati kretanje vazduha potrebnog za mikrobijalan rast u zemljištu (USEPA, 1998c; Khan et al., 2004).



Slika 2.9. Ex situ tretman zagađenog zemljišta u biogomilama

Tehnika biogomila je pogodna zbog toga što se gomile lake za primenu i konstrukciju, mogu se konstruisati tako da odgovaraju različitim uslovima terena. Iz predhodnog teksta može se zaključiti da tehnika biogomila ima mnogo sličnosti sa tehnikom površinske obrade, međutim biogomile imaju nekoliko prednosti u odnosu na površinsku obradu: zauzimaju manje prostora, bolji je transport kiseonika zbog mogućnosti aeracije, moguća je kontrola emisije volatilnih organskih jedinjenja (Anon, 1996; USEPA, 1998c).

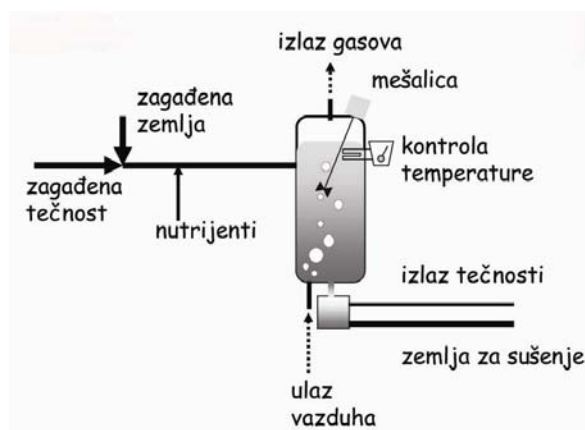
Bioremedijacija u suspenziji

Bioremedijacija u suspenziji je *ex situ* biološki tretman koji zahteva eskavaciju kontaminiranog zemljišta. Proces se izvodi mešanjem zagađenog zemljišta vode, aditiva i mikroorganizama u kontrolisanom bioreaktoru (slika 2.10). Da bi se obezbedio dobar kontakt između zagađenog zemljišta i mikroorganizama, čvrste materije zemljišta se održavaju u suspendovanom stanju. U ovakvom reaktoru biodegradacija se odvija brzo, vreme tretmana se kreće u opsegu od 1 meseca do 6 meseci. (Zhang et al., 2001; Nano i Rota, 2003).

Tretman u bioreaktoru se odvija u tri faze:

1. Faza punjenja - sitnjenje zemljišta (do 2 mm veličine čestica) i odvajanje šljunka i kamenja, pripremanje mulja i punjenje reaktora.
2. Reakciona faza - mešanje i aeracija
3. Faza sušenja - odlaganje i obezvodnjavanje dobijenog mulja (*Nano i Rota, 2003*).

Bioreaktor se uspešno koristi za remedijaciju zemljišta zagađenog naftom i njenim derivatima, nehalogenovanim semivolatilnim i volatilnim organskim jedinjenjima, pesticidima, PAH, PCB i eksplozivima (*Nano i Rota, 2003*). Neka od ovih jedinjenja zahtevaju dodatak specifičnih bakterija ili korišćenje aerobno/anaerobnog reaktora za biodegradaciju (*Zhang et al., 2001; Kuyukina et al., 2003*).



Slika 2.10. Bioremedijacija u suspenziji

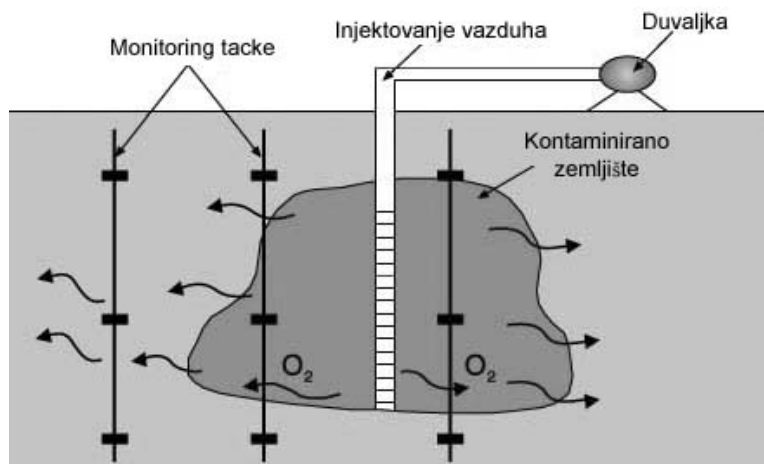
Zbog zatvorenog sistema u bioreaktoru je omogućena kontrola temperature, vlage, pH, kiseonika, nutrijenata, dodatak surfaktanata, dodatak mikroorganizama, monitoring reakcija i uslova, i kontrola emisije volatilnih organskih jedinjenja. Tehnika bioremedijacije u suspenziji je pogodna i kao predtretman tehnike površinske obrade pri remedijaciji zemljišta zagađenog velikim količinama ugljovodonika (<50,0 g/kg zemljišta), (*Kuyukina et al., 2003*). Nedostaci ove tehnike su: potreba za eskavacijom i transportom zagađenog zemljišta, neefikasnost za zemljišta sa velikim sadržajem gline, tokom procesa mogu nastati slobodni gasoviti produkti koji se moraju ukloniti pre ispuštanja u atmosferu, potreba za dodatnim tretmanima za obezvodnjavanje nastalog mulja i tretman nastale otpadne vode što znatno poskupljuje ovu tehniku (*Zhang et al., 2001*).

Bioprovetravanje (Bioventing)

Bioprovetravanje, *in situ* tehnika koja podrazumeva degradaciju prisutnih organskih zagađujućih materija do ugljen-dioksida i vode uz pomoć prirodno prisutnih mikroorganizama na posmatranom lokalitetu. Da bi se stimulisala aerobna mikrobijalna degradacija organskih materija u zagađeno zemljište se injektuje vazduh. Bioprovetravanje podrazumeva injektovanje vazduha u saturisanu i nesaturisanu zonu zemljišta (*USEPA, 1998d; Mihopoulos et al.; 2001, Baker i Moore, 2002*). Jedan tipičan sistem za bioprovetravanje je prikazan na slici 2.11. Tehnika bioprovetravanja

je slična tehnici vakum ekstrakcije (SVE), samo što za razliku od bioprovetravanja, SVE koristi veće protoke vazduha što dovodi do isparavanja volatilnih organskih jedinjenja pa je za ovu tehniku potreban dodatni sistem za tretiranje otpadnih gasova, zbog čega je ova tehnika znatno skuplja od tehnike bioprovetravanja (*Baker i Moore, 2002*).

Tehnika bioprovetravanja se uspešno primenjuje za sve anaerobno degradabilne supstance: volatilna i volatilna organska jedinjenja, PAH, i naftni produkti kao što su benzin, kerozin, dizel i ulja za zagrevanje. Tehnika bioprovetravanja se takođe može koristiti za uklanjanje često upotrebljivanih hemikalikja kao što su: fenoli, alkoholi, ketoni, različiti hlorovani rastvarači i BETX komponente (benzen, toluen, etilbenzen, ksilen). Tehnika bioprovetravanja je najefikasnija za srednje frakcije nafte kao što je dizel pošto lakše frakcije imaju tendenciju da isparavaju pa se zbog toga najčešće uklanjaju i tretiraju u SVE sistemu. Teže frakcije nafte takođe mogu da se uklanjaju ovom tehnikom, ali je za njih potrebno duže vreme biodegradacije. (*USEPA, 1998d; Kao et al., 2001; Baker i Moore, 2002*).



Slika 2.11. Šematski prikaz jednog tipičnog bioventing sistema

Efikasnost tehnika bioprovetravanja zavisi od koncentracije i biodostupnosti zagađujućih organskih materija. Velike koncentracije zagađujućih materija mogu biti toksične za mikroorganizme, dok niske koncentracije zagađujućih materija nisu adekvatne za indukovanje enzimskog procesa. Vreme tretmana se kreće od 6 meseci do 2 godine. Oprema za tehniku bioprovetravanja je dostupna i laka za instaliranje i može se kombinovati sa drugim tehnikama. Zbog malog protoka vazduha oprema za tretiranje otpadnih gasova nije potrebna. Međutim, sa ovom tehnikom se ne mogu postići niske granice prečišćavanja i nije efikasna za zemljišta sa visokim sadržajem gline i malom permeabilnošću (*Diele et al., 2002; Mihopoulos et al., 2002; Khan et al., 2004*).

Selekcija tehnike koja će se primeniti za remedijaciju je jedan od najvažnijih koraka u procesu uklanjanja organskog zagađenja sa određenog lokaliteta. Različite remedijacione tehnike su dostupne za remedijaciju podzemnih voda i zemljišta međutim, nije svaka tehnika odgovarajuća za sve vrste kontaminanata i za svaki tip zemljišta. Izbor remedijacione strategije i tehnike uslovljen je nizom faktora kao što

su: karakteristike lokacije, priroda i izvor zagađujućih materija, potencijalan uticaj na okolinu i dr. Obično se za efikasno uklanjanje zagađenja primenjuje više od jedne tehnike, koje se najčešće kombinuju i povezuju serijski, u liniju procesa.

2.3. Bioremedijacija

Bioremedijacija je kompleksan proces. Biološka degradacija se obavlja u ćelijama mikroorganizama, koji resorbuju neki zagađivač, pa u slučaju da poseduju odgovarajuće enzime dolazi do razgradnje zagađujuće supstance u odgovarajuće metabolite. Ugljovodonici iz nafte služe kao izvor nutrijenata i energije za rast i razvoj mikroorganizama, koji ih razgrađuju do naftenskih kiselina, alkohola, fenola, hidroperoksida, karbonilnih jedinjenja (aldehida i ketona), estara i na kraju do ugljenik-dioksida i vode (Eglinnton, 1975; Marković et al., 1996).

Bioremedijacija se može podeliti na dva osnovna tipa: (1) Prirodnu bioremedijaciju (*eng. natural attenuation*), koja se primenjuje kada su prirodni uslovi pogodni za odvijanje bioremedijacije bez ljudske intervencije, i (2) Tehničku bioremedijaciju (*eng. engineered*), koja se primenjuje kada je potrebno dodavati materije koje stimulišu mikroorganizme.

Prirodna bioremedijacija podrazumeva redukciju koncentracije zagađenja prirodnim procesima. Za opis prirodne bioremedijacije koriste se i termini “pasivno uklanjanje” (*eng. passive*) i “spontana” (*eng. intrinsic*) bioremedijacija. Prirodna bioremedijacija se primenjuje kada je prirodni stepen biodegradacije zagađenja brži od stepena migracije zagađenja. Ovaj relativni odnos zavisi od tipa i koncentracije zagađenja, mikrobiološke zajednice i hidrogeohemijskih karakteristika zemljišta. Ona se uglavnom koristi za čišćenje akvifera gde je uklonjen izvor zagađenja, mada se može takođe koristiti kada je izvor i dalje prisutan ili ako su uklonjene neke opasne tačke. Prirodno uklanjanje zagađenja može biti posledica destruktivnih (aerobna i anaerobna biodegradacija, abiotička oksidacija, hidroliza) i nedestruktivnih (sorpcija, razblaženje (disperzija i infiltracija), volatilizacija) procesa (Sara, 2003). Prednosti prirodnog uklanjanja su niži troškovi čišćenja i minimalno narušavanje pejzaža. Nedostaci su nemogućnost uklanjanja visokih koncentracija zagađenja, može doći do migracije zagađenja, vreme razgradnje težih frakcija je dugo, ne može se uvek postići ciljna vrednost koncentracije zagađenja za razumno vreme, uslovi na lokalitetu mogu biti nepovoljni, potreban je dugotrajan monitoring. Da bi prirodna bioremedijacija bila favorizovana potrebni su sledeći uslovi: stalan protok podzemne vode, prisustvo minerala koji štite da ne dođe do promene pH sredine, prisustvo visokih koncentracija kiseonika, nitrata, sulfata, gvožđa(III) itd (CISB, 1993).

Prirodna bioremedijacija se oslanja na prirodne sposobnosti prisutnih mikrobioloških zajednica. Sposobnost prirodnih mikroorganizama da izvedu pasivnu bioremedijaciju mora biti dokazana laboratorijskim testovima sprovedenim na specifičnom zemljištu. Ti testovi moraju biti izvedeni pre uspostavljanja prirodne bioremedijacije, da bi je mogli prihvatiti kao legitimnu tehniku čišćenja. Dodatno, efikasnost prirodne bioremedijacije mora biti dokazana terenskim monitoringom koji uključuje hemijske analize zagađenja, krajnjih elektron-donora i/ili drugih reaktanata ili produkata karakterističnih za biodegradacioni proces. Prirodna bioremedijacija može se koristiti sama ili u konjukciji sa drugim remedijacionim tehnikama. Na primer, zemljište može biti iskopano zbog odlaganja ili tretmana putem pasivne bioremedijacije radi uklanjanja rezidualnog zagađenja. Slično, ovaj proces može se

primeniti nakon “ispumpaj-i-tretiraj” tehnike ili nakon tehničke bioremedijacije radi sprečavanja migracije zagađenja sa datog lokaliteta.

Primarno kod primene prirodne bioremedijacije je da zemljište mora biti u potpunosti ispitano. Parametri na koje treba obratiti pažnju su: tip, količina i distribucija zagađenja, podložnost zagađenja biodegradaciji mikroorganizmima iz zemljišta, tok podzemne vode kada se ne vrši crpljenje (uključujući sezonske fluktuacije), vremenski period migracije mrlje i bliskost i osetljivost potencijalnih receptora, koji mogu biti štetni ako dođu u kontakt sa zagađenjem. Ako su nam informacije o svim navedenim parametrima dostupne, možemo upotrebiti matematički model da bi smo odredili odnos migracije i biodegradacije. Ključne karakteristike zemljišta pogodnog za spontanu bioremedijaciju: stalan tok podzemne vode (brzina i pravac) kroz sezone, prisustvo karbonatnih minerala (krečnjak, dolomit, ljuštore, školjke) za puferovanje pH, visoke koncentracije elektron-akceptora kao kiseonika, nitrata, sulfata, gvožđe(III)-jona, prisustvo nutrijenata (azot i fosfor).

Prirodna bioremedijacija može da se primenjuje kao samostalna tehnika, ili da se kombinuje sa drugim tehnikama (*Brown et al., 1994*). Iako postoje različite procedure za sprovođenje prirodne bioremedijacije, nije propisana standardna procedura koja bi obuhvatila koji sve parametri treba da se prate, kojom frekvencijom i na kom mestu (*Mulligan i Yong, 2004*).

Tehnička bioremedijacija je brža od prirodne jer se vrši stimulacija mikrobiološke degradacije zagađenja kontrolom koncentracije kiseonika, nutrijenata, vlažnosti, pH, temperature i dr (*Rahman et al., 2003; Yerushalmi et al., 2003*). Tehnička bioremedijacija se primenjuje kada je bitno da se čišćenje izvrši za kratko vreme ili kada se mrlja veoma brzo širi. Njenom primenom smanjuju se troškovi zbog kraćeg tretiranja zemljišta i manjeg broja uzorkovanja i analiza, a ona je važna i zbog političkih i psiholoških potreba jer je zajednica izložena zagađenju.

Prilikom dizajniranja bioremedijacionog procesa mora se sprečiti da se zagađenje širi dalje zbog prodiranja u podzemnu vodu. Koja varijanta čišćenja će se primeniti zavisi od vrste zagađenja, prirode terena i dr. Može se primeniti tehnička, spontana bioremedijacija, kombinacija obe, ili mešavina bioremedijacije sa nebiološkim tretmanom. Pošto je obično koncentracija zagađenja u podzemnoj vodi manja nego u zoni izvora zagađenja, onda se mogu primeniti drugačije procedure za izvornu zonu i za raširenu mrlju. Faktori koji utiču na dizajniranje bioremedijacionog procesa su:

- ciljevi koji se žele postići prilikom tretmana zemljišta,
- širenje zagađenja (vrsta, koncentracija i lokacija),
- vrsta biološkog procesa koji efikasno transformiše zagađenje, transportna dinamika zemljišta.

Najčešće primenjivane tehnike tehničke bioremedijacije opisane su u prethodnom poglavlju u okviru treće grupe remedijacionih tehnika, tako da one ovde dalje neće biti razmatrane. U ovom poglavlju će više biti razmatrani mehanizmi i kinetika biodegradacije i faktori koji na njih utiču.

2.3.1. Mehanizmi i proizvodi razgradnje ugljovodonika

Istraživači bioremedijacije su došli do velikog broja informacija o mehanizmima biooksidacije, nastalim produktima i o uticaju reakcionih uslova pre nego što se bioremedijaciona tehnologija počela komercijalno primenjivati.

Mikroorganizmi koji mogu da razgrađuju različite klase jedinjenja, i pod aerobnim i pod anaerobnim uslovima, bili su prilično dobro ispitani kao i njihova potreba za odgovarajućim pH, nutrijentima, kiseonikom, temperaturom, redoks-potencijalom i vlagom (Brown *et al.*, 1993). Zavisno od količine prisutnog kiseonika u zemljištu bioremedijacija se može odvijati pod aerobnim i anaerobnim uslovima.

Anaeroban proces se odvija pod dejstvom anaerobnih mikroorganizama i on je toliko spor da je njegov značaj zanemarljiv. Ipak je ustanovljeno da anaerobna razgradnja može uzeti maha nakon što je nafta prethodno bila izložena aerobnim mikroorganizmima (Jobson *et al.*, 1979). Anaerobna razgradnja ugljovodonika moguća je u dubljim slojevima nafte, tj. u dubini naftonosnih nalazišta bez dotoka vazduha. Pobuđivači anaerobne degradacije su najčešće sulforedukujuće bakterije. Reakcija sulfata pod dejstvom mikroorganizama predstavlja oksido - redukcion proces. Pri tome se sulfati redukuju do sumporvodonika, a ugljovodonici oksidišu. Pod anaerobnim uslovima procesi razgradnje su specifičniji, na primer, čiste kulture bakterija iz toluena mogu nagraditi benzilsukcinat, a iz ksilena metilbenzilsukcinat. Kod aromata može doći i do redukcije dvostrukih veza, tako su testovi sa mikrobiološkim kulturama pokazali redukciju jedne ili više dvostrukih veza u benzenovom prstenu pod anaerobnim uslovima: iz benzena može nastati cikloheksen, a iz toluena 4-metilcikloheksanol (Grbić-Galić i Vogel, 1987).

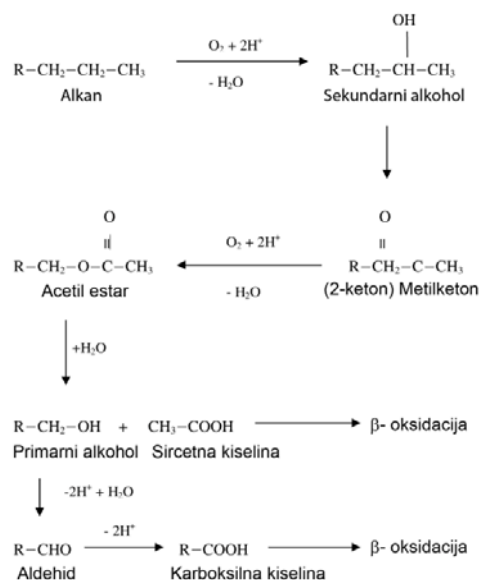
Aerobnu razgradnju vrše aerobni mikroorganizmi, i na nju, pored kiseonika, značajan uticaj ima prisustvo mineralnih soli, temperatura i pH. Aerobni mikroorganizmi zahtevaju soli azota, fosfora, kalijuma, magnezijuma, gvožđa, cinka i dr. Najveći rast bakterija i gljivica oksidanasa ugljovodonika zapaža se u temperaturnom intervalu od 25 – 40°C. Međutim mikroorganizmi pokazuju veliku prilagodljivost na uslove rasta, pa i na temperaturu. Optimalni pH za biorazgradnju se kreće između 7 i 8,5. Međutim, promena kiselosti sredine može uticati na promenu dominantne vrste mikroorganizama pa time i uslova za mikrobiološku razgradnju.

Mehanizam razgradnje alifatičnih jedinjenja

Inicijalni korak u aerobnoj degradaciji saturisanih, alifatičnih (n-alkana) jedinjenja je „napad“ enzima oksigenaze na terminalnu ili sekundarnu metil grupu, pri čemu se formira alkohol, slika 2.12 (Sepić *et al.* 1995; Koma *et al.* 2001; van Hamme *et al.* 2003). Alkohol se dalje oksiduje do odgovarajućeg aldehida ili ketona i više masne kiseline. Više masna kiselina se dalje oksiduje sa citoplazmičnim b-oksidacionim enzimima do trikarboksilne kiseline (van Hamme *et al.* 2003). Ispitivanja oksidacije alkena su ograničena na degradaciju terminalnih alkena (1-alkena). Pozicija dvostruke veze u alkenima je faktor koji utiče na degradabilnost alkena, pa tako terminalna dvostruka veza je biodegradabilnija od interne dvostruke veze. Inicijalni korak oksidacije može da se odigra ili na dvostrukoj vezi ili na saturisanom delu niza (npr. metil grupi), pri čemu mogu nastati četiri glavna produkta. Oksidacijom metil grupe mogu nastati ili (1) alkenoli ili više masne kiseline ili (2) primarni ili sekundarni alkoholi ili metil ketoni, dok oksidacijom dvostruke veze mogu nastati (1) epoksidi ili (2) dioli (Britton 1984; Morgan i Watkinson 1994).

Takođe, brojna ispitivanja su pokazala da se alifatični ugljovodonici mogu degradirati anaerobnim putem, ovaj metaboloizam u literaturi nije sasvim objašnjen (Chayabutra i Ju 2000; Grishchenkov *et al.* 2000; van Hamme *et al.* 2003). Mnogi istraživači su predložili n-heksan kao model jedinjenja za određivanje načina degradacije n-alkana anaerobnim mikroorganizmima (Heider *et al.* 1999; Widdel i Rabus 2001; Wilkes *et al.* 2003). Inicijalni korak ovog puta je uvek aktivacija n-alkana na C₂ poziciji sa fumaratom pri čemu se formira sucinat, koji se dalje aktivira

sa HSCoA i nastaje succinil-CoA (Heider et al. 1999; Wilkes et al. 2003). U ovom poslednjem jedinjenju dolazi do preraspodele ugljenika tako da se formira malonil-CoA, koji se zatim dekarboksiluje do 4-metilalkinoil-CoA, a zatim sledi β -oksidacija do CO_2 kao krajnjeg produkta (Wilkes et al. 2003). Biodegradabilna frakcija organskih kontaminanata u zemljištu je u literaturi definisana kao frakcija koja se može lako desorbovati sa zemljišta u tečnu fazu (Alexander 2000; Reid et al. 2000a; Semple et al. 2003). Ranija mikrobiološka ispitivanja pokazala su da mikroorganizmi mogu da usvajaju samo rastvorene hidrofobne organske materije (Wodzinski i Coyle 1974; Ogram et al. 1985), ova ispitivanja su ograničena s obzirom da je danas poznato da postoje mikroorganizmi koji mogu da vrše biodegradaciju sorbovanih ugljovodonika (Tang et al. 1998).



Slika 2.12. Put aerobne degradacije alkana β -oksidacijom

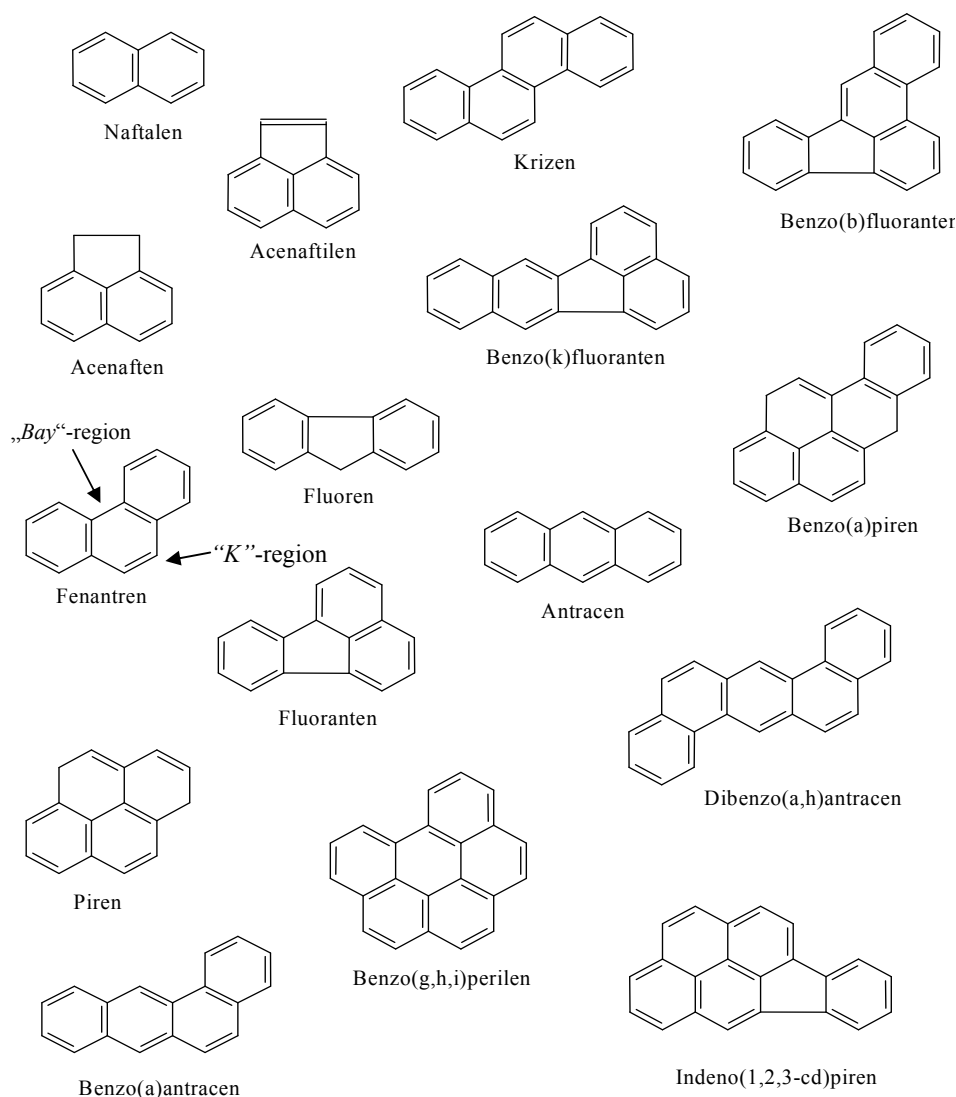
Mehanizam razgradnje policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Pokazano je da neki mikroorganizmi, uglavnom roda *Pseudomonas* i *Mycobacterium*, mogu da transformišu i degradiraju PAH. Ova osobina može biti korisna za uklanjanje ovih jedinjenja iz životne sredine. Uspešna primena ovih bakterija za bioremedijaciju PAH-kontaminiranih područja zahteva dublje razumevanje o odvijanju mikrobiološke degradacije PAH.

Sudbina policikličnih aromatičnih ugljovodonika u prirodi je od izuzetnog značaja za životnu sredinu zbog njihovih toksičnih, mutagenih i kancerogenih osobina. S obzirom, da je većina PAH toksična potrebno je razumeti fizičko-hemijske procese i reakcije mikrobiološke degradacije koje utiču na mobilnost i sudbinu ovih jedinjenja u podzemnim vodama, zemljištu i sedimentu. Biodegradacija PAH se sa jedne strane može smatrati normalnim procesima u ciklusu ugljenika, a sa druge strane kao uklanjanje polutanata nastalih ljudskom aktivnošću iz životne sredine.

Policiklični aromatični ugljovodonici su grupa jedinjenja koja sadrže ugljenik i vodonik, povezan u obliku dva ili više spojenih aromatičnih prstenova uređenih linearno ili pod uglom (slika 2.13). Mnogi PAH sadrže "bay"-region i "K"-region. "Bay"-region i "K"-region epoksidi, koji se mogu formirati metabolički, su visoko

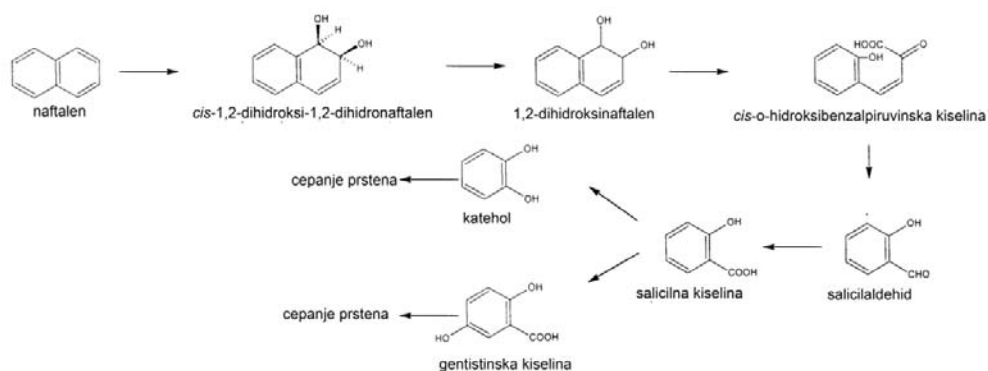
reaktivni kako u hemijskom tako i u biološkom pogledu. Fenantren je najprostiji aromatični ugljovodoničar koji sadrži ove regione. „Bay“-region fenantrena je sterno sakriveno područje između ugljenikovih atoma 4 i 5, a „K“-region se nalazi između 9 i 10 ugljenikovog atoma koji su povezani dvostrukom vezom, koja ima najizraženije aromatične oleinske osobine sa visokom gustinom elektrona (slika 2.13.). Prema Schmidt-Pullman elektronskoj teoriji, „K“-region epoksidi trebalo bi da budu više kancerogeni od njihovih prekursora. PAH male molekulske težine (sa dva ili tri prstena) su relativno volatilni, rastvorni i degradabilniji od PAH sa velikom molekulskom masom. Visokomolekularni PAH (četiri ili više prstenova) jako se sorbuju na zemljištu ili sedimentu i rezistentniji su na mikrobiološku degradaciju.



Slika 2.13. Polciklični aromatični ugljovodoničari

Naftalen. Biodegradacija naftalena je najpotpunije proučena od svih PAH zbog njene najjednostavnije strukture i njene najveće rastvorljivosti, kao i zbog

toga što se naftalen-degradirajuće bakterije lako izoluju. Bakterijske vrste koje su sposobne da degradiraju PAH izoluju se uglavnom iz zemljišta. Ovo su obično gram-negativne bakterije, većina njih pripada rodu *Pseudomonas* (Morzik *et al.*, 2003). Istraživanja su pokazala da bakterije prvo oksiduju naftalen inkorporacijom oba atoma kisonika u aromatični molekul pri čemu se formira *cis*-1,2-dihidroksi-1,2-dihidronaftalen. Naftalen dioksidogeneze deluju kao multikomponentni sistem enzima koji je odgovoran za formiranje *cis*-dihidrodiol naftalena (Cerniglia, 1984). Drugi korak u bakterijskoj oksidaciji naftalena je konverzija *cis*-1,2-dihidroksi-1,2-dihidronaftalena u 1,2-dihidroksinaftalen. Ova reakcija je katalizovana sa naftalen(+)-*cis*-dihidrodiol dehidrogenazom i zahteva NAD^+ kao elektron akceptor. Sledeći korak dovodi do enzimatskog otvaranja prstena 1,2-dihidroksinaftalena do *cis*-2-hidroksibenzalpiruvata, koji se zatim konvertuje serijom dehidrogenaza do salicilata i piruvata. Salicilat se oksiduje sa salicilat hidrolazom do katehola, koji može podleći ili *orto* ili *meta* cepanju u zavisnosti od metabolizma bakterija (Dagley, 1971). Predloženi put oksidacije naftalena nekim vrstama *Pseudomonas* bakterija prikazan je na slici 2.14 (Morzik *et al.*, 2003).

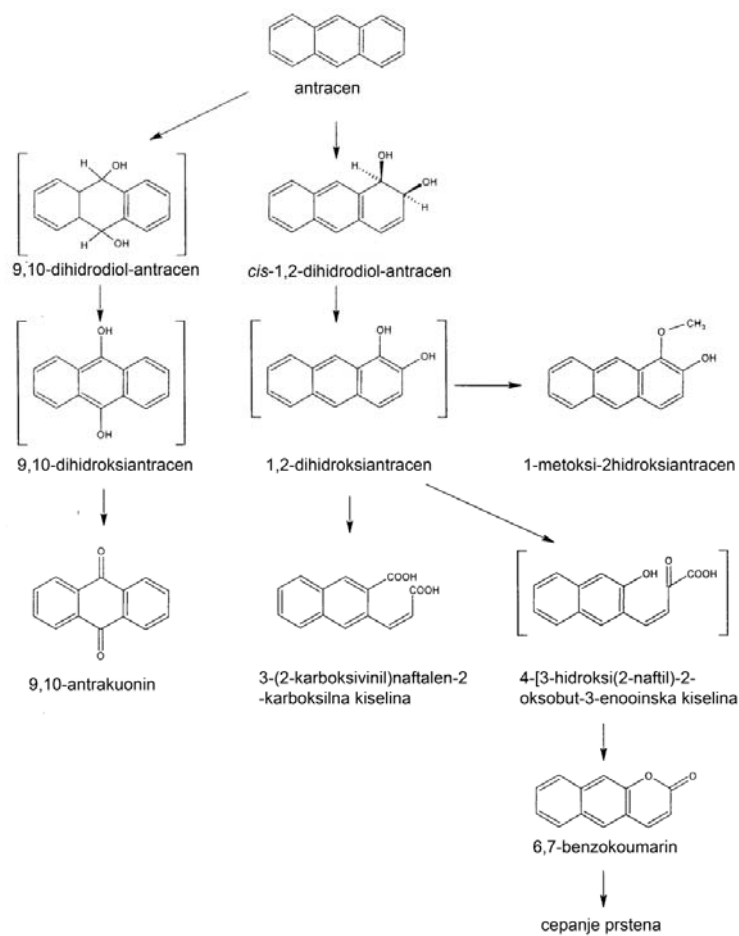


Slika 2.14. Predloženi put oksidacije naftalena nekim vrstama bakterija

Fluoren. Istraživanja su pokazala da tokom degradacije i biodegradacije fluorena bakterijama nastaje nekoliko intermedijera. Degradacijom fluorena sa *Pseudomonas*-om nastaje šest glavnih metabolita, pet od njih je identifikovano: 9-fluorenol; 9-fluorenol; 1,1-dihidroksi-1-hidro-9-fluorenol; 8-hidroksi-3,4-benzokumarin i ftalna kiselina. Identifikacija 8-hidroksi-3,4-benzokumarina i ftalne kiselina ukazuje na činjenicu da se peti prsten ovog diola otvara prvi pri čemu nastaje 2-karboksi derivat, 2,3-dihidroksi bifenil se katabolizuje analognom reakcijom kao kod degradacije bifenila, rezultujući formiranjem ftalne kiseline (Grifoll *et al.*, 1994; Morzik *et al.*, 2003). Alternativno u nekim bakterijama inicijalna oksidacija može rezultovati nastajanjem 3,4-dihidroksifluorena, što je dalje praćeno cepanjem diolnog prstena i daljom degradacijom do 3,4-dihidroksikumarina. Predložen je i drugačiji katabolički put fluorena u *Brevibacterium* bakterijama, gde hidroksilacijom na C-9 fluorenu nastaje 9-fluorenol, koji se zatim dehidrogenuje do 9-fluorenona (Trenz *et al.*, 1994). Ovaj intermedijer zatim podleže dioksidaciji na angularnom mestu pri čemu se formira 1,10-dihidro-11,10-dihidroksifluoren-9-on, peti prsten se zatim otvara i nastaje supstituisani bifenil.

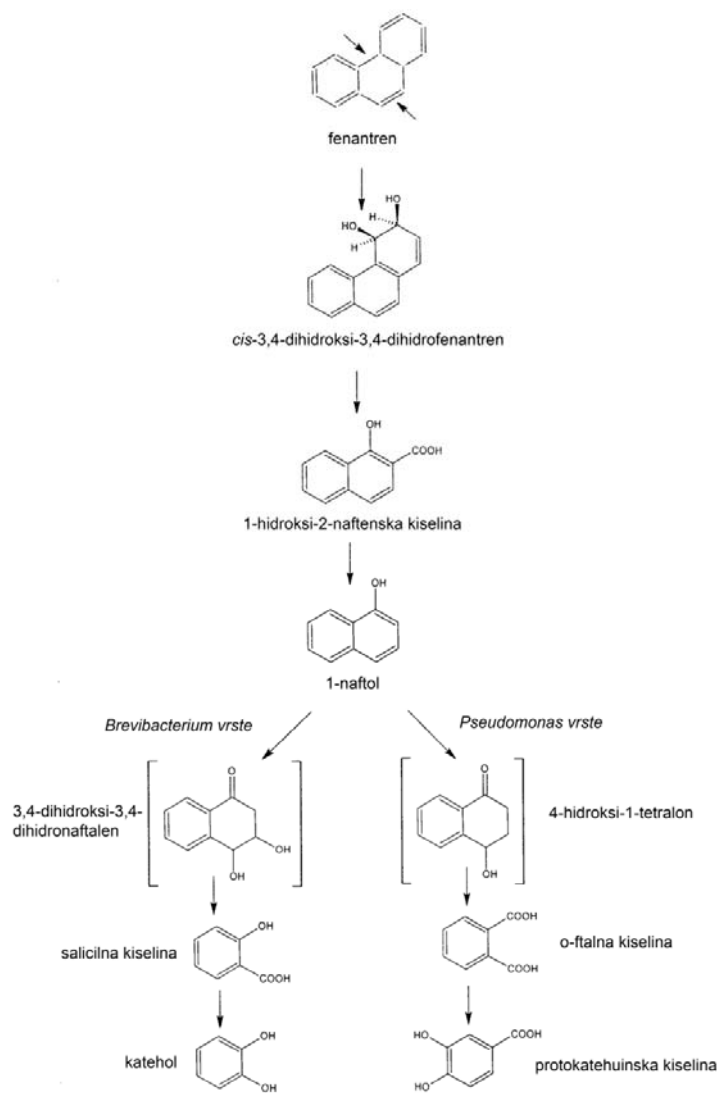
Antracen i fenantren. Ovi triciklični aromatični ugljovodonici su široko rasprostranjeni u životnoj sredini. Oni se koriste kao model supstrati za ispitivanje

degradacije PAH u životnoj sredini, s obzirom da obe strukture i njihovi derivati (kao što su benzo[a]antracen i benzo[a]piren) spadaju u grupu kancerogenih jedinjenja. Antracen se može kompletno mineralizovati sa bakterijama *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Beijerinckia*, *Rhodococcus* i *Mycobacterium* pri čemu je inicijalni oksigenovani intermedijer dihidrol (*Morzik et al., 2003*). Većina ovih bakterija oksiduju antracen u 1,2 poziciji pri čemu se formira *cis*-1,2-dihidroksi-1,2-dihidroantracen, a zatim se NAD^+ -zavisnim dihidrodiol dehidrogenazama konvertuje u 1,2-dihidroksiantracen. U sledećem koraku bakterije oksiduju 1,2-dihidroksiantracen pri čemu dolazi do cepanja prstena i nastanka *cis*-4-(2-hidroksi-3-naftil)-okso-butanonska kiselina, nakon čega dolazi do njene konverzije u 2-naftoinsku kiselinu. Produkti cepanja prstena se metabolišu do salicilata i katehola preko 2,3-dihidroksinaftalena. Katehol se degradira do jednostavnog alifatičnog jedinjenja na sličan način kao kod naftalena (*Cerniglia, 1984; Morzik et al., 2003*). Većina *Mycobacterium* vrsta metabolizuje antracen na različitim mestima u molekulu, najverovatnije putem „napada“ dioksidgenaze i monooksigenaze na aromatični nukleus. Rezultujućii antracen *cis*-1,2-dihidrodiol se dehidrogenuje do 1,2-dihidroksiantracena. Akumulacija 1-metoksi-2-hidroksiantracena daje dodatni dokaz o deoksigenaciji antracena. Predloženi put degradacije antracena sa *Mycobacterium* je prikazan na slici 2.15.



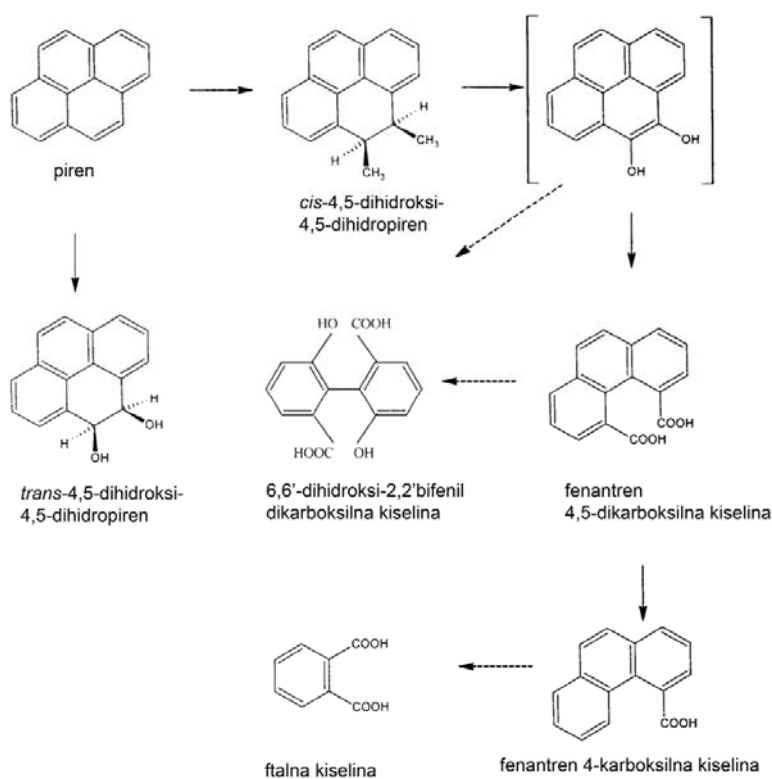
Slika 2.15. Predloženi put degradacije antracena sa *Mycobacterium*

Bakterije roda *Pseudomonas* inicijalno oksiduju fenantren u 1,2 i 3,4 poziciji pri čemu se formira *cis*-1,2-dihidroksi-1,2-dihydrofenantren ili *cis*-3,4-dihidroksi-3,4-dihydrofenantren. Fenantren-*cis*-3,4-dihidrodiol je predominantni izomer koji se konvertuje do 3,4-dihidroksifenantrena. Produkti cepanja prstena se dalje metabolišu do 1-hidroksi-2-naftoinske kiseline, koja se zatim dekarboksiluje do 1,2-dihidroksinaftalena, a zatim sledi *meta* cepanje prstena i formiranje salicilne kiseline (Jerina *et al.*, 1976 Morzik *et al.*, 2003). Salicilna kiselina se dalje može degradirati pri čemu mogu nastati ili katehol ili gentistinska kiselina. I katehol i gentistinska kiselina podležu cepanju pri čemu se formiraju intermedijeri ciklusa trikarboksilnih kiseline (Houghton i Shanley, 1994). Novi intermedijer, 1-naftol je detektovan prilikom biodegradacije fenantrena bakterijama roda *Brevibacterium* koje degradiraju fenantren preko 1-hidroksi-2-naftoinske kiseline i salicilne kiseline, i *Pseudomonas* koji degradiraju fenantren formiranjem 1-hidroksi-2-naftoinske kiseline, 1-naftola i *o*-ftalne kiseline (slika 2.16.).



Slika 2.16. Predloženi put metabolizma fenantrena bakterijama roda *Brevibacterium* i *Pseudomonas*

Piren i benzo[a]piren. Mycobacterium je bakterija za koju je pokazano da može da degradira piren i benzo[a]piren. Sedam metabolite metabolizma pirena je identifikovano (Morzik *et al.*, 2003). Tri produkta oksidacije prstena, *cis*-4,5-pirendihidrodiol i *trans*-4,5-pirendihidrodiol i pirenol; kao i četiri produkta cepanja prstena 4-hidroksiperinafenon; 4-fenantroinska kiselina; ftalna kiselina i cinaminska kiselina. 4-fenantroinska kiselina je glavni produkt metabolizma pirena. Detekcija *cis*- i *trans*-4,5-dihidrodiola ukazuje na različite inicijalne puteve oksidativnog “napada” na piren. *Mycobacterium* vrste su takođe sposobne da formiraju i neke nove metabolite kao što su 6,6-dihidroksi-2,2-bifenil dikarboksilna kiselina, što predstavlja novi put degradacije pirena koji uključuje cepanje oba centralna prstena (Vila *et al.*, 2001). Šematski prikaz puta predloženog za degradaciju pirena sa *Mycobacterium* je prikazan na slici 2.17.

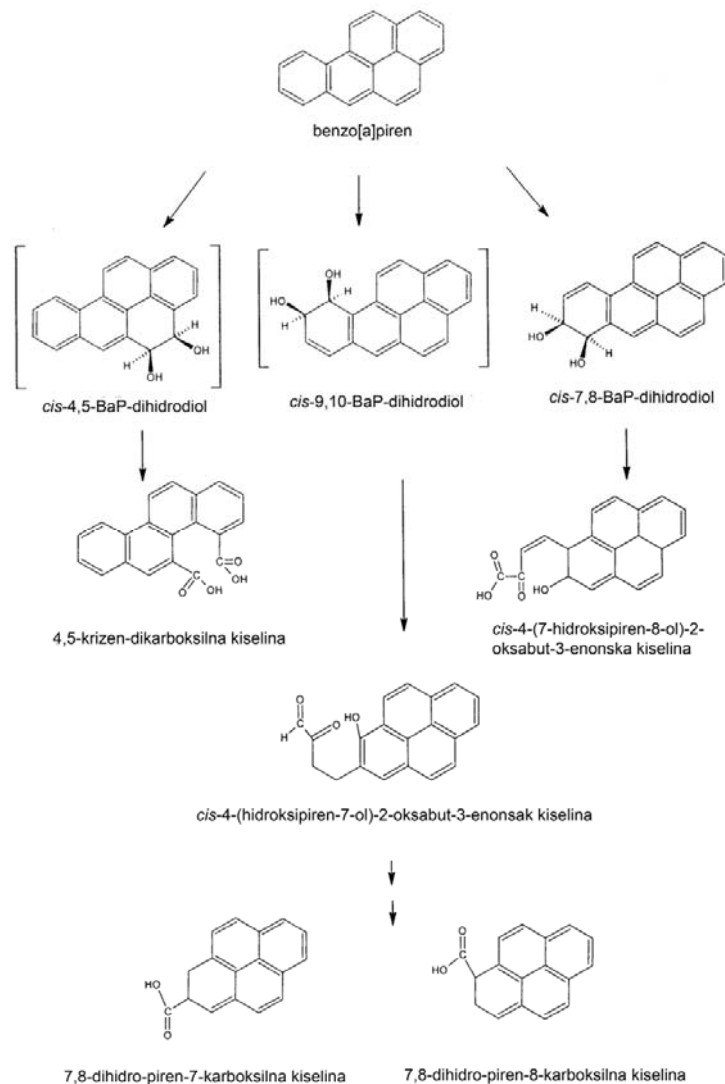


Slika 2.17. Šematski prikaz puta predloženog za degradaciju pirena sa *Mycobacterium*

Mycobacterium ne mineralizuje samo piren već takođe može da mineralizuje i benzo[a]piren. Analiza degradacionih produkata pokazuje da se benzo[a]piren transformiše dioksidacijom na 4,5-, 7,8- i 9,10- poziciji. Predominantno se formira krizen-4,5-dikarboksilat cepanjem intradiola 4,5- dihidroksi[a]pirena, dok 7,8- i 9,10-dihidrodioli podležu ekstradiolnom cepanju do dihidropiren karboksilata (Morzik *et al.*, 2003). Šematski prikaz puta predloženog za degradaciju benzo[a]pirena sa *Mycobacterium* je prikazan na slici 2.18.

Fluoranten. Fluoranten se uglavnom degradira bakterijama iz roda *Mycobacterium* i *Alcaligenes*. Degradacija sa *Mycobacterium* uključuje

dioksigenaciju na 1,2 i 7,8 poziciji, pri čemu nastaje fluoren-9-on ili acenaften-7-on nakon cepanja prstena. Degradacijom sa *Alcaligenes* ovo poslednje jedinjenje se dalje oksiduje do 3-hidroksimetil-3,4-dihidrobenzokumarin (Morzik et al., 2003). U nekim vrstama bakterija *Mycobacterium* najmanje sedam metabolita se formira tokom mineralizacije fenantrena. Pet ovih jedinjenja je identifikovano: *cis*-2,3-fluoranten dihidrodiol; 9-karboksimetilen-fluoren-1-karboksilna kiselina; *cis*-1,9-dihidroksi-1-hidro-fluoren-9-on-8-karboksilna kiselina; 4-hidroksibenžokromen-6-on-7-karboksilna kiselina i benzene-1,2,3-trikarboksilna kiselina (Schneider et al., 1996).



Slika 2.18. Šematski prikaz puta predloženog za degradaciju benzo[a]pirena sa *Mycobacterium*

Benzof[a]antracen. Put za parcijalnu degradaciju benzo[a]antracena ispitan je za grupe bakterija roda *Beijerinckia* i *Mycobacterium*. Ispitivanja su pokazala da neke vrste *Beijerinckia* uključuju dioksigenaciju na 1,2-, 8,9- ili 10,11- poziciji pri čemu

nastaju tri različita diola (*Cerniglia, 1984; Schneider et al., 1996*). Glavni dihidrodiole izomer koji se formira je *cis*-1,2-dihidrobenzo[*a*]antracen. Ovi dioli se dalje degradiraju do 1-hidroksi-2-karboksiantracena ili do odgovarajućih fenantrena. S druge strane, *Mycobacterium* formira 5,6-dihidrodiol kao dominantan metabolit, a kao sekundarne metabolite 8,9- i 10,11-dihidrodiol (*Schneider et al., 1996*).

2.3.2. Kinetika bioremedijacionih procesa

Istraživanja kinetike procesa bioremedijacije teku u dva pravca: prvi je proučavanje faktora koji utiču na količinu transformisanih jedinjenja u toku vremena; drugi pravac istraživanja je određivanje oblika krivih koje opisuju transformacije i, ispitivanje koji od grafika dekompozicije najbolje fituje metabolizam datih jedinjenja u mikrobiološkoj kulturi u laboratorijskom mikrokosmosu, ili, ponekad, na terenu. Zbog ometajućih faktora kompleksnosti procesa nemoguće je tačno predvideti vreme trajanja bioremedijacije. Određivanja iz literaturnih vrednosti stepena degradacije su korisna, ali manje tačna jer ona ne uzimaju u obzir specifične karakteristike zemljišta, temperaturu, vlagu, i najbitnije, prilagođavanje bakterija specifičnom zagađenju.

Istraživanje kinetike biodegradacije u prirodnom okruženju je često empirijsko, i njime se oslikava osnovni nivo znanja o mikrobiološkoj populaciji i njenoj aktivnosti u datom okruženju (*Höhener et al., 2003; Pala et al., 2006*). Jedan primer empirijskog pristupa je model:

$$-dC/dt = kC^n,$$

gde je *C* koncentracija supstrata, *t* je vreme, *k* je konstanta nestajanja jedinjenja, *n* je parametar fitovanja, red reakcije (*Hamaker, 1972*). Kod ovog modela može se fitovati kriva nestajanja supstrata menjanjem *n* i *k* dok se ne dobije dobar fit. Iz ove jednačine evidentno je da je brzina proporcionalna stepenu koncentracije supstrata. Naučnici koji proučavaju kinetiku ne prikazuju uvek da li je model koji koriste baziran na teorijskoj ili empirijskoj osnovi, i da li konstante u jednačini imaju fizički smisao ili su samo parametri fitovanja (*Bazin i dr., 1976*).

Biodegradaciona kinetika može se aproksimirati kinetikom prvog reda. Ona dozvoljava da se u bilo koje vreme predviđa koncentracija iz poluvremena biodegradacije. Ako su uspostavljeni optimalni uslovi, remedijacijono vreme zavisi od poluvremena degradacije, početne koncentracije u najzagađenijem zemljištu i krajnje koncentracije koja se želi postići. Mnogi istraživači prihvataju kinetiku prvog reda zbog lakog predstavljanja i analiziranja podataka, jednostavnosti grafičke zavisnosti *log* preostalih jedinjenja od vremena u vidu prave linije sa malim odstupanjem linije fita od tačaka, i zbog lakog predviđanja koncentracije kada je jednom određeno vreme poluživota. Ovaj pristup je najmanje pouzdan pri veoma visokim i veoma niskim koncentracijama zagađenja. Uzimajući istu početnu vrednost, različiti kinetički modeli će predvideti ogromno različite količine zaostalih jedinjenja na kraju (*Rončević et al., 2005; Pollard et al., 2008*).

U reakcijama prvog ili nultog reda, jednačina je:

$$-dC/dt = k \quad \text{za reakciju nultog reda;}$$

$$-dC/dt = kC \quad \text{za reakciju prvog reda.}$$

Kod reakcije drugog reda brzina je proporcionalna drugom uticaju (npr. kvadratnom) koncentracije pojedinog molekula reaktanata ($\text{brzina} = kC^2$) ili u drugim prilikama koncentraciji dva reaktanta ($\text{brzina} = kC_1C_2$). U oba slučaja koncentracija oba jedinjenja uključena je u promene reakcije sa vremenom.

Kod *ex-situ* tretmana zemljišta, remedijacijono vreme generalno ne zavisi od transporta nutrijenata i kiseonika i može se grubo odrediti iz degradacionog stepena, određenog u laboratorijskim testovima sa uzorcima donetim sa terena. Sledeći faktori često ometaju jednostavnu ekstrapolaciju kinetike opisane ovde na prirodne uslove.

1. Različite barijere mogu da ograniče ili spreče kontakt između mikrobioloških ćelija i njihovih organskih supstrata.
2. Mnogi organski molekuli sorbuju se na glini ili humusu zemljišta ili sedimenta, i kinetika dekompozicije sorbovanih supstrata može biti potpuno različita od one koju ima isto jedinjenje slobodno u rastvoru.
3. Prisustvo drugih organskih molekula, koji mogu da se metaboliziraju od strane biodegradirajućih vrsta, može da umanja ili poveća konzumaciju ispitivanih jedinjenja.
4. Primena neorganskih nutrijenata, kiseonika, ili faktora rasta, može da utiče na brzinu transformacije i onda će proces biti regulisan difuzijom tih nutrijenata ili brzinom njihovog nastajanja ili regeneracije od strane drugih stanovnika zajednice.
5. Mnoge vrste mogu da metaboliziraju ista organska jedinjenja simultano.
6. Protozoe ili moguće vrste koje parazitiraju na biodegradirajućoj populaciji mogu da upravljaju rastom, veličinom ili aktivnošću populacije odgovorne za biodegradaciju.
7. Mnoge sintetičke hemikalije ili polutanti imaju previše nisku rastvorljivost u vodi, i kinetika njihovih transformacija može biti potpuno različita za jedinjenja koja su u vodenoj fazi.
8. Čelije aktivne populacije mogu biti sorbovane ili razvijene u mikrokolonije, i kinetika procesa izazvanih sorbovanim bakterijama ili mikrokolonijama još je nerešiva.
9. Mnoga organska jedinjenja nestaju samo posle perioda aklimatizacije, i metoda još ne postoji koja može da predvidi dužinu ovog perioda ili očekivani procenat vremena između pojave jedinjenja i njihove totalne destrukcije. Dakle, skoro sve kinetike koje se primenjuju ignorišu period aklimatizacije (prilagođavanja).

2.3.3. Faktori koji utiču na procese biodegradacije naftnih ugljovodonika

Faktori koji utiču na procese biodegradacije naftnih ugljovodonika u zemljištu se mogu grupisati u četiri kategorije (Alexander, 1995; USEPA, 1994):

1. Karakteristike zemljišta (tekstura zemljišta, pH vrednost zemljišta, sadržaj vlage, temperatura zemljišta, sadržaj kiseonika; koncentracija nutrijenata),
2. Karakteristike ugljovodonika (hemijska struktura, koncentracija i toksičnost)
3. Procesi koji utiču na biodostupnost ugljovodonika (starenje, sekvencijacija i kompleksiranje).
4. Brojnost mikroorganizama i razvoj katabolizma.

Karakteristike zemljišta.

Tekstura zemljišta utiče na permeabilnost, sadržaj vlage, i ukupnu gustinu zemljišta. Fino sprášena zemljišta su manje permeabilna od zemljišta sa krupnim česticama. Zemljišta sa niskom permeabilnošću su obično slepljena i otežavaju distribuciju i transport vlage, nutrijenata i vazduha. Ovakvom zemljištu se prilikom bioremedijacije mogu dodati agensi kao što je slama ili piljevina u cilju postizanja željene teksture zemljišta (USEPA, 1994).

pH zemljišta. Da bi se podržao bakterijski rast, pH zemljišta bi trebalo da je u opsegu od 6-8, a vrednosti oko 7 su optimalne (USEPA, 1998c). Zemljištu sa pH vrednosti iznad ovog opsega, pre bioremedijacionog tretmana se mora podesiti pH. pH zemljišta se može povisiti dodatkom kreča, ili sniziti dodatkom elementarnog sumpora. Tečni rastvori takođe mogu biti injektovani u zemljište tokom tretmana radi regulacije pH.

Sadržaj vlage. Za normalan rast mikroorganizama u zemljištu potrebni su vlažni uslovi. Međutim, prekomerna vlaga zemljišta, ograničava kretanje vazduha kroz međupovršinu, a samim tim redukuje dostupnost kiseonika koji je esencijalan za aerobne metaboličke procese. Generalno zemljište treba da je vlažno ali ne i mokro. Idealni opseg za vlažnost zemljišta je između 12-30%, ili 40-80% saturacionog kapaciteta zemljišta (USEPA, 1994).

Temperatura zemljišta. Varijacije temperature utiču na sve biološke procese (Norris i Eckenfelder, 1991; Algappan i Cowan, 2004). Većina aerobnih bioloških tretmana se odvija u osegu 4-39°C. Pokazano je da mikrobijalna aktivnost u zemljištu značajno opada na temperaturama ispod 10°C. Mikrobijalna aktivnost većine bakterija važnih za biodegradaciju naftnih ugljovodonika takođe opada na temperatura većim od 45°C. U opsegu od 10°C do 45°C, brzina mikrobiološke aktivnosti se obično udvostručava na svakih 10°C. Zbog toga što temperatura zemljišta varira sa ambijentalnom temperaturom, postojaće određeni periodi tokom godine kada se bakterijski rast, a samim tim i degradacija kontaminanata smanjuje. Kada se ambijentalna temperatura vrati u opseg u koji je optimalan za rast bakterija, bakterijska aktivnost se ponovo povećava (USEPA, 1994).

Koncentracija nutrijenata. Za normalan rast i održavanje biodegradacionog procesa mikroorganizama potrebni su neorganski nutrijenti kao što su azot i fosfor. Neophodni nutrijenti za održavanje bakterijske populacije mogu biti prisutni u dovoljnoj količini na samom zemljištu, ali ih je najčešće potrebno dodavati. Međutim, višak određenih nutrijenata (npr., fosfata i sulfata) može usporiti mikrobijalni metabolizam. Tipičan C:N:P odnos kreće se u opsegu od 100:10:1 do 100:10:0,5, u zavisnosti od specifičnih konstituenata i mikroorganizama uključenih u biodegradacioni proces (USEPA, 1994). Prilikom izbora nutrijenata potrebno je voditi računa o vremenu njihovog zadržavanja u zemljištu. Izvor fosfora je najčešće so fosforne kiseline, a izvor azota može biti amonijumova so, nitratna so, urea ili kombinacija različitih supstanci. Upotreba nutrijenata je zabrinjavajuća jer oni mogu da povećaju nivo nitrata u podzemnoj vodi. Takođe, zabrinjavajući je i rezidual amonijum-jona jer oni mogu da pređu u nitrata. Ortofosfati mogu da prouzrokuju taloženje gvožđa, kalcijuma i magnezijuma, i zato treba da se primenjuju uz veliku pažnju. Tripolifosfati rastvaraju gvožđe, kalcijum i magnezijum i u mnogo manjoj meri izazivaju blokadu sistema. Ako se koriste soli natrijuma, glinovito zemljište može da nabrekne i smanji propustljivost i za vodu i za vazduh. U nekim slučajevima proces može teći i bez dodatka nutrijenata.

Iako su azot i fosfor važni za mikroorganizme oni manje limitiraju spontanu bioremedijaciju nego elektron-akceptori. Većina komercijalnih bioremedijacionih projekata koristi kiseonik kao elektron-akceptor, iako se mogu koristiti i drugi elektron-akceptori za mikrobiološku razgradnju organskih jedinjenja (nitrati, sulfati, gvožđe(III)-joni) (Norris i Eckenfelder, 1991).

Sadržaj kiseonika je izuzetno važan. Kiseonik i nutrijenti u prvoj generaciji bioremedijacionih tehnika su dodavani putem cirkulacije podzemne vode ali su postupci biodegradacije koji su se odigrali bili ograničeni malom rastvorljivošću i nestabilnošću kiseonika u vodenom rastvoru (Brown et al., 1993). Zbog potrebe za većim količinama kiseonika sve više se primenjivao vodonik-peroksid. Primenom vodonik-peroksida značajno se povećava količina kiseonika (10-50 puta više kiseonika nego do tada primenjivanim aeracionim sistemima), međutim, njegova primena ima ograničenja, jer u nekim tipovima zemljišta može doći do prebrze dekompozicije vodonik-peroksida i do obrazovanja začepjenja (Britton, 1985).

U poslednje vreme se sve više koristi raspršivanje vazduha (Brown i Jasiniewicz, 1992). Raspršivanje vazduha podrazumeva injektovanje vazduha ispod vodene table radi zasićenja podzemne vode vazduhom i na taj način se obezbeđuje kiseonik. Raspršivanje vazduha je relativno jeftino i kiseonik se može distribuirati kroz svo zemljište odjednom, što je bolje nego osloniti se na front kiseonika koji se kreće kroz zemljište.

Karakteristike kontaminanta.

Hemijska struktura. Hemijska struktura kontaminanta prisutnih u zemljištu je veoma važna za određivanje brzine biodegradacije ovih jedinjenja. Što je komplikovanija struktura konstituenata naftnih produkata to je manja brzina biološkog tretmana. Alifatična i monoaromatična jedinjenja male molekulske težine se lakše biodegradiraju u odnosu alifatične i poliaromatične komponente velike molekulske mase. Naftni ugljovodonici predstavljaju smešu kompleksnih jedinjenja koja se generalno mogu svrstati u četiri frakcije: alifatični ugljovodonici, aromatični ugljovodonici, smole i asfaltne komponente (Balba et al., 1998).

Alifatični ugljovodonici se dafinisu kao derivati metana sa otvorenim nizom, koji nisu ni ciklična ni aromatična organska jedinjenja, i sastoje se od ugljenika i vodonika. Alifatični ugljovodonici mogu se podeliti u tri strukturno različite grupe: (1) zasićeni alkani (C-C), nezasićeni alkeni (C=C) i (3) nezasićeni alkinini (C≡C). Nezasićeni ugljovodonici (alkeni i alkinini) su retko prisutni u sirovoj nafti, ali su česti konstituenti njenih rafiniranih produkata kao posledica procesa krekovanja. Od svih frakcija naftnih ugljovodonika n-alkani srednje dužine (C₁₀-C₂₅) se najbrže biodegradiraju i preferirani su supstrat od strane mikroorganizama, zbog čega se smatraju toksičnijim od drugih frakcija. n-alkani dugog niza (C₂₅-C₄₀) su hidrofobna čvrsta jedinjenja koja se teško razgrađuju zbog njihove loše rastvorljivosti u vodi i male biodostupnosti, račvasti alkani se takođe degradiraju znatno sporije od odgovarajućih normalnih alkana. Brzina biodegradacije PAH zavisi u velikoj meri od njihove molekulske mase (Balba et al., 1998).

Brzina biodegradacije cikloalkana je promenljiva ali je uglavnom manja od brzine degradacije alkana (Atlas et al., 1981). Visoko kondenzovane aromatične i cikloparafinske strukture, smole, bitumen i asfaltni materijali imaju najvišu tačku ključanja, a samim tim su i najrezistentniji na biodegradaciju. Smatra se da je ovakav

rezidualni materijal nakon degradacije nafte i njenih produkata analogan, i čak se može smatrati huminskim materijama. Zbog njihovih inertnih karakteristika, nerastvorljivosti i sličnosti sa humusnim materijalom malo je verovatno da ova jedinjenja predstavljaju opasnost za životnu sredinu (Balba et al., 1998; Loehner et al., 2001; Ivančev-Tumbas et al., 2004; Brassington et al., 2007; Stroud et al., 2007).

Koncentracija i toksičnost. Prisustvo visokih koncentracija naftnih organskih konstituenata i teških metala u zemljištu mogu biti toksične i inhibirati rast i reprodukciju bakterija odgovornih za biodegradacione procese. Suprotno, veoma niske koncentracije organskog materijala će rezultirati smanjenom mikrobiološkom aktivnošću. Generalno koncentracija ukupnih naftnih ugljovodonika iznad 50.000 mg/kg, ili toksičnih metala iznad 2500 mg/kg se smatraju inhibitornim i/ili toksičnim za većinu mikroorganizama. Ako je koncentracija naftnih ugljovodonika veća od 10.000 mg/kg, ili je koncentracija toksičnih metala veća od 2500 mg/kg zemljište treba razblažiti čistim zemljištem da bi se kontaminanti razblažili, tako da prosečna koncentracija bude ispod toksičnog nivoa. Ciljne vrednosti ukupnih naftnih ugljovodonika ispod 1000 mg/kg se generalno ne mogu postići bioremedijacijom (USEPA, 1994). Međutim, visoke koncentracije kontaminanta u zemljištu ne moraju uvek izazivati negativne efekte, da li će visoke koncentracije izazvati toksične efekte na mikrobiološku populaciju zavisi i od njihovog hemijskog sastava kao i procesa kojima je naftno zagađenje podleglo (Trindade et al., 2005).

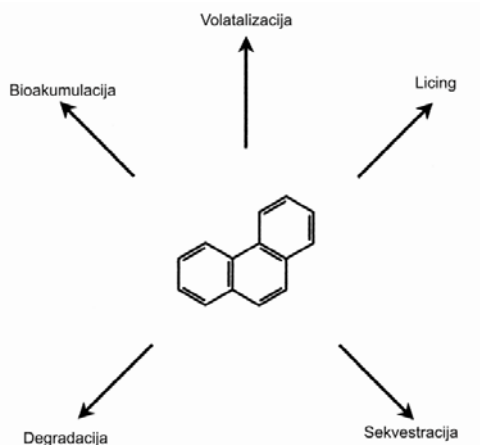
Biodostupnost - Starenje, sekvstracija i kompleksiranje naftnog zagađenja

Ugljovodonici prisutni u nafti spadaju u grupu „hidrofobnih organskih materija – HOC“ je sveobuhvatni pojam koji obuhvata širok opseg jedinjenja organskih ksenobiotika koji su pronašli svoj put do životne sredine, ova jedinjenja su obično slabo rastvorna u vodi. U ova jedinjenja spadaju jednostavna alifatična, ciklična i aromatična jedinjenja (uglavnom benzen, toluen, etilbenzen i ksilen (BTEX)), poliaromatični ugljovodonici ((PAH), uključujući i naftalen, fenantren i benzo(a)piren) i polihlorovani bifenili (PCB). Zemljište ima važnu ulogu u sudbini HOC u životnoj sredini. Kontaminanti dospevaju na zemljište uglavnom njihovom nemarnom primenom, prosipanjem i curenjem, kao i atmosferskom depozicijom. Kao rezultat ovoga, zemljište predstavlja „odvod“ za ove kontaminante. Deo HOC se gubi u zemljištu (degradacijom, isparavanjem), dok značajan deo ovih kontaminanata zaostaje u zemljištu (slika 2.19). Iz ovog razloga, sudbina i ponašanje organskih kontaminanata u zemljištu je bio predmet intenzivnog istraživanja, sa naročitim interesom vezanim za biodostupnost kontaminanta u zemljištu.

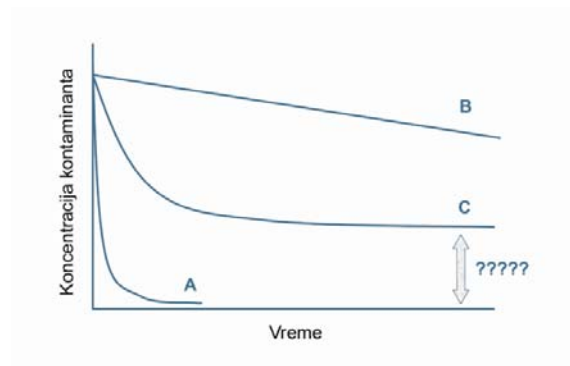
Sudbina hidrofobnih organskih kontaminanata u zemljištu (starenje i sekvstracija).

Nakon dospevanja na zemljište, organski kontaminanti se gube biodegradacijom, ličingom ili volatalizacijom, ili se mogu akumulirati u bioti zemljišta ili biti zadržani skvestracijom sa zemljišnom mineralnom i organskom materijom (slika 2.19). Sudbina i ponašanje HOC u zemljištu je kontrolisana sa nekoliko faktora kao što su tip zemljišta (sadržaj mineralne i organske materije) i fizičko-hemijske osobine (npr., rastvorljivost u vodi, polarnost, hidrofobnost, lipofilnost i molekulska struktura kontaminanata), (Reid et al., 2000a).

Kontaminanti se iz zemljišta mogu uklanjati različitim brzinama i do različitog stepena. Slika 2.20 pokazuje teorijske krive gubitka za tri različita tipa kontaminanta: A predstavlja vodo rastvorne, veoma mobilne i lako biodegradabilne kontaminante; B predstavlja spori gubitak jako interaktivnih hemikalija; C predstavlja bifazno ponašanje većine kontaminanata u zemljištu, gde se gubitak javlja ali nestaje sa vremenom. Ako organske komponente koje su dospale na zemljište nisu kompletno uklonjene ličingom, volatalizacijom ili degradacijom, onda se njihova interakcija sa komponentama zemljišta mora razmotriti, kao što je to prikazano strelicom ispod krive C (slika 2.20.).



Slika 2.19. Sudbina i ponašanje model hidrofobnog organskog kontaminanta (fenatrena) u zemljištu (Semple et al., 2003)



Slika 2.20. Teorijski gubitak kontaminanata iz zemljišta: A predstavlja vodo rastvorne, veoma mobilne i lako biodegradabilne kontaminante; B predstavlja spori gubitak jako interaktivnih hemikalija; C predstavlja bifazno ponašanje većine kontaminanata u zemljištu, (Semple et al., 2003)

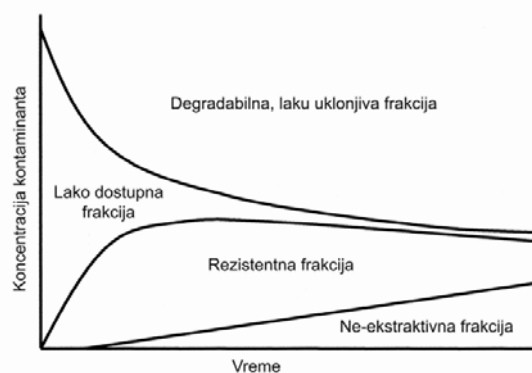
Normalno, kako se povećava vreme kontakta između kontaminanata i zemljišta, opada hemijska i biološka dostupnost, ovaj proces se često naziva "starenje" (Hatzinger i Alexander, 1995). Slika 2.20. pokazuje uticaj kontaktnog vremena na ekstraktivnost i biodostupnost HOC u zemljištu. Tokom vremena lako dostupna frakcija (lako ekstraktibilna ili biodostupna frakcija) se smanjuje na bifazan način, tj., nešto se degradira ili gubi iz zemljišta, a nešto se transformiše u rezistentnu

frakciju. Sadržaj rezistentne frakcije raste, ona se može osloboditi samo specifičnim i ponekad agresivnim ekstrakcijama, to je praćeno sporim porastom neekstraktivne frakcije (Macleod i Semple, 2000).

Mehanizam starenja je dosta istraživani (Reid *et al.*, 2000a). Danas je poznato da na interakciju između zemljišta i HOC utiče organska materija iz zemljišta (njena količina (Hatzinger i Alexander, 1995) i njena priroda (Piatt i Brusseau, 1998)); neorganski konstituenti (Ball i Roberts, 1991a,b; Mader *et al.*, 1997), a naročito distribucija pora i struktura (Nam i Alexander, 1998); mikrobiološka aktivnost (Guthrie i Pfaender, 1998) i koncentracija kontaminanta (Divincenzo i Sparks, 1997).

Glavni mehanizmi starenja su sorpcija i difuzija (kolektivno nazvane sekvestracija), koje predstavljaju interakciju između kontaminanta i čvrste frakcije u zemljištu, uglavnom mineralne i organske frakcije (Xing i Pignatello, 1997; Schlebaum *et al.*, 1998). Ovo zajedno sa fizičko hemijskim osobinama kontaminanta, u velikoj meri određuje brzinu i stepen starenja u zemljištu (Alexander, 2000).

Organski kontaminanti generalno prolaze kroz dve kinetičke faze u zemljištu (slika 2.21). Inicijalno, deo kontaminanta može biti sorbovan brzo (reda veličine minuta ili nekoliko sati), dok se preostala frakcija sorbuje znatno sporije tokom nedelja ili meseci (Xing i Pignatello, 1997). Inicijalna, brza sorpcija je generalno posledica vezivanja vodoničnim vezama i van der Valsovih silama, mehanizmi koji se odvijaju momentalno nakon kontakta HOC sa površinom zemljišta (Dec i Bollag, 1997; Gevaio *et al.*, 2000). Organski kontaminanti se u zemljištu najčešće vezuju kovalentnim vezama, što rezultuje stvaranjem skoro ireverzibilne inkorporacije u zemljište (Dec i Bollag, 1997; Gevaio *et al.*, 2000). Međutim, s obzirom da je HOC sorpcija vođena raspodelom između rastvorne faze i faze organske materije, specifične interakcije između sorbata i sorbenta dovode do toga da je uticaj hemisorpcije na ove kontaminant minimalan (Brusseau *et al.*, 1991).



Slika 2.21. Uticaj kontaktnog vremena na ekstraktabilnost i biodostupnosti kontaminanta (Semple *et al.*, 2003)

Dva koncepta su predložena za opisivanje sekvestracije HOC u zemljištu: (1) difuzija kroz organsku materiju i (2) sorpciono-usporena difuzija u pore.

Difuzija u organsku materiju. Za zemljišnu organska materija se smatra da sadrži gumenu i staklastu fazu, obe ove faze sadrže mesta za rastvaranje. Za staklastu fazu se smatra da sadrži krute otvore (rupe) gde kontaminanti mogu interreagovati sa organskom materijom (Xing i Pignatello, 1997). Kontaminant na taj način difunduje u kompleksnu strukturu, tj., dolazi do sekvestracije u organskoj materiji.

Sorpciono-usporena difuzija. Difuzija kontaminanta kroz poru vodu u zemljištu je usporena sorpcijom na površini nano- i mikropora u zemljištu koje sadrže malo organske materije. Brzina difuzije zavisi od veličine čestica zemljišta, poroznosti pora, i sternih smetnju unutar pora (*Pignatello i Xing, 1996*). Većina zemljišta sadrže mnoštvo pora sa dijametrima 20 nm i manjim (*Alexander, 1995*). Ovakve pore su isuviše male da bi omogućile najmanjim bakterijama (1 μm), višim organizmima (protozoe 10 μm), ili vlasima korenja (7 μm) da prođu do njih. Iz tog razloga je kontaminant smešten u ovako finim porama zaštićen od „napada“ biote iz zemljišta, tj., kontaminant nije biodostupan.

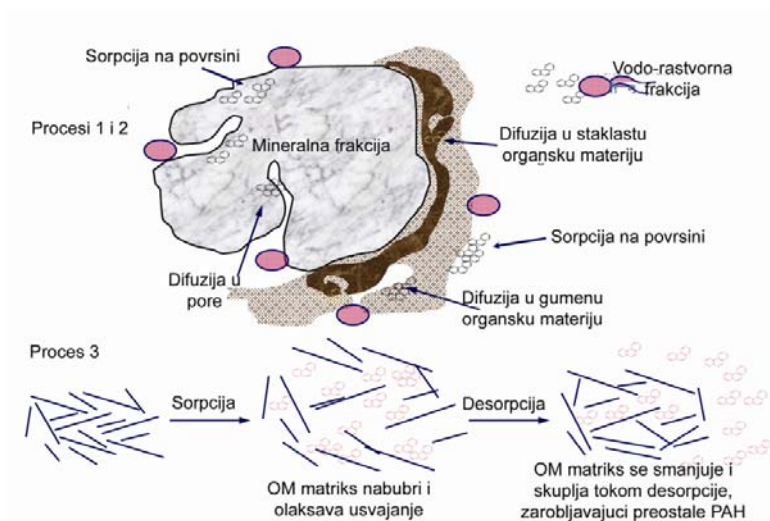
Biodostupnost

Termin „biodostupnost“ odnosi se na frakciju hemikalija u zemljištu koja se može usvojiti ili transformisati živim organizmima. Dva važna faktora određuju količinu hemikalija koja je biodostupna: (1) brzina transfera posmatranog jedinjenja do žive ćelije (transfer mase) i (2) brzina usvajanja i metabolizam (intristička aktivnost ćelija). Biodostupnost nekog jedinjenja se određuje kao odnos transfera mase i intrističke aktivnosti zemljišne biote (*Bosma et al., 1997*). Biodostupnost se takođe definiše kao stepen do koga jedinjenja mogu slobodno da se kreću u ili na organizam, ovakva definicija je najbolje korišćena u kontekstu specifičnih organizama zbog toga što je poznato da se biodostupnost razlikuje između organizama i jednakih vrsta (*Reid et al., 2000a*). Određivanje biodostupnosti kontaminanta u zemljištu od esencijalne je važnosti za razumevanje rizika uzrokovanog kontaminantima i za određivanje potrebnih mera za uspešnu bioremedijaciju.

Kao što je već rečeno sekvestracija i starenje organskih kontaminanata u zemljištu redukuje biodostupnost organskih jedinjenja što rezultuje stavljanjem ne-degradabilnog reziduala u zemljištu. Kontaminanti koji su podlegli procesu sekvestracije i starenja nisu dostupni za biodegradaciju u zemljištu čak iako su sveže dodata jedinjenja još uvek biodegradabilna (*Alexander, 1995*). Sorpcija je glavni faktor koji sprečava kompletnu bioremedijaciju ugljovodonika u zemljištu (*Bosma et al., 1997*). Spora sorpcija dovodi do toga da frakcija HOC postaje rezistentna na desorpciju i raste njena prezistentnost u organskom matriksu zemljišta (*Hatzinger i Alexander, 1995*). Sledeće hipoteze su predložene kao objašnjenje za starenje.

1. Ostarela frakcija rezultuje od spore difuzije HOC u čvrstoj frakciji organske materije u zemljištu, (*Alexander, 2000*).
2. Kontaminant sporo difunduje kroz zemljište i postaje sorbovan i zarobljen u nano- i mikroporama zemljišta (*Hatzinger i Alexander, 1995*), (slika 2.22.).

Naravno, može doći do sekvestracije kontaminanta kombinacijom oba gore pomenuta mehanizma (slika 2.22.). Dokazi za sekvestraciju kontaminanta uključuju (1) laboratorijska i terenska ispitivanja, koja demonstriraju opadanje dostupnosti za organizme (*Chung i Alexander, 1998*); (2) ispitivanje ekstraktabilnosti ostarelih HOC i kinetike sorpcije i desorpcije (*Hatzinger i Alexander, 1995*); (3) privremene promene u brzini i stepenu mineralizacije kontaminanta (*Hatzinger i Alexander, 1995*; *Reid et al., 2000b*); i procena toksičnosti. Jednostavnije, starenje može biti povezano sa kontinualnom difuzijom HOC u male pore gde se organski molekuli zadržavaju sorpcijom. Ovo objašnjava opadanje ekstraktabilnosti i biodostupnosti HOC. Ovo takođe znači da organska jedinjenja koja su bila u kontaktu sa zemljištem dugo vremena najverovatnije nisu dostupna za ljude, životinje i biljke (*Alexander, 1995*). Međutim, još uvek nije poznato koliko dugo će ova frakcija ostati u ovom stanju ili da li će se kontaminanti remobilizovati i postati ekstraktabilni i biodostupni.



Slika 2.22. Fizičko ponašanje kontaminanta u zemljištu

Mikrobijalna populacija i razvoj katabolizma

Mikrobijalna populacija.

Zemljišta obično sadrže veliki broj različitih mikroorganizama uključujući i bakterije, alge, gljive, protozoe i aktinomycete. Od ovih organizama, bakterije su najbrojnija, biohemijski najaktivnija grupa i pri praktično niskim nivoima kiseonika. Bakterije zahtevaju izvor ugljenika, azota i fosfora za njihov ćelijski rast i izvor energije za održavanje metaboličke funkcije potrebne za njihov rast. Odgovarajući tip i količina mikroorganizama je obično prisutna u zemljištu, međutim u poslednje vreme zagađeno zemljište se često meša sa kultivisanim mikroorganizmima ili životinjskim stajnjakom. Dodatak stajnjaka ima dve svrhe: augmentaciju mikrobijalne populacije i obezbeđivanje dodatne količine nutrijenata.

Za produkciju energije u metaboličkim procesima bakterija neophodni su terminalni elektron akceptori (TEA) za enzimatsku oksidaciju izvora ugljenika do ugljen-dioksida. Mikrobi su klasifikovani prema izvoru ugljenika i TEA koje koriste za svoje metaboličke procese. Bakterije koje koriste organska jedinjenja (npr., naftne produkte ili prirodna organska jedinjenja) kao njihov izvor ugljenika su *heterotrofi*; oni koji koriste jedinjenja neorganskog ugljenika (npr., ugljen-dioksid) su *autotrofi*. Bakterije koje koriste kiseonik kao njihov TEA su aerobne; a one koje koriste druga jedinjenja umesto kiseonika (npr., nitrate, sulfate) su anaerobne; a one koje mogu da koriste i kiseonik i druga jedinjenja kao izvor TEA su *fakultativne*. Za procese biodegradacije naftnih produkata važnu ulogu imaju obe grupe bakterija, fakultativne i heterotrofne.

Brojnost mikroorganizama u zemljištu se obično kreće u opsegu 10^4 do 10^7 po gramu zemljišta. Za efikasnu biodegradaciju ova brojnost ne bi trebalo da je manja od 10^3 po gramu zemljišta. Brojnost manja od 10^3 po gramu zemljišta ukazuje na prisustvo toksičnih koncentracija organskih ili neorganskih jedinjenja (npr., metala). U ovoj situaciji bioremedijacija i dalje može biti efikasna ako se zemljište kondicionira u cilju smanjivanja toksične koncentracije i povećanja brojnosti mikroorganizama.

Ponekad su potrebni dodatni laboratorijski testovi da bi se identifikovale prisutne bakterijske vrste. Ovo može biti poželjno ako postoji nesigurnost da li su mikrobi koji degradiraju specifične naftne produkte prisutni u zagađenom zemljištu. Ako je nedovoljan broj ili tip mikroorganizama prisutan, brojnost populacije se može povećati uvođenjem kultivisanih mikroba koji su dostupni iz brojnih drugih izvora.

Pored kvasaca iz rodova *Candida* (*C. lipolytica*, *C. tropicalis*), *Hansenula*, *Torulopsis*, *Rhodotorula* i gljiva iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* i druge, osnovnu ulogu u biodegradaciji ugljovodonika nafte imaju bakterije, među kojima dominiraju vrste iz rodova *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* i druge.

Nedavno je predloženo korišćenje određenih vrsta gljiva za degradaciju organskih konstituenata na osnovu obećavajućih laboratorijskih testova. Primena gljiva se pojavljuje kao tehnologija remedijacije koja može biti efektivna za mnoge tipove organskih kontaminanata. Gljive ne metabolizuju kontaminante, nego se degradacija se odvija izvan njihovih ćelija. One degradiraju lignin, koji im mora biti obezbeđen, obično u obliku slame ili piljevine pomešane sa zemljištem. U procesu degradacije lignina, gljive luče druge hemikalije koje degradiraju organske kontaminante, pri čemu se ovaj proces se zove ko-metabolizam. Ova tehnologija još uvek nije podvrgnuta ekstenzivnom terenskom ispitivanju, laboratorijski testovi su pokazali da može degradirati organske kontaminante ispod granice detekcije (*USEPA*, 1994).

Razvoj katabolizma

Sposobnost zemljišnih mikroorganizama da degradiraju HOC je fundamentalno za zdravlje i plodnost zemljišta. Jedan od ključnih mehanizama za uklanjanje HOC iz zemljišta je katabolička aktivnost mikroba (*Pritchard i Bourquin*, 1984). Mikroflora zemljišta ima različit kapacitet za usvajanje HOC. Ova katabolička aktivnost je primarno posledica ko-evolucije zemljišne mikroflora i prirodnih organskih materija, koje imaju hemijsku strukturu analognu posmatranim HOC (*Dagely*, 1975). Brzina mikrobijalne dekompozicije HOC u zemljištu je funkcija nekoliko faktora, ili jednog ili njihove kombinacije (*Macleod et al.*, 2001):

1. dostupnost kontaminanata organizmima koji imaju sposobnost da ih degradiraju;
2. broj prisutnih degradirajućih mikroorganizama u zemljištu;
3. aktivnost degradirajućih mikroorganizama, i
4. molekulska struktura kontaminanta.

Međutim, procesi koji kontrolišu evoluciju kataboličkih aktivnosti u zemljištu nisu u potpunosti razjašnjeni. Katabolička aktivnost se može razviti usvajanjem sledećih procesa:

1. indukcije ili depresije specifičnih enzima;
2. razvojem novih metaboličkih sposobnosti preko genetskih promena, transformacije ili mutacije plazmoida, i
3. selektivno obogaćivanje organizama koji imaju sposobnost da transformišu ciljane kontaminante (*Spain i van Veld*, 1983; *Pritchard i Bourquin*, 1984).

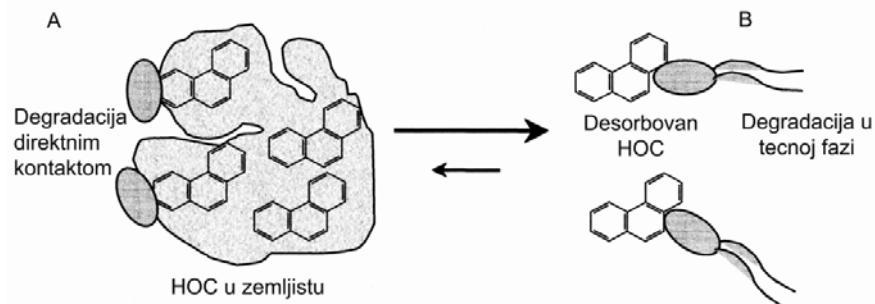
Smatra se da je adaptacija kontrolisana koncentracijom HOC koja interreaguje sa mikroflorom, kao i dužinom kontaktnog vremena kontaminanta i zemljišta (*Bosma et al.*, 1997; *Alexander*, 2000; *Macleod et al.*, 2001). Na primer *Macleod i Semple* (2002) su ispitivali razvoj kataboličke ativnosti za piren na dva tipa zemljišta (sa

pašnjaka i iz šume) sa nejednakom količinom organske materije, u oba zemljište je dodat piren u koncentraciji od 100 mg/kg. Za mineralizaciju pirena u zemljištu sa pašnjaka je trebalo 8 nedelja, dok je u zemljištu iz šume trebalo 76 nedelja. Ovo ispitivanje je pokazalo da je piren u zemljištu iz šume bio biodostupan ali mikrobijalna zajednica iz zemljišta nije mogla da mineralizuje piren. Istraživači su takođe zaključili da izostanak katabolički aktivnosti može biti posledica sporijeg transfera pirena od zemljišta do mikroorganizama u zemljištu iz šume kao posledice velikog sadržaja organske materije u ovom zemljištu. Frekvencija unošenja (dodavanja) HOC u zemljište takođe se smatra važnom u formiranju brzine i stepena kataboličke aktivnosti (Carmichael et al., 1997; Thompson et al., 1999).

Mikrobijalni katabolizam je principijalni mehanizam za uklanjanje kontaminanata, kao što su PAH, iz zemljišta. Za slabo rastvorne kontaminante, biodegradacija je generalno sporija nego za rastvornije kontaminante, s obzirom da se kontaminanti brže raspodeljuju sa čvrstom fazom zemljišta (Bosma et al., 1997). Mikroorganizmi mogu da usvajaju kontaminante iz tečne faze direktnim kontaktom ćelija sa organskim kontaminantom, ili sa submikrometerskim česticama dispergovanim u tečnoj fazi (Nakahara et al., 1977). Mikrobijalna interakcija sa HOC uključuje dva procesa (Bosma et al., 1997):

1. fizičke ili hemijske komponente uključene u kretanje kontaminanta u fizičku sredinu, u relaciji sa degradirajućim mikroorganizmima, i
2. biološke komponente uključene u metabolizam kontaminanta.

Relativna važnost ovih mehanizama zavisi od jačine sekvencije kontaminanta kao i od brzine degradacije. Na brzinu kojom sekevestrovani HOC postaju dostupni utiče sposobnost mikroorganizama da redukuju koncentraciju u tečnoj fazi i tendencije organizama da vezuju sorbent (Calvillo i Alexander, 1996). Ovo je prikazano na slici 2.23., gde je prikazan mogući mehanizam mikrobijalnog usvajanja kontaminanta, direktni kontakt ili u tečnoj fazi. Povećano kontaktno vreme smanjuje veličinu brzo desorbujuće faze i stepen biodegradacije (Hatzinger i Alexander, 1995; Pignatello i Xing, 1996; Cornelissen et al., 1998). Guerin i Boyd (1992) i Calvillo i Alexander (1996) su pokazali da prisustvo degradirajućih mikroorganizama menja desorpcionu brzinu kontaminanata sa sorbovane površine. Promena se dešava zbog toga što mikroorganizmi usvajaju kontaminante koji su lako dostupni preko tečne faze što dovodi do desorpcije kontaminanata sa čvrste površine u tečnu fazu (slika 2.23.) (Bosma et al., 1997).



Slika 2.23. Mikrobiološko usvajanje hidrofobnih organskih kontaminanata u zemljištu: A – predstavlja direktni kontakt, B – predstavlja degradaciju u tečnoj fazi, Pravac i veličina strelica reprezentuju interakciju između kontaminanta i zemljišta u pornoj vodi

2.3.4. Metode za monitoring i razvoj bioremedijacionih procesa

Redovan monitoring je neophodan da bi se optimizovala brzina biodegradacije, da bi se pratila redukcija koncentracije kontaminanata, emisija isparljivih komponenti, migracija (sekvestracija) kontaminanata u zemljište, da bi se utvrdilo da li proces bioremedijacije teče u optimalnim uslovima u pogledu pH vrednosti, sadržaja vlage i nutrijenata itd. Tehnike za monitoring i razvoj bioremedijacionih procesa se grubo mogu podeliti na hemijske i biološke.

Hemijske metode za praćenje i razvoj bioremedijacionih procesa

Tehnike za analizu naftnih ugljovodonika

Određivanje sadržaja naftnog zagađenja u zemljištu vrši se u cilju procene biodegradacionog potencijala kontaminiranog zemljišta, određivanja završene tačke bioremedijacije u pogledu zadovoljavanja regulatornih kriterijuma i u cilju praćenja promena koncentracija specifičnih ciljanih ugljovodonika. Od specifičnih ciljanih ugljovodonika za praćenje procesa bioremedijacije zemljišta kontaminiranog naftom i naftnim derivatima najznačajnije je praćenje rezidualne koncentracije alifatičnih, aromatičnih i biomarker jedinjenja. Tehnike koje se koriste za analizu naftnih ugljovodonika mogu se podeliti na osnovu podataka koji se njima dobijaju: kvantifikovanje ukupne količine naftnih ugljovodonika, koncentracije različitih grupa ugljovodonika ili koncentracije specifičnih ciljanih jedinjenja (*Weisman, 1998*), pregled ovih tehnika dat je u tabeli 2.2. Dodatno, postoje metode za brzi skrining kontaminiranih lokaliteta. Međutim, većina ovih tehnika je zasnovana na merenju koncentracije para dobijenih u vadoznoj zoni ili zemljišnom gasu. U slučaju zemljišta zagađenog starim naftnim zagađenjem ove metode uglavnom nisu relevantne i smatraju se ne specifičnim tehnikama. Podaci dobijeni ovim metodama nisu korisni za procenu rizika, međutim, ove metode su jeftine, brze i jednostavne za izvođenje tako da su veoma pogodne za skrining zagađenih lokaliteta. Najčešće korišćene specifične metode podrazumevaju korišćenje gasne hromatografije, gasne hromatografije sa masenim detektorom (GC-MS), gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID), infracrvenu spektrometriju (IR), tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (HPLC), i gravimetrijsku analizu (*Weisman, 1998; Brassington et al., 2007*).

GC-FID metodom se određuju svi nepolarni ugljovodonici koji mogu da se ekstrahuju primenjenim rastvaračima, eluiraju sa kolone i sagore. Koncentracija ugljovodonika određuje se merenjem površine određenog dela hromatograma, u zavisnosti od opsega ugljovodonika koji se meri. Primarna prednost ove metode se ogleda u tome da se pored ukupnog sadržaja ugljovodonika dobijaju informacije o tipu prisutnih naftnih ugljovodonika. Detekcioni limit metode zavisi od matriksa i specifikacije primenjene metode i kreće se u opsegu oko 10 mg/kg zemljišta. Ovom metodom se određuje opseg ugljovodonika od C₆ – C₃₆, što znači da se volatilne komponenta koje se eluiraju pre rastvarača neće meriti. Mnogu derivati nafte sadrže ugljovodonike sa više od 40 C atoma, sirova nafta može sadržati ugljovodonika sa čak 100 C atoma. Ovi ugljovodonici su izvan mernog opsega većine GC metoda, ali postoje specijalizovani gasni hromatografi dizajnirani da mogu da analiziraju ove

visokomolekularne ugljovodonike, mada se u ovakvim slučajevima uglavnom koriste druge tehnike kao što su IR spektrometrija i gravimetrijska analiza.

Tabela 2.2. Analitičke metoda za merenje ukupnih i specifičnih ugljovodonika

Metoda	Tip produkata koji se određuje	Opseg ugljovodonika koji se određuje
GC – FID metode	Uglavnom benzini, dizel ulja i lož ulja, a može se modifikovati i za teže frakcije nafte (maziva i teška ulja).	Obično od C ₆ – C ₃₆ (može biti modifikovana za veći opseg ugljovodonika).
IR – metode	Uglavnom dizel ulja, lož ulja, maziva i teška ulja.	Većina prisutnih ugljovodonika osim volatilnih i veoma teških.
Gravimetrijske metode	Uglavnom teže frakcije nafte – sirova nafta, maziva i teška ulja.	Sve što može da se ekstrahuje (osim volatilnih ugljovodonika koji se gube).
Skrining metode	Različiti produkti (ali se dobijaju samo orjentacioni podaci).	Aromatični ugljovodonici (BTEX, PAH).
Metode za određivanje sadržaja specifičnih ugljovodonika		
GC – MS metode	Uglavnom benzini, dizel ulja i lož ulja, a može se modifikovati i za teže frakcije nafte.	Volatilne i semivolatilne frakcije nafte.
HPLC metode	Uglavnom benzini, dizel ulja i lož ulja i teže frakcije nafte.	Semivolatilne i nevolatilne komponente, PAH i različiti derivati aromatičnih i heterocikličnih jedinjenja.

Metode gasne hromatografije su najčešće korišćene tehnike za analizu naftnih ugljovodonika, zbog toga što su relativno osetljive, selektivne i mogu biti korišćene za određivanje specifičnih ciljnih jedinjenja. S obzirom da je sastav sirove nafte i njenih produkata veoma kompleksan i postoji visok stepen varijacija između nafte različitog porekla, što omogućava da se za svaku od njih izoluje jedinstveni hemijski “otisak prsta”. Ovo može biti korišćeno u cilju određivanja izvora naftne kontaminacije zemljišta, o čemu će biti više reči kasnije u poglavlju o biomarker jedinjenjima. GC-FID tehnika se može koristiti i za analizu specifičnih naftnih prdukata, kao na primer za opseg ugljovodonika u benzinu i dizelu, međutim često se dešava da veliki udeo prisutnih ugljovodonika ne može da se razloži što je karakteristično za staro ugljovodonično zagađenje.

Nedostaci GC-FID metode vezani su za, kao što je to već spomenuto, nemogućnost kvantifikovanja ugljovodonika manjih od C₆ i većih od C₃₅, kao i za činjenicu da se ovom tehnikom ne mogu određivati polarne komponente nafte (jedinjenja koja sadrže azot, sumpor i kiseonik) i produkti oksidacije nafte (Weisman, 1998). Gasno hromatografske tehnike su zahtevnije od drugih tehnika, i zehtevaju da su uzorci volatilni pri primenjenim operacionim uslovima. Problemi takođe mogu nastati sa ko-elucijom jedinjenja koja imaju slične tačke ključanja pa samim tim mogu da izlaze na istom retencionom vremenu, što je za očekivati s obzirom da nafta sadrži puno izomera. U slučaju da imamo zemljište koje je zagađeno starim naftnim zagađenjem koje je obično slabo volatilno i ima visoku temperature ključanja potrebni su visoko temperaturni operacioni uslovi u koloni (Weisman, 1998; Brassington et al., 2007).

IR spektrometrijom određuju se svi ugljovodonici koji mogu da se izekstrahuju rastvaračima kao što su freon ili ugljen-tetrahlorid. Ovom tehnikom moguće je

odrediti ukupan sadržaj polarnih i nepolarnih ugljovodonika, pri čemu se nepolarni ugljovodonici dobijaju nakon prečišćavanja ekstrakta na aluminijum oksidu ili florisilu. Primarna prednost ove metode je jednostavnost, brzina određivanja i manji troškovi u odnosu na gasno hromatografske metode. Detekcioni limit ove metode je oko 10 mg/kg. Veliki nedostatak IR-tehnike ogleda se u tome da ova tehnika ne daje nikakve informacije o tipu prisutnih ugljovodonika niti o prisustvu toksičnih molekula, a takođe ne dobijaju se specifične informacije o potencijalnom riziku vezanom za kontaminaciju.

Određivanje ugljovodonika infracrvenom spektrometrijom podrazumeva merenje apsorpcije na CH traka koje potiču iz CH₃, CH₂ i CH grupa ugljovodonika, nakon ekstrakcije zemljišta sa pogodnim rastvaračem. IR metod je osetljiviji za zasićene ugljovodonike nego za aromatične. Da bi se dobili što pouzdaniji kvantitativni rezultati, potrebno je pripremiti standardnu smešu od smeše ugljovodonika, čiji sastav približno odgovara sastavu kontaminanata ugljovodonika u zemljištu koji će se određivati (Weisman, 1998).

Gravimetrijske metode mere sve ugljovodonike koji mogu da se ekstrahuju primenjenim rastvaračem, i koji se ne uklanjaju tokom uklanjanja rastvarača isparavanjem. Neke gravimetrijske metode uključuju i korak prečišćavanja radi uklanjanja biogenog materijala. Prednost ove tehnike je jednostavnost, brzina određivanja i najmanjih zahteva u pogledu potrebne opreme i materijala u odnosu na sve druge spomenute tehnike. Detekcioni limit je oko 50 mg/kg zemljišta. Ova metoda nije pogodna za merenje lakoisparljivih ugljovodonika koji isparavaju pri temperaturama nižim od 70-85°C. Ove metode se preporučuju za određivanje ugljovodonika u zemljištu koje je zagađeno velikim količinama teške frakcije nafte. Veliki nedostatak ove metode ogleda se u tome da ova tehnika ne daje nikakve informacije o tipu prisutnih ugljovodonika niti o prisustvu toksičnih molekula, a takođe ne dobijaju se specifične informacije o potencijalnom riziku vezanom za kontaminaciju (Weisman, 1998).

Skrining tehnike se zasnivaju na korelaciji sadržaja ukupnih ugljovodonika sa odgovorom antitela specifičnih komponenata nafte. Postoje više različitih terenskih instrumenata za brzo određivanje naftnih ugljovodonika, ovi instrumenti su dizajnirani za analiziranje u terenskim uslovima.

GC-MS - Gasna hromatografija sa masenom detekcijom se rutinski primenjuje za identifikaciju individualnih komponenti naftnih ugljovodonika. Ove metode imaju visok nivo selektivnosti i mogućnost potvrde identiteta jedinjenja primenom retencionog vremena i jedinstvenog izgleda hromatograma. GC-MS omogućava potvrdu ciljanog analita i identifikaciju ne ciljanih analita, i može se koristiti za separaciju ugljovodonika u klase. Nedostatak ovih metoda je da izomerna jedinjenja imaju identične hromatograme, dok mnogo različitih jedinjenja može imati slične hromatograme. Teške frakcije nafte mogu sadržati na hiljade komponenata koje se ne mogu razdvojiti u gasnom hromatografu. Različita jedinjenja mogu imati iste jone, što otežava proces identifikacije (Jensen et al., 2000).

Tehnike za određivanje dostupnosti ugljovodonika u zemljištu

Maseni transfer kontaminanta određuje mikrobijalnu biodostupnost (Bosma et al., 1997; Carmichael et al., 1997) i posebno veličinu brzo i sporo desorbujuće frakcije (Cornelissen et al., 1998). Usvajanje kontaminanta je brže iz fluida nego iz sorbovanog stanja (Ogram et al., 1985), pa s obzirom da se većina ugljovodonika slabo rastvara u vodi i jako sorbuje na zemljištu samo će mala porcija posmatranog kontaminanta biti prisutna u vodi koja je u kontaktu sa zemljištem. Zbog toga je voda

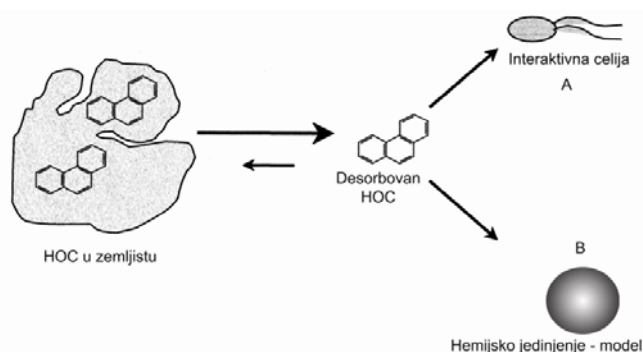
loš izbor rastvarača za procenu biodostupnosti, s obzirom da će velika labilna frakcija ugljovodonika ostati na čvrstoj fazi zemljišta (Reid *et al.*, 2000a). Idealno ekstrakciono sredstvo bi prema tome bilo ono koje može da izekstrahuje celokupnu labilnu frakciju kontaminanta iz zemljišta, ponekad možda oponašajući interakcije između mikroba i kontaminanta.

Konvencionalne ekstrakcije podrazumevaju primenu organskih rastvarača za uklanjanje što je više moguće kontaminanta. Ovakav način ekstrakcije ne reprezentuje dobro frakciju ugljovodonika koja je dostupna bioti zemljišta. Alternativni pristup, prvi put primenjen od strane Alexander (1995), je primena blagih organskih rastvarača i ekstrakcionih uslova. Hipoteza na kojoj je baziran ovaj pristup je zasnovana na: (1) ugljovodonicima u zemljištu se sastoji od leko ekstraktibilne frakcije kao i od jako sekvestrovane frakcije i (2) ova lako ekstraktibilna frakcija bolje reprezentuje biodostupnu frakciju nego ukupna količina kontaminanta. Hatzinger i Alexander (1995) su ispitivali biodostupnost fenantrena koji je bio podvrgnut procesu starenja u sterilnom zemljištu. Količina mineralizovanog fenantrena nakon dodatka inokuluma opala je sa vremenom starenja; količina fenantrena koja se može izekstrahovati butanolom je takođe opala. Kelsey *et al.* (1997) je testirao devet kombinacija blagih rastvarača za blagu ekstrakciju i zaključio da je butanol najadekvatniji rastvarač za procenu biodostupnosti kontaminanta glistama i bakterijskom inokulumu. Međutim, za blagu ekstrakciju organskim rastvaračima nije pokazano da je pouzadana u predviđanju biodostupne frakcije, zbog kompleksnosti interakcija između fizičko-hemijskih osobina kontaminanta, zemljišta i biote. Do danas, selekcija blagih organskih rastvarača i ekstrakcionih uslova je razvijana empirijski, iz dobijenih korelacija sa eksperimentalno izmerenom i definisanom biodostupnošću.

Jedan od najznačajnijih napredaka je vezan za primenu čvrsto-tečne mikroekstrakcije (SPME), izbegavajući u potpunosti primenu rastvarača. Ako se čvrsta faza adsorbenta dovede u kontakt sa suspenzijom zemljišta i vode, ugljovodonicima mogu difundovati sa zemljišta na adsorbent. Ovo može biti korišćeno kao brza i adekvatna alternativa konvencionalnim ekstrakcijama (Eriksson *et al.*, 1998) i može se koristiti za procenu biodostupnosti. Primena odgovarajućeg adsorbenta kao što je Tenax, će obezbediti da koncentracija ugljovodonika u tečnoj vazi u suspenziji zemljišta i vode bude efektivno nula (Yeom *et al.*, 1996). Adsorbent maksimizuje difuzioni gradijent delujući kao beskonačni odvod za ugljovodonicima - razmenljiva frakcija ugljovodonika sorbovana na zemljištu se transferuje na adsorbent.

Mnogi pokušaji su napravljeni da bi se poboljšala validacija blagih ekstrakcionih metoda koje bolje oponašaju transfer koji se odvija tokom biodegradacije. U poslednjih nekoliko godina, mnoga istraživanja su bila posvećena razvoju metoda za merenje biodostupnosti ugljovodonika koje možda oponašaju mikrobijalne interakcije sa ugljovodonicima (slika 2.24.). Tehnike uključuju oksidaciju peroksidom (Cuypers *et al.*, 2000) i ekstrakciju ciklodekstrinima (Reid *et al.*, 2000b; Cuypers *et al.*, 2001, 2002). Sve ove tehnike su pokazale jake korelacije između mikrobijalno degradabilne frakcije i frakcije dostupne za hemijsku ekstrakciju. Ove tehnike su uglavnom bile fokusirane na ispitivanje PAH. Tehnike variraju u njihovoj kompleksnosti. Prednost ekstrakcije ciklodekstrinima naspram čvrsto-tečne ekstrakcije i oksidacije persulfatom je njena jednostavnost: zahteva samo jednostavno mućkanje, i visoko je reproduktivna. Međutim malo je poznato o primenljivosti ovih tehnika na druge organske kontaminante u bioti zemljišta, i to je teme za buduća razmatranja.

Za ispitivanje biodostupnosti ugljovodonika objavljano je i nekoliko radova, sa zadovoljavajućim rezultatima primenom ekstrakcije hidrofobne organske materije različitim surfaktantima (Volkering *et al.*, 1998; Wahle i Kordel, 1997; Barthe i Pelletier 2007). Treba napomenuti da se surfaktanti ne koriste samo kao pogodna ekstrakciona sredstva za predviđanje biodostupnosti, takođe je u literaturi objavljeno da surfaktanti mogu da povećaju biodostupnost hidrofobnih organskih materija (Volkering *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Jordan i Cuningham, 1999).



Slika 2.24. Teorijski mehanizam biodegradacije fenantrena (A) i model hemijskog jedinjenja, omogućava određivanje stepena biodegradacije (Semple *et al.*, 2003)

Mikrobiološke metode za praćenje i razvoj bioremedijacionih procesa

Biološke metode su svakako neophodne za kompletiranje tradicionalnog pristupa hemijskih analiza da bi se verifikovao koncept biodostupnosti. Tradicionalne metode monitoringa zemljišnih mikroba su zasnovane na merenju promena u mikrobijalnoj biomasi, broju mikroorganizama, enzimske aktivnosti i odgovora ključnih procesa u zemljištu. Metode su uglavnom fokusirane na specifične kataboličke procese gde se dobijaju najrelevantnije informacije (Macleod *et al.*, 2001).

Brojnost bakterija

Inicijalna analiza brojnosti ukupnih heterotrofnih i specifičnih ugljovodonik oksidujućih bakterija u kontaminiranom zemljištu može dati korisne informacije o biološkoj aktivnosti zemljišta, i stepena aklimatizacije indogene mikrobijalne populacije na uslove kontaminiranog lokaliteta. Ovi rezultati takođe pokazuju da li zemljište sadrži zdravu indogenu mikrobijalnu populaciju sposobnu za izvođenje procesa bioremedijacije. Takođe, monitoring mikrobijalne populacije tokom bioremedijacije je jedan od korisnih načina za praćenje promena mikrobiološke aktivnosti usled degradacije ugljovodonika. Pokazano je da postoji veoma dobra korelacija između brojnosti mikroorganizama i biodegradacije ugljovodonika (Al-Awadhi *et al.*, 1996; Song i Bartha, 1990).

Ukupna brojnost bakterija se najčešće određuje u reprezentativnom kompozitnom uzorku zemljišta, primenom standardne serije razblaženja i tehnikom brojanja na nutrijentnim agarizovanim podlogama (Rodina, 1972). Ugljovodonik oksidujuće bakterije mogu biti određene na sličan način, s tim što se koristi čvrst mineralni medijum sa dodatkom odgovarajućeg jedinjenja ugljovodonika, kao što je

na primer n-heksadekan, kao jedinog izvora energije i ugljenika. Određivanje brojnosti specifičnih ugljovodonik oksidujućih bakterija obezbeđuje dodatne informacije o potencijalu degradacije ugljovodonika i posmatranom zemljištu. Procentualni udeo ugljovodonik oksidujućih bakterija u ukupnoj brojnosti heterotrofnih bakterija obično reflektuje stepen mikrobijalne aklimatizacije i procese degradacije ugljovodonika u kontaminiranom zemljištu. Tehnika određivanja brojnosti mikroorganizama na agarizovanoj podlozi ima nekoliko nedostataka naročito ako se određuju nekulturable mikroorganizmi (*Balba et al., 1998*).

Dehidrogenazna aktivnost

Biološka oksidacija organskih jedinjenja je generalno dehidrogenacioni proces, koji je katalizovan dehidrogenaznim enzimima (*Page et al., 1982*). Zbog toga ovaj enzim ima esencijalnu ulogu u oksidaciji organske materije, gde transferuje vodonik od organskog supstrata do elektron akceptora. Mnogo različitih specifičnih enzimskih sistema je uključeno u dehidrogenaznu aktivnost zemljišta. Ovi sistemi su integralni deo zemljišnih mikroorganizama i reflektuju u velikoj meri biohemijsku aktivnost zemljišta.

Određivanje dehidrogenazne aktivnosti zemljišta može biti korišćeno kao jednostavan metod za ispitivanje mogućih inhibitornih efekata kontaminanta na mikrobiološku aktivnost zemljišta (*Bartha, 1986*). Na primer, toluen i hloroform, ako su prisutni u povišenim koncentracijama, mogu jako inhibirati dehidrogenazu u zemljištu, ali imaju mali efekat pri niskim koncentracijama (*Page et al., 1982*). Međutim, pošto dehidrogenazna aktivnost zavisi od ukupne mikrobiološke aktivnosti mikroorganizama u zemljištu, njene vrednosti u različitim zemljištima ne reflektuju uvek ukupan broj vijabilnih mikroorganizama izolovanih na posmatranom medijumu (*Page et al., 1982*).

Najčešće korišćeni metod za određivanje dehidrogenazne aktivnosti je kolorimetrijski metod, gde se koristi 2,3,5-trifenil tetrazolijum hlorid (TTC) koji deluje kao elektron akceptor za mnoge dehidrogenazne enzime (*Page et al., 1982*). Redukcijom ovog jedinjenja katalitičkim efektom dehidrogenaza iz zemljišta nastaje trifenil formazan koji ima karakterističnu crvenu boju čiji intenzitet se može meriti na 485 nm (*Page et al., 1982*). Intenzitet crvene boje dobijene ispitivanjem dehidrogenaza je dobar indeks za mikrobiološku aktivnost ispitivanog zemljišta. Međutim, nekoliko faktora može uticati na aktivnost dehidrogenaza u zemljištu. Takođe, nitrati, nitriti i joni gvožđa (III) inhibiraju dehidrogenaznu aktivnost, s obzirom da ovi joni deluju kao alternativni elektron akceptori.

Respirometrijski test zemljišta

Mineralizacioni testovi koji uključuju merenje produkcije CO₂ mogu obezbediti izvanrednu informaciju o biodegradabilnom potencijalu ugljovodonika u kontaminiranom zemljištu. Ovaj pristup se smatra preliminarnim korakom u studijama izvodljivosti, jer obezbeđuje brze i relativno nedvosmislene podatke koji su pogodni za testiranje različitih bioloških opcija tretmana, kao što je dodatak nutrijenata, mikrobiološka inokulacija itd. Test se takođe može koristiti za potvrdu aktivne degradacije ugljovodonika i za određivanje mikrobijalno dostupne frakcije kontaminant u zemljištu tokom procesa bioremedijacije (*Hatzinger i Alexander, 1995; White et al., 1997; Macleod i Semple, 2000; Reid et al., 2000b; Kim et al., 2005*). Tokom respiracionog testa mogu se pratiti potrošnja kiseonika i/ili produkcija ugljen-dioksida primenom ili skupe automatske opreme koja može simultano da meri veliki broj uzoraka, ili jednostavnih respirometrijskih boca koje se najčešće i koriste (*Bartha*

i Pramer, 1965; Pritchard i Costa, 1991). Merenje potrošnje kiseonika može se vršiti primenom različitih manometara i kontrole pritiska, s obzirom da prilikom potrošnje kiseonika od strane aerobnih mikroorganizama, nastaje merljivi negativni pritisak u respirometrijskoj boci koji je u direktnoj vezi sa parcijalnim pritiskom kiseonika. Ugljen-dioksid koji se razvija tokom respirativnih procesa može se apsorbovati u kalijum-hidroksidu koji se može nalaziti u centralnom delu respirometrijske boce ili u posebnom odeljku koji je prikačen sa strane na respirometrijsku bocu. Količina apsorbovanog ugljen-dioksida, se zatim meri titracijom rezidualnog KOH sa standardnim rastvorom hlorovodonične kisline, nakon dodatka barijum-hlorida za precipitaciju karbonata. Ova testovi se takođe mogu koristiti za procenu mogućih inhibitornih efekata teških metala, toksičnih jedinjenja i pH na mikrobiloške aktivnosti u zemljištu (Balba et al., 1998; Loehrer et al., 2001).

Mikrobijalna respiracija može biti korišćena za kvantifikovanje uticaja kontaminanta na mikroorganizme u zemljištu ili za merenje katabolizam određenog kontaminanta do CO₂. U ovu svrhu, primena ¹⁴C-obeležene supstrate je neophodna za praćenje sudbine spajkovanih organskih jedinjenja u zemljištu i za izračunavanje ukupnog masenog bilansa. Merenjem biodegradacije ¹⁴C-obeženih ugljovodonika do ¹⁴CO₂, može se odrediti katabolički potencijal mikrobijalne zajednice zemljišta (Reid et al., 2001; Stroud et al., 2007). Dodatno, uticaj na mikrobijalnu kataboličku aktivnost zavisi od biodostupnosti kontaminanta u zemljištu (Reid et al., 2000a). Primena ¹⁴C-obeženih supstrata omogućava da se sudbina organskih kontaminanata i njihova biodostupnost uspešno prate, čak i tamo gde dolazi do kompletne destrukcije originalnog ugljenikovog skeleta (Hatzinger i Alexander, 1995; Reid et al., 2000b; Stroud et al., 2007). Nekoliko uređaja je razvijeno za praćenje oslobađanja ¹⁴CO₂ iz ¹⁴C-obeženih supstrata i statičnim i protočnim sistemima. Statični sistem se široko primenjuje, njegova prednost je jednostavnost, mala cena i mala nesigurnost u pogledu protoka, curenja i sorpcije ¹⁴C-obeženih materijala. Jednostavan respirometrijski sistem je efektivan za kvantifikaciju brzine i stepene mineralizacije HOC u zemljištu (Reid et al., 2001).

Testovi biodegradacije u mikrokosmosu

Postoje brojne definicije “mikrokosmosa”. Najtipičnija je ona koja podrazumeva da se netaknuti, minimalno narušeni deo ekosistema donese u laboratoriju za ispitivanje u njegovom prirodnom stanju. Mikrokosmos može varirati u svojoj kompleksnosti od jednostavnih statičnih tegli sa kontaminiranim zemljištem do visoko sofisticiranih sistema dizajniranih da omoguće što bolje održavanje različitih parametara koji vladaju na kontaminiranoj lokaciji u laboratorijskim uslovima. Mikrokosmosi koji blisko modeluju realne uslove u životnoj sredini će najverovatnije obezbediti relevantne rezultate. U ovakvim eksperimentima, važno je obezbediti odgovarajuće kontrole, kao što su sterilni tretmani, da bi se razlikovao efekat abiotičke degradacije ugljovodonika od biodegradacije. Mikrokosmos eksperimenti sa zemljištem su korisni za određivanje biodegradacionog potencijala ugljovodoničnog zagađenja i za razvoj modela za predviđanje sudbine ovih kontaminanata. Mogu biti korišćena matematičke jednačine za opisivanje kinetike svakog procesa koji je uključen u transformaciju specifičnih posmatranih ugljovodonika. Koncentracija ugljovodonika i njihovih degradacionih produkata mogu biti praćeni u različitim komponentama mikrokosmosa, za dobijanje korisnih

kinetičkih informacija u pogledu njihove ravnotežne raspodele, biodegradacio transformacionog ponašanja, pod dominantnim uslovima koji vladaju u životnoj sredini. Dodatno, test se može koristiti za skrining bioremedijacionih tretmana da bi se odabrala adekvatna bioremedijaciona strategija (Balba et al., 1998). Tokom studija izvodljivosti, u mikrokosmosu se regularno prati degradacija ugljovodonika, brojnost bakterija, pH, sadržaj vlage i nutrijenata.

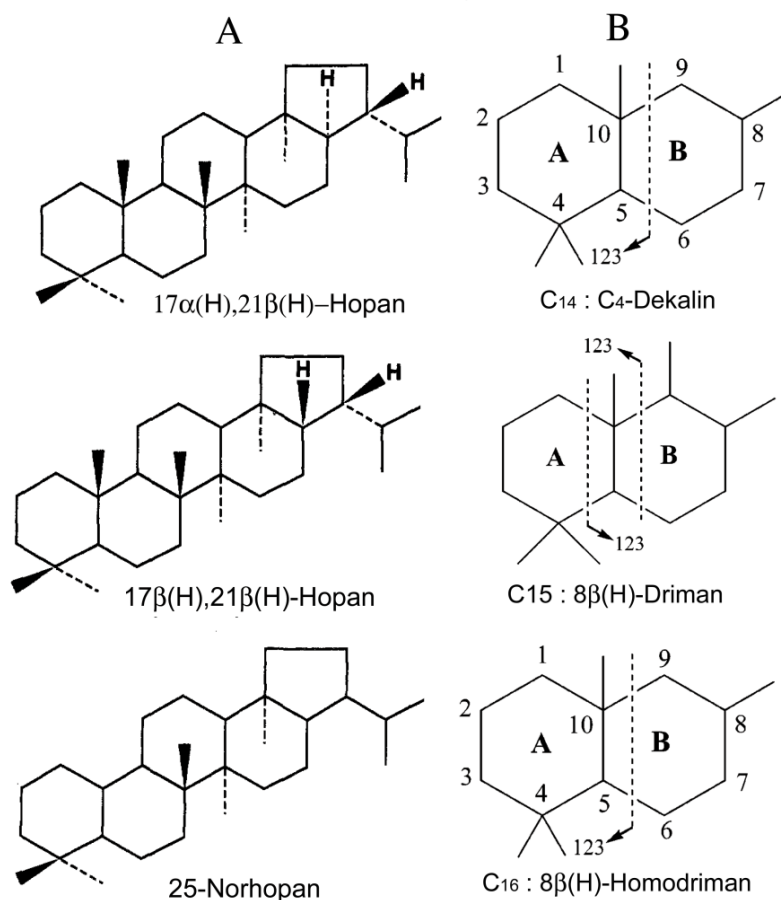
Biomarker jedinjenja

Određivanje degradacije ugljovodonika u terenskim uslovima je znatno komplikovanije nego u laboratorijskim uslovima zbog heterogenosti kontaminacije. Zagađeni lokaliteti su najčešće veoma heterogeni u svojoj prirodi tako da inicijalni analitički podaci o koncentraciji kontaminanta variraju od veoma niskih do veoma visokih na relativno malom prostoru. Dodatno, najčešće su zagađene velike zapremine zemljišta, reda veličine hiljade kubnih metara. Pod ovim okolnostima, veoma je teško obezbediti statistički značajne podatke bez analiziranja ogromnog broja uzoraka što bi zahtevalo velike troškove. Zbog poteškoća u kvantifikaciji ugljovodonika prilikom bioremedijacije u industrijskim uslovima, odnos određenih ugljovodonikovih jedinjenja sa kompleksnom smešom ugljovodonika može biti korišćena za procenu biodegradacije ugljovodonika. Ugljovodonik oksidujućim mikroorganizmi obično znatno sporije degradiraju račvaste alkane i izoprenoidna jedinjenja kao što su pristan (2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan) i fitan (2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan) u odnosu na normalne alkane. U skladu sa ovom činjenicom, odnos normalnih alkana sa ovim račvastim biomarker jedinjenjima može da reflektuje stepen do koga su mikroorganizmi degradirali ugljovodonike u naftnoj smeši (Wang et al., 1994; Prichard i Costa, 1991; Kennicutt, 1988). Ovaj koncept odnosa ugljovodonika je baziran na pretpostavci da nebiodegradacioni procesi kao što su starenje, isparavanje i ličing, neće prouzrokovati različit gubitak normalnih i račvastih ugljovodonika koji imaju slične hemsijske osobine (Kennicutt, 1988). Međutim, ovaj metod ima i neka ograničenja, s obzirom na činjenicu da se račvasti alkani uključujući i fitan biodegradiraju sporo, što znači da se primenom C₁₈/fitan odnosa podcenjuje biodegradacija ugljovodonika. Takođe, oktadekan (C₁₈) se obično degradira brzo, što čini ovu tehniku korisnom samo u ranoj fazi degradacije ugljovodonika (Balba et al., 1998).

U cilju rigoroznijeg kvantifikovanja biodegradacije i nakon što se pristan i fitan degradiraju, mogu se koristiti jedinjenja hopana kao konzerviranog internog standarda. Hopani su molekularni fosili bakterijskih hopanoida, to su policiklična zasićena jedinjenja (pentaciklični terpeni, slika 2.25. A) veoma su slični steroidnim i mogu se naći u skoro svim tipovima sirove nafte, a možda su jedni od najzastupljenijih poznatih jedinjenja na Zemlji. Hopani su veoma rezistentni na biodegradaciju, i zbog ove osobine predstavljaju izuzetna biomarker jedinjenja naspram kojih se sva druga biodegradabilna jedinjenja mogu normalizovati. Dodatno, zbog slabe biodegradabilnosti dolazi do njihovog obogaćivanja u rezidualnom ulju sa procesima starenja, isparavanja i biodegradacije (Prince et al., 1994; Wang et al., 1994; Venosa et al., 1997; Gagni i Cam, 2007).

Pored hopana, u poslednje vreme se kao biomarker jedinjenja sve više primenjuju jedinjenja seskviterpena. Seskviterpeni su polimetilovani supstituisani dekalini ili dekahidronaftaleni (C₁₄ - C₁₆ biciklični alkani), prvi put su otkriveni 1974 godine. Alexander et al., (1983) je identifikovao 8β(H)-driman i 4β(H)-eudesman u

većini Australijskih ulja. Seskviterpeni koji imaju skelet drimana (slika 2.25. B) su najčešće prisutni u nafti. Većina ovih seskviterpena najverovatnije vodi poreklo od viših biljaka kao i od jednostavnih algi i bakterija. Uvođenje ovih tzv. novih biomarker jedinjenja je posledica toga da se kod lakših frakcija nafte kao što su mlazno gorivo i dizel tokom procesa rafinacije uklanja većina visoko molekulskih biomarker jedinjenja (hopana). Zbog toga su pentaciklični terpeni i steareni u ovim frakcijama nafte prisutni u veoma malim količinama, dok se seskviterpeni koncentruju u ovim frakcijama (Wang *et al.*, 2005).



Slika 2.25. Strukture najzastupljenijih hopana (A) i seskviterpena (B)

Biomarker jedinjenja su jedna od najvažnijih grupa jedinjenja u nafti i derivatima nafte. Ona mogu biti detektovana u malim količinama (reda veličine ppm i sub-ppm) u prisustvu velikog broja različitih ugljovodonika iz nafte gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom (GC-MS). Relativni sadržaj biomarker jedinjenja u nafti i njenim derivatima zavisi od porekla nafte, stepena procesa starenja, procesa biodegradacije i isparavanja. Zbog toga biomarker jedinjenja otkrivaju mnogo više informacija o poreklu nafte u odnosu na druga jedinjenja u nafti. Zbog toga, hemijska analiza biomarker jedinjenja može biti od velikog značaja za forenzička ispitavanja porekla izlivena nafte, monitoringa degradacionih procesa i stepena starenja nafte i njenih derivate u različitim uslovima (Wang *et al.*, 2005).

Ekološki uticaj i procena toksičnosti

Dodatno, za demonstraciju efikasnosti tretmana, neophodno je pokazati da se tokom bioremedijacije ne produkuju toksični intermedijeri kako bi se izbegli neželjeni ekološki efekti (Cerniglia, 1984; Prince et al., 1994). Toksičnost kontaminiranog zemljišta pre i nakon završene bioremedijacije se može meriti primenom odgovarajućih testova toksičnosti. Metod koji je dobro izučen za ispitivanje mikrobijalnog odgovora na genetskom nivou ili na nivou vrste je primena reporter gena za produkciju biosenzora zato što to omogućava brz, jeftin i osetljiv biomonitoring, i oni mogu biti izabrani na osnovu njihove relevantnosti u životnoj sredini (Paton, 2001). Biosenzor se može definisati kao receptor (biološka jedinica, npr., enzim, cela ćelija, tkivo) povezan za transduktivni mehanizam (de la Guardia, 1995). Većina odgovarajućih receptora za mikrobijalni sistem su reporter geni dizajnirani da omoguće brzu kvantifikaciju targetnog produkta. Najčešće se koristi *lacZ* gen, koji obuhvata β -galaktozidazu, rezistenciju na antibiotike, katehol-2-3-oksigenazu, β -glukuronidazu (Atlas et al., 1992). Bioluminiscencija zasnovana na lux genima, je naročito koristan reporter mehanizam zato što je veoma senzitivna i dovoljno je brz da omogući monitoring u realnom vremenu, a omogućava i ne-destruktivno *in situ* merenje (Stewart, 1990). Bioluminiscencija - zasnovana na biosenzorima može biti smatrana korisnom koliko i *lacZ* sistemi (Atlas et al., 1992). Mikrobi mogu biti markirani sa lux genima vezanim za specifične HOC degradacione gene, omogućavajući *in situ* monitoring ekspresije gena (Barkay et al., 1995). Na primer, Sanseverino et al. (1993) je koristio *Pseudomonas fluorescens* HK44 (vezanog sa *nap* genima) za karakterizaciju sedam kontaminiranih zemljišta. Kasnija ispitivanja od strane Burlage et al. (1994) su pokazala da se ovim biosenzorima može detektovati kontaminacija zemljišta sa srednjim destilatima rafinisanog ulja.

Nedavno, Bundy et al. (2001) su uporedili tri katabolički bazirana luminiscentna biosenzora i pokazali da indukcija biosenzora značajno varira u zavisnosti od prirode HOC i ekstrakcione tehnike. Zaključili su da u kombinaciji biosenzori nude korisnu informaciju za predviđanje bioremedijacije tokom vremena. Drugi reporter gen sistem, *gfp*, koji ima kod za zeleni fluorescentni protein, se takođe koristi u velikoj meri. Ovaj protein takođe omogućava visoko selektivnu detekciju, do prostog ćelijskog nivoa, i može biti korišćen za konstitutivno i specifično markiranje. Kombinacija *gfp*- i lux-baziranih biosenzora ima veliki potencijal, pošto dva sistema daju komplemetarni aspekt mikrobijalnih performansi.

Molekulske probe

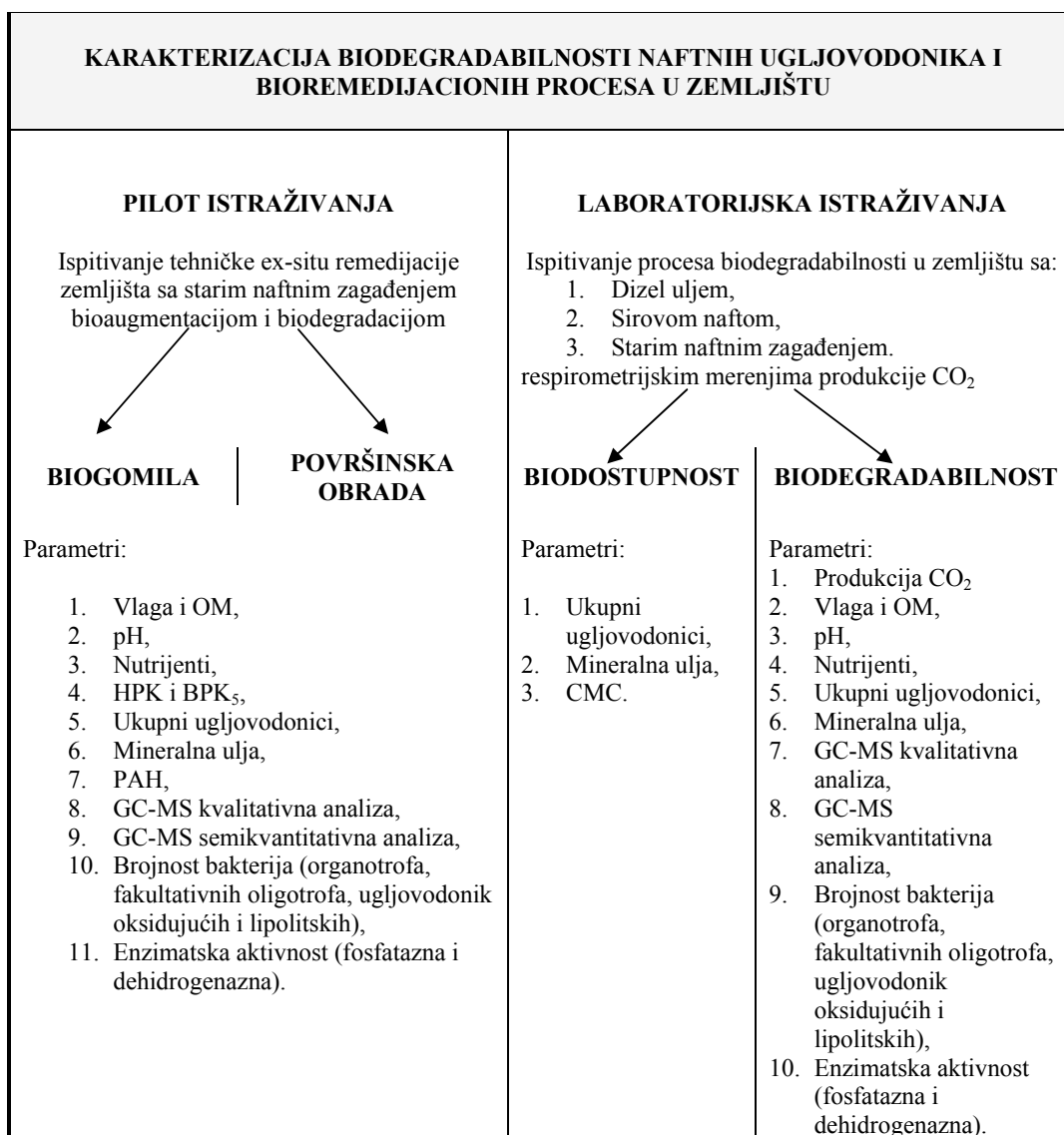
Uticaj HOC na mikrobijalnu zajednicu je ispitivan na genetičkom nivou primenom tehnika koje mogu da odrede frekvenciju i distribuciju specifičnih gena za degradaciju. Probe su razvijene za gene iz degradacionog puta alifatičnih, monoaromatičnih i poliaromatičnih ugljovodonika (Stapleton et al., 1998). Ove probe se mogu primeniti na DNA, mRNA ili rRNA. Inicijalna faza preliminarnih polimeraznih lančanih reakcija (PCR) se obično izvodi da bi se povećala osetljivost detekcije (Barkay et al., 1995). Takođe, probe mogu biti primenjene na izolate iz životne sredine, mada je važniji pristup je ekstrakcija nuklinskih kiselina direktno iz zemljišta, na taj način se izbegavaju problemi vezani za kultivaciju (Sayler, 1991;

Atlas et al., 1992). Generalno je poznato da mRNA transkripti kratko-žive u zemljištu, pa zbog toga *in situ* merenja mRNA mogu dati procenu visoko specifične degradativne aktivnosti (*Wilson et al., 1999*). Ove tehnike su veoma rasprostranjene, što pokazuje važnost ovog pristupa. Stapleton i Sayler (1998) su primenili šest proba gena uzetih iz aerobne degradacije alifatičnih ugljovodonika i dve uzete iz metanogenog procesa da bi odredili kontaminaciju akvifera sa avionskim gorivom. Skoro svi uzorci su dali pozitivnu reakciju za sve gene, i shodno tome, ¹⁴C-obeleženi ugljovodonici dodati uzorcima su brzo degradirani.

Postojeće probe gena, međutim, ne mogu kompletno okarakterisati ekološki efekat HOC, i Ahn et al. (1999) i Lloyd-Jones et al. (1999) su zabeležili da se ne mogu svi PAH degraderi izolovani iz kontaminiranog zemljišta hibridizovati sa postojećim probama. Stapleton et al. (1998) je zabeležio da se DNA iz veoma kisele sredine (pH<2) nije hibridizovao uopšte sa standardnim genima, takođe biohemijske tehnike su verifikovale da je došlo do degradacije ugljovodonika.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

U okviru ovog istraživanja ispitani su: (1) procesi koji se odvijaju prilikom bioremedijacije zemljišta zagađenog naftom i derivatima nafte, koje je bilo izloženo spontanim abiotičkim i biotičkim procesima u toku 8 godina, tehnikama biogomila i površinske obrade na poluindustrijskoj (pilot) skali uz optimizaciju tehnoloških parametara sa ciljem povećanja efikasnosti i efektivnosti biodegradacije ugljovodonika; i (2) uticaj koncentracije, biodostupnosti, tipa i starenja zagađujućih materija na procese biodegradacije i biotransformacije u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Šema plana eksperimenta data je na slici 3.1.



Slika 3.1. Plan eksperimenta

3.1. Karakterizacija biodegradacionih i biotransformacionih procesa u zemljištu sa starim naftnim zagađenjem u toku tretmana biogomilama i površinskom obradom

Za ispitivanje biodegradacionih i biotransformacionih procesa starog naftnog zagađenja zemljištu u toku tretmana biogomilama i površinskom obradom uzeto je zemljište iz Rafinerije nafte Novi Sad iz kontrolisanog depoa (tankvana N8). Kompleks Rafinerije nafte Novi Sad je razoren u toku 1999. godine bombardovanjem od strane NATO pakta. Razaranjem rezervoara, transportnih i proizvodnih kapaciteta uništeno je oko 74000 tona nafte i derivata od čega je oko 90% izgorelo, preko 500 tona se izlilo u Dunav, a preostali deo se izlio na zemljište u Rafineriji i u kolektor prečišćenih i zauljenih otpadnih voda Rafinerije. Sirova nafta se izlila na površinu od 51.000 m², prostor zagađen benzinima iznosi oko 8500 m², a ostali naftni derivati (kerozin, dizel, mazut i goriva) su se izlili na površinu od oko 35.000 m² (slika 3.2) (Dalmacija et al., 2000; 2003). Deo zagađenog zemljišta, oko 10.000 m³, je smešten u kontrolisani depo (tankvanu N8), gde je bilo izloženo različitim spontanim biotičkim i abiotičkim procesima u toku 8 godina.

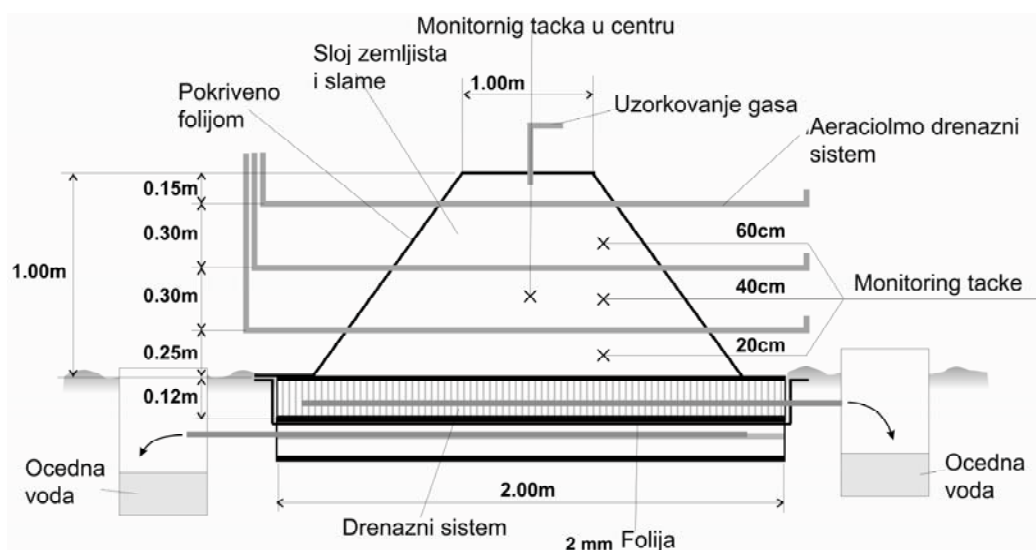


Slika 3.2. Razoreni transportni sistem unutar kompleksa Rafinerije i izlivena nafta

Na osnovu hemijske analize zemljišta utvrđeno je da je ono sadržalo 38,4 g/kg ukupnih ugljovodonika i 25,4 g/kg mineralnih ulja. Distribucija čestica mineralne frakcije je bila 88,90% peska, 4,10% praha i 0,54% gline, što je za očekivati s obzirom da je lokalitet na kome je izgrađena rafinerija prekriven slojem peska pre njene konstrukcije.

3.1.1. Bioremedijacija u biogomili

Za ispitivanje tretmana u biogomili uzeto je zemljište iz kontrolisanog depoa (tankvana N8). Postavljene su dve biogomile na odabranom lokalitetu u okviru Rafinerije nafte Novi Sad, gde su iskopane dve kasete za postavku pilota dimenzija 2 x 2 m, dubine 0,4 m. Da bi se sprečilo širenje zagađenja sa biogomila usled spiranja vodom ispod prve biogomile je postavljena zaštitna folija od polipropilena, a ispod druge je postavljena termoplastična folija od etilen-propilena, obe folije su bile otporne na ugljovodonike (proizvodnja Trelleborg, Švedska). Da bi se ustanovilo da li dolazi do migracije zagađenja u okolinu tj. u cilju određivanja fizičke, hemijske i biološke otpornosti folije ispod zaštitnih folija je postavljen drenažni sistem za kontrolu kvaliteta vode sastavljen od PVC cevi i sloja peska debljine 0,2 m. Iznad zaštitne folije postavljen je drenažni sistem za ocedne vode iz biogomila, takođe sačinjen od PVC cevi i sloja peska debljine 0,2 m. Na drenažni sistem je zatim postavljen sloj zemljišta zagađenog naftom i derivatima u obliku zarubljene piramide visine 1 m, kompostiran sa slamom, ukupne zapremine 2,7 m³. Kroz strukturu piramide na tri različite visine postavljen je aeraciono – drenažni sistem sačinjen od PVC cevi. Aeraciono – drenažni sistem, s obzirom da je otvoren na obe strane omogućava prirodnu ventilaciju biogomila. Međutim, da bi se pospešila mikrobiološka aktivnost kroz biogomile je dodatno uduvavan vazduh jednom nedeljno u toku prve godine tretmana. U cilju sprečavanja zagađenja vazduha usled emisije volatilnih organskih jedinjenja (VOC) biogomila je prekrivena zaštitnom termoplastičnom folijom od etilen-propilena, EPDM debljine 2 mm (Trelleborg, Švedska). Na ovaj način se osim sprečavanja isparavanja VOC-a postiže i bolja kontrola vlage, sprečava gubitak toplote oslobođen mikrobiološkom aktivnošću i bolje iskorišćenje solarne energije za zagrevanje biogomila. Šematski prikaz biogomile dat je na slici 3.3., dok je na slici 3.4. prikazana konstrukcija biogomile.



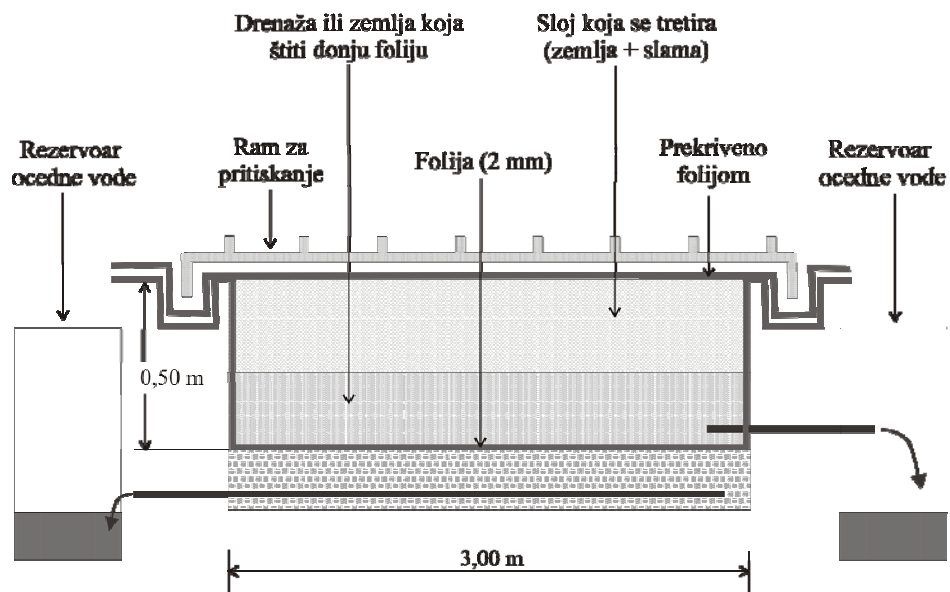
Slika 3.3. Šematski prikaz biogomile



Slika 3.4. Konstrukcija biogomile

3.1.2. Bioremedijacija površinskom obradom

Za ispitivanje tretmana površinske obrade uzeto je zemljište iz kontrolisanog depoa (tankvana N8) Rafinerije nafte Novi Sad. Na odabranom lokalitetu u okviru Rafinerije nafte Novi Sad, iskopana je kasetna za postavku pilota dimenzija 3 x 3 m, dubine 0,7 m. Da bi se sprečilo širenje zagađenja usled spiranja vodom ispod zagađenog zemljišta je postavljena zaštitna termoplastična folija od etilen-propilena, EPDM debljine 2 mm (Trelleborg, Švedska). U cilju određivanja fizičke, hemijske i biološke otpornosti folije ispod nje je postavljen drenažni sistem za kontrolu kvaliteta vode ispod zaštitne folije sastavljen od PVC cevi i sloja peska debljine 0,2 m. Iznad zaštitne folije postavljan je drenažni sistem za ocedne vode iz zagađenog zemljišta, takođe sačinjen od PVC cevi i sloja peska debljine 0,2 m. Na drenažni sistem je zatim postavljen sloj zemljišta zagađenog naftom i njenim derivatima debljine 0,3 m, kompostiran sa slamom, ukupne zapremine 2,7 m³ (slika 3.5. i 3.6.). U cilju sprečavanja zagađenja vazduha usled emisije volatilnih organskih jedinjenja (VOC) zemljište je prekriveno istom folijom od etilen-propilena. Na ovaj način se osim sprečavanja isparavanja VOC-a postiže i bolja kontrola vlage, sprečava gubitak toplote oslobođen mikrobiološkom aktivnošću i bolje iskorišćenje solarne energije za zagrevanje zemljišta. Zemljište je jednom nedeljno navodnjavano, a jednom mesečno prekopavano radi aeracije.



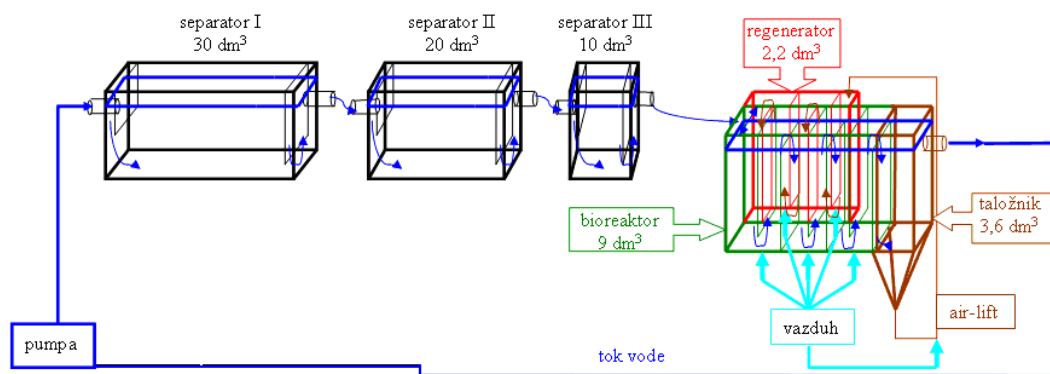
Slika 3.5. Šematski prikaz površinske obrade



Slika 3.6. Konstrukcija površinske obrade

3.1.3. Bioaugmentacija biogomila i površinske obrade

Pored stimulacije native mikroflore aeracijom i irigacijom zemljišta, vršena je i bioaugmentacija mikroorganizmima izdvojenim iz zagađenog zemljišta. Inicijalni mikrobijalni konzorcijum je izolovan iz starog naftnog zagađenja zemljišta i iz otpadne vode rafinerije nafte. Kultivacija mikroorganizama i bioaugmentacija je izvedena u mineralnom medijumu (Torlak 23,3 g/l 1l; pepton 1 “Torlak” 15 g, masa ekstrakta Torlak 3 g, NaCl 5 g, K-fosfata 0,3 g) u laboratorijskim uslovima u erlenmajerovoj posudi. Bioaugmentacija je dalje nastavljena u laboratorijskom bioreaktoru u istom mineralnom medijumu, slika 3.7. Ogledna polja su navodnjavana dva puta nedeljno, da bi se vlažnost održala na nivou 50-80% saturacionog kapaciteta zemljišta. Takođe ocedna voda sakupljena sa biogomila i površinske obrade u odvojenom rezervoaru (slika 3.3 i 3.5) je korišćena za navodnjavanje, uz dodatak vode iz bioreaktora usled gubitaka ocedne vode kao posledice isparavanja i vezivanja u zemljištu.



Slika 3.7. Laboratorijski bioreaktor za kultivaciju mikroorganizama

3.1.4. Uzorkovanje, hemijska i mikrobiološka analiza

Zemljište je uzorkovano pre početka eksperimenta (0. dan je uzet kao kontrolni uzorak) i nakon različitih vremenskih perioda u toku dve godine eksperimenta. U biogomili zemljište je uzorkovano na različitim visinama biogomila: 20 cm, 40 cm, 60 cm od dna biogomile i iz centra biogomila (slika 3.3). U radu su dati rezultati srednjih vrednosti analiza zemljišta iz biogomila na posmatranim monitoring tačkama. Kod površinske obrade uzimano je pet uzoraka sa nasumično odabranih lokacija na polju od kojih je zatim pravljen jedan kompozitni uzorak. Za praćenje procesa bioremedijacije zagađeno zemljište analizirano je na sledeće parametre: vlažnost, pH, sadržaj organske materije iskazane kroz gubitak žarenjem, hemijska potrošnja kiseonika, biološka potrošnja kiseonika, sadržaj azotnih i fosfornih materija, sadržaj ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja, sadržaj poliaromatičnih

ugljovodonika, organski profil zemljišta, semikvantitativna GC-MS analiza odabranih jedinjenja ugljovodonika u odnosu na biomarker jedinjenja terpena, sadržaj metala, brojnost reprezentativnih grupa mikroorganizama, dehidrogenazna aktivnost, fosfatazna aktivnost.

Ocedna voda se biogomila i sa površinske obrade uzorkovana je u istim vremenskim intervalima kad i zemljište i analizirana na sledeće parametre: pH, hemijska potrošnja kiseonika, biološka potrošnja kiseonika, sadržaj azotnih i fosfornih materija, sadržaj ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja, brojnost reprezentativnih grupa mikroorganizama, dehidrogenazna aktivnost, fosfatazna aktivnost.

3.2. Uticaj koncentracije, biodostupnosti, strukture i starenja zagađujućih materija na procese biodegradacije i biotransformacije u kontrolisanim laboratorijskim uslovima

3.2.1. Zemljište

U cilju ispitivanja uticaja koncentracije, biodostupnosti, strukture i starosti zagađujućih materija na procese biodegradacije i biotransformacije kontrolisanim laboratorijskim uslovima korišćena su dva tipa zemljišta: (1) zemljište kontaminirano naftom i derivatima nafte (benzin, sirova nafta, kerozin, dizel ulje i produkti sagorevanja nafte) kao posledica destrukcije infrastrukture Rafinerije nafte Novi Sad, koje je 8 godina tokom stajanja u depou bilo izloženo spontanim procesima degradacije i godinu dana kontrolisanim uslovima degradacije tokom tretmana površinskom obradom zemljišta. (2) Čisto, nekontaminirano zemljište uzeto takođe sa prostora Rafinerije nafte Novi Sad, u cilju obezbeđivanja istih karakteristika zemljišta u pogledu granulometrijskog sastava, saturacionog kapaciteta zemljišta i permeabilnosti kao kod kontaminiranog zemljišta. Generalno, zemljište korišćeno za ovaj eksperiment je imalo sledeće karakteristike: 22,7% saturacioni kapacitet, $2,6 \times 10^{-4}$ cm/s koeficijent permeabilnosti (kf), pH 7,30, i 3,6% humusnih materija. Distribucija čestica mineralne frakcije je bila 88,90% peska, 4,10% praha i 0,54% gline, što je za očekivati s obzirom da je lokalitet na kome je izgrađena rafinerija prekriven slojem peska pre njene konstrukcije. Za svrhu ovog eksperimenta oba zemljišta su homogenizovana i prosejana kroz 2 mm sito.

3.2.2. Procedura kontaminacije

Zemljište sa starim naftnim zagađenjem je sadržalo oko 35,00 mg/g ukupnih ugljovodonika i 9,01 mg/g mineralnih ulja. U cilju ispitivanja uticaja koncentracije, strukture i sastava zagađujućih materija na biodostupnost i biodegradabilnost zemljište sa starim naftnim zagađenjem je razblaženo sa čistim suvim zemljištem (sušeno na $105 \pm 5^\circ\text{C}$ 24 h) tako da su krajnje koncentracije ugljovodonika bile 20, 10 i 5 mg/g zemljišta. Procedura kontaminacije čistog zemljišta usvojena je od Urum et

al., (2006). Na 2000 g čistog suvog zemljišta dodato je odvojeno oko 200 g sirove nafte (Rujan export blend) i oko 200 g dizel ulja (bez aditiva) i homogenizovano. Krajnja koncentracija sirove nafte i dizel ulja u zemljištu je bila oko 100 mg/g, ovako pripremljena zemljišta su zatim dalje razblažena sa čistim zemljištem u cilju dobijanja koncentracije ukupnih ugljovodonika 35, 20, 10 i 5 mg/g. Osobine korišćene sirove nafte i dizel ulja su date u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Osobine korišćene sirove nafte i dizel ulja

Osobine	Sirova nafta	Dizel ulje
Specifična težina na 10°C, kg/m ³	862	883
Viskoznost na 20°C, mm ² /s	20,42	11,91
Sadržaj vode (% mas)	0,00	na
Sadržaj sumpora, mg/l	1,83	na

na – nije analizirano

3.2.2. Određivanje biodostupnosti ugljovodonika u zemljištu

Za procenu biodostupnosti nafte i naftnih derivata u zemljištu su ispitana tri surfaktanta: Tween80, Brij35 i DBS (dodecilbenzil-sulfonat). U cilju ispitivanja uticaja starenja i tipa zagađenja na biodostupnost, pored zemljišta sa starim naftnim zagađenjem ispitana je i biodostupnost zemljišta sveže zagađenog sirovom naftom i dizel uljem. Tačne koncentracije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u zemljištima korišćenim za određivanje biodostupnosti date su u tabeli 3.2. Da bi se optimizovala ekstrakcija sa posmatranim surfaktantima ispitivani su sledeći parametri: (1) sorpcija surfaktanata na zemljištu, (2) efekat koncentracije dodatog surfaktanta, (3) odnos mase zemljišta i zapremine surfaktanta (M/V), (4) vreme ekstrakcije. U cilju sprečavanja mikrobioloških reakcija u ispitivanim zemljištima tokom određivanja biodostupnosti svi rastvori surfaktanata su pravljani u rastvoru koji je sadržao 200 mg/l HgCl₂.

1. Sorpcija surfaktanta na zemljištu je izračunata iz količine surfaktanta potrebne da se postigne CMC (kritička koncentracije micela) u prisustvu i odsustvu zemljišta. Sorpcioni eksperimenti sastojali su se od mućkanja 5 g čistog zemljišta sa 10 ml surfaktanata različite koncentracije 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon uspostavljanja ravnoteže, uzorci su centrifugirani i površinski napon u supernatantu je meren pomoću Osvaldovog viskozimetra. CMC vodenog rastvora surfaktanta predstavlja koncentraciju surfaktanta pri kojoj se prvi put javlja minimalan površinski napon.
2. Efekta koncentracije surfaktanata na količinu izekstrahovanih ugljovodonika, meren je mućkanjem 5 g kontaminiranog zemljišta sa 10 ml surfaktanata različite koncentracije (0%; 0,001%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5% i 1%) 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon uspostavljanja ravnoteže, uzorci su centrifugirani i meren je rezidualni sadržaj ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u zemljištu.

3. Efekat M/V odnosa meren je mućkanjem 5 g kontaminiranog zemljišta sa 5 ml; 10 ml; 20 ml i 50 ml surfaktanta optimalne koncentracija (u pogledu najveće količine izekstrahovanih ugljovodonika dobijene predhodnim ispitivanjem) 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon uspostavljanja ravnoteže, uzorci su centrifugirani i meren je rezidualni sadržaj ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u zemljištu.
4. Efekat uticaja vremena ekstrakcije ispitan je samo za zemljište sa starim naftnim zagađenjem i meren je mućkanjem 5 g kontaminiranog zemljišta sa optimalnom zapreminom i koncentracijom surfaktanata (dobijenom iz predhodnog ispitivanja) 24 h; 48 h; 72 h i 96 h na sobnoj temperaturi. Nakon uspostavljanja ravnoteže, uzorci su centrifugirani i meren je rezidualni sadržaj ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u zemljištu.

Tabela 3.2. Koncentracije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u ispitivanim zemljištima

Tip kontaminanta u zemljištu	Oznaka	Ukupni ugljovodonici (g/kg)	Mineralna ulja (g/kg)
Staro naftno zagađenje	ON35	34,96	12,10
Sirova nafta	SN35	33,54	25,67
Dizel ulje	DO35	36,03	27,87

3.2.3. Ispitivanje biodegradabilnosti ugljovodonika u zemljištu

Eksperimenti biodegradacije izvedeni su u 250 ml - modifikovanim *Bartha* biometrima opremljenim sa posudom sa KOH i hermetički zatvorenim sa gumenim čepovima, slika 3.8. Biometri su korišćeni za merenje mikrobiološke produkcije CO₂ kao što je to opisano od strane Bartha i Pramer (1965). Ispitivanja mineralizacije merenjem ukupne produkovane količine CO₂ mogu obezbediti izuzetne informacije o biodegradacionom potencijalu ugljovodonika. Za tu svrhu 50 g svakog tipa kontaminiranog zemljišta (dizel uljem, sirovom naftom i starim naftnim zagađenjem) i svake pripremljene koncentracije kontaminanta (0 (kontrola), 5, 10, 20 i 35 mg/g) je odmereno u biometre, detaljne karakteristike svake ispitivane probe su date u tabeli 3.3.

Probe su bioaugmentirane tako da je krajnja koncentracija reprezentativnih grupa mikroorganizama bila oko 10¹⁴ CFU/g zemljišta. Mikrobijalni konzorcijum dobijen je na isti način kao i kod postavke bioremedijacije na dva pilot eksperimenta, s tim da je naknadna bioaugmentacija u bioreaktoru vršena uz dodatak dizel ulja i sirove nafte kao izvora ugljenika u cilju adaptacije mikroorganizama na ovaj supstrat i izbegavanja lag faze nakon dodatka inokuluma na zemljište. Rastvor nutrijenata je takođe dodat u svaku probu: sastojao se od NH₄Cl kao izvora N, a kao izvor P korišćen je K₂HPO₄/KH₂PO₄ puferski rastvor. Rezultujući C:N:P odnos nakon dodatka inokuluma i nutrijenata je bio oko 100:5:0.5, a saturacija zemljišta vodom je bila podešena na oko 50%. Da bi se utvrdilo da li dodatak nutrijenata i inokuluma ima uticaj na biodegradaciju ugljovodonika, tretmani sa najvišom koncentracijom ugljovodonika su dodatno ispitivani sa dodatkom samo destilovane vode umesto

inokuluma i nutrijenata. Dodatno, postavljen je i kontrolni uzorak koji se sastojao od bioaugmentiranog čistog nekontaminiranog zemljišta. Eksperiment je trajao 48 dana. Nakon 35 dana u cilju ispitivanja uticaja slabe desorpcije ugljovodonika na proces biodegradacije (u tom momentu) dodat je Tween80 (5 ml).

Tabela 3.7. Eksperimentalni uslovi u biometrima

Tip kontaminanta u zemljištu	Kontaminant %	Inokulum dodat	Nutrijenti dodati	Simbol
Dizel ulje	3,5	+	+	DO35
Dizel ulje	2	+	+	DO20
Dizel ulje	1	+	+	DO10
Dizel ulje	0,5	+	+	DO5
Dizel ulje	3,5	-	-	DO35ko
Sirova nafta	3,5	+	+	SN35
Sirova nafta	2	+	+	SN20
Sirova nafta	1	+	+	SN10
Sirova nafta	0,5	+	+	SN5
Sirova nafta	3,5	-	-	SN35ko
Staro naftno zagađenje	3,5	+	+	ON35
Staro naftno zagađenje	2	+	+	ON20
Staro naftno zagađenje	1	+	+	ON10
Staro naftno zagađenje	0,5	+	+	ON5
Staro naftno zagađenje	3,5	-	-	ON35ko
Nekontaminirano	0	+	-	Kontrola



Slika 3.8. Ispitivanje biodegradacije – biometri

Za sve eksperimentalne uslove biometri su postavljeni u triplikatima (2x50 g zemljišta) i inkubirani na 30°C u mraku 48 dana. Prođukovan CO₂ je apsorbovan u 10,0 ml rastvoru KOH (0,2 N), smeštenom u biometru. Ovaj rastvor je izvlačen svakih 24 h sa špricem, i količina apsorbovanog CO₂ je zatim merena titracijom rezidualne količine KOH, nakon dodatka rastvora BaCl₂ (1 ml, 1,0 N) korišćenog za taloženje karbonatnih jona, sa standardnim rastvorom HCl (0,1 N). Tokom ove procedure biometri su aerisani 2 min kroz filter od NaOH. 0., 7., 15. i 48. dana uzimani su uzorci zemljišta za analizu rezidualne količine ugljovodonika i dehidrogenazne aktivnosti zemljišta. pH, sadržaj nutrijenata, GC-MS analiza (kvalitativna i semikvantitativna) i brojnost mikroorganizama je urađena na početku i na kraju eksperimenta.

3.3. Metode analize

Korišćene su standardne metode analize vode i zemljišta, kao i njihove modifikacije razvijene u Laboratoriji za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine Departmana za hemiju i Laboratoriji za mikrobiologiju Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

3.3.1. Metode analize vode

Temperatura vode je merena živinim termometrom.

pH vrednost vode je merena terenskim pH metrom WTW model pH340i/set (metode 4500-H+ i 2580 B, APHA, 1995).

Hemijska potrošnja kiseonika u vodi je određivana preko diromata, titrimetrijski (metod P-V-10, Škunca-Milovanović et al., 1990).

Biohemijska potrošnja kiseonika u vodi je merena pomoću Lovibond® BOD mernog sistema.

Sadržaj ukupnih ugljovodonika, mineralnih ulja i ugljovodonika adsorbovanih na aluminijum-oksidu (polarna jedinjenja) u vodi je određivan standardnom metodom kvantitativne IR spektrofotometrije (metod P-V-47/A, Škunca-Milovanović et al., 1990).

Sadržaj amonijaka u vodi je određivan spektrofotometrijski sa Nesslerovim reagensom (metod P-V-2/B, Škunca-Milovanović et al., 1990).

Sadržaj nitrata u vodi je određivan kolorimetrijski sa brucinom (metod P-V-31/B, Škunca-Milovanović et al., 1990).

Sadržaj nitrata u vodi je određivan kolorimetrijski sa sulfanilnom kiselinom (metod P-V-32/B, Škunca-Milovanović et al., 1990).

Sadržaj organskog azota u vodi je određivan spektrofotometrijski sa Nesslerovim reagensom nakon mineralizacije po Kjeldahlu (metod P-V-6/A, Škunca-Milovanović et al., 1990).

Ukupan azot u vodi predstavlja zbir amonijačnog, nitratnog, nitritnog i organskog azota.

Sadržaj ortofosfata i ukupnog fosfora u vodi je određivan spektrofotometrijski sa amonijum-molibdatom i askorbinskom kiselinom (*metod P-V-16/A, Škunca-Milovanović et al., 1990*).

Brojnost bakterija u vodi određivana je posrednom (odgajivačkom) metodom na čvrstim, agarizovanim, podlogama (*Rodina, 1972., Petrović et al., 1998*). Ispitivanje je obuhvatilo nekoliko značajnijih grupa bakterija: organotrofi, fakultativni oligotrofi, lipolitske bakterije i ugljovodonik-oksidujuće bakterije.

Dehidrogenazna aktivnost je određivana spektrofotometrijski merenjem sadržaja Trifenil-formazana nastalog iz 2,3,5-Trifeniltetrazolijumhlorida (TTC) nakon inkubacije vode sa TTC 24 časa na 30°C (metod Lenhard-a modifikovan po Thalmann-u, *Petrović et al., 1998*).

Indeks fosfatazne aktivnosti (IFA – $\mu\text{mol pNP/s/l}$) je određivan kao srednja vrednost aktivnosti kiselih, neutralnih i alkalnih fosfomonoestar-hidrolaza, pri podešenim pH optimumima i temperaturi od 30°C, na transformaciji para-nitrofenilfosfata u para-nitrofenol (*Matavulj, 1986*).

3.3.2. Metode analize zemljišta

Rezultati za zemljište su dati u odnosu na masu suvog zemljišta.

Temperatura zemljišta je merena živinim termometrom.

Sadržaj vode (%vlage) u zemljištu je određivan gravimetrijski sušenjem 5 g uzorka 6 h na 105°C (*NEN 5754*).

Sadržaj organske materije u zemljištu je određivan gravimetrijski žarenjem 5 g uzorka 3 h na 550°C (*NEN 5754*).

Aktivna kiselost u zemljištu je merena u vodenoj suspenziji zemljišta pomoću terenskog pH metra WTW model pH340i/set (*USEPA 9045*).

Hemijska potrošnja kiseonika u zemljištu je određivana preko dihromata, titrimetrijskom metodom P-V-10, (*Škunca-Milovanović et al., 1990*) modifikovanom za zemljište. Odmereno je 500 mg uzorka u balon od 250 ml i dodato 20 ml detilovane vode, 20 ml kalijum-dihromata (1 N) i 40 ml koncentrovane sumporne kiseline. Šmeša je zagrevana 2 h na temperaturi ključanja, a zatim titrovana sa fero-amonijum-sulfatom (1 N). Količina dihromata utrošena za oksidaciju organskih materija u zemljištu izračunata je iz razlike utroška fero-amonijum-sulfata utrošenog za titraciju slepe probe i uzorka.

Biohemijska potrošnja kiseonika u zemljištu je merena pomoću Lovibond® BOD mernog sistema. 1 g zemljišta i 100 ml destilovane odmereno je u Lovibond® BOD bocu i inkubirano 5 dana na 20°C, utrošena količina kiseonika za biološku oksidaciju organske materije direktno je očitana na Lovibond® BOD senzoru i preračunata na količinu odmerenog zemljišta.

Sadržaj amonijaka u zemljištu je određivan titrimetrijski sa sumpornom kiselinom nakon destilacije.

Sadržaj nitrata i nitrita u zemljištu je određivan titrimetrijski sa sumpornom kiselinom u obliku amonijaka nakon digestije Dewardovom legurom i destilacije (*Anon., 1965*).

Sadržaj organskog azota u zemljištu je određivan titrimetrijski sa sumpornom kiselinom u obliku amonijaka nakon mineralizacije po Kjeldahlu.

Ukupan azot u zemljištu predstavlja zbir amonijačnog, nitratnog, nitritnog i organskog azota.

Sadržaj fosfora u zemljištu je određivan spektrofotometrijski sa amonijum-molibdatom i askorbinskom kiselinom nakon digestije 300 mg uzorka sa kalijum-persulfatom u kiseloj sredini.

Metali (Cd, Cu, Cr, Zn, Ni, Pb, Fe, Mn) su određivani metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije nakon digestije zemljišta u ccHNO_3 (metod ISO 11466).

Sadržaj ukupnih ugljovodonika. Sadržaj ukupnih ugljovodonika, mineralnih ulja i ugljovodonika adsorbovanih na aluminijum-oksidu (polarna jedinjenja) je određivan u uzorcima zemljišta nakon šestočasovne ekstrakcije (Soxhlet) 5 g zemlje sa 100 ml CCl_4 standardnom metodom kvantitativne IR spektrofotometrije (USEPA., 1996f; APHA, 1995). Sadržaj ugljovodonika je određivan na osnovu IR spektara pomoću standardne prave - osnovni standardni rastvor je referentna smeša izo-oktan:cetan:benzen (1,5:1,5:1). Mineralna ulja su razdvajana od polarnih jedinjenja eluiranjem ekstrakta kroz kolonu sa aluminijum-oksidom. Sadržaj ugljovodonika adsorbovanih na aluminijum-oksidu je određivan iz razlike koncentracija ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja. Standardna devijacija merenja određena na početku eksperimenta analizom četiri replikata i ona je iznosila 10%.

GC-MS karakterizacija naftnih ugljovodonika u vodi i zemlji.

Analiza zemljišta na sadržaj semivolatilnih organskih jedinjenja je vršena na gasnom hromatografu Hewlett Packard 5890 GC Series II sa masenim detektorom 5971 MSD nakon prethodne pripreme uzoraka. Uzorci zemljišta su podvrgnuti ekstrakciji smešom rastvarača metilenhlorid – heksan (1:1) jedan čas na sobnoj temperaturi (Desideri et al., 1984). Elementarni sumpor je uklonjen dodatkom praha bakra (Cowan i Riley, 1987). Ekstrakti su frakcionisani hromatografski na koloni silika gela prema proceduri USEPA 3630C. Čistoća rastvarača je prethodno proverena na GC-MS.

Kvantitativna analiza na sadržaj PAH. Kvantitativna (SIM) analiza uzoraka zemljišta je vršena pri identičnim uslovima hromatografisanja navedenim za SCAN analizu. Kao interni standard je korišćen 1-fenilnonan. U uzorcima je određivan sadržaj 13 policikličnih aromatičnih ugljovodonika: naftalena, acenaftilena, acenaftena, fluorena, fenantrena, antracena, fluorantena, pirena, benz(a)antracena, krizena, benzo(b)fluorantena, benzo(k)fluorantena i benzo(a)pirena. Karakteristični joni koji su praćeni specifičnom SIM analizom, kao i granice detekcije metode (MDL) i praktične granice kvantitacije (PQL) PAH u zemljištu su dati u tabeli 3.8. Karakteristični joni za interni standard su 91, 204 i 133. Kvantifikacija je vršena na osnovu karakterističnog "target" jona za svaki PAH. Kalibraciona kriva je dobijena snimanjem serije standardnih rastvora smeše ispitivanih PAH-ova. Standardna devijacija merenja određena na početku eksperimenta analizom četiri replikata i ona je iznosila 27%.

Kvalitativna i semikvantitativna GC-MS analiza. Kvalitativna (SCAN) analiza uzoraka vršena je skeniranjem masa u opsegu 35-550 atomskih jedinica. Dobijeni spektri poređeni su sa spektrima komercijalne baze podataka Wiley, a identifikovana jedinjenja su ona čiji je identitet određen sa verovatnoćom većom od 70%. Uslovi hromatografisanja su: kolona Ultra-2 (25 m x 0,2 mm x 0,3 μm), protok helijuma 1 ml/min, temperatura injektora 250°C, temperatura detektora 280°C. Postavljen je temperaturni program: 40°C 5 min, °C/min do 130°C, drži 2,2 min, 12°C/min do 180°C, drži 2,2 min, 7°C/min do 300°C, drži 11,79 min.

Semikvantitativna GC-MS analiza urađena je izolovanjem SIM hromatograma n-alkana, izoalkana i terpena iz total jon hromatograma na osnovu karakterističnog "target" jona za posmatrana jedinjenja (tabela 3.9). Relativna promena sadržaja ugljovodonika dobijena je deljenjem površine posmatranog jedinjenja sa površinom odabranog terpena. Za procenu promene relativnog sadržaja ugljovodonika za zemljišta sa starim naftnim zagađenjem korišćen je hopan, a za zemljišta zagađena sirovom naftom i dizel uljem korišćeni su seskviterpeni.

Tabela 3.8. Karakteristični joni, granice detekcije metode (MDL) i praktične granice kvantitacije (PQL) PAH u zemljištu

PAH	Karakteristični joni	MDL	PQL
		µg/kg suvog zemljišta	
Naftalen	128, 102, 64	0,8	2,8
Acenaftilen	152, 98, 74	0,9	3,0
Acenaften	154, 76, 63	0,4	1,3
Fluoren	166, 139, 63	1,4	4,4
Fenantren	178, 152, 126	0,5	1,6
Antracen	178, 152, 126	0,6	1,8
Fluoranten	202, 174, 150	1,2	3,8
Piren	202, 174, 150	1,2	3,8
Benz(a)antracen	228, 114, 200	0,9	2,8
Krizen	228, 114, 200	0,7	2,1
Benzo(b)fluoranten	252, 126, 113	1,6	5,0
Benzo(k)fluoranten			
Benzo(a)piren	252, 126, 113	1,4	4,5

Tabela 3.9. Karakteristični joni za detekciju pojedinih jedinjenja u zemljištu (Gagni i Cam, 2007; Wang et al., 2005)

	Jedinjenja	Target jon (m/z)
Alkani	n-Alkani (C ₆ -C ₄₄)	85
	Račvasti alkani (pristan i fitan)	85
	Cikloalkani	83
Terpeni	(17.alfa.H,21.beta.H)-Hopan (C ₃₀)	191
	29-Nor-(17.alpha.H,21.beta.H)-hopan (C ₂₉)	191
	C ₄ -Dekalin (C ₁₄)	123
	8.beta(H)-Driman (C ₁₅)	123
	8.beta(H)-Homodriman (C ₁₆)	123

Indeks fosfatazne aktivnosti (IFA – µmol pNP/s/g) je određivan kao srednja vrednost aktivnosti kiselih, neutralnih i alkalnih fosfomonoestar-hidrolaza, pri podešenim pH optimumima i temperaturi od 30°C, na transformaciji para-nitrofenilfosfata u para-nitrofenol (Matavulj, 1986; Tabatabai i Bremner, 1969).

Dehidrogenazna aktivnost je određivana spektrofotometrijski merenjem sadržaja Trifenil-formazana nastalog iz 2,3,5-Trifeniltetrazolijumhlorida (TTC) nakon inkubacije zemljišta sa TTC 24 časa na 30°C (metod Lenhard-a modifikovan po Thalmann-u, Petrović et al., 1998).

Brojnost bakterija u kontaminiranom zemljištu određivana je posrednom (odgajivačkom) metodom na čvrstim, agarizovanim, podlogama (Rodina, 1972, Petrović *et al.*, 1998). Za analizu zemljišta prvo je napravljena serija razblaženja uzoraka u 0,1% natrijum-pirofosfatu uz energično mućkanje na Vortex-u. Zasejavanje je vršeno inokulacijom određenih razređenja na hranljive podloge. Nakon inkubacije (5-7 dana na 26-28°C) vršeno je prebrojavanje izraslih kolonija. Brojnost je izražena kao broj bakterija na gram suvog zemljišta. Ispitivanje je obuhvatilo nekoliko značajnijih grupa bakterija: organotrofi, fakultativni oligotrofi, lipolitske bakterije i ugljovodonik-oksidišuće bakterije.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati ispitivanja bioremedijacionih procesa u zemljištu u toku tretmana biogomilama i površinskom obradom

4.1.1. Karakteristike zagađenog zemljišta

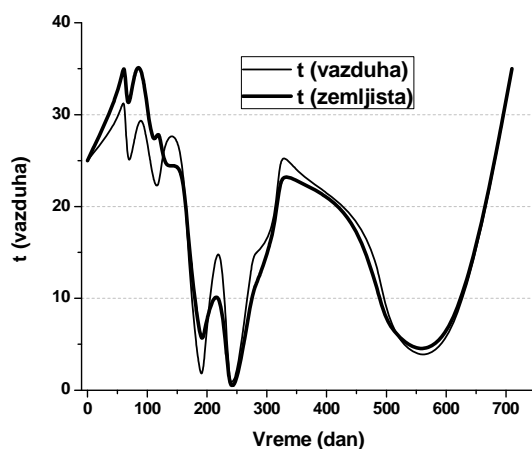
Za ispitivanje bioremedijacionih procesa u toku tretmana biogomilama i površinskom obradom korišćeno je zemljište zagađeno naftom i derivatima nafte čije su prosečne hemijske i mikrobiološke karakteristike date u tabeli 4.1. Prikazani rezultati pokazuju da je zemljište bilo zagađeno izuzetno visokim količinama ugljovodonika (38,4 g/kg ukupnih ugljovodonika i 25,4 g/kg mineralnih ulja) koji predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje i životnu sredinu. Sadržaj PAH čini manje od 1% ukupnih ugljovodonika u zemljištu, međutim s obzirom na njihovu toksičnost i kancerogenost njihova biodogradacija je ispitana u toku ovog istraživanja. Teški metali izazivaju koagulaciju belančevina citoplazme i na taj način izazivaju smrt mikroorganizama. Prema *USEPA, 1994* do inhibicije metaboličke aktivnosti dolazi kada je sadržaj teških metala u zemljištu veći od 2500 mg/kg, zbirni sadržaj teških metala u zemljištu je bio oko 10 puta niži od ove vrednosti (210 mg/kg), tako da oni nisu dalje ispitivani.

Tabela 4.1. Karakterizacija zagađenog zemljišta

Parametar	Vrednost	Parametar	Vrednost
Saturacija zemljišta vodom (%)	22,73	Naftalen (µg/kg)	12,5
Vlaga (%)	11	Acenaftilen (µg/kg)	<3,0
pH	7,30	Acenaften (µg/kg)	9,4
Humus (%)	5,08	Fluoren (µg/kg)	71
Organska materija	11,3	Fenantren (µg/kg)	224
HPK (mg O ₂ /kg)	407	Antracen (µg/kg)	<2,0
BPK ₅ (mg O ₂ /kg)	15,5	Fluoranten (µg/kg)	<3,8
Amonijak (mg N/kg)	81	Piren (µg/kg)	765
Nitrati, nitriti (mg N/kg)	263	Benzo(a)antracen (µg/kg)	<5,0
Organski azot (mg N/kg)	935	Krizen (µg/kg)	2200
Ukupan fosfor (mg P/kg)	243	Benzo(b)fluoranten (µg/kg)	<5,0
Mineralna ulja (g/kg)	25,4	Benzo(k)fluoranten (µg/kg)	300
Ukupni ugljovodonici (g/kg)	38,4	Benzo(a)piren (µg/kg)	1550
Fe (g/kg)	12,2	Benzo(g,h,i)perilen (µg/kg)	150
Mn (mg/kg)	240	Indeno(1,2,3-cd)piren (µg/kg)	230
Ni (mg/kg)	17	Dibenzo(a,h)antracen (µg/kg)	<5,0
Cr (mg/kg)	7,9	SUM PAH (µg/kg)	5500
Pb (mg/kg)	20	Organotrofne bakterije (cfu/g)	46,5x10 ⁸
Cd (mg/kg)	0,65	Ugljovodonik oksidujuće (cfu/g)	57,7x10 ⁸
Cu(mg/kg)	17	DHA (µgTPF/g)	169
Zn (mg/kg)	145	IFA (µmol pNP/s/g)	116

4.1.2. Temperaturni uslovi u toku tretmana zemljišta biogomilama i površinskom obradom

Promena temperature utiče na na rast i aktivnost mikroflore prisutne u zemljištu, u opsegu od 10°C do 45°C, brzina mikrobiološke aktivnosti se obično udvostručava na svakih 10°C. Zbog toga što temperatura zemljišta varira sa ambijentalnom temperaturom, postojaće određeni periodi tokom godine kada se bakterijski rast, a samim tim i degradacija kontaminanata smanjuje. Kada se ambijentalna temperatura vrati u opseg koji je optimalan za rast bakterija, bakterijska aktivnost se ponovo povećava (USEPA, 1994). Međutim, izvedena su brojna ispitivanja u hladnim regionima i na Arktiku koja pokazuju da se procesi biodegradacije mogu uspešno odvijati i pri niskim temperaturama, ali iznad tačke smrzavanja vode (Filler *et al.*, 2001; Walworth *et al.*, 2001). Promena temperature u biogomilama i površinskoj obradi pratila je uslove ambijentalne temperature, pri čemu je u zimskim mesecima padala na vrednosti bliske nuli, ali je bitno naglasiti da u toku posmatranog perioda nije došlo do smrzavanja zemljišta (slika 4.1.).



Slika 4.1. Promena temperature u zemljištu tokom procesa bioremedijacije biogomilama i površinskom obradom

4.1.3. Ispitivanje procesa bioremedijacije zemljišta u toku tretmana biogomilama

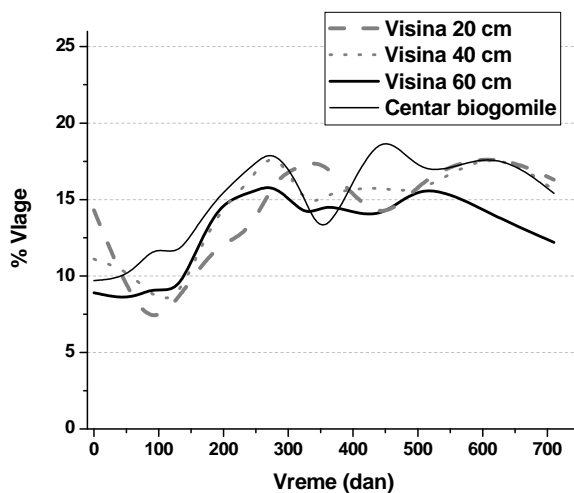
Vlažnost zemljišta

Za odvijanje mikrobioloških procesa u zemljištu na odgovarajućem nivou, a samim tim i za uspešno izvođenje procesa bioremedijacije neophodno je podesiti optimalne uslove u pogledu sadržaja vlage u zemljištu. Za normalan rast mikroorganizama u zemljištu potrebni su vlažni uslovi. Međutim, prekomerna vlaga zemljišta, ograničava kretanje vazduha kroz međupovršinu, a samim tim redukuje

dostupnost kiseonika koji je esencijalan za aerobne metaboličke procese. Generalno zemljište treba da je vlažno ali ne i mokro. Idealni opseg za vlažnost zemljišta je između 12-30%, ili 40-80% saturacionog kapaciteta zemljišta.

Sadržaj vlage u toku tretmana kretao se u opsegu od 6,9 do 18,6%, što predstavlja 30-82% saturacionog kapaciteta ispitivanog zemljišta (slika 4.2.). Odatve sledi da su u zemljištu u toku tretmana održavani optimalni uslovi u pogledu sadržaja vlage. U cilju održavanja ovih optimalnih uslova zemljište je navodnjavano dva puta nedeljno u toku letnjih meseci i jednom u dve nedelje u toku zimskih meseci. Za navodnjavanje zemljišta korišćena je ocedna voda sa biogomila (slika 3.2.) koja je periodično dopunjavana sa vodom iz bioreaktora (slika 3.6.), zbog gubitaka usled isparavanja i njenog vezivanja i zadržavanja u zemljištu.

Sadržaj vlage je najniži u prvih 100 dana eksperimenta i kretao se u opsegu od 6,9%-12%, nakon ovog perioda sadržaj vlage u zemljištu raste na oko 15,5% (prosečna vrednost za sve četiri monitoring tačke) i ostaje skoro konstantan do kraja eksperimenta. Ovo je najverovatnije posledica visokog sadržaja ugljovodonika u zemljištu, koji formiraju tanak film ulja na česticama zemljišta što sprečava prodiranje i vezivanje vode za čestice zemljišta, bez obzira na količinu vode dodate prilikom navodnjavanja, i na dodatnu slamu kao kompost materijal čiji je cilj osim olakšavanja transporta kiseonika i zadržavanje vode u zemljištu. Dobijeni rezultati su u skladu sa promenom sadržaja ugljovodonika (slika 4.7.) gde se vidi da je najveća količina ugljovodonika uklonjenja u ovom periodu. Dodatno, najmanji sadržaj vlage izmeren je na vrhu biogomile (60 cm), što je i za očekivati s obzirom da dolazi do ceđenja vode sa viših slojeva biogomile ka nižim.

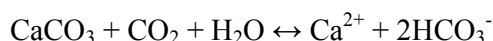


Slika 4.2. Promena sadržaja vlage u tretiranom zemljištu na različitim visinama biogomile u toku tretmana

Promena pH vrednosti u zemljištu i vodi u toku tretmana

Da bi se podržao bakterijski rast, pH zemljišta bi trebalo da je u opsegu od 6-8, a vrednosti oko 7 su optimalne (USEPA, 1998c). pH vrednost zemljišta u toku tretmana se kretala u opsegu od 6,60 do 7,98, tj. u okviru optimalnih vrednosti u toku

posmatranog procesa biodegradacije ugljovodonika u zemljištu (tabela 4.2.). U toku prvih 92 dana eksperimenta pH vrednost u zemljištu i u ocednoj vodi raste kao posledica odvijanja procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Nakon ovog perioda pH vrednost polako opada do 242. dana najverovatnije kao posledica dekompozicije organske materije i mikrobiološke respiracije pri čemu nastaju kiseline, posebno ugljena kiselina. Naime, organska materija u reaktoru se razgrađuje do ugljen-dioksida i vode. Nastali ugljen-dioksid rastvara karbonate iz zemljišta i gradi hidrokarbonate:



Slobodna ugljena kiselina i hidrokarbonatni-jon predstavljaju osnovni karbonatni sistem koji ispoljava puferske osobine i stabilise pH vode:



pH vrednost vode zavisi od različitih oblika ugljene kiseline. Interval pH vrednosti na kojima je zastupljena ravnoteža između slobodne ugljene kiseline i hidrokarbonata je 4,2-8,3.

Nakon 280. dana imamo nagli pad pH vrednosti za skoro jednu pH jedinicu što je posledica dodavanja veštačkog đubriva u zemljište u tom periodu u cilju optimizovanja sadržaja nutrijenata. U toku poslednjih 400 dana eksperimenta pH vrednost opet polako raste takođe kao posledica odvijanja procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Promena pH vrednosti ocedne vode uglavnom prati promene pH vrednosti zemljišta.

Tabela 4.2. Promena pH vrednosti u tretiranom zemljištu na različitim visinama biogomile i u ocednoj vodi u toku tretmana

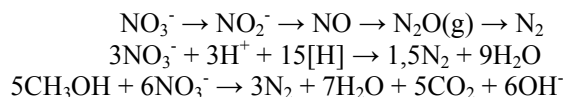
Vreme (dan)	20 cm	40 cm	60 cm	Centar biogomile	Srednje vrednosti	Ocedna voda
0	7,26	7,30	7,31	7,30	7,29	7,20
56	7,39	7,41	7,58	7,31	7,42	7,30
92	7,92	7,97	7,98	7,97	7,96	7,88
159	7,55	7,60	7,58	7,49	7,56	7,40
242	7,42	7,57	7,47	7,39	7,46	7,45
280	6,60	6,74	7,18	6,83	6,84	7,64
328	6,56	6,74	6,89	6,83	6,76	7,39
358	6,78	6,71	6,73	6,93	6,79	7,50
443	7,05	7,01	7,15	7,13	7,09	7,25
613	7,23	7,24	7,34	7,34	7,29	7,14
710	7,43	7,61	7,68	7,60	7,58	7,25

Sadržaj nutrijenata u zemljištu i vodi u toku tretmana

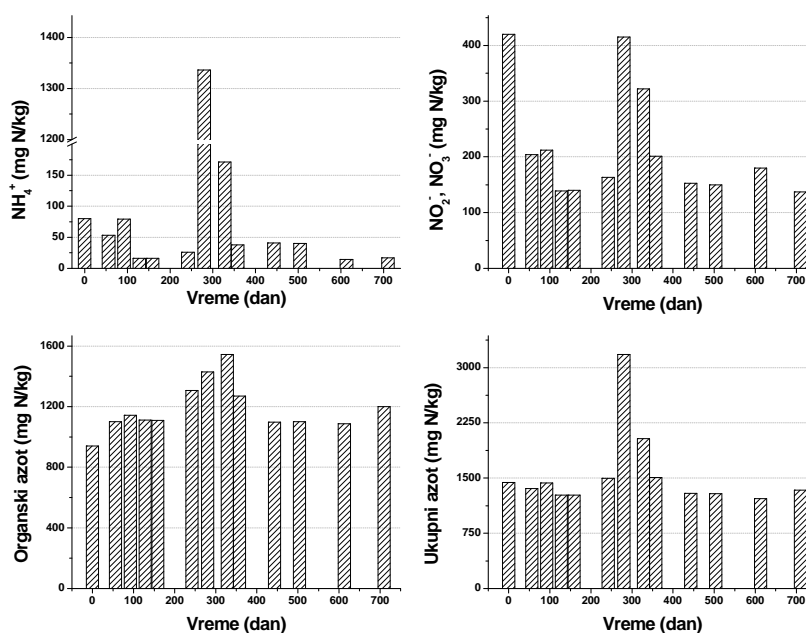
Za normalan rast i održavanje biodegradacionog procesa mikroorganizama potrebni su neorganski nutrijenti kao što su azot i fosfor. Neophodni nutrijenti za održavanje bakterijske populacije mogu biti prisutni u dovoljnoj količini u samom

zemljištu, ali ih je najčešće potrebno dodavati. Međutim, višak određenih nutrijenata (npr., fosfata i sulfata) može usporiti mikrobijalni metabolizam. Tipičan C:N:P odnos kreće se u opsegu od 100:10:1 do 100:10:0,5, u zavisnosti od specifičnih konstituenata i mikroorganizama uključenih u bidegradacioni proces.

U toku prvih 250 dana eksperimenta dolazi do opadanja sadržaja amonijačnog, nitritnog i nitratnog azota (slika 4.3.), što je praćeno istovremenim porastom sadržaja organskog azota, kao posledica asimilacije azotnih materija od strane mikroorganizama. Međutim, s obzirom da je povećanje sadržaja organskog azota manje od smanjenja pomenutih oblika azota, možemo pretpostaviti da se deo nitratnog i nitritnog azota denitrifikuje do N_2 , prema sledećim reakcijama:

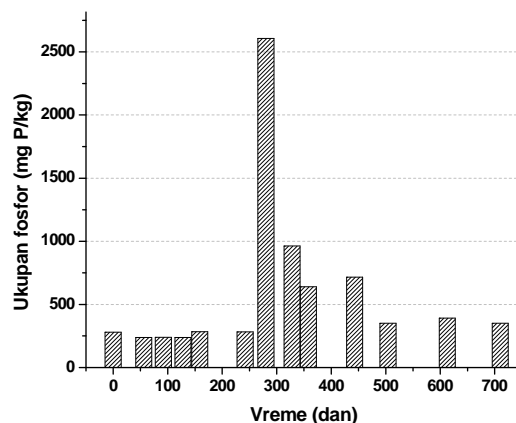


Ovo je u skladu sa povećanjem pH vrednosti izmerene u toku prvih 100 dana eksperimenta kada je ovaj proces i bio najintenzivniji s obzirom da je koncentracija nitrata opala za više od 50% u ovom periodu. U cilju održavanja optimalnih uslova u pogledu sadržaja nutrijenata, na biogomile je dodato veštačko đubrivo. Ukupno je dodato oko 1 kg NPK 15:15:15 đubriva, koje je sadržalo 150 g azota (60% amonijačnog i 40% nitritnog) i 150 g fosfora. Naravno, nakon dodatka đubriva izmeren je porast sadržaja amonijačnog i nitratnog azota, čiji sadržaj nakon ovog perioda opada, pri čemu se jedan deo ugrađuje u organsku materiju dok se drugi deo spira sa zemljišta tako da je u ocednoj vodi registrovan povišen sadržaj ovih oblika azota (tabela 4.3.). Nakon 358. dana dolazi do opadanja sadržaja organske materije, najverovatnije kao posledica degradacije odumrle ćelijske biomase, da bi nakon 504. dana eksperimenta sadržaj svih oblika azota ostao uglavnom konstantan do kraja eksperimenta.



Slika 4.3. Promena sadržaja azotnih materija u zemljištu u toku tretmana

Sadržaj fosfora do momenta dodatka veštačkog đubriva je uglavnom konstantan i kreće se u proseku oko 250 mg P/kg (slika 4.4.). Nakon dodatka đubriva njegova vrednost u zemljištu iznosi 2600 mg P/kg, nakon čega njegova koncentracija opada do kraja eksperimenta najverovatnije kao posledica njegove manjim delom ugradnje u biomasu i većim delom njegovog spiranja sa zemljišta, a možda i zadržavanja u dubljim slojevima zemljišta ili peska koji je postavljen ispod sloja zemljišta na drenažnim cevima za ocednu vodu (slika 3.3.).



Slika 4.4. Promena sadržaja fosfornih materija u zemljištu u toku tretmana

Promena sadržaja nutrijentnih materija u ocednoj vodi uglavnom prate njihovu promenu u zemljištu (tabela 4.3.). U ocednoj vodi nije detektovan organski azot, tako da je ukupan azot dobijen sabiranjem amonijačnog, nitritnog i nitratnog azota. Pre dodatka veštačkog đubriva sadržaj amonijačnog azota u ocednoj vodi je nizak (manje od 1% nutrijentnih materija u zemljištu), dok nitrati i nitriti uglavnom nisu ni detektovani, odakle možemo pretpostaviti da se deo nitratnog i nitritnog azota u zemljištu denitrifikuje do N_2 , i da se ne gubi spiranjem sa zemljišta u ocednu vodu.

Tabela 4.3. Promena nutrijentnih materija u ocednoj vodi u toku tretmana

Vreme (dan)	Parametar				
	NH_4^+ (mg N/l)	NO_2^- (mg N/l)	NO_3^- (mg N/l)	Ukupan N (mg N/l)	PO_4^{3-} (mg P/l)
0	6,83	0,61	3,58	11,02	0,86
56	1,37	<0,002	<0,43	1,37	0,77
92	0,98	<0,002	<0,43	0,98	0,66
128	2,54	<0,002	<0,43	2,54	0,66
159	2,93	<0,002	<0,43	2,93	0,66
242	4,39	0,03	<0,43	4,39	0,66
280	26,33	2,66	15,68	44,67	1,09
328	8,19	0,30	11,65	20,14	1,09
443	5,46	<0,002	2,24	5,46	0,66
613	3,41	0,12	2,69	6,22	0,66
710	3,41	0,12	2,69	6,22	0,66

Promena organskih materija u zemljištu i vodi u toku tretmana

Sadržaj organskog ugljenika određen je kao gubitak žarenjem na 550°C, uz primenu korekcionog faktora od 1,724 za transfer % gubitka žarenjem u % organskog ugljenika (Savv et al., 2003). U toku eksperimenta u zemljištu je bilo oko 86% mineralnih materija, oko 13 % organskih materija i oko 7% organskog ugljenika (tabela 4.4.). To je u skladu sa činjenicom da je osnova Rafinerije refulisani sloj peska i da se samo na površini obrazovao tanak sloj humusa.

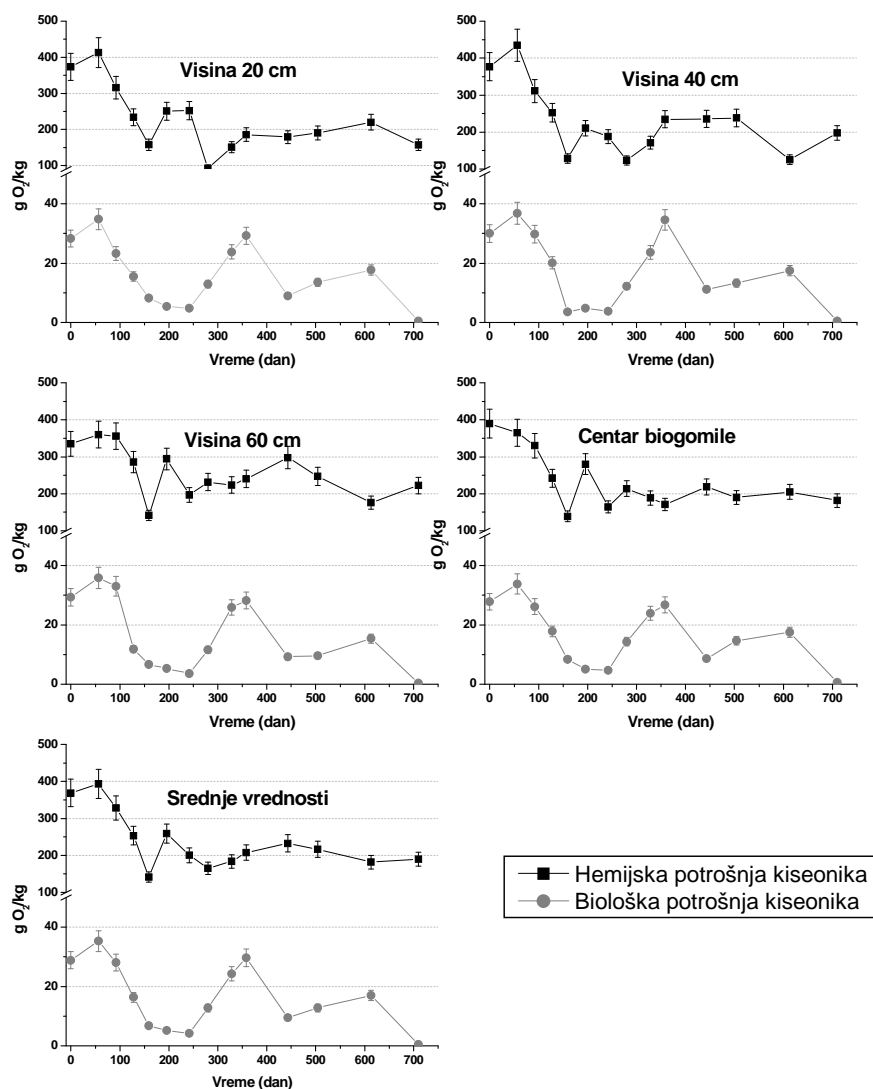
Tabela 4.4. Sadržaj organske i mineralne materije zemljištu u toku tretmana

Vreme (dan)	% mineralne materije	% organske materije	% organskog ugljenika
0	89,02	13,24	7,68
56	90,70	12,14	7,04
92	90,81	10,59	6,14
128	90,80	11,10	6,44
159	88,29	13,13	7,61
196	85,77	15,15	8,79
242	84,62	14,04	8,14
280	82,45	15,13	8,77
328	85,00	13,99	8,12
358	85,09	14,10	8,18
443	84,25	13,40	7,77
504	82,03	11,22	6,51
613	82,63	13,21	7,66
710	85,14	13,44	7,79

Hemijska potrošnja kiseonika (HPK) zemljišta u toku eksperimenta je u proseku bila oko 240 g O₂/kg (slika 4.5.). Prema literaturnim podacima za većinu ugljovodonika može se aproksimirati da je potrebno 3 g kiseonika za oksidaciju 1 g razgradljivih ugljovodonika - datih 240 g O₂/kg zemljišta može da oksiduje 80 g organske materije/kg zemljišta, što predstavlja sadržaj organske materije od 8%, a to je približno jednako sadržaju organskog ugljenika određenog sagorevanjem (7,6%). Na slici 4.5. prikazana je promena HPK vrednosti u toku tretmana na različitim visinama biogomile, odakle se može videti da je ova promena bila prilično ujednačena na svim monitoring tačkama. HPK u toku eksperimenta ima trend opadanja, i opada u proseku za oko 180 g O₂/kg, kao posledica degradacije organskih materija u toku eksperimenta što je u skladu sa izmerenim promenama sadržaja ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja.

Na slici 4.5. prikazana je i promena biološke potrošnje kiseonika (BPK₅) u zemljištu u toku tretmana u biogomilama. Vrednosti BPK₅ reprezentuju mikrobiološku aktivnost zemljišta kao i udeo biodegradabilnih ugljovodonika prisutnih u zemljištu. Nakon postavke eksperimenta podešeni su optimalni uslova za biodegradaciju (u pogledu vlage, kiseonika, sadržaja mikroorganizama itd.) dolazi do povećanja BPK₅ vrednosti za oko 10 g O₂/kg u prvih 56 dana eksperimenta, kao posledica povećanja mikrobiološke aktivnosti i razgradnje prisutnog biorazgradivog

organskog supstrata. Nakon ovog perioda dolazi do opadanja BPK_5 vrednosti što je posledica kako iscrpljivanja sadržaja biorazgradivog organskog supstrata tako i smanjenja sadržaja neophodne količine nutrijenata za odvijanje mikrobioloških procesa. Iz ovih razloga u zemljište je kao što je to već rečeno dodato veštačko đubrivo. Dodatak veštačkog đubriva doveo je do porasta BPK_5 vrednosti u periodu od 242. do 358. dana. Ovo je u skladu sa povećanjem sadržaja organskog azota izmerenog u ovom periodu. Naime, u toku svog metaboličkog ciklusa mikroorganizmi deo supstrata troše za stvaranje nove ćelijske biomase (u toku ovog procesa dolazi do ugradnje neorganskih oblika azota i organskog supstrata u ćelijsku biomasu), a drugi deo organskog supstrata transformišu do ugljen-dioksida i vode. Od 358. dana BPK_5 vrednost opada do kraja eksperimenta, što je posledica smanjenja koncentracije biodegradabilnog organskog supstrata potrebnog za mikrobiološke procese. Na kraju eksperimenta BPK_5 vrednost opada skoro na nulu ($0,42 \text{ g O}_2/\text{kg}$) pa bi se odavde mogao izvući zaključak da bez obzira na visok sadržaj organske materije u zemljištu udeo biodegradabilnog supstrata je veoma nizak.

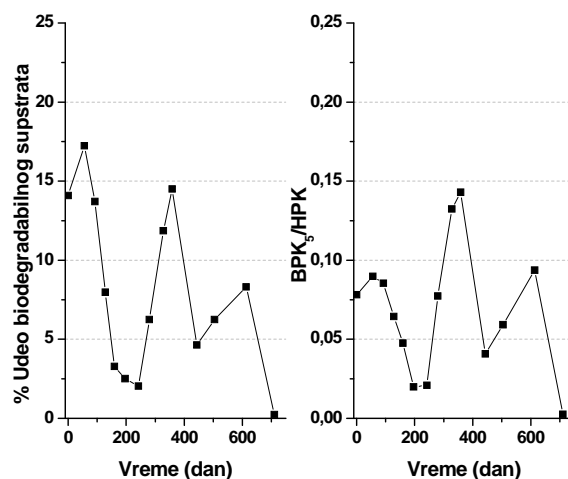


Slika 4.5. Promena hemijske i biološke potrošnje kiseonika u toku tretmana

Udeo biodegradabilne frakcije organske materije u ukupnoj količini organske materije može se izračunati na sledeći način:

$$\% \text{Biodegradabilnog udela} = \text{BPK}/\text{ThPK} \times 100$$

Gde je ThPK teorijska potrošnja kiseonika koja se može izračunati stehiometrijski na osnovu poznatog sadržaja organskog ugljenika (Kaakinen et al., 2007). Za ovu svrhu ovde su korišćene vrednosti dobijene za % organskog ugljenika, tabela 4.4., rezultati su prikazani na slici 4.6. Trend krive je sličan kao kod promene BPK₅ vrednost. Međutim, generalno gledano udeo biodegradabilnog supstrata ne prelazi 18% u toku eksperimenta, dok je na kraju eksperimenta izmerena vrednost biodegradabilnog dela supstrata bila izuzetno niska i iznosila je 0,4%. Ovo je u skladu sa činjenicom da je ispitivano zemljište u toku 8 godina bilo izloženo spontanim procesima degradacije, isparavanja itd. i u toku 2 godine (u toku eksperimenta) kontrolisanim procesima degradacije. Povećavajem vremena kontakta između kontaminanata i zemljišta, opada hemijska i biološka dostupnost kontaminanata, ovaj proces se često naziva "starenje". Glavni mehanizmi starenja su sorpcija i difuzija (kolektivno nazvane sekvestracija), koje predstavljaju interakciju između kontaminanata i čvrste frakcije u zemljištu, uglavnom mineralne i organske frakcije (Xing i Pignatello, 1997; Schlebaum et al., 1998). Organski kontaminanti se u zemljištu najčešće vezuju kovalentnim vezama, što rezultuje stvaranjem skoro ireverzibilne inkorporacije u zemljište (Dec i Bollag, 1997; Gevao et al., 2000). Kao što je već rečeno sekvestracija i starenje organskih kontaminanata u zemljištu redukuje biodostupnost organskih jedinjenja što rezultuje stvaranjem perzistentnog reziduala organskih kontaminanata u zemljištu. Kontaminanti koji su podlegli procesu sekvestracije i starenja nisu dostupni za biodegradaciju u zemljištu čak iako su sveže dodata jedinjenja još uvek biodegradabilna (Alexander, 1995).



Slika 4.6. Procentualni udeo biodegradabilnog dela supstrata i BPK₅/HPK odnos (srednje vrednosti sa sve četiri monitoring tačke) u toku tretmana

Slične zaključke možemo izvesti posmatranjem BPK₅/HPK odnosa koji se kretao u granicama (0,003-0,14). Međutim, iako je odnos BPK₅/HPK blizu nule što

znači da je udeo lako razgradivih organskih materija u ukupnom sadržaju organskih materija veoma nizak, ipak dolazi do smanjenja vrednosti HPK u većem iznosu nego što je doprinos smanjenja vrednosti BPK₅. Iz toga se može zaključiti da se u toku datog tretmana razgrađuju i teže razgradiva organska jedinjenja.

U tabeli 4.5. date su vrednosti za hemijsku i biološku potrošnju kiseonika u ocednoj vodi sa biogomile. Najveća vrednost HPK detektovana je na početku eksperimenta što je u skladu sa činjenicom da je na početku eksperimenta zemljište sadržalo najveću količinu rastvornih ugljovodonika koji su se mogli sprati sa zemljišta u ocednu vodu, dok je u toku preostalog perioda eksperimenta prosečna vrednost HPK bila oko 1000 mg O₂/l. Vrednosti BPK₅ u ocednoj vodi uglavnom su pratile trend promene BPK₅ vrednosti u zemljištu.

Tabela 4.5. HPK i BPK₅ u ocednoj vodi sa biogomile u toku tretmana

Vreme (dan)	0	56	92	128	159	242	280	328	443	504	613	710
HPK (mg O ₂ /l)	4315	500	550	730	955	900	1200	900	1275	700	1408	1200
BPK ₅ (mg O ₂ /l)	102	56	33	20	20	36	78	154	35	9,0	6,0	6,0

Kinetika degradacije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u toku tretmana

Brzina degradacije naftnih ugljovodonika zavisi od niza faktora. Remedijaciono vreme se grubo može odrediti iz degradacionog stepena ugljovodonika u uzorcima kontaminiranog zemljišta tokom vremena. U brojnim eksperimentalnim istraživanjima je pokazano da se biodegradaciona kinetika može aproksimirati kinetikom prvog reda, (Heitkamp et al. 1987; Heitkamp i Cerniglla 1987; Venosa et al. 1996; Seabra et al. 1999; Holder et al. 1999; Winningham et al. 1999; Namkoonga et al. 2002; Grossi et al. 2002; Hohener et al. 2003; Collina et al. 2005; Rončević et al. 2005):

$$C = C_0 e^{-kt} \text{ (ili } \ln C = \ln C_0 - kt) \quad (1)$$

gde je C koncentracija supstrata (g/kg), t je vreme, C₀ inicijalna koncentracija supstrata (g/kg), k je konstanta brzine promene koncentracije supstrata u zemljištu (dan⁻¹).

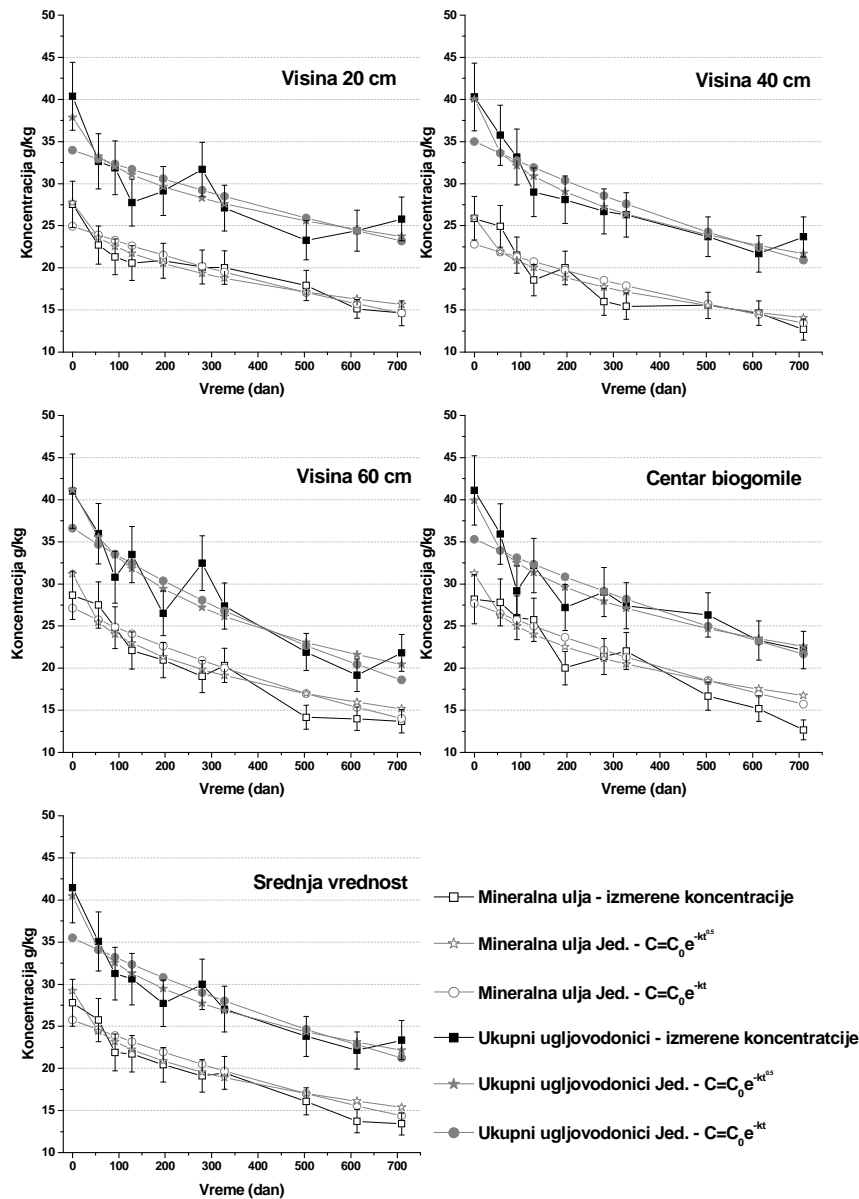
Osim ovog modela korišćen je model predložen od strane Rončević et al. 2005:

$$\ln C = \ln C_0 - kt^{0,5} \quad (2)$$

gde je C koncentracija supstrata (g/kg), t je vreme, C₀ inicijalna koncentracija supstrata (g/kg), k je konstanta brzine promene koncentracije supstrata u zemljištu (dan^{-0,5}).

Na slici 4.7. prikazna je promena koncentracije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika sa vremenom na različitim visinama biogomile, kao i oba navedena jednostavna kinetička modela koja su u skladu sa prikazanim promenama. U toku posmatranog perioda na monitoring tačkama 20 cm, 40 cm, 60 cm i iz centra biogomile koncentracija mineralnih ulja se smanjila za 47%; 51%, 52 i 55%, dok se

koncentracija ukupnih ugljovodonika smanjila za 36%, 41%, 47%, i 46% respektivno. Generalno u toku posmatranog perioda koncentracija mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika se u proseku smanjila za 52% i 43% respektivno. Do smanjenja sadržaja ugljovodonika u gornjem sloju biogomile moglo je doći iz dva razloga: (1) usled mikrobiološke degradacije i (2) usled spiranja i migracije zagađenja u niže slojeve. S obzirom da u donjem sloju biogomile tokom vremena ne dolazi do porasta koncentracije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja, može se zaključiti da ne dolazi do značajne migracije zagađenja iz gornjeg sloja. Stoga, verovatnije je da do redukcije zagađenja dolazi mikrobiološkom razgradnjom, a ona je favorizovana u gornjem sloju, jer je on tanji, što omogućava bolji transport vode i kiseonika.



Slika 4.7. Promena koncentracije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u zemljištu tokom tretmana: stvarne koncentracije i koncentracije izračunate iz oba matematička modela ($\ln C = \ln C_0 - kt$ i $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$)

Najintenzivnija biodegradacija ugljovodonika uočena je u toku prvih godinu dana eksperimenta, dok u drugoj godini eksperimenta sadržaj ugljovodonika sporo opada i u toku poslednjih meseci uglavnom ostaje konstantan. Sadržaj mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika na kraju eksperimenta je bio visok (u proseku oko 13,2 g/kg i 23,4 g/kg respektivno). Međutim, s obzirom na veoma sporu biodegradaciju ugljovodonika i na veoma nisku vrednost biološke potrošnje kiseonika na kraju eksperimenta možemo zaključiti da je preostali udeo ugljovodonika koji se može biodegradirati veoma mali, i da ova preostala količina ugljovodonika u zemljištu najvećim delom čini perzistentnu rezidualnu frakciju ugljovodonika. Smatra se da je ovakav rezidualni materijal nakon degradacije nafte i njenih produkata analogan, i čak se može smatrati huminskim materijama. Zbog njihovih inertnih karakteristika, nerastvorljivosti i sličnosti sa humusnim materijalom malo je verovatno da ova jedinjenja predstavljaju opasnost za životnu sredinu.

Ovde treba napomenuti da, za razliku od drugih gore razmatranih parametara, nije uočen uticaj dodatka veštačkog đubriva na promenu brzine degradacije ugljovodonika. Što je takođe najverovatnije posledica velikog udela perzistentne frakcije ugljovodonika u ukupnoj masi ugljovodonika, tako da eventualne male promene u brzini biodgradacije biodegradabilnog dela supstrata nisu mogle biti uočene.

Vrednosti za konstante brzina promene koncentracija ugljovodonika sa vremenom i koeficijente korelacije dobijene primenom ova dva kinetička modela na izmerene eksperimentalne vrednosti su date u tabeli 4.6. Visoki koeficijenti korelacije dobijeni su za oba kinetička modela, pri čemu su neznatno bolji koeficijenti korelacije dobijeni za kinetički model predložen od strane *Rončević et al. 2005*. Vrednost konstante brzine degradacije mineralnih ulja je najveća na 60 cm a najniža na 20 cm, što takođe potvrđuje činjenicu da je biodegradacija ugljovodonika favorizovana u gornjem sloju, zbog limitirajućeg uticaja koncentracije kiseonika na biodegradaciju ugljovodonika u donjim slojevima kao posledice njegovog sporijeg transporta u donjim debljim slojevima zemljišta biogomile.

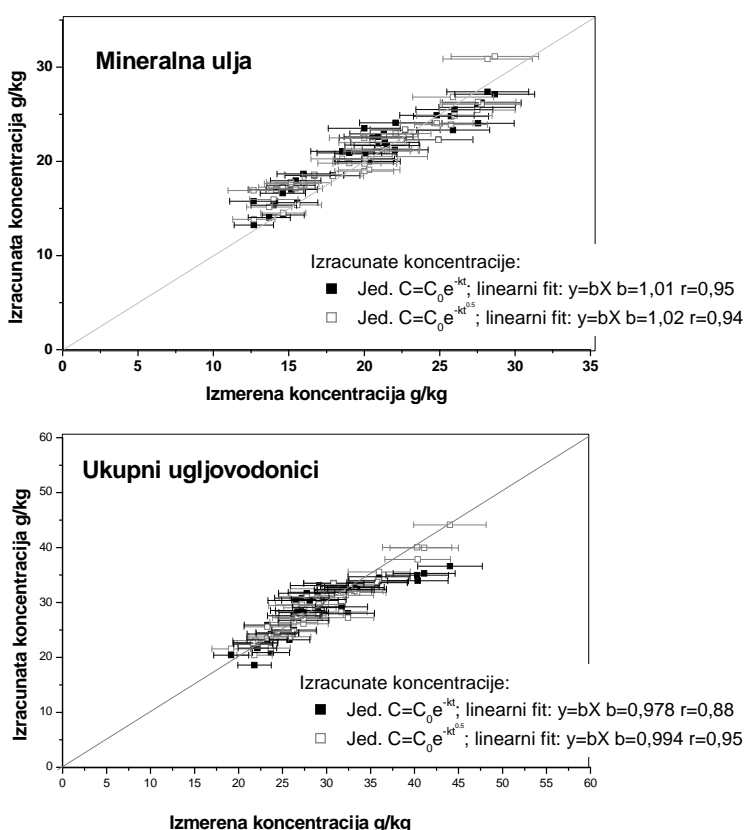
Tabela 4.6. Kinetički parametri degradacije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u zemljištu tokom tretmana

	Mineralna ulja					Ukupni ugljovodonici				
	20 cm	40 cm	60 cm	Centar	Srednja vredn.	20 cm	40 cm	60 cm	Centar	Srednja vredn.
$\ln C = \ln C_0 - kt$										
$\ln C_0$	3,18	3,15	3,30	3,31	3,24	3,53	3,55	3,63	3,56	3,60
$k \text{ (dan}^{-1}\text{)} \times 10^{-4}$	5,15	7,99	9,28	7,77	7,66	5,40	7,30	9,14	6,80	7,20
r	0,82	0,85	0,94	0,90	0,96	0,81	0,90	0,91	0,90	0,91
$\ln C = \ln C_0 - kt^{0,5}$										
$\ln C_0$	3,27	3,29	3,44	3,43	3,36	3,63	3,69	3,79	3,69	3,70
$k \text{ (dan}^{-0,5}\text{)} \times 10^{-2}$	1,58	2,48	2,70	2,26	2,28	1,75	2,30	2,72	2,14	2,26
r	0,85	0,89	0,93	0,89	0,97	0,90	0,97	0,94	0,95	0,97

Dodatno, konstante brzine degradacije mineralnih ulja su neznatno veće od konstanti brzina degradacije ukupnih ugljovodonika na monitoring tačkama 60 cm,

40 cm i iz centra biogomile, s obzirom da je limitirajući faktor brzine biodegradacije mineralnih ugljovodonika njihova inicijalna oksidacija, ovo može biti posledica značajnijeg doprinosa teško degradabilnih jedinjenja (humus, lignin, asfaltne komponente idr.) na konstantu brzine degradacije ukupnih ugljovodonika. Dodatno, brža degradacija ukupnih ugljovodonika od mineralnih ulja na monitoring tački 20 cm potvrđuje limitirajući uticaj kiseonika na biodegradaciju mineralnih ulja.

Da bi se utvrdilo koji od ova dva modela daje pouzdanije rezultate, koncentracije ugljovodonika dobijene primenom ova dva modela su korelirane s koncentracijama dobijenim eksperimentalnim putem (slika 4.8.). Iz prikazanih rezultata se vidi da su bolje korelacije dobijene primenom jednačine 2 u pogledu ukupnih ugljovodonika, dok su u pogledu mineralnih ulja dobijeni skoro isti koeficijenti korelacije za obe jednačine. Takođe, bitno je naglasiti da su nagibi pravi i za mineralna ulja i za ukupne ugljovodonike za oba kinetička modela bliski jedinici, što ukazuje na to da su oba kinetička modela u skladu sa izmerenim promenama koncentracija ugljovodonika.



Slika 4.8. Korelacija između stvarne (izmerene) koncentracije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika i koncentracije predviđene (izračunate) primenom matematičkih modela

U tabeli 4.7. prikazane su koncentracije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika u ocednoj vodi biogomile u toku eksperimenta. Prosečna koncentracija ukupnih ugljovodonika u ocednoj vodi tokom eksperimenta bila je oko 17 mg/l, dok

je prosečna koncentracija mineralnih ulja bila oko 4,5 mg/l, što ukazuje na niske količine ugljovodonika koji se spiraju sa oglednog polja, što ide u prilog činjenici da smanjenje koncentracije ugljovodonika potiče predominantno od procesa degradacije, a ne od procesa spiranja zagađenja. Takođe, treba naglasiti da je ova voda korišćena za navodnjavanje oglednog polja, tako da su ugljovodonici koji su se sprali sa biogomile ponovo vraćeni na nju. Iako je koncentracija mineralnih ulja u ocednoj vodi niska, ona je ipak veća od maksimalno dozvoljene koncentracije u vodi za piće (10 µg/l), a u slučaju odlaganja ovakvog zemljišta u životnu sredinu ove količine ugljovodonika bi se djestvom padavina mogle sprati sa kontaminiranog zemljišta i infiltrirati u podzemnu vodu i na taj način degradirati njen kvalitet.

Tabela 4.7 Promena koncentracije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika u ocednoj vodi u toku tretmana

Vreme (dan)	0	56	92	128	159	242	280	328	504	613	710
Ukupni ugljovodonici (mg/l)	15,9	5,1	3,9	21,6	22,5	13,2	21,6	20,5	22,9	18,4	15,4
Mineralna ulja (mg/l)	3,7	3,9	2,8	3,4	4,1	0,9	3,9	4,9	5,5	2,2	1,5

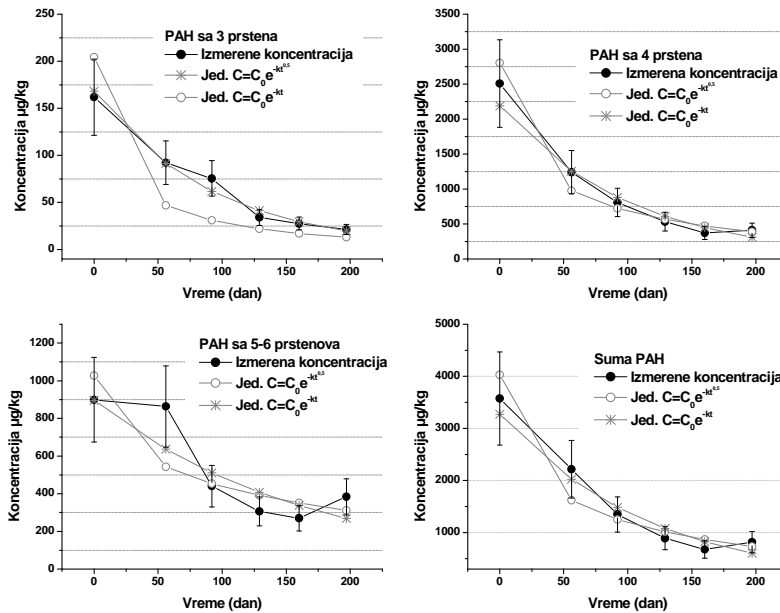
Degradacija poliaromatičnih ugljovodonika u zemljištu u toku tretmana

Degradacija PAH je takođe upoređena sa dva kinetička modela spomenuta gore. Promena koncentracije PAH sa tri, četiri, pet-šest prstenova i ukupne količine PAH prikazana je na slici 4.9. Zbog toga što je promena koncentracije PAH bila veoma slična na sve četiri monitoring tačke na slici 4.9. prikazane su srednje vrednosti za sve četiri monitoring tačke. Tokom posmatranog perioda sadržaj PAH sa 3 prstena je opao za 87%, sa 4 prstena za 84% a za 5-6 prstenova za 57%, dok je prosečni sadržaj ukupnih PAH opao za 77%. Dodatno, važno je zapaziti da je koncentracija PAH sa 3 prstena deset puta niža od koncentracije PAH sa većim brojem prstenova na samom početku tretmana u biogomili. Ovo se takođe može pripisati bržoj degradaciji PAH sa manjim brojem prstenova tokom spontanog procesa starenja naftnog zagađenja u zemljištu koji se odvijao prethodnih 8 godina.

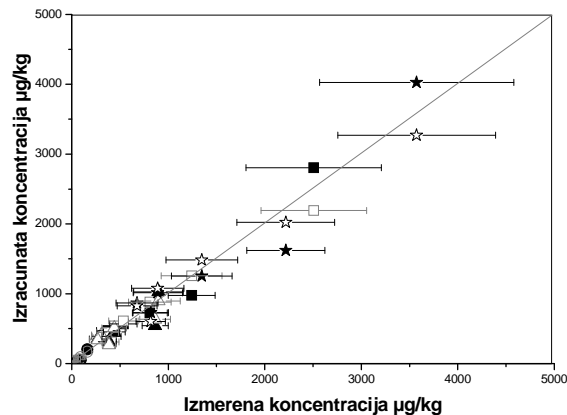
Najbrža biodegradacija uočena je kod PAH sa manjim brojem prstenova, što je posledica njihove jednostavnije strukture u odnosu na PAH sa većim brojem prstenova. Ovo je potvrđeno sa konstantama brzine degradacije PAH izračunatim pomoću dva pomenuta kinetička modela (tabela 4.8.).

Podaci za koncentraciju PAH izračunati primenom jednačine 1 i 2 (slika 4.9.) su u skladu sa eksperimentalno dobijenim podacima. Ovo je potvrđeno koeficijentima korelacije koji su bili veći od 0,9, osim u slučaju PAH sa 5-6 prstenova, za koje je koeficijent korelacije bio veći od 0,8 (tabela 4.8.).

Korelacija između eksperimentalnih podataka i podataka izračunatih iz oba kinetička modela je prikazana na slici 4.10. Za sve grupe posmatranih PAH nagibi pravih su bili grupisani oko jedinice što znači da su primenjeni kinetički modeli u skladu sa dobijenim promenama koncentracija PAH.



Slika 4.9. Promena koncentracije PAH (sa 3, 4, 5-6 prstenova, suma) u zemljištu u toku tretmana: stvarne koncentracije i koncentracije izračunate iz oba kinetička modela ($\ln C = \ln C_0 - kt$ i $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$)



Jed. $C=C_0 e^{-kt}$

- Suma PAH sa 3 prstena; linearni fit: $y=bX$, $b=0.921$, $r=0.96$
- Suma PAH sa 4 prstena; linearni fit: $y=bX$, $b=1.00$, $r=0.99$
- △ Suma PAH sa 5-6 prstena; linearni fit: $y=bX$, $b=0.817$, $r=0.93$
- ☆ Suma PAH; linearni fit: $y=bX$, $b=1.02$, $r=0.96$

Jed. $C=C_0 e^{-kt^{0.5}}$

- Suma PAH sa 3 prstena; linearni fit: $y=bX$, $b=1.00$, $r=0.99$
- Suma PAH sa 4 prstena; linearni fit: $y=bX$, $b=0.924$, $r=0.99$
- ▲ Suma PAH sa 5-6 prstena; linearni fit: $y=bX$, $b=0.921$, $r=0.89$
- ★ Suma PAH; linearni fit: $y=bX$, $b=0.942$, $r=0.99$

Slika 4.10. Korelacija između stvarne (izmerene) koncentracije PAH (sa 3, 4, 5-6 prstenova, suma) i koncentracije predviđene (izračunate) primenom kinetičkih modela

Tabela 4.8. Kinetički parametri uklanjanja PAH iz zemljišta tokom tretmana

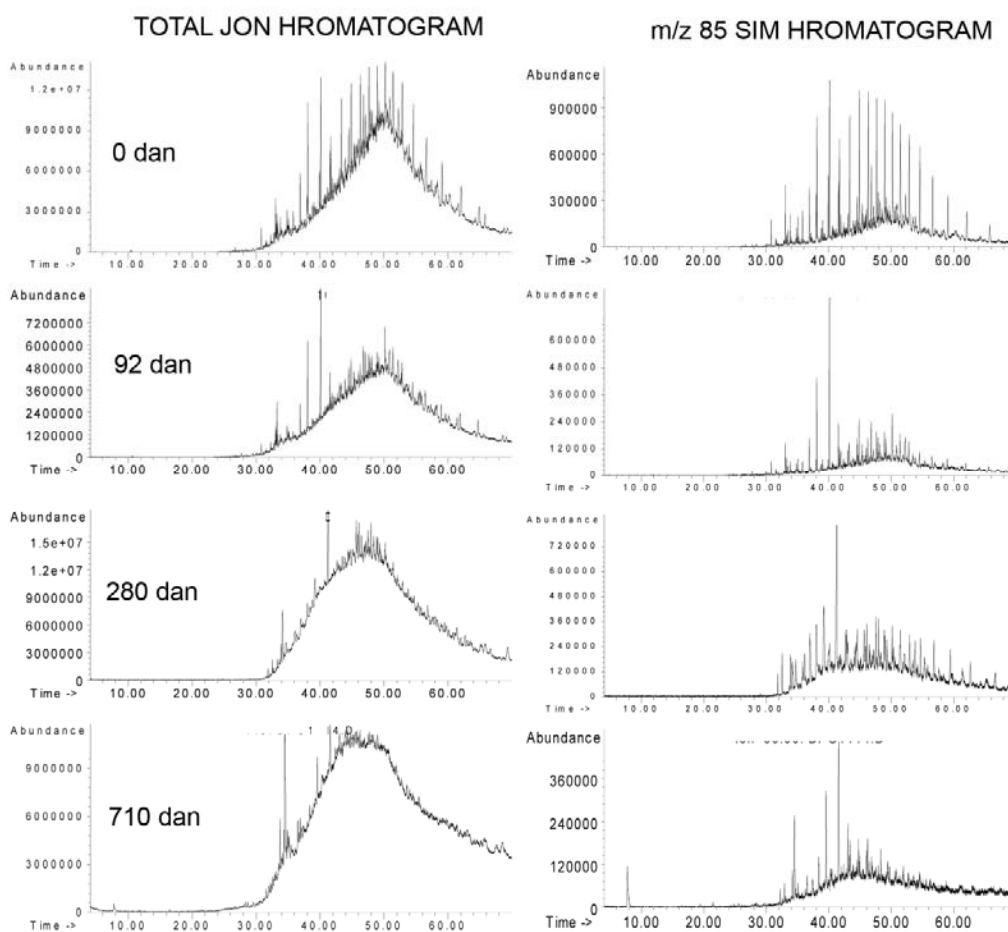
Parametri	PAH sa 3 prstena	PAH sa 4 prstena	PAH sa 5-6 prstenova	Suma svih PAH
$\ln C = \ln C_0 - kt$				
$\ln C_0$	5,21	7,55	6,78	8,02
$k \text{ (dan}^{-1}\text{)} \times 10^{-3}$	8,8	8,7	6,7	8,1
r	0,98	0,90	0,85	0,92
$\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$				
$\ln C_0$	5,44	7,85	6,77	8,26
$k \text{ (dan}^{-0.5}\text{)} \times 10^{-1}$	1,3	1,3	0,92	1,2
r	0,98	0,97	0,82	0,95

GC-MS kvalitativna analiza zemljišta u toku tretmana

Jedinjenja detektovana GC-MS kvalitativnom analizom ekstrakata zemljišta uzetih tokom perioda posmatranog procesa bioremedijacije na različitim visinama u biogomili su dati u tabelama 4.9., 4.10. 4.11. i 4.12., dodatno na slici 4.11. prikazani su total jon hromatogrami i m/z 85 SIM hromatogrami za 0., 92., 280. i 710. dan eksperimenta za uzorke uzete iz centra biogomile. Podaci reflektuju činjenicu da je zemljište uzeto za ovo ispitivanje u značajnoj meri zagađeno različitim ugljovodonicima, što je u skladu sa činjenicom da je zemljište zagađeno različitim produktima nafte (kao što su sirova nafta, dizel, srednji destilati, mazut, teški destilati, kerozin itd.) i njihovim produktima sagorevanja u toku bombardovanja Rafinerije nafte Novi Sad (*Dalmacija et al., 2000, 2003*). Na početku eksperimenta zemljište sa starim naftnim zagađenjem je sadržalo veliki broj n-alkana ravnog niza (C₁₂-C₃₃), kao i veliki broj račvastih ugljovodonika od kojih su u najvećoj meri prisutni (najintenzivniji pikovi u hromatogramu, slika 4.11.) nor-pristan (2,6,10-Trimetil-pentadekan), pristan (2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan) i fitan (2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan). Većina prisutnih jedinjenja detektovana je i na kraju eksperimenta. Prema ranijim istraživanjima, n-alkani $\leq C_{20}$ nestaju veoma brzo, ostavljajući za sobom izoprenoidne strukture (*Aboul-Kassim i Simoneit, 2001; Wang et al., 1994*), što je i potvrđeno prikazanim rezultatima. Naime, bez obzira što je većina n-alkana prisutnih na početku eksperimenta detektovana i na kraju, ako pogledamo total jon hromatograme (slika 4.11.) možemo uočiti na osnovu relativnih intenziteta pikova da su na kraju eksperimenta u najvećoj meri prisutna račvasta jedinjenja alkana (pristan i fitan), što je posledica njihove manje biodegradabilnosti (*Balba et al., 1998; Ivančev-Tumbas et al., 2004; Nhi-Chong et al., 2008*). Dodatno, veličina „brda“ u hromatogramu, koje predstavlja GC nerazdvojivu kompleksnu smešu ugljovodonika, raste sa proteklom vremenom trajanja eksperimenta, što je karakteristično za procese starenja i biodegradacije nafte u zemljištu (*Wang et al., 1994*).

Promene u prisustvu n-alkana po visinama biogomile su manje više iste, npr. dodekan je detektovan u prvih 128 dana eksperimenta, nakon čega nestaje, da bi ponovo bio detektovan od 328.-613. dana eksperimenta. Slično se dešava i sa pentadekanom, dok su tridekan i tetradekan detektovani samo na početku eksperimenta, što je najverovatnije posledica biorazgradnje složene organske materije koja je mogla da kompleksira ova jedinjenja u svoju strukturu, nakon iscrpljivanja lakše biodegradabilnog supstrata. Ovo je naročito izraženo u gornjem sloju biogomile

(60 cm) u kome vladaju najoptimalniji uslovi biodegradacije (u pogledu transporta kiseonika i vlage), pa do razgradnje složene organske materije može doći brže tako da su dodekan, i pentadekan na ovoj monitoring tački detekovani u dužem periodu. Dodatno, n-alkani C_{27} - C_{33} uglavnom nisu detektovani nakon 328. dana na visinama 60 cm i 40 cm; kao i nakon 443. dana na visini od 20 cm i centru biogomile, što je takođe posledica optimalnijih uslova za biodegradaciju u gornjim, tanjim slojevima biogomile, ovo je u skladu sa izmerenim promenama mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika u toku eksperimenta. Detekcija C_{16} - C_{26} tokom celog eksperimenta i nestanak C_{27} - C_{33} na kraju eksperimenta je samo posledica toga da je inicijalni sadržaj n-alkana C_{16} - C_{26} bio veći na početku eksperimenta.



Slika 4.11. Total jon hromatogrami i m/z 85 SIM jon hromatogrami dobijeni analizom zemljišta iz centra biogomile tokom tretmana

U uzorcima nisu detektovane volatilne komponente što je posledica gubitka kontaminanata isparavanjem i biodegradacijom tokom spontanog procesa starenja zagađenja u zemljištu pre postavke eksperimenta. Nekoliko cikličnih derivata alkana je detektovano tokom eksperimenta, ova jedinjenja su uglavnom bila novoformirana i predstavljaju neke od metabolita tokom biodegradacije normalnih i račvastih alkana.

Tabela 4.9. Jedinjenja detektovana u toku tretmana u zemljištu biogomile na 20 cm

Detektovana jedinjenja	Vreme (dan)											
	0	56	92	128	159	196	244	280	328	504	613	710
1-Hloro-dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dodekan			x	x			x		x	x		
Tridekan			x									
Tetradekan	x		x									
Pentadekan	x		x							x	x	
Heksadekan	x		x	x		x		x	x	x	x	x
Heptadekan	x	x		x	x	x				x		x
Oktadekan	x		x							x	x	x
Nonadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
Heneikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dokosan	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
Trikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tetrakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Pentakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heksakosan	x	x	x	x	x		x	x	x	x		x
Heptakosan	x	x	x	x	x	x	x	x				
Oktakosan	x	x	x	x	x	x						
Nanokosan	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Triakontan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
Hentriakontan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Dotriakontan		x	x	x	x	x	x	x	x			x
Trietriakontan	x		x		x	x						x
(Z)-7-Tetradeken	x							x	x	x		
(E)-3-Oktadeken	x							x	x	x	x	x
2,3,7-Trimetil-oktan	x		x									
5-Butil-nonan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,3,5-Trimetil-dekan	x	x	x					x	x	x	x	x
6-Etiyl-2-metil-dekan			x						x	x	x	x
6-Etil-undekan									x	x		x
5-Etil-5-propil-undekan	x	x	x		x	x	x		x			
2,6,10-Trimetil-pentadekan	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7,9-Dimetil-heksadekan	x	x	x						x	x		x
3-Metil-heptadekan	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	
2,6,10,15-Tetrametil-heptadekan	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
9-Metil-nonadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9-Oktil-heptadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
10-Metil-eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14,18-Pentametil-eikosan		x		x	x		x	x	x	x	x	x
Ciklotetradekan								x	x	x	x	x
1,7,11-Trimetil-4-ciklotetradekan	x								x			
3,4,5-Trihidroksi-2-ciklopenten-1-one				x	x							
Eikosil-cikloheksan,	x		x							x		
4-Metil- beta.-cikloheksanetanol				x	x		x			x	x	x
Cikloheksadekan		x		x	x		x					
1,2-Ditetradecikloksietan	x	x	x	x	x	x	x					
2,6-Naftalenedione, oktahidro-1,1,8	x		x						x			x
1,2-Dihidro-nafto[2,1-b]furan-4-ol						x						
2-Metil-antracen		x									x	x
9-Butil-antracen	x	x	x		x	x	x			x	x	
3,6-Dimetil-fenantren		x			x	x	x			x	x	
2,3,5-Trimetil-fenantren	x	x					x	x		x	x	
Ciklopenta[cd]piren	x	x		x		x	x	x	x	x	x	
2-Metil-piren	x	x	x	x	x	x	x	x				
2-Metil-krizen				x	x	x	x					
3-Metil-krizen	x	x				x	x	x	x			
2-Hloro-5-metoksibifenil					x		x	x	x	x	x	
N-Butil-benzenamin												
1,3,7,7-Tetrametil-2,11-doksa-3,5-bi..	x	x					x	x		x	x	x
(5.alfa.,14.beta.)-Androstan	x	x		x	x		x	x	x		x	x
(5.beta.)-Pregnan	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x
Holestan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(5.alpha.,14.beta.)-Holestan,	x		x		x	x	x	x				x
(17.alfa.H,21.beta.H)-Hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29-Nor-(17.alfa.H,21.beta.H)-hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabela 4.10. Jedinjenja detektovana u toku tretmana u zemljištu biogomile na 40 cm

Detektovana jedinjenja	Vreme (dan)											
	0	56	92	128	159	196	244	280	328	504	613	710
1-Hloro-dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dodekan				x	x		x			x	x	x
Tridekan	x			x								
Tetradekan												
Pentadekan		x	x	x		x			x	x	x	x
Heksadekan	x	x	x	x		x		x	x	x	x	x
Heptadekan	x	x	x	x					x			x
Oktadekan	x		x	x		x		x				x
Nonadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heneikosan		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dokosan		x	x	x	x	x						
Trikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tetrakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pentakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heksakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
Heptakosan	x	x	x	x	x	x	x					
Oktakosan	x	x	x	x	x	x	x	x				
Nanokosan	x	x	x	x	x	x	x	x				
Triakontan	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
Hentriakontan	x	x	x	x	x	x	x	x				
Dotriakontan	x	x	x	x	x	x	x	x				x
Trietriakontan	x	x	x	x	x	x	x	x				x
(Z)-7-Tetradeken			x						x	x	x	x
(E)-3-Oktadeken	x		x		x				x	x	x	
2,3,7-Trimetil-oktan				x								
5-Butil-nonan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
2,3,5-Trimetil-dekan	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
6-Etil-2-metil-dekan			x	x	x	x			x	x	x	x
6-Etil-undekan										x	x	
5-Etil-5-propil-undekan	x	x	x	x	x	x	x					
2,6,10-Trimetil-pentadekan	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7,9-Dimetil-heksadekan	x	x	x	x	x	x				x	x	x
3-Metil-heptadekan	x	x	x	x		x						x
2,6,10,15-Tetrametil-heptadekan	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
9-Metil-nonadekan	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x
9-Oktil-heptadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10-Metil-eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14,18-Pentametil-eikosan			x	x				x	x	x	x	
Ciklotetradekan								x	x	x	x	x
1,7,11-Trimetil-4-ciklotetradekan												x
3,4,5-Trihidroksi-2-ciklopenten-1-one							x					
Eikosil-cikloheksan,	x					x			x			x
4-Metil- beta.-cikloheksanetanol			x	x					x			
Cikloheksadekan		x	x									
1,2-Ditetradecikloksietan	x	x	x	x	x	x	x		x			
2,6-Naftalenedione, oktahidro-1,1,8	x											
1,2-Dihidro-nafto[2,1-b]furan-4-ol		x	x									
2-Metil-antracen		x						x				x
9-Butil-antracen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3,6-Dimetil-fenantren		x	x	x		x		x		x	x	x
2,3,5-Trimetil-fenantren				x	x	x						
Ciklopenta[cd]piren		x	x		x							x
2-Metil-piren	x	x	x	x	x	x		x				x
2-Metil-krizen		x		x	x	x						
3-Metil-krizen			x									
2-Hloro-5-metoksibifenil			x									
N-Butil-benzenamin	x		x				x					
1,3,7,7-Tetrametil-2,11-doksa-3,5-bi..	x	x		x	x			x	x			x
(5.alfa.,14.beta.)-Androstan												x
(5.beta.)-Pregnan	x	x	x	x	x	x	x	x				x
Holestan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(5.alpha.,14.beta.)-Holestan,		x			x	x		x				
(17.alfa.H,21.beta.H)-Hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29-Nor-(17.alfa.H,21.beta.H)-hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabela 4.11. Jedinjenja detektovana u toku tretmana u zemljištu biogomile na 60 cm

Detektovana jedinjenja	Vreme(dan)											
	0	56	92	128	159	196	242	280	328	504	613	710
1-Hloro-dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dodekan	x		x		x		x			x	x	x
Tridekan	x						x					
Tetradekan	x	x										
Pentadekan	x		x	x	x				x	x	x	x
Heksadekan	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heptadekan	x	x	x					x		x		x
Oktadekan	x	x	x				x		x		x	x
Nonadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heneikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dokosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Trikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tetrakosan	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x
Pentakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heksakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heptakosan	x	x	x	x	x	x		x	x			
Oktakosan	x	x	x									
Nanokosan	x	x	x	x	x	x		x	x		x	x
Triakontan	x	x	x	x	x	x		x			x	x
Hentriakontan	x	x	x	x	x	x					x	
Dotriakontan	x	x	x	x	x	x	x		x		x	x
Trietriakontan	x		x		x			x			x	x
(Z)-7-Tetradeken	x	x	x					x	x	x		x
(E)-3-Oktadeken	x		x	x				x	x	x		x
2,3,7-Trimetil-oktan	x	x	x								x	
5-Butil-nonan	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
2,3,5-Trimetil-dekan	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6-Etil-2-metil-dekan	x		x	x	x	x				x	x	x
6-Etil-undekan							x			x	x	x
5-Etil-5-propil-undekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10-Trimetil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7,9-Dimetil-heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
3-Metil-heptadekan	x	x	x			x		x	x	x		x
2,6,10,15-Tetrametil-heptadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9-Metil-nonadekan	x	x	x	x		x		x	x			
9-Oktil-heptadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10-Metil-eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
2,6,10,14,18-Pentametil-eikosan	x	x		x	x	x	x	x	x		x	
Ciklotetradekan	x				x		x	x	x	x	x	x
1,7,11-Trimetil-4-ciklotetradekan												
3,4,5-Trihidroksi-2-ciklopenten-1-one		x	x	x								
Eikosil-cikloheksan,	x	x	x					x		x		x
4-Metil- beta.-cikloheksanetanol	x			x	x							
Cikloheksadekan	x	x	x	x	x	x			x			
1,2-Ditetradecikloksietan	x	x	x	x	x	x			x			
2,6-Naftalenedione, oktahidro-1,1,8	x											x
1,2-Dihidro-nafto[2,1-b]furan-4-ol	x	x		x								
2-Metil-antracen	x		x					x	x		x	x
9-Butil-antracen	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
3,6-Dimetil-fenantren	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
2,3,5-Trimetil-fenantren	x	x	x	x	x			x	x		x	
Ciklopenta[cd]piren	x	x	x	x	x		x	x	x			
2-Metil-piren	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
2-Metil-krizen		x	x	x	x	x	x				x	
3-Metil-krizen		x	x									
2-Hloro-5-metoksibifenil		x		x								
N-Butil-benzenamin	x	x	x	x	x	x		x	x		x	
1,3,7,7-Tetrametil-2,11-doksa-3,5-bi..	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
(5.alfa.,14.beta.)-Androstan	x	x	x	x				x	x			x
(5.beta.)-Pregnan	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
Holestan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(5.alpha.,14.beta.)-Holestan				x	x	x		x				x
(17.alfa.H,21.beta.H)-Hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29-Nor-(17.alfa.H,21.beta.H)-hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabela 4.12. Jedinjenja detektovana u toku tretmana u zemljištu u centru biogomile

Detektovana jedinjenja	Vreme (dan)											
	0	56	92	128	159	196	443	280	328	504	613	710
1-Hloro-dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dodekan			x						x			
Tridekan			x				x		x			
Tetradekan		x										
Pentadekan	x		x		x	x			x		x	x
Heksadekan	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	
Heptadekan	x		x				x	x	x			x
Oktadekan	x		x		x		x	x	x	x		x
Nonadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heneikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dokosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Trikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Tetrakosan	x	x	x	x	x	x	x		x			x
Pentakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Heksakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Heptakosan	x	x	x	x	x	x		x				
Oktakosan	x	x	x	x	x	x		x	x			
Nanokosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Triakontan	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x
Hentriakontan	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	
Dotriakontan		x	x	x		x		x	x		x	
Triakontan	x	x					x	x	x			
(Z)-7-Tetradeken	x		x					x				x
(E)-3-Oktadeken	x			x			x	x	x	x		x
2,3,7-Trimetil-oktan	x	x	x									
5-Butil-nonan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,3,5-Trimetil-dekan	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6-Etil-2-metil-dekan		x	x	x		x	x	x	x	x		x
6-Etil-undekan									x			
5-Etil-5-propil-undekan	x	x	x	x	x	x	x	x				
2,6,10-Trimetil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7,9-Dimetil-heksadekan	x	x	x					x	x			
3-Metil-heptadekan	x	x	x			x	x	x	x	x		x
2,6,10,15-Tetrametil-heptadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
9-Metil-nonadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
9-Oktil-heptadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10-Metil-eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14,18-Pentametil-eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ciklotetradekan					x			x	x	x	x	x
1,7,11-Trimetil-4-ciklotetradekan												
3,4,5-Trihidroksi-2-ciklopenten-1-one	x						x					
Eikosil-cikloheksan,	x	x	x			x		x	x			x
4-Metil- β -cikloheksanetanol	x			x	x	x	x	x	x	x		
Cikloheksadekan	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x
1,2-Ditetradecikloksietan	x	x	x	x	x	x	x	x				
2,6-Naftalenedione, oktahidro-1,1,8	x	x	x			x		x		x		x
1,2-Dihidro-nafto[2,1-b]furan-4-ol		x	x									
2-Metil-antracen	x					x	x	x	x	x		x
9-Butil-antracen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
3,6-Dimetil-fenantren	x	x	x	x		x			x	x	x	
2,3,5-Trimetil-fenantren	x		x	x			x	x	x	x	x	
Ciklopenta[cd]piren	x		x	x	x	x	x	x	x	x		x
2-Metil-piren	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2-Metil-krizen				x		x	x					
3-Metil-krizen	x				x							
2-Hloro-5-metoksibifenil												x
N-Butil-benzenamin	x					x						
1,3,7,7-Tetrametil-2,11-doksa-3,5-bi..	x	x	x				x	x		x	x	
(5.alfa.,14.beta.)-Androstan	x		x				x	x	x		x	x
(5.beta.)-Pregnan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Holestan	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
(5.alpha.,14.beta.)-Holestan		x		x		x						
(17.alfa.H,21.beta.H)-Hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29-Nor-(17.alfa.H,21.beta.H)-hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Određeni broj supstituisanih poliaromatičnih ugljovodonika je detektovan u netretiranom i tretiranom zemljištu, dok većina originalno prisutnih PAH nije detektovana na kraju eksperimenta. Značajno je primetiti, da u toku ove GC-MS kvalitativne analize nije detektovan nijedan od 16 prioriternih PAH analiziranih u prethodnom poglavlju, što je posledica visoke granice detekcije ove metode (20 mg/kg), dok je koncentracija sume svih PAH na početku eksperimenta bila oko 3,5 mg/kg.

Granica detekcije svakog jedinjenja u zemljištu je grubo procenjena na osnovu detekcionog limita detektora oko 500 ng za svako jedinjenje, ekstrahovano je 7 g zemljišta za analizu, ostatak nakon uparavanja ekstrakta rekonstituisan je u 500 μ l, dok je zapremina injekta iznosila 2 μ l, granica detekcije za bilo koje jedinjenje koje se želi efikasno detektovati trebalo bi da je reda veličine 20 mg/kg (Ivančev *et al.*, 2004). Međutim, s obzirom da mnoga jedinjenja prisutna u nafti nisu uključena u standardne smeše koje se koriste za rutinske analize, zbog toga se ne analiziraju GC-MS-SIM analizom, ali su obuhvaćena GC-MS kvalitativnim pristupom. Ovo ukazuje na potrebu primene ove metode za detaljniju identifikaciju ovih komponenti.

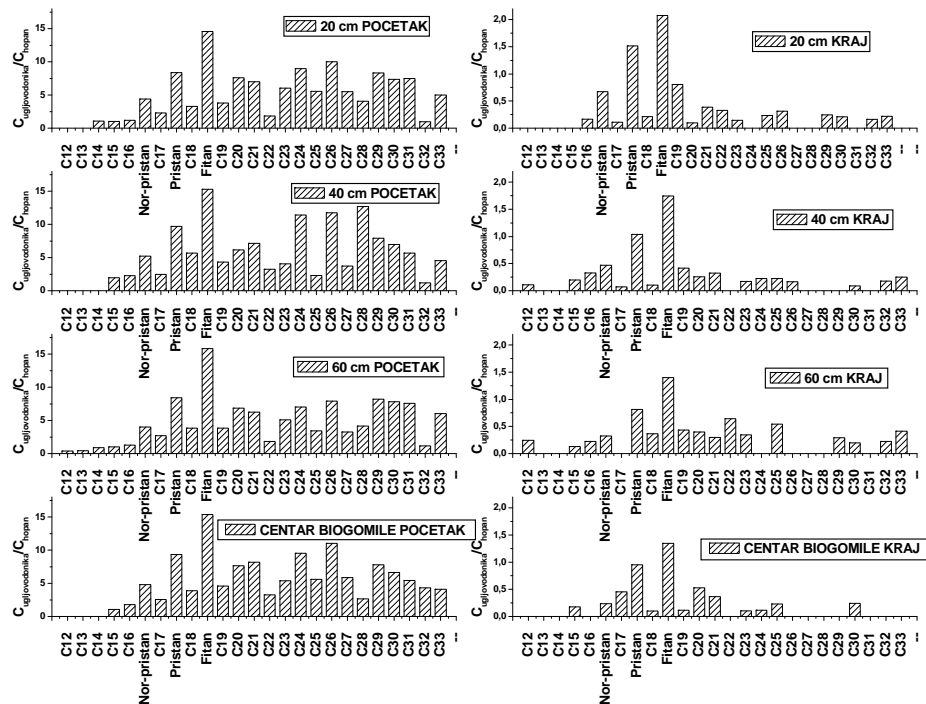
Jedinjenja sterana (derivati holestana i androstana) i terpena (nor-hopan i hopan) su konstantno detektovana u svim uzorcima tretiranog i netretiranog zemljišta. Naime, jedinjenja hopana su nastala kao posledica bakterijskih aktivnosti tokom formiranja nafte pre više miliona godina. Ova jedinjenja se ne mogu formirati tokom procesa bioremedijacije i veoma su otporna na biodegradaciju pa se mogu koristiti kao biomarker jedinjenja (unutrašnji standardi) za procenu biodegradacije i starosti zagađenja u zemljištu (Prince *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Venosa *et al.*, 1997; Gagni i Cam, 2007).

Procena biodegradacije pojedinih grupa n-alkana i izoalkana u odnosu na biomarker jedinjenja hopana

Kao što je već rečeno hopani su molekularni fosili bakterijskih hopanoida, to su policiklična zasićena jedinjenja (pentaciklični terpeni) veoma su slični steroidima i mogu se naći u skoro svim tipovima sirove nafte. Hopani su veoma rezistentni na biodegradaciju, i zbog ove osobine predstavljaju izuzetna biomarker jedinjenja naspram kojih se sva druga biodegradabilna jedinjenja mogu normalizovati. Dodatno, zbog slabe biodegradabilnosti dolazi do njihovog relativnog obogaćivanja u odnosu na druga jedinjenja u rezidualnom ulju sa procesima starenja, isparavanja i biodegradacije (Prince *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Venosa *et al.*, 1997; Gagni Cam, 2007).

Relativna promena sadržaja pojedinih n-alkana (dobijena merenjem promene odnosa površine pikova alkana i hopana) na početku i kraju eksperimenta u odnosu na (17.alfa.H,21.beta.H)-Hopan na posmatranim visinama biogomile prikazana je na slici 4.12. Fitan je dominantno prisutan u zemljištu na početku eksperimenta na svim posmatranim monitoring tačkama, što je karakteristično za staro naftno zagađenje zemljišta, gde su se u toku procesa starenja u većoj meri razgrađivala lakše biodegradabilni n-alkani. Od n-alkana u uzorcima na početku eksperimenta u skoro podjednake količinama su prisutna jedinjenja sa C₂₀-C₃₀. Jedinjenja sa C₁₂-C₁₆ prisutna su u veoma malim količinama, dok alkani sa C₁₇-C₁₉ su prisutni u nešto većoj količini ali znatno manjoj od alkana sa C₂₃-C₃₀, ovo je takođe posledica procesa

starenja naftnog zagađenja koje se odvijalo u proteklih 8 godina. Sadržaj pristana je na početku bio u rangu sa sadržajem alkana sa C_{20} - C_{30} , dok je koncentracija norpristana bila nešto niža.

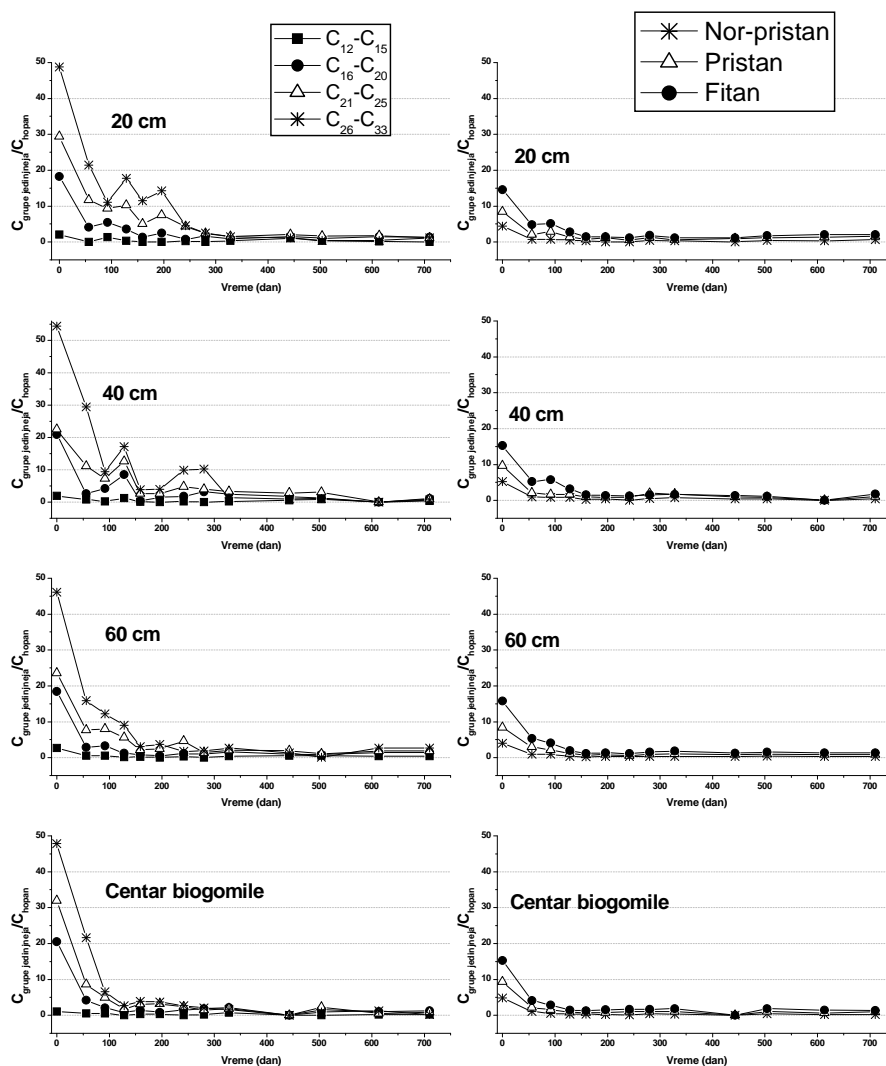


Slika 4.12. Relativna distribucija sadržaja n-alkana i izoalkana ($C_{ugljovodonika}/C_{chopan}$) u zemljištu na posmatranim visinama biogomile u toku tretmana

Na kraju eksperimenta možemo videti da je sadržaj i račvastih i normalnih alkana značajno opao (oko 10 puta). Međutim, u uzorcima zemljišta relativni sadržaj račvastih ugljovodonika u ukupnoj masi ugljovodonika je povećan, što je posledica njihove manje biodegradabilnosti u odnosu na normalne alkane. Ovo je takođe očigledno ako pogledamo izgled m/z 85 SIM hromatograma pre i posle eksperimenta gde najintenzivniji pikovi zapravo potiču od posmatrana tri račvasta jedinjenja alkana (slika 4.11.). Dodatno, količina razgrađenih račvastih ugljovodonika na različitim visinama biogomile opada sledećim redosledom 60 cm > centar biogomile > 40 cm > 20 cm što je u korelaciji sa izmerenim količinama uklonjenih ukupnih ugljovodonika i mienralnih ulja.

Promena sadržaja određenih grupa n-alkana sa vremenom prikazana je na slici 4.13. Zbirno gledano sadržaj posmatranih grupa alkana na početku eksperimenta opada sledećim redosledom C_{26} - C_{33} > C_{21} - C_{25} > C_{16} - C_{20} > C_{12} - C_{15} , što je kao što je već rečeno posledica veće razgradnje lakših ugljovodonika. Ukupna količina uklonjenih n-alkana praktično je biodegradirana u toku prve godine eksperimenta, nakon čega njihova količina u zemljištu ostaje konstantna do kraja eksperimenta, ovo je takođe u korelaciji sa promenama koncentracije mineralnih ulja i ugljovodonika dobijenim tokom eksperimenta. Preostala količina ugljovodonika u zemljištu je ili (1)

suviše niska i stoga nevidljiva za mikroorganizme, ili (2) je čvrsto sorbovana i sekvestrovana u porama zemljišta, i iz tih razloga perzistentna. Sadržaj račvastih alkana opada u prvih 150 dana eksperimenta, gde se degradira preostala biodostupna frakcija ovih jedinjenja, nakon čega njihov sadržaj ostaje konstantan do kraja eksperimenta, takođe kao posledica perzistentnosti sekvestrovane frakcije ugljovodonika u zemljištu.



Slika 4.13. Relativna promena sadržaja grupa n-alkana (C_{12} - C_{15} , C_{16} - C_{20} , C_{21} - C_{25} i C_{26} - C_{33}) i račvastih ugljovodonika (nor-pristan, pristan i fitan) u zemljištu u toku tretmana

Ako pogledamo relativni udeo različitih grupa ugljovodonika u ukupnoj masi ugljovodonika, koji je dobijen izračunavanjem procentualnog udela zbira površina pikova posmatrane grupe ugljovodonika u ukupnoj površini pikova svih prisutnih ugljovodonika (tabela 4.13.), vidimo da su u uzorcima najzastupljeniji n-alkani sa nekih 60%, a zatim slede račvasti ugljovodonici sa 15% i aromatični ugljovodonici sa

oko 10%. Relativni udeo ovih grupa jedinjenja praktično ostaje isti i na kraju eksperimenta. Međutim, značajno je napomenuti da je ukupna površina pikova normalizivana na površinu hopana na kraju eksperimenta redukovana za čak 95%, ukazujući na taj način na odvijanje procesa biodegradacije tokom eksperimenta.

Tabela 4.13. Procentualni udeo pojedinih grupa ugljovodonika detektovanih u zemljištu na početku i na kraju eksperimenta

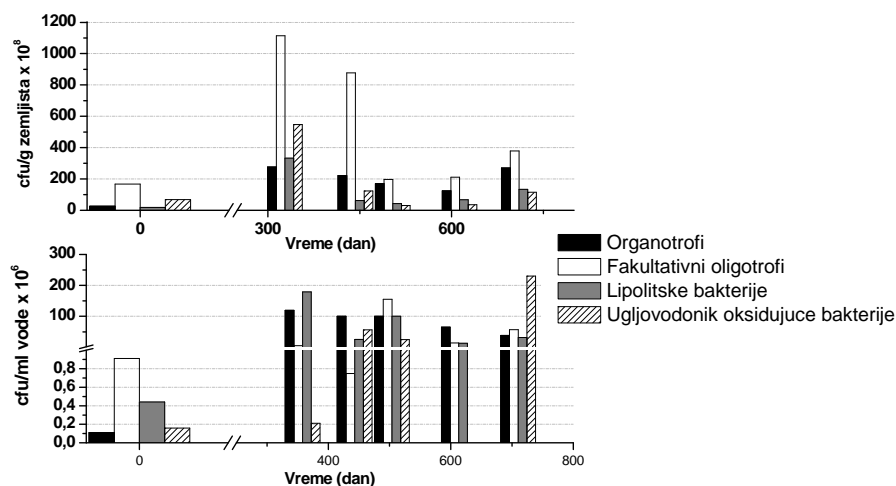
	n-Alkani	Račvasti ugljovodonici	n-Alkeni	Ciklični ugljovodonici	Aromatični ugljovodonici	Hopani i sterani
Početak	59%	15%	1,3%	7,2%	8,3%	7,2%
Kraj	58%	15%	2,6%	4,7%	6,9%	7,5%
95% redukcije ukupne površine pikova na kraju eksperimenta						

Mikrobiološka karakterizacija procesa bioremedijacije

Promena brojnosti ispitivanih grupa bakterija u zemljištu zagađenom naftom u toku tretmana u biogomili prikazana je na slici 4.14, jer bez dokaza o prisustvu mikroorganizama, posebno ugljovodonik-oksidujućih i lipolitskih bakterija, ne može se govoriti o procesu mikrobiološke degradacije zagađenja. Mikrobiološke analize potvrdile su da je bakterijska populacija u biogomili bila uključena u procese biodegradacije organskih kontaminanata. U zemljištu je detektovana visoka brojnost ispitivanih grupa bakterija, u desetinama i stotinama miliona u gramu zemljišta (10^8 - 10^9 cfu/g). Bitno je da je brojnost bakterija u toku tretmana znatno veća nego na samom početku, što nam ukazuje da je tretman organskih zagađujućih materija u biogomili doprineo povećanju mikrobiološke degradacije ugljovodonika i biomase. U skladu sa tim je i smanjenje koncentracije ugljovodonika u toku tretmana. Na kraju eksperimenta, brojnost svih ispitivanih grupa bakterija je opala, a pošto je u uzorku još uvek bilo dostupnog azota i fosfora za bakterijski rast, ovo je najverovatnije posledica promene sastava mineralnog ulja, gde nakon biodegradacije lako biodegradabilnih normalnih alkana u zemljištu zaostaju kompleksna perzistentna organska jedinjenja (lignin, humus, asfaltne komponente). Brojnost bakterija u ocednoj vodi sa biogomile je znatno viša u toku eksperimenta u odnosu na inicijalni period, 10^7 - 10^8 cfu po ml ocedne vode. Ovo takođe potvrđuje mikrobiološku degradaciju ugljovodonika u biogomili.

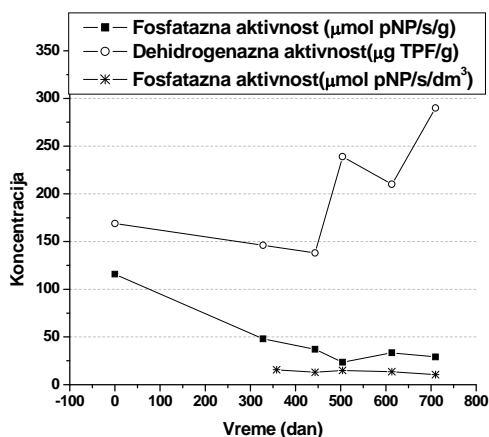
Dominantna mikroflora u zemljištu je grupa fakultativnih oligotrofa, što indikuje postojanje zadovoljavajućeg procesa samoprečišćavanja zemljišta. Tokom procesa, broj lipolitskih i ugljovodonik oksidujućih bakterija je značajno porastao, indikujući da je došlo do intenziviranja procesa biodegradacije.

Dehidrogenaze imaju esencijalnu ulogu u oksidaciji organske materije, gde transferuju vodonik od organskog supstrata do elektron akceptora, s obzirom da je biološka oksidacija organskih jedinjenja generalno dehidrogenacioni proces, koji je katalizovan dehidrogenaznim enzimima (*Lenhard, 1956; Paul i Clark, 1989; Page et al., 1982*). Mnogo različitih specifičnih enzimskih sistema je uključeno u dehidrogenaznu aktivnost zemljišta. Ovi sistemi su integralni deo zemljišnih mikroorganizama i reflektuju u velikoj meri biohemijske aktivnosti zemljišta.



Slika 4.14. Promena brojnosti ispitivanih grupa bakterija u zemljištu i ocednoj vodi biogomile u toku tretmana

Određivanje dehidrogenazne aktivnosti zemljišta može biti korišćeno kao jednostavan metod za ispitivanje mogućih inhibitornih efekata kontaminanta na mikrobiološku aktivnost zemljišta (Bartha i Pramer, 1965). U toku eksperimenta dehidrogenazna aktivnost generalno raste, indikujući da u toku procesa nije došlo do inhibicije mikrobioloških procesa kao posledica toksičnog dejstva visokih koncentracija organskih kontaminanata u zemljištu (slika 4.15.). Naime, ovo takođe ide u prilog činjenici da su u zemljištu zaostala kompleksna i teško biodegradabilna jedinjenja čvrsto sorbovana na zemljištu, koja zbog toga ne predstavljaju opasnost za mikroorganizme.



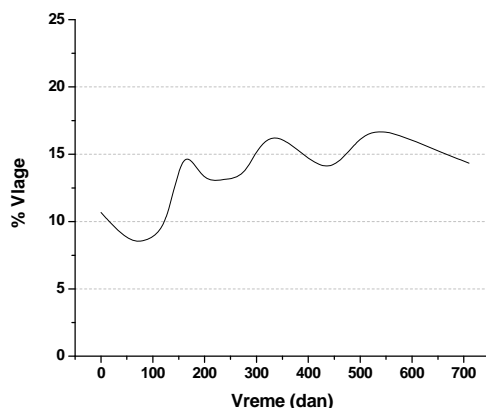
Slika 4.15. Promena dehidrogenazne i fosfatazne aktivnosti u zemljištu i ocednoj vodi u toku tretmana

Fosfatazna aktivnost uglavnom opada tokom eksperimenta što je u skladu sa opadanjem brojnosti mikroorganizama na kraju eksperimenta, kao posledice nedovoljne količine supstrata za mikrobiološke procese.

4.1.1. Ispitivanje procesa bioremedijacije zemljišta u toku tretmana površinskom obradom

Vlažnost zemljišta

Sadržaj vlage u toku tretmana kretao se u opsegu od 8,3 do 17,9%, što predstavlja 37-79% saturacionog kapaciteta ispitivanog zemljišta (slika 4.16.), što pokazuje da su u zemljištu u toku tretmana vladali optimalni uslovi u pogledu sadržaja vlage. U cilju održavanja sadržaja vlage zemljište je nalivano vodom dva puta nedeljno u toku letnjih meseci i jednom u dve nedelje u toku zimskih meseci. Za navodnjavanje zemljišta korišćena je ocedna voda sa oglednog polja koja je dopunjavana sa vodom iz bioreaktora, zbog gubitaka usled njenog isparavanja i vezivanja i zadržavanja u zemljištu.



Slika 4.16. Sadržaj vlage u zemljištu u toku tretmana

Slično kao kod tretmana u biogomili, usled visoke koncentracije ugljovodonika na početku eksperimenta, koji formiraju tanak film ulja na česticama zemljišta što sprečava prodiranje i vezivanje vode za čestice zemljišta, sadržaj vlage je najniži u prvih 100 dana eksperimenta i kreće se u opsegu od 8,3%-11%. Nakon ovog perioda sadržaj vlage u zemljištu raste na oko 16% i do kraja eksperimenta se kreće u granicama $16 \pm 2\%$. Dobijeni rezultati su u skladu sa promenom sadržaja ugljovodonika (slika 4.21.) gde se vidi da je najveća količina ugljovodonika uklonjenja u ovom periodu.

Promena pH vrednosti u zemljištu i vodi u toku tretmana

pH vrednost zemljišta u toku tretmana se kretala u opsegu od 7,23 do 7,97 (tabela 4.14.), indikujući da su u toku tretmana u zemljištu održavani optimalni uslovi za mikrobiološku degradaciju ugljovodonika u pogledu pH vrednosti. U toku prvih 92

dana eksperimenta pH vrednost u zemljištu i u ocednoj vodi raste kao posledica odvijanja procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Nakon ovog perioda pH vrednost opada do 328. dana najverovatnije kao posledica dekompozicije organske materije i mikrobiološke respiracije pri čemu nastaju kiseline, posebno ugljena kiselina. Za razliku od tretmana u biogomili dodatak nutrijenata nakon 280. dana nije imao značajan uticaj na pH vrednost. Naime, pH vrednost opada ali ne tako drastično kao kod tretmana u biogomili, što može biti posledica odvijanja procesa nitrifikacije i denitrifikacije u većoj meri nego u biogomili, tako da je delimično neutralisan efekat dodatka veštačkog đubriva. U toku poslednjih 400 dana eksperimenta pH vrednost opet polako raste takođe kao posledica odvijanja procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Promena pH vrednosti ocedne vode uglavnom prati promene pH vrednosti zemljišta.

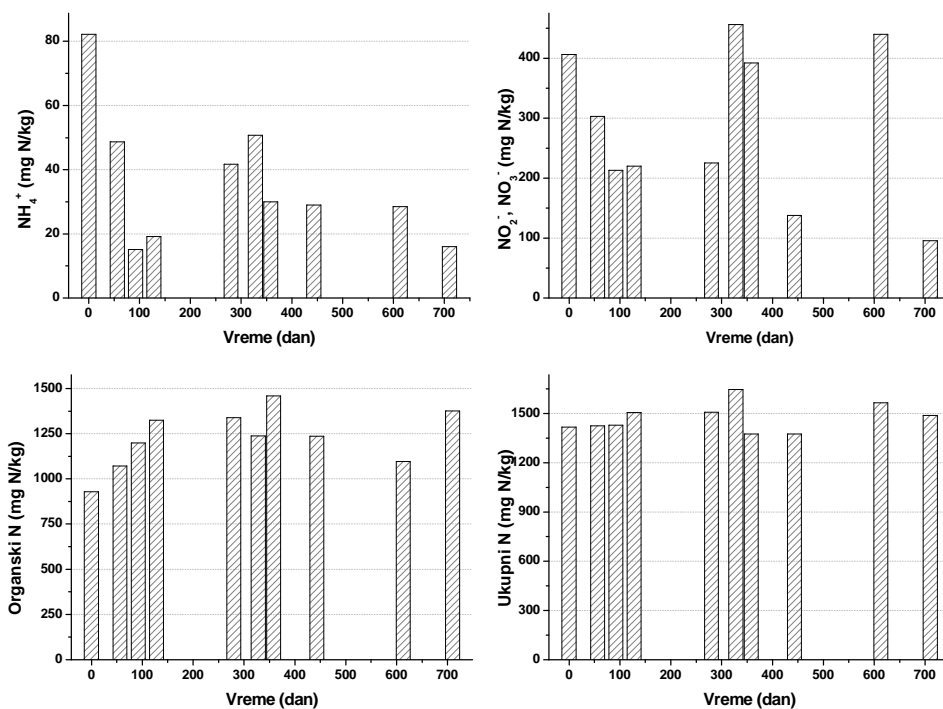
Tabela 4.14. Promena pH vrednosti u zemljištu i ocednoj vodi u toku tretmana

Vreme (dan)	0	56	92	159	242	280	328	443	613	710
Zemljište	7,23	7,26	7,97	7,59	7,51	7,26	7,23	7,43	7,47	7,70
Voda	7,05	7,00	7,80	7,57	7,30	7,05	7,12	7,20	7,30	7,70

Sadržaj nutrijenata u zemljištu i vodi u toku tretmana

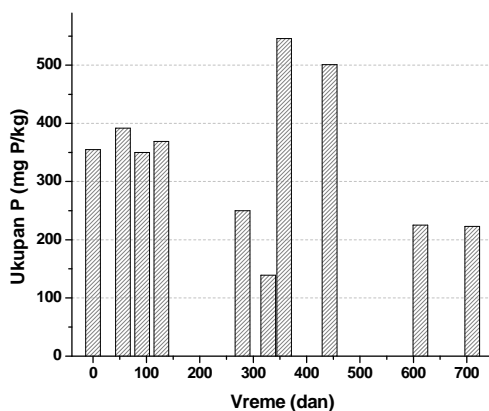
Oko 90% ukupnog azota čini organski azot (slika 4.17.), a ostatak čine amonijum jon, nitrati i nitriti. Sadržaj amonijaka u zemljištu u prvih 200 dana eksperimenta opada za 77% (sa 82,2 na 19,2 mg N/kg), dok sadržaj nitritnog i nitratnog azota opada za 45% (sa 406 na 225 mg N/kg) kao posledica njegove asimilacije od strane mikroorganizama i ugradnje u organsku materiju, kao i procesa nitrifikacije i denitrifikacije, što je u skladu sa porastom pH i sadržaja organskog azota u zemljištu u posmatranom periodu, dok sadržaj ukupnog azota ostaje skoro konstantan. Međutim, s obzirom da bakterije za svoj metabolizam mogu da koriste samo rastvorne oblike azota (amonijak, nitrate i nitrite) smanjenje koncentracije ovih oblika azotnih materija moglo bi da uzrokuje smanjenje metaboličke aktivnosti bakterija, a samim tim i da uspori proces biodegradacije ugljovodonika. Iz pomenutih razloga, nakon ovog perioda (pre 280. dana), na ogledno polje je dodato veštačko đubrivo (NPK 15:15:15), zbog čega dolazi do povećanja koncentracija amonijačnog, nitratnog i nitritnog oblika azota. Ukupno je dodato oko 1 kg NPK 15:15:15 đubriva, koje je sadržalo 150 g azota (60% amonijačnog i 40% nitritnog) i 150 g fosfora.

Sadržaj amonijačnog, nitratnog i nitritnog oblika azota nakon ovog perioda opet opada, pri čemu se jedan deo ugrađuje u organsku materiju dok se drugi deo spira sa zemljišta tako da je u ocednoj vodi registrovan povišen sadržaj ovih oblika azota (tabela 4.15.). Nakon 358. dana dolazi i do opadanja organskog azota, najverovatnije kao posledice degradacije i odumiranja ćelijske biomase usled nedovoljne količine organskog supstrata koji mikroorganizmi mogu da koriste u svom metabolizmu, što je u skladu sa istovremenim porastom sadržaja nitritnog i nitratnog azota. Međutim, u poslednjih 100 dana eksperimenta dolazi do opadanja sadržaja rastvornih oblika azota kao posledica njihove ugradnje u biomasu što je opet praćeno porastom organskog azota, i može biti posledica adaptacije mikroorganizama za degradaciju i asimilaciju kompleksnog i teže biorazgradljivog organskog supstrata u zemljištu.



Slika 4.17. Sadržaj azotnih materija u zemljištu u toku tretmana

Sadržaj fosfora u prvih 100 dana eksperimenta ostaje uglavnom konstantan, nakon čega opada do momenta dodatka veštačkog đubriva do 250 mg P/kg (slika 4.18.). Nakon dodatka đubriva sadržaj fosfora u zemljištu iznosio je 600 mg P/kg, nakon čega njegov sadržaj opada do kraja eksperimenta najverovatnije kao posledica njegove manjim delom ugradnje u biomasu i većim delom spiranja sa zemljišta, a možda i zadržavanja u dubljim slojevima zemljišta ili peska koji je postavljen ispod sloja zemljišta na drenažnim cevima za ocednu vodu (slika 3.4.).



Slika 4.18. Sadržaj fosfora u zemljištu u toku tretmana

Promena sadržaja nutrijentnih materija u ocednoj vodi uglavnom prate njihovu promenu u zemljištu (tabela 4.15.). U ocednoj vodi nije detektovan organski azot, tako da je ukupan azot dobijen sabiranjem amonijačnog, nitritnog i nitratnog azota. Pre dodatka veštačkog đubriva sadržaj amonijačnog azota u ocednoj vodi je nizak (manje od 1% nutrijentnih materija u zemljištu), dok nitrati i nitriti uglavnom nisu ni detektovani.

Tabela 4.15. Promena sadržaja nutrijenata u ocednoj vodi u toku tretmana

Vreme (dan)	Parametar				
	NH ₄ ⁺ (mg N/l)	NO ₂ ⁻ (mg N/l)	NO ₃ ⁻ (mg N/l)	Ukupan N (mg N/l)	PO ₄ ³⁻ (mg P/l)
0	1,16	0,06	<0,43	2,22	0,86
56	3,85	<0,002	<0,43	3,85	0,86
92	0,96	<0,002	<0,43	0,96	0,66
128	2,60	<0,002	<0,43	2,60	0,66
159	11,6	<0,002	<0,43	11,6	0,66
242	9,63	0,06	<0,43	9,69	0,66
280	26,9	2,66	11,43	41,0	0,66
328	5,78	0,30	1,76	7,84	3,35
443	9,24	0,06	2,20	11,4	0,66
613	4,81	0,12	7,04	12,0	0,66
710	3,41	0,12	3,58	7,11	0,66

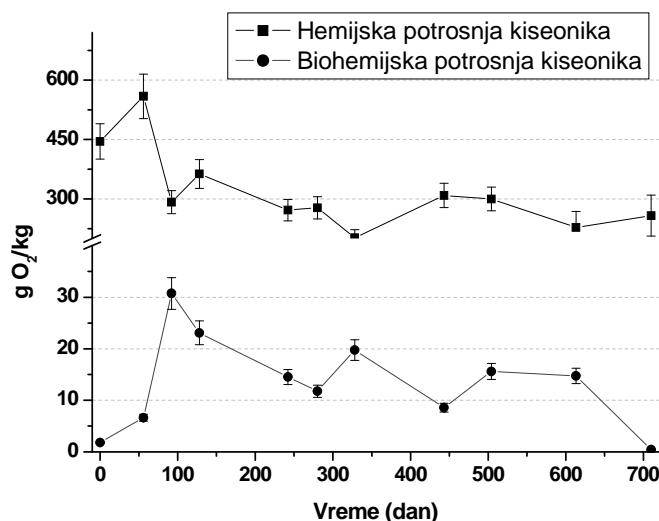
Promena organskih materija u zemljištu i vodi u toku tretmana

Sadržaj organskog ugljenika određen je kao gubitak žarenjem na 550°C, uz primenu korekcionog faktora od 1,724 za preračunavanje %gubitka organske materije u %organskog ugljenika (*Sauv et al.*, 2003). U toku eksperimenta u zemljištu je bilo oko 86% mineralnih materija i oko 14 % organskih materija, tj. oko 8,5% organskog ugljenika (tabela 4.16.).

Tabela 4.16. Sadržaj organske i mineralne materije zemljištu u toku tretmana

Vreme (dan)	% mineralne materije (ostatak žarenja)	% organske materije (gubitak žarenjem)	% organskog ugljenika
0	87,2	12,8	7,4
56	86,0	14,0	8,1
92	87,8	12,2	7,1
128	89,9	10,1	5,8
159	85,0	15,0	8,7
196	84,9	15,1	8,8
242	83,8	16,3	9,4
280	84,0	16,0	9,3
328	85,5	14,5	8,4
443	84,5	15,5	9,0
504	84,0	16,0	9,3
613	84,1	15,9	9,2
710	85,7	14,3	8,3

Hemijska potrošnja kiseonika zemljišta u toku eksperimenta je u proseku bila oko 330 g O₂/kg (slika 4.19.). Prema literaturnim podacima za većinu ugljovodonika može se aproksimirati da je potrebno 3 g kiseonika za oksidaciju 1 g razgradljivih ugljovodonika - datih 330 g O₂/kg zemlje može da oksiduje 110 g organske materije/kg zemljišta, što predstavlja sadržaj organske materije od 11 %, a to je približno sadržaju organske materije određene sagorevanjem (14 %). U toku tretmana dolazi do smanjenja vrednosti HPK što nam ukazuje da dolazi do razgradnje organskih materija.

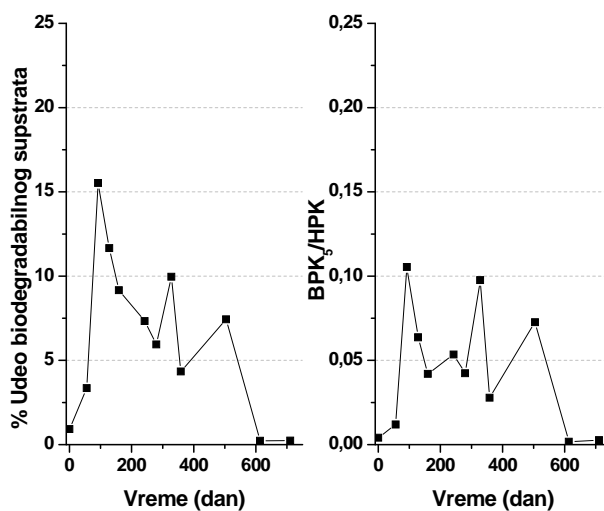


Slika 4.19. Promena HPK i BPK₅ vrednosti zemljišta u toku tretmana

Na slici 4.19. prikazana je i promena BPK₅ u zemljištu zagađenom naftom u toku tretmana površinskom obradom. Vrednosti BPK₅ reprezentuju mikrobiološku aktivnost zemljišta kao i udeo biodegradabilnih ugljovodonika prisutnih u zemljištu, kao i kod tretmana u biogomili ove vrednosti izuzetno niske i kreću se u opsegu od 0,43 do 30 mg O₂/kg. Promene BPK₅ vrednosti u toku tretmana površinskom obradom su slične uočenim promenama u toku tretmana u biogomili. U toku prvih 100 dana eksperimenta BPK₅ vrednost raste kao posledica povećanja mikrobiološke aktivnosti i udela biodegradabilnog dela organske materije u zemljištu kao posledice uspostavljanja optimalnih uslova za biodegradaciju (pH, nutrijenti, kiseonik, vlaga itd.) u oglednom polju. Nakon ovog perioda vrednost BPK₅ opada kao posledica razgradnje preostale količine biodegradabilnog dela supstrata, do momenta dodavanja veštačkog đubriva. Dodatak veštačkog đubriva, za razliku od tretmana u biogomili, dovodi samo do malog porasta BPK₅ vrednosti, što jasnije vidi na promenama udela biodegradabilnog dela supstrata i BPK₅/HPK odnosa (slika 4.20.). Ovo može biti posledica većeg sadržaja rastvornih azotnih materija u zemljištu površinske obrade, tako da je process biodegradacije bio manje limitiran sadržajem nutrijenata. Međutim, značajno je napomeniti i da su vrednosti biološke potrošnje kiseonika generalno niže u toku tretmana površinskom obradom, indikujući da se u ovom tretmanu biodegradacija odvija u manjoj meri, što je kasnije i potvrđeno promenom sadržaja ukupnih ugljovodonika.

Od 358. dana BPK_5 vrednost opada do kraja eksperimenta, što je takođe posledica iscrpljivanja sadržaja biodegradabilnog organskog supstrata potrebnog za mikrobiološke procese. Na kraju eksperimenta BPK_5 vrednost opada skoro na nulu ($0,43 \text{ g O}_2/\text{kg}$) pa bi se odavde mogao izvući zaključak da bez obzira na visok sadržaj organske materije u zemljištu udeo biodegradabilnog supstrata je veoma nizak (slika 4.20.). Maksimalna vrednost od 15,5% izmerena je nakon 56. dana, tj. nakon uspostavljanja optimalnih uslova za bioremedijaciju. Na kraju eksperimenta udeo biodegradabilnih organskih materija konstantno opada (do 0,4%), kao posledica njihove razgradnje, dok preostalu količinu organske materije najverovatnije čine teško degradabilne organske materije (lignin, humus, asfaltne komponente itd.) kao i sekvestrovane organske materije u zemljištu kao posledica procesa starenja kojim je ovo zemljište bilo izloženo u toku poslednjih 10 godina. S obzirom na slabu biodegradabilnost i perzistentnost preostale frakcije organskih komponenti ova rezidualna frakcija najverovatnije ne predstavlja opasnost po životnu sredinu i može se čak smatrati sastavnim delom samog zemljišta.

Slične zaključke možemo izvesti posmatranjem BPK_5/HPK odnosa koji se kretao u granicama (0,004-0,10). Međutim, iako je odnos BPK_5/HPK blizu nule što znači da je udeo lako razgradivih organskih materija u ukupnom sadržaju organskih materija veoma nizak, ipak dolazi do smanjenja vrednosti HPK u većem iznosu nego što je doprinos smanjenja vrednosti BPK_5 . Iz toga se može zaključiti da se u toku datog tretmana razgrađuju i teže razgradiva organska jedinjenja.



Slika 4.20. Procentualni udeo biodegradabilnog dela supstrata i BPK_5/HPK odnos u toku tretmana

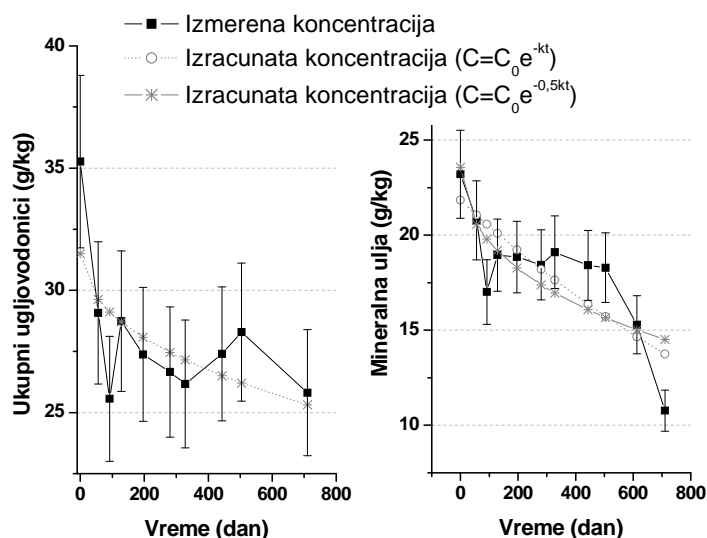
U tabeli 4.17. date su vrednosti za hemijsku i biološku potrošnju kiseonika u ocednoj vodi sa oglednog polja. Najveća vrednost HPK detektovana je na početku eksperimenta što je u skladu sa činjenicom da je na početku eksperimenta zemljište sadržalo najveću količinu rastvornih ugljovodonika koji su se mogli sprati sa zemljišta u ocednu vodu. U toku preostalog perioda eksperimenta prosečna vrednost HPK je bila oko $800 \text{ mg O}_2/\text{l}$. Vrednosti BPK_5 u ocednoj vodi uglavnom su pratile trend promene BPK_5 vrednosti u zemljištu.

Tabela 4.17. HPK i BPK₅ u ocednoj vodi u toku tretmana

Vreme (dan)	0	56	92	128	159	242	280	328	443	504	613	710
HPK (mg O ₂ /l)	1500	1000	500	540	920	900	1000	600	1100	775	832	790
BPK ₅ (mg O ₂ /l)	232	162	35	20	20	0	5,0	135	10	2,0	13	5,0

Kinetika degradacije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u toku tretmana

U toku 2 godine tretmana bioremedijacije površinskom obradom zemljišta zagađenog visokim koncentracijama starog naftnog zagađenja, sadržaj mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika je opao za oko 53% (od 23,2 g/kg do 10,8 g/kg) i 27% (od 35,3 g/kg do 25,8 g/kg) respektivno (slika 4.21.). Kao što je to već rečeno brža razgradnja mineralnih ulja u poređenju sa ukupnim ugljovodonicima je najverovatnije posledica značajnog doprinosa slabo degradabilnih organskih materija (humus, lignin, asfaltne komponente i dr.) na brzinu degradacije ukupnih ugljovodonika. Najintenzivnija degradacija mineralnih ulja je uočena u prvih 92 dana i poslednjih 200 dana tretmana površinskom obradom, dok je između ova dva perioda uočen dug period stagnacije, kao posledica degradacije lako degradabilnih jednostavnih ugljovodonika srednje veličine u inicijalnom periodu procesa bioremedijacije, i dugog perioda potrebnog za adaptaciju mikroorganizama za oksidaciju slabo degradabilnih kompleksnih ugljovodonika. U slučaju ukupnih ugljovodonika najintenzivnija degradacija je uočena u prvih šest meseci tretmana, nakon ovog perioda sadržaj ukupnih ugljovodonika ostaje relativno konstantan, što takođe može biti posledica prisustva slabo degradabilnih organskih materija, kao što su humus, lignin, asfaltne komponente i dr.



Slika 4.21. Promena koncentracije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u toku tretmana: stvarne koncentracije i koncentracije izračunate iz kinetičkih modela

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad \text{i} \quad \ln C = \ln C_0 - kt^{0,5}$$

Efikasnost uklanjanja mineralnih ulja iz zemljišta u toku dva posmatrana tretmana (biogomila i površinska obrada) je praktično ista. Međutim, u pogledu sadržaja ukupnih ugljovodonika u biogomili uklonjeno je dva puta više ukupnih ugljovodonika (gledajući apsolutnu količinu ukupno uklonjenih ugljovodonika). Manja efikasnost uklanjanja ukupnih ugljovodonika površinskom obradom zemljišta najverovatnije je posledica toga da se u ovom tretmanu mineralna ulja u manjoj meri razgrađuju do ugljen-dioksida i vode, a u većoj meri transformišu u perzistentna polarna organska jedinjenja. Naime, transport kiseonika i vode u tokom površinske obrade zemljišta je bolji, s obzirom na činjenicu da je zemljište prostrto u tankom sloju i dodatno je prekopavano jednom nedeljno, tako da su u ovom tretmanu osim mikrobiološke degradacije bili najverovatnije favorizovani i procesi hemijske oksidacije naftnog zagađnja u zemljištu. Ovo je u skladu sa promenama BPK₅ vrednosti izmerenim u ova dva tretmana.

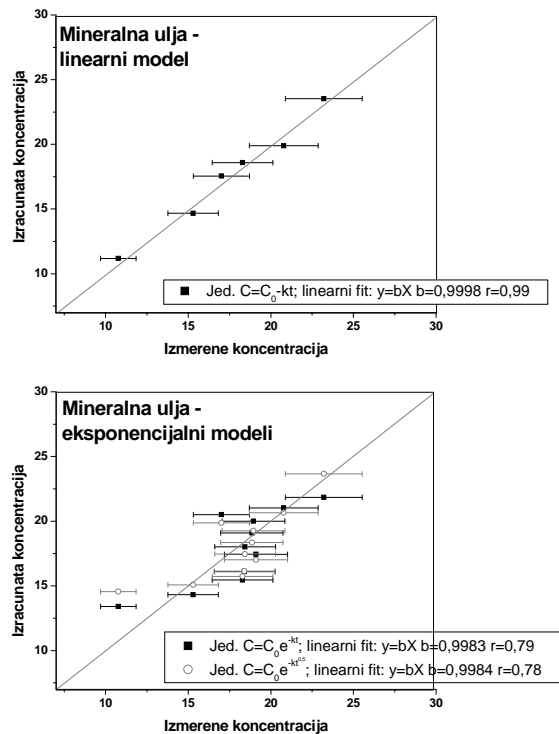
Degradacija mineralnih ulja je bila u reletivno dobroj korelaciji sa kinetičkim modelima $\ln C = \ln C_0 - kt$ i $\ln C = \ln C_0 - kt^{0,5}$ ($r=0,79$ i $0,74$ respektivno) (slika 4.21.). Međutim, dobijeni koeficijenti korelacije kao i konstante brzina su značajno niži od onih dobijenih primenom istih kinetičkih modela za degradaciju mineralnih ulja u biogomili. Uzimajući u obzir da je efikasnost uklanjanja mineralnih ulja na kraju eksperimenta za oba tretmana praktično bila ista ovo može biti posledica različite kinetike degradacije mineralnih ulja u ova dva tretmana. Naime, u toku tretmana površinskom obradom, promena sadržaja mineralnih ulja se u toku prvih 92 dana i u toku poslednjih 200 dana eksperimenta može najbolje opisati linearnom jednačinom (tabela 4.18.), dok je u periodu od 92.-504. dana koncentracija mineralnih ulja relativno konstantna tako da se i ne može razmatrati kinetika degradacije u ovom periodu. Dodatno, konstanta brzine degradacije mineralnih ulja u prvih 92 dana je oko dva puta veća od konstante brzine u poslednjih 200 dana tretmana, što je posledica da su na početku eksperimenta u zemljištu bili prisutni lakše degradabilni ugljovodonici (n-alkani kraćeg niza i drugi) koji su se brzo degradirali nakon podešavanja optimalnih uslova za biodegradaciju na početku eksperimenta, dok su se poslednjih 200 dana eksperimenta nakon dužeg vremena stagnacije i adaptacije mikroflore degradirala kompleksnija i teže biodegradabilna organska jedinjenja.

Tabela 4.18. Kinetički parametri degradacije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u toku tretmana

Parametri	Mineralna ulja		Ukupni ugljovodonici
$\ln C = \ln C_0 - kt$			
$\ln C_0$	3,08		-
$k \text{ (dan}^{-1}\text{)} \times 10^{-4}$	6,50		-
r	0,79		-
$\ln C = \ln C_0 - kt^{0,5}$			
$\ln C_0$	3,16		3,45
$k \text{ (dan}^{-1/2}\text{)} \times 10^{-2}$	1,80		0,82
r	0,74		0,70
$C = C_0 - kt$			
	0.-92. dana	504.-710. dana	-
C_0	23,54	18,60	-
$k \text{ (dan}^{-1}\text{)} \times 10^{-2}$	6,52	3,64	-
r	0,97	0,99	-

Za promenu sadržaja ukupnih ugljovodonika kinetički model $\ln C = \ln C_0 - kt$ se nije mogao primeniti, dok je primenom drugog kinetičkog modela $\ln C = \ln C_0 - kt^{0,5}$ dobijena dva puta niža konstanta brzine degradacije ugljovodonika u odnosu na dobijene konstante brzine u biogomili, što je posledica činjenice da se koncentracija ukupnih ugljovodonika skoro i ne menja nakon prvih šest meseci pa sve do kraja eksperimenta.

Korelacija izmerene i izračunate koncentracije mineralnih ulja za eksponencijalne kinetičke modele ($\ln C = \ln C_0 - kt$ i $\ln C = \ln C_0 - kt^{0,5}$) i linearni model ($C = C_0 - kt$) primenjen za prvih 92 i poslednjih 200 dana eksperimenta prikazana je na slici 4.22. Za oba eksponencijalna kinetička modela koeficijenti korelacije su bili oko 0,8, dok su nagibi pravih bili bliski jedinici tako da bi se moglo reći da ova dva kinetička modela relativno dobro opisuju nastale promene koncentracije mineralnih ulja. Međutim, znatno bolji koeficijent korelacije dobijen je za linearni model primenjen za prvih 92 i poslednjih 200 dana eksperimenta, odnosno ova kinetika i model ponašanja mineralnih ulja znatno bolje opisuju izmerene promene mineralnih ulja tokom površinske obrade zemljišta.



Slika 4.22. Korelacija između izmerene i izračunate koncentracije mineralnih ulja za linearni i eksponencijalne kinetičke modele

U tabeli 4.19. prikazane su koncentracije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika u ocednoj vodi u toku eksperimenta. Prosečna koncentracija ukupnih ugljovodonika u ocednoj vodi tokom eksperimenta bila je oko 20 mg/l, dok je prosečna koncentracija mineralnih ulja bila oko 3,5 mg/l, što ukazuje na niske količine ugljovodonika koji se spiraju sa ogleđnog polja, što ide u prilog činjenici da smanjenje koncentracije ugljovodonika potiče predominantno od procesa degradacije

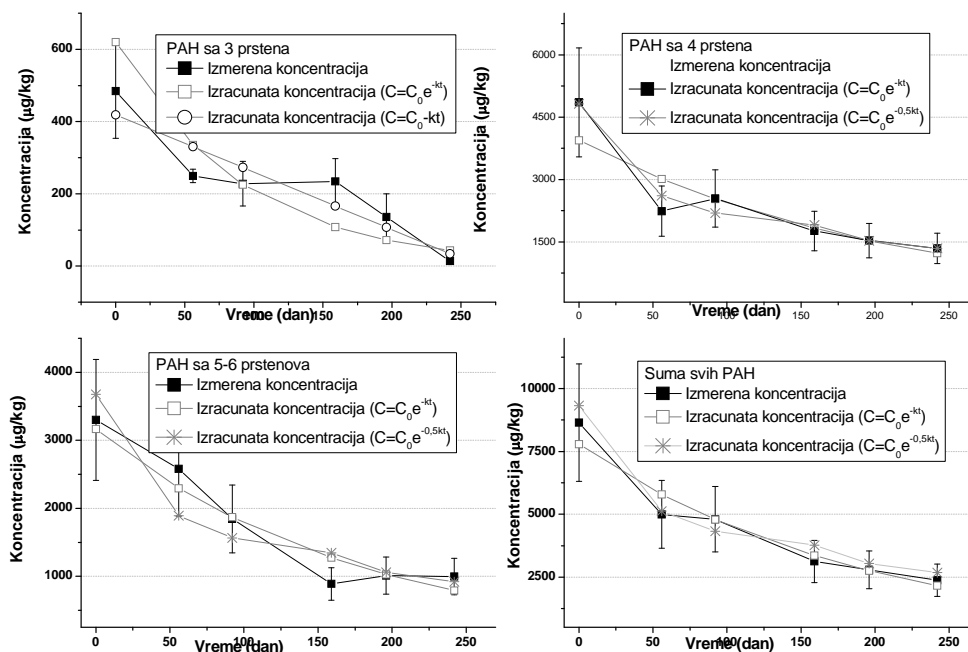
a ne od procesa spiranja zagađenja. Takođe, treba naglasiti da je ova voda korišćena za navodnjavanje površinske obrade, tako da su ugljovodonići koji su se sprali sa površinske obrade ponovo vraćeni na nju.

Tabela 4.19. Promena koncentracije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonića u ocednoj vodi u toku tretmana

Vreme (dan)	0	56	92	128	159	242	280	328	504	613	710
Ukupna ulja mg/l	1,72	25,0	3,07	23,7	28,1	12,2	24,2	15	17,1	14,1	14,6
Mineralna ulja mg/l	1,37	14,5	2,48	1,99	2,81	0,94	7,2	5,2	11,6	0,77	1,7

Degradacija poliaromatičnih ugljovodonića u zemljištu u toku tretmana

Promena ukupnog sadržaja PAH i sume PAH sa tri, četiri i pet-šest prstenova, prikazana je na slici 4.23. Dodatno na slici 4.23. su takođe prikazani kinetički modeli $C=C_0 \cdot kt$ i $\ln C = \ln C_0 - kt$ za PAH sa tri prstena prikazan i $\ln C = \ln C_0 - kt$ i $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$ za ostale PAH. Tokom posmatranog perioda količina PAH sa 3 prstena je opala za 97% (od 485 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$), sa 4 prstena za 72% (od 4854 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 1344 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i sa 5-6 prstena za 70% (od 3300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 998 $\mu\text{g}/\text{kg}$), dok je ukupan sadržaj PAH opao za oko 72%.



Slika 4.23. Promena koncentracije PAH (ukupne, sa 3, 4, 5-6 prstenova) u toku tretmana: stvarne koncentracije i koncentracije izračunate iz primenjenih kinetičkih modela

Najintenzivnija degradacija uočena je za PAH sa manjim brojem prstenova, kao posledica njihove jednostavne strukture u poređenju sa PAH sa većim brojem prstenova, dok se degradacija PAH sa 4 i sa 5-6 prstenova praktično odvijala istom brzinom. Ovo je potvrđeno sa izračunatim konstantama brzine degradacije PAH izračunatim pomoću dva pomenuta kinetička modela (tabela 4.20.). Dodatno, važno je zapaziti da je koncentracija PAH sa 3 prstena deset puta niža od koncentracije PAH sa većim brojem prstenova na samom početku tretmana površinskom obradom. Ovo se takođe može pripisati bržoj degradaciji PAH sa manjim brojem prstenova tokom spontanog procesa starenja naftnog zagađenja u zemljištu derivata koji se odvijao predhodnih 8 godina.

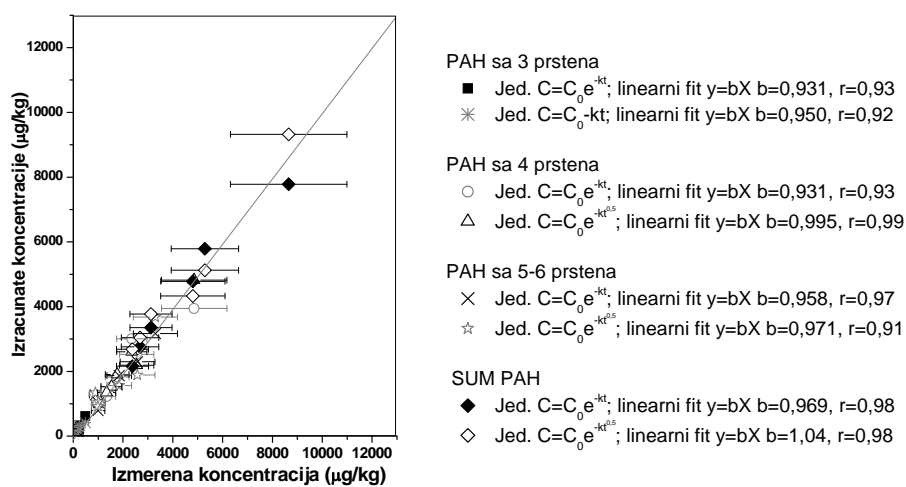
Tabela 4.20. Kinetički parametri degradacije PAH iz kontaminiranog zemljišta u toku tretmana

Parametri	PAH sa 3 prstena	PAH sa 4 prstena	PAH sa 5-6 prstenova	Suma svih PAH
$\ln C = \ln C_0 - kt$				
$\ln C_0$	6,43	8,28	8,06	8,96
$k \text{ (day}^{-1}\text{)} \times 10^{-3}$	11	4,83	5,73	5,30
r	0,60	0,87	0,84	0,96
$\ln C = \ln C_0 - kt^{0,5}$				
$\ln C_0$	-	8,48	8,21	9,14
$k \text{ (day}^{-0,5}\text{)} \times 10^{-1}$	-	0,82	0,89	0,80
r	-	0,95	0,74	0,94
$C = C_0 - kt$				
C_0	419	-	-	-
$k \text{ (dan}^{-1}\text{)}$	1,57	-	-	-
r	0,92	-	-	-

Podaci za koncentraciju PAH izračunati primenom jednačina $\ln C = \ln C_0 - kt$ i $\ln C = \ln C_0 - kt^{0,5}$ (slika 4.23.) su u skladu sa eksperimentalno dobijenim podacima. Ovo je potvrđeno koeficijentima korelacije koji su se kretali u opsegu od 0,74-0,96, osim u slučaju PAH sa 3 prstena, za koje je koeficijent korelacije bio 0,6 za prvi kinetički model dok sa drugim kinetičkim modelom nije pronađena korelacija što je posledica toga da se biodegradacije odvija brže nego što to opisuju primenjeni kinetički modeli, pa bi se promena ovih PAH bolje mogla opisati linearnom jednačinom $C = C_0 - kt$ (tabela 4.19.), čijom primenom je dobijen koeficijent korelacije 0,92.

Da bi se ispitalo koji od primenjenih kinetičkih modela je u boljoj korelaciji sa izmerenim promenama koncentracije PAH u toku tretmana korelirane su izmerene i izračunate koncentracije PAH za primenjene kinetičke modele (slika 4.24.). Za sve grupe posmatranih PAH dobijeni su visoki koeficijenti korelacije (>0,9). Međutim, za PAH sa 3 prstena nagib prave za linearni kinetički model je bio bliži jedinici pa se može zaključiti da je ovaj kinetički model u boljoj saglasnosti sa izmerenim podacima. Za ostale grupe PAH nagibi pravih su bili grupisani oko jedinice što znači da primenjeni kinetički modeli dobro opisuju izmerene promene koncentracija PAH,

tako da se nije moglo sa sigurnošću utvrditi koji od dva kinetička modela je u boljoj korelaciji sa dobijenim promenama.



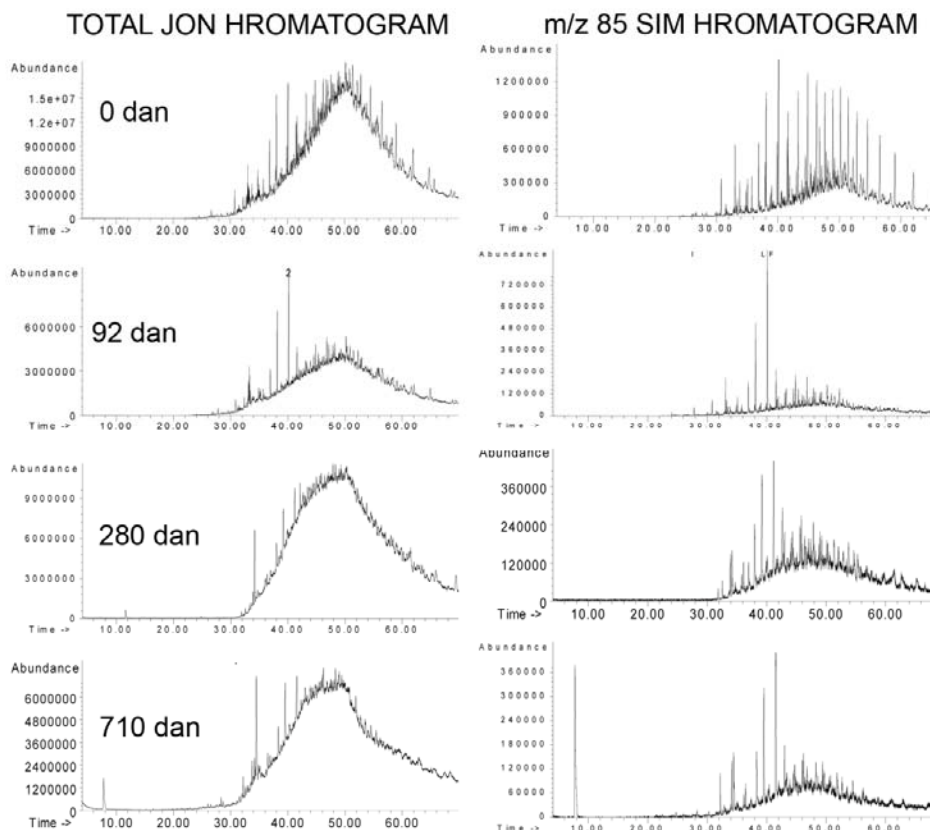
Slika 4.24. Korelacija između stvarne (izmerene) koncentracije PAH (ukupne, sa 3, 4, 5-6 prstenova) i koncentracije predviđene (izračunate) primenom matematičkih modela

GC-MS kvalitativna analiza zemljišta u toku tretmana

Jedinjenja detektovana GC-MS analizom ekstrakata zemljišta uzetih u tokom posmatranog perioda procesa bioremedijacije zemljišta površinskom obradom su dati u tabeli 4.21., dodatno na slici 4.25. prikazani su total jon hromatogrami za 0., 96., 270. i 710. dan eksperimenta. Isto kao i kod tretmana u biogomili dobijeni rezultati GC-MS-kvalitativne analize kontaminiranog zemljišta reflektuju činjenicu da je zemljište uzeto za ovo ispitivanje u značajnoj meri zagađeno različitim ugljovodonicima što jasno ukazuje na zagađenje naftne prirode. Na početku eksperimenta zemljište zagađeno naftom i njenim derivatima sadržalo je veliki broj n-alkana ravnog niza (C_{12} - C_{33}), kao i veliki broj račvastih ugljovodonika od kojih su u najvećoj meri prisutni (najintenzivniji pikovi u hromatogramu, slika 4.25.) nor-pristan (2,6,10-Trimetil-pentadekan), pristan (2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan) i fitan (2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan). Većina ovih jedinjenja detektovana je i na kraju eksperimenta. Međutim, bez obzira što je većina n-alkana prisutnih na početku eksperimenta detektovana i na kraju, ako pogledamo total jon hromatograme (slika 4.25.) možemo uočiti na osnovu relativnih intenziteta pikova da su na kraju eksperimenta u najvećoj meri prisutni račvasti ugljovodonici (uglavnom jedinjenja pristana i fitana), što je posledica njihove manje biodegradabilnosti (Wang et al., 1994; Balba et al., 1998; Ivančev-Tumbas et al., 2004; Nhi-Chong et al., 2008). Takođe, veličina „brda“ u hromatogramu, koje predstavlja GC nerazdvojivu kompleksnu smešu ugljovodonika, raste sa proteklom vremenom trajanja eksperimenta, što je karakteristično za procese starenja i biodegradacije naftnog zagađenja u zemljištu (Wang et al., 1994).

Tabela 4.21. Jedinjenja detektovana u toku vremena u zemljištu tokom eksperimenta

Detektovana jedinjenja	Vreme (dan)											
	0	56	92	159	196	242	280	328	443	504	613	710
1-Hloro-dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dodekan			x						x	x	x	
Tridekan											x	
Tetradekan										x	x	x
Pentadekane	x		x						x	x	x	
Heksadekan	x		x		x		x			x	x	x
Heptadekan	x		x						x	x	x	
Oktadekan	x		x						x		x	
Nonadekane	x	x	x			x						
Eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heneikosan	x	x	x		x	x	x					
Dokosan	x	x	x									
Trikosan	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	
Tetrakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pentakosan	x	x	x	x	x							
Heksakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heptakosan	x	x	x		x			x				
Oktakosan	x	x	x		x	x	x					x
Nanokosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Triakontan	x	x	x		x	x	x				x	x
Hentriakontan	x	x			x	x	x					
Dotriakontan					x	x	x					
Trietriakontan	x	x			x	x	x		x	x	x	
(Z)-7-Tetradeken	x	x	x		x		x	x	x	x	x	x
(E)-3-Oktadeken			x		x		x	x		x	x	x
2,3,7-Trimetil-oktan	x		x	x	x						x	
5-Butil-nonan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,3,5-Trimetil-dekan		x				x		x		x	x	x
6-Etil-2-metil-dekan	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6-Etil-undekan									x	x	x	
5-Etil-5-propil-undekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10-Trimetil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
7,9-Dimetil-heksadekan	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3-Metil-heptadekan	x	x	x	x	x				x	x	x	x
2,6,10,15-Tetrametil-heptadekan		x							x	x	x	x
9-Metil-nonadekan	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
9-Oktil-Heptadekan	x	x	x	x	x	x	x			x	x	
10-Metil-eikosan	x	x	x	x	x				x	x	x	x
2,6,10,14,18-Pentametil-eikosan		x			x	x	x	x	x	x	x	x
Ciklotetradekan										x	x	x
Eikosil-cikloheksan	x	x	x		x			x			x	
1,7,11-Trimetil-4-ciklotetradekan			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Cikloheksadekan		x	x			x						
4-Metil- beta.-cikloheksanetanol		x			x							
1,2-Ditetradecikloksietan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1,3,7,7-Tetrametil-2,11-doksa-3,5-bi..	x		x	x	x	x	x	x		x	x	x
2,6-Naftalenedione, oktahidro-1,1,8			x									
Nafto[2,1-b]furan-4-ol, 1,2-dihidro	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-Metil-antracen	x	x	x						x	x	x	x
9-Butil-antracene	x	x										
3,6-Dimetil-fenantren	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,3,5-Trimetil-fenantren			x							x	x	
Ciklopenta[cd]pirene	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
2-Metil-piren	x	x	x	x	x							x
2-Hloro-5-methoksibifenil	x	x	x	x	x					x		
N-Butil-benzenamin	x	x										
(5.alfa.,14.beta.)-Androstan	x	x	x									
(5.beta.)-Pregnan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(5.alfa.)-D-Dihomoandrostan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Holestan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(17.alfa.H,21.beta.H)-Hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29-Nor-(17.alfa.H,21.beta.H)-hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x



Slika 4.25. Total jon hromatogrami i m/z 85 SIM jon hromatogrami dobijeni analizom zemljišta površinske obrade u toku tretmana

Slično kao kod tretmana u biogomili, n-alkani C_{12} - C_{18} su uglavnom detektovani u prvih 128 dana eksperimenta, nakon čega oni nestaju, da bi ponovo bili detektovani nakon nekih 443. dana, što je kako je to već rečeno, najverovatnije posledica biorazgradnje složene organske materije koja je mogla da kompleksira ova jedinjenja u svoju strukturu, nakon iscrpljivanja lakše biodegradabilnog supstrata. Od ostalih n-alkana C_{19} , C_{21} , C_{22} , C_{25} , C_{27} , C_{31} , C_{32} nisu mogli biti detektovani nakon prvih godinu dana eksperimenta, dok su n-alkani C_{20} , C_{23} , C_{24} , C_{26} , C_{28} , C_{29} i C_{30} bili prisutni u zemljištu sve do kraja eksperimenta, što je najverovatnije posledica njihovog različitog inicijalnog sadržaja u zemljištu na početku eksperimenta.

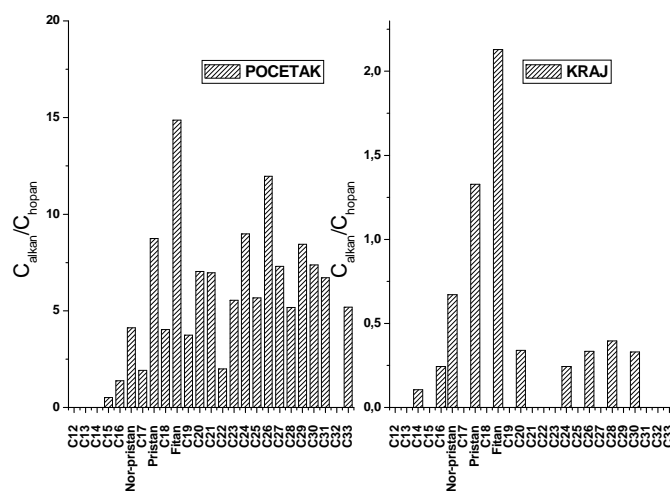
U uzorcima nisu detektovane volatilne komponente što je posledica gubitka kontaminanata isparavanjem i biodegradacijom tokom spontanog procesa starenja zagađenja u zemljištu pre postavke eksperimenta. Nekoliko cikličnih derivata alkana je detektovano tokom eksperimenta, neka od originalno prisutnih jedinjenja su degradirana tokom eksperimenta, dok su istovremeno nastala nova ciklična jedinjenja kao posledica metaboličkih aktivnosti mikroorganizama.

Određeni broj supstituisanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika je detektovan u netretiranom i tretiranom zemljištu, većina originalno prisutnih PAH nije detektovana na kraju eksperimenta. Značajno je primetiti, da u toku ove GC-MS kvalitativne analize nije detektovan nijedan od 16 prioriternih PAH analiziranih u predhodnom poglavlju, što je posledica visoke granice detekcije ovog metoda

(20 mg/kg), dok je koncentracija sume svih PAH na početku eksperimenta bila oko 8,6 mg/kg. Jedinjenja sterana (derivati holestana i androstana) i terpena (nor-hopan i hopan) su konstantno detektovana u svim uzorcima tretiranog i netretiranog zemljišta. Jedinjenja hopana su kasnije korišćena kao biomarker jedinjenja (unutrašnji standardi) za procenu biodegradacije i starosti zagađenja u zemljištu (Prince *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Venosa *et al.*, 1997; Gagni *et al.*, 2007).

Procena biodegradacije pojedinih grupa n-alkana i izoalkana u odnosu na biomarker jedinjenja hopana

Relativna promena sadržaja pojedinih n-alkana (dobijena merenjem promene odnosa površine pikova alkana i hopana) na početku i kraju eksperimenta u odnosu na (17.alfa.H,21.beta.H)-Hopan tretiranom zemljištu površinske obrade prikazana je na slici 4.26. Kao i u biogomili, fitan je dominantno prisutan u zemljištu na početku eksperimenta, kao posledica procesa starenja zagađenja, tokom koga su se u većoj meri razgrađivali lakše biodegradabilni n-alkani ostavljajući za sobom račvaste strukture i druga kompleksna jedinjenja ugljovodonika. Generalno posmatrano, na početku eksperimenta od n-alkana u uzorcima su najprisutnija jedinjenja sa C₂₀-C₃₀ atoma. Jedinjenja sa C₁₂-C₁₆ atoma prisutna su u veoma malim količinama, dok alkani sa C₁₇-C₁₉ atoma su prisutni u nešto većoj količini ali znatno manjoj od alkana sa C₂₀-C₃₀ atoma, što je takođe posledica procesa starenja naftnog zagađenja koje se odvijalo u proteklih 8 godina. Sadržaj pristana je na početku bio u rangu sa sadržajem alkana sa C₂₀-C₃₀ atoma, dok je koncentracija nor-pristana bila na nivou sadržaja n-alkana sa C₁₇-C₁₉ atoma.

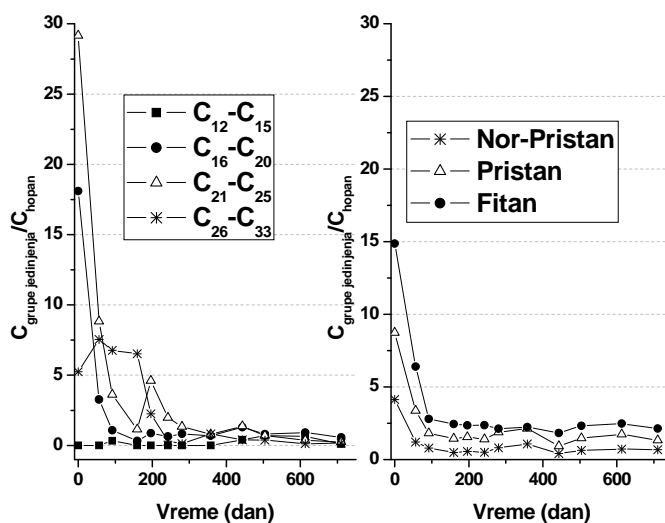


Slika 4.26. Relativna distribucija sadržaja n-alkana (C_{alkana}/C_{hopan}) u zemljištu u toku tretmana

Na kraju eksperimenta možemo videti da je sadržaj i račvastih i normalnih alkana značajno opao (oko 10 puta). Međutim, u uzorcima zemljišta relativni sadržaj račvastih ugljovodonika u ukupnoj masi ugljovodonika je povećan, što je posledica

njihove manje biodegradabilnosti u odnosu na normalne alkane. Ovo je takođe očigledno ako pogledamo izgled m/z 85 SIM hromatograma pre i posle eksperimenta (slika 4.26.) gde najintenzivniji pikovi zapravo potiču od posmatrana tri račvasta jedinjenja alkana. Dodatno, većina n-alkana je potpuno degradirana do kraja eksperimenta, što je posledica dobrog transporta kiseonika tokom površinske obrada, s obzirom da je ovde zemljište prostrto na velikoj površini u tankom sloju.

Za razliku od biogomile, relativni sadržaj određenih grupa n-alkana na početku eksperimenta opada sledećim redosledom $C_{21}-C_{25} > C_{16}-C_{20} > C_{26}-C_{33} > C_{12}-C_{15}$, gde u znatno manjoj količini imamo grupu n-alkana $C_{26}-C_{33}$ (slika 4.27.). Shodno tome, tokom prvih 200 dana eksperimenta sadržaj ove grupe n-alkana ostaje konstantan, s obzirom da je u zemljištu prisutna dovoljna količina biodegradabilnijih n-alkana sa manjim brojem C atoma. Nakon ovog perioda kada je količina lako degradabilnih n-alkana skoro iscrpljena dolazi do razgradnje n-alkana $C_{26}-C_{33}$. Generalno gledano, kao i kod biogomile ukupna količina uklonjenih n-alkana praktično je biodegradirana u toku prve godine eksperimenta, nakon čega njihova količina u zemljištu ostaje skoro konstantna do kraja eksperimenta. Preostala količina ugljovodonika u zemljištu je ili (1) suviše niska i stoga nevidljiva za mikroorganizme, ili (2) je čvrsto sorbovana i skvestrovana u porama zemljišta, i iz tih razloga nije biodostupna i biodegradabilna. Sadržaj račvastih alkana opada u prvih 100 dana eksperimenta, gde se degradira preostala biodostupna frakcija ovih jedinjenja, nakon čega njihov sadržaj ostaje konstantan do kraja eksperimenta; slično je zapaženo i u toku tretmana u biogomili.



Slika 4.27. Relativna promena sadržaja grupa n-alkana ($C_{12}-C_{15}$, $C_{16}-C_{20}$, $C_{21}-C_{25}$ i $C_{26}-C_{33}$) i račvastih ugljovodonika (nor-pristan, pristan i fitan) u zemljištu u toku tretmana

Ako pogledamo relativni udeo različitih grupa n-alkana u ukupnoj masi ugljovodonika (tabela 4.22.), vidimo da su u uzorcima najzastupljeniji n-alkani sa nekih 50%, a zatim slede račvasti ugljovodonici 24%. Za razliku od situacije dobijene u biogomili, relativni udeo ovih grupa jedinjenja značajno je izmenjen na kraju eksperimenta u pogledu odnosa relativnog udela normalnih i račvastih alkana. Naime, relativni udeo n-alkana je opao za 30% dok je udeo račvastih ugljovodonika porastao

za isti procenat. Dobijene promene posledica brže razgradnje normalnih alkana u odnosu na račvaste alkane, ali takođe mogu biti posledica toga da se u toku površinske obrade zemljišta, n-alkani ne transformišu u potpunosti do ugljen-dioksida i vode, već se deo ovih jedinjenja transformiše u različita račvasta jedinjenja, što je u skladu sa činjenicom da je ukupna površina pikova normalizivana na površinu hopana na kraju eksperimenta redukovana za 90%, što je 5% manje nego u biogomili.

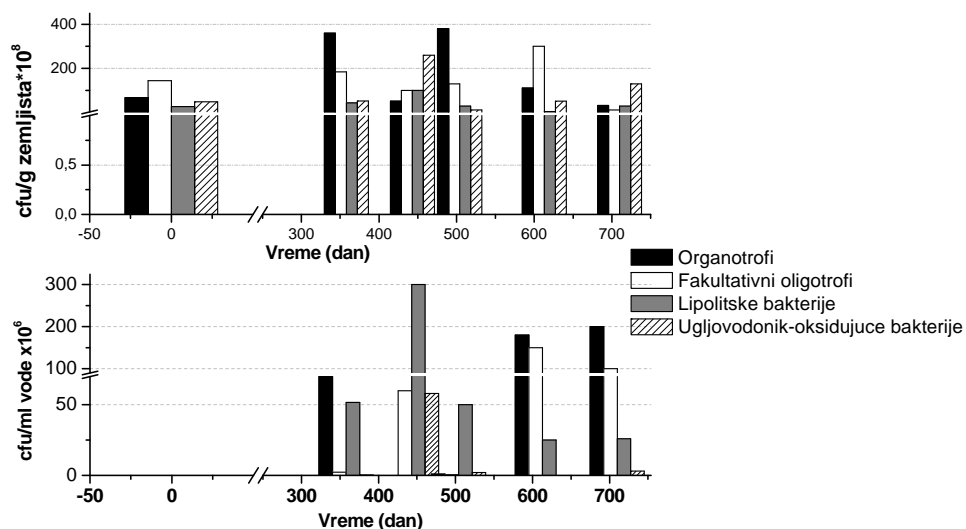
Tabela 4.22. Procentualni udeo pojedinih grupa ugljovodonika detektovanih u zemljištu na početku i na kraju eksperimenta

	n-Alkani	n-Alkeni	Račvasti ugljovodonici	Ciklični ugljovodonici	Aromatični ugljovodonici	Hopani i Sterani
Početak	46,9	0,73	24,3	8,35	9,76	9,92
Kraj	16,20	2,57	51,2	6,75	7,86	15,4

90% redukcije ukupne površine pikova na kraju eksperimenta

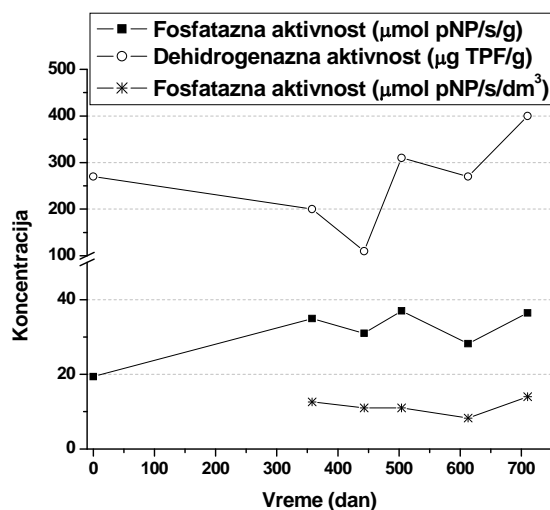
Mikrobiološka karakterizacija procesa bioremedijacije

Na slici 4.28. prikazana je promena brojnosti ispitivanih grupa bakterija u zemljištu zagađenom naftom u toku tretmana površinskom obradom, jer bez dokaza o prisustvu mikroorganizama, posebno ugljovodonik-oksidujućih i lipolitskih bakterija, ne može se govoriti o procesu mikrobiološke degradacije zagađenja. U zemljištu je detektovana visoka brojnost ispitivanih grupa bakterija, u desetinama i stotinama miliona u gramu zemljišta. Bitno je da je brojnost bakterija u toku tretmana veća nego na samom početku, što nam ukazuje da je tretman površinskom obradom doprineo povećanju mikrobiološke degradacije ugljovodonika i biomase. U skladu sa tim je i smanjenje koncentracije ugljovodonika u toku tretmana.



Slika 4.28. Promena brojnosti ispitivanih grupa bakterija u zemljištu i ocednoj vodi u toku tretmana

U toku eksperimenta dehidrogenazna aktivnost generalno raste, indikujući da u toku procesa nije došlo do inhibicije mikrobioloških procesa kao posledica toksičnog delovanja visokih koncentracija organskog supstrata u zemljištu (slika 4.29.). Naime, ovo takođe ide u prilog činjenici da su u zemljištu zaostala kompleksna i teško biodegradabilna jedinjenja čvrsto sorbovana na zemljištu, koja s toga ne predstavljaju opasnost za mikroorganizme, a samim tim najverovatnije ni za životnu sredinu. Fosfatazna aktivnost je uglavnom konstantna tokom eksperimenta i njena prosečna vrednost se kreće u opsegu oko 31 $\mu\text{mol pNP/s/g}$.



Slika 4.29. Promena dehidrogenazne i fosfatazne aktivnosti u zemljištu i ocednoj vodi u toku tretmana

Rezultati tretmana zemljišta zagađenog naftom i derivatima nafte biogomilama i površinskom obradom, ukazuju da su bolji rezultati dobijeni tretmanom u biogomili u pogledu sadržaja ukupnog organskog zagađenja. Međutim, sadržaj ugljovodonika nakon tretmana u zemljištu je i dalje izuzetno visok (oko 10.000 mg/kg). Naravno, uzimajući u obzir starost zagađenja kao i rezultate dobijene gasno hromatografskom analizom možemo smatrati da preostalu količinu ugljovodonika čine teško sekvestrovana i perzistentna jedinjenja (kao što su lignin, humus, asfaltne materije itd.), koja se zbog svoje inertnosti mogu smatrati integralnim delom zemljišta, i koja kao takva najverovatnije nisu štetna i toksična za životnu sredinu.

Ipak, postavlja se pitanje da li je usporavanje procesa biodegradacije nakon godinu dana eksperimenta posledica toksičnog delovanja visokih koncentracija ugljovodonika ili nastanka toksičnih nus produkata metabolizma bakterija. Da bi se ovo ispitalo potrebna su dodatna ispitivanja biodostupnosti zagađujućih materija kao i uticaja tipa, starosti i koncentracije zagađujućih materija na procese biodegradacije. U tom cilju, nakon godinu dana eksperimenta sa površinske obrade zemljišta uzeta je određena količina zemljišta. Rezultati ispitivanja uticaja biodostupnosti, starenja, koncentracije i tipa zagađenja na biodostupnost i procese biodegradacije prikazani su u narednom poglavlju.

4.2. Ispitivanje uticaja koncentracije, tipa i starenja zagađujućih materija na njihovu biodostupnost i procese biodegradacije u zemljištu

4.2.1. Ispitivanje uticaja koncentracije, tipa i starenja zagađujućih materija na njihovu biodostupnost u zemljištu

Termin „biodostupnost” odnosi se na frakciju hemikalija u zemljištu koja se može usvojiti ili transformisati živim organizmima. Dva važna faktora određuju količinu hemikalija koja je biodostupna: (1) brzina transfera posmatranog jedinjenja do žive ćelije (transfer mase) i (2) brzina usvajanja i metabolizam (intristička aktivnost ćelija). Biodostupnost nekog jedinjenja se određuje kao odnos transfera mase i intrističke aktivnosti zemljišne biote (*Bosma et al., 1997*). Maseni transfer kontaminanta određuje mikrobijalnu biodostupnost (*Bosma et al., 1997; Carmichael et al., 1997*).

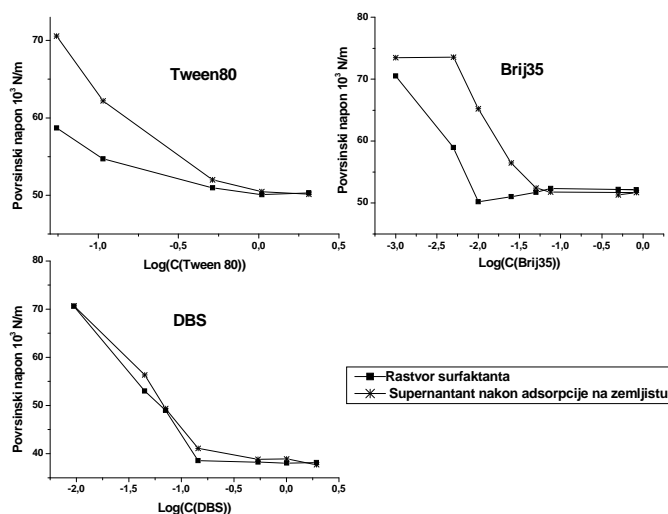
Usvajanje kontaminanta je brže iz fluida nego iz sorbovanog stanja (*Ogram et al., 1985*), a s obzirom da se hidrofobne organske materije slabo rastvaraju u vodi i jako sorbuju na zemljištu samo će mala porcija datog kontaminanta biti prisutna u vodi koja je u kontaktu sa zemljištem. Iz pomenutih razloga, voda je loš izbor rastvarača za procenu biodostupnosti, s obzirom da će velika labilna frakcija hidrofobnih organskih kontaminanata ostati na čvrstoj fazi zemljišta (*Reid et al., 2000a*). Idealno ekstrakciono sredstvo bi prema tome bilo ono koje može da izekstrahuje celokupnu labilnu frakciju kontaminanta iz zemljišta.

Jedna od najčešće primenjivanih metoda je primena ekstrakcije kontaminanta ciklodekstrinima, pri čemu treba napomenuti da su u literaturi ova jedinjenja uglavnom korišćena za procenu biodostupnosti PAH. Za ispitivanje biodostupnosti mineralnih ulja objavljano je svega nekoliko radova, gde su zadovoljavajući rezultati dobijeni primenom ekstrakcije hidrofobne organske materije različitim surfaktantima (*Volkering et al., 1998a,b; Wahle i Kordel, 1997; Barthe i Pelletier 2007*). Treba napomenuti da se surfaktanti ne koriste samo kao pogodna ekstrakciona sredstva za predviđanje biodostupnosti, takođe je u literaturi objavljeno da surfaktanti mogu da povećaju biodostupnost hidrofobnih organskih materija (*Volkering et al., 1998a,b; Wang et al., 1998; Jordan i Cuningham, 1999*).

Za procenu biodostupnosti nafte i naftnih derivata u zemljištu ispitana su tri surfaktanta: Tween80, Brij35 i DBS (dodecilbenzil-sulfonat). U cilju ispitivanja uticaja starenja i tipa zagađenja na biodostupnost, pored zemljišta sa starim naftnim zagađenjem (uzetog iz Rafinerije nafte Novi Sad, nakon tretmana površinskom obradom zemljišta) ispitana je i biodostupnost sveže zagađenog zemljišta sličnim koncentracijama sirove nafte i dizel ulja, kao što je to opisano u eksperimentalnom delu. Tačne koncentracije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u zemljištima korišćenim za određivanje biodostupnosti date su eksperimentalnom delu u tabeli 3.2.

Određivanje kritične koncentracije micela (CMC) odabranih surfaktanata

CMC vodenog rastvora surfaktanta predstavlja koncentraciju surfaktanta pri kojoj se prvi put javlja minimalan površinski napon. Rezultati merenja CMC vrednosti u vodenom rastvoru surfaktanata i supernantantu nakon adsorpcije surfaktanta na zemljištu dati su na slici 4.30. i tabeli 4.23. Vrednost površinskog napona vodenog rastvora surfaktanta indikuju njegovu sposobnost uklanjanja hidrofobnih organskih kontaminanata iz zemljišta (*Abdul et al. 1990*). Što je površinski napon pri CMC vrednosti surfaktana niži, to je veća njegova sposobnost da redukuje kapilarne sile koje zadržavaju hidrofobne organske materije na zemljištu, što favorizuje njihovu separaciju.



Slika 4.30. Određivanje CMC vrednosti vodenog rastvora surfaktanata i supernantanta nakon adsorpcije na zemljištu

Međutim, deo surfaktanta se gubi tokom ekstrakcije kao posledica njegove sorpcije na zemljištu, što dovodi do pomeranja CMC vrednosti surfaktanta u supernantantu nakon ekstrakcije zemljišta. Sorpcija surfaktanta na zemljištu određena je merenjem CMC vrednosti supernantanta dobijenog nakon ekstrakcije čistog nekontaminiranog zemljišta surfaktantima (slika 4.30. i tabela 4.23.).

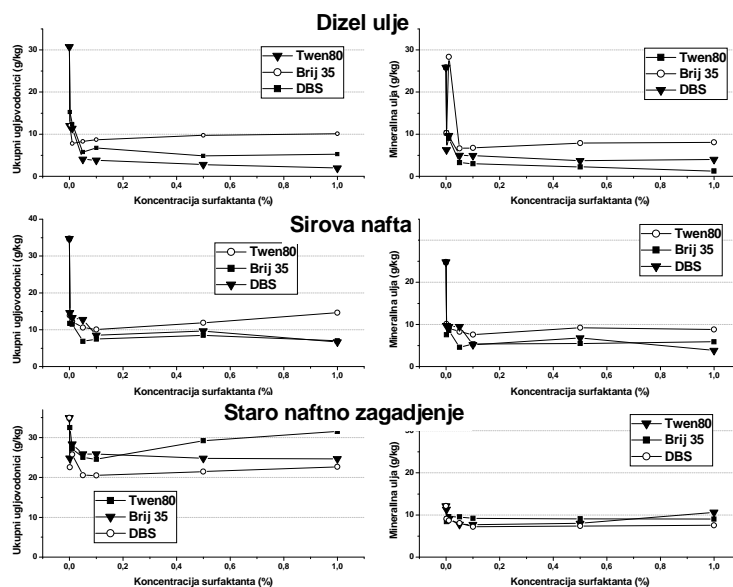
Tabela 4.23. Površinski napon i CMC vrednosti vodenog rastvora surfaktanta i supernantanta

Parametar	Uzorak	Tween80	Brij35	DBS
CMC %	Vodeni rastvor	0,5	0,01	0,9
	Supernantan nakon sorpcije na zemljištu	0,5	0,05	0,9
Površinski napon (10^3 N/m)	Vodeni rastvor	50,98	50,23	41,09
	Supernantan nakon sorpcije na zemljištu	52,00	52,44	38,98

Optimizacija ekstrakcije ugljovodonika iz zemljišta surfaktantima

Koncentracije surfaktanta

Zavisnost koncentracije surfaktanta i efikasnosti ekstrakcije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja je prikazana na slici 4.31. gde su prikazane rezidualne koncentracije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u zemljištu nakon ekstrakcije surfaktantima. Povećavanjem koncentracije surfaktanta kod sva tri tipa kontaminiranog zemljišta dolazi do opadanja koncentracije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika. Za zemljište sveže kontaminirano dizel uljem najveća količina ekstrakovanih mineralnih ulja dobijena je za surfaktant Tween80, pri čemu koncentracija mineralnih ulja konstantno opada sa povećanjem koncentracije surfaktanta, indikujući da je u zemljištu prisutno više biodostupnih ugljovodonika nego što je izekstrahovano sa najvećom primenjenom koncentracijom surfaktanta. Najmanja količina mineralnih ulja izekstrahovana je sa Brij35, što ukazuje da je ovaj surfaktant najmanje pogodan za određivanje biodostupne frakcije mineralnih ulja.



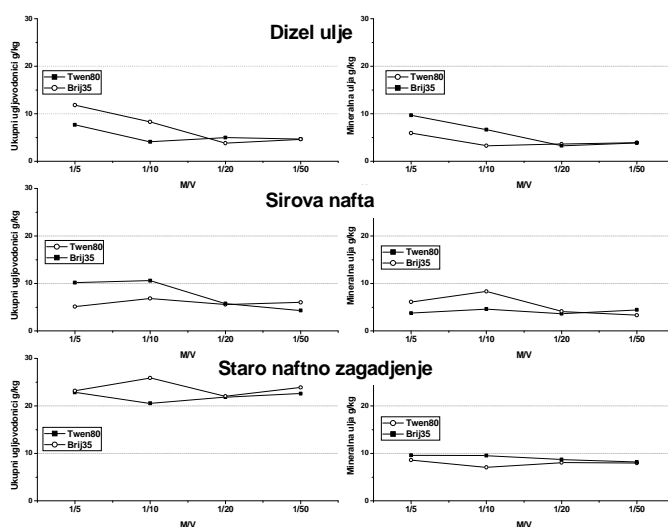
Slika 4.31. Optimizacija koncentracije surfaktanta na količinu ekstrakovanih ugljovodonika

Za zemljište zagađeno sirovom naftom, takođe je najveća količina mineralnih ulja izekstrahovana sa Tween80 pri koncentraciji od 0,5%, dok je opet najmanja količina izekstrahovana sa Brij35. Isti zaključci se mogu izvesti i za ukupne ugljovodonike. Kod zemljišta sa starim naftnim zagađenjem količina izekstrahovanih mineralnih ulja je bila znatno manja u odnosu na količinu izekstrahovanu iz sveže kontaminiranih zemljišta (u proseku oko 4 g/kg), pri čemu nije primećena značajna razlika između primenjenih surfaktanta (slika 4.31.). Međutim, značajna razlika uočena je za ekstrakciju ukupnih ugljovodonika, gde su kao i kod sveže kontaminiranih zemljišta najbolji rezultati dobijeni za 0,5% Tween80 nako čega koncentracija izekstrahovanih ugljovodonika ostaje konstantna. Pri 0,05%

koncentracije surfaktanta Brij35 i DBS su dali iste rezultate. Međutim sa povećanjem koncentracije DBS smanjuje se količina izekstrahovanih ukupnih ugljovodonika u zemljištu indikujući da ovaj surfaktant nije pogodan za određivanje biodostupne frakcije ugljovodonika iz ovog zemljišta. Dodatno, bitno je zapaziti da je količina izekstrahovanih ukupnih ugljovodonika iz zemljišta sa starim naftnim zagađenjem nekoliko puta manja od količine izekstrahovane iz sveže kontaminiranih zemljišta. Dobijeni rezultati ukazuju da su u zemljištu sa starim naftnim zagađenjem prisutna slabo biodostupna i rastvorna jedinjenja kao posledica procesa starenja.

Optimizacija zapremine surfaktanta

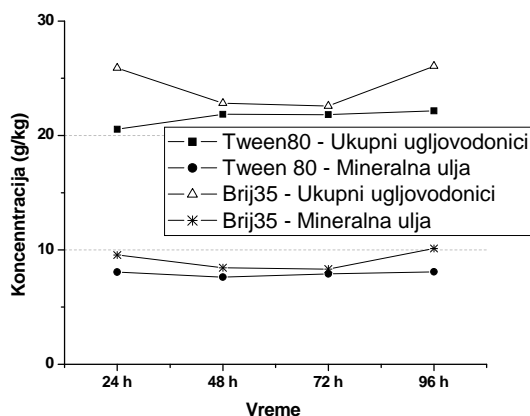
Za optimalne koncentracije surfaktanta Tween80 (0,5%) i Brij 35 (0,05%), ispitan je uticaj primenjenog odnosa zapremine rastvora surfaktanta i mase zemljišta (M/V), da bi se odredilo da li je količina izekstrahovanih jedinjenja bila ograničena rastvorljivošću prisutnih organskih kontaminanata a ne njihovom biodostupnošću. Ispitani su sledeći M/V odnosi: 1/5, 1/10, 1/20 i 1/50 (slika 4.32.). M/V odnos imao je uticaj jedino na Brij35 za sve tipove kontaminanata, gde je nakon primene 1/20 M/V odnosa dobijen isti nivo ekstrakcije ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja kao kod Tween80.



Slika 4.32. Optimizacija odnosa zapremine surfaktanta i mase ekstrahovanog zemljišta (M/V) na količinu ekstrahovanih ugljovodonika

Optimizacija vremena ekstrakcije

Manja količina izekstrahovanih ugljovodonika iz zemljišta sa starim naftnim zagađenjem, u odnosu na količinu izekstrahovanu iz sveže kontaminiranih zemljišta, može biti posledica i jače sorpcije ugljovodonika na česticama zemljišta, kao posledice starenja zagađenja u zemljištu. Iz ovih razloga ispitan je uticaj ekstrakcionog vremena na količinu ekstrahovanih ugljovodonika (slika 4.33.). Međutim, vreme ekstrakcije nije imalo uticaj na količinu izekstrahovanih mineralnih ulja za oba primenjena surfaktanta. Za ukupne ugljovodonike vreme je za surfaktant Brij35 imalo minimalni efekat, tako da je dobijena ista količina izekstrahovanih ugljovodonika kao i kod Tween80 nakon 48 h ekstrakcije.



Slika 4.33. Optimizacija vremena ekstrakcije surfaktantima na količinu ekstrahovanih ugljovodonika

Za procenu biodostupne frakcije kao najbolji se pokazao surfaktant Tween80 pri koncentraciji od 0,5%. U tabeli 4.24. date su količine rezidualne frakcije ugljovodonika u zemljištu nakon ekstrakcije zemljišta ovim surfaktantom, takođe je dat i procentualni udeo rezidualne frakcije ugljovodonika u odnosu na početnu količinu ugljovodonika. Najveće količine biodostupne frakcije ugljovodonika dobijene su za zemljište sveže kontaminirano dizel uljem oko 95% mineralnih ulja i oko 85% ukupnih ugljovodonika (u odnosu na inicijalnu količinu ugljovodonika), što je i očekivano s obzirom da dizel ulje sadrži ugljovodonike srednje veličine koji su rastvorljiviji, a samim tim i biodostupniji u odnosu na sirovu naftu.

Samo oko 40% ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja je dostupno u zemljištu sa starim naftnim zagađenjem, što je u skladu sa podacima dobijenim bioremedijacijom ovog zemljišta u biogomili i površinskom obradom gde je nakon dve godine tretman dobijena koncentracija mineralnih ulja bila oko 13 g/kg i 11 g/kg, a ukupnih ugljovodonika oko 23 g/kg i 26 g/kg, respektivno. Rezultati ekstrakcije indicuju da je u zemljištu nakon bioremedijacionih procesa ostala izvesna količina biodegradabilnog supstrata. Međutim, treba napomenuti da je biodostupnost ispitana nakon godinu dana pilot istraživanja, nakon čega je ovaj tretman nastavljen još godinu dana, tokom koga je deo ugljovodonika uklonjen biodegradacijom a deo je sekvestrovan u porama zemljišta, što je uticalo na smanjenje količine biodostupnog dela supstrata.

Tabela 4.24. Koncentracija i % rezidualnih ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja nakon ekstrakcije sa Tween80

Parametar	Jedinica	DO	SN	ON
Ukupni ugljovodonici	g/kg	1,94	5,56	21,87
	%	5,39	16,58	62,56
Mineralna ulja	g/kg	1,24	3,60	8,07
	%	4,46	14,02	66,69

4.2.2. Ispitivanje uticaja koncentracije, tipa i starenja zagađujućih materija na procese njihove biodegradacije u zemljištu

Na procese biodegradacije značajno utiče tip tj. strukturni sastav zagađenja. Na primer alkani srednje dužine (C_{10} - C_{20}) se najbrže biodegradiraju i preferirani su supstrat od strane mikroorganizama, dok su n-alkani dugog niza (C_{20} - C_{40}) hidrofobna čvrsta jedinjenja koja se teško razgrađuju zbog njihove loše rastvorljivosti u vodi i male biodostupnosti. Račvasti alkani i cikloalkani se takođe degradiraju znatno sporije od odgovarajućih normalnih alkana. Visoko kondenzovane aromatične i cikloparafinske strukture, smole, bitumen i asfaltni materijali imaju najvišu tačku ključanja, a samim tim su i najrezistentniji na biodegradaciju.

Osim od strukture, biodegradacija naftnih ugljovodonika u zemljištu značajno zavisi i od vremena proteklog od kontaminacije zbog procesa starenja, koji smanjuje biodostupnost zagađujućih materija za mikroorganizme (Trindade et al.,2005; Brassington et al.,2007). Ovi procesi pospešuju sorpciju hidrofobnih organskih kontaminanata za zemljište tj. njihovu sekvestraciju u zemljištu, smanjujući brzinu i stepen biodegradacije. Šta više, zemljište sa starim naftnim zagađenjem uglavnom sadrži teško biodegradabilna jedinjenja, uglavnom visoko molekularne ugljovodonike koji se ne mogu degradirati indogenim mikroorganizmima (Trindade et al.,2005).

Suprotno tome, sveže kontaminirano zemljište ugljovodonicima sadrži veće količine zasićenih i alifatičnih jedinjenja, koji su kao što je već spomenuto podložniji biodegradaciji. Međutim, polutanti u sveže zagađenom zemljištu su toksičniji za native mikroorganizme, što rezultuje dužem vremenu adaptacije (*lag faze*) mikroorganizama za degradaciju ugljovodonika, a čak može doći i do inhibicije biodegradacionog procesa, što je posledica većih količina rastvorenih ugljovodonika. S tim u vezi je i koncentracija zagađujućih materija, naime, visoke koncentracije zagađujućih materija u zemljištu ne moraju uvek izazvati negativne efekte u životnoj sredini, što će zavisiti od količine i tipa rastvornih ugljovodonika u zemljištu (Trindade et al.,2005).

Karakteristike zagađenog zemljišta

U cilju ispitivanja procesa biodegradacije korišćena su dva tipa zemljišta: (1) zemljište kontaminirano naftom i derivatima nafte (benzin, sirova nafta, kerozin, dizel ulje i produkti sagorevanja nafte) kao posledica destrukcije infrastrukture Rafinerije nafte Novi Sad, koje je 8 godina tokom stajanja u depou bilo izloženo nekontrolisanim procesima degradacije i godinu dana kontrolisanim uslovima degradacije u toku tretmana površinskom obradom zemljišta. (2) Čisto, nekontaminirano zemljište uzeto takođe sa prostora Rafinerije nafte Novi Sad, u cilju obezbeđivanja istih karakteristika zemljišta u pogledu granulometrijskog sastava, saturacionog kapaciteta zemljišta i permeabilnosti kao kod kontaminiranog zemljišta. U cilju ispitivanja uticaja koncentracije, tipa i starenja zagađujućih materija deo čistog zemljišta zagađen je sirovom naftom i dizelom (bez aditiva) u različitim koncentracijama, dok je koncentracija zagađenja zemljišta iz Rafinerije nafte modifikovana mešanjem sa čistim zemljištem u različitim odnosima (tabela 4.25.).

Tabela 4.25. Koncentracija ukupnih ugljovodonika i mienralnih ulja u probama

Proba	Ukupni ugljovodonici (g/kg)	Mineralna ulja (g/kg)
DO35	36,0	27,9
DO20	20,5	16,0
DO10	10,8	9,15
DO5	8,04	7,04
DO35ko	36,0	27,9
SN35	33,5	25,7
SN20	16,5	12,5
SN10	9,33	7,50
SN5	6,90	5,50
SN35ko	33,5	25,7
ON35	35,0	12,1
ON20	15,7	4,87
ON10	9,01	3,80
ON5	6,66	2,30
ON35ko	35,0	12,1
Kontrola	0,77	0,56

Promena pH vrednosti u toku eksperimenta

pH vrednost se u toku eksperimenta kretala u opsegu od 7,00-8,10 za sve probe ukazujući da su u toku tretmana u probama vladali optimalni uslovi u pogledu pH vrednosti (tabela 4.26.).

Tabela 4.26. Promena pH vrednosti u toku eksperimenta

Proba	Vreme	
	0 d	48 d
DO35	7,93	7,30
DO20	7,90	7,20
DO10	7,95	7,50
DO5	8,05	8,10
SN35	7,90	7,20
SN20	7,86	7,50
SN10	7,96	7,33
SN5	7,92	7,65
ON35	7,93	7,60
ON20	7,55	7,50
ON10	7,66	7,00
ON5	7,70	7,30
DO35ko	7,75	7,50
SN35ko	7,93	7,60
ON35ko	7,90	7,85
Kontrola	7,60	7,47

Sadržaj nutrijentnih materija u toku eksperimenta

Da bi se obezbedila dovoljna količina nutrijenata i mikroorganizama za procese biodegradacije u svaki erlenmajer je dodato po 5 ml rastvora koji je sadržao K_2HPO_4 i NH_4Cl , tako da je rezidualni C:N:P bio 100:5:0,5. Sadržaj nutrijentnih materija u probama na početku i kraju eksperimenta dat je u tabeli 4.27. Na kraju eksperimenta u značajnoj meri smanjen je sadržaj amonijaka (u svim probama osim u kontrolnim gde nisu dodati nutrijenti) što je praćeno porastom sadržaja nitritnog i nitratnog i organskog azota, kao posledica odvijanja nitrifikacionih procesa i ugradnje azotnih materija u novoformiranu ćelijsku biomasu. Na kraju eksperimenta sadržaj azota blago opada, što je najverovatnije posledica odvijanje procesa denitrifikacija nastalog nitritnog i nitratnog azota do N_2 . Generalno gledano na kraju eksperimenta u probama je ostala dovoljna količina rastvornih oblika azota, tako da usporavanje procesa biodegradacije nije bilo posledica nedovoljne količine nutrijenata.

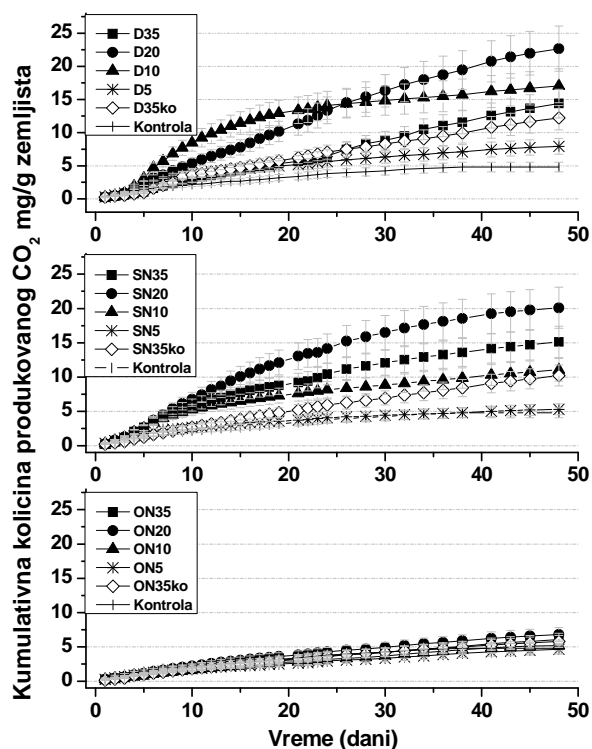
Tabela 4.27. Sadržaj azota i fosfora na početku i kraju eksperimenta

Parametar	Amonijačni azot		Nitratni, nitritni azot		Organski azot		Ukupan azot		Ukupan fosfor	
	mg N/kg		mg N/kg		mg N/kg		mg N/kg		mg P/kg	
Proba	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d
DO35	2087	1389	21	166	514	565	2621	2119	210	195
DO20	1066	505	21	218	514	762	1600	1485	206	122
DO10	568	63	21	523	514	615	1103	1201	205	36
DO5	307	16	21	136	514	353	841	505	205	106
SN35	2066	1361	21	140	578	651	2664	2152	173	95
SN20	1046	554	21	163	577	662	1643	1579	170	123
SN10	549	73	21	325	577	644	1146	1041	168	68
SN5	287	27	21	161	577	530	884	717	168	128
ON35	2084	1773	248	372	1381	1121	3713	3226	448	490
ON20	1063	361	134	552	926	974	2123	1887	303	270
ON10	566	25	78	342	473	758	1116	1125	226	127
ON5	304	20	49	155	397	600	751	775	194	186
D35ko	32	66	0	10	514	294	545	371	183	134
SN35ko	12	19	0	10	577	439	589	468	147	164
ON35ko	29	92	227	362	1381	1134	1637	1588	422	157
Kontrola	103	87	5	10	567	496	674	593	168	149

Respirometrijska merenja u toku eksperimenta

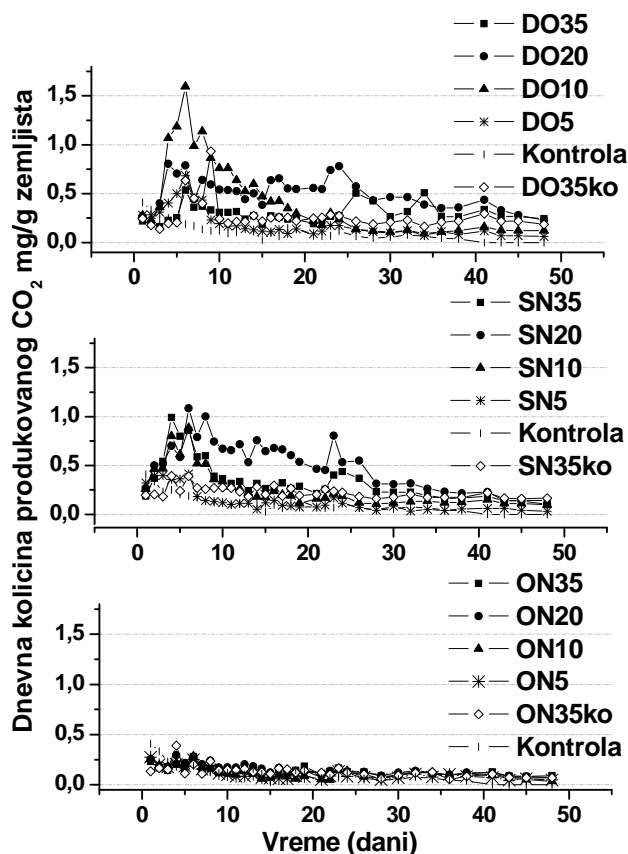
Kumulativna količina produkovanog CO_2 za sve probe prikazana je na slici 4.34., dok je dnevna količina produkovanog CO_2 prikazana na slici 4.35. Najveću kumulativnu količinu CO_2 (22,60 mg/g) produkovalo je zemljište u probi DO20 (16 mg/g ukupnih ugljovodonika). Nešto niža količina (17,06 mg/g produkovanog CO_2) produkovana je za DO10 probu (10,8 mg/g ukupnih ugljovodonika), međutim

značajno je uočiti razliku u kinetici produkcije CO₂ između ove dve probe. Produkcija CO₂ u tokom prvih 15 dana eksperimenta je bila veća u probi DO10 u odnosu na tretman DO20, nakon čega produkcija CO₂ u probi DO10 ostaje konstantna, dok produkcija CO₂ u probi DO20 skoro linearno raste sve do 35. dana eksperimenta nakon čega stagnira do kraja eksperimenta. Ovo je najverovatnije posledica toga da su se u tretmanu DO10 razvili optimalni uslovi za mikrobiološku degradaciju ugljovodonika. Naime, dizel ulje uglavnom sadrži ugljovodonike srednje dužine (C₁₀-C₂₀), ovi ugljovodonici se najbrže biodegradiraju i preferirani su supstrat od strane mikroorganizama. Međutim, n-alkani srednje dužine su takođe i najrastvorljiviji ugljovodonici i mogu pokazati toksično dejstvo. Shodno ovome u probi DO20 s obzirom na inicijalno veću koncentraciju ugljovodonika izraženiji je njihov toksičan efekat na prisutnu mikrofloru, vremenom sa smanjenjem koncentracije ugljovodonika stavraju se povoljniji uslovi za procese biodegradacije i dolazi do intenziviranja produkcije CO₂. Nakon 35. dana količina biodostupnog suspcstrata opada i produkcija CO₂ usporava. Probe DO35 (bioaugmentirana na početku eksperimenta) i DO35ko (nije bioaugmentirana na početku eksperimenta) su imale skoro istu produkciju CO₂ sve do oko 35. dana eksperimenta kada tretman DO35 počinje polako da ubrzava kao posledica adaptacije dodate mikroflora. Količina produkovanog CO₂ u ovim probama je niža od od količine produkovane u probama DO10 i DO20 što je takođe posledica visoke koncentracije rastvorljivih ugljovodonika koji toksično deluju na prisutnu mikrofloru. Najmanja količina produkovanog CO₂ dobijena je za tretman DO5. Ovo je posledica niske koncentracije prisutnih ugljovodonika, gde se biodegradabilni ugljovodonici brzo razgrade a preostala količina je praktično nevidljiva za mikroorganizme.



Slika 4.34. Kumulativna količina produkovanog CO₂ kao posledica mineralizacije ugljovodonika tokom eksperimenta

U probama koje su sadržale zemljište kontaminirano sirovom naftom najveća količina produkovanog CO₂ (20,10 mg/g) dobijena je takođe za probu koja je sadržala oko 20 mg/g ukupnih ugljovodonika (SN20). Međutim, na drugom mestu po količini produkovanog CO₂ nalazi se proba SN35 (33,5 mg/g ukupnih ugljovodonika), 15,13 mg/g, a zatim slede količine produkovanog CO₂ dobijene u probama SN10 (9,33 mg/g ukupnih ugljovodonika) i SN35ko (33,5 mg/g ukupnih ugljovodonika). Iz dobijenih podataka možemo zaključiti da su se optimalni uslovi za degradaciju ugljovodonika razvili u probi SN20. Nasuprot ovome, manja produkcija CO₂ u tretmanu SN35 je posledica toksičnog dejstva visokih koncentracija rastvorenih ugljovodonika. Manja količina produkovanog CO₂ u probi SN35ko u odnosu na probu SN35 jasno govori o pozitivnom uticaju bioaugmentacije zemljišta na procese biodegradacije. Količine produkovanog CO₂ u probama SN20, SN10 i SN5 su bile u sledećem odnosu 1:2:4 što je u skladu sa odnosom koncentracija ugljovodonika u ovim probama (tabela 4.25). Međutim, treba napomenuti da je količina produkovanog CO₂ u probi SN5 na nivou kontrolnog uzorka, tj, respiracije nezagađenog bioaugmentiranog zemljišta tako da se ne može sa sigurnošću tvrditi da je izdvojena količina CO₂ posledica biodegradacije sirove nafte iz zemljišta.



Slika 4.35. Dnevna količina produkovanog CO₂ kao posledica mineralizacije ugljovodonika tokom eksperimenta

Produkcija CO₂ u svim probama koje su sadržale zemljišta sa starim naftnim zagađenjem je na nivou produkcije kontrolnog (nezagađenog) zemljišta tj., možemo

reći da se biodegradacija odvija u veoma maloj meri, što je i potvrđeno količinom degradiranih ugljovodonika nakon završetka tretmana (slika 4.36.). Ovo se može objasniti time, da je prilikom procesa starenja naftno zagađenje podleglo različitim biotičkim i abiotičkim procesima, tj. deo lakših frakcija ugljovodonika je ispario, deo se razgradio, a pospešena je i sorpcija rezidualne hidrofobne frakcije za zemljište tj., njihova sekvestracija u zemljištu, i time smanjena brzina i stepen njihove biodegradacije. Ovakav rezidualni materijal zbog svojih inertnih karakteristika, nerastvorljivosti i sličnosti sa humusnim materijalom najčešće ne predstavlja opasnost za životnu sredinu (Trindade *et al.*, 2005).

Nakon 35. dana eksperimenta, kada je dnevna produkcija CO₂ u skoro svim probama opala na vrednost kontrolnog uzorka, u sve probe dodat je surfaktant Tween80 (0,5%) da bi se uverilo da li je usporavanje procesa biodegradacije posledica slabe rastvorljivosti preostale količine ugljovodonika. Eksperiment je nastavljen do 48. dana, međutim dodatkom surfaktanta nije došlo do ponovnog povećanja produkcije CO₂, na osnovu čega se može zaključiti da zaustavljanje procesa biodegradacije nije posledica slabe rastvorljivosti ugljovodonika.

Degradacija ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u toku eksperimenta

Sadržaj ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u svim probama nakon 1., 7., 15. i 48. dana dati su na slici 4.36. U probama koje su sadržale sveže kontaminirana zemljišta (dizelom i sirovom naftom) udeo mineralnih ulja (nepolarnih ugljovodonika) je oko 80%, dok je udeo mineralnih ulja u probama sa starim naftnim zagađenjem 35%. Ovo je takođe posledica starenja zagađenja, i prisustva humusa, lignina i drugih materija u zemljištu sa starim naftnim zagađenjem. Koncentracija ukupnih ugljovodonika u toku posmatranih 48 dana eksperimenta u probama DO10; DO5; SN20; SN10; SN5 opala je za 70-87%, u probama DO20 i SN35 53-63%, i u probama DO35; DO35ko; SN35ko; ON35; ON20; ON20; ON5 i ON35ko za 9-39% (tabela 4.28.). Smanjenje koncentracije ugljovodonika je u skladu sa dobijenom produkcijom CO₂. U probama koje su sadržale zemljište kontaminirano dizelom sa smanjenjem sadržaja mineralnih ulja tokom procesa biodegradacije proporcionalno se smanjuje i koncentracija ukupnih ugljovodonika, što je i za očekivati s obzirom da je limitirajući faktor biodegradacije zapravo inicijalna oksidacija mineralnih ulja. U probama sa zemljištem zagađenim sirovom naftom i starim naftnim zagađenjem procenat uklonjenih ukupnih ugljovodonika je za oko 10% manji od procenta uklonjenih mineralnih ulja, što može biti posledica većeg doprinosa prisustva slabo degradabilnih polarnih organskih jedinjenja (humus, lignin itd.) na brzinu biodegradacije ukupnih ugljovodonika, ali i transformacije dela mineralnih ulja do slabo degradabilnih polarnih organskih jedinjenja.

Takođe, ovde treba istaknuti da je koncentracija mineralnih ulja na kraju laboratorijskog eksperimenta (9,05 g/kg) bila približna koncentraciji dobijenoj tokom površinske obrade (10,8 g/kg), dok je koncentracija ukupnih ugljovodonika (32 g/kg) na kraju laboratorijskog eksperimenta bila nešto veća od one dobijene površinskom obradom (26 g/kg), što je posledica znatno kraćeg vremena eksperimenta u laboratorijskim uslovima (48 dana) u odnosu na pilot istraživanja (710 dana), gde je došlo do razgradnje i teže biodegradabilnih polarnih organskih jedinjenja.

Procenti rezidualne frakcije mineralnih ulja (u odnosu na početnu količinu) dobijeni nakon 48 dana tretmana u svim probama DO, i SN35, ON35, ON20 kao i u

svim kontrolnim uzorcima su veće od onih predviđenih ekstrakcijom sa Tween80, dok su procenti rezidualne frakcije ukupnih ugljovodonika u svim probama veći od predviđenih (tabela 4.28.). Dobijeni rezultati indikuju da u probama još uvek ima biodegradabilnog supstrata, koji se u toku 48 dana eksperimenta nije stigao razgraditi. Međutim, treba naglasiti da je biodostupna frakcija ugljovodonika određena na početku eksperimenta tako da se ne može očekivati da se ukupna količina izekstrahovanih ugljovodonika sa Tween80 degradira u potpunosti do CO₂ i vode, s obzirom na bifazno ponašanje ugljovodonika u zemljištu, gde se jedan deo uklanja biodegradacijom, dok drugi deo difunduje u pore zemljišta i kompleksira se sa zemljišnom organskom materijom (*Semple et al., 2003*). Dodatno, jedan deo ugljovodonika se takođe ugrađuje u novonastalu ćelijski biomasu, čime se može delimično objasniti i razlika u količini ukolonjenih ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja. Međutim, veće uklanjanje mineralnih ulja u odnosu na ugljovodonike je većim delom posledica transformacije mineralnih ulja u teže biodegradabilna polarna organska jedinjenja.

Tabela 4.28. Procentualni udeo rezidualne frakcije ugljovodonika u odnosu na početnu količinu u probama nakon tretmana i predviđen ekstrakcijom ugljovodonika sa Tween80

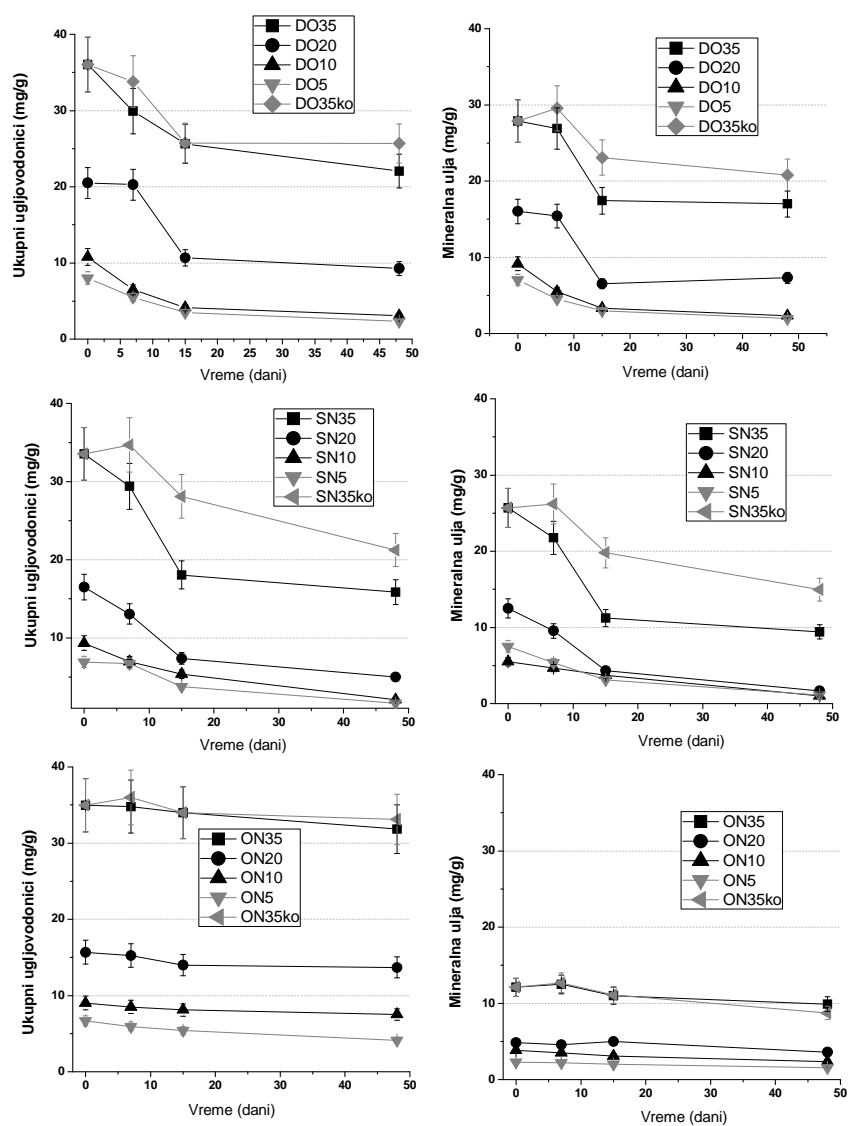
Probe	Ukupni ugljovodonici (%)		Mineralna ulja (%)	
	Izmereno	Predviđeno	Izmereno	Predviđeno
DO35	61	5,4	61	4,5
DO20	45		46	
DO10	29		25	
DO5	29		28	
SN35	47	17	37	14
SN20	30		13	
SN10	23		18	
SN5	24		15	
ON35	91	63	82	67
ON20	87		74	
ON10	83		61	
ON5	62		67	
DO35ko	71	5,4	75	4,5
SN35ko	63	17	58	14
ON35ko	95	63	72	67

Najveća razlika između predviđene i uklonjene količine ugljovoodnika u toku tretmana dobijena je za DO probe koje su sadržale zemljište sveže kontaminirano dizel uljem, gde je kao posledica njegove strukture dobijeno da je oko 95% prisutnih ugljovodonika biodostupno. Međutim, stvarna uklonjena količina ugljovodonika u probama je bila znatno niža, što je posledica veće toksičnosti nižih rastvorljivijih ugljovodonika na prisutnu mikrofloru, pa je u toku adaptacije mikroflora na ovo zagađenje deo ugljovodonika imao vremena da difunduje u pore zemljišta kao i da se kompleksira sa zemljišnom organskom materijom.

U slučaju SN proba, jedino rezidualni sadržaj mineralnih ulja u probi SN35 je bio veći od predviđenog, kao posledica veće inicijalne količine rastvorenih ugljovodonika u ovoj probi, što je u skladu sa izmerenom produkcijom CO₂ u ovim

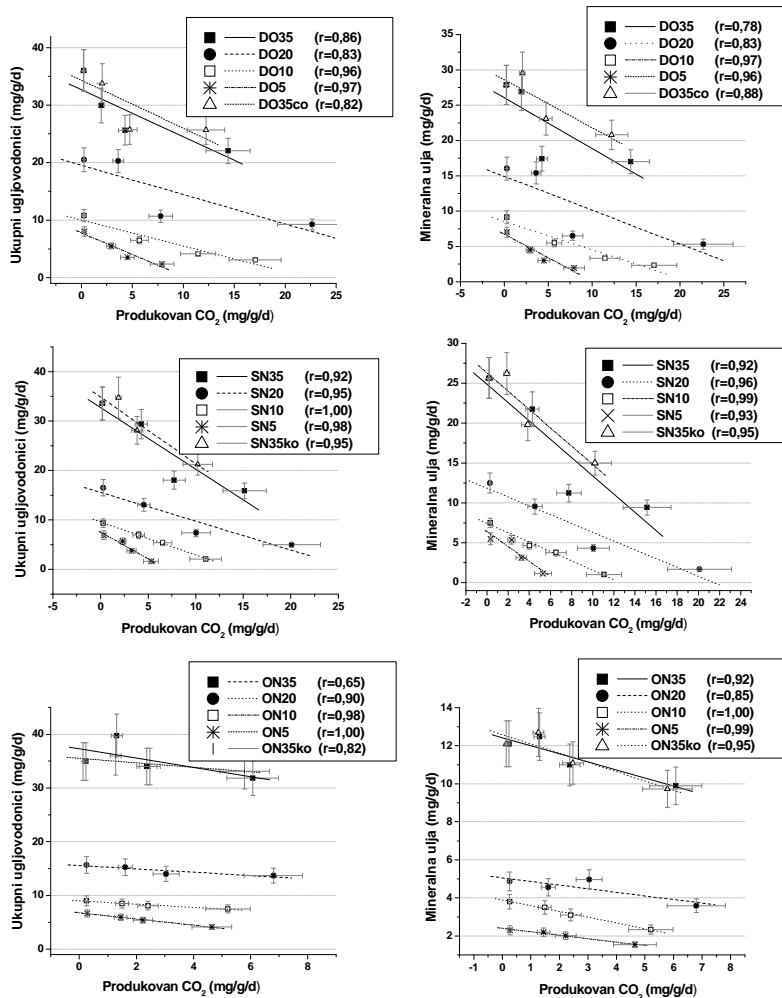
probama. Rezidualni sadržaj ukupnih ugljovodonika je bio veći od predviđenog u svim probama, indikujući da je deo mineralnih ulja transformisan u teže biodegradabilna polarna organska jedinjenja.

U probama koje su sadržale zemljište sa starim naftnim zagađenjem, takođe jedino u probi ON35 je rezidualna frakcija mineralnih ulja bila neznatno veća od predviđene, što može biti posledica prisustva teško biodegradabilnih visokomolekularnih ugljovodonika koji je preostao nakon dugog procesa starenja ovog zagađenja u zemljištu. Takođe, rezidualni sadržaj ukupnih ugljovodonika je veći u svim probama od predviđenog ukazujući da su se mineralna ulja u ovim probama predominantno transformisala u polarna organska jedinjenja a manjim delom biodegradirala do CO₂ i vode, što je u skladu sa produkovanom količinom CO₂ u ovim probama.



Slika 4.36. Promena sadržaja ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja u probama tokom eksperimenta

Merenje smanjenja koncentracije ugljovodonika jedan je od najčešćih pristupa za monitoring procesa biodegradacije. Da bismo ispitali vezu između produkovane količine CO₂ i degradiranih ugljovodonika izvršena je korelacija izdvojene količine CO₂ i ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja nakon 1., 7., 15. i 48. dana eksperimenta (slika 4.37.). Izuzetno visoki koeficijenti korelacije (0,96-0,97) dobijeni su za probe DO10 i DO5, koje su sadržale zemljište kontaminirano nižim količinama dizel ulja, što ukazuje na činjenicu da se degradacija ugljovodonika u ovim probama uglavnom odvijala biotičkim putem. Nasuprot tome za probe DO20, DO35 i DO35ko koji su sadržali veće koncentracije dizel ulja dobijeni su niži koeficijenti korelacije. Ovo je posledica toga da u ovim probama smanjenje koncentracije ugljovodonika nije samo posledica biotičkih procesa, već se u ovim probama u značajnijoj meri odvijaju i abiotički procesi. Naime, kao što je gore već rečeno dizel ulje sadrži uglavnom parafine, izoparafine i cikloparafine srednje dužine (C₁₀-C₂₅), značajan deo ovih ugljovodonika je veoma isparljiv, pa shodno tome probe koje sadrže veće količine dizel ulja imaju i veće količine isparljivih ugljovodonika koji se pre uklanjaju volatalizacijom nego biodegradacijom.



Slika 4.37. Korelacija između inicijalne brzine produkcije CO₂ i ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja tokom eksperimenta

Visoki koeficijenti korelacije su dobijeni za sve probe koje su sadržale zemljišta zagađena sirovom naftom. Ovo je u skladu sa činjenicom da za razliku od dizel ulja sirova nafta sadrži manji procenat isparljivih ugljovodonika pa se uklanjanje ugljovodonika iz kontaminiranog zemljišta predominantno odvija biodegradacijom.

U slučaju proba koje su sadržale zemljište sa starim naftnim zagađenjem dobijeni su visoki koeficijenti korelacije za skoro sve tretmane (0,82-1,00), mala količina izdvojenog CO₂ odgovara maloj količini uklonjenih ugljovodonika. S obzirom na starost zagađenja u posmatranom zemljištu (oko 10 godina) može se smatrati da su isparljivi ugljovodonici kao i biodegradabilni ugljovodonici uglavnom uklonjeni tokom procesa starenja, a da su u zemljištu uglavnom prisutni teško biodegradabilni ugljovodonici. Shodno tome može se pretpostaviti da je u toku posmatranog perioda degradirana preostala količina biodegradabilnog supstrata. Iz dobijenih rezultata možemo zaključiti da je količina izdvojenog CO₂ veoma koristan i jednostavan alat za praćenje stepena mineralizacije ugljovodonika u slučajevima kada abiotički gubitak ugljovodonika nema veliki uticaj na ukupnu količinu uklonjenih ugljovodonika.

Mikrobiološka karakterizacija procesa biodegradacije

Dehidrogenazna aktivnost nakon 1., 7., 15. i 48. dana eksperimenta data je u tabeli 4.29. Vrednost dehidrogenazne aktivnosti pratila je dnevni trend produkcije CO₂ (slika 4.35.) u svim probama. U probama sa zemljištem kontaminiranim dizel uljem najveća vrednost dehidrogenazne aktivnosti uočena je u probi DO20 nakon 15. dana, što je u skladu sa najvećom količinom razvijenog CO₂ u ovoj probi, kao i sa maksimalnom dnevnom proizvedenom količinom CO₂ (slika 4.35.). Maksimalna dehidrogenazna aktivnost za probu DO10 dobijena je 7. dana, kada je takođe detektovana i maksimalna dnevna produkcija CO₂. U probi DO5 vrednost dehidrogenazne aktivnosti polako opada tokom posmatranog perioda, što je takođe u skladu sa tim da je maksimalna dnevna produkcija CO₂ za ovaj tretman izmerena u prvih 5 dana eksperimenta kao posledica male količine biodegradabilnog supstrata dostupnog za mikroorganizme. U probi DO35 dehidrogenazna aktivnost raste tokom vremena sa naglim skokom na kraju eksperimenta što je u skladu sa porastom produkcije CO₂ na kraju eksperimenta, kao posledice adaptacije dodate mikroflore i smanjenja koncentracije rastvorenih ugljovodonika koji mogu toksično delovati i inhibirati degradaciju. Dehidrogenazna aktivnost u probi DO35ko ostaje konstantna tokom eksperimenta.

Slični rezultati dobijeni su i za probe sa zamljištem kontaminiranim sirovom naftom, s tim da je u ovim probama najveća vrednost dehidrogenazne aktivnosti izmerena u probi SN35 koja je bila na trećem mestu po ukupnoj količini produkovanog CO₂, ali je vrednost dehidrogenazne aktivnosti ipak pratila dnevni trend produkcije CO₂ u ovim probama. U probi SN35 maksimalna vrednost dehidrogenazne aktivnosti dobijena je nakon 15 dana što je u skladu maksimalnom dnevnom proizvedenom količinom CO₂ u datom tretmanu, U tretmanu SN20 maksimalna vrednost je dobijena nakon 7. dana nakon čega ova vrednost opada kao i dnevna produkcija CO₂. U probama SN10 i SN5 dehidrogenazne aktivnosti uglavnom opadaju tokom posmatranog perioda, što je takođe u skladu sa tim da je maksimalna dnevna produkcija CO₂ za ove probe izmerena u prvih 5 dana eksperimenta.

Probe ON20, ON10 i ON5 koje su sadržale zemljište sa starim naftnim zagađenjem uglavnom su imale konstantnu vrednost dehidrogenazne aktivnosti što je u skladu sa relativno malom i konstantnom produkcijom CO₂ tokom posmatranog perioda. Međutim, u probama ON35 i ON35ko detektovane su izuzetno visoke vrednosti dehidrogenazne aktivnosti, što je najverovatnije posledica prisustva autohtone mikroflore koja se u ovim probama razvila tokom desetogodišnjeg perioda izloženosti ovog zemljišta različitim uslovima. Međutim, ova visoka vrednost dehidrogenazne aktivnosti nije u skladu sa količinom izdvojenog CO₂ kao ni sa količinom degardiranih ugljovodonika, indikujući da izostanak biodegradacije u ovim probama nije posledica toksičnog dejstva visokih koncentracija ugljovodonika već njihove perzistentnosti.

Tabela 4.29. Mikrobiološka karakterizacija proba na početku i kraju eksperimenta

Probe	Organotrofi		Fakultativni oligotrofi		Lipolitske bakterije		Ugljovodonik oksidujuće bak.		Dehidrogenazna aktivnost			
	CFU/g zemljišta x 10 ¹⁰								µg TPF/g			
Vreme	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	1 d	7 d	15 d	48 d
DO35	46000	9,30	62000	3	1060	0,51	400	1,2	40,6	71,9	60,1	176
DO20	46000	16,00	62000	3,7	1060	0,6	400	0,75	36,4	81,0	666	141
DO10	46000	2,10	62000	5,2	1060	2,6	400	1,6	33,4	218	39,7	40,7
DO5	46000	2,60	62000	2,1	1060	0,03	400	1,1	48,6	44,8	32,3	28,6
SN35	46000	7,50	62000	10	1060	3,4	400	10	40,6	38,0	53,6	35,9
SN20	46000	11,00	62000	4,8	1060	2,7	400	3	50,8	294	527	137
SN10	46000	2,70	62000	3,8	1060	1,6	400	1	49,3	146	123	35,0
SN5	46000	30,00	62000	7,2	1060	1	400	100	59,7	36,8	28,7	41,7
ON35	46000	0,90	62000	1,7	1060	2,1	400	0,35	42,0	25,8	44,1	32,0
ON20	46000	1,70	62000	2,7	1060	1,6	400	1,3	50,8	50,5	39,9	39,1
ON10	46000	2,10	62000	2,1	1060	0,3	400	0,8	158	504	423	120
ON5	46000	1,70	62000	7,7	1060	1,3	400	0,6	69,7	64,5	64,3	51,9
DO35ko	0,01	16,00	1	3,5	0,26	1,1	0	0,9	70,3	48,6	48,9	62,1
SN35ko	0,01	2,10	1	7,6	0,26	5,6	0	1,6	41,8	33,6	40,2	44,7
ON35ko	0,01	1,00	1	1	0,26	0,03	0,002	1	158	697	726	1334
Kontrola	46000	1,00	62000	1,1	1060	0,55	400	0,5	45,1	-	-	50,7

Sve probe, osim proba DO35ko, SN35ko i ON35ko, su na početku eksperimenta bioaugmentirane. Brojnost reprezentativnih grupa mikroorganizama je na početku eksperimenta bila reda veličine: organotrofi - 10¹⁴ CFU/g zemljišta; fakultativni oligotrofi - 10¹⁴ CFU/g zemljišta; lipolitske bakterije - 10¹³ CFU/g zemljišta; ugljovodonik oksidujuće bakterije - 10¹² CFU/g zemljišta. Ova vrednost je na kraju eksperimenta znatno opala, ali je i dalje bila izuzetno visoka, ukazujući da je u toku ispitivanja bilo dovoljno mikroorganizama potrebnih za biodegradaciju organskih kontaminanata (tabela 4.29.).

GC-MS kvalitativna analiza proba u toku eksperimenta

Jedinjenja detektovana GC-MS kvalitativnom analizom ekstrakata zemljišta uzetih na početku i kraju eksperimenta u posmatranim probama su dati u tabelama

4.30, 4.31. i 4.32. Dodatno na slici 4.38., 4.39. i 4.40. prikazani su total jon hromatogrami za posmatrane probe na početku i kraju eksperimenta. Prema literaturnim podacima dizel ulja se sastoje od 24% n-alkana, 30% aromata i 46% izoalkana i cikloalkana (Marchal *et al.*, 2003). Dobijeni rezultati GC-MS kvalitativne analize proba koje su sadržale zemljište kontaminirano dizel uljem su u skladu sa literaturnim podacima. Od n-alkana, izoalkana i cikloalkana detektovana jedinjenja su imala od 14-25 ugljenikovih atoma što je takođe u skladu sa literaturnim podacima, s obzirom da se ostali ugljovodonici uglavnom uklone tokom procesa rafinacije. Od aromatičnih ugljovodonika uglavnom su detektovani različiti derivati naftalena, koji su u potpunosti bili uklonjeni na kraju eksperimenta u svim probama. Većina inicijalno detektovanih n-alkana su se mogli detektovati i na kraju eksperimenta. Manje račvasti alkani sa manjim brojem C atoma degradiraju u potpunosti do kraja eksperimenta. Dodatno, većina cikličnih alkana nije detektovana na kraju eksperimenta. Generalno gledano, nisu uočene bitne razlike između posmatranih proba na kraju eksperimenta u pogledu detektovanih jedinjenja (slika 4.38.).

Tabela 4.30. Detektovana jedinjenja u zemljištu kontaminiranom dizel uljem

Detektovana jedinjenja	DO5		DO10		DO20		DO35		DO35ko
	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	48 d
1-Hloro-dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tetradekan	x		x		x		x		
Pentadekan	x		x		x		x		
Hexadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heptadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Oktadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nanodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eikosan	x	x	x	x	x	x	x		x
Heneikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dokosan	x	x		x	x	x	x	x	x
Trikosan		x				x		x	x
Tetrakosan		x						x	x
1-Nonadekan	x		x		x		x		
(E)-5-Eikosen	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6-Heneikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-Metil-dekan	x		x		x		x		
2,6,10-Trimetil-dodekan	x		x		x		x	x	x
2-Metil-tetradekan	x		x		x		x		x
2,6,10-Trimetil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7-Metil-heksadekan					x		x		
2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5-Metil-okadekan	x		x		x		x		
7-Heksil-eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11-Decil-tetrakosan									x
3-Cikloheksil-3-cikloheksil-dekan	x		x	x	x		x	x	
1,1'-Oksibis-dekan	x		x	x	x		x		
Etil-cikloheksan	x		x		x		x		
1,2,3-Trimetil-cikloheksan	x		x		x		x		
1-Metil-3-pentil-Cikloheksan			x		x	x	x		
Etil-ciklopentan	x	x	x	x	x	x	x	x	
1-(Cikloheksilmetil)-2-m-cikloheksan	x		x		x		x		
1,1,2,3-Tetrametilcikloheksan	x		x		x		x		
Spiro[2-etiliden-3-metilciklopenta	x		x		x		x		
2,6-Dimetil- nafihalen	x		x		x		x		
1,3-Dimetil- nafihalen	x		x		x		x		
1,5-Dimetil- nafihalen	x		x		x		x		
1,4,6-Trimetil-nafihalen			x		x		x		
6-Metilfenatridin	x		x		x		x	x	x
8.beta(H)-Homodriman	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabela 4.31. Detektovana jedinjenja u zemljištu kontaminiranom sirovom naftom

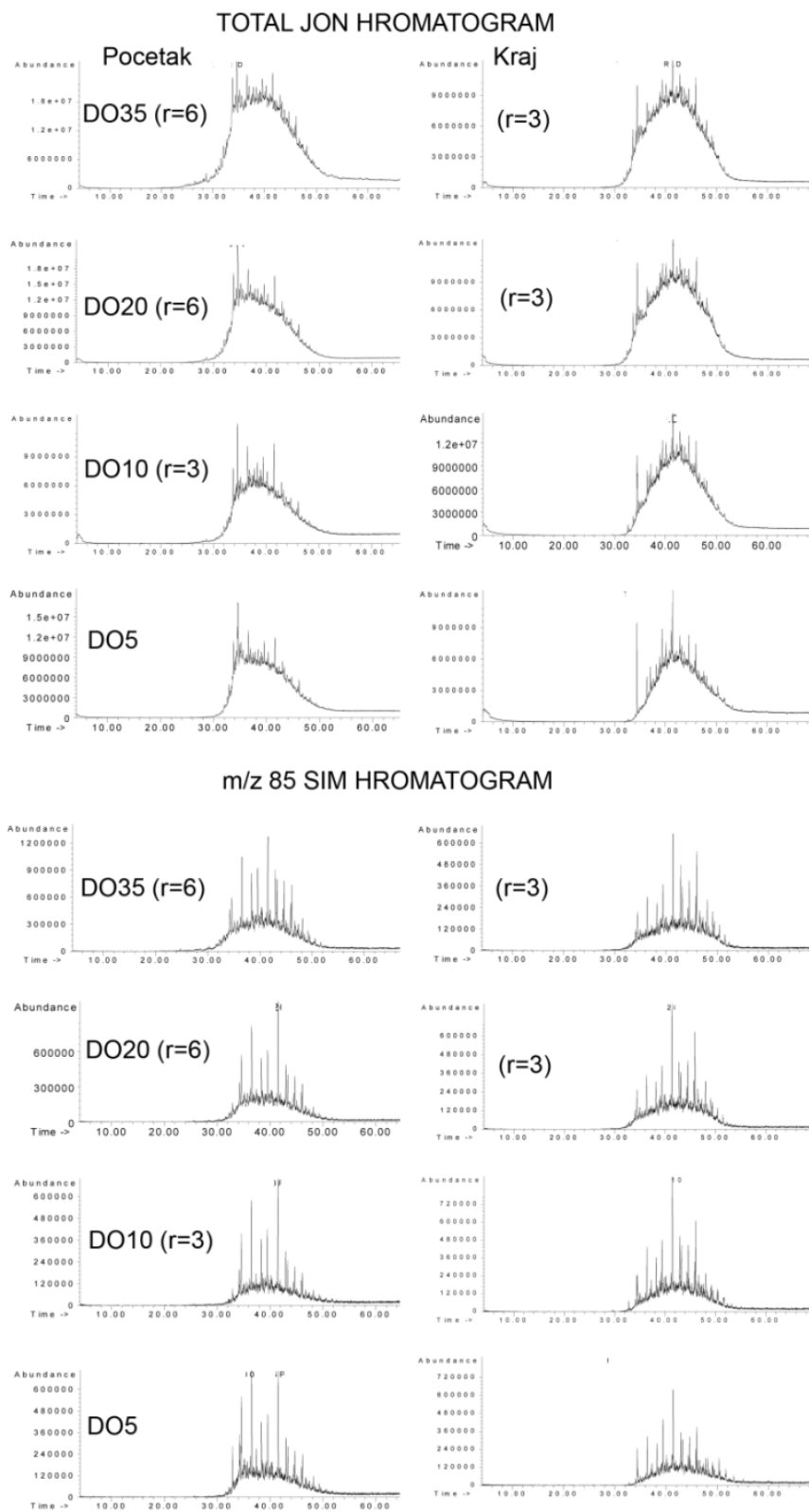
Detektovana jedinjenja	SN5		SN10		SN20		SN35		SN35ko
	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	48 d
1-Floro-dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dekan					x		x		
Dodekan			x		x		x		
Undekan			x		x		x		
Tridekan	x		x		x		x	x	x
Tetradekan	x		x		x	x	x	x	
Pentadekan	x	x	x	x	x	x	x		
Heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heptadekan	x	x	x	x	x	x	x		
Oktadekan	x	x	x	x	x	x	x		
Nanodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eikosan	x	x	x	x	x	x	x		x
Heneikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dokosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Trikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tetrakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pentakosan	x		x	x	x	x	x	x	x
Heksakosan			x		x		x		
Heptakosan			x	x	x	x	x	x	
Oktakosan			x		x		x	x	
Nanokosan			x		x		x	x	x
Triakontan			x		x		x		
Dotriakontan			x		x		x		x
Triakontan			x		x		x		
(Z)-7-Heksadeken		x		x		x		x	x
(E)-5-Oktadeken		x		x		x			
(E)-5-Eikosen		x		x		x		x	x
5-Dokosen		x		x				x	x
3-Metil-nonan			x		x		x		
5-Butil-nonan	x		x		x		x		
5-(2-Metilpropil)-nonan					x		x		
5-Etil-5-metil-dekan			x		x		x		
4-Metil-1-dekan			x		x		x		
5-Etil-5-metil-dekan	x		x		x		x	x	x
6-Etil-undekan			x		x		x		
5-Etil-undekan	x		x		x	x	x	x	x
3,6-Dimetil-undekan			x		x		x		
7-Metil-dodekan			x		x		x		
2,5-Dimetil-dodekan			x		x		x		
2,5-Dimetil-dodekan			x		x		x		
2,6,10-Trimetil-dodekan	x				x		x	x	x
2-Metil-6-propil-dodekan			x		x		x		
2-Metil-8-propil-dodekan	x	x			x		x		
4,9-Dipropil-dodekan	x	x	x		x		x	x	x
2-Metil-tridekan	x		x		x		x	x	
7-Metil-tridekan	x		x		x		x	x	x
2-Metil-6-propil-tridekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3-Metil-tetradekan	x	x			x	x	x	x	x
2,6,10-Trimetil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,15-Tetrametil-heptadekan	x	x	x	x	x	x	x		
5-Metil-oktadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3-Metil-nonadekan			x	x	x		x	x	x
10-Metil-eikosan	x				x		x	x	x
3-Metilheneikosan		x	x	x	x	x	x		x
11-Decil-dokosan	x		x		x	x	x	x	x
Pentil-cikloheksan					x		x		
(4-metilpentil)-Cikloheksan			x		x		x		
(1-metiletil)-Cikloheksan			x		x		x		
Decyl-Cikloheksan	x				x		x	x	x
Decil-Cikloheksan	x	x			x		x		x
1,2,4,5-Tetraetil-cikloheksan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-(2-Metilpropil)-1,1'-bicykloheksil..	x				x		x	x	x
(1-Pentilheptil)- benzen	x		x		x	x	x	x	x
(1-Butiloktil)-benzen	x				x		x		x
2,6-Dimetil- nafthalen			x		x		x	x	
1,3-Dimetil- nafthalen			x		x	x	x	x	x
1,5-Dimetil- nafthalen	x	x	x		x		x	x	x
Holestan			x		x		x	x	x
8.beta(H)-Homodriman	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(17,alfa,H,21,beta,H)-Hopan	x	x	x	x	x	x	x	x	x

U probama koje su sadržale zemljište kontaminirano sirovom naftom detektovan je izuzetno veliki broj jedinjenja, što je u skladu sa činjenicom da je sirova nafta kompleksna smeša velikog broja različitih ugljovodonika (Vitorović, 1987). Takođe, s obzirom da su probe SN sadržale sveže kontaminirano zemljište većina jedinjenja koja su bila prisutna u sirovoj nafti su detektovana u zemljištu na početku eksperimenta. Broj detektovanih jedinjenja na početku eksperimenta se smanjuje sa smanjenjem sadržaja ugljovodonika, zbog toga što je koncentracija pojedinih ugljovodonika suviše niska da bi se mogli detektovati ovom metodom. U najvećoj količini od n-alkana prisutni su C₁₅-C₂₅ alkani, što je zaključeno na osnovu probe SN5 gde je inicijalna koncentracija ugljovodonika bila najniža, a ova grupa ugljovodonika se još uvek mogla da se detektovati.

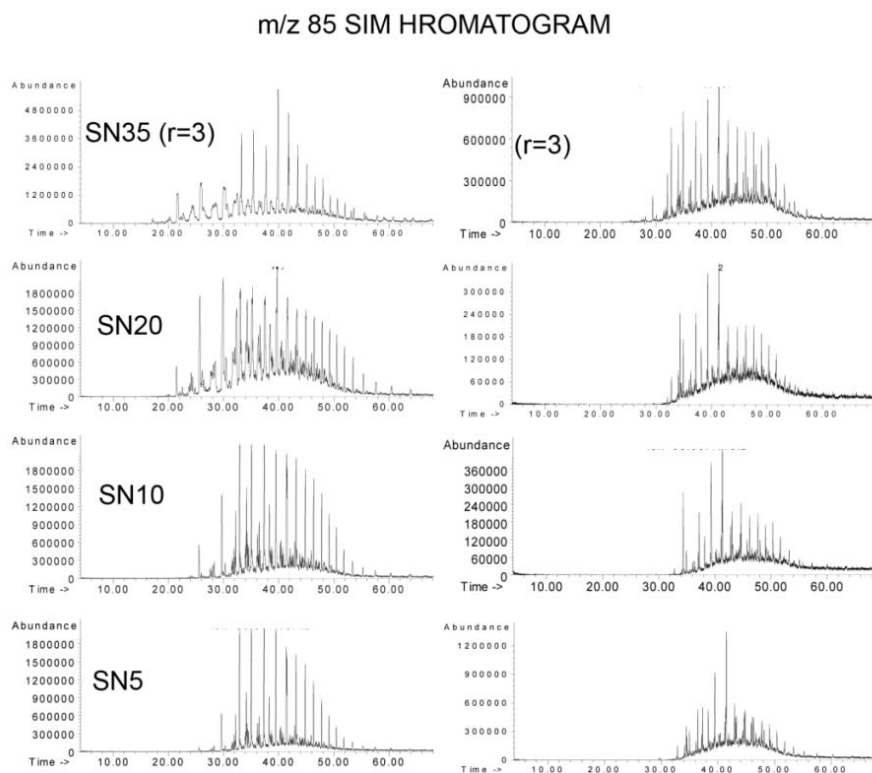
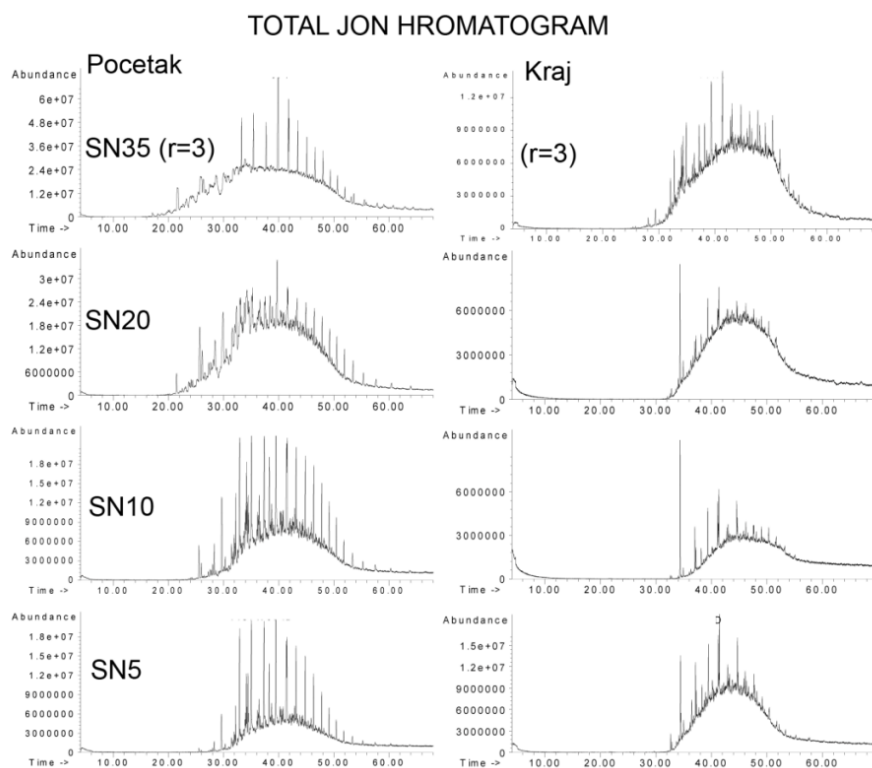
Generalno, detektovani su n-alkani od C₁₀-C₃₃, dok viši alkani s obzirom na njihove visoke temperature ključanja nisu mogli biti detektovani ovom metodom. Na kraju eksperimenta u probama SN5 i SN10 nisu se mogli detektovati ugljovodonici ≤C₁₄, dok se u probi SN20 još uvek mogao detektovati tetradekan, a u probi SN35 čak i tridekan, što može biti posledica njihove različite inicijalne koncentracije, ali takođe i sporije biodegradacije u probi SN35 usled veće koncentracije rastvornih ugljovodonika koji mogu izazvati toksično dejstvo.

U uzorcima je detektovan i veliki broj račvastih alkana na početku eksperimenta, pri čemu su račvasti derivati dekana, undekana, dodekana i tridekana potpuno razgrađeni u probama SN5, SN10 i SN20, dok je većina ovih jedinjenja još uvek mogla biti detektovana u probi SN35, što je u korelaciji sa razgrađenom količinom ugljovodonika i produkovanom količinom CO₂ izmerenim u ovim probama. Iste zaključke možemo izvesti i posmatranjem aromatičnih jedinjenja, od kojih su u najvećem broju detektovani derivati naftalena. Od cikličnih jedinjenja detektovano je svega 7 jedinjenja i to uglavnom derivata cikloheksana, od kojih većina nije mogla biti detektovana na kraju eksperimenta. Od jedinjenja terpena detektovani su 8.β(H)-Homodriman (17,α(H),21,β(H)-Hopan, koji su s obzirom na svoju perzistentnost detektovani i na kraju eksperimenta. Dodatno, na kraju eksperimenta detektovano je i nekoliko nezasićenih n-alkana produkata metabolizma mikroorganizama (eikosen, pentadeken, heksadeken).

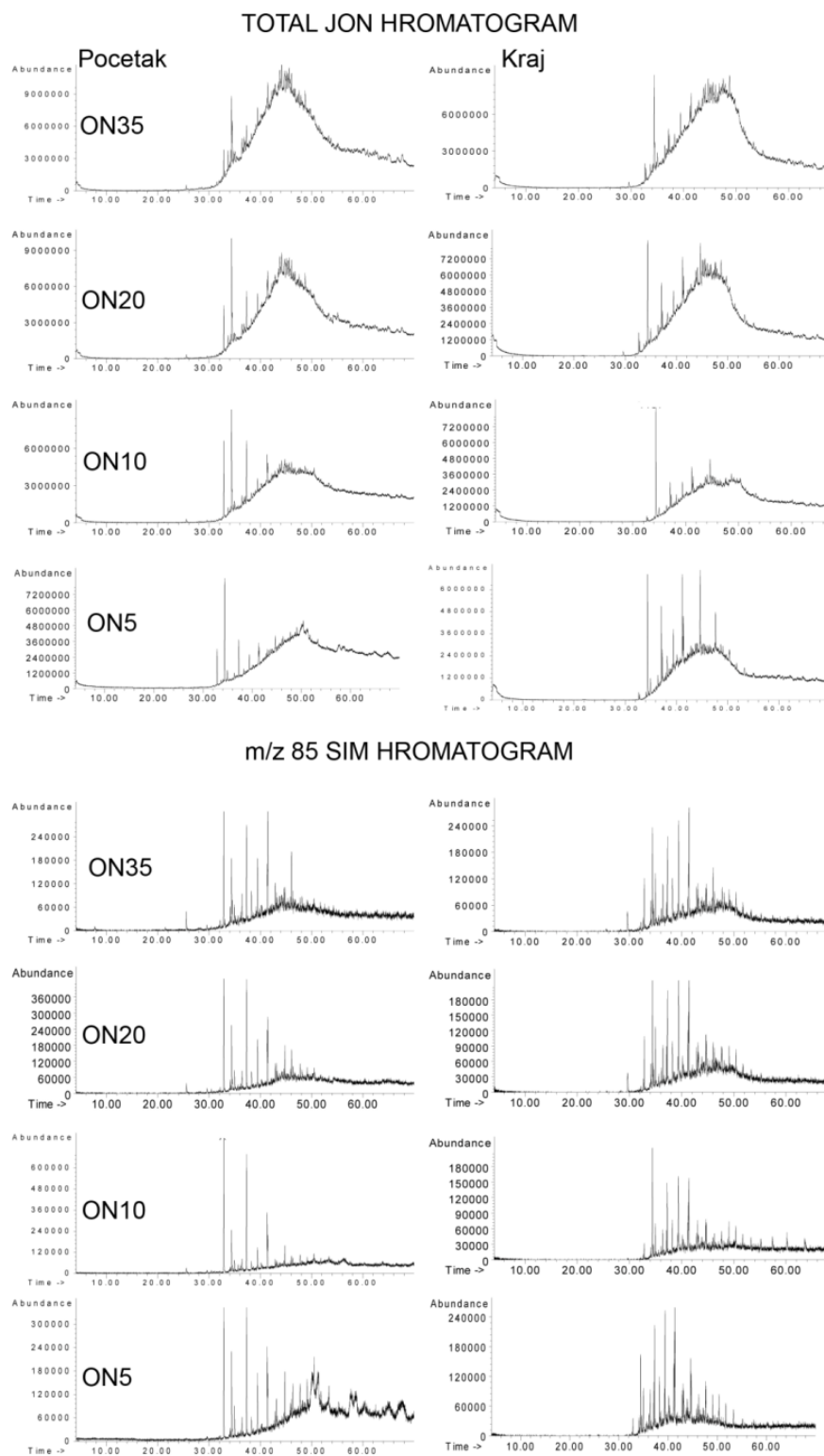
U probama koje su sadržale zemljište sa starim naftnim zagađenjem na početku eksperimenta detektovani su n-alkana ravnog niza (C₁₅-C₃₀), kao i veliki broj račvastih ugljovodonika od kojih su u najvećoj meri prisutni (najintenzivniji pikovi u hromatogramu, slika 4.40.) nor-pristan (2,6,10-Trimetil-pentadekan), pristan (2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan) i fitan (2,6,10,14-Tetrametil-heksadekan). Većina ovih jedinjenja prisutna detektovana je i na kraju eksperimenta. Nisu uočene bitne razlike u detektovanim jedinjenjima na početku i kraju eksperimenta, osim pojave tri nezasićena jedinjenja (eikosen, pentadeken, heksadeken) produkata metabolizma bakterija. Ovo je skladu sa rezultatima dobijenim u poslednjoj godini ispitivanja bioremedijacije biogomilama i površinskom obradom, gde takođe u tom periodu nisu zabeležene značajne promene. Dodatno, poredeći sa rezultatima dobijenim u SN probama, znatno manji broj jedinjenja je detektovan što je posledica procesa starenja koji se u ovom zemljištu odvijao proteklih 10 godina. Dodatno, veličina „brda“ u hromatogramu, koja predstavlja GC nerazdvojivu kompleksnu smešu ugljovodonika, u odnosu na SN probe je znatno veća, što takođe ukazuje na procese starenja i biodegradacije nafte u zemljištu (Wang et al., 1994). Jedinjenja sterana (derivati holestana i androstana) i terpena (nor-hopan i hopan) su konstantno detektovana u svim uzorcima tretiranog i netretiranog zemljišta.



Slika 4.38. Total jon hromatogrami i m/z 85 SIM hromatogrami na početku i kraju eksperimenta u DO probama



Slika 4.39. Total jon hromatogrami i m/z 85 SIM jon hromatogrami na početku i kraju eksperimenta u SN probama



Slika 4.40. Total jon hromatogrami i m/z 85 SIM jon hromatogrami na početku i kraju eksperimenta u ON probama

Tabela 4.41. Detektovana jedinjenja u zemljištu sa starim naftnim zagađenjem

Detektovana jedinjenja	ON5		ON10		ON20		ON35		ON35ko
	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	0 d	48 d	48 d
1-Hloro-dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dodekan					x			x	x
Pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Hexadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heptadekan		x		x		x		x	x
Oktadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nonadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heneikosan	x	x	x		x	x	x	x	x
Dokosan	x	x	x		x		x	x	x
Trikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tetrakosan	x		x		x		x		
Pentakosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Heksacosan	x	x	x		x		x		
Nanokosan	x		x		x		x		
Triakontan	x		x	x	x		x		
7-Hexadeken, (Z)-		x		x		x		x	x
5-Oktadeken, (E)-				x		x		x	x
5-Eikosen, (E)-		x		x	x	x	x	x	x
5-butyl-Nonan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,3,5-trimetil-Dekani		x			x	x	x	x	x
2,6,11-trimetil-Dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-metil-6-propil-Dodekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10-trimetil-Pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-tetrametil-Pentadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2,6,10,14-tetrametil-Heksadekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3-metil-Heptadekan		x						x	x
2,6,10,15-tetrametil-Heptadekan		x			x	x		x	x
2,6-dimetil-Oktadekan		x		x					
2,6,10,14,18-pentametil-Eikosan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ciklotetradekan								x	x
Ciklotetradekan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3,4-bis(1-metiletenil)-Cikloheksan,					x	x	x	x	x
2,6-Naftalenedione, oktahidro-1,1,8	x	x	x		x	x		x	x
9-butyl-Antracen	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(1-pentilheptil)- Benzen	x	x		x		x		x	x
(1-butiloktil)-Benzen		x				x			
2H-Inden-2-one, 1-bromooktahidro-		x				x	x	x	x
D-Dihomoandrostan, (5,alfa,-)		x				x			
Pregnan, (5,beta,-)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(17,alfa,H,21,beta,H)-Hopani	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29-Nor-(17,alfa,H,21,beta,H)-hopani	x	x	x	x	x	x	x	x	x

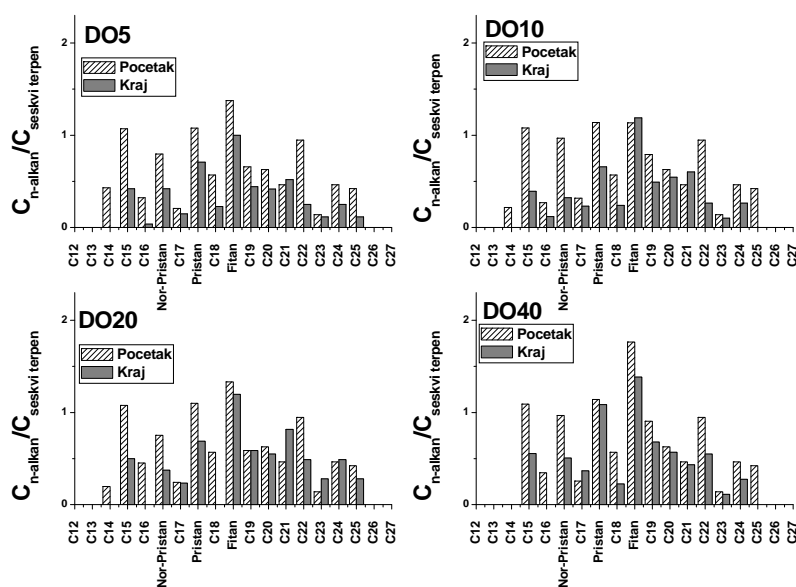
Procena biodegradacije pojedinih grupa jedinjenja u odnosu na biomarker jedinjenja terpena

Hopani su molekularni fosili bakterijskih hopanoida, to su policiklična zasićena jedinjenja (pentaciklični terpeni) veoma su slični steroidima i mogu se naći u skoro svim tipovima sirove nafte. Hopani su veoma rezistentni na biodegradaciju, i zbog ove osobine predstavljaju izuzetna biomarker jedinjenja naspram kojih se sva druga biodegradabilna jedinjenja mogu normalizovati (Prince et al., 1994; Wang et al., 1994; Venosa et al., 1997; Gagni et al., 2007). Pored hopana, u poslednje vreme se kao biomarker jedinjenja sve više primenjuju jedinjenja seskviterpena. Seskviterpeni su polimetilovani supstituisani dekalini ili dekahidronaftaleni (C₁₄ - C₁₆ biciklični alkani), prvi put su otkriveni 1974. godine. Alexander et al., (1983) je identifikovao 8β(H)-driman i 4β(H)-eudesman u većini Australijskih ulja. Seskviterpeni koji imaju skelet drimana su najčešće prisutni u nafti. Uvođenje ovih tzv. novih biomarker

jedinjenja je posledica toga da se kod lakših frakcija nafte kao što su mlazno gorivo i dizel tokom procesa rafinacije uklanja većina visoko molekularnih biomarker jedinjenja (hopana). Zbog toga su pentaciklični terpeni i sterani u ovim frakcijama nafte prisutni u veoma malim količinama, dok se seskviterpeni koncentruju u ovim frakcijama (Wang et al., 2005).

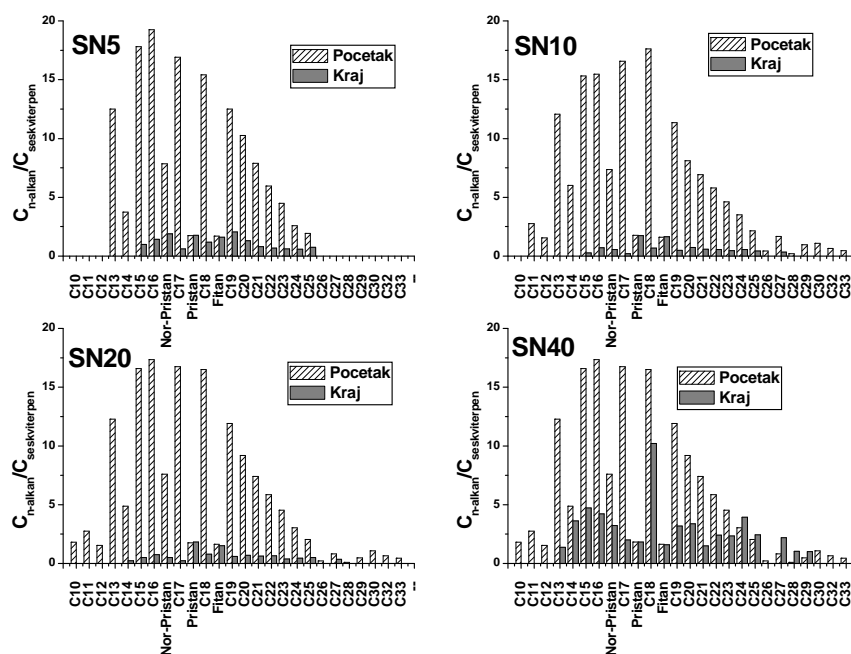
Procena biodegradacionih procesa za probe koje su sadržale zemljište kontaminirano dizel uljem i sirovom naftom određena je merenjem relativne promene sadržaja pojedinih n-alkana, dobijene merenjem promene odnosa površine pikova alkana i 8.beta(H)-Homodrimana (seskviterpena), dok je za probe koje su sadržale zemljišta sa starim naftnim zagađenjem relativna promena sadržaja n-alkana dobijena u odnosu na (17.alfa.H,21.beta.H)-hopan (slike 4.41, 4.41. i 4.43.).

U probama koje su sadržale zemljište zagađeno dizel uljem detektovani su ugljovodnici od C₁₄-C₂₅, dok su ostali n-alkani uklonjeni tokom procesa rafinacije i proizvodnje dizel ulja. Generalno, n-alkani C₁₄-C₁₈ su redukovani za 50%, dok su promene C₁₉-C₂₅ bile zanemarljive u svim probama. Dobijene promene na prvi pogled nisu u skladu sa dobijenim promenama sadržaja ukupnih ugljovodnika i mineralnih ulja i produkovanom količinom CO₂ u ovim probama. Dodatno, poređenjem sa promenama dobijenim za probe koje su sadržale zemljište zagađeno sirovom naftom gde je uklonjeno više od 90% inicijalno prisutnih n-alkana (slika 4.41.) nameće se mišljenje da ugljovodnici prisutni u DO probama su manje biodegradabilni, što je u suprotnosti sa literaturnim podacima. Naime, dizel ulje se sastoji od grupe ugljovodnika sa bliskim tačkama ključanja koji pri primenjenom temperaturnom programu GC-MS kvalitativne analize ne mogu da se razdvoje već u hromatogramu izlaze u obliku „brda“ GC-nerazdvojivih ugljovodnika čak i u SIM m/z 85 hromatogramu (slika 4.38.), što onemogućava adekvatnu semikvantitativnu analizu. Dodatno, „brdo“ GC-nerazdvojivih ugljovodnika u SIM m/z 85 hromatogramu je manje, što je posledica razgradnje biodegradabilnih ugljovodnika bliskih tačaka ključanja.



Slika 4.41. Relativna promena sadržaja n-alkana i izoalkana u DO probama na početku i kraju eksperimenta

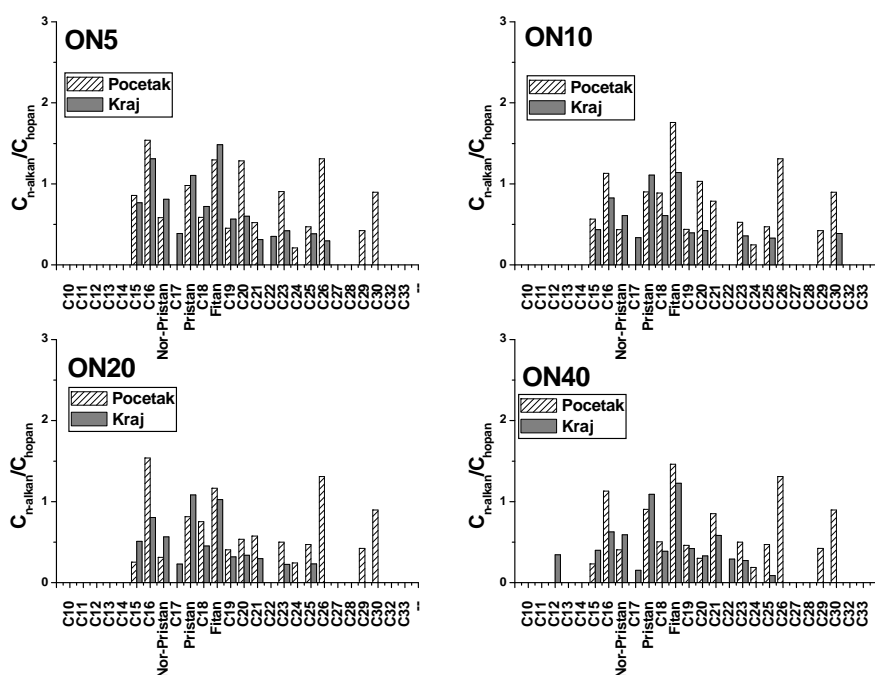
U probama koje su sadržale zemljište kontaminirano sirovom naftom relativni sadržaj n-alkana je značajno manji na kraju eksperimenta (slika 4.42.). n-Alkani C_{13} - C_{23} dominantno prisutni na početku eksperimenta u svim probama. n-Alkani C_{10} - C_{14} su u potpunosti uklonjeni u probama SN5 i SN10, dok je u probi SN20 preostala veoma mala količina C_{14} . Takođe, n-alkani C_{28} - C_{30} su degradirani u potpunosti, do kraja eksperimena u probama SN10 i SN20, što je posledica njihovog niskog sadržaja na početku eksperimenta, tako da relativno male promene u njihovom sadržaju dovode do njihovog potpunog uklanjanja iz zemljišta. Dodatno, n-alkani C_{15} - C_{25} su degradirani za oko 90% u probama SN5, SN10 i SN20 kraju eksperimenta. Promene relativnog sadržaja n-alkana u probi SN35 pokazuju drugačiji trend u odnosu na prve tri probe. U SN35 probi n-alkani C_{13} - C_{30} detektovani su i na kraju eksperimenta, pri čemu je njihov relativni sadržaj bio u proseku tri puta veći od relativnog sadržaja n-alkana u probama SN5, SN10 i SN20. Ovo je najverovatnije posledica toksičnog dejstva rastvornih ugljovodonika kojih u SN35 probi, s obzirom na ukupan sadržaj ugljovodonika ima najviše, na prisutnu mikrofloru, a samim tim i na procese biodegradacije i biotransformacije. Dobijene promene su u skladu sa odnosom količina produkovanog CO_2 u probama SN20, SN10 i SN5 koji je bio 1:2:4.



Slika 4.42. Relativna distribucija sadržaja n-alkana i izoalkana ($C_{alkana}/C_{seskviterpen}$) u SN probama na početku i kraju eksperimenta

Sadržaj račvastih ugljovodonika pristana i fitana se ne menja na kraju eksperimenta, dok se nor-pristan takođe razgrađuje u istoj količini kao i n-alkani. Naime, kao što je već rečeno fitan i pristan su zbog svoje visoko račvaste strukture manje podložni biodegradaciji, i dok u uzorku još uvek ima biodostupnih i lako biodegradabilnih n-alkana ova jedinjenja se praktično i ne razgrađuju.

U skladu sa zabeleženim promenama sadržaja mineralnih ulja i produkovanom količinom CO₂, promene u relativnom sadržaju n-alkana u zemljištu sa starim naftnim zagađenjem su minimalne (slika 4.43.). Na početku eksperimenta, pored jedinjenja pristana i fitana koja su prisutna u najvećoj količini, prisutna su i jedinjenja n-alkana C₁₅-C₃₀. Preostala količina biodegradabilnih jedinjenja se degradira do kraja eksperimenta, pri čemu treba zapaziti da relativni sadržaj n-alkana C₁₅-C₂₀ skoro i ne menja, što ukazuje na mogućnost da je ovaj deo n-alkana verovatno čvrsto sorbovan u porama mineralne frakcije zemljišta ili kompleksiran i organskoj materiji zemljišta i iz tih razloga nije biodostupan. U suprotnom ova jedinjenja bi verovatno bila u potpunosti razgrađena verovatno još u toku procesa spontane degradacije koja se odvijala u ovom zemljištu pre postavke eksperimenta. Jedinjenja alkana C₂₅-C₃₀ se na kraju eksperimenta skoro u potpunosti degradiraju.

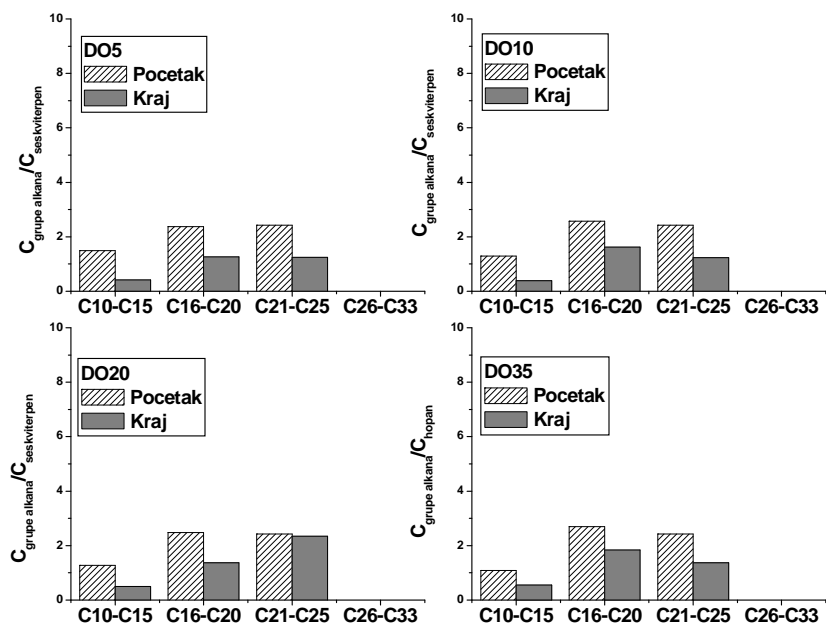


Slika 4.43. Relativna distribucija sadržaja n-alkana i izoalkana (C_{alkana}/C_{hopan}) u ON probama na početku i kraju eksperimenta

U skladu sa zaključcima dobijenim za relativnu promenu pojedinačnih n-alkana, relativni sadržaj određenih grupa n-alkana (C₁₂-C₁₅, C₁₆-C₂₀, C₂₁-C₂₅ i C₂₆-C₃₃) na kraju eksperimenta se smanjuje za oko 50% u svim ispitivanim DO probama (slika 4.44.). Kao što je to već rečeno ovo najverovatnije nije apsolutna količina razgrađenih n-alkana s obzirom na nemogućnost adekvatne semikvantitativne analize zbog njihovog slabo razdvajanje tokom GC-MS analize.

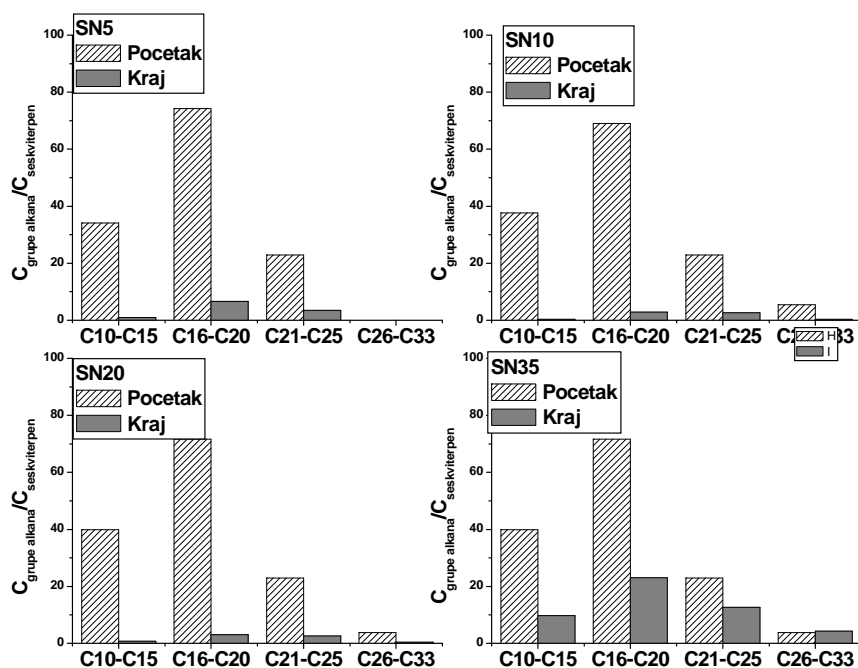
Relativni sadržaj svih posmatranih grupa n-alkana u probama SN10 i SN20 opada skoro na nulu na kraju eksperimenta kao posledica njihove biodegradacije, a preostala mala količina ovih ugljovodonika je verovatno nevidljiva za mikroorganizme (slika 4.45.). Treba zapaziti da je relativni sadržaj C₁₂-C₂₅ u probi SN5 nešto veći u odnosu na probe SN10 i SN20, što je posledica niske inicijalne

koncentracije ugljovodonika u ovom tretmanu koja je najverovatnije bila nevidljiva za mikroorganizme, što je u skladu sa respirometrijskim merenjima za ovu probu koja su bila na nivou kontrolne probe. U probi SN35 u najvećoj količini su se razgradili ugljovodonici C_{12} - C_{20} , što je posledica njihove veće biodegradabilnosti u odnosu na n-alkane dužeg niza. Međutim, generalno gledano relativni sadržaj svih posmatranih grupa ugljovodonika u SN35 probi je na kraju eksperimenta veći u odnosu na ostale probe, indikujući da se biodegradacija u ovoj probi odigravala na znatno manjem nivou, što je kako je to već rečeno posledica toksičnog dejstva rastvornih ugljovodonika kojih u SN35 probi ima najviše.

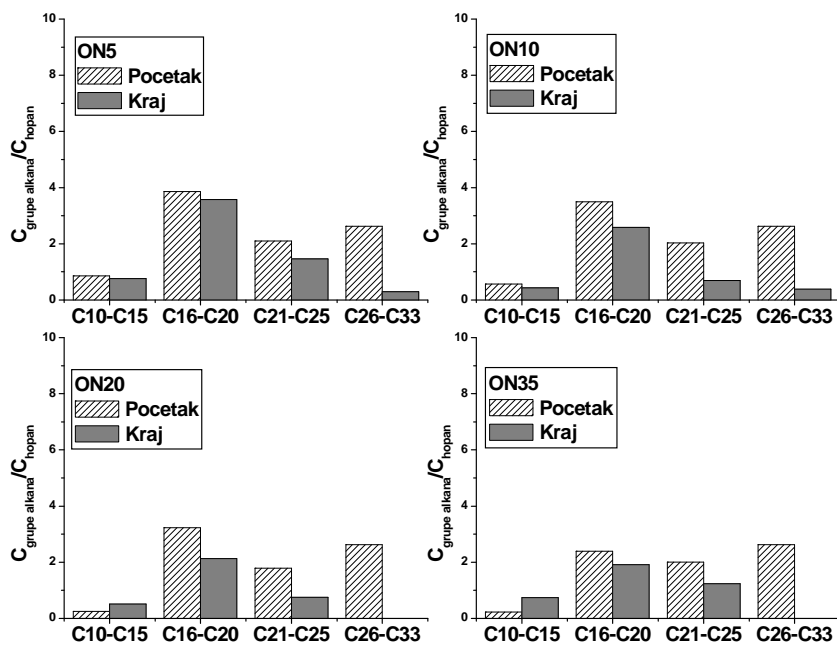


Slika 4.44. Relativna promena sadržaja grupa n-alkana (C_{12} - C_{15} , C_{16} - C_{20} , C_{21} - C_{25} i C_{26} - C_{33}) u zemljištu na početku i kraju eksperimenta u DO probama

Relativni sadržaj posmatranih grupa n-alkana u ON probama opada sledećim redosledom C_{26} - $C_{33} > C_{21}$ - $C_{25} > C_{16}$ - $C_{20} > C_{12}$ - C_{15} (slika 4.46.). Ovo može biti posledica, toga da su niži biodegradabilniji ugljovodonici najvećim delom uklonjeni u toku procesa starenja i tretmana površinskom obradom ovog zemljišta, a da preostala frakcija ovih ugljovodonika nije biodostupna kao posledica njihove inkorporacije u pore mineralne frakcije zemljišta kao i kompleksiranja sa zemljišnom organskom materijom. Kao posledica ovoga, degradira se preostala količina biodostupnih viših ugljovodonika (slika 4.46.). Nisu uočene razlike u promeni relativnog sadržaja grupa ugljovodonika između tretmana, odakle sledi da koncentracija zagađenja u slučaju zemljišta starim naftnim zagađenjem i njenim derivatima nije imala primetan efekat na procese biodegradacije. Ovo dovodi do zaključka da slaba biodegradabilnost ovog zemljišta nije posledica toksičnosti visokih koncentracija ugljovodonika ili nagomilavanja toksičnih produkata tokom procesa starenja naftnog zagađenja u zemljištu.



Slika 4.45. Relativna promena sadržaja grupa n-alkana ($C_{12}-C_{15}$, $C_{16}-C_{20}$, $C_{21}-C_{25}$ i $C_{26}-C_{33}$) u zemljištu na početku i kraju eksperimenta u SN probama



Slika 4.46. Relativna promena sadržaja grupa n-alkana ($C_{12}-C_{15}$, $C_{16}-C_{20}$, $C_{21}-C_{25}$ i $C_{26}-C_{33}$) u zemljištu na početku i kraju eksperimenta u ON probama

Istraživanje biodegradabilnosti ugljovodonika i njihova sudbina u životnoj sredini u mnogome zavisi od strukture, koncentracije i procesa starenja zagađujućih materija. Naime, u slučaju dizel ulja koje u svojoj stukturi sadrži uglavnom ugljovodonike srednje dužine (C₁₅-C₂₅) koji su lako biodegradabilni, ali zbog svoje dobre rastvorljivosti i izuzetno toksični, pokazano je da je već pri koncentracijama od 20 mg/g uočen toksičan efekat koji je prevaziđen nakon dve nedelje kao posledica smanjenja prekomerne koncentracije rastvorenih ugljovodonika biotičkim i abiotičkim putem i adaptacije prisutne mikroflore. U slučaju većih koncentracija ovaj efekat je bio još izraženiji. U slučaju zemljišta kontaminiranog sirovom naftom isti efekat se javlja tek pri koncentraciji od 35 mg/g, kao posledica toga da sirova nafta sadrži manju količinu lako rastvornih ugljovodonika. Za razliku od sveže kontaminiranog zemljišta, na zemljište kontaminirano starim naftnim zagađenjem koncentracija nije imala uticaj, u ovakvom zemljištu biodegradacija je bila na veoma niskom nivou, ali ne kao posledica toksičnosti već kao posledica sekvestracije hidrofobnih organskih kontaminanata u zemljištu.

5. ZAKLJUČAK

Nafta i naftni derivati mogu da izazovu ekološke katastrofe usled akcidentnih izlivanja, havarija na postrojenjima za crpljenje, transport i preradu nafte. Zbog potencijalne opasnosti koju naftni ugljovodonici predstavljaju za čoveka i životnu sredinu, javila se potreba za ispitivanjem i karakterizacijom procesa biodegradacije i biotransformacije u zemljištu zagađenom ugljovodonicima, kao i za razvojem bioremedijacionih tehnika za prečišćavanje ovakvog zemljišta do nivoa koji obezbeđuje njegovo bezbedno odlaganje ili ponovno korišćenje.

U okviru ovog istraživanja ispitani su: (1) Proces koji se odvija prilikom bioremedijacije zemljišta zagađenog naftom i derivatima nafte, koje je bilo izloženo spontanim abiotičkim i biotičkim procesima degradacije u toku 8 godina, tehnikama biogomila i površinske obrade na poluindustrijskoj (pilot) skali uz optimizaciju tehnoloških parametara sa ciljem povećanja efikasnosti i efektivnosti biodegradacije ugljovodonika; (2) Uticaj koncentracije, biodostupnosti, strukture i starenja zagađujućih materija na procese biodegradacije i biotransformacije u kontrolisanim laboratorijskim uslovima.

Za ispitivanje bioremedijacionih procesa u toku *ex-situ* tretmana korišćeno je zemljište zagađeno visokim i potencijalno toksičnim koncentracijama nafte i njenih derivata (38,4 g/kg ukupnih ugljovodonika i 25,4 g/kg mineralnih ulja). BPK₅/HPK odnos ovog zemljišta bio je oko 0,04 ukazujući na malu biorazgradivost prisutnog organskog supstrata, što je posledica dugog vremena kontakta između kontaminanta i zemljišta, tokom koga je došlo do sorpcije i difuzije velikog dela organskih zagađujućih materija u čvrstu frakciju zemljišta, uglavnom mineralnu i organsku frakciju. Dodatno, visok sadržaj ugljovodonika u zemljištu može da oteža transport kiseonika i vlage kroz zemljište zbog formiranja tankog filma ulja na česticama zemljišta. U cilju sprečavanja usporavanja procesa kao posledice nedovoljne količine kiseonika i vlage ispitivano zemljište je kompostirano sa slamom.

Tokom dve godine bioremedijacionog tretmana sadržaj mineralnih ulja opao je za 52% (od 27,8 g/kg do 13,2 g/kg) i 53% (od 23,2 g/kg do 10,8 g/kg), dok je sadržaj ukupnih ugljovodonika opao za 43% (od 41,4 g/kg do 23,4 g/kg) i 27% (od 35,3 g/kg do 25,8 g/kg) u biogomili i površinskoj obradi respektivno. Brža razgradnja mineralnih ulja u poređenju sa ukupnim ugljovodonicima je najverovatnije posledica značajnog doprinosa slabo degradabilnih organskih materija (humus, lignin, asfaltne komponente i dr.) na brzinu degradacije ukupnih ugljovodonika. Efikasnost uklanjanja mineralnih ulja iz zemljišta u dva posmatrana bioremedijaciona tretmana je praktično ista. Međutim, u pogledu sadržaja ukupnih ugljovodonika u biogomili uklonjeno je dva puta više ukupnih ugljovodonika (gledajući apsolutnu količinu ukupno uklonjenih ugljovodonika). Manja efikasnost uklanjanja ukupnih ugljovodonika površinskom obradom zemljišta najverovatnije je posledica toga da se u ovom tretmanu mineralna ulja u manjoj meri razgrađuju do ugljen-dioksida i vode, a u većoj meri transformišu u perzistentna polarna organska jedinjenja u odnosu na biogomilu.

Kinetika biodegradacije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika u toku tretmana u biogomili u saglasnosti je sa kinetičkim modelima $\ln C = \ln C_0 - kt$ i

$\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$. Izmerene promene koncentracije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika su u dobroj korelaciji sa oba kinetička modela ($r=0,82-0,97$). Konstante brzine degradacije kretale su se u opsegu od $5,15-9,50 \times 10^{-4} \text{ dan}^{-1}$ za kinetički model $\ln C = \ln C_0 - kt$ i $1,58-2,89 \times 10^{-2} \text{ dan}^{-0.5}$ za kinetički model $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$. Kinetika biodegradacije mineralnih ulja u toku površinske obrade relativno se dobro može opisati sa dva pomenuta kinetička modela ($r=0,8$), međutim, znatno bolju korelaciju pokazao je linearni model ($C = C_0 - kt$) primenjen na prvih 92 i poslednjih 200 dana eksperimenta ($r=0,97-0,99$). Konstante brzine degradacije za ovaj linearni kinetički model su bile u opsegu $3,64-6,52 \times 10^{-2} \text{ dan}^{-1}$. Promena sadržaja ukupnih ugljovodonika u toku površinske obrade zagađenog zemljišta relativno je u dobroj korelaciji ($r=0,70$) samo sa kinetičkim modelom $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$, a konstanta brzine degradacije za ovaj model je iznosila $0,82 \times 10^{-2} \text{ dan}^{-0.5}$.

Prosečan sadržaj PAH u tretiranom zemljištu bio je oko 6 mg/kg što je manje od 1% ukupnog organskog zagađenja u zemljištu, međutim zbog svog izuzetno toksičnog i kancerogenog dejstva, ispitani su biodegradacioni procesi ovih jedinjenja. Oko 70% ukupnih PAH ukolonjeno je u toku prve godine primenom obe bioremedijacione tehnike. Dodatno, kinetika biodegradacije je u korelaciji ($r=0,82-0,98$) sa kinetičkim modelima $\ln C = \ln C_0 - kt$ i $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$ za obe tehnike, za sve grupe PAH, osim za PAH sa 3 prstena u tretmanu površinskom obradom, gde je bolja korelacija dobijena primenom linearnog modela ($r=0,92$) što je posledica boljeg transporta kiseonika u ovom tretmanu a samim tim i brže degradacije PAH sa jednostavnijom strukturom.

GC-MS kvalitativna i semikvantitativna analiza dala je slične rezultate za obe tehnike. GC-MS kvalitativna analiza pokazala je da su u zemljištu prisutni n-alkani $C_{12}-C_{33}$, različiti račvasti alkani od kojih su najprisutnija jedinjenja nor-pristana, pristana i fitana, takođe su detektovana jedinjenja hopana koja su korišćena kao biomarker jedinjenja i interni standardi za semikvantitativnu analizu. Analizom distribucije relativnog sadržaja pojedinačnih n-alkana izoalkana na početku i kraju tretmana pokazano je da se relativni sadržaj n-alkana smanjuje u značajno većoj meri od izoalkana. Analizom relativne promene sadržaja grupa n-alkana ($C_{12}-C_{15}$, $C_{16}-C_{20}$, $C_{21}-C_{25}$ i $C_{26}-C_{33}$) pokazano je da se sve grupe n-alkana uklanjaju u tokom prve godine tretmana nakon čega njihov sadržaj ostaje konstantan do kraja eksperimenta. Preostala količina n-alkana u zemljištu je ili (1) suviše niska i stoga nevidljiva za mikroorganizme, ili (2) je čvrsto sorbovana i sekvestrovana u porama zemljišta, i iz tih razloga nebidostupna i perzistentna.

Mikrobiološke analize potvrdile su da je bakterijska populacija tokom *ex-situ* tretmana bila uključena u procese biodegradacije organskih kontaminanata:

- u zemljištu je detektovana visoka brojnost ispitivanih grupa bakterija, u desetinama i stotinama miliona u gramu zemljišta (10^8-10^9 CFU/g). Dominantna mikroflora u zemljištu je grupa fakultativnih oligotrofa, što indikuje postojanje zadovoljavajućeg procesa samoprečišćavanja zemljišta;
- tokom procesa broj lipolitskih i ugljovodonik oksidujućih bakterija je značajno porastao;
- u toku eksperimenta dehidrogenazna aktivnost generalno raste, indikujući da u toku procesa nije došlo do inhibicije mikrobioloških procesa kao posledica toksičnog delovanja velikih koncentracija organskog supstrata u zemljištu.

Generalno, gledano rezidualna koncentracija ukupnih ugljovodonika u zemljištu nakon bioremedijacije tehnikama biogomile i površinske obrade je slična (uzimajući u obzir standardnu devijaciju od 10%), i visoka. Postavlja se pitanje da li

je usporavanje procesa biodegradacije nakon godinu dana eksperimenta posledica toksičnog delovanja visokih koncentracija ugljovodonika ili nastanka toksičnih nusprodukata metabolizma bakterija. U tu svrhu dodatna ispitivanja biodostupnosti zagađujućih materija kao i uticaja tipa, koncentracije i starenja zagađujućih materija na procese biodegradacije su sprovedena.

Respirometrijska merenja mineralizacije ugljovodonika u toku laboratorijskog ispitivanja pokazala su:

- da je u slučaju zemljišta sveže kontaminiranog dizel uljem, koje u svojoj stukturi sadrži uglavnom biodegradabilne ugljovodonike srednje dužine (C₁₅-C₂₅) koji su zbog svoje dobre rastvorljivosti i izuzetno toksični, već pri koncentracijama od 2% uočen toksičan efekat koji je prevaziđen nakon dve nedelje tretmana kao posledica smanjenja prekomerne koncentracije rastvorenih ugljovodonika biotičkim i abiotičkim putem i adaptacije prisutne mikroflore;
- kod zemljišta kontaminiranog sirovom naftom toksičan efekat se javlja tek pri koncentraciji od 3,5%, kao posledica toga da sirova nafta sadrži manju količinu lako rastvornih ugljovodonika;
- da na biodegradaciju starog naftnog zagađanja u zemljištu koncentracija ugljovodonika nije imala uticaj, u ovakvom zemljištu respiracija je bila na veoma niskom nivou pri svim ispitivanim koncentracijama;

Merenjem sadržaja ugljovodonika u zemljištima tokom posmatranih 48 dana laboratorijskog eksperimenta pokazano je da:

- u probama koje su sadržale zemljište sveže kontaminirano sa 0,5-1% dizel ulja i 0,5-2% sirove nafte sadržaj ugljovodonika opao za 70-87%;
- u probama koje su sadržale zemljište sveže kontaminirano sa 2% dizel ulja i 3,5% sirove nafte sadržaj ugljovodonika opao za 53-63%;
- u probama koje su sadržale zemljište sveže kontaminirano sa 3,5% dizel ulja i 0,5-3,5% starog naftnog zagađanja sadržaj ugljovodonika opao za 9-39%;
- promene sadržaja ugljovodonika u posmatranim zemljištima u skladu sa produkovanim količinama CO₂ osim za probe koje su sadržale zemljište kontaminirano sa 3,5% dizel ulja, čime je pokazano da u ovim probama smanjenje koncentracije ugljovodonika nije samo posledica biotičkih procesa, već se u ovim probama u značajnijoj meri odvijaju i abiotički procesi;
- koncentracija mineralnih ulja u zemljištu sa starim naftnim zagađenjem nakon 48 dana laboratorijskog eksperimenta (9,05 g/kg) je bila bliska koncentraciji dobijenoj na površinskoj obradi (10,8 g/kg), dok je koncentracija ukupnih ugljovodonika na kraju laboratorijskog eksperimenta (32 g/kg) bila nešto veća od one dobijene površinskom obradom (26 g/kg).

Rezultati merenja degidrogenazne aktivnosti zemljišta potvrdili su rezultate respirometrijskih merenja, gde je promena dehidrogenazne aktivnosti uglavnom pratila promenu dnevne produkcije CO₂. Međutim, najviše izmerene vrednosti dehidrogenazne aktivnosti imalo je originalno zemljište sa starim naftnim zagađenjem (sa površinske obrade) što nije u skladu sa količinom izdvojenog CO₂ kao ni sa količinom degardiranih ugljovodonika i posledica je prisustva autohtone mikroflore koja se u ovim probama razvila tokom desetogodišnjeg perioda izloženosti ovog zemljišta različitim uslovima. Ova merenja takođe podržavaju pretpostavku da nije došlo do inhibicije mikrobioloških procesa kao posledica toksičnog delovanja velikih koncentracija organskog supstrata u zemljištu.

Semikvantitativna analiza zemljišta u toku laboratorijskog eksperimenta pokazala je da:

- kod zemljišta zagađenog sirovom naftom relativni sadržaj pojedinačnih n-alkana nakon 48 dana eksperimenta bio za više od 10 puta manji za sve probe, osim u slučaju probe sa 3,5% sirove nafte;
- sadržaj pristana i fitana se ne menja u toku posmatranog perioda kao posledica njihove manje biodegradabilnosti u odnosu na n-alkane;
- kod starog naftnog zagađenja zemljišta, u skladu sa zabeleženim promenama sadržaja mineralnih ulja i produkovanom količinom CO₂, promene u relativnom sadržaju n-alkana su minimalne, gde se uglavnom do kraja eksperimenta razgrađuje preostala količina biodostupnih viših n-alkana C₂₅-C₃₀.

Merenja biodostupnosti ugljovodonika ekstrakcijom sa Tween80 pokazala su da je u zemljištu sveže kontaminiranom dizel uljem, sirovom naftom i starim naftnim zagađenjem oko 95%, 85% i 40% ugljovodonika biodostupno, respektivno. Koncentracija rezidualne frakcije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika dobijena nakon 48 dana tretmana u skoro svim probama je veća od predviđenih. Međutim, ovde treba istaći da je biodostupnost određena na početku eksperimenta biodegradacije, tako da je uočeno neslaganje posledica bifaznog ponašanja ugljovodonika u zemljištu, gde se jedan deo uklanja biodegradacijom, dok drugi deo difunduje u pore zemljišta i kompleksira se sa zemljišnom organskom materijom.

Bitno je istaći da koncentracija ugljovodonika u slučaju starog naftnog zagađenja zemljišta nije imala primetan efekat na procese biodegradacije. Ovo staro naftno zagađenje u zemljištu može predstavljati prihvatljivu završnu tačku remedijacije za životnu sredinu. Ovakve završne tačke javljaju se u slučaju kada kontaminant koji zaostaje u zemljištu nema negativan efekat na ljude i životnu sredinu, i kod starih zagađujućih materija koje se sporo oslobađaju sa zemljišta. Koncept se zasniva na sledećem: (1) da visoke koncentracije kontaminanta u zemljištu ne moraju izazivati negativne efekte, (2) da je na kontaminiranom lokalitetu rizik za ljudsko zdravlje i životnu sredinu direktno povezan sa sposobnošću oslobađanja kontaminanta, i (3) da je ono što se oslobodi kao i brzina njegovog oslobađanja iz zemljišta važna koliko i tip i koncentracija kontaminanta prisutnog u zemljištu. Ovo dovodi do zaključka da slaba biodegradabilnost starog naftnog zagađenja u zemljištu nije posledica toksičnosti visokih koncentracija ugljovodonika ili nagaomilavanja toksičnih produkata tokom procesa starenja zagađenja u zemljištu i da se ova rezidualna frakcija ugljovodonika u zemljištu zbog svojih inertnih karakteristika i rezistencije na biodegradaciju može smatrati integralnim sastavom zemljišta, i kao takva ne bi trebalo da predstavlja opasnost po životnu sredinu. Međutim, iako je količina ugljovodonika koja može da pređe u vodenu fazu mala, u prirodnim uslovima usled spiranja ugljovodonika sa zemljišta kišom, postoji verovatnoća da ovi ugljovodonici dospeju u podzemnu vodu iznad maksimalno dozvoljene koncentracije za vodu za piće (MDK = 10 µg/l) i na taj način degradiraju njen kvalitet. Zbog nemogućnosti daljeg uklanjanja zagađenja bioremedijacijom, preostala količina zagađujućih materija koja može dospeti u vodenu fazu bi trebalo da se ukloni nekim drugim remedijacionim tehnikama pre njegovog konačnog bezbednog odlaganja u životnu sredinu.

5. LITERATURA

1. Abdul, S.A., Gibson, T.L., Rai, D.N., 1990. Selection of surfactants for the removal of petroleum products from shallow sandy aquifers. *Ground Water* **28(6)**, 920-926.
2. Aboul-Kassim, T.A.T., Simoneit, B.R.T., 2001. Pollutant-solid phase interactions mechanisms, Chemistry and Modeling. In: Hutzinger O. (Ed.), *Handbook of environmental chemistry*, **5**, Water Pollution Part E, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 4–105.
3. Ahn, Y., Sanseverino, J., Saylor, G.S., 1999. Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. *Biodegradation*, **10**, 149–157.
4. Al-Awadhi, N., Al-Daher, R., El-Nawawy, A., Balba, M.T., 1996. Bioremediation of oil-contaminated soil in Kuwait. I. Land farming to remediate oil-contaminated soil. *J. Soil Contamin.* **5(3)**, 243–260.
5. Alexander, M., 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environmental Science and Technology*, **29**, 2713–2717.
6. Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, **34**, 4259–4265.
7. Alexander, R., Kagi, R.I., Noble, R.A., 1983. Identification of bicyclic sesquiterpanes drimane and eudesmane in petroleum. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 226-228.
8. Algappan, G., Cowan, R.M., 2004. Effect of temperature and dissolved oxygen on the growth kinetics of *Pseudomonas putida F1* growing on benzene and toluene. *Chemosphere* **54 (8)**, 1255-1265.
9. Alkorta, I., Garbisu, C., 2001. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology* **79(3)**, 273–276.
10. Alter, S.R., Brusseau, M.L., Piatt, J.J., Ray-M, A., Wang, J.-M., Cain, R.B., 2003. Use of tracer tests to evaluate the impact of enhanced solubilization flushing on in-situ biodegradation. *Journal of Contaminant Hydrology* **64(3-4)**, 191–202.
11. Anon, 1965. *Methods of soil analysis* (Ed. Black, C. A., Evans, D. D., Ensminger, L.E.,)
12. Anon, 1996. *Biopile design construction manual*, Naval Facilities Engineering Service Center, Port Hueneme, California.
13. APHA-AWWA-WPCF, 1995 *Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater*. Eaton, A. D., Clesceri, L. S. and Greenberg, A. E. (Eds.) American Public Health Association, Washington.
14. Arduini, I., Masoni, A., Ercoli, L., 2006. Effects of high chromium applications on miscanthus during the period of maximum growth. *Environmental and Experimental Botany* **58**, 234–243.
15. Atagana, H.I., 2004. Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 510–520.

16. Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microb. Rev.* **45**, 180-209.
17. Atlas, R.M., Sayler, G., Burlage, R.S., Bej, A.K., 1992. Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. *Biotechniques* **12**, 706–717.
18. Baker, R.S., Moore, A.T., 2000. Optimizing the effectiveness of in situ bioventing. *Pollution Engineering* **32(7)**, 44–47.
19. Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R., 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*. **32**, 155–164.
20. Ball, W.P., Roberts, P.V., 1991a. Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 1. Equilibrium. *Environmental Science and Technology* **25**, 1223–1237.
21. Ball, W.P., Roberts, P.V., 1991b. Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 2. Interparticle diffusion. *Environmental Science and Technology* **25**, 1237–1249.
22. Barkay, T., Nazaret, S., Jeffrey, W., 1995. Degradative genes in the environment. In: *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals* (eds L.Y. Young i C.E. Cerniglia), pp.545–577. Wiley–Liss, New York.
23. Bartha R., Pramer D., 1965. Features of a flask and method for measuring the persistence of and biological effects of pesticides measuring the persistence of and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci.* **100**, 86–170.
24. Bartha, R., 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbiol Ecol.* **12**, 155–172.
25. Barthe, M.E., Pelletier, 2007. Comparing bulk extraction methods for chemically available polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation in worms. *Environmental Chemistry* **4**, 271-283.
26. Batchelor, B., 2006. Overview of waste stabilization with cement. *Waste management* **26**, 689–698.
27. Bazin, M.J., Saunders, P.T., Prosser, J.I., 1976. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **4**, 463-498.
28. Bosma, T.N.P., Middeldorp, P.J.M., Schraa, G., Zehnder, A.J.B., 1997. Mass transfer limitations of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environmental Science and Technology* **31**, 248–252.
29. Brassington, K.J., Hough, R.L., Paton, G.I., Semple, K.T., Risdon, G.C., Crossley, J., Hay, I., Askari, K., Pollard, S.J.T., 2007. Weathered Hydrocarbon Wastes: A Risk Management Primer. *Environmental Science and Technology* **37**, 199-232.
30. Britton, L.N., 1984, Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In *Microbial Degradation of Organic Compounds ed. Gibson, D.T.* pp. 89–129. USA: Marcel Dekker Inc.
31. Britton, L.N., 1985. Feasibility Studies on the Use of Hydrogen Peroxide to Enhance Microbial Degradation of Gasoline. *API Pub.4389.*, Washington, D. C., USA.
32. Brown, R. A., Hicks, R. J., Hicks, P.M., 1994. Use of air sparging for in situ bioremediation. In: Hinchee, R. E., editor. *Air sparging for site remediation.* Boca Raton (FL): Lewis Publishers; p. 38– 55.
33. Brown, R. A., Mahaffey, W., Norris, R.D., 1993. In situ bioremediation: The state of the practice. In: WSTB-CETS-NRC *In Situ Bioremediation: When Does It Work?*. National academy Press, Washington, D. C., 121-135.

34. Brown, R.A., Jasinlewicz, F., 1992. Air sparging: a new model for remediation. *Pollution Engineering*, July, 52-57.
35. Brusseau, M.L., Jessup, R.E., Rao, S.C., 1991. Nonequilibrium sorption of organic chemicals: elucidation of rate-limiting processes. *Environmental Science and Technology* **25**, 134–142.
36. Bundy, J.B.A., Campbell, C.D., Paton, G.I., 2001. Comparison of the response of six different luminescent bacterial bioassays to bioremediation of five contrasting soils. *Journal of Environmental Monitoring* **3**, 404–410.
37. Burlage, R.S., Palumbo, A.V., Heitzer, A., Sayler, G., 1994. Bioluminescent reporter bacteria detect contaminants in soil samples. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **45-6**, 731–740.
38. Calvillo, Y.M., Alexander, M., 1996. Mechanism of microbial utilization of biphenyl sorbed to polyacrylic beads. *Applied Microbiology and Biotechnology* **45**, 383–390.
39. Camacho, L.M., Munson-McGee, S.H., 2006. Anomalous transient leaching behavior of metals solidified/stabilized by pozzolanic fly ash. *Journal of Hazardous Materials* **B137**, 144–151.
40. Carmichael, L.M., Christman, R.F., Pfaender, F.K., 1997. Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. *Environmental Science and Technology* **31**, 126–132.
41. Cerniglia, C.E., 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* **30**, 31–37.
42. Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**, 351-368.
43. Chayabutra, C., Ju, L.K., 2000. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Appl Environ Microbiol* **66**, 493–498.
44. Cheah, E.P.S., Reible, D.D., Valsaraj, K.T., Constant, W.D., Walsh, B.W., Thibodeaux, L.J., 1998. Simulation of soil washing with surfactants. *Journal of Hazardous Materials* **59**, 107–122.
45. Chu, W., Chan, K.H., 2003. The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. *Science of the Total Environment* **307(1–3)**, 83–92.
46. Chua, Y., Wertha, C.J., Valocchia, A.J., Yoona, H., Webbb, A.G., 2004. Magnetic resonance imaging of nonaqueous phase liquid during soil vapor extraction in heterogeneous porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* **73**, 15– 37.
47. Chung, N.H., Alexander, M., 1998. Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. *Environmental Science and Technology* **32**, 855–860.
48. CISB-WSTB-CETS-NRC (Committee on In Situ Bioremediation, Water Science and Technology Board, Commission on Engineering and Technical Systems, National Research Council), 1993. *In situ bioremediation: When Does It Work?*, National Academy Press, Washington, D.C., USA.
49. Collina, E., Bestetti, G., Di Gennaro, P., Franzetti, A., Gugliersi, F., Lasagni, M., Pitea D., 2005. Naphthalene biodegradation kinetics in an aerobic slurry-phase bioreactor. *Environment International* **31**, 167– 171.
50. Cornelissen, G., van Noort, P.C.M., Govers, H.A.J., 1998. Mechanism of slow desorption of organic compounds from sediments: a study using model sorbents. *Environmental Science and Technology* **32**, 3124–3131.

51. Cowan, C.E., Riley, R.G., 1987. Guidance for sampling of and analyzing for organic contaminants in sediments (EPA 440/4-87-010) United States Environmental Protection Agency, Criteria and Standard Division, Washington, DC.
52. Cuypers, C., Clemens, R., Grotenhuis, T., Rulkens, W., 2001. Prediction of petroleum hydrocarbon bioavailability in contaminated soils and sediments. *Soil and Sediment Contamination* **10**, 459–482.
53. Cuypers, C., Grotenhuis, T., Joiasse, J., Rulkens, W., 2000. Rapid persulfate oxidation predicts PAH bioavailability in soils and sediments. *Environmental Science and Technology* **34**, 2057–2063.
54. Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., Rulkens, W., 2002. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* **46**, 1235–1245.
55. Dagely, S., 1975. A biochemical approach to some problems of environmental pollution. In: Essays in Biochemistry (eds P.N. Campbell & W.N. Aldridge), **11**, pp. 81–130. Academic Press, London.
56. Dagley, S., 1971. Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **6**, 1.
57. Dalmacija, B., Ivančev-Tumbas, I., Agbaba, J., Đurendić, M., 2003. Case Study of Petroleum Contaminated Area of Novi Sad After NATO Bombing in Yugoslavia. *Soil and Sediment Contamination* **12(4)**, 591 - 611.
58. Dalmacija, B., Ivančev-Tumbas, I., Bikit, I., Vesković, M., Đurendić, M., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V.V., Čonkić, Lj., Bečelić, M., 2000. Environmental pollution of Novi Sad and its surroundings and health risks. *Archive of oncology* **8(3)**, 113-117.
59. Dalmacija, B., Petrović, O., Rončević, S., Ivančev-Tumbas, I., Bečelić, M., Simeunović, J., Agbaba, J., Radnović, D., Lazić, N., Đukić, M., 2004. Osnovne postavke remedijacije zemljišta zagađenog naftom, *Naftno zagađenje područja ratno ostrvo mogućnost prirodne bioremedijacije*, Prirodno-matematički fakultet, Institut za hemiju, Novi Sad, 204-223.
60. De la Guardia, M., 1995. Biochemical sensors – the state of the art. *Mikrochimica Acta* **120**, 243–255.
61. Dec, J. i Bollag, J.-M., 1997. Determination of covalent and noncovalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil. *Soil Science* **162**, 858–874.
62. Dermatas, D., Meng, X., 2003. Utilization of fly ash for stabilization/solidification of heavy metal contaminated soils. *Engineering Geology* **70(3-4)**, 377–394.
63. Desideri, P.G., Lepri, L., Canovaro, M., Checchini, L., 1984. Recovery, identification and determination of organic compounds in marine sediments. *Journal of Chromatography* **284**, 317–330.
64. Di Palma, L., Ferrantelli, P., Merli, C., Biancifiori, F., 2003. Recovery of EDTA and metal precipitation from soil flushing solutions. *Journal of Hazardous Materials* **103(1-2)**, 153–168.
65. Diele, F., Notarnicola, F., Sgura, I., 2002. Uniform air velocity field for a bioventing system design: some numerical results. *International Journal of Engineering Science* **40(11)**, 1199–1210.
66. Divincenzo, J.P., Sparks, D.L., 1997. Slow sorption kinetics of pentachlorophenol on soil: concentration effects. *Environmental Science and Technology* **31**, 977–983.

67. Eapen, S., Singh, S., Thorat, V., Kaushik, C.P., Raj, K., D'Souza, S.F., 2006. Phytoremediation of radiostrontium (90Sr) and radiocesium (137Cs) using giant milky weed (*Calotropis gigantea* R.Br.) plants. *Chemosphere* **65**, 2071-2073.
68. Eglinton, G., 1975. Environmental chemistry, Vol. 1, *Specialist periodical reports*. The Chemical Society, Burlington House, London.
69. Eriksson, M., Swartling, A., Dalhammar, G., 1998. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solidphase micro-extraction and GC-MS. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**, 129-134.
70. Escalante-Espinosa, E., Gallegos-Martínez, M.E., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere* **59**, 405-413.
71. Feng, D., Lorenzen, L., Aldrich, C., Mare, P.W., 2001. Ex-situ diesel contaminated soil washing with mechanical methods. *Minerals Engineering* **14(9)**, 1093-1100.
72. Filler, D.M., Lindstrom, J.E., Braddock, J.F., Johnson, R.A., Nickalaski, R., 2001. Integral biopile components for successful bioremediation in the Arctic. *Cold Regions Science and Technology* **32(2-3)**, 143-156.
73. Gagni, S., Cam, D., 2007. Stigmastane and hopanes conserved biomarkers for estimating oil biodegradation in former refinery plant/contaminated soil. *Chemosphere* **67**, 1975-1981.
74. Gevaio, B., Semple, K.T., Jones, K.C., 2000. Bound pesticide residues in soils – a review. *Environmental Pollution* **108**, 3-14.
75. Giasi I.C., Morelli A., 2003. A Landfarming Application Technique Used as Environmental Remediation for Coal Oil Pollution. *Journal of Environmental Science and Health, Part A—Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* **A38 (8)**, 1557-1568.
76. Gidda, T., Cann, D., Stiver W.H., Zytner, R.G., 2006. Airflow dispersion in unsaturated soil. *Journal of Contaminant Hydrology* **82**, 118-132.
77. Grbić-Galić, D., Vogel, T.M., 1987. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 254-260.
78. Grifoll, M., Selifonov, S.A., Chapman P.J. 1994. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorine by *Pseudomonas* sp. Strain F274. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2438.
79. Grishchenkov, V.G., Townsend, R.T., McDonald, T.J., Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., Boronin, A.M., 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochem* **35**, 889-896.
80. Grossi, V., Massias, D., Stora, G., Bertrand Burial, J.C., 2002. Exportation and degradation of acyclic petroleum hydrocarbons following simulated oil spill in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Chemosphere* **48(9)**, 947-954.
81. Guerin, T.F., 1999. Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ landtreatment. *Journal of Hazardous Materials* **B65**, 305-315.
82. Guerin, W.F., Boyd, S.A., 1992. Differential bioavailability of soilsorbed naphthalene to two bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1142-1152.
83. Guthrie, E.A., Pfaender, F.K., 1998. Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environmental Science and Technology* **32**, 501-508.

84. Halmemies, S., Grondahl, S., Arffman, M., Nenonen, K., Tuhkanen, T., 2003. Vacuum extraction based response equipment for recovery of fresh fuel spills from soil. *Journal of Hazardous Materials* **97(1–4)**, 127–143.
85. Hamaker, J. W., 1972. In: Goring, C. A. I. i Hamaker, J. W. (Eds.) *Organic Chemicals in the Soil Environment*, Dekker, New York, 253-340.
86. Hamby, D.M., 1996. Site remediation techniques supporting environmental restoration activities- a review. *The Science of the Total Environment* **191**, 203-224.
87. Hansen, D.L., Nestler, C., Ringelberg, D., Bajpai, R., 2004. Extended bioremediation of PAH/PCP contaminated soils from the POPILE wood treatment facility. *Chemosphere* **54**, 1481–1493.
88. Harvey, R. G., 1997. *Polycyclic hydrocarbons*. Wiley-VCH, New York.
89. Harvey, R.G., 1991. *Polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry and carcinogenicity*. Cambridge University Press, Cambridge.
90. Hassan, H.F., Taha, R., Al Rawas, A., Al Shandoudi, B., Al Gheithi, K., Al Barami, A.M., 2005. Potential uses of petroleum-contaminated soil in highway construction. *Construction and Building Materials* **19**, 646–652.
91. Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1995. Effect of ageing of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology* **29**, 537–545.
92. Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., Widdel, F., 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 459–473.
93. Heitkamp, M.A., Cerniglia, C.E., 1987. Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* **6(7)**, 535–546.
94. Heitkamp, M.A., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E., 1987. Naphthalene biodegradation in environmental microcosms: Estimates of degradation rates and characterization of metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* **53(1)**, 129–136.
95. Hejazi, R., Husain, T., Khan, F.I., 2003. Landfarming operation in arid region- human health risk assessment. *Journal of Hazardous Materials* **B99**, 287–302.
96. Hincsee, E.R., Kittle, H.J., 1995. *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Columbus (OH): Battelle Press.
97. Höhener, P., Duwig, C., Pasteris, G., Kaufmann, K., Dakhel, N., Harms, H., 2003. Biodegradation of petroleum hydrocarbon vapors: laboratory studies on rates and kinetics in unsaturated alluvial sand, *Journal of Contaminant Hydrology* **66**, 93–115.
98. Holder, E.L., Miller, K.M., Haines, J.R., 1999. Crude oil component biodegradation kinetics by marine and freshwater consortia. In: Alleman B.C., Leeson A. (Ed.), *In situ bioremediation of polycyclic hydrocarbons and other organic compounds* (pp. 245–250). Battelle, Columbus, OH.
99. Houghton, J.E., Shanley, M.S., 1994. Catabolic potential of pseudomonads: a regulatory perspective. In *Biological degradation and bioremediation of toxic chemical* (ed. G. Rasul Chaudhry) Chapman and Hall, London, pp. 11-32.
100. http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_oil_spills
101. Ivančev-Tumbas, I., Tričković, J., Karlović, E., Tamaš, Z., Rončević, S., Dalmacija, B., Petrović, O., Klačnja, M., 2004. GC/MS-SCAN to follow the fate of crude oil components in bioreactors set to remediate contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* **54(4)**, 311-318.

102. Jensen, S.T., Arvin, E., Svensmark, B., Wrang, P., 2000. Quantification of Compositional Changes of Petroleum Hydrocarbons by GC/FID and GC/MS during Long-term Bioremediation Experiment. *Soil and Sediment Contamination* **9(6)**, 549-577.
103. Jerina, D.M., Selander, H., Yagi, H., Wels, M.C., Davey J.F., Mahadevan, V., Gibson, D.T., 1976. Dihydrodiols from anthracene and phenanthrene. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 5988.
104. Jobson, A. M., Cook, F. D., Westlake, D. W. S., 1979. Interaction of aerobic and anaerobic bacteria in petroleum biodegradation. *Chem. Geol.* **24**, 355-365
105. Joner, E.J., Leyval, C., Colpaert, V.J., 2006. Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere. *Environmental Pollution* **142**, 34-38.
106. Jordan, R.N., Cunningham, A.B., 1999. Surfactant enhanced bioremediation: A review of the effects of surfactants on the bioavailability of hydrophobic organic chemicals in soils. In: Baveye, Ph., Block, J.-C., Goncharuk, V.V. (Eds.), *Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment*. NATO ASI Series 2, Environment 64. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 463–496.
107. Jorgensen, K.S., Puustinen, J., Suortti, A.M., 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution* **107(2)**, 245–254.
108. Ju, C., Jou, G., 2006. An efficient technology to treat heavy metal-lead contaminated soil by microwave radiation. *Journal of Environmental Management* **78**, 1–4.
109. Juteau, P., Bisaillon, J.G., Lepine, F., Ratheau, V., Beaudet, R., Villemur, R., 2003. Improving the biotreatment of hydrocarbons-contaminated soils by addition of activated sludge taken from the wastewater treatment facilities of an oil refinery. *Biodegradation* **14**, 31–40.
110. Kaakinen, J., Vahaoja, P., Kuokkanen, T., Roppola, K., 2007. Studies on the effects of certain soil properties on the biodegradation of oils determined by manometric respirometric method. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 7str.
111. Kao, C.M., Chen, S.C., Liu, J.K., Wu, M.J., 2001. Evaluation of TCDD biodegradability under different redox conditions. *Chemosphere* **44(6)**, 1447–1454.
112. Kaštanek, F., Kaštanek, P., 2005. Combined decontamination processes for wastes containing PCBs. *Journal of Hazardous Materials* **B117**, 185–205.
113. Keith, L. H. i Telliard, W. A., 1979. Priority pollutants I-a perspective view. *Env. Sci. Tech.* **13**, 416-423.
114. Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M., 1997. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environmental Science and Technology*, **31**, 214–217.
115. Kennicutt, M.C., 1988. The effect of biodegradation on crude oil bulk and molecular composition. *Oil Chem. Pollut.* **4**, 89–112.
116. Khan, I.F., Husain, T., Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Managament* **71**, 95-122.
117. Kim, S.J., Choi, D.H., Sim, D.S., Oh, Y.S., 2005. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. *Chemosphere* **59**, 845-852.
118. Kirchmann, H., Ewnetu, W., 1998. Biodegradation of petroleum-based oil wastes through composting. *Biodegradation* **9**, 151–156.

119. Koma, D., Hasumi, F., Yamamoto, E., Ohta, T., Chung, S.Y., Kubo, M., 2001. Biodegradation of long-chain nparaffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *J Biosci Bioeng* **91**, 94–96.
120. Kornmüller, A., Wiesmann, U., 1999. Continuous ozonation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil/water-emulsions and biodegradation of oxidation product. *Wat. Sci. Tech.* **40**, 107-114.
121. Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Ritchkova, M.I., Philp, J.C., Cunningham, C.J., Christofi, N., 2003. Bioremediation of crude oil-contaminated soil using slurry-phase biological treatment and land farming techniques. *Soil and Sediment Contamination* **12(1)**, 85–99.
122. Laine, M.M., Jorgensen, K., 1997. Effective and Safe Composting of Chlorophenol-Contaminated Soil in Pilot Scale. *Environmental Science and Technology* **31**, 371-378.
123. Li, L., Cunningham, C.J., Pas, V., Philip, J.C., Barry, D.A., Anderson, P., 2004. Field trial of new aeration system for enhancing biodegradation in biopile. *Waste Management* **24(2)**, 127-137.
124. Lenhard, G., 1956. *Die dehydrogenaseaktivitat des Bodens als Mass fur die Mikroorganismenatitigkeit im Boden.* Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenkd. **73**, 1–11.
125. Paul, E.A., Clark, F.E., 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, New York, pp. 46–48.
126. Liste H., Felgentreu D., 2006. Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil. *Appl. Soil. Ecol.* **31**, 43-52.
127. Liu, G., Cabrera, J., Allen, M., Cai, Y., 2006. Mercury characterization in a soil sample collected nearby the DOE Oak Ridge Reservation utilizing sequential extraction and thermal desorption method. *Science of the Total Environment* **369**, 384–392.
128. Lloyd-Jones, G., Laurie, A.D., Hunter, D.W.F., Fraser, R., 1999. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiology Ecology* **29**, 69–79.
129. Loehner, R.C., Mc Millen, S.J., Webster, M.T., 2001. Predictions of biotreatability and actual results: soils with petroleum hydrocarbons. *Pract. Period. Hazard. Toxic. Radioact. Waste management* **5**, 78–87.
130. Logsdon, S.D., Keller, K.E., Moorman, T.B., 2002. Measured and predicted solute leaching from multiple undisturbed soil columns. *Soil Science Society of America Journal* **66(3)**, 686–695.
131. Macek, T., Macková, M., Káš, J., 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* **18**, 23–34.
132. Macleod, C.J.A., Morriss, A.W.J., Semple, K.T., 2001. The role of microorganisms in ecological risk assessment of hydrophobic organic contaminants (HOCs) in soils. *Advances in Applied Microbiology* **48**, 171–212.
133. Macleod, C.J.A., Semple, K.T., 2000. Influence of contact time on extractability and degradation of pyrene in soils. *Environmental Science and Technology* **34**, 4952–4957.
134. Macleod, C.J.A., Semple, K.T., 2002. Evolution of pyrene catabolic ability in similar soils with different organic matter contents. *Environmental Pollution* **119**, 357–364.

135. Mader, B.T., Uwe-Goss, K., Eisenreich, S.J., 1997. Sorption of nonionic, hydrophobic organic chemicals to mineral surfaces. *Environmental Science and Technology* **31**, 1079–1086.
136. Malviya, R., Chaudhary, R., 2006a. Leaching behavior and immobilization of heavy metals in solidified/stabilized products. *Journal of Hazardous Materials* **B137**, 207–217.
137. Malviya, R., Chaudhary, R., 2006b. Factors affecting hazardous waste solidification/stabilization: A review. *Journal of Hazardous Materials* **B137**, 267–276.
138. Mann, M.J., 1999. Full-scale and pilot-scale soil washing. *Journal of Hazardous Materials* **66**, 119–136.
139. Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F., Vandecasteele, J.P., 2003. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil and Gas Science and Technology* (**58**), 441–448.
140. Marković, D.A., Đarmati, Š.A., Gržetić, I.A., Veselinović, D.S., 1996. *Fizičko-hemijski osnovi zaštite životne sredine, Izvori zagađivanja, posledice i zaštita*. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
141. Matavulj, M., 1986. Fosformonoestar–hidrolaze mikroorganizama i njihov značaj u kruženju fosfora u akvatičnim staništima, *Doktorska disertacija*, Prirodoslovno–matematički fakultet, Zagreb.
142. Merkl, N., Schultze–Kraft, R., Infante, C., 2005. Phytoremediation in the tropics e influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental Pollution* **138**, 86–91.
143. Mihopoulos, P.G., Suidan, M.T., Sayles, G.D., 2001. Complete remediation of PCE contaminated unsaturated soils by sequential anaerobic– aerobic bioventing. *Water Science and Technology* **43(5)**, 365–372.
144. Mihopoulos, P.G., Suidan, M.T., Sayles, G.D., Kaskassian, S., 2002. Numerical modeling of oxygen exclusion experiments of anaerobic bioventing. *Journal of Contaminant Hydrology* **58(3–4)**, 209–220.
145. Mohn, W.W., Radziminski, C.Z., Fortin, M.–C., Reimer, K.J., 2001. On site bioremediation of hydrocarbon–contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**, 242–247.
146. Morgan, P. and Watkinson, R.J. 1994. Biodegradation of components of petroleum. In *Biochemistry of Microbial Degradation ed. Ratledge, C.* pp. 1–31. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
147. Morzik, A., Piotrowska–Seget, Z., Labuzek, S., 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies* **12**, 15–25.
148. Mulligan, C.N., Yong, R.N., 2004. Natural attenuation of contaminated soils, *Environ. Int.* **30**, 587–601.
149. Nakahara, T., Erickson, L.E., Gutierrez, J.R., 1977. Characteristics of hydrocarbon uptake in cultures with two liquid phases. *Biotechnology and Bioengineering* **19**, 9–25.
150. Nam, K., Alexander, M., 1998. Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: tests with model solids. *Environmental Science and Technology* **32**, 71–74.
151. Nam, K., Chung, N., Alexander, M., 1998. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environmental Science and Technology* **32**, 3785–3788.

152. Namkoonga, W., Hwangb, E.Y., Parka, J.S., Choic, J.Y., 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution* **119**(1), 23–31.
153. Nano, A.G., Rota, R., 2003. Combined slurry and solid-phase bioremediation of diesel contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* **B100**, 79–94.
154. NEN 5754 Bodem. 1992. Bapaling van het gehalte aan organische stof in grond volgens gloeiverliesmethode.
155. Nhi-Cong L.T., Mikolasch A., Klenk, H.P., Schaueret F., 2008. Degradation of the multiple branched alkane 2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane (pristane) in *Rhodococcus ruber* and *Mycobacterium neoaurum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **63**(2), 201–207.
156. Nicholl, S.I., Talley, J.W., 2006. Development of thermal programmed desorption mass spectrometry methods for environmental applications. *Chemosphere* **63**, 132–141.
157. Norris, R. D., Eckenfelder, W.W., Jr., 1991. *Applicability of biodegradation principals for treatment of soils and groundwater*. Eckenfelder INC, Nashville, Tennessee, USA.
158. Ogram, A.V., Jessup, R.E., Ou, L.T., Rao, P.S.C., 1985. Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in soils. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 582–587.
159. Otterpohl, R., 2002. Options for alternative types of sewerage and treatment systems directed to improvement of the overall performance. *Water Science and Technology* **45**(3), 149–158.
160. Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., 1982. *Methods of Soil Analysis*, part II, 2nd ed., ASA-SSSA, Wisconsin, pp. 937–970.
161. Pala, D.M., de Carvalho, D.D., Pinto, J.C., Sant’Anna Jr, G.L., 2006. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* **54**, 254–260.
162. Park, J., Jung, Y., Han, M., Lee, S., 2002. Simultaneous removal of cadmium and turbidity in contaminated soil-washing water by DAF and electroflotation. *Water Science and Technology* **46**(11–12), 225–230.
163. Paton, G.I., 2001. Lighting the way for bioremediation. *Chemistry and Industry* **3**, 77–79.
164. Petrovic, O., Gajin, S., Matavulj, M., Radnovic, D., Svircev, Z., 1998. *Microbiological investigations of the surface freshwater quality*. Institute of Biology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, pp 35–49.
165. Piatt, J.J., Brusseau, M.L., 1998. Rate-limited sorption of hydrophobic organic compounds by soils with well characterized organic matter. *Environmental Science and Technology* **32**, 1604–1608.
166. Picado, A., Nogueira, A., Baeta-Hall, L., Mendonc, E., Rodrigues, M., do Ceu Saagua, M., Martins, A., Anselmo, A.M., 2001. Landfarming a PAH-Contaminated Soil. *Journal of Environmental Science and Health* **A36**(9), 1579–1588.
167. Pignatello, J.J., Xing, B., 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science and Technology* **30**, 1–11.
168. Pollard, S. J.T., Hough, R.L., Kim, K., Bellarby, J., Paton, G.I., Semple, K.T., Coulon, F., 2008. Fugacity modelling to predict the distribution of organic contaminants in the soil:oil matrix of constructed biopiles. *Chemosphere* **71**, 1432–1439.

169. Prince, R., Elmendorf, D.L., Lute, R.J., Hsu, S.C., Haith, E.C., Senius, D.J., Dechert, J.G., Douglas, S.G., Butier, L.E., 1994. $17\alpha(H),21\beta(H)$ -Hopane as a Conserved Internal Marker for Estimating the Biodegradation of Crude Oil. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 142–145.
170. Prichard, H.P., Costa, C.F., 1991. EPA's Alaska oil bioremediation report. *Environ. Science Technol.* **25**, 372–379.
171. Pritchard, P.H., Bourquin, A.W., 1984. The use of microcosms for evaluation of interactions between pollutants and microorganisms. *Advances in Microbial Ecology* **7**, 133–215.
172. Pulford, I.D., Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metalcontaminated land by trees—a review. *Environment International* **29(4)**, 529–540.
173. Rahman, K.S.M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M., 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients, *Bioresource Technology* **90**, 159–168
174. Rai, J.P.N., Singhal, V., 2003. Biogas production from water hyacinth and channel grass used for phytoremediation of industrial effluents. *Bioresource Technology* **86(3)**, 221–225.
175. Rasulić, G., 2007. U: *Nafta i životna sredina – zaštita, zagađivanje i remedijacija*. Naftna industrija Srbije, Pančevo.
176. Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T., 2000a. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments – a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution* **108**, 103–112.
177. Reid, B.J., MacLeod, C.J.A., Lee, P.H., Morriss, A.W.J., Stokes, J.D., Semple, K.T., 2001. A simple $14C$ -respirometric method for assessing microbial catabolic potential and contaminant bioavailability. *FEMS Microbiology Letters* **196**, 141–146.
178. Reid, B.J., Stokes, J.D., Jones, K.C., Semple, K.T., 2000b. A nonexhaustive cyclodextrin based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environmental Science and Technology* **34**, 3174–3179.
179. Rodina, A.G., 1972. *Methods in Aquatic microbiology*. Ed. Colwell, R. and Zambruski, M., University Park Press, Baltimore and Butterworth and Co Ltd. London.
180. Rončević, S., Dalmacija, B., Ivančev–Tumbas, I., Petrović, O., Klačnja, M., Agbaba, J., 2005. Kinetics of Degradation of Hydrocarbons in the Contaminated Soil Layer. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **49**, 27–36.
181. Sanseverino, J., Applegate, B.M., King, J.M.H., Sayler, G.S., 1993. Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1931–1937.
182. Sara, M.N., 2003. *Site assessment and remediation handbook*, Second Edition, Lewis Publishers, CRC Press LLC, Boca Raton–London–New York–Washington.
183. Sauv, S., Manna, S., Turmel, M.C., Roy, G.A., Courchesne, F., 2003. Solid-solution partitioning of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the organic horizons of a forest soil. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 5191–5196.
184. Sayler, G.S., 1991. Contribution of molecular biology to bioremediation. *Journal of Hazardous Materials* **28**, 13–27.

185. Schlebaum, W., Badora, A., Schraa, G., van Riemsdijk, W.H., 1998. Interactions between a hydrophobic organic chemical and natural organic matter: equilibrium and kinetic studies. *Environmental Science and Technology* **32**, 2273–2277.
186. Schneider, J., Grosser, R., Jayashimuhulu, K., 1996. Degradation of pyrene, benzo[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycrobacterium* sp. strain RJGII–135, isolated from former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 13.
187. Seabra, P.N., Linhares, M.M., Santa, Anna, L.M., 1999. Laboratory study of crude oil remediation by bioaugmentation. In: Alleman, B.C., Leeson, A., (Ed), *In situ bioremediation of polycyclic hydrocarbons and other organic compounds* (pp. 421–426). Battelle, Columbus, OH.
188. Semple, K.T., Morris, A.W.J., Paton, G.I., 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European J Soil Sci.* **54**, 1–10
189. Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor, T.R., 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* **112**, 269–283.
190. Sepic, E., Leskovsek, H. and Trier, C., 1995. Aerobic bacterial degradation of selected polyaromatic compounds and nalkanes found in petroleum. *J Chromatogr A* **697**, 515–523.
191. Sherwood, L.J., Qualls, R.G., 2001. Stability of phosphorus within a wetland soil following ferric chloride treatment to control eutrophication. *Environmental Science and Technology* **35**(20), 4126–4131.
192. Shi, C., Jimenez, A.F., 2006. Stabilization/solidification of hazardous and radioactive wastes with alkali-activated cements. *Journal of Hazardous Materials* **B137**, 1656–1663.
193. Škunca–Milovanović, S., Feliks, R., Đurović, B., 1990. *Voda za piće, Standardne metode za ispitivanje higijenske ispravnosti*, Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, NIP "Privredni pregled", Beograd.
194. Song, H.G., Bartha, R., 1990. Effect of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(3), 646–651.
195. Soudek, P., Tykva, R., Vannkova, R., Vanek, T., 2006. Accumulation of radioiodine from aqueous solution by hydroponically cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Environmental and Experimental Botany* **57**, 220–225.
196. Spain, J.C., van Veld, P.A., 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical–structure. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 428–435.
197. Stapleton, R.D., Savage, D.C., Saylor, G.S., Stacey, G., 1998. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4180–4184.
198. Stapleton, R.D., Saylor, G.S., 1998. Assessment of the microbiological potential for the natural attenuation of petroleum hydrocarbons in a shallow aquifer system. *Microbial Ecology* **36**, 349–361.
199. Stewart, G.S.A.B., 1990. In vivo bioluminescence – new potentials for microbiology. *Letters in Applied Microbiology*, **10**, 1–8.
200. Stroud, J.L., Paton, G.I., Semple, K.T., 2007. Microbe–aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 1239–1253.

201. Stroud, J.L., Paton, G.I., Semple, K.T., 2009. Predicting the biodegradation of target hydrocarbons in the presence of mixed contaminants in soil. *Chemosphere* **74**, 563–567.
202. Tabatabai, M.A., J.M. Bremner., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* **1**, 301–307.
203. Taha, R., Al-Rawas, A., Al-Jabri, K., Al-Harthy, A., Hassan, H., Al-Oraimi, S., 2004. An overview of waste materials recycling in the Sultanate of Oman Resources. *Conservation and Recycling* **41**, 293–306.
204. Tang, W.-C., White, J.C., Alexander, M., 1998. Utilisation of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. *Appl Microbiol Biotechnol.* **49**, 117–121.
205. Thompson, I.P., Bailey, M.J., Boyd, E.M., Maguire, N., Meharg, A.A., Ellis, R.J., 1999. Concentration effects of 1,2-dichlorobenzene on soil microbiology. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 1891–1898.
206. Thurnau, R.T., 1996. Low-temperature desorption treatment of co-contaminated soils: TCLP as an evaluation technique. *Journal of Hazardous Materials* **48**, 149–169.
207. Trenz, S.P., Engesser K.H., Fischer P., Knackmuss, H.J., 1994. Degradation of fluorine by *Brevibacterium* sp. Strain DPO13611: a novel C–C bond cleavage mechanism via 1,10-dihydro-11,10-dihydroxyfluorene-9-one. *J. Bacteriol.* **176**. 789.
208. Trindade, P.V.O., Sobral. A.C.L., Rizzo, S.G.F., Leite, Soriano, A.U., 2005. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soil from Brazil: a comparasion study. *Chemosphere* **58**, 515–522.
209. Urum, K., Grigson, S., Pekdemir, T., McMenemy, S., 2006. A Comparasion of efficiency of Different Surfactants for Removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere* **62**, 1403–1410.
210. USEPA, 1994. Biopiles. In *How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites. A Guide for Corrective Action Plan Reviewers.* http://www.epa.gov/OUST/pubs/tum_ch4.pdf.
211. USEPA, 1995. How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency. Publication # EPA 510-B-95-007, Washington, DC.
212. USEPA, 1996a. A citizen's guide to soil washing. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency Publication # EPA 542-F-96-002, Washington, DC.
213. USEPA, 1996b. In situ soil vapor extraction. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, <http://www.epa.gov/techinfo/case/comm/soilvape.html>
214. USEPA, 1996c. A citizen's guide to in situ soil flushing. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency. Publication # EPA 542-F-96-006, Washington, DC.
215. USEPA, 1996d. A citizen's guide to in situ thermal desorption. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency. Publication # EPA 542-F-96-005, Washington, DC.
216. USEPA, 1996e. A citizen's guide to phytoremediation. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency. Publication # EPA 542-F-96-014, Washington, DC.

217. USEPA, 1996f. Method 3560 Supercritical extraction of total recoverable petroleum hydrocarbons. Available at: epa.gov/sw-846/pdfs/3560.pdf
218. USEPA, 1996g. Method 3630C Silica Gel Cleanup, Revision 3. In: Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods (SW-846).
219. USEPA, 1998a. Soil vapor extraction (SVE). Office of the Underground Storage Tank, US Environmental Protection Agency. Publication # EPA 510-B-95-007, <http://www.epa.gov/swrust1/cat/svel.htm>
220. USEPA, 1998b. Landfarming. Office of the Underground Storage Tank, US Environmental Protection Agency. Publication # EPA 510-B-95-007. <http://www.epa.gov/swrust/cat/landfarm.htm>
221. USEPA, 1998d. Bioventing. Office of the Underground Storage Tank, US Environmental Protection Agency. Publication # EPA 510-B-95-007, <http://www.epa.gov/OUST/cat/biovent.htm>
222. USEPA, 1998e. Biopiles. Office of the Underground Storage Tank, US Environmental Protection Agency. Publication # EPA 510-B-95-007, <http://www.epa.gov/swrust1/cat/biopiles.htm>
223. USEPA, 9045 pH in soil.
224. van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**, 503–549.
225. Venosa, A., Suidan, M., Wrenn, B., Strohmeier, K., Haines, J., Eberhart, B., 1996. Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environmental Science and Technology* **30(5)**, 1764–1775.
226. Venosa, A.D., Suidan, M.T., King, D., Wrenn, B.A., 1997. Use of hopane as a conservative biomarker for monitoring the bioremediation effectiveness of crude oil contaminating a sandy beach. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **18**, 131–139.
227. Veselinović, D., Gržetić, I., Đarmati, Š., Marković, D., 1995. *Fizičko-hemijski osnovi zaštite životne sredine, Stanja i procesi u životnoj sredini*. Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, Beograd, str. 297-304.
228. Vila, J., Lopez, Z., Sabate, J., Minguillon, C., Solanas, A.M., Grifoll, M., 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5497.
229. Vitorović, D., 1987. Hemijska tehnologija. Naučna knjiga, Beograd, 325-326.
230. Volkering, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H., 1998b. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* **8**, 401–417.
231. Volkering, F., Quist, J.J., Van Velsen, A.F.M., Thomassen, P.H.G., Olijve, M., 1998a. A rapid method for predicting the residual concentration after biological treatment of oilpolluted soil. In: *Contaminated Soil '98*, vol. 1. Thomas Telford, London, pp. 251–259.
232. Vouillamoz, J., Milke, M.W., 2001. Effect of compost in phytoremediation of diesel-contaminated soils. *Water Science and Technology* **43(2)**, 291–295.
233. Wahle, U., Kordel, W., 1997. Development of analytical methods for the assessment of ecotoxicological relevant soil contamination. 1. Development and improvement of soil extraction methods for the determination of the bioavailable parts of contaminants. *Chemosphere* **35**, 223–237.
234. Waltera, M., Wilsona, K.B., Boulb, L., Fordc, C., McFaddend, D., Chongc, B., Pinfold, J., 2005. Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **56**, 51–57.

235. Walworth, J., Braddock, J., Woolard, C., 2001. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soils. *Cold Regions Sciences and Technology* **32**, 85–91.
236. Wang, J.-M., Marlowe, E.M., Miller–Maier, R.M., Brusseau, M.L., 1998. Cyclodextrin–enhanced biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1907–1912.
237. Wang, Z., Fingas, M., Sergy, G., 1994. Study of 22–Year–Old Arrow Oil Samples Using Biomarker Compounds by GC/MS. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1733–1746.
238. Wang, Z., Yang, C., Fingas, M., Hollebone, B., Peng, X., Hansen, B.A., Christensen, H.J., 2005. Characterization, weathering, and application of sesquiterpanes to source identification of spilled lighter petroleum products. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 8700–8707.
239. Weisman, W., 1998. TPHCWG, *Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series Volume 1: Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media*, Amherst Scientific, Amherst, MA, 1998.
240. White, J.C., Hunter, M., Pignatello, J.J., Alexander, M., 1999. Increase in bioavailability of aged phenanthrene in soils by competitive displacement with pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 1728–1732.
241. Widdel, F., Rabus, R., 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol.* **12**, 259–276.
242. Wilkes, H., Kuhner, S., Bolm, C., Fischer, T., Classen, A., Widdel, F., Rabus, R., 2003. Formation of n–alkane and cycloalkane–derived organic acids during anaerobic growth of a denitrifying bacterium with crude oil. *Org Geochem.* **34**, 1313–1323.
243. Wilson, M.S., Bakermans, C., Madsen, E.L., 1999. In situ, real–time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 80–87.
244. Winningham, J., Britto, R., Patel, M., McInturff, F., 1999. A landfarming field study of creosote–contaminated soil. In: Leeson, A., Alleman, B. C., (Ed), *Bioremediation technologies for PAH compounds* (pp. 37–42). Battelle, Columbus, OH.
245. Wodzinski, R.S., Coyle, J.E., 1974. Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. *Appl Microbiol* **27**, 1081–1084.
246. Xing, B., Pignatello, J.J., 1997. Dual–model sorption of low–polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. *Environmental Science and Technology* **31**, 792–799.
247. Yeom, I.T., Ghosh, M.M., Cox, C.D., Ahn, K.H., 1996. Dissolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from weathered contaminated soil. *Water Science and Technology* **34**, 335–342.
248. Yerushalmi, L., Rocheleau, S., Cimpoia, R., Sarrazin, M., Sunahara, G., Peisajovich, A., Leclair, G., Guiot, S.R., 2003. Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil, *Bioremediation Journal* **7(1)** 37–51.
249. Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, Q.L., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* **368**, 456–464.
250. Zhan, H., Park, E., 2002. Vapor flow to horizontal wells in unsaturated zones. *Soil Science Society of America Journal* **66(3)**, 710–721.

251. Zhang, C., Daprato, R.C., Nishino, S.F., Spain, J.C., Hughes, J.B., 2001. Remediation of dinitrotoluene contaminated soils from former ammunition plants: Soil washing efficiency and effective process monitoring in bioslurry reactors. *Journal of Hazardous Materials* **87(1-3)**, 139–154.
252. Zheljzkov, D.V., Craker, E.L., Xing, B., 2006. Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environmental and Experimental Botany* **58**, 9–16.

BIOGRAFIJA



Ime i prezime: Snežana Maletić

Datum rođenja: 20.09.1980.

Mesto rođenja: Indija, Srbija.

Obrazovanje:

2003 - diplomirala na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, Departman za hemiju, sa prosečnom ocenom 9,23.

2004 – upisala doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, gde je položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9,88.

Zaposlenje:

2004 – Istraživač pripravnik na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu

2008 - Istraživač saradnik na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu

Publikacije:

Autor i koautor 1 rada u vodećim časopisu međunarodnog značaja (M23), 3 saopštenja na međunarodnim konferencijama (M33), 2 predavanja po pozivu na konferencijama nacionalnog značaja (M61) i 21 saopštenja na domaćim konferencijama (M63 i M64), 8 poglavlja u knjigama koja se koriste kao pomoćna sredstva u nastavi na osnovnim i posle diplomskim studijama.

Saradnja:

2008 - u okviru FP6 projekta, boravila na dvomesečnom usavršavanju na Univerzitetu u Aberdinu, Škotska na Institutu za nauku o zemljištu.

Članstvo u naučnim i drugim asocijacijama: IWA – International Water Association, Srpsko hemijsko društvo, Jugoslovensko društvo za zaštitu voda, Udruženje za tehnologiju vode i sanitarno inženjerstvo.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije: monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa: tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada: doktorska disertacija

VR

Autor: Snežana Maletić, dipl. hem.

AU

Mentor: dr Božo Dalmacija, red. profesor PMF-a u Novom Sadu

MN

Naslov rada: Karakterizacija biodegradabilnosti naftnih ugljovodonika u zemljištu i bioremedijacionih procesa u toku tretmana biogomilama i površinskom obradom

NR

Jezik publikacije: srpski (latinica)

JP

Jezik izvoda: s/e

JI

Zemlja publikovanja: R Srbija

ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina

ZGP

Godina: 2010.

GO

Izdavač: Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

MA

Fizički opis rada: (6/168/252/52/79/-/-)

(broj poglavlja/strana/lit.citata/tabela/slika/grafika/priloga)

FO

Naučna oblast: hemija

NO

Naučna disciplina: zaštita životne sredine

ND

Predmetna odrednica/Ključne reči: bioremedijacija, biodegradacija, naftno zagađenje, ugljovodonici, zemljište, kinetika, starenje zagađujućih materija, biodostupnost.
PO

UDK:

Čuva se: Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF-a u Novom Sadu
ČU

Važna napomena:

VN

Izvod:

U okviru ovog istraživanja ispitani su: (1) Proces koji se odvijaju prilikom bioremedijacije zemljišta zagađenog naftom i derivatima nafte, koje je bilo izloženo spontanim abiotičkim i biotičkim procesima degradacije u toku 8 godina, tehnikama biogomila i površinske obrade na poluindustrijskoj (pilot) skali uz optimizaciju tehnoloških parametara sa ciljem povećanja efikasnosti i efektivnosti biodegradacije ugljovodonika; (2) Uticaj starenja, koncentracije, biodostupnosti i strukture zagađujućih materija na procese biodegradacije i biotransformacije u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Tokom dve godine bioremedijacionog tretmana sadržaj mineralnih ulja opao je za 52% (od 27,8 g/kg do 13,2 g/kg) i 53% (od 23,2 g/kg do 10,8 g/kg), dok je sadržaj ukupnih ugljovodonika opao za 43% (od 41,4 g/kg do 23,4 g/kg) i 27% (od 35,3 g/kg do 25,8 g/kg) u biogomili i površinskoj obradi respektivno. Efikasnost uklanjanja mineralnih ulja iz zemljišta u dva posmatrana bioremedijaciona tretmana je praktično ista. Međutim, u pogledu sadržaja ukupnih ugljovodonika u biogomili uklonjeno je dva puta više ukupnih ugljovodonika (gledajući apsolutnu količinu ukupno uklonjenih ugljovodonika). Kinetika biodegradacije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika u toku tretmana u biogomili u saglasnosti je sa kinetičkim modelima $\ln C = \ln C_0 - kt$ i $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$. Kinetika biodegradacije mineralnih ulja u toku površinske obrade relativno se dobro može opisati sa dva pomenuta kinetička modela, međutim, znatno bolju korelaciju pokazao je linearni model ($C = C_0 - kt$) primenjen na prvih 92 i poslednjih 200 dana eksperimenta. Promena sadržaja ukupnih ugljovodonika u toku površinske obrade zagađenog zemljišta relativno je u dobroj korelaciji samo sa kinetičkim modelom $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$. Laboratorijska ispitivanja pokazala su da biodegradabilnost i sudbina ugljovodonika u životnoj sredini jako zavise od tipa, starosti i koncentracije zagađujućih materija. Naime, u slučaju zemljišta sveže kontaminiranog dizel uljem, već pri koncentracijama od 20 mg/g uočen toksičan efekat koji je prevaziđen nakon dve nedelje tretmana kao posledica smanjenja prekomerne koncentracije rastvorenih ugljovodonika biotičkim i abiotičkim putem i adaptacije prisutne mikroflore. U slučaju većih koncentracija ovaj efekat je bio još izraženiji. Kod zemljišta kontaminiranog sirovom naftom isti efekat se javlja tek pri koncentraciji od 35 mg/g, kao posledica toga da sirova nafta sadrži manju količinu lako rastvornih ugljovodonika. Za razliku od sveže kontaminiranog zemljišta, na biodegradaciju starog naftnog zagađanja u zemljištu koncentracija nije imala uticaj, u ovakvom zemljištu respiracija je bila na veoma niskom nivou pri svim ispitivanim koncentracijama, ali ne kao posledica toksičnosti, već kao posledica činjenice da se degradabilni deo zagađujućih materija degradirao tokom procesa starenja, tako da su u zemljištu zaostali visokomolekularni teško rastvorni ugljovodonici (smole, asfaltne komponente i dr.) sekvestrovani u zemljištu. Merenja

biodostupnosti ugljovodonika (ekstrakcijom sa Tween80) pokazala su da je u zemljištu sveže kontaminiranom dizel uljem i sirovom naftom i starim naftnim zagađenjem oko 95%, 85% i 40% ugljovodonika biodostupno, respektivno. Koncentracija rezidualne frakcije mineralnih ulja i ukupnih ugljovodonika dobijena nakon 48 dana laboratorijskog tretmana u skoro svim probama je veća od predviđenih, što je posledica bifaznog ponašanja ugljovodonika u zemljištu, gde se jedan deo uklanja biodegradacijom, dok drugi deo difunduje u pore zemljišta i kompleksira se sa zemljišnom organskom materijom. Količina ugljovodonika iz starog naftnog zagađenja zemljišta koja može da pređe u vodenu fazu je mala reda veličine nekoliko mg/l, međutim, u prirodnim uslovima usled spiranja ugljovodonika sa zemljišta kišom, postoji verovatnoća da ovi ugljovodonici dospeju u podzemnu vodu iznad maksimalno dozvoljene koncentracije za vodu za piće (MDK = 10 µg/l) i na taj način degradiraju njen kvalitet. Zbog nemogućnosti daljeg uklanjanja zagađenja bioremedijacijom, preostala količina zagađujućih materija koja može dospeti u vodenu fazu bi trebalo da se ukloni nekim drugim remedijacionim tehnikama pre njegovog konačnog bezbednog odlaganja u životnu sredinu.

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN Veća: 28.05.2009.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik: dr Elvira Karlović, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu

Član: dr Božo Dalmacija, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu, mentor

Član: dr Srđan Rončević, docent PMF-a u Novom Sadu

Član: dr Mile Klašnja, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: monographic publication

DT

Type of record: Textual material, printed

TR

Contents code: theses

CC

Author: Snežana Maletić, BSc.

AU

Mentor: dr Božo Dalmacija, Full Professor

MN

Title: Characterisation of the biodegradability of petroleum hydrocarbons in soil and the bioremediation processes during treatment by biopiles and landfarming

TI

Language of text: Serbian

LT

Language of abstract: Serbian/English

LA

Country of publication: R Serbia

CP

Locality of publication: AP Vojvodina

LP

Publication year: 2010.

PY

Publisher: Authors reprint

PU

Publ.place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

PP

Physical description: (6/168/252/52/79/-/-)

(chapters/pages/literature/tables/pictures/graphs/additional lists)

PD

Scientific field: Chemistry

SF

Scientific discipline: Environmental protection

SD

Subject/Key words: bioremediation, biodegradation, petroleum contamination, hydrocarbons, soil, kinetics, contamination weathering, bioavailability.

SKW

UC:

Holding data: Library on the Department of Chemistry, biochemistry and environmental protection, Faculty of Sciences, 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3.

HD

Note:

N

Abstract:

The aims of this study were to examine: (1) the processes that occur during bioremediation of soil contaminated by oil and oil derivatives, which was exposed to spontaneous abiotic and biotic degradation processes over 8 years, using pilot scale biopiles and landfarming techniques to optimise technological parameters with the aim of increasing the efficiency and effectiveness of hydrocarbons biodegradation. (2) the effect of contaminants weathering, concentration, bioavailability and structure on the biodegradation and biotransformation process under controlled laboratory conditions. Over the two years of bioremediation treatment by biopiles and landfarming, the mineral oil content decreased by 52% (from 27.8 g/kg to 13.2 g/kg) and 53% (from 23.2 g/kg to 10.8 g/kg), and the total hydrocarbon content decreased by 43% (from 41.4 g/kg to 23.4 g/kg) and 27% (from 35.3 g/kg to 25.8 g/kg), respectively. The efficiency of mineral oil removal from soil in these two applied bioremediation treatments was practically the same. However, in terms of the absolute amount of total hydrocarbons, twice as many total hydrocarbons were removed in the biopile. The mineral oil and total hydrocarbons biodegradation kinetics in the biopile were in good agreement with the kinetic models $\ln C = \ln C_0 - kt$ and $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$. The mineral oil biodegradation kinetics during the landfarming treatment is relatively well described with those two kinetic models, however, significantly better correlation is obtained by the linear model ($C = C_0 - kt$) applied to the first 92 and last 200 days of the experiment. The change in total hydrocarbons content during the landfarming treatment is in relatively good correlation only with the kinetic model $\ln C = \ln C_0 - kt^{0.5}$. The laboratory biodegradation investigation showed that hydrocarbon biodegradability and its fate in the environment strongly depend upon the structure, concentration and weathering of the hydrocarbons. Thus, in the case of diesel contaminated soil, as a consequence of its structure, i.e. the presence in a higher concentration of the soluble and toxic midrange n-alkanes, a toxic effect is detected at a diesel oil concentration of 20 mg/g, although this effect is overcome after two weeks, as a consequence of the decreasing concentration of soluble hydrocarbons in biotic and abiotic processes and microbial adaptation. This effect was more pronounced in the case of the soil with the highest diesel oil concentration. In crude oil contaminated soil, a toxic effect was observed at a much higher hydrocarbon concentration (35 mg/g) than in the diesel oil contaminated soil, which corresponds to the fact that crude oil contains significantly less soluble hydrocarbon. In contrast to these two freshly contaminated soils, the weathered contaminated soil contaminant concentration did not have an effect on hydrocarbon biodegradation, with biodegradation in this soil actually at a low level at all concentrations, not as a consequence of toxicity, but because the degradable part of the contaminant was already degraded during the weathering process, leaving behind only highly condensed

hydrophobic organic contaminants (asphaltenes, resins, etc.) sequestered in the soil. The data obtained for hydrocarbons bioavailability (by Tween80 extraction) showed that the bioavailable hydrocarbon fraction from soils freshly contaminated with diesel oil and crude and weathered oil contamination were approximately 95%, 85% and 40%, respectively. The concentration of residual mineral oil fractions and total hydrocarbons obtained after 48 days of laboratory biodegradability treatment in almost all batches was greater than predicted, as a result of the biphasic behaviour of hydrocarbons in the soil, where some were degraded or lost from the soil and some transformed into the recalcitrant fraction. The amount of hydrocarbons from the weathered soil contamination that can be transferred into the water phase is small, of the order of a few mg/l in magnitude, however, under natural conditions, due to hydrocarbons leaching by rainfall, it is possible that these hydrocarbons infiltrate groundwater above the maximum permissible concentration for drinking water (MAC = 10 µg/l) and thus degrade its quality. As it is not possible to achieve further contamination degradation by bioremediation, the remaining amount of pollutants which can be transferred into the water phase should be removed by some other remediation techniques before its final safe disposal in the environment.

A

Accepted by the Scientific Board on: 28.05.2009.

ASB

Defended:

DE

Thesis defend board:

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

President: Dr. Elvira Karlović, Full Professor, Faculty of Science, Novi Sad

Member: Dr. Božo Dalmacija, Full Professor, Faculty of Science, Novi Sad, mentor

Member: Dr. Srđan Rončević, Assistant Professor, Faculty of Science, Novi Sad

Member: Dr. Mile Klašnja, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad