

**Univerzitet u Beogradu**

**HEMIJSKI FAKULTET**



**Jelena S. Avdalović**

**NASTANAK ZEMLJIŠTA U PROCESIMA  
BIOREMEDIJACIJE**

**– Doktorska disertacija –**

**Beograd, 2015.**

Универзитет у Београду

ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ



Јелена С. Авдаловић

**НАСТАНАК ЗЕМЉИШТА У ПРОЦЕСИМА  
БИОРЕМЕДИЈАЦИЈЕ**

– Докторска дисертација –

Београд, 2015.

**University of Belgrade**

**FACULTY OF CHEMISTRY**



**Jelena S. Avdalović**

**GENERATING OF SOIL IN THE PROCESS OF  
BIOREMEDIATION**

**– Doctoral Dissertation –**

**Belgrade, 2015.**

***Mentori:***

Dr Miroslav M. Vrvic, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Mila Ilic, istraživač saradnik  
Institut za hemiju tehnologiju i metalurgiju  
Univerzitet u Beogradu

***Članovi komisije:***

Dr Branimir Jovančičević, vanredni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Vladimir Beškoski, docent  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

***Datum odbrane:***

# Nastanak zemljišta u procesima bioremedijacije

## Izvod

Napredak tehnologije i industrije u poslednjih sto godina, porast populacije i razvoj velikih gradova, dovode do generisanja otpada čija količina prevazilazi sposobnost prirode za samoprečišćavanjem. Nagomilavanje otpadnog materijala različitog porekla dovodi do sve većeg zagađenja životne sredine uključujući i zemljište. Otpadne supstance koje se ne mogu razgraditi degradiraju zemljište, i prouzrokuju poremećaje normalnih procesa u njemu, sa negativnim posledicama po ekosistem i zdravlje ljudi.

Nafta kao i njeni derivati predstavljaju jedan od najvećih i najopasnijih zagađivača životne sredine, a samim tim i zemljišta. Do zagađenja naftom i naftnim derivatima može doći usled njene eksploatacije, prerade, transporta, skladištenja i korišćenja, ali i usled slučajnih izlivanja. Metoda koja se poslednjih godina sve više koristi za saniranje posledica usled zagađenja naftom je bioremedijacija.

Bioremedijacija je proces koji se bazira na prirodnom kapacitetu mikroorganizama za degradaciju ili transformaciju toksičnih supstanci u životnoj sredini u bezopasne proizvode. Bioremedijacione tehnologije su u skladu sa principima održivog razvoja, jer ne generišu otpad, a tretirano zemljište može da povrati svoju prirodnu biološku aktivnost.

Cilj ovog rada je bio da se ispita primena različitih mikroorganizama kao „bioloških agenasa“, kroz dva procesa od suštinskog značaja za nastanak zemljišta. Prvi podrazumeva ispitivanje zimogenog aktivnog konzorcijuma mikroorganizama za *ex situ* bioremedijaciju složenog naftnog kontaminanta u sloju veštačkog zemljišnog supstrata, sa rečnim peskom kao matičnom stenom, uz simultano praćenje procesa humifikacije. Mobilizacija fosfora posredstvom mikroorganizama je druga grupa procesa, koja je proučavana u ovom radu, tako što su korišćeni fosfatna ruda i koncentrat pirita kao supstrat, uz dodatak acidofilne bakterijske kulture *Acidithiobacillus sp.* kao katalizatora.

Istraživanja bazirana na simultanoj bioremedijaciji i humifikaciji obuhvatila su tri eksperimenta.

U prvom pilot eksperimentu koji je trajao 6 meseci *ex situ* bioremedijacijom je tretirano 150 m<sup>3</sup> zemljišta kontaminiranog različitim naftnim derivatima. Sadržaj ukupnih naftnih ugljovodonika je smanjen sa početnih 30 g/kg suve supstance na 2,2 g/kg suve supstance, dok je sadržaj huminskih kiselina porastao za 47%. Analiza huminskih kiselina iz ispitivanih uzoraka je pokazala da se tokom bioremedijacije menja i struktura huminskih kiselina, tj. smanjuje se sadržaj alifatičnog ugljenika, a povećava se sadržaj aromatičnog i karbonilnog ugljenika. Step en aromatičnosti molekula huminskih kiselina je porastao sa 24,9% na 28,9% tokom bioremedijacije.

U drugom pilot eksperimentu koji je trajao 90 dana, izvedena je bioremedijacija složenog naftnog zagađivača u sloju veštačkog zemljišnog supstrata, sa rečnim peskom kao matičnim supstratom. Jedan sud je predstavljao kontrolu haldu i u njemu su bili umešani piljevina, pesak i zagađivač. Drugi sud je predstavljao inokulisanu haldu, pripremljen je na isti način kao i kontrola, te su pored piljevine, peska i zagađivača dodati biostimulatori, izvori azota i fosfora i biomasa. Početna vrednost ukupnih naftnih ugljovodonika u pilot postrojenju je iznosila 22,35 g/kg suve supstance. Na kraju eksperimenta, ukupni ugljovodonici su pali na 7,12 g/kg suve supstance u inokulisanoj haldi, dok je u kontrolnoj haldi ta vrednost iznosila 19,21 g/kg suve supstance. Porast sadržaja huminskih kiselina od 0,23% do 0,70% u inokulisanoj haldi je primećen tokom bioremedijacionog procesa, dok je u kontrolnoj haldi porast u sadržaju huminskih kiselina bio neznatan. Dodatne analize huminskih kiselina iz inokulisanе halde pokazuju da se one transformišu tokom procesa i da na kraju imaju veći stepen aromatičnosti, veći redoks i puferski kapacitet, nego na početku.

U trećem eksperimentu je praćenje procesa bioremedijacije složenih kontaminanata (mešavina mazuta i katalizatora) iz naftne industrije izvedeno, takođe, u sloju veštačkog zemljišnog supstrata, kao i drugi eksperiment, ali pri različitim uslovima, kako bi se utvrdilo koji od faktora najviše utiče na brzinu razgradnje i transformacije zagađivača. Eksperiment se sastojao iz pet haldi, pri čemu se svaka halda sastojala iz peska, piljevine i složenog kontaminanta. Sve halde su sadržale navedene sastojke u istoj količini kao i kontrola, samo su se razlikovale u uslovima pod kojima je izvedena biodegradacija. Prva halda je predstavljala kontrolu, druga aerisanu haldu, treća biostimulisanu, četvrta aerisanu i biostimulisanu, a peta aerisanu, biostimulisanu i inokulisanu haldu. Eksperiment bioremedijacije je trajao 170 dana.

Dobijeni rezultati pokazuju da u svim haldama dolazi do razgradnje ukupnih naftnih ugljovodonika, dok je najveći procenat razgradnje ugljovodonika zabeležen u petoj haldi i on je iznosio 64,64%. Analize huminskih kiselina iz pete halde pokazuju, da osim porasta koncentracije huminskih kiselina za 21% nakon 170 dana eksperimenta, dolazi do promene i u njihovoj strukturi. Kao i u prethodnom eksperimentu, analize huminskih kiselina iz inokulisane halde pokazuju da se dešava njihova transformacija tokom proceda bioremedijacije, i da one na kraju imaju veći stepen aromatičnosti kao i veći redoks i puferski kapacitet, nego na početku.

Urađena je i gel hromatografija uzoraka huminskih kiselina, izolovanih iz pete halde tokom bioremedijacionog procesa. Rezultati pokazuju da je nultog dana udeo frakcije velike molekulske mase (veće od 100 kDa) iznosio je 72,67% dok je nakon 170 dana od početka procesa udeo navedene frakcije iznosio 76,17%. Pretpostavka je da se nerazgrađene organske komponente transformišu i uključuju u složene polimerne strukture analogne huminskim supstancama.

Istraživanje bazirana na ispitivanju mikrobiološkog rastvaranja fosfata iz fosfatne rude dejstvom *Acidithiobacillus sp. B2* u prisustvu pirita je trajalo je 28 dana. Mešavina rude sa kojom je izveden eksperiment sastojala se iz 70% fosfatne rude i 30% koncentrata pirita, dok je gustina pulpe iznosila 10%. Kao kontrola je upotrebljena suspenzija istovetnog sastava u kojoj su mikroorganizmi inaktivirani sterilizacijom. Dobijeni rezultati pokazuju da je u suspenziji sa gvožđe-oksidujućim *Acidithiobacillus sp. B2* rastvoreno 34,5% neorganskog  $P_2O_5$ , dok je za isto vreme u kontrolnoj suspenziji procenat rastvaranja  $P_2O_5$  bio 3,8%.

Ključne reči: humifikacija, huminske kiseline, bioremedijacija, gvožđe(II)-oksidujuća bakterija *Acidithiobacillus sp. B2*, fosfatna ruda

Naučna oblast: biohemija

Uža naučna oblast: mikrobiološka hemija i biotehnologija

UDK: 577

# Generating of soil in the procees of bioremediation

## Abstract

The advance of technology and industry in the last hundred years, population growth and the development of big cities have led to the production of waste materials in quantities which exceed self-purification capacity of nature. The accumulation of waste materials of various origin causes increased pollution of the environment, including soil. Nondegradable waste materials degrade soil and disrupt normal soil processes, which has negative effects on the ecosystem and human health.

Petroleum and its derivatives are one of the major and most dangerous pollutants of soil. Pollution by petroleum and petroleum derivatives is caused by its exploitation, processing, transport, storage and use, but also by accidental spills. Bioremediation is a method of reducing petroleum pollution which has been widely used in the last years.

Bioremediation is a process which is based on the natural capacity of microorganisms to degrade or transform toxic substances from the environment into harmless products. Bioremediation technologies are in harmony with the principles of sustainable development since waste materials are not generated, and the treated soil can recover its natural biological activity.

The aim of this paper is to study the use of different microorganisms as “biological agents” through two processes which are of crucial importance for soil formation. The first one includes the study of an active consortium of zymogenous microorganisms for *ex situ* bioremediation of a complex petroleum contaminant in the layer of artificial soil substrate with river sand as parent material, along with simultaneous monitoring of the humification process. Phosphorus mobilisation by microorganisms is the second group of processes studied in this paper and in this study phosphate ore and pyrite concentrate are used as substrate while the culture of acidophilic bacteria *Acidithiobacillus sp.* was added as a catalyst.

The studies based on simultaneous bioremediation and humification included three experiments.



In the first pilot experiment, which lasted for 6 months, 150 m<sup>3</sup> of soil contaminated by various petroleum derivatives was treated by *ex situ* bioremediation. The TPH content was reduced from the initial 30 to 2,2 g/kg, while the content of humic acids increased by 47%. The analysis of humic acids from the studied samples showed that the structure of humic acids changed during bioremediation, i.e. the content of aliphatic carbon was reduced, while the content of aromatic and carboxylic carbon was increased. The degree of aromaticity of molecules of humic acids increased from 24,9% to 28,9% during bioremediation.

In the second pilot experiment, which lasted for 90 days, bioremediation of a complex petroleum pollutant was carried out in the layer of artificial soil substrate, with river sand as mother substrate. One container was a control biopile and it contained a mixture of sawdust, sand and the pollutant. The second container was an inoculated biopile and it was prepared in the same way as the control biopile but, in addition to sawdust, sand and the pollutant, it also contained biostimulants, the sources of nitrogen and phosphorus, and biomass. The initial value of petroleum hydrocarbons in the pilot biopile was 22,35 mg/kg s.s.. At the end of the experiment, the total hydrocarbons were reduced to 7,12 mg/kg s.s. in the inoculated biopile, while the value was 19,21 mg/kg s.s. in the control biopile. It was observed that the content of humic acids increased from 0,23% to 0,70% in the inoculated biopile during the bioremediation process, while the increase in the content of humic acids in the control biopile was insignificant. Additional analyses of humic acids from the inoculated biopile showed that they were transformed during the process and that they had a higher degree of aromaticity as well as greater redox and buffering capacity at the end of the experiment.

In the third experiment, the monitoring of the process of bioremediation of complex contaminants (a mixture of mazut and a catalyst) from petroleum industry was also carried out in the layer of artificial soil substrate (just like in the second experiment), but under different conditions in order to determine which of the factors had the greatest influence on the speed of degradation and transformation of pollutants. The experiment included five biopiles, and each biopile consisted of sand, sawdust and a complex contaminant. All biopiles contained the abovementioned ingredients in the same quantity as the control biopile, they differed only in the conditions under which the bioremediation was carried out. The first biopile was the control biopile, the second

one was aerated, the third one was biostimulated, the fourth one was both aerated and biostimulated, and the fifth one was an aerated, biostimulated and inoculated biopile. The bioremediation experiment lasted for 170 days.

The obtained results showed that total petroleum hydrocarbons were degraded in all biopiles, but the highest percentage of degradation of hydrocarbons was observed in the fifth biopile and it was 64,64%. The analyses of humic acids from the fifth biopile showed that, apart from the increase in the concentration of humic acids by 21% after 170 days of experiment, their structure was changed as well. Just like in the previous experiment, the analyses of humic acids from the inoculated biopile showed that they were transformed during the bioremediation process and that they had a higher degree of aromaticity as well as greater redox and buffering capacity than at the beginning. In addition to this, gel chromatography was performed on the samples of humic acids isolated from the fifth biopile during the bioremediation process. The results showed that on day 0 the share of fraction of great molecular mass (greater than 100 kDa) was 72,67%, while the share of the abovementioned fraction was 76,17% 170 days after the beginning of the process, which was probably due to the fact that undegraded organic compounds were transformed and included in complex polymer structures which are analogues of humic substances.

The research based on the study of microbiological dissolution of phosphates from phosphate ore by the action of *Acidithiobacillus sp. B2* in the presence of pyrite lasted for 28 days. The mixture of ores which was used in the experiment contained 70% of phosphate ore and 30% of pyrite concentrate. A suspension of the identical composition in which microorganisms were inactivated by sterilization was used as the control suspension. The obtained results showed that 34,5% of inorganic  $P_2O_5$  was dissolved in the suspension with iron-oxidizing *Acidithiobacillus sp. B2*, while the percentage of dissolved  $P_2O_5$  was 3,8% in the control suspension.

Keywords: humification, humic acids, bioremediation, iron(II)-oxidizing *Acidithiobacillus sp. B2*, phosphate rock

*Mojim dragim roditeljima, supruhu i našim devojčicama*

*Ova doktorska teza je urađena u laboratoriji Grupe za mikrobiološku hemiju (GMBH), Katedre za biohemiju, Hemijskog fakulteta.*

*Temu za rad je predložio i radom neposredno rukovodio dr Miroslav M. Vrvić, redovni profesor, mentor ovog rada. Izražavam duboko poštovanje prema mom Profesoru i iskrenu zahvalnost na ukazanom poverenju, znanju koje nesebično prenosi i podršci koju mi svakodnevno pruža. Bez njegovih korisnih sugestija sa jedne strane i potpune slobode u radu sa druge strane, rad na ovoj tezi ne bi bio tako prijatno i uspešno iskustvo.*

*Dr Mili Ilić, naučnom saradniku, i dr Vladimiru Beškoskom, docentu, se zahvaljujem na pomoći koju su mi pružili tokom izrade ove doktorske disertacije, i svemu što sam od njih naučila.*

*Zahvaljujem se mojim dragim studentkinjama Bojani Živanović i Olgi Božović, na pomoći tokom rada na ovoj disertaciji.*

*Zahvalnost dugujem i svim divnim kolegama na podršci i korisnim sugestijama iz GMBH dr Gordani-Gojgić Cvijović, dr Jeleni Milić, dr Nikoleti Lugonji, dr Snežani Spasić, dr Dragici Jakovljević, Jovani Stefanović-Kojić i dr Srđanu Miletiću, kome sam posebno zahvalna za pomoć na terenskim zadacima.*

*Zahvaljujem se mojim roditeljima, suprugu Vladimiru i našim devojčicama, na beskrajnoj ljubavi, podršci, razumevanju i strpljenju tokom svih ovih "studentskih" godina.*

*Beograd, jun 2015.*

*Autor*

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	1
<b>2. Pregled literature</b>	
<b>2.1. Zemljište</b>	4
2.1.1. Nastanak zemljišta	4
2.1.2. Zemljište kao višefazni sistem	6
2.1.2.1. Mineralni deo zemljišta	7
2.1.2.1.1. Hemijski sastav mineralnog dela zemljišta	8
2.1.2.1.2. Primarni i sekundarni minerali	9
2.1.2.2. Organski deo zemljišta	10
2.1.2.3. Priroda zemljišnog humusa	12
2.1.2.3.1. Humin	14
2.1.2.3.2. Fulvo kiseline	14
2.1.2.3.3. Huminske kiseline	15
2.1.2.4. Formiranje huminskih supstanci	17
2.1.2.4.1. Lignin teorija nastanka huminskih supstanci	18
2.1.2.4.2. Polifenolna teorija sa ligninom kao izvorom fenola	21
2.1.2.4.3. Polifenolna teorija sa alternativnim izvorima fenola	23
2.1.2.4.4. Teorija o kondenzaciji amino-šećera	24
<b>2.2. Zagađenje zemljišta</b>	25
2.2.1. Zagađenje zemljišta naftom i derivatima nafte	26
2.2.2. Toksično delovanje naftnih ugljovodonika	27
<b>2.3. Bioremedijacija</b>	28
2.3.1. Faktori koji utiču na process biodegradacije naftnih ugljovodonika	29
2.3.1.1. Naftni ugljovodonici kao supstrat za bioremedijaciju	29
2.3.1.2. Karakteristike samog zemljišta	30
2.3.1.2.1. Kiseonik	30
2.3.1.2.2. Hranljive supstance	31
2.3.1.2.3. Vlaga	31
2.3.1.2.4. Temperatura	31
2.3.1.2.5. pH vrednost	31
2.3.1.2.6. Surfaktanti	32
2.3.1.2.7. Tekstura zemljišta	32
2.3.1.3. Mikroorganizmi	32
2.3.1.4. Putevi degradacije ugljovodonika nafte	33
2.3.1.4.1. Aerobna razgradnja	34
2.3.1.4.2. Anaerobna razgradnja	42
2.3.2. Tehnologije bioremedijacije	42
2.3.2.1. <i>In situ</i> tehnike bioremedijacije	42
2.3.2.2. <i>Ex situ</i> tehnike bioremedijacije	44
2.3.3. Prednosti i mane bioremedijacije	46
2.3.4. Veza između bioremedijacije i humifikacije	47

<b>3. Materijal i metode</b>	
<b>3.1. Analitičke metode</b>	50
3.1.1. Temperatura	50
3.1.2. Potencijometrijsko određivanje pH vrednosti	50
3.1.3. Retencioni vodeni kapacitet	50
3.1.4. Određivanje vlage	50
3.1.5. Određivanje ukupnog sadržaja pepela	51
3.1.6. Određivanje sadržaja karbonata	51
3.1.7. Određivanje koncentracije fosfora u čvrstim uzorcima	51
3.1.8. Gravimetrijsko određivanje ukupnih naftnih ugljovodonika	51
3.1.9. Izolovanje huminskih kiselina	52
3.1.9.1. Određivanje optičke gustine huminskih kiselina	52
3.1.9.2. Određivanje elementarne organske mikroanalize huminskih kiselina	53
3.1.9.3. Gel hromatografija uzoraka huminskih kiselina	53
3.1.9.4. Potencijometrijske titracije rastvora huminskih kiselina	53
3.1.10. Ekstrakcija huminskih supstanci	54
3.1.11. Analiza fosfatne rude i pirira	56
<b>3.2. Mikrobiološke metode</b>	56
3.2.1. Podloge za određivanje broja mikroorganizama	56
3.2.1.1. Podloga za određivanje broja ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija	56
3.2.1.2. Podloga za određivanje broja kvasaca i plesni	57
3.2.1.3. Podloga za određivanje broja mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2	57
3.2.1.4. Podloga za određivanje broja ukupnih anaerobnih mezofilnih hemoorganoheterotrofnih bakterija	57
3.2.1.5. Podloga 9K za izolovanje i gajenje <i>Acidithiobacillus sp.</i>	58
3.2.2. Pomoćne mikrobiološke podloge i rastvori	55
3.2.2.1. Rastvor za pripremanje serijskih razblaženja	55
3.2.2.2. Ekstrakt zemlje	55
3.2.3. Određivanje broja mikroorganizama	55
3.2.4. Priprema i umnožavanje biomase konzorcijuma zimogenih mikroorganizama za reinokulaciju	55
3.2.5. Priprema bakterijske culture <i>Acidithiobacillus sp. B2</i> za eksperimente mikrobiološke mobilizacije fosfora iz fosfatne rude	61
3.3. Strukturno-instrumentalne metode	61
3.3.1. Spektrofluorimetrija uzoraka huminskih kiselina	61
3.3.1. Rendgenska difrakciona analiza	62
3.3.2. <sup>13</sup> C NMR spektroskopija	62
3.3.3. Infracrvena spektroskopija	62

## 4. Rezultati i diskusija

<b>4.1. Sinteza i transformacija huminskih supstanci tokom bioremedijacije naftnih zagađivača</b>	64
4.1.1. Prvi eksperiment	64
4.1.1.1. Izgradnja pilot halde za <i>ex situ</i> bioremedijaciju 150 m <sup>3</sup> zemljišta	64
4.1.1.2. Osnovni hemijski pokazatelji pilot <i>ex situ</i> bioremedijacionog procesa u Rafineriji nafte Pančevo	66
4.1.1.3. Mikrobiološki pokazatelji pilot <i>ex situ</i> bioremedijacionog procesa	69
4.1.1.4. Karakterizacija huminskih kiselina	70
4.1.1.4.1. Određivanje količine huminskih kiselina i parametra E4/E6	70
4.1.1.4.2. Nuklearna magnetna rezonanca uzoraka huminskih kiselina	72
4.1.1.4.3. Elementarna organska analiza huminskih kiselina i izračunati atomski odnosi H/C i O/C	73
4.1.2. Drugi eksperiment	74
4.1.2.1. Opis pilot eksperimenta	74
4.1.2.2. Hemijski i mikrobiološki pokazatelji procesa bioremedijacije	75
4.1.2.3. Karakterizacija huminskih kiselina	76
4.1.2.3.1. Elementarna organska analiza i E4/E6	76
4.1.2.3.2. FT-IR analiza	77
4.1.2.3.3. Potenciometrijske titracije rastvora huminskih kiselina	78
4.1.2.3.3. Humifikacioni parametri	79
4.1.3. Treći eksperiment	81
4.1.3.1. Opis eksperimenta	81
4.1.3.2. Mikrobiološki i hemijski pokazatelji procesa bioremedijacije	82
4.1.3.3. Karakterizacija huminskih kiselina	85
4.1.3.3.1. Gel hromatografija uzoraka huminskih kiselina	85
4.1.3.3.2. Spektrofluorimetrijska analiza	89
4.1.3.3.3. Potenciometrijske titracije rastvora huminskih kiselina	90
<b>4.2. Mikrobiološka mobilizacija fosfora iz fosfatne rude</b>	92
4.2.1. Opis eksperimenta	93
4.2.2. Izolovanje i karakterizacija mikroorganizma <i>Acidithiobacillus sp. B2</i>	93
4.2.2.1. Izolovanje mikroorganizama	93
4.2.2.1. Analiza 16S rRNA genske sekvence	94
4.2.2.3. Osnovne karakteristike izolovanog <i>Acidithiobacillus sp. B2</i>	94

4.2.3.	Karakteristike fosfatne ruda i pirita	95
4.2.3.1.	Fosfatna ruda	95
4.2.3.2.	Koncentrat pirita	96
4.2.4.	Rezultati ispitivanja rastvaranja fosfora iz mešavine fosfatne rude i pirita pomoću bakterijske kulture <i>Acidithiobacillus sp. B2</i>	97
5.	Zaključak	101
6.	Literatura	105
7.	Biografija	



## 1.UVOD

Nafta i njeni derivati su ključni energenti, a samim tim se i najmasovnije upotrebljavaju u svim domenima života i rada, tako da nas ne iznenađuje činjenica da je zagađenje životne sredine zagađivačima naftnog tipa uvek prisutan problem. Kada se nađu u životnoj sredini, nafta i njeni derivati, podležu brojnim fizičkim i hemijskim promenama, a najintenzivnije transformacije se dešavaju usled delovanja mikroorganizama. Upravo se na toj osobini bazira proces bioremedijacije, poslednjih godina veoma korišćen za saniranje zagađenja naftnog tipa. Naime, bioremedijacija je veoma važan transformacioni proces koji predstavlja razgradnju organske supstance pod uticajem mikroorganizama. Pod određenim uslovima, neke vrste mikroorganizama mogu da razgrade neka jedinjenja prisutna u nafti, koristeći ih kao izvor elektrona i energije, što za krajnji efekat ima smanjenje količine zagađivača u životnoj sredini. Bioremedijacione tehnologije su u skladu sa principima održivog razvoja, jer ne generišu otpad, a tretirano zemljište može da povрати svoju biološki vrednost.

Predmet ovog rada je bila primena različitih mikroorganizama kao „bioloških agenasa“ u remedijaciji, zaštiti i očuvanju životne sredine, koja je sagledana kroz dva procesa od suštinskog značaja za nastanak zemljišta. Prvi podrazumeva primenu zimogenog aktivnog konzorcijuma mikroorganizama za *ex situ* bioremedijaciju složenog naftnog kontaminanta u sloju veštačkog zemljišnog supstrata, sa rečnim peskom kao matičnom stenom, kao i praćenje procesa humifikacije, pošto su huminske supstance jedan od ključnih elemenata plodnosti zemljišta. Međutim, pored huminskih supstanci, za kvalitet zemljišta je od izuzetne važnosti i mobilizacija elemenata, a pre svih, fosfora i kalijuma, koja ima za cilj povećanje usvojivosti esencijalnih biogenih elemenata za ishranu biljaka. Mobilizacija fosfora posredstvom mikroorganizama je druga grupa procesa, koja je proučavana u ovom doktoratu, tako što su korišćeni fosfatna ruda i koncentrat pirita kao supstrat, uz dodatak kulture acidofilne tionske-gvožđe(II)-oksidujuće bakterije *Acidithiobacillus sp.*B2 kao katalizatora solubilizacije. Osnovna ideja je bila rastvaranja fosfata iz fosfatne rude, zahvaljujući bakterijski generisanom kiselom gvožđe(III)-sulfatu iz pirita, tj. *in situ* generisanje usvojivog fosfora.

U okviru ispitivanja prvog procesa, simultane bioremedijacije i humifikacije, bilo je potrebno rešiti sledeće zadatke:

1. Dizajnirati poluindustrijska postrojenja za bioremedijaciju složenog naftnog zagađivača.
2. Izolovati konzorcijume zimogenih mikroorganizama iz naftnog zagađivača, umnožiti ih i aplicirati u procesu bioremedijacije.
3. Pratiti promene osnovnih mikrobioloških i hemijskih pokazatelja biodegradacije.
4. Pratiti promene u sadržaju ukupnih naftnih ugljovodonika.
5. Pratiti promene u količini i strukturi huminskih kiselina za vreme procesa bioremedijacije.

U okviru proučavanja mikrobiološke mobilizacije fosfata iz fosfatne rude bilo je potrebno:

1. Izolovati i okarakterisati čistu kulturu *Acidithiobacillus sp. B2*.
2. Uraditi hemijsku karakterizaciju fosfatne rude.
3. Ispitati dinamiku i količinu izluženog-mobilizovanog fosfata iz fosfatne rude dejstvom bakterijske kulture *Acidithiobacillus sp. B2*.

Laboratorijski i pilot eksperimenti trebalo bi da daju značajne rezultate za razumevanje načina generisanja zemljišta, kroz proces simultane bioremedijacije i humifikacije, kao i kroz proces mikrobiološke solubilizacije fosfata iz fosfatne rude.

## 2. PREGLED LITERATURE

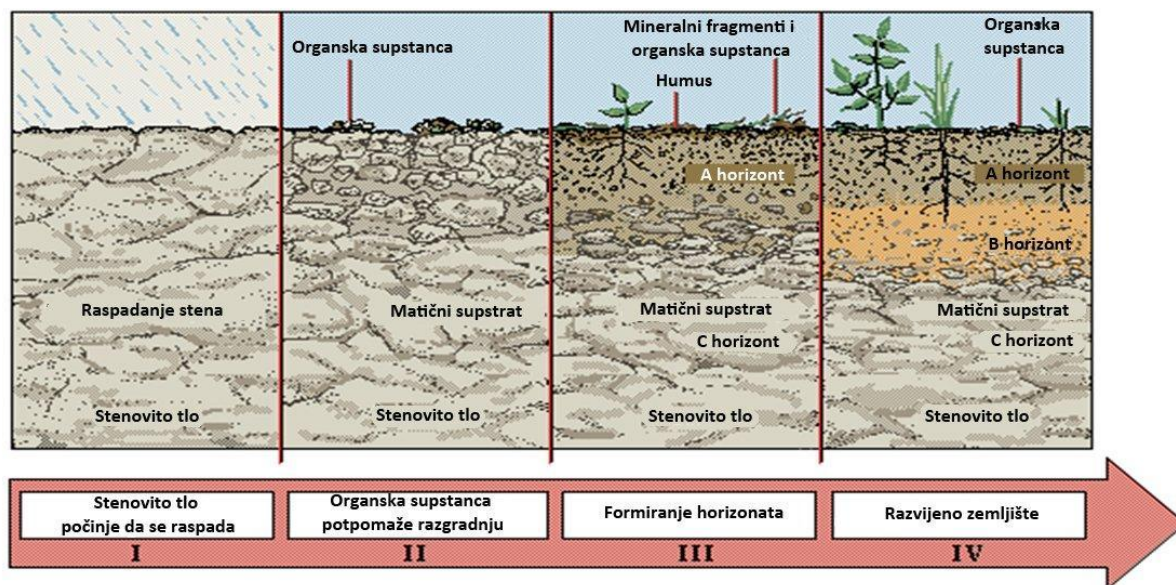
## **2.1. Zemljište**

Zemljište je površinski rastresiti sloj Zemljine kore (litosfere), nastao dugotrajnim procesima raspadanja matične geološke podloge u različitim klimatskim uslovima i pod složenim dejstvom živih organizama (mikroorganizama, gljiva, biljaka) (Veselinović i dr., 1995; Maier i dr. 2000).

Zemljište je sredina koja direktno učestvuje u razvoju živog sveta na Zemlji, jer pruža niz hranljivih sastojaka biljkama, a one kroz lanac ishrane i životinjama. Iz tog razloga zemljište predstavlja jedan od baznih činilaca životne sredine (Paul, 2007).

### **2.1.1. Nastanak zemljišta**

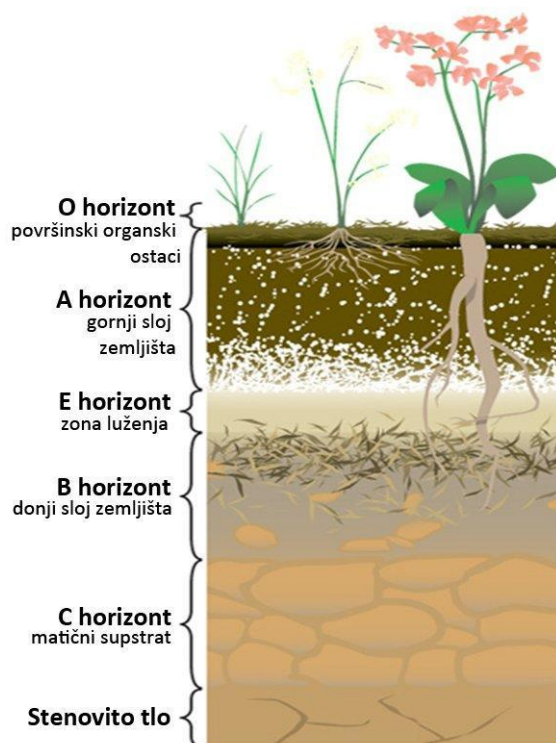
Osnovni faktori koji određuju sastav zemljišta su stene od kojih je zemljište nastalo, tj. njihov hemijski i mineraloški sastav. Razlaganjem različitih stena nastaju različite količine peska, gline i prašine praćene koloidnim česticama i rastvornim jedinjenjima. Sledeći faktor je klima, tj. padavine, temperature i vetar. Posle klime dolaze živi organizmi kao značajan činilac koji utiče na degradaciju primarnih stena ili mladih zemljišta, i konačno vreme kao važan faktor u procesu stvaranja zemljišta. U poslednje vreme, među faktore koji utiču na stvaranje i osobine zemljišta spada i čovekova aktivnost (Veselinović i dr., 1995). Na Slici 2.1. je prikazan način formiranja zemljišta.



**Slika 2.1.** Način formiranja zemljišta

Konačni rezultati nastanka zemljišta mogu se videti iz njegovog profila. Profili se dele na horizonte, koji se međusobno razlikuju po teksturi, strukturi, gustini, poroznosti, temperaturi, boji, debljini i reaktivnosti. Horizonti međusobno nemaju oštre granice.

Horizonti nastaju kao rezultat kompleksnih interakcija koji se odvijaju tokom alteracije, tj. površinskog raspadanja. Kišnica koja prolazi kroz zemljište nosi sa sobom rastvorene i koloidne čvrste čestice ka nižim horizontima u kojima se oni talože. Biološki procesi (kao što je bakterijsko razlaganje ostataka biljaka), dovode do stvaranja slabo kiselog  $\text{CO}_2$ , organskih kiselina, i kompleksnih jedinjenja koji se takođe prenose kišnicom ka nižim horizontima gde interaguju sa glinama i drugim mineralima, pri čemu dovode do njihovog preobražaja (Veselinović i dr., 1995; Maier i dr., 2000).



**Slika 2.2.** Profil zemljišta

Horizont O predstavlja gotovo čistu, delimično raspadnutu, organsku supstancu.

Horizont A je tamno obojeni horizont, sastoji se od humusa i mineralnih zrna. Horizont je karakterističan po delimičnom izluživanju/ispiranju. Ispiranje je praćeno proceđivanjem vode sa površine u dublje slojeve, tako da se pojedini elementi transportuju u jonskom obliku (Ca, Na, K, Mg), a neki se transportuju u vidu koloida (Fe, Al-hidroksidi,  $H_4SiO_4$ ). Organske kiseline i organski kompleksi koji nastaju mikrobiološkom aktivnošću takođe doprinose delimičnom izluživanju iz horizonta A. Sniženi pH doprinosi raspadu minerala i mobilizaciji metala adsorbovanih na mineralima glina.

Horizont E je svetlo obojeni horizont s malo organske supstance. Karakterističan je po intezivnom izluživanju/ispiranju. Ovaj horizont može nedostajati u suvim klimama ili mladim zemljištima.

Horizont B je smeđe do narandžaste boje. Sadrži rastvorene i koloidne vrste (glina, hidroksidi, silicijumova kiselina). Narandžasta boja ukazuje na prisustvo oksida gvožđa. Moguće su manje kolićine organske supstance. Horizont B se zove i iluvijalni. Ovaj horizont prima sve supstance koje su izlužene iz A horizonta. U procesu

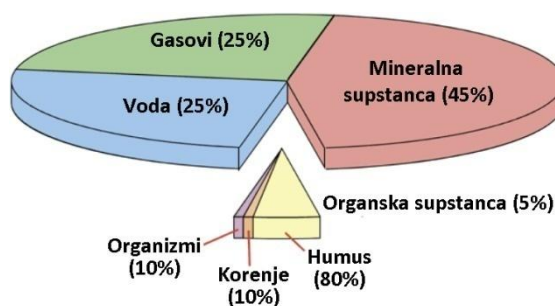
zagađivanja zemljišta ovaj horizont je posebno važan, zbog povišenog sadržaja glina koje jonoizmenjivački vezuju mnoge zagađujuće supstance. U njemu se najviše koncentruju štetni metali kao što su Pb, Cd, Hg,Co, Ni, radioaktivni Cs i dr.

Horizont C je svetliji od horizonta B, sa malo ili potpuno bez organske supstance. On je rastresiti deo matičnog supstrata bez znakova pedogenetskih procesa karakterističnih za ostale horizonte -može predstavljati trošeni stenski materijal *in situ* ili materijal transportovan vodenim tokovima, vetrom, gravitacijom (Maier et al., 2000).

R predstavlja čvrstu stenu, tj matični supstrat. Horizonti A, E i B se drugačije nazivaju i »solum« ili »pravo zemljište«, s obzirom da se najveći broj hemijskih i bioloških aktivnosti dešava upravo u ovim slojevima (Miletić, 2013). Horizonti C i R ne pripadaju zemljištu.

### 2.1.2. Zemljište kao višefazni sistem

Zemljište predstavlja višefazni sistem: pored čvrste faze, ono ima tečnu fazu (zemljišni rastvor) i gasovitu fazu (zemljišni vazduh). Sve faze se nalaze u stanju dinamičke ravnoteže. Prema prostoru, koji zauzimaju pojedine faze zemljišta, najviše je zastupljena čvrsta faza zemljišta - 50% (zapreminskih), od čega na mineralnu otpada - 45%, a na organsku - 5%. Organska faza zemljišta se sastoji iz humusa, korenja biljaka i organizama. Tečna i gasovita faza zauzimaju ostalih 50% zapremine zemljišta u različitim odnosima u zavisnosti od njegove vlažnosti. Slika 2.3. predstavlja zemljište kao višefazni sistem (Jakovljević i Pantović, 1991).



**Slika 2.3.** Zemljište kao višefazni sistem

(<http://www.prescriptionsoilanalysis.com/>)



Zemljište je nastalo kao rezultat dugotrajnih procesa promene matičnog supstrata i sadrži proizvode raspadanja stena, kao i biljnih i životinjskih organizama.

Međusobnim delovanjem mineralnih i organskih materija, uz neposredno učešće živih organizama, stvara se složeni kompleks zemljišnih jedinjenja, čija su svojstva u datim uslovima čvrsto povezana sa karakterom klime, reljefa i vremenom trajanja pedogenetskih procesa (Veselinović i dr., 1995).

Radi bolje preglednosti u daljem tekstu će se odvojeno razmatrati hemijski sastav mineralnog i organskog dela čvrste faze zemljišta.

### **2.1.2.1. Mineralni deo zemljišta**

Mineralni deo zemljišta nastaje iz litosfere njenim raspadanjem pod uticajem različitih fizičkih, hemijskih i bioloških faktora (pedogenetski činioci). Kao rezultat tih promena na površini kamenitog omotača Zemlje (litosfera) stvara se jedna nova sfera – pedosfera. Prosečna njena debljina (na površini zemljine kore) iznosi 2m (od nekoliko cm pa do više metara).

Debljina litosfere iznosi 50-100 km, a poluprečnik Zemlje je 6 377 km.

Na pedosferu otpada najmanji deo, ali je ona vrlo važna i komplikovanog je sastava. U nju ulaze delovi svih sfera: litosfere, hidrosfere, atmosfere i biosfere.

Na mineralni deo zemljišta otpada 45% od ukupne zapremine zemljišta. On je nastao raspadanjem površine raznih stena, koje ulaze u sastav litosfere (magnetske, metamorfne i sedimentne). U sastavu litosfere najviše su zastupljene magnetske stene – 95% (zapreminskih). Međutim, površinski sloj litosfere čini tanka kora (1-2 km debljine), koja je izgrađena od sedimentnih stena, pa je usled toga, na tim stenama i nastao najveći deo zemljišta. Stene na površini Zemlje podležu procesima raspadanja, čiji tempo i pravac zavise u velikoj meri od uslova reljefa, klime i životne aktivnosti mikroorganizama. Njihov sastav i svojstva su veoma različiti. Pedogenetski procesi, koji se vrše na matičnom supstratu, dovode do bitnih promena njegovih svojstava. Ipak, svojstva matičnog supstrata jako utiču na svojstva zemljišta, koja se na njemu stvaraju (Jakovljević i Pantović, 1991).

### 2.1.2.1.1. Hemijski sastav mineralnog dela zemljišta

Hemijski elementi koji ulaze u sastav litosfere zastupljeni su u njoj veoma različito. U Tabeli 2.1. naveden je srednji elementarni sastav litosfere i zemljišta – površinskog dela litosfere. Skoro polovinu litosfere čini kiseonik - 47,2% (težinskih). Drugo mesto zauzima silicijum - 27,6%. Iza silicijuma dolaze aluminijum i gvožđe, koji zajedno čine blizu 14%. U sledeću grupu elemenata spadaju: Ca, Na, K i Mg, od kojih u sastavu litosfere ima svakog po 2-3%. Svi ostali elementi zajedno nalaze se u litosferi u količini manjoj od 1%, a u toj grupi su i elementi neophodni za ishranu biljaka: C, H, N, S, P, Mn. Još manje sadrži litosfera tzv. “mikroelemente”, kao: Cu, Zn, Co, B, Mo i dr.

U Tabeli 2.1. je prikazan srednji sadržaj hemijskih elemenata u litosferi i zemljištu.

**Tabela 2.1** . Srednji sadržaj hemijskih elemenata u litosferi i zemljištu

<b>Elementi</b>	<b>Litosfera (%)</b>	<b>Zemljište (%)</b>	<b>Elementi</b>	<b>Litosfera (%)</b>	<b>Zemljište (%)</b>
O	47,2	49,0	C	(0,1)	2,0
Si	27,6	33,0	S	0,09	0,085
Al	8,8	7,1	Mn	0,09	0,085
Fe	5,1	3,8	P	0,08	0,08
Ca	3,6	1,4	N	0,01	0,1
Na	2,64	0,6	Cu	0,01	0,002
K	2,6	1,4	Zn	0,005	0,005
Mg	2,1	0,6	Co	0,003	0,0008
Ti	0,6	0,5	B	0,0003	0,001
H	(0,15)	?	Mo	0,0003	0,0003

Zemljište se znatno razlikuje po svom srednjem sastavu od prosečnog sastava litosfere. U zemljištu su više zastupljeni kiseonik i vodonik kao elementi vode koju magmatske stene ne sadrže. U zemljištu se zatim nalazi znatno više ugljenika nego u litosferi (20 puta) i azota (10 puta), zbog toga što zemljište spada u biosferu i sadrži organsku materiju. U isto vreme zemljište sadrži manje Al, Fe, Ca, K, Na i Mg nego litosfera, pri čemu se količina svakog od tih elemenata razlikuje u zavisnosti od njihovog ponašanja u procesima raspadanja i pedogeneze.

Ranije je istaknuto da se zemljište obrazuje iz proizvoda raspadanja površinskih stana, a ti procesi raspadanja se nastavljaju i u zemljištu, i to u tesnoj povezanosti sa proizvodima životne aktivnosti organizama. Sastav zemljišta se zbog toga nalazi u stanju stalnih promena, i zemljišna jedinjenja predstavljaju samo karike u lancu tih promena (Jakovljević i Pantović, 1991).

Minerali koji ulaze u sastav zemljišta dele se na dve grupe: primarne i sekundarne.

#### **2.1.2.1.2. Primarni i sekundarni minerali**

Primarni su po svom poreklu vezani za magmatske i metamorfne stene. Usitnjeni pod uticajem fizičkih i hemijskih činilaca, ovi minerali se u izvesnoj količini nalaze u zemljištu u hemijski neizmenjenom stanju. Najrasprostranjeniji primarni minerali u zemljištu su minerali koji sadrže kiseonična jedinjenja silicijuma: kvarc, feldspati, amfiboli, pirokseni i liskuni (alumo i ferosilikati). Primarni minerali nisu postojani u uslovima koji vladaju na zemljinoj površini, pa podležu postepenom razlaganju. Oni se prvo usitnjavaju pod uticajem fizičkih činilaca (promene temperature, vetar, prenosna snaga vode), pa dalje podležu delovanju hemijskih i bioloških činilaca, pri čemu se menja njihov sastav i unutrašnja struktura (Veselinović i dr., 1995).

Pošto raspadanje zahvata prvo površinu minerala, to ukoliko su čestice više usitnjene, imaće veću ukupnu površinu i procesi razlaganja će teći brže.

Najvažniji činilac hemijskog razlaganja u zemljištu jeste voda, koju zadržava rastresita zemljišna masa.

Važan značaj ima i prisustvo kiseonika u zemljištu, kao i ugljene kiseline, koja nastaje kao proizvod životne aktivnosti zemljišne flore i faune. Ugljena kiselina rušilački utiče na minerale.

Pored ugljene kiseline proizvodi životnih aktivnosti organizama u zemljištu su i neke druge mineralne i organske kiseline (azotna, sumporna, limunska, oksalna), koje takođe igraju važnu ulogu u procesu promene zemljišnih minerala.

Osnovne reakcije pri hemijskom razlaganju minerala su: hidratacija, hidroliza, rastvaranje i oksido-redukcija.

Pri potpunom raspadanju silikata alumo i fero(i)silikata, nastaju prosti proizvodi raspadanja: hidrati oksida gvožđa, aluminijuma, dvovalentnih i jednovalentnih baza, hidrat oksida silicijuma (silicijumova kiselina) i neke druge kiseline: ugljena, sumporna, hlorovodonična, azotna i fosforna, koje nastaju oksidacijom elemenata prisutnih u površinskim stenama (S, P, Cl) ili u atmosferi (N, C). Neutralizacijom kiselina i baza nastaju proste soli, koje takođe čine sekundarne minerale: karbonati, sulfati, nitrati, hloridi, fosfati, silikati. Pored sekundatnih mineral prostog sastava kao proizvod raspadanja primarnih mineral nastaju sekundarni alumo i ferisilikati koji su dosta rasprostranjeni u zemljištu. Ovi minerali se zovu "glineni", minerali gline, jer čine deo raznih glina i odlikuju se visokim stepenom disperznosti, tj. sastoje se iz veoma sitnih čestica. Njihove opšte karakteristike su: slojevita građa, analogna građi liskuna, i prisustvo hemijski vezane vode. Broj mineral gline je veliki, ali u zemljištu najveći značaj imaju minerali grupe kaolinita, montmorionita i hidroliskuna (ilita). Sekundarni minerali čine najveći i najvažniji deo mineralnih supstanci čvrste faze zemljišta (Jakovljević i Pantović, 1991).

### **2.1.2.2. Organski deo zemljišta**

Prisustvo organske supstance je ključna karakteristika zemljišta po kome se ono razlikuje od matičnog supstrata. Dakle, supstrat postaje zemljište tek onda kad se u njemu pojavi organska supstanca.

Prvobitna akumulacija organske supstance nastaje kao rezultat životne aktivnosti nižih organizama koji naseljavaju površinu stena i uslovljavaju transformaciju tih stena u zemljištu. Kako je već ranije istaknuto, biološki činioci igraju važnu ulogu u raspadanju stena. Pri usitnjavanju, stene dobijaju veću moć zadržavanja vode, što je prvi uslov za razvoj viših biljaka.

Sa naseljavanjem viših biljaka znatno se ubrzava akumulacija organskih supstanci. Posle izumiranja organizama, supstance koje ulaze u njihov sastav podležu u zemljištu procesima humifikacije (razlaganja i sekundarne sinteze) pri čemu nastaju supstance koje se nazivaju zemljišni humus. Humifikacija je dakle prirodni proces u kome se organska materija prevodi u huminske supstance pomoću geo-mikrobnih mehanizama. Podrazumeva da se ugljenik iz organskih ostataka transformiše i

konvertuje u huminske supstance biohemijskim i abiotičkim procesima. Kompostiranje podrazumeva intermedijernu fazu u kojoj se nalaze huminske supstance i delimično dekompostirana organska materija, a prilikom odmicanja procesa konverzije dominiraju različite hemijske vrste u različitom vremenu. Za razliku od ostalih bioloških procesa, humifikacija se odvija u haotičnom, otvorenom sistemu, gde ne postoji „unutrašnja” kontrola procesa enzimima, ćelijskim strukturama, membranama i ćelijskim transportnim sistemima (Jakovljević i Pantović, 1991). Usled prisustva različitih vrsta biljnog materijala, kao i mnogobrojnih enzimskih reakcija, humifikacijom može nastati gotovo beskonačno mnogo različitih jedinjenja. Gotovo je nemoguće naći dva identična huminska molekula (Mayhew, 2004).

Humifikacija je proces koji je blisko povezan sa ostalim procesima kojima se omogućava kruženje organske supstance u zemljištu, kao što su dekompostiranje i mineralizacija.

Dekompostiranje je razgradnja organskih makromolekula na manje organske i neorganske konstituente i obično je posredovano mikroorganizmima, a uključuje depolimerizaciju i oksidacione reakcije. Mineralizacija je proces konverzije organske materije u neorganske konstituente, kao što su  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ , takođe dejstvom mikroorganizama.

Mikrobna biomasa je od ključnog značaja u zemljištu, kao agens koji učestvuje u razgradnji biljnih ostataka, pri čemu dolazi do oslobađanja hranljivih supstanci. Širok opseg mikroorganizama zastupljen je u zemljištu. Najzastupljenije su bakterije, zatim aktinomicete, gljive, alge, protozoe. U većini zemljišta, biomasa zemljišnih mikroorganizama čini oko 5% od ukupnog ugljenika zemljišta i oko 1% ukupnog azota zemljišta (Stevenson, 1994).

Količina i sastav humusa, kao i njegov raspored po horizontima zemljišta su u tesnoj vezi sa karakterom pedogenetskih procesa i karakteristični su za svaki tip zemljišta. Količina i sastav humusa u velikoj meri određuju plodnost zemljišta - njegovu specifičnu osobinu, po kojoj se razlikuje od matičnog supstrata.

### 2.1.2.3. Priroda zemljišnog humusa

Organska supstanca zemljišta može biti podeljena u dve grupe. To su:

1. Sveži i nepotpuno razloženi biljni i životinjski ostaci;
2. Humus.

Humus predstavlja frakciju organske materije zemljišta koja je amorfna i lišena ćelijskih struktura karakterističnih za biljke, mikroorganizme i životinje (Whitehead i Tinsley, 1963).

Humus se sastoji iz dva tipa komponenti:

1. Nehuminske supstance ili humusne supstance nespecifične prirode.
2. Huminske supstance.

U grupu nehuminskih supstanci ubrajamo veliki broj organskih jedinjenja poput ugljenih hidrata, aminokiselina, masnih kiselina, smole, lignina i dr. Zajednička osobina svih ovih jedinjenja je da su nastala prilikom razlaganja ostataka biljnog i životinjskog porekla kao i pravih huminskih materija, ali da nisu obrazovana u procesu humifikacije (Živković i Đođević, 2003).

Pored toga što je u većini zemljišta sadržaj nehuminskih supstanci mali, njihova uloga nije zanemarljiva. One učestvuju u obrazovanju huminskih supstanci, utiču na mnoge hemijske i fizičke osobine zemljišta, a pri mineralizaciji oslobađaju ugljen-dioksid i mnoge druge vezane elemente poput azota, fosfora i sumpora, neophodne za rast i razvoj drugih organizama (Živković i Đođević, 2003).

Huminske supstance predstavljaju grupu organskih jedinjenja koje se ne mogu uvrstiti ni u jednu klasu jedinjenja. Tradicionalno se definišu prema svojoj rastvorljivosti. U huminske supstance ubrajamo fulvo kiseline, huminske kiseline i humin. Fulvo kiseline su organska jedinjenja koja se rastvaraju u vodi na svim pH vrednostima. Huminske kiseline su frakcija koja je nerastvorna u kiseloj sredini na  $\text{pH} < 2$ , ali je rastvorna u baznim uslovima. Treća frakcija koja se može uočiti u huminskim supstancama jeste humin koji je nerastvoran u vodi na svim pH vrednostima. Organske komponente zemljišta prikazane su na Slici 2.4. (Pena-Mendez, 2005).



**Slika 2.4.** Organske komponente zemljišta.

Huminske supstance široko su rasprostranjene u životnoj sredini. Nalaze se u zemljištu, vodi i sedimentima.

Huminske supstance generalno nastaju razlaganjem biljnih i životinjskih ostataka, ali mogu nastati i kao sporedni proizvodi metabolizma mikroorganizama, i mnogo su stabilnije od svojih prekursora. Huminske supstance predstavljaju najrasprostranjenije prirodne kompleksirajuće ligande i igraju značajnu ulogu u formiranju zemljišnih agregata, kontroli kiselosti tla, cirkulaciji hramljivih supstanci, održavanju vlažnosti zemljišta, detoksikaciji od opasnih komponenata (adsorbuju toksične metale i antropogene organske zagađivače iz vode i zemljišta), održavanju kvaliteta poljoprivrednog zemljišta, kao i u održavanju kvaliteta same životne sredine (Pena-Mendez, 2005).

Huminske kiseline su se dugo smatrale inertnim organskim jedinjenjima, naročito u anaerobnim uslovima. Najnovija istraživanja pokazuju da huminske kiseline mogu biti rezervoar elektrona za anaerobne mikroorganizme, stimulišući anaerobni metabolizam, a samim tim degradaciju i finalno mineralizaciju organskih jedinjenja u odsustvu kiseonika (Klöpffel, 2014).

### **2.1.2.3.1. Humin**

Humin je frakcija huminskih supstanci koja nije rastvorna u vodi ni na jednoj pH vrednosti. Kompleksi humina se smatraju makromolekulima zato što njihova molekulska masa varira u opsegu od 100.000 do 10.000 000 Da. Humin je od svih huminskih supstanci najotporniji na degradaciju. Hemijske i fizičke osobine humina su i dalje samo delimično poznate, ali zna se da on igra značajnu ulogu u poboljšanju retencionog vodenog kapaciteta, poboljšanju njegove strukture, kao i uopšteno poboljšanju plodnosti. (Pettit, 2006).

### **2.1.2.3.2. Fulvo kiseline**

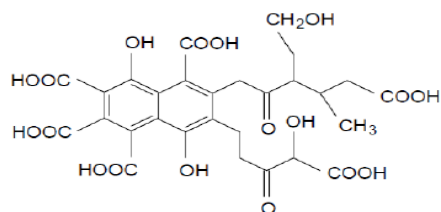
Fulvo kiseline su visokomolekularna azotna organska jedinjenja, složene molekulske građe. One predstavljaju smešu slabih alifatičnih i aromatičnih organskih kiselina koje su rastvorne u vodi na svim pH vrednostima. Po građi molekula i nizu najvažnijih osobina, kao i po uticaju na tok procesa u zemljištu, znatno se razlikuju od huminskih kiselina. Pre svega, njihovi molekuli su znatno prostije građe od molekula huminskih kiselina, usled čega im je boja žućkasta, zbog koje su i dobile takav naziv (lat. fulvus-žut).

Struktura i sastav fulvo kiselina je veoma promenljiva. Fulvo kiseline su manje molekulske mase od huminskih kiselina i od humina, a mogu biti mase od 1,000 do 10,000 Da. Fulvo kiseline sadrže duplo više kiseonika od huminskih kiselina i to u vidu karboksilnih, hidroksilnih grupa i keto grupa. Ovo je razlog zašto su fulvo kiseline rastvorne u vodi na svim pH vrednostima (Pena-Mendez, 2005; Živković i Dođević, 2003).

Fulvo kiseline uzorkovane sa velikog broja različitih lokacija i analizirane, ne pokazuju prisustvo metoksi grupa, imaju nizak sadržaj fenola, i manje su aromatične od huminskih kiselina. Iako same po sebi slabe kiseline, zbog većeg broja karboksilnih grupa, fulvo kiseline su jače kiseline od huminskih. Kada su zastupljene u visokom procentu u zemljištu izazivaju hemijsko raspadanje silikata, usled čega dolazi do ispiranja jona aluminijuma i gvožđa (Pettit, 2006).



Na Slici 2.5. prikazan je hipotetički model strukture fulvo kiselina (Mirsal, 2008). Ona sadrži alifatične i aromatične strukture sa velikim brojem funkcionalnih grupa koje sadrže kiseonik.



**Slika 2.5.** Hipotetički model fulvo kiselina

Zbog svoje relativno male molekulske mase, molekuli fulvo kiselina mogu slobodno da ulaze u korenje, lišće i stabla biljaka, a prilikom ulaska u biljna tkiva, fulvo kiseline sa sobom unose i minerale. Ova osobina čini fulvo kiseline nezamenljivim sastojcima mineralnih đubriva (Pettit, 2006).

### 2.1.2.3.3. Huminske kiseline

Huminske kiseline su tamno obojena (braon do crna) jedinjenja velike molekulske mase. Složene su strukture i poseduju veliki broj različitih funkcionalnih grupa poput karboksilnih, hidroksilnih i karbonilnih grupa. Posledica prisustva velikog broja navedenih grupa je njihova velika reakciona sposobnost i visok kapacitet adsorpcije katjona (Pena-Mendez, 2005).

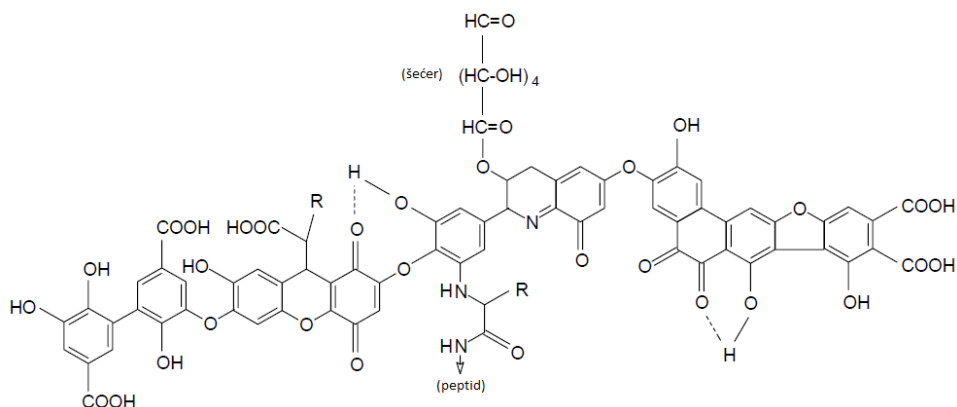
Huminske kiseline obuhvataju smešu slabih alifatičnih i aromatičnih organskih kiselina koje su nerastvorne u vodi u kiselim uslovima, a rastvorne su u alkalnim sredinama. U proseku 35% molekula huminskih kiselina je aromatično, dok je ostatak molekula alifatičan. Molekulska masa ovih kiselina varira u opsegu od 10,000 do 100,000 Da. Polimeri huminskih kiselina lako vezuju minerale koji se nalaze u glini u zemljištu, pri čemu se formiraju stabilni kompleksi (Pettit, 2006).

Osnovni hemijski elementi koji ulaze u sastav huminskih kiselina su ugljenik, vodonik, kiseonik, azot i sumpor i oni su uvek prisutni, bez obzira na poreklo (Pena-Mendez, 2005). Huminske kiseline mogu lako da grade soli sa neorganskim jedinjenjima koja se u zemljištu nalaze gotovo u tragovima. Analizom uzoraka prirodnih

huminskih kiselina ustanovljeno je prisustvo preko šesdeset različitih elemenata koji se vezuju za molekule huminskih kiselina u formi u kojoj su dostupni organizmima. Time je pokazano da huminske kiseline igraju bitnu ulogu jonoizmenjivača i metal-kompleksirajućeg sistema. Huminske kiseline takođe učestvuju u održavanju kompaktnosti zemljišta, kao i u usporavanju procesa isparavanja vode iz zemljišta, što je naročito bitno kod peskovitog zemljišta i u sušnim sredinama (Stevenson,1994).

U prirodnim uslovima molekuli huminskih kiselina mogu da sadrže proteinske i ugljenohidratne ostatke kovalentno vezane za jezgro molekula (Pettit, 2006; Stevenson,1994).

Na Slici 2.6. prikazan je hipotetički model strukture huminskih kiselina po Stivenson-u (Stevenson,1994).



**Slika 2.6.** Hipotetički model strukture huminskih kiselina po Stivensonu

Iako huminske i fulvo kiseline imaju brojne zajedničke osobine, postoje značajne strukturne razlike između njih. U odnosu na huminske kiseline, fulvo kiseline imaju viši sadržaj kiseonika i sadrže znatno više karboksilnih grupa, dok huminske kiseline sadrže visok nivo kiseonika u vidu strukturne komponente samog jezgra tj. u vidu etarskih ili estarskih funkcionalnih grupa (Pettit, 2006).

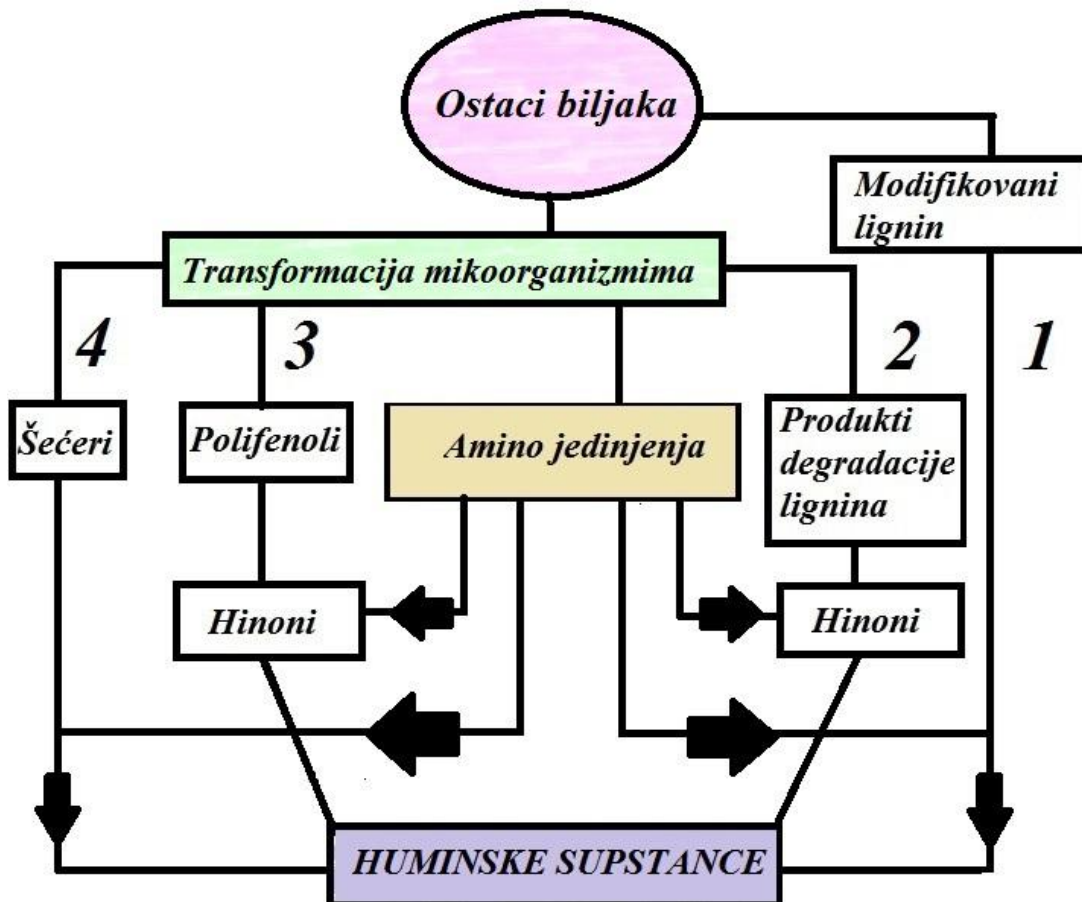
Posledica ovako jedinstvene strukture molekula huminskih kiselina su mnoge interakcije između organskih molekula, jona metala i minerala u zemljištu i sedimentima:

1. Organsko/organske interakcije između ugljenih hidrata, proteina, lipida i lignina.
2. Organsko/mineralne interakcije.
3. Organska faza/ion metala/mineral- ovaj tip interakcije doprinosi uređenju strukture posmatranog sistema putem nastajanja koordinacionog poliedra, što za posledicu može imati imobilizaciju neorganskih ili organskih zagađivača.
4. Površinska aktivnost, učešće u stvaranju micelarnih molekulskih struktura koji sadrže i hidrofobne i hidrofilne delove.

Navedeni primeri interakcija pokazuju važnost poznavanja strukture i sastava huminskih supstanci zbog njihove veoma važne uloge u životnoj sredini (utiču na biodostupnost elemenata i hemijskih jedinjenja u vodama i zemljištu, zadržavaju ili oslobađaju zagađivače životne sredine) (Đurka, 2010).

#### **2.1.2.4. Formiranje huminskih supstanci**

Formiranje huminskih supstanci je jedan od najslabije shvaćenih, najmanje razjašnjenih i najintragantnijih aspekata hemije humusa. Postoji više putanja formiranja humusnih supstanci tokom raspadanja biljnih i životinjskih ostataka u zemljištu, od kojih su najvažniji prikazani na Slici 2.7.



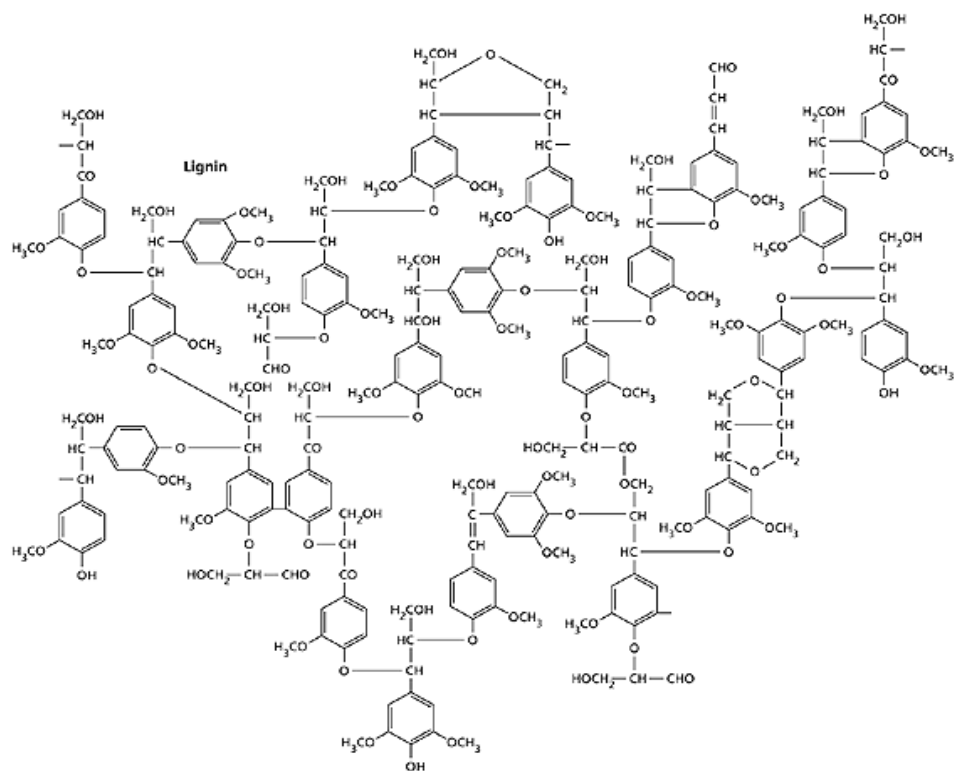
**Slika 2.7.** Pregled glavnih putanja nastanka huminskih supstanci.

U klasičnoj teoriji, putanja 1, popularizovanoj od strane Waksman-a, huminske supstance predstavljaju modifikovane lignine - lignin teorija. Putanje 2 i 3 predstavljaju mehanizam koji uključuje hinone, dok putanja 4 postulira da se nastanak huminskih supstanci odvija preko kondenzacije šećera i amina (Stevenson,1994).

#### **2.1.2.4.1 Lignin teorija nastanka huminskih supstanci**

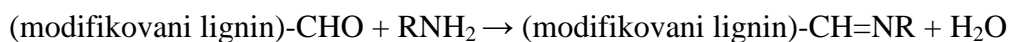
Dugo godina smatralo se da je lignin izvor huminskih supstanci. Lignin je kompleksni polimer aromatičnih alkohola - monolignola i predstavlja sastavni deo sekundarnog ćelijskog zida biljaka i pojedinih algi. Celulozna vlakna u ćelijskom zidu su okružena hemicelulozom koja je često obložena ligninom. Lignin je manje podložan metaboličkoj razgradnji. Lignin ima ulogu u stabilizaciji biljnih tkiva tokom rasta (Stevenson,1994).

Lignin se pretežno sastoji iz tri različita aromatična alkohola: kumaril-alkohola, koniferil-alkohola i sinapil-alkohola. Ova tri monomera formiraju trodimenzionalnu mrežu polimerizacijom u slobodno-radikalskoj reakciji. Učešće slobodnih radikala u reakciji polimerizacije dovodi do nastajanja neuređene molekulske struture (Stevenson,1994). Predložena struktura lignina prikazana je na Slici 2.8.



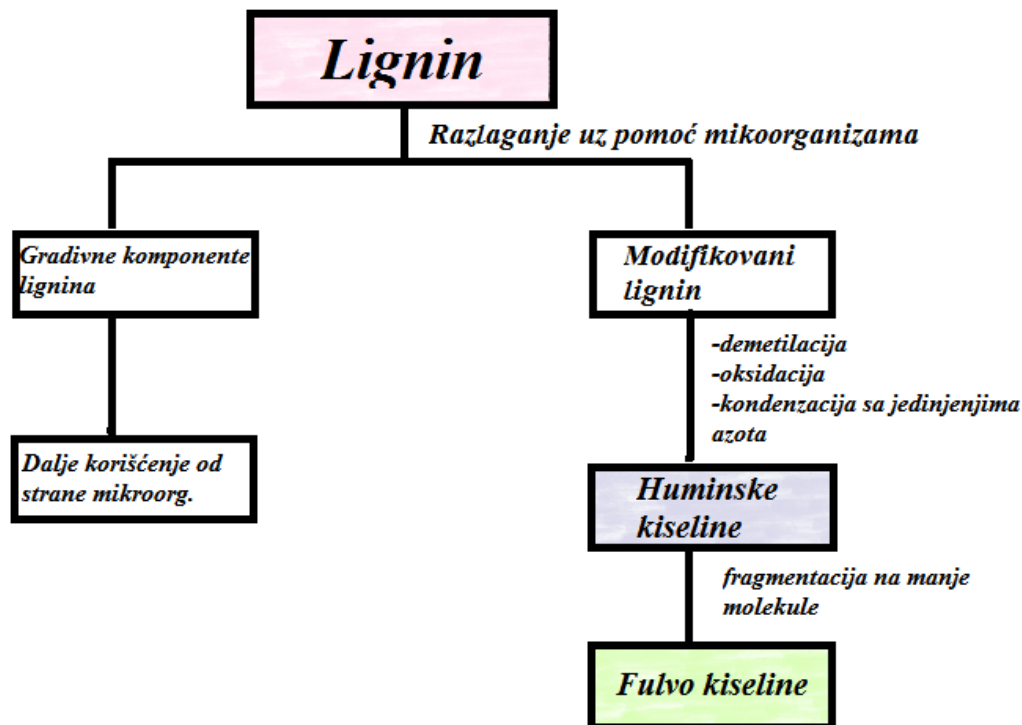
**Slika 2.8.** Predložena struktura dela molekula lignina (Stevenson,1994)

Waksman nije delio mišljenje svojih kolega, već je zaključio da azot sadržan u huminskim kiselinama ne potiče od lignina, već nastaje kondenzacijom modifikovanog lignina sa proteinima, kao proizvod mikrobiološke sinteze, a da se stabilizacija između modifikovanog lignina i proteina postiže formiranjem Šifove baze:



Modifikacija lignina podrazumeva gubitak metoksi (OCH<sub>3</sub>) grupa uz formiranje *o*-hidroksifenola i oksidaciju alifatičnih bočnih lanaca do karboksilnih grupa. Demetilacija i oksidacija bočnog lanca, kao i raskidanje aromatičnog jezgra ligninskih

komponenti, dovode do povećanja broja kiselih funkcionalnih grupa u modifikovanom ligninu. Lignin teorija nastanka huminskih supstanci prikazana je šematski na Slici 2.9.



**Slika 2.9.** Šematski prikaz lignin teorije po Waksman-u.

Više dokaza ide u prilog ovoj teoriji o formiranju huminskih kiselina (Stevenson,1994):

1. Lignin i huminske kiseline se razgrađuju sa znatnim teškoćama od strane većine gljiva i bakterija.
2. Lignin i huminske kiseline su rastvorni u alkalijama i precipitiraju u kiselinama. Takođe, oba polimera su delimično rastvorna u alkoholima i piridinu, i oba sadrže metoksi-grupe. Sadržaj metoksi-grupa smanjuje se sa stepenom dekompozicije-razgradnje.
3. Lignin i huminske kiseline su kisele prirode.

4. Kada se lignin zagreva sa vodenim rastvorom alkalija, transformiše se u huminske kiseline koje sadrže metoksi grupu.

5. Huminske kiseline imaju dosta zajedničkog sa oksidovanim ligninom.

Hatcher i Spicker su predložili modifikovanu lignin teoriju koja podrazumeva da se i drugi biopolimeri poput kutina, suberina i nekih mikrobnih biopolimera (melanini, parafinski makromolekuli) mogu koristiti kao prekursori huminskih supstanci (Stevenson,1994).

Druga modifikacija Waksmanove teorije nastanka huminskih supstanci podrazumeva da se i amonijak, nastao prilikom razlaganja azotnih organskih jedinjenja od strane mikroorganizama, može koristiti kao izvor azota za sintezu huminskih supstanci (Stevenson,1994).

#### **2.1.2.4.2. Polifenolna teorija sa ligninom kao izvorom fenola**

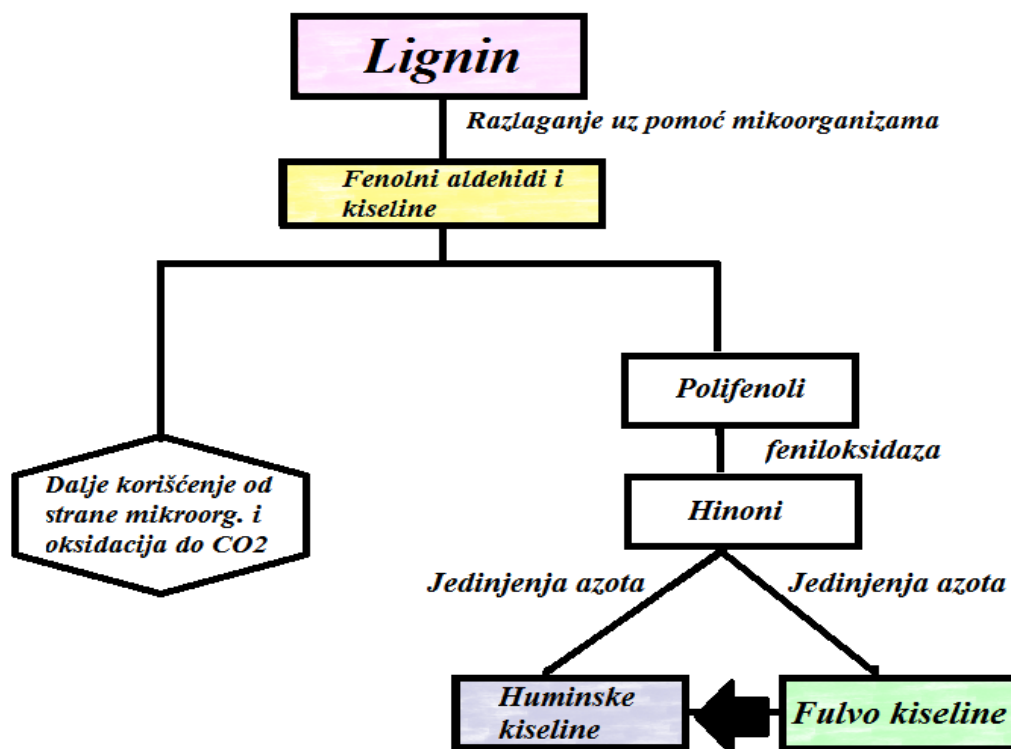
Po ovoj teoriji, fenolni aldehidi i kiseline koji bivaju oslobođeni iz lignina dejstvom mikroorganizama, podležu daljoj enzimskoj konverziji u hinone. Hinoni dalje polimerizuju sa ili bez jedinjenja azota formirajući makromolekule slične huminskim supstancama. Formiranje huminskih supstanci se odigrava u tri stupnja:

1. Lignin, dobijen tokom razgradnje biljnih ostataka, podvrgnut je oksidativnom cepanju, pri čemu se degraduje do osnovnih strukturnih jedinica.

2. Bočni lanci ligninskih strukturnih jedinica se oksiduju, a zatim demetiluju, pri čemu se dobijeni polifenoli prevode u hinone dejstvom enzima polifenoloksidaza.

3. Hinoni dalje reaguju sa komponentama koje sadrže azot, pri čemu se formiraju tamno obojeni polimeri.

Šematski prikaz sinteze huminskih supstanci prema polifenolnoj teoriji sa ligninom kao izvorom fenola prikazan je na Slici 2.10.



**Slika 2.10.** Šematski prikaz polifenolne teorije sa ligninom kao izvorom fenola.

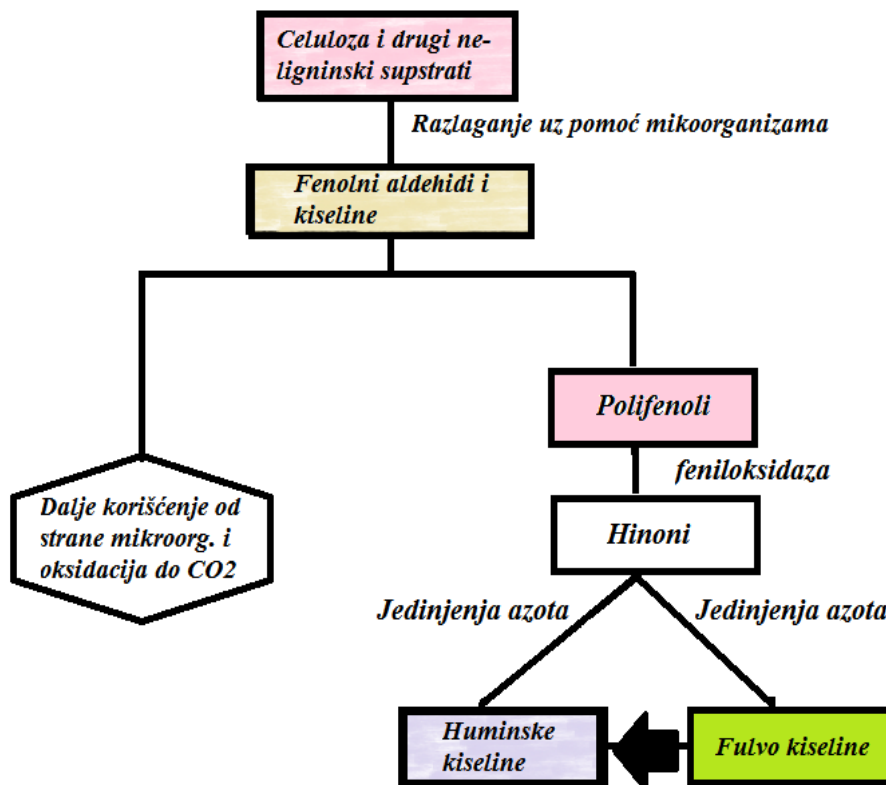
Prema ovoj teoriji, početna faza razgradnje lignina uključuje oslobađanje di-lignoilnih komponenata i formiranje primarnih fenilpropanskih jedinica. Fenilpropanske jedinice zatim podležu oksidaciji na bočnom lancu, pri čemu se dobijaju različite aromatične kiseline i aldehidi kao što su vanilin i vanilinska kiselina. Ovako nastali polifenoli nisu stabilni i mogu biti dalje razgrađeni posredstvom bakterija, aktinomiceta i gljiva. Takođe, mogu da podlegnu rekombinaciji, međusobnoj ili sa drugim organskim molekulima, nakon što se konvertuju u hinone. Iako fenoli mogu spontano da oksiduju do hinona u alkalnoj sredini, konverzija se uglavnom sprovodi pomoću polifenoloksidaznih enzima. Enzimaska oksidacija fenolnih komponenti u prisustvu aminokiselina, peptida i proteina dovodi do toga da nastaju azotni polimeri koji imaju dosta osobina kao i prirodne huminske kiseline. Treba napomenuti da i prisutni aminošećeri imaju potencijala da reaguju sa fenolima na isti način kao i aminokiseline.

Ovako nastali brojni mono-, di- i tri-hidroksi fenoli i aromatične kiseline dalje služe kao gradivne jedinice za sintezu huminskih supstanci (Stevenson,1994).



### 2.1.2.4.3. Polifenolna teorija sa alternativnim izvorima fenola

Pokazano je da celuloza i druge ne-ligninske supstance mogu da budu izvor fenola prilikom sinteze huminskih supstanci. Ova teorija je generalno slična polifenolnoj teoriji sa ligninom kao izvorom fenola, sa razlikom u tome da se kao izvor polifenola ne koristi lignin. Dokazi da huminske supstance mogu nastati i bez učešća lignina, zasnovani su na tome, da se humus akumulira u zemljištu i sedimentima bez prisustva lignina. U hladnim i vlažnim regionima humus pretežno nastaje od nižih biljaka koje ne sadrže lignin (Stevenson,1994). Šematski prikaz polifenolne teorije sa alternativnim izvorima fenola prikazan je na Slici 2.11.

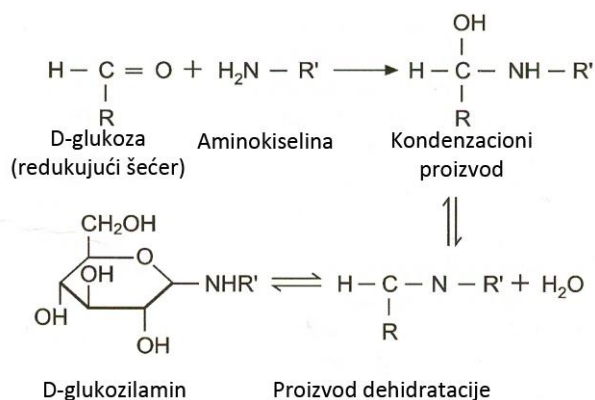


Slika 2.11. Šematski prikaz polifenolne teorije sa alternativnim izvorima fenola.

#### 2.1.2.4.4. Teorija o kondenzaciji amino-šećera

Po ovoj teoriji (koju je razvio Achard) kondenzacione reakcije između redukujućih šećera (ketoza i aldoza) i amino jedinjenja dovode do stvaranja N-supstituisanog glikozilamina. Iz ovog jedinjenja u procesu dehidratacije i fragmentacije nastaje polimer sa azotom braon boje koji stvara veliku strukturu poznatu kao huminske kiseline.

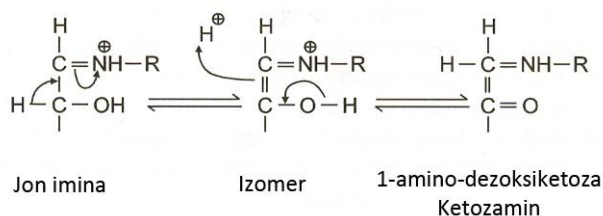
Početna faza (stvaranje glikozida). Kondenzuju se karbonilna grupa aldoze i slobodna amino grupa aminokiseline (Maillard-ova reakcija) dajući N-supstituisani glikozilamin:



**Slika 2.12.** Početna faza (Maillard-ova reakcija)

U ovoj fazi se ne javlja braon boja.

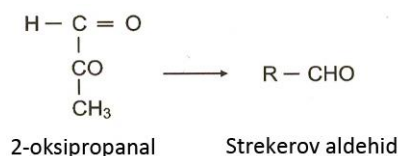
Srednja faza (stvaranje keto-amina). Fragmentacijom proizvoda dobijenog u početnoj fazi stvara se jon imina koji preraspodelom (Amadori premeštanje) prelazi u keto-amin:



**Slika 2.13.** Stvaranje keto-amina (Amadori premeštanje)

Završna faza (stvaranje reaktivnih supstanci koje polimerizacijom prelaze u tamno-braon huminske kiseline). U ovoj fazi keto-amini se fragmentišu do

hidroksiacetona ili 2-oksopropanala koji se dalje degradira do tzv. Strekerovog aldehida:



**Slika 2.14.** Stvaranje Strekerovog aldehida

Ova jedinjenja su veoma reaktivna i polimerizuju se do makromolekula huminskih kiselina (Stevenson,1994).

## 2.2. Zagađenje zemljišta

Brzi razvoj tehnologije u savremenom svetu, velika industrijska i poljoprivredna proizvodnja, porast populacije i razvoj velikih gradova, dovode do nagomilavanja otpadnog materijala različitog porekla i do sve većeg zagađenja životne sredine uključujući i zemljište. Velike količine otpadnih supstanci koje se ne mogu razgraditi procesima samoprečišćavanja degradiraju zemljište, i prouzrokuju poremećaje normalnih procesa u njemu, sa negativnim posledicama po ekosistem i zdravlje ljudi (Ugrinov i Stojanov, 2010).

Izvori zagađenja zemljišta su dominantno posledica ljudskih aktivnosti i bazično se mogu svrstati u tri grupe:

1. Otpadne vode kao zagađivači zemljišta:

-industrijske otpadne vode

-vode zagađene poljoprivrednim aktivnostima (veštačka đubriva, pesticidi, organske materije različitog porekla)

-otpadne vode iz domaćinstava i komunale otpadne vode

2. Zagađivači poreklom iz atmosfere koji zemljište kontaminiraju ispiranjem, padavinama ili direktnom sedimentacijom:

-emisija iz industrijskih tehnoloških procesa

-emisija usled sagorevanja fosilnih goriva (industrija, energetska postrojenja, individualna ložišta)

-emisija poreklom od motornih vozila

-emisija prilikom sagorevanja različitih organskih otpada.

3. Čvrsti otpad različitog porekla:

-komunalni otpad,

-industrijski otpad,

-otpad iz poljoprivrede.

Kada zagađivači dospeju u zemljište na bilo koji od navedenih načina njihova dalja sudbina zavisi od niza fizičkih, hemijskih i bioloških faktora čiji se uticaji međusobno prepliću (Ugrinov i Stojanov, 2010).

### **2.2.1. Zagađenje zemljišta naftom i derivatima nafte**

Energija je osnova funkcionisanja naše planete. Sa povećanjem svetske populacije, nafta i prirodni gas su postali glavni izvori energije (Ilić, 2011).

Nafta, kao prirodni proizvod, sama po sebi na mestu nastanka, nije zagađivač. Eksploatacijom, preradom, skladištenjem, transportom i upotrebom postaje jedan od najrasprostranjenijih zagađivača. Naftni derivati predstavljaju jedan od najčešćih izvora zagađenja životne sredine u svetu. U velikim koncentracijama, ugljovodonici koji čine sirovu naftu i njene derivate veoma su otrovni za mnoge žive organizme, uključujući i ljude. Nafta, takođe, sadrži određene količine sumpornih i azotonih jedinjenja, koja su opasna sama po sebi i mogu, pri reakciji sa okruženjem, da proizvedu sekundarne toksične supstance. Izlivanja nafte koja se dešavaju pri transportom tankerima, cevovodima i na naftnim bušotinama oslobađaju ogromne količine nafte u zemljište i morski ekosistem u koncentrovanom obliku (Amro, 2004).

U rafinerijama, tokom procesa prerade, gde se sirova nafta obrađuje i oplemenjuje u korisne derivate kao što su benzin, dizel gorivo, asfaltne baze, lož ulje, kerozin i tečni naftni gas, dolazi do izdvajanja brojnih hemikalija u atmosferu kao i generisanja tečnog i čvrstog otpada svakodnevno.

Mnoge operacije vezane za eksploataciju nafte, proizvodnju i transport imaju potencijal da utiču na životnu sredinu u različitim stepenima. Curenje iz cevovoda ili bušotine, podzemni rezervoari za benzinske pumpe, nepropisno odlaganje otpada, izlivanje nafte su glavni izvori površinske kontaminacije i kontaminacije podzemnih voda (<http://ioscproceedings.org/doi/pdf/10.7901/2169-3358-1969-1-15>).

Nafta i njeni naftni derivati su od suštinskog značaja za industrijski razvoj. Nažalost, mehanička oštećenja, ljudski nemar, kao i prirodne katastrofe dovode do suviše čestog oslobađanja nafte i/ili njegove proizvode u životnu sredinu.

### **2.2.2. Toksično delovanje naftnih ugljovodonika**

Ugljovodonici poreklom iz nafte prenose se lancem ishrane na sve organizme, bez obzira na način kako dospeju u životnu sredinu. Toksični derivati nafte pretežno su hlorovani, aromatični i policiklični aromatični ugljovodonici (eng. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAH*). Lako isparljivi ugljovodonici najviše se zadržavaju u atmosferi gde podležu reakcijama transformacije sa kiseonikom iz vazduha, peroksi- ili hidroksi-radikalima ili ozonom. Prilikom izlivanja nafte primarni zagađivači voda su metil terc-butil etar (eng. *Methyl Tertiary-Butyl Ether – MBTE*) i benzen, toluen, etilbenzen i ksilen (eng. *Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene-BTEX*). Potvrđeno je da benzen ima toksično i kancerogeno dejstvo, dok su BTEX polutanti relativno manje štetni u odnosu na njega jer podležu oksidativnim transformacijama u organizmu i tako se eliminišu (Babić, 2009; Atlas, 1995).

Policiklični aromatični ugljovodonici ili poliareni predstavljaju klasu organskih jedinjenja koja se sastoje od dva ili više kondenzovanih aromatičnih prstenova. Široko su rasprostranjeni u zemljištu, sedimentima, podzemnim vodama i atmosferi. U životnu sredinu dospevaju kao proizvodi sagorevanja fosilnih goriva, kao što su ugalj i nafta, ali i prilikom gasifikacije uglja, spaljivanja otpada, drveta i vegetacije. Prirodni procesi kao što su vulkanske erupcije i šumski požari takođe utiču na stvaranje ovih jedinjenja. Međutim, akcidentna izlivanja nafte i ulja predstavljaju glavni izvor PAH u životnoj sredini. Opstanak PAH u životnoj sredini zavisi od više faktora, kao što je njihova hemijska struktura, koncentracija, rasprostranjenost i biodostupnost. Faktori spoljašnje sredine, kao što su tip i struktura zemljišta, pH, temperatura, odgovarajući nivo

kiseonika, hranljivih supstanci i vode utiču na aktivnost mikrobnih populacija koje vrše njihovu razgradnju. Generalno, što je veća molekulska masa ovih ugljovodonika, veća je i njihova hidrofobnost i toksičnost, a to za posledicu ima njihovo duže zadržavanje u životnoj sredini i sporiju degradaciju (Bamforth i Singleton, 2005).

Utvrđeno je da poliareni pored toksičnih, ispoljavaju i kancerogene i mutagene efekte. Pokazano je da su oni PAH, koji sadrže 4-6 kondenzovanih aromatičnih prstenova odgovorni za preko 75% potencijalnog kancerogenog dejstva. Na listi prioriternih polutanata nalazi se 16 PAH: 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. Najtoksičniji od svih jeste benzo(a)piren (3,4-benzopiren) (Babić, 2009).

Tehnologije za uklanjanje naftnih zagađujućih supstanci iz zemljišta i njihovo izlečenje (remedijaciju) mogu biti abiotičke (fizičke, hemijske i termičke) i biotičke (bioremedijacija u širem smislu). Mogu se primeniti na mestu zagađenja (*in situ*) i izvan mesta zagađenja (*ex situ*). Predmet ovog rada je bioremedijacija, dok se detaljan prikaz abiotičkih tehnologija može naći u prethodnim radovima (Khan i dr.; Kostić, 2007).

## 2.3. Bioremedijacija

Kao što je prethodno napomenuto, tehnologije za uklanjanje naftnih zagađujućih supstanci iz zemljišta mogu biti abiotičke i biotičke. U svetu se biotičke metode koriste dugi niz godina, pa tako i u tretmanu zagađenja ugljovodonicima nafte, bioremedijaciji pripada oko 25% svih remedijacionih postupaka (Philip i Atlas, 2005).

Bioremedijacija je efikasna, ekonomski isplativa, zelena tehnologija kojom se zagađujuće supstance biološkim putem transformišu u netoksična jedinjenja ili se potpuno razgrađuju do ugljen-dioksida i vode. Kao biološki agensi se najčešće koriste mikroorganizmi. Degradacija se obavlja u ćelijama mikroorganizama, koji najpre resorbuju neki zagađivač, pa ga zahvaljujući sopstvenim enzimima transformišu i razgrađuju. Zagađivači imaju ulogu hranljivih supstanci i energije za rast i razvoj mikroorganizama. Korišćenje mikroorganizama kao bioloških agenasa u procesima bioremedijacije je u konstantnom porastu zbog njihovog biodiverziteta, kao i ogromne

kataboličke sposobnosti. Samim postupkom bioremedijacije omogućava se optimizacija procesa biodegradacije zagađivača, a to se postiže aeracijom, biostimulacijom (dodatak hranljivih supstanci) i bioaugmentacijom (dodatak mikroorganizama). Metode bioremedijacije se mogu koristiti ne samo za uklanjanje ugljovodonika nafte već i drugih organskih zagađivača (pesticidi, deterdženti, organski rastvarači ili fenoli), teških metala (živa, kadmijum, olovo), radionuklida (uranijum) (Alexander, 1999; Das i Chandran, 2011; Ugrinov, 2010; Raičević i dr., 2007; Beškoski i dr., 2012).

### **2.3.1. Faktori koji utiču na procese biodegradacije naftnih ugljovodonika**

Biodegradacija naftnog zagađenja u zemljištu zavisi od više faktora. To su:

- Priroda i količina ugljovodonika;
- Karakteristika samog zemljišta;
- Prisutnost i degradacione osobine mikroorganizama u zemljištu.

#### **2.3.1.1. Naftni ugljovodonici kao supstrat za bioremedijaciju**

Nafta se sastoji iz velikog broja različitih ugljovodonika i sličnih komponenti koji se mogu podeliti na zasićenu i aromatičnu frakciju. Zasićena frakcija sadrži alkane normalnog i račvastog niza, i cikloalkane (naftene), dok aromatična frakcija sadrži mono i policiklične ugljovodonike koji mogu da imaju i alkil-bočni niz. Osim ugljovodonika, nafta sadrži i jedinjenja azota, sumpora i kiseonika (NSO-jedinjenja). U malim količinama u nafti su prisutni i asfalteni, visokomolekulska aromatična jedinjenja ili smeše jedinjenja sa većim brojem kondenzovanih aromatičnih prstenova i većim brojem heteroatoma. Proizvodi koji se dobijaju destilacijom sirove nafte predstavljaju derivate nafte i mogu se grubo razvrstati u tri grupe: goriva, maziva i ostalo (Beškoski i dr., 2012; Evans i Furlog, 2003).

Efikasnost bioremedijacije je u direktnoj vezi sa hemijskom strukturom zagađujuće supstance. Usled strukturne raznovrsnosti kod ugljovodonika postoje razlike u brzini i stepenu degradacije mikrobiološkim putem (Atlas, 1984).

Brzina mikrobiološke razgradnje je različita za različita jedinjenja prisutna u naftnim zagađujućim supstancama. Brzina se smanjuje u nizu *n*-alkani, račvasti alkani, *n*-alkil aromatična jedinjenja male molekulske mase, aromatična jedinjenja sa jednim prstenom, ciklični alkani, policiklični aromatični ugljovodonici, asfalteni (Beškoski et al., 2012). Bitno je napomenuti da se *n*-alkani dugog niza asimiliraju lakše od *n*-alkana kratkog niza. Zasićena i aromatična frakcija male molekulske mase nafte je biodegradabilnija od aromatične frakcije velike molekulske mase. Stepenn degradacije aromatičnih ugljovodonika se smanjuje sa povećanjem broja kondenzovanih aromatičnih prstenova. Brzina biodegradacije cikloalkana je promenljiva, ali je uglavnom manja od brzine degradacije alkana (Atlas, 1981). Visoko kondenzovane aromatične i cikloparafinske strukture, smole, bitumen su i najrezistentnije na biodegradaciju. Smatra se da je ovakav rezidualni materijal nakon degradacije nafte i njenih proizvoda analogan huminskim supstancama, i da je malo je verovatno da ova jedinjenja predstavljaju opasnost za životnu sredinu (Loeher i dr., 2001; Brassington i dr., 2007; Stroud i dr., 2007).

### **2.3.1.2. Karakteristike samog zemljišta**

Kontrola i optimizacija procesa bioremedijacije naftnog zagađivača u zemljištu je veoma kompleksna i zavisi od više faktora. To su: prisustvo kiseonika ili drugih akceptora elektrona, sadržaj hranljivih supstanci, sadržaj vlage, temperatura, pH vrednost zemljišta, prisustvo surfaktanata, tekstura zemljišta.

#### **2.3.1.2.1. Kiseonik**

Sadržaj raspoloživog kiseonika određuje da li će proces da se odvija pod aerobnim ili anaerobnim uslovima. Ugljovodonici se brzo degraduju pod aerobnim uslovima, a da bi se povećala koncentracija kiseonika u zagađenoj sredini koriste se različite metode, kao što su metode prevrtanja, prinudne aeracije, mehaničko mešanje ili bioventilacija. Nekada se pribegava i dodavanju alternativnih izvora kiseonika, kao što su vodonik-peroksid ili magnezijum-peroksid (Bamforth I Singleton, 2005).



#### **2.3.1.2.2. Hranljive supstance**

Stepen degradacije zagađujućih supstanci zavisi i od koncentracije azota i fosfora koji su neophodni za rast mikroorganizama. Za optimalan rast mikroorganizama potrebno je da ugljenik, azot, fosfor i kalijum budu u masenom odnosu C:N:P:K=100:10:1:0.1, što je približno odnosu ovih elemenata u biomasi (Boopathy, 2000). Visoka koncentracija ugljovodonika uzrokuje ekstremno visoki odnos C:N, C:P ili oba što je nepogodno za rast mikroorganizama, pa je uobičajeno je da se hranljive supstance dodaju u zemljište radi uspostavljanja optimalnog masenog odnosa (Atlas, 1995; Vidali 2001). Dodatak hranljivih supstanci naziva se biostimulacija, a može se koristiti mineralno đubrivo ili đubrivo organskog porekla (Das i Chandran, 2011).

#### **2.3.1.2.3. Vlaga**

Optimalna vlažnost zemljišta za procese bioremedijacije je 12-30% ili 40-80% kapaciteta zasićenja. Zemljište u suštini treba da je vlažno, ali ne i mokro. Prekomerna vlažnost zemljišta ograničava kretanje vazduha kroz površinske slojeve, što za posledicu ima ograničenu dostupnost kiseonika, koji je neophodan za aerobne metaboličke procese (Rittman and McCarty, 2001).

#### **2.3.1.2.4. Temperatura**

Temperatura utiče na sposobnost mikroorganizama da degraduju zagađivače, na njihov rast, kao i na brzinu razgradnje kontaminanata. Takođe, od temperature zavisi i viskozitet, ratvorljivost, fizička priroda i hemijski sastav zagađivača. Pokazano je da rastvorljivost PAH raste sa porastom temperature, pri čemu se povećava i biodostupnost ovih molekula (Bamforth i Singleton, 2005). Biodegradacija naftnih ugljovodonika se može odvijati u širokom opsegu temperature, jer su izolovani psihrofilni, mezofilni i termofilni mikroorganizmi koji koriste ugljovodonike nafte kao jedini izvor ugljenika i elektrona (Rittman i McCarty, 2001).

#### **2.3.1.2.5. pH vrednost**

pH vrednost zemljišta utiče na tip mikroorganizama koji su na raspolaganju za biodegradaciju. Bakterijama obično odgovara neutralna sredina, dok gljivama slabo kisela sredina. Optimalno pH zemljišta za optimalnu aktivnost mikroorganizama je u

granicama od 6 do 8. U slučaju kiselijeg zemljišta pH se podešava dodatkom kreča, a u slučaju suviše alkalnog dodatkom amonijum-sulfata (Alexander, 1999; Rittman i McCarty, 2001).

#### **2.3.1.2.6. Surfaktanti**

Surfaktanti su jedinjenja koja smanjuju površinski napon vode. Oni povećavaju rastvorljivost hidrofobnih supstanci u vodi. S obzirom da se ugljovodonici vezuju za čestice zemljišta, surfaktanti potpomažu proces desorpcije nepolarnih jedinjenja, povećavajući na taj način njihovu bioispoljivost. Surfaktanti koji se koriste u procesima bioremedijacije mogu biti hemijskog i biološkog porekla. Veoma je bitno da budu biodegradabilni i da ne inhibiraju rast mikroorganizama (Mihelcic i dr., 1995).

#### **2.3.1.2.7. Tekstura zemljišta**

Tekstura zemljišta utiče na propustljivost, sadržaj vlage i ukupnu gustinu zemljišta. Fino sprášena zemljišta su manje propustljiva od zemljišta sa krupnim česticama. Zemljišta sa niskom propustljivošću obično su spleljena i otežavaju prenos vode, vazduha i hranljivih supstanci. Ovakvom zemljištu se prilikom bioremedijacije dodaju agensi (slama ili piljevina) radi postizanja željene teksture. Na brzinu degradacije zagađivača u kontaminiranom zemljištu utiče i sadržaj gline, organske supstance i udeo pojedinih frakcija peska. Zemljište u kome se u većoj količini nalaze pesak i šljunak poseduje dobru drenažnu sposobnost i propustljivo je za vazduh (Philip i Atlas, 2005; Boopathy, 2000).

### **2.3.1.3. Mikroorganizmi**

Upotreba mikroorganizama u procesima biodegradacije je u stalnom porastu. Njihov biodegradacioni potencijal je uslovljen kataboličkim genima i enzimima (Khomenkov i dr., 2008). Mikroorganizmi poseduju različite mehanizme za adaptaciju na hidrofobne supstrate kao što su: modifikacija ćelijske membrane, proizvodnja površinski aktivnih supstanci ili upotreba efluks pumpi za smanjenje koncentracije toksičnih komponenti (Van Hamme, 2004).

Rodovi mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike nafte su kod bakterija: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*,

*Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* i *Bacillus*, kod kvasaca: *Rhodotorulla*, *Candida*, *Sporobolomyces* i *Aureobasidium*, a kod plesni: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* i *Phanerochaete* (Beškoski i dr., 2012; Cerniglia i Sutherland, 2001; Kuhad i Gupta, 2009).

Pojedinačni mikroorganizmi imaju sposobnost da razgrade samo određeni broj komponenti nafte, ali postojanjem mikrobnih zajednica, poput onih koje se nalaze u zemljištu, omogućen je veći stepen razgradnje. Postoje komponente nafte koje je moguće razložiti samo zajedničkim dejstvom većeg broja mikroorganizama tj. kometabolički. Osim mikroorganizama koji primarno razlažu naftu, u zemljištu su prisutni i drugi mikroorganizmi koji za svoju ishranu koriste komponente nastale primarnom razgradnjom ugljovodonika nafte (Mishra i dr., 2001; Horakova and Nemeč, 2000). Za mikroorganizme u procesu bioremedijacije je jako bitno da budu aktivni, tj. da imaju sposobnost biodegradacije određenog zagađivača i da njihov broj bude dovoljno veliki, kako bi razgradnja bila što efikasnija.

Bioaugmentacija je dodavanje koncentrovane populacije mikroorganizama u cilju sanacije kontaminiranih oblasti, u kojima je broj mikroorganizama manji od  $10^5$  CFU/g ili ukoliko mikroorganizmi ne poseduju mehanizme za razgradnju kontaminanta (Mishra i dr., 2001). Mikroorganizmi koji se koriste za bioaugmentaciju, mogu autohtoni (zimogeni) i alohtoni. Zimogeni mikroorganizmi se izoluju sa mesta zagađenja. Egzogeni mikroorganizmi su izolovani sa drugih lokaliteta, ili nabavljeni iz komercijalnih izvora, testirani u laboratoriji na biodegradaciju određenih kontaminanata, i ukoliko je biološka aktivnost dobra, koriste se za oporavk degradiranih prostora. Najpraktičnije je upotrebiti mikroorganizme sa mesta koje treba da bude dekontaminirano (Horakova i Nemeč, 2000), zato što su prisutni mikroorganizmi adaptirani na uslove sredine, kao i na eventualno prisustvo drugih zagađujućih supstanci (Gojgić-Cvijović i dr., 2012). Nakon izolacije, mikroorganizmi se umnožavaju u bioreaktoru, i apliciraju u procesu bioremedijacije.

#### **2.3.1.4. Putevi biodegradacije ugljovodonika nafte**

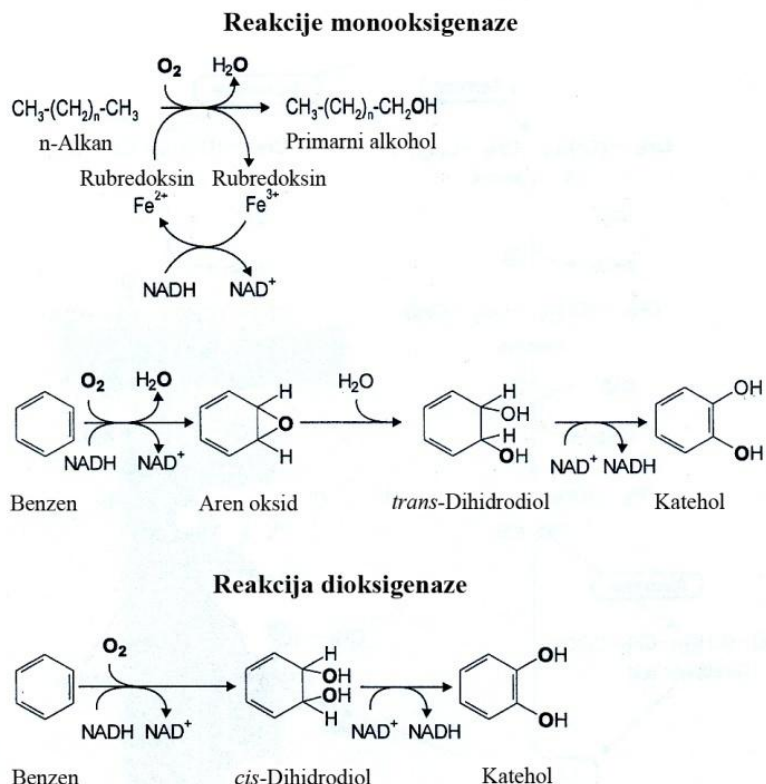
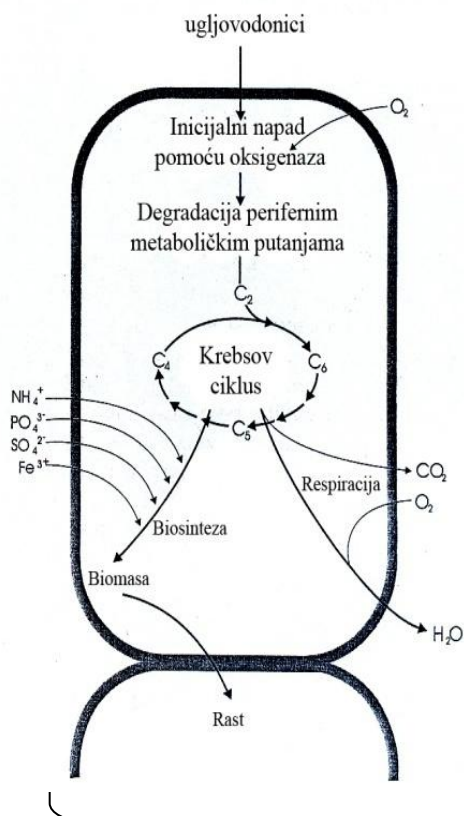
Mikroorganizmi mogu koristiti različite ugljovodonike nafte kao izvore ugljenika, pri čemu su najčešće korišćeni ugljovodonici: alkani, cikloalkani, BTEX i

PAH. Najefikasnija i najkompletnija razgradnja ugljovodonika nafte se dešava pod aerobnim uslovima. Anaerobna degradacija se odvija znatno sporije od aerobne, ali je značajna u uslovima snižene koncentracije kiseonika (Peng, 2008).

#### **2.3.1.4.1. Aerobna razgradnja**

U aerobnoj biodegradaciji, kiseonik je pored toga što je terminalni akceptor elektrona i jedan od ključnih reaktanata u početnim metaboličkim putanjama. Naime, kiseonik se ugrađuje u supstrate pomoću enzima monooksigenaza (alifatični i neki aromatični ugljovodonici) i dioksigenaza (aromatični ugljovodonici), pri čemu nastaju primarni alkohol ili katehol koji se dalje razlažu perifernim metaboličkim putanjama do masnih kiselina koje ulaze u process  $\beta$ -oksidacije na koji se dalje nastavlja Krebsov ciklus (Slika 2.15) (Milić, 2011; Singh i Ward, 2004).

Na Slici 2.15. je prikazan princip aerobne degradacije ugljovodonika.

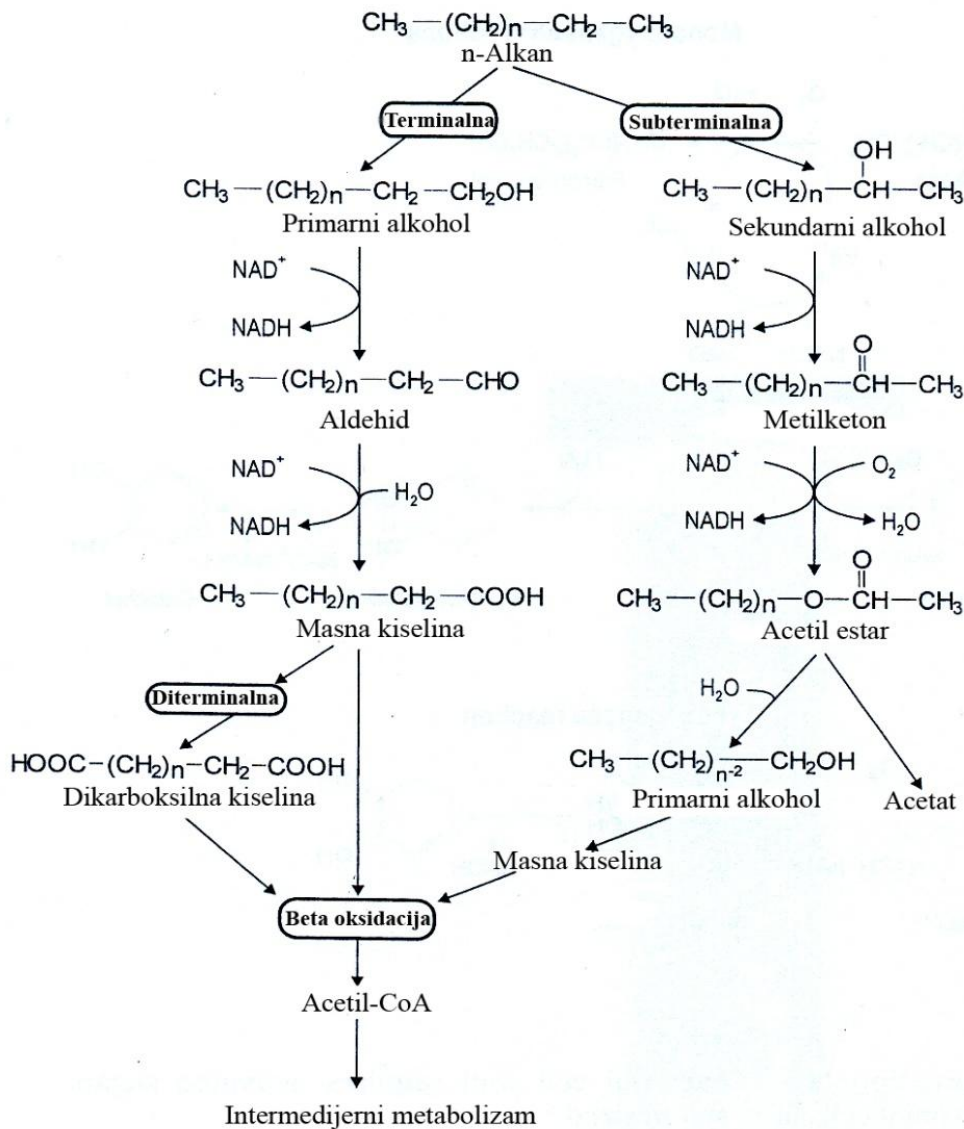


**Slika 2.15.** Princip aerobne degradacije ugljovodonika

### Alifatični ugljovodonici

Terminalna oksidacija je glavna putanja oksidacije alkana. Alkohol-dehidrogenaza katalizuje oksidaciju alkohola u aldehyd, aldehyd-dehidrogenaza katalizuje oksidaciju aldehyda u masnu kiselinu koja se dalje β-oksidacijom prevodi u acetil-CoA koji ulazi u ciklus limunske kiseline.

Diterminalna oksidacija alkana je sporedna putanja degradacije alkana pri čemu nastaje dikarboksilna kiselina koja se β-oksidacijom prevodi u acetil-CoA. Subterminalna oksidacija je karakteristična za alkane kratkog niza (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), pri čemu se dobija sekundarni alkohol, koji se oksiduje u keton. Keton se dalje prevodi do estera. Esteraza hidrolizuje estar do alkohola i masne kiseline, koja se dalje metaboliše β-oksidacijom (Van Beilen i dr., 2003).



**Slika 2.16.** Putanja degradacije alkana

### Aromatični ugljovodonici

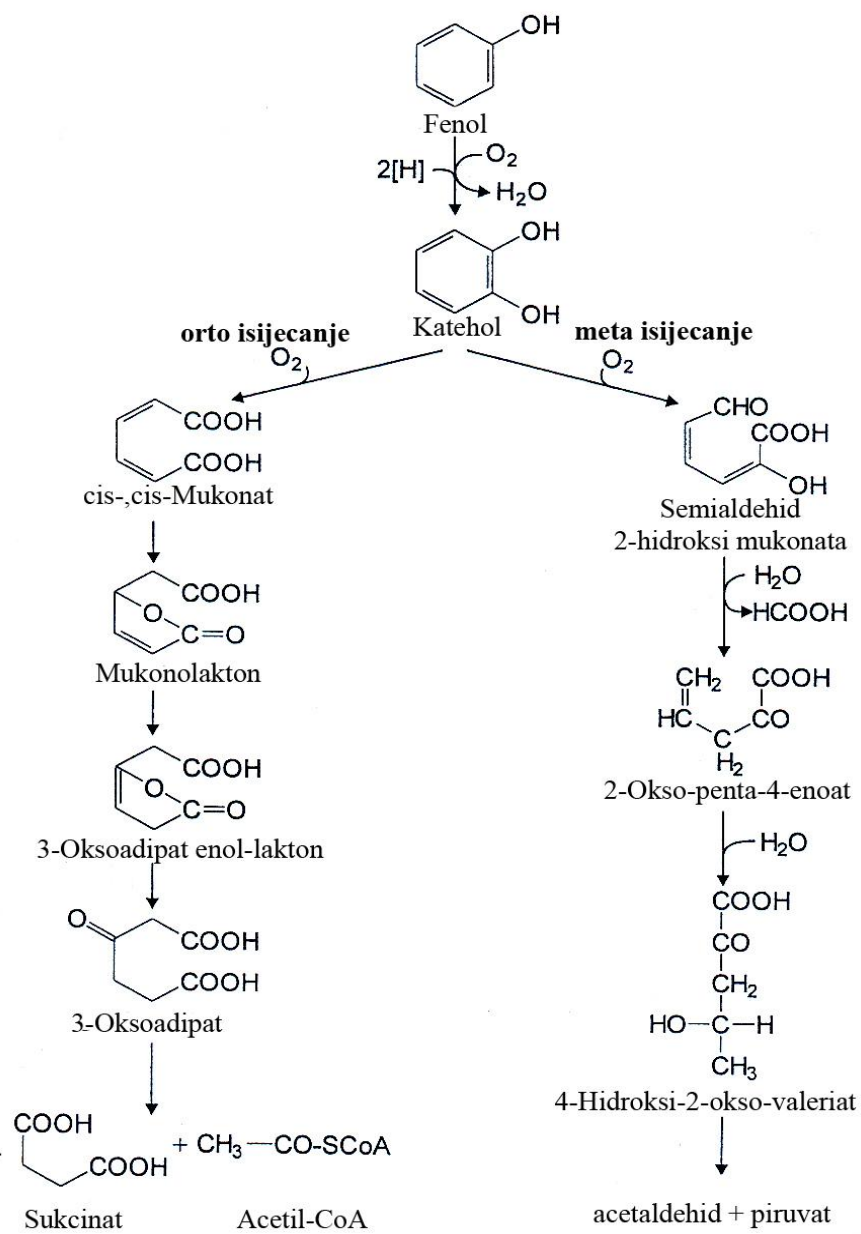
Degradacija aromatičnih jedinjenja podrazumeva njihovu transformaciju do određenih međuproizvoda kao što su katehol, homogentizat ili protokatehual nekim od perifernih putanja. Ovako nastali međuproizvodi bivaju prevedeni u neke od intermedijera ciklusa limunske kiseline i dalje metabolisani u istom (Singer i Finnerty, 1984).

## Monoaromatični ugljovodonici

Početni koraci, hidroksilacija i dehidrogenacija, su zajednički za sve putanje mikrobiološke degradacije monoaromatičnih ugljovodonika. Na ovaj način se aromatični prsten prevodi u katehol, centralni intermedijer metabolizma aromatičnih ugljovodonika (Miličić-Terzić, 2001).

Metabolizam katehola se dalje račva u dve alternativne putanje (Slika 2.17.). U prvoj putanji dolazi do *orto* ili intradiol isecanja prstena, dok u drugoj putanji dolazi do *meta* ili ekstradiol isecanja prstena katehola. Krajnji proizvodi i *o*-puta (sukcinat i acetil-CoA) i *m*-puta (acetaldehid i piruvat) ulaze u Krebsov ciklus (Milić, 2011).

Na Slici 2.17. su prikazane dve alternativne putanje aerobne degradacije monoaromatičnih jedinjenja

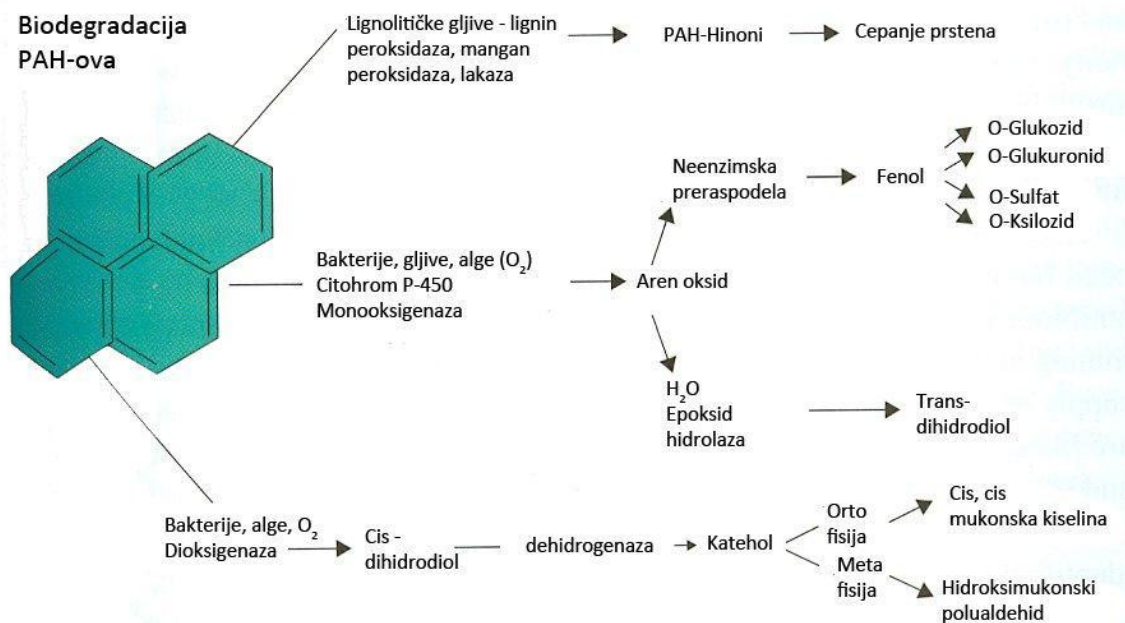


**Slika 2.17.** Dve alternativne putanje aerobne degradacije monoaromatičnih jedinjenja.



## Poliaromatični ugljovodonici

Poliaromatični ugljovodonici se biotransformišu u manje kompleksne metabolite, koji lakše podležu biodegradaciji (Alisi i dr., 2009).



**Slika 2.18.** Šematski prikaz mikrobnog metabolizma PAH-ova.

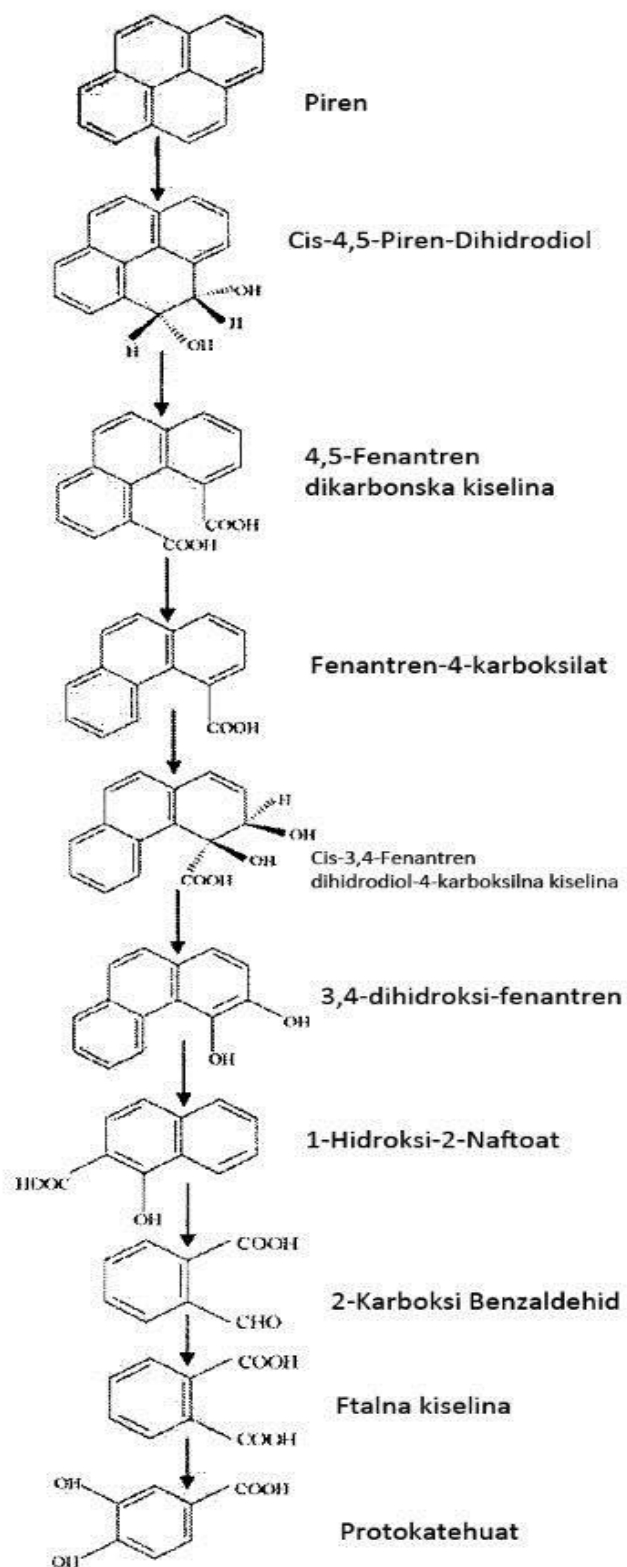
Poznat je veliki broj bakterijskih vrsta koje učestvuju u degradaciji PAH, pri čemu je većina njih izolovana iz kontaminiranog zemljišta ili sedimenata. Najčešći načini biodegradacije PAH su prikazani na Slici 2.18 (Paul, 2007)

Kod većine bakterija, inicijalni korak razgradnje PAH, je ugrađivanje molekuskog kiseonika pomoću dioksigenaza, kada nastaje najpre *cis*-dihidrodiola, a zatim katehol .

Prvi korak u metabolizmu PAH pomoću nelignolitičkih gljiva podrazumeva oksidaciju aromatičnog prstena do aren-oksida pomoću citohrom P<sub>450</sub> monooksigenaza. Nastali aren-oksidi dalje se prevode do *trans*-dihidrodiola. Iako većina nelignolitičkih gljiva nije sposobna za potpunu mineralizaciju PAH, nastali PAH konjugati generalno su manje toksični i više rastvorljivi nego odgovarajuća polazna jedinjenja. Primeri nelignolitičkih gljiva koje koriste oksidativni put posredovan P<sub>450</sub> monooksigenazama su *Chrysosporium pannorum*, *Cunninghamella elegans* i *Aspergillus niger* (Bamforth i Singleton, 2005).

Lignolitičke gljive sintetišu ekstracelularne mangan- ili lignin- peroksidaze, kao i lakaze koje oksiduju PAH nespecifičnom radikalskom reakcijom. Studije koje proučavaju uticaj lignolitičkih gljiva na degradaciju PAH pokazale su da se ovi ugljovodonici degraduju u kombinaciji sa lignolitičkim enzimima, citohrom P<sub>450</sub> monooksigenazama i epoksid-hidrolazama koje vrše kompletnu mineralizaciju polaznog jedinjenja. Takođe je pokazano da je kombinacija enzima iz lignolitičkih i nelignolitičkih gljiva ključna za potpunu mineralizaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika veće molekulske mase, kao što su piren i benzo[ $\alpha$ ]piren (Bamforth i Singleton, 2005). Piren je često korišćen kao model sistem za biodegradaciju visokomolekulskih PAH-ova.

Na Slici 2.19. je prikazana šema biorazgradnje pirena (Haritash i Kaushik, 2009).



Slika 2.19. Šematski prikaz mikrobiološke razgradnja pirena

#### **2.3.1.4.2. Anaerobna razgradnja**

Poslednjih godina se intenzivno proučava anaerobna biorazgradnja ugljovodonika.

Kod anaerobne degradacije prvi korak predstavlja uvođenje vode ili fumarata umesto molekuskog kiseonika. U odsustvu kiseonika alternativni akceptori elektrona kao što su nitrati, joni gvožđa ili sulfati, neophodni su za oksidaciju aromatičnih jedinjenja. Prilikom razgradnje aromatičnih jedinjenja centralni intermedijer je benzoil-CoA čija dalja degradacija ide postepenim zasićenjem prstena do pimelil-CoA koji se zatim kompletno razgrađuje do acetil-CoA i ugljen-dioksida (Bamforth i Singleton, 2005; Haritash i Kaushik, 2009).

### **2.3.2. Tehnologije bioremedijacije**

Izbor tehnologije za bioremedijaciju se zasniva na informacijama dobijenim u toku preliminarnih istraživačkih testova. Ti testovi moraju dati odgovore na sledeća pitanja: Koja je hemijska priroda zagađivača na ispitivanoj lokaciji? Koliki je stepen zagađenja i koje su dimenzije zagađenog prostora? Koje su karakteristika zemljišta i terena? Koje su granične koncentracije koje treba dostići na osnovu zakonske regulative? Koliko je raspoloživog vremena za izvođenje dekontaminacije? Koliki je nivo rizika? Kolika je cena? (Mirsal, 2008).

Bitno je istaći, da se različite tehnologije, pa i abiotički i biotički postupci, mogu kombinovati u cilju smanjenja zagađenja do bezbednog nivoa po prihvatljivoj ceni. Generalno, bioremedijacione tehnologije mogu da se klasifikuju kao *in situ* i *ex situ*.

#### **2.3.2.1. *In situ* tehnike bioremedijacije**

*In situ* tehnologije omogućavaju tretman zagađene zemlje na lokaciji gde je utvrđeno prisustvo zagađenja, pri čemu se izbegavaju troškovi iskopavanja i transporta, a i najmanje je narušavanje životne sredine. Bioremedijacija koja se izvodi na samom mestu zagađenja, *in situ* bioremedijacija, po samoj svojoj prirodi je povoljnija tehnika od *ex situ* bioremedijacije (izvan mesta zagađenja). Međutim, njeno osnovno

ograničenje u odnosu na *ex situ* tehniku je dubina zemljišta koja se može efikasno obraditi (najčešće do 30 cm dubine).

U tehnike *in situ* bioremedijacije se ubrajaju: bioprovetravanje (od eng. *bioventing*), *in situ* površinska obrada zemljišta do 50 cm (od eng. *landfarming*), prirodno smanjenje (od eng. *natural attenuation*), stimulirana bioremedijacija (od eng. *enhanced bioremediation*) i fitoremedijacija.

**Bioprovetravanje** (eng. *bioventing*) predstavlja ubacivanje kiseonika u zonu zagađenog zemljišta takvom brzinom da se ostvari maksimum aerobne mikrobne degradacije organskih jedinjenja, a da se isparavanje i oslobađanje kontaminanata u atmosferu smanji na minimum. Tehnike bioventilacije se uspešno primenjuje za naftne derivate kao što su benzin, kerozin, dizel i ulja za grejanje, PAH-ove, ali se može koristiti i za fenole, alkohole, različite hlorovane rastvarače i BTEX komponente.

**In situ površinska obrada zemljišta** primenjuje se za tretman zagađenog površinskog sloja zemljišta (eng. *landfarming*), dubine do 50 cm. Po dodatku hranljivih supstanci i piljevine kontaminirano zemljište se periodično okreće kako bi se obezbedio adekvatan prenos kiseonika i dodatno kvasi da bi se održala odgovarajuća vlažnosti neophodna za mikrobiološku aktivnost. Ovo je metoda kojom se stimuliše biodegradacija autohtonim mikroorganizmima. Metoda se primenjuje *in situ* ukoliko je kontaminacija plitka i ispod nje se nalazi glinoviti sloj ili zaglinjeno vodonepropusno zemljište. Ukoliko je kontaminacija na dubini većoj od 1,5 m zemljište se iskopava i primenjuje se *ex situ* metod.

**Prirodno smanjenje** (eng. *natural attenuation*), poznato i kao bioslabljenje (eng. *intrinsic bioremediation or bioattenuation*) pasivni je remedijacioni postupak, koji se bazira samo na praćenju prirodnog procesa prečišćavanja koja se odigrava *in situ* bez ikakve stimulacije. Zagađujuća supstanca se podvrgava biodegradaciji, mineralizaciji, isparavanju, razblaženju, disperziji, sorpciji i interakciji sa zemljištem. Tehnologija je primenljiva za PCB-e, ugljovodonike nafte, eksplozive, pojedine metale i pesticide. Nedostaci su dužina trajanja procesa, potencijalna migracija kontaminanata, luženjem, isparavanjem i često nemogućnost postizanja željene dekontaminacije.

**Stimulisana bioremedijacija** (unapređena, poboljšana, na eng. *enhanced bioremediation*) predstavlja primenu biostimulacije (dodatak hranljivih supstanci- azota, fosfora, kiseonika) i/ili bioaugmentacije (dodatak mikroorganizama) na kontaminiranom prostoru u ciju ubrzavanja prirodnih biodegradacionih procesa (Beškoski i dr., 2012).

**Fitoremedijacija** je tehnologija za prečišćavanje kontaminirane zemlje korišćenjem biljaka. Biljke se uspešno koriste za uklanjanje metala, radionuklida, hlorovanih organskih jedinjenja, naftnih derivata, pesticide, insekticida, eksploziva i surfaktanata. Metoda se zasniva na sposobnosti biljaka da deluju kao solarne pumpe za vodu, pri čemu povuku i u vodi rastvorne zagađujuće supstance (Kostić, 2007).

### **2.3.2.2. Ex situ tehnike bioremedijacije**

Bioremedijacija van mesta zagađenja (*ex situ*) zahteva iskopavanje zagađenog zemljišta i njegov transport do mesta obrade. Na utvrđenom mestu se meša sa otpadom iz drveno-prerađivačke industrije uz dodatak hranljivih supstanci. Zemljište se poljoprivrednom mehanizacijom periodično okreće, čime se povećava aeracija i izbegava heterogena degradacija. Optimalan sadržaj vlage se održava navodnjavanjem ili rasprskavanjem, a optimalan pH dodavanjem gašenog kreča ili fosforne kiseline. Ova jednostavna tehnologija je često korišćena u naftnoj industriji za dekontaminaciju naftnog mulja (Beškoski i dr., 2012).

U *ex situ* tehnike spadaju: uređene biološke halde (od eng. *biopiles*), kompostiranje, i primena bioreaktora. Bitno je napomenuti da se površinska obrada zemljišta (od eng. *landfirming*) može realizovati i *ex situ* postupkom bioremedijacije.

**Uređene biološke gomile** (eng. *biopiles*), biološke halde, su projektovani sistemi u kojima se iskopano zemljište gomila u visine od nekoliko metara oko sistema za distribuciju vazduha. U gomile se dodaju hranjive supstance i materijal koji povećava rastresitost. Sistem se aeriše produvanjem vazduha kroz gomilu duvača ili vakum pumpi, u cilju stimulacije aerobne mikrobne aktivnosti. Vlažnost zemljišta i sadržaj neophodnih hranljivih supstanci se kontroliše. Proces se odvija na vodenonepropusnom terenu što se postiže radom na asfaltu, ili postavljanjem čvrstih polietilenskih folija. Procedne tečnosti se sakupljaju sistemom cevi i prečišćavaju sistemom filtera ili odvede

do sabirnog bazena, a odatle se vraćaju prskalicama na haldu. Zemljište se pokriva nepropusnom folijom radi kontrolisanja gubitka vode isparavanjem, isparavanja štetnih supstanci, kontrolisanja atmosferskih tečnosti, čuvanja toplote koja se oslobađa u toku mikrobioloških procesa, a potrebna je za optimalnu biodegradaciju. Karakteristike zemljišta i klimatski uslovi određuju i utiču na ovaj proces, dok su hranljive supstance, kiseonik, vlaga i pH faktori koji se mogu kontrolisati s ciljem ubrzanja remedijacionog postupka. Biogomile se mogu porediti sa tehnikom „landfarming“, osnovna razlika je u debljini sloja zemljišta koji je podvrgnut bioremedijaciji. Tehnologija se uspešno primenjuje za obradu halogenih i nehalogenih isparljivih organskih jedinjenja (eng. *volatile organic compounds-VOCs*), naftnih ugljovodonika, poluisparljivih organskih jedinjenja (eng. *semivolatile organic compounds-SVOCs*) i pesticida. Njene prednosti su jednostavnost projektovanja i primene, niska cena, zatim zatvorenost sistema kao i kratko vreme obrade (Rončević, 2007).

**Kompostiranje** (engl. *composting*) je tehnika koja se bazira na mešanju zagađene zemlje sa bezopasnim organskim poljoprivrednim otpadom. Prisustvo poljoprivrednog otpada pozitivno utiče na razvoj bogate mikrobne populacije i povećanje termičkih karakteristika samog procesa. Krajnji proizvod ima veliki mikrobni diverzitet i uobičajeno se upotrebljava kao dodatak zemljištu jer sadrži hranljive supstance neophodne biljkama (Rončević, 2007).

**Bioreaktori** su jedna od najvažnijih *ex situ* tehnika čiji je osnovni princip stimulacija biološke aktivnosti kroz obezbeđivanje optimalne temperature, stepena aeracije, hranljivih supstanci i drugih faktora. Upotreba bioreaktora znatno skraćuje vreme trajanja procesa bioremedijacije. Tehnologija se još naziva bioremedijacija u tečnom stanju (eng. *slurry phase bioremediation*). Zagađeno zemljište, sedimen ili mulj se iskopava, meša sa vodom i ubacuje u bioreaktor. Suspenziji se dodaju hranljive i površinski aktivne supstance uz mehaničko mešanje ili aeraciju. Uobičajeno, 10-30% suspenzije u reaktoru je suva supstanca. Zatvoren sistem omogućava praćenje ne samo temperature, pH i aeracije već i isparljivih organskih jedinjenja. Po završetku procesa, zemljište se suši, a preostala voda dodatno obrađuje filtriranjem, pre ispuštanja u prirodni recipijent u skladu sa lokalnim propisima. Ova tehnologija nalazi primenu za remedijaciju zemljišta kontaminiranog ugljovodonicima nafte, rastvaračima i

pesticidima. Brzina i efikasnost dekontaminacije je znatno veća u odnosu na ostale bioremedijacione procese. Cena tretmana je najviša u odnosu na druge biološke postupke (Beškoski i dr., 2012).

### **2.3.3. Prednosti i mane bioremedijacije**

Bioremedijacija je prirodni proces i zato se smatra pogodnom za uklanjanje različitog otpada iz kontaminiranog zemljišta. Broj mikroorganizama koji učestvuju u biodegradaciji povećava se kada ima kontaminacije, a nakon degradacije smanjuje se prisustvo ovih populacija (Vidali, 2001).

Prednost bioremedijacije ogleda se u tome što ova tehnologija predstavlja deo zelene hemije uklapajući se time u strategiju održivog razvoja, a njena *in situ* tehnologija najmanje narušava životnu sredinu. Naime, ona podrazumeva transformaciju zagađivača u netoksične produkte (razgradnja ide do ugljen-dioksida, vode i biomase). Bioremedijacija se smatra bezbednom tehnologijom koja rešava problem zagađenja bez ikakvog skladištenja otpada. Osim toga, ova metoda pruža niže cene postupaka u poređenju sa alternativnim metodama (Beškoski i dr., 2012).

Osnovno ograničenje ove metode je što se ne može upotrebiti za dekontaminaciju zemljišta kontaminiranog toksičnim supstancama koje nisu biodegradabilne. Ne može se upotrebiti ni za remedijaciju zemljišta sa izuzetno visokom koncentracijom zagađujućih supstanci. Opasnost predstavlja i mogućnost nastanka još toksičnijih proizvoda od polaznih kada ne dođe do potpune degradacije. Biološki proces je često veoma specifičan zbog prisustvo i aktivnost određenih populacija mikroorganizama, i veoma kompleksan i zahtevan u pogledu uslova spoljašnje sredine neophodne za njihov rast. Još jedan od nedostataka ove metode je što postupci traju duže od ostalih metoda, a i dešava se da je teško sniziti koncentraciju kontaminanta ispod propisane granične vrednosti.

Izuzetno je teško ekstrapolirati pilot-eksperiment na industrijskom nivou, kao i razviti celokupnu tehnologiju koja je pogodna za mesta sa složenom smešom kontaminanata koji nisu ravnomerno raspoređeni u okolini (Vidali, 2001).



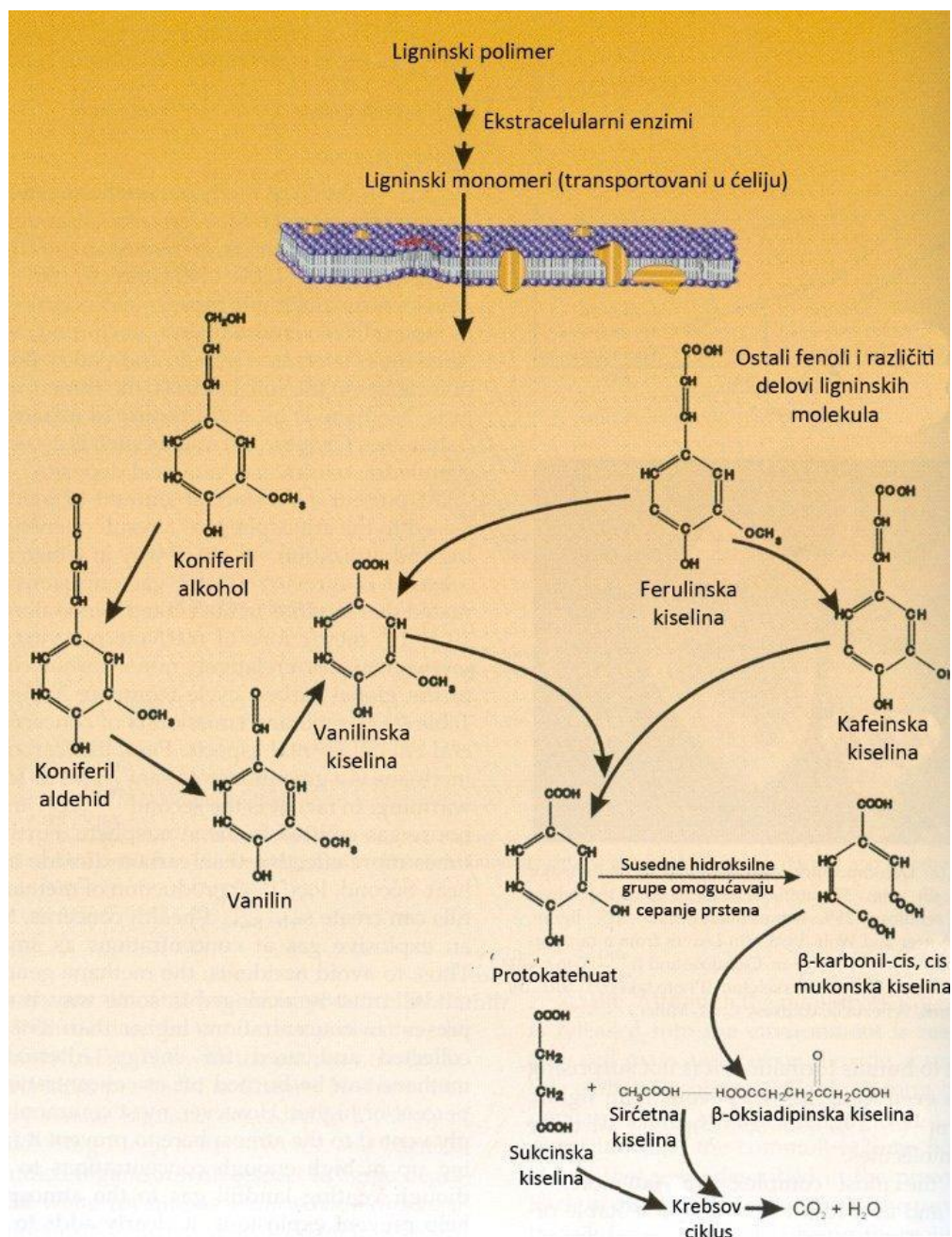
### 2.3.4. Veza između humifikacije i bioremedijacije

U istraživanjima vršenim poslednjih godina na temu bioremedijacija organskih zagađivača, uočeno je da tokom mikrobne razgradnje PAH u procesima bioremedijacije dolazi do formiranja metabolita, strukture slične strukturi huminskih supstanci (Ressler et al. 1999, Henner et al. 1997, Harayama, 1997; Haritash i Kaushik, 2009). Ispitivanja pokazuju da degradacija PAH u suspenziji obogaćenoj kulturama mikroorganizama iz kontaminiranih zemljišta, dovodi do formiranja tamno obojene frakcije rastvorne organske supstance- DOM (eng. *Dissolved Organic Matter*) i partikularne organske supstance- POM (eng. *Particulate Organic Matter*). Ove frakcije su izuzetno rezistentne na bakterijsku degradaciju (Ressler i dr. 1999).

Za formiranje humusnih supstanci od značaja su hinonske strukture (hinonski molekuli) koje mogu imati ulogu prekursora u procesima humifikaciji. Prema tome, velika je verovatnoća da će ove supstance biti uključene u procese formiranja DOM i POM tokom bakterijske degradacije PAH. Dakle, humifikacija se tokom mikrobne degradacije organskih zagađivača u zemljištu i vodama uglavnom nastavlja sa PAH transformisanim proizvodima.

Na Slici 2.20. je prikazana šema razgradnje lignina, kao polaznog jedinjenja za nastanak huminskih supstanci. Lignin se sporo razgrađuje, jer je napravljen kao vrlo heterogen polimer, koji sadrži više aromatičnih rezidua, nego ugljenohidratnih. Razgradnja lignina se dešava uz pomoć nespecifičnog ekstracelularnog enzima, vodonik peroksid zavisne lignin peroksidaze, i ekstracelularnog oksidacionog enzima koji generiše vodonik peroksid. Peroksidazni enzim i vodonik-peroksid sistem proizvode slobodne radikale na bazi kiseonika koji reaguju sa ligninskim polimerom, pri čemu se oslobađaju fenil-propenske rezidue, koje kasnije bivaju razgrađene od starane mikrobnih ćelija (Maier i dr. 2000).

Ako se razgradnja lignina uporedi sa šemom razgradnje PAH (Slika 2.19.), uočavaju se velike sličnosti u putanjama razgradnje.



**Slika 2.20.** Degradacija lignina

Degradacija aromatičnih jedinjenja podrazumeva njihovu transformaciju do određenih međuproizvoda kao što su katehol, hinoni ili protokatehuat nekim od perifernih putanja. Ove intermedijarne supstance, mogu biti potpuno metabolisane u ciklusu trikarbonskih kiselina, a mogu biti i inicijalne supstance za nastanak huminskih

kiselina i jedinjenja sličnih njima. Jedan od ključnih događaja za početak humifikacije tokom biorazgradnje PAH jeste polimerizacija proizvoda nastalih bakterijskom razgradnjom ovih jedinjenja. Specifične fenolne i hinonske strukture predstavljaju značajne elemente za početak ovog procesa. Iz svega navedenog, sa velikom verovatnoćom se može zaključiti, da su mehanizmi mikrobiološke degradacije PAH vrlo slični sa mehanizmima koji zauzimaju mesto u prirodnoj humifikaciji lignina. (Ressler i dr. 1999, Henner i dr. 1997, Harayama, 1997; Haritash i Kaushik, 2009; Maier i dr. 2000).

### 3. MATERIЈAL I METODE

## **3.1 Analitičke metode**

### **3.1.1. Temperatura**

Temperatura vazduha, tečnih i čvrstih uzoraka na terenu je merena digitalnim termometrom model "Elite" proizvođača "HANNA Instruments" (Padova, Italia).

### **3.1.2. Potenciometrijsko određivanje pH vrednosti**

pH čvrstih uzoraka je merena u suspenziji pripremljenoj od homogenizovanog uzorka i prokuvane demineralizovane vode u odnosu 1 : 2,5, prema standardnoj metodi (ISO DIS 10390:2002). Merenje je izvođeno na digitalnom pH-metru (tip pH 300i) proizvodnje "WTW" (Weilhem, Germany) sa kombinovanom elektrodom istog proizvođača.

### **3.1.3. Retencioni vodeni kapacitet**

Retencioni vodenim kapacitet (RVK) određivan je standardnom metodom ISO 11274:1998.

### **3.1.4. Određivanje vlage**

Procenat vlage određivan je u vlagomeru (model MOC-120H) firme Shimadzu Co., Japan sa programom sušenja uzorka na 105 °C, 90 min. Rezultati su dati kao srednja vrednost tri ponavljanja (ISO 11465:1993).

### **3.1.5. Određivanje ukupnog sadržaja pepela**

Sadržaj pepela je određivan u porcelanskim tiglovima spaljivanjem organske supstance uzorka pomoću plamenika do prestanka izdvajanja belih para, a zatim žarenjem u peći na 800 °C tokom 2h.

### **3.1.6. Određivanje sadržaja karbonata**

Sadržaj karbonata u čvrstim uzorcima određivanje je standardnom volumetrijskom metodom ISO 10693:1995. Vrednost atmosferskog pritiska preuzimana je sa web stranice Republički Hidrometeorološki zavod Srbije ([www.hidmet.gov.rs/ciril/osmotreni/index.php](http://www.hidmet.gov.rs/ciril/osmotreni/index.php)).

### **3.1.7. Određivanje koncentracije fosfora u čvrstim uzorcima**

Fosfor je u uzorcima određivan spektrofotometrijski nakon ekstrakcije iz čvrstih uzoraka (Margesin i Schinner, 2005).

### **3.1.8. Gravimetrijsko određivanje ukupnih naftnih ugljovodonika**

Ukupni ugljovodonici nafte (TPH) su određivani gravimetrijski standardnom metodom (BS EN 14345:2004)

### 3.1.8.1. Izolovanje huminskih kiselina

Rastvor za ekstrakciju je napravljen rastvaranjem sledećih komponenti (ISO 5073, 1999):

Natrijum-pirofosfat	15 g
Natrijum-hidroksid	7 g
Demineralizovana voda	do 1000 mL

U 40 g uzorka zemlje doda se 200 mL rastvora za ekstrakciju. Suspenzija se stavi na ključalo vodeno kupatilo u trajanju od dva sata, uz povremeno mešanje. Kada se završi ekstrakcija, uzorak se profiltrira prvo kroz grublji, a zatim kroz finiji filter papir. Nakon filtracije uzorak se zakišeljiva sa 6M hlorovodoničnom kiselinom do pH 1, da bi se istaložile huminske supstance.

Uzorak se nakon taloženja profiltrira kroz filter papir, crna traka, poznate mase. Na filter papiru ostaju huminske kiseline, koje se ispiraju demineralizovanom vodom do pH 5. Nakon toga se suše u sušnici na 105 °C do konstantne mase. Uzorak huminskih kiselina se zatim meri na analitičkoj vagi sa tačnošću  $\pm 0,001$  g.

#### 3.1.8.1.1. Određivanje optičke gustine huminskih kiselina

0,03 g huminskih kiselina je rastvoreno u 100 ml 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>. Pripremljeni rastvori su ostavljeni u normalnim sudovima 4 dana. Za to vreme se reakcija stabilizuje do pH 8,2 – 8,8. Određivanje optičke gustine izvedeno je na talasnim dužinama od 465 nm i 665 nm, na spekrofotometru Specol 1300 (Analytic Jena AG, Germany). Odnos adsorbanci na 465 nm i 665 nm je definisan kao E4/E6, parameter koji definiše optičku gustinu (Pajaczkowska et al. 2003; Xiaowei et al. 2013).

#### **3.1.8.1.2. Određivanje elementarne organske mikroanalize huminskih kiselina**

Uzorci su pre elementarne organske mikroanalize (EOMA) sušeni na 105 °C do konstantne mase. Tako dobijeni uzorci su sprášeni i uraðena je EOMA u automatskom analizatoru „VARIO-EL III CHNS-O Analyzer“ proizvođača Elementar (Hanau, Germany).

#### **3.1.8.1.3. Gel hromatografija uzoraka huminskih kiselina**

Izolovane huminske kiseline su rastvarane u 0,05 M rastvoru natrijum-bikarbonata pH 8,3. Pravljeni su rastvori koncentracije 1 mg/mL. Ovako pripremljeni uzorci huminskih kiselina su korišćeni za gel hromatografiju i spektrofotometriju.

Gel hromatografija je rađena na Sephadex G-100 koloni zapremine gela 35 mL. Kolona je ekvilibrisana sa 10 zapremina demineralizovane vode. Na kolonu je nanošeno po 1 mL rastvora huminskih kiselina koncentracije 1 mg/mL. Uzorci su eluirani sa kolone sa demineralizovanom vodom. Sakupljane su frakcije od po 2 mL pri protoku kolone od 0,5 mL/min. Nakon završene hromatografije snimljene su apsorbance frakcija na talasnoj dužini 405 nm, a apsorbancija je očitavana čitačem mikro ploča (LKB micro plate reader 5060-006). Rezultati dobijeni eksperimentalnim putem su statistički obrađivani u programima Microcal<sup>TM</sup> Origin<sup>TM</sup>, Version 8.0, 1991-2009 Microcal Software, Inc., Microsoft Office Excel 2010.

#### **3.1.8.1.4. Potencijometrijske titracije rastvora huminskih kiselina**

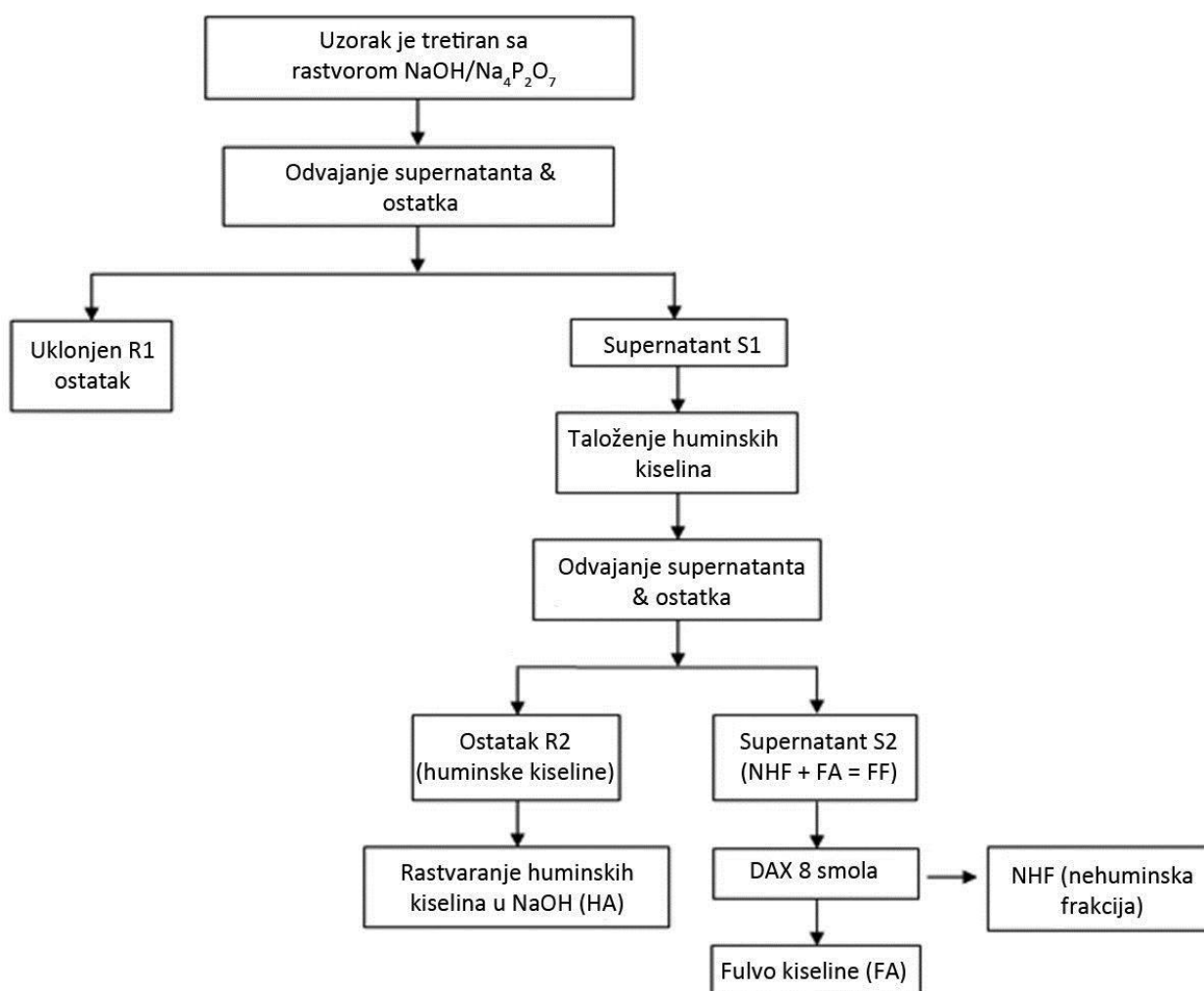
Potencijometrijska i pH merenja su izvedena u istoj elektrohemijskoj ćeliji, opremljenoj Fišerovom platinastom elektrodom i zasićenom kalomelovom elektrodom za potencijometrijska merenja, kao i sa staklenom elektrodom za praćenje pH vrednosti. Digitalni mV/pH instrument (HANNA Instruments) je korišćen za sva pH i potencijometrijska merenja. Huminske kiseline su rastvorene u rastvoru NaOH. Početna pH vrednos rastvora bila je 12. Promene elektromotorne sile (EMS) i pH su praćene nakon dodavanja 0,1 M HCl. Preliminarna studija pokazuje da je pH 12 bila najbolja za rastvaranje huminskih kiselina. Sva merenja su izvedena na sobnoj temperaturi uz mešanje.



### 3.1.10. Ekstrakcija huminskih supstanci

Ekstrakcija huminskih supstanci (HS), kao i razdvajanje njenih frakcija, su izvedeni korišćenjem tri protokola. Svi protokoli su prilagođeni procedurama opisanim u literaturi (Domeizel i dr. 2004).

Huminske kiseline (HA) i fulvo kiseline (FA), frakcije huminskih supstanci, su ekstrahovane prema prema Protokolu 1 (Slika) Huminske supstance su ekstrahovane prema Protokolu 2, dok su huminske kiseline neophodne elementarnu analizu, FT-IR analize, potenciometrijske titracije i E4/E6 odnos ekstrahovane prema Protokolu 3.



Slika 3.1. Šematski prikaz protokola za odvajanje frakcija huminskih supstanci

### **Protokol 1 za ekstrakciju huminskih supstanci (HS)**

Korak 1. 20g osušenog uzorka je tretirano sa 100 ml rastvora NaOH/Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (ISO 5073, 1999) u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od dva sata sa čestim mućkanjem. Suspenzija je ohlađena i supernatant S1 je odvojen od rezidua R1 centrifugiranjem.

Korak 2. Supernatant S1 sadrži rastvorene huminske kiseline (HA) i rastvorene fulvo kiseline (FA). Huminske kiseline su istaložene sa 6M HCl na pH 1. Nakon centrifugiranja, u supernatantu (S2) se nalazi fulvo frakcija (FF), koja sadrži fulvo kiseline i nehumifikovanu frakciju (NHF). Huminske kiseline u talogu su označene kao residue R2, i one su rastvorene u 0,1 M NaOH.

Korak 3. Ekstrakt S2, dobijen u koraku 2, je propušten kroz kolonu DAX 8 (<http://www.humicsustances.org>). Ova kolona je korišćena za odvajanje fulvo kiselina od nehuminske frakcije. Rastvor sakupljen na dnu kolone sadrži nehuminsku frakciju. Rastvor fulvo frakcija je dobijen nakon eluiranja kolone sa 0,1 M NaOH.

### **Protokol 2 za ekstrakciju ukupnih huminskih supstanci**

Uzorak (10g) je tretiran sa 50 ml NaOH/Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> rastvorom (ISO 5073, 1999) u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od dva sata sa čestim mućkanjem. Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen, i u njemu su se nalazile ukupne huminske supstance (HS).

Ukupni organski ugljenik u rastvorima huminskih supstanci, huminskih kiselina i fulvo kiselina, dobijenih prema opisanom protokolu je izmeren korišćenjem uređaja Total Organic Carbon Analyzer, Model 2100 (Zellveger Analytics, USA). Rezultati su izraženi u mg/g suve supstance.

### **Protokol 3 za ekstrakciju huminskih kiselina**

Protokol 3 je identičan protokolu opisanom u odeljku 3.1.8.

### **3.1.10. Analiza fosfatne rude i pirita**

Hemijska karakterizacija fosfatne rude sa ležišta Lisina urađena je konvencionalnom metodom, alkalnim stapanjem sa natrijum karbonatom i natrijum boratom i rastvaranjem u hlorovodoničnoj kiselini (Savić i Savić, 1990).

Alkalni metali su određivani metodom atomske emisije plamene spektrofotometrije, Fe, Al, Ca, Mg i metali u tragu, metodom atomske apsorpcione plamene spektrofotometrije na uređaju Perkin Elmer AAS Analyst 300, a fosfor je određivam spektrofotometrijski u obliku žutog fosfomolibdatnog kompleksa na talasnoj dužini od 460 nm, na uređaju Spekol 1300.

Sumpor iz pirita je određivan gravimetrijski, posle oksidacije sa kalijum hloratom i azotnom kiselinom, i taloženja u obliku barijum sulfata (Jekić i dr. 2007).

## **3.2 Mikrobiološke metode**

### **3.2.1 Podloge za određivanje broja mikroorganizama**

#### **3.2.1.1. Podloga za određivanje broja ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija**

Hranljivi agar se priprema rastvaranjem suve podloge prema uputstvu proizvođača (Anonymus, 2010). Sterilizacija podloge se vrši u autoklavu na 0,10 MPa u trajanju od 20 minuta.

U svim mikrobiološkim radovima se poštuju pravila rada u mikrobiološkoj hemiji, a za pripremanje podloga upotrebljavane su supstance čistoće *pro analysi* (Gojgić-Cvijović i Vrvić, 2003).

### **3.2.1.2. Podloga za određivanje broja kvasaca i plesni**

Saburo - dekstrozni agar se priprema rastvaranjem suve podloge po uputstvu proizvođača uz dodatak 100 mg/L streptomicina nakon sterilizacije, a sterilizacija podloge se vrši u autoklavu na 0,10 MPa za vreme od 20 minuta (Anonymus, 2010).

### **3.2.1.3. Podloga za određivanje broja mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2**

Podloga se priprema rastvaranjem sledećih komponenti:

Amonijum-nitrat	1 g
Dikalijum-hidrogen fosfat	0,25 g
Ekstrakt zemlje	50 mL
Agar	16 g
Demineralizovana voda	do 1000 mL

Sterilizacija podloge se vrši u autoklavu na 0,10 MPa u trajanju od 20 minuta. Tako pripremljenoj, ohlađenoj podlozi, u sterilnoj zoni se dodaje dizel D2 u količini 2000 ppm tj. 2g ili 2,35 mL (Miličić-Terzić i dr. 2000 ; Miličić-Terzić i dr. 2001).

### **3.2.1.4 Podloga za određivanje broja ukupnih anaerobnih mezofilnih hemoorganotroheterotrofnih bakterija**

Ukupne anaerobne mezofilne hemoorganoheterotrofne bakterije su određivane na hranljivom agaru sa glukozom, zasejavanjem u anaerobnim uslovima. Hranljivi agar je pripreman kao za 3.2.1.1. uz dodatak 0,5 % glukoze. Sterilizacija podloge se vrši u autoklavu na 0,10 MPa u trajanju od 20 minuta.

### 3.2.1.5. Podloga 9K za izolovanje i gajenje *Acidithiobacillus sp.*

Podloga se priprema rastvaranjem sledećih komponenti :

FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	44,8 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,1 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,01 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , koncentrovana	0,27 mL
Demineralizovana voda	do 1000 mL
	pH ≈ 2,5

Podloga se zamuti ako se priprema po originalnom uputstvu (Silverman i Lundgren, 1959). Zato se ona priprema na sledeći način: Odmerene supstance rastvore se u ¼ ukupne zapremine vode uz zagrevanje do ključanja. Topao rastvor se procedi kroz hartiju za ceđenje i razblaži do ukupne zapremine. Podloga se sterilise u autoklavu na 0,10 MPa za vreme od 20 minuta. Ohlađeni rastvor se procedi kroz kvalitativnu hartiju za ceđenje. pH se podesi rastvorom sumporne kiseline ili rastvorom natrijum-hidroksida, koncentracije 5 mol/L. Podloga se “hladno sterilise” membranskom filtracijom\*\* i razliva u sterilne erlenmajere i epruvete. Ovako pripremljena podloga postojana je do mesec dana. Na ovoj podlozi su aktivirane kulture, a upotrebljavana je i za određivanje broja *Acidithiobacillus sp.* Kao rezultat rasta *Acidithiobacillus sp.* podloga se boji u crveno usled prisustva gvožđe(III)-jona i pada pH vrednost ispod 2.

---

\*\* Za membransku filtraciju, u svim slučajevima, upotrebljavali smo držač membrane za postupak pod smanjenim pritiskom, prečnika 50 mm i zapremine 0,5 L tip SM 16201 proizvodnje Sartorius. Koristili smo membrane prečnika 50 mm, prosečne veličine pora 0,45 μm tip SM 11406, istog proizvođača.

## **3.2.2. Pomoćne mikrobiološke podloge i rastvori**

### **3.2.2.1 Rastvor za pripremanje serijskih razblaženja**

Fiziološki rastvor koncentracije 0,9% natrijum-hlorida (8,0 g natrijum-hlorida na 1L demineralizovane vode), u koji je dodato 0,1 mL Tween-a 80, je upotrebljavan za pripremanje serijskih razblaženja.

### **3.2.2.1 Ekstrakt zemlje**

U 100 ml demineralizovane vode doda se 10 g kontaminirane zemlje i potom zagreva do ključanja. Rastvor se topao cedi i filtrat čuva u zamrzivaču.

## **3.2.3. Određivanje broja mikroorganizama**

Broj mikroorganizama je određivan metodom serijskog razblaženja (Gojgić-Cvijović i Vrvic, 2003). Ukupne izrasle kolonije hemoorganoheterotrofnih mezofilnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija, kao i ukupne anaerobne mezofilne hemoorganoheterotrofne bakterije su brojane posle 48 sati. Kvasci i spore plesni su brojane posle 72 sata, dok su kolonije mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike brojane nakon 7 do 8 dana. Zasejane agarne ploče su inkubirane na temperaturi od 28°C.

## **3.2.4. Pripremanje i umnožavanje biomase konzorcijuma zimogenih mikroorganizama za reinokulaciju**

Sa površine podloge za određivanje broja mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2 u sterilnoj zoni fiziološkim rastvorom i sterilnom ezom pojedinačne porasle kolonije su prebacivane u 4 erlenmajera od 250 mL sa po 100 mL Startne podloge 1 (SP1). Nakon dva dana na tresilici pri 200 rpm i na 28 °C sadržaj iz erlenmajera od 250 mL je kvantitativno prebacivan u 4 erlenmajera od 5 L sa po 2 L

Startne podloge 2 (SP2). Nakon 4 dana na tresilici pri 200 rpm i na 28 °C, sadržaj suspenzije iz erlenmajera je služio kao inokulum. U inokulum je dodat komercijalni, netoksični i biodegradabilni biosurfaktant Biosolve® CLEAR kompanije The Westford Chemical Corporation (Westford, MA, SAD). On je korišćen kao biodisperzant za rastvaranje dodatih ugljovodnika u prvom redu mazuta. Originalni rastvor je upotrebljavan u koncentraciji 1 mL/L.

Startna podloga 1 (SP1) je pripravljena rastvaranjem sledećih komponenti:

Hranljivi bujon	1,2 g
Kontaminirana zemlja	5 g
Demineralizovana voda	do 100 mL
pH	7,0

Startna podloga 2 (SP2) je pripravljena rastvaranjem sledećih komponenti:

Hranljivi bujon	23,3 g
Kontaminirana zemlja	100 g
Mazut	20 g
Demineralizovana voda	do 2000 mL
pH	7,0

Nakon sterilizacije podloge SP2 u autoklavu, u ohlađenu podlogu u sterilnoj zoni se dodaje vanbilansni mazut kao dominantni izvor ugljenika.

### **3.2.6. Priprema bakterijske kulture *Acidithiobacillus sp. B2* za eksperiment mikrobiološke mobilizacije fosfora iz fosfatne rude**

Bakterijska kultura *Acidithiobacillus sp. B2* je gajena i održavana u aktivnom stanju na hranljivoj podlozi 9K (Silverman and Lundgren, 1959).

Neposredno pred eksperiment luženja, kultura *Acidithiobacillus sp. B2* aktivirana je trostrukim presejavanjem u intervalu od 5-6 dana (eksponencijalna faza) u erlenmajerima od 250ml sa 100ml sveže podloge 9K i inkubirana na 28 °C. Nakon aktiviranja, kultura je umnožavana u erlenmajeru od 5 dm<sup>3</sup> sa 2 dm<sup>3</sup> 9K podloge., za vreme od 5-7 dana, tj. kada je merenjem elektromotorne sile utvrđeno da je preko 95% gvožđe(II)-jona oksidovano u gvožđe(III)-jon. Po isteku vremena umnožavanja, podloga sa biomasom i sa talogom gvožđe(III)-sulfata, je proceđena kroz sterilnu hartiju za ceđenje kvaliteta Whatman No1, a zatim su bakterije koncentrovane na membran-filteru. Talog biomase na membran filtru je ispran sterilnim rastvorom za luženje dok se nije izgubila žućkasto-mrka boja taloga gvožđe(III)-jona. Po završenom ceđenju, bimsa dobijena iz 1dm<sup>3</sup> podloge, sa membrane je isprana sa 20 ml sterilne podloge.

## **3.3.Strukturno-instrumentalne metode**

### **3.3.1. Spekrtofluorimetrija uzoraka huminskih kiselina**

Rastvori huminskih kiselina koncentracije 1 mg/mL su razblazeni demineralizovanom vodom do finalne koncentracije 10 µg/mL. Ekscitacija uzorka huminskih kiselina je rađena na talasnoj dužini od 350nm. Sniman je emisioni spektar ovih uzoraka u opsegu talasnih dužina od 365-650nm. Uzorci su snimani pri konstantnoj temperaturi od 20 °C na Horiba Scientific Fluoromax-4 Spectrofluorometer (Horiba, Kzoto, Japan) spektrofluorimetru.



### 3.3.2. Rendgenska difrakciona analiza

Minerološko-petrografski sastav pepela je određen metodom difrakcije x-zraka. Rendgenska difrakciona analiza (RDA) je urađena na difraktometru proizvodnje Philips (Holandija) tip PW PW-1710. Korišćena je rendgenska cev tipa NF sa bakarnom antikatodom. Anodno opterećenje cevi bilo je 40kV i 30mA.

Prorezi ('slitovi') su bili fiksni 1,0 mm-0,10 mm. Uzorci su presovani u standardne aluminijumske ramove i snimani su u području  $2\theta$  od  $5-60^\circ$ . Podaci su prikupljeni tako što je meren svaki 0,020 u trajanju od po 0,5 s .

Identifikacija minerala je urađena korišćenjem JCPDS 9-0432 i JCPDS 42-1340 (Powder Diffraction File).

### 3.3.3. $^{13}\text{C}$ NMR spektroskopija

$^{13}\text{C}$ -NMR spektri huminskih kiselina snimljeni su na uređaju Varian Gemini 2000 Spectrometer. Uzorak za NMR analizu pripremljen je rastvaranjem 50 mg huminskih kiselina u 1 mL 0,3M rastvora NaOD u  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.3.4. Infracrvena spektroskopija

Uzorci zemljišta, analizirani su infracrvenom (IC) spektroskopijom. Spektri su snimljeni na instrumentu Nicolet 6700 FT-IR u ATR (eng. *Attenuated Total Reflection*) modu. Interpretacija spektara vršena je pomoću softvera OMNIC Software, ThermoNicolet.

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

U ovom radu, je proučavana primena različitih mikroorganizama kao „bioloških agenasa“ kroz dva procesa od suštinskog značaja za nastanak zemljišta. Prvi podrazumeva primenu zimogenog aktivnog konzorcijuma mikroorganizama za *ex situ* bioremedijaciju naftnog zagađenja kao i praćenje procesa humifikacije, pošto su huminske supstance jedan od ključnih elemenata kvaliteta zemljišta. Međutim, da bi zemljište bilo plodno, nisu dovoljne samo huminske supstance, već i prisutnost dostupnih esencijalnih elemenata, a pre svih fosfora i kalijuma. Mobilizacija fosfora posredstvom mikroorganizama je drugi proces, koji je proučavan u ovom radu, tako što su korišćeni fosfatna ruda i koncentrat pirita kao supstrat, uz dodatak kulture acidofilne gvožđe(II)-oksidujuće bakterije *Acidithiobacillus sp. B2* kao katalizatora solubilizacije. Osnovna ideja je bila rastvaranja fosfata iz fosfatne rude, zahvaljujući bakterijski generisanom kiselom gvožđe(III)-sulfatu iz pirita, tj. *in situ* generisanje usvojivog fosfora. Naime, oksidacija pirita počinje bakterijskom oksidacijom sulfida do sulfata, a nastavlja se hemijskom oksidacijom, dejstvom bakterijski generisanog  $Fe_2(SO_4)_3$  koji je u kiseloj sredini dobar hemijski oksidans. Hemijska oksidacija pirita kao rezultat daje redukovani oblik jona gvožđa, koji opet *Acidithiobacillus sp.* oksiduje do gvožđe(III)-jona. To znači da je proces cikličan i u prirodi poznat kao “fero-feri” ciklus. Ključna uloga *Acidithiobacillus sp.* je u regeneraciji gvožđe(III)-jona, kao jakog oksidacionog sredstva i sumporne kiseline koja pomaže rastvaranje fosfora iz fosfatne rude.

Prvi deo istraživanja (sinteza i transformacija huminskih supstanci tokom bioremedijacije naftnih zagađivača) je obuhvatio tri eksperimenta. U ovim eksperimentima je proučavana mogućnost primene autohtonog zimogenog konzorcijuma mikroorganizama za bioremedijaciju naftnog zagađenja, kao i mogućnost nastanka huminskih supstanci tokom procesa bioremedijacije. Naime, neki naučnici (Ressler i dr. 1999, Henner i dr. 1997, Loehner i dr., 2001; Brassington i dr., 2007; Stroud i dr., 2007) smatraju da tokom biorazgradnje policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH) nastaju supstance slične huminskim, što je veoma značajno, s obzirom da huminske supstance predstavljaju jedan od ključnih elemenata kvaliteta zemljišta.

U cilju ispitivanja navedene hipoteze, dizajnirana su pilot postrojenja za bioremedijaciju, i praćenje promena u ugljovodoničnom sastavu, kao i promena u sastavu huminskih supstanci.

U prvom eksperimentu je praćen proces humifikacije tokom bioremedijacije zemljišta kontaminiranog naftom i derivatima nafte, dok je u drugom i trećem eksperimentu praćen proces humifikacije složenog naftnog kontaminanta (naftno zagađenje +katalizator) u sloju veštačkog zemljišnog supstrata, sa rečnim peskom kao matičnom stenom. Svi eksperimenti su detaljno opisani u daljem tekstu.

Drugi deo istraživanja (mikrobiološka mobilizacija fosfora iz fosfatne rude) je bio baziran na ispitivanju dinamike i količine izluženog-mobilizovanog fosfata iz fosfatne rude dejstvom sopstvenog soja bakterijske kulture *Acidithiobacillus sp. B2*.

## **4.1. Sinteza i transformacija huminskih supstanci tokom bioremedijacije naftnih zagađivača**

### **4.1.1. Prvi eksperiment**

Pilot eksperiment bioremedijacije je realizovan *ex situ* postupkom bioremedijacije zemljišta kontaminiranog različitim naftnim derivatima i različitog nivoa kontaminacije.

U krugu Rafinerije nafte Pančevo (RNP) na asfaltnoj, vodonepropusnoj podlozi od zemljišta različitog nivoa kontaminacije naftom i naftnim derivatima izrađena je bioremedijaciona halda («otvoreni bioreaktor») zapremine 150 m<sup>3</sup>.

#### **4.1.1.1. Izgradnja pilot halde za *ex situ* bioremedijaciju 150 m<sup>3</sup> zemljišta**

Zemljište je homogenizovano upotrebom poljoprivredne mašine i u njega je umešana piljevina (10% V/V) u cilju povećanja retencionog vodnog kapaciteta, aeracije, ali i kao alternativni izvor ugljenika. Da bi se povećala rastvorljivost i mešljivost naftnih ugljovodonika, sa vodom su dodati estri alkohola i masnih kiselina dugog lanca u vidu komercijalne biodegradabilne površinski aktivne supstance, biodisperzanta BioSolve® CLEAR. Kako mikroorganizmi sa ugljovodicima ostvaruju kontakt na granici faza

polarno/nepolarno, dodatkom biodisperzanta kontaktna površina je povećana. Kao izvor azota i fosfora za biostimulaciju procesa dodat je stajnjak sa farme živine (oko 5% m/m). Na asfaltnu podlogu je postavljena čvrsta polietilenska folija i preko nje ravnajući sloj od čamovih dasaka prekriven folijom. Preko svega je nanet sloj piljevine debljine 20mm.



**Slika 4.1.** Homogenizacija zemlje i piljevine



**Slika 4.2.** Postavljanje cevi za aeraciju



**Slika 4.3.** Mešanje zemlje pre nanošenja na haldu



**Slika 4.4.** Nanošenje zemlje



**Slika 4.5.** Sistem oluka za sakupljanje procedne tečnosti



**Slika 4.6.** Konačni izgled halde

Geometrija halde je trostrani paralelopiped, čije su dimenzije takve da jedan dužni metar sadrži  $6 \text{ m}^3$  tretiranog materijala. Prirodna aeracija je stimulirana sistemom perforiranih cevi. Vlažnost je održavana tehnološkom vodom iz primarnog rezervoara zapremine  $1 \text{ m}^3$  koji je upotrebljavan za sakupljanje procednih tečnosti i za dodavanje biomase, manuelnim orošavanjem pumpom do 100% retencionog vodnog kapaciteta.

Halda je izgrađena na podlozi sa nagibom od 2°. Procedni rastvori su sistemom drenaže i oluka sakupljeni u sekundarni rezervoar, sa automatskom kontrolom nivoa koji je potapajućom pumpom spregnut sa primarnim rezervoarom za vodu, odnosno sistem je prema uticajima na okolinu potpuno zatvoren. Homogenizacija i dodatna aeracija sadržaja halde je obezbeđivana ručnim mešanjem celokupne količine svake dva nedelje. Halda je od direktnih spoljnih uticaja zaštićena «plastenikom».

Eksperiment je trajao 6 meseci. Oznake uzoraka i dani bioremedijacije dati su u Tabeli 4.1.

**Tabela 4.1.** Oznake uzoraka i dana bioremedijacije

	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6
<b>Dan bioremedijacije/ uzorkovanja</b>	<b>0</b>	<b>33</b>	<b>63</b>	<b>112</b>	<b>147</b>	<b>184</b>

#### **4.1.1.2. Osnovni hemijski pokazatelji pilot *ex situ* bioremedijacionog procesa u RNP**

Zemljište kontaminirano naftom i naftnim derivatima inicijalno je sadržalo 29,99 ± 1,88 g TPH/kg i 9,3 x 10<sup>5</sup> ćel/g RUV mikroorganizama.

U Tabeli 4.2. prikazani su osnovni hemijski pokazatelji za početni uzorak koji je podvrgnut bioremedijaciji i uzorkovan prvog dana tretmana.

**Tabela 4.2.** Osnovni hemijski pokazatelji za početni uzorak koji je podvrgnut bioremedijaciji

<b>Redni broj</b>	<b>Osobina/komponenta</b>	
<b>Neki osnovni pokazatelji</b>		
1.	Temperatura vazduha (°C)	18,0
2.	Temperatura vazduha na dubini od 15cm (°C)	53,4
3.	pH (1:2.5)	7,9
4.	Retencioni vodeni kapacitet(% (m/m))	12,5
5.	Sadržaj vode na 105°C (%(m/m))	21,3
<b>Elementarna organska mikroanaliza (%)</b>		
6.	Ugljenik	15,87
7.	Vodonik	2,36
8.	Azot	0,35
9.	Sumpor	0,48
10.	Fosfor	0,20
11.	Pepeo	68,2
<b>Sadržaj neorganskog ugljenika (%)</b>		
12.	CO <sub>2</sub>	3,8
<b>Sadržaj ugljovodonika (g/kg)</b>		
13.	Ukupni naftni ugljovodonici (TPH)	29,99±1,88
<b>Biogeni i neki značajni toksični metali (mg/kg)</b>		
14.	Mn	0,11
15.	K	0,92
16.	Mg	5,43
17.	Ca	46,23
18.	Fe	9,18
19.	V	0,072
20.	Ni	0,034

U uzorku HP1 temperatura halde na dubini od 15cm veća od 50°C ukazuje na intenzivne egzotermne biodegradacione procese. Sadržaj TPH je visok. Retencioni vodeni kapacitet, pH vrednost i sadržaj vode od 21% su optimalni za početak bioremedijacije. Izmerene koncentracije azota i fosfora nisu ograničavajuće. Toksični metali poput vanadijuma i nikla su prisutni u niskim koncentracijama.

Osnovni fizički, fizičko-hemijski i hemijski pokazatelji pilot *ex situ* bioremedijacije dati su u Tabeli 4.3.

**Tabela 4.3.** Osnovni fizički, fizičko-hemijski i hemijski pokazatelji pilot *ex situ* bioremedijacije<sup>1</sup>

Uzorak	Temperatura vazduha <sup>2</sup> [°C]	Temperatura zemlje na dubini od 15 cm <sup>2</sup> [°C]	pH (s:l=1:2.5)	Sadržaj vode na 105 °C [% (m/m)]	TPH <sup>3</sup> [g/kg]
HP1	18,0	53,4	7,9	19,9	29,99 ± 1,88
HP2	23,4	34,6	7,7	13,8	23,08 ± 3,32
HP3	37,5	38,2	7,5	33,7	13,73 ± 1,31
HP4	14,5	31,4	7,5	35,6	7,74 ± 2,88
HP5	28,9	37,2	7,6	37,0	5,42 ± 1,76
HP6	15,6	36,8	7,3	23,8	2,17 ± 1,32

<sup>1</sup>Svi rezultati određivanja u laboratoriji su srednje vrednosti tri nezavisna određivanja.

<sup>2</sup>Merenja i određivanja na terenu.

<sup>3</sup>Rezultati se odnose na suhu supstancu određenu na 105 °C.

Iz Tabele 4.3. uočava se da je najniža izmerena temperatura vazduha bila 14,5 °C a najviša 37,5 °C. Temperatura zemljišta na dubini od 15 cm se kretala u opsegu 36,8-53,4 °C što ukazuje na oslobađanje toplote tokom aerobne bioorazgradnje ugljovodonika. pH vrednost se smanjivala tokom procesa sa početnih 7,9 na 7,3. To je u skladu sa poznatom činjenicom da se razgradnjom ugljovodonika u aerobnim uslovima formiraju i organske kiseline kao jedni od produkata oksidacije. Najbitniji pokazatelj bioremedijacionog procesa je sadržaj TPH. U ovom eksperimentu TPH je smanjen sa 30 g/kg na 2 g/kg., što ukazuje na smanjenje od 93%.



### 4.1.1.3. Mikrobiološki pokazatelji pilot *ex situ* bioremedijacionog procesa

Sadržaj osnovnih klasa mikroorganizma prisutnih u tretiranom zemljištu tokom procesa bioremedijacije i to: ukupnih hemoorganoheterotrofnih mezofilnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija, anaerobnih bakterija, kvasaca i spora plesni, celulolitičkih mikroorganizama i mikroorganizama što razlažu ugljovodonike, prikazan je u Tabeli 4.4.

**Tabela 4.4.** Osnovni mikrobiološki pokazatelji pilot *ex situ* bioremedijacije

Uzorak	Mikroorganizmi [CFU/g]				
	UBA <sup>1</sup>	ANA <sup>2</sup>	KIP <sup>3</sup>	CEL <sup>4</sup>	RUV <sup>5</sup>
HP1	$1.0 \times 10^7$	$2,9 \times 10^3$	$1.9 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	$9.3 \times 10^5$
HP2	$1.3 \times 10^7$	$7,9 \times 10^2$	$1.5 \times 10^4$	$1,3 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
HP3	$2.1 \times 10^8$	$4,9 \times 10^3$	$3.0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	$5.1 \times 10^7$
HP4	$7.8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$1.5 \times 10^6$
HP5	$1.0 \times 10^8$	$4,6 \times 10^3$	$2.8 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$	$1.0 \times 10^7$
HP6	$1.0 \times 10^8$	$8,7 \times 10^3$	$7.9 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4$	$8.5 \times 10^7$

<sup>1</sup>Ukupne hemoorganoheterotrofne mezofilne aerobne i fakultativno anaerobne bakterije; <sup>2</sup>Anaerobi; <sup>3</sup>Kvasci i spore plesni; <sup>4</sup>Celulolitički mikroorganizmi i <sup>5</sup>Mikroorganizmi koji razlažu ugljovodonike.

U uzorku HP1 uočava se da je sadržaj mikroorganizama koji kao izvor C atoma koriste ugljovodonike relativno visok u ukupnom broju mikroorganizama što ukazuje da su prirodni remedijacioni procesi otpočeli u zemljištu. Osnovni cilj primenjenog bioremedijacionog procesa je bio da se poveća broj mikroorganizama u zemljištu, a posebno udeo onih koji razgrađuju ugljovodonike nafte. Porast broja mikroorganizama i intenziviranje procesa biodegradacije pored biostimulacijom postignut je i reinokulacijom zimogenih mikroorganizama.

Broj mikroorganizama je bio u opsegu  $10^6$ - $10^8$  CFU/g i predstavljao je dominantnu frakciju u ukupnom broju mikroorganizama što je od presudnog značaja za uspešnost procesa bioremedijacije pošto je ranije utvrđeno da se bioremedijacioni postupci neće odvijati ukoliko je broj  $< 10^4$  CFU/g (Forsyth i dr., 1995).

Udeo mikroorganizama, koji razgrađuju ugljovodonike u njihovom ukupnom broju, na početku je bio nešto veći od 9%, da bi na kraju procesa biodegradatori ugljovodonika bili dominantni sa udelom preko 85% (red veličine  $10^7$  CFU/g), što je potvrda da je odabrani postupak i režim *ex situ* bioremedijacije zemljišta iz rafinerije visokog stepena kontaminacije izuzetno efikasan, zahvaljujući pre svega odgovarajućem izboru mikroorganizama, koji su činili primenjeni konzorcijum biomase, koja je reinokulisana na tretirano zemljište.

Kako je broj mikroorganizama na početku procesa bio  $10^6$  CFU/g u laboratoriji je iz uzorka zemljišta izdvojena mešana populacija mikroorganizama, koji razgrađuju ugljovodonike. Pojedini sojevi su testirani na rast na ugljovodonicima različite strukture kao jedinih izvora ugljenika u mineralnoj podlozi. Kao test supstrati upotrebljeni su: složene smese ugljovodonika različitih klasa (dizel gorivo D-2, parafin, ekstrahovani ukupni ugljovodonici nafte iz tretiranog zemljišta), *n*- i *cyclo*-alkani (heksan, heptan, dekan, heksadekan i cikloheksan), aromatični ugljovodonici (benzen, toluen i smesa izomera ksilena), policiklični aromatični ugljovodonici (fenantren i piren) i hloroform kao hlorovani derivat ugljovodonika. Od zimogenih sojeva koji su pokazali najširi opseg rasta pripreman je konzorcijum koji je umnožavan u laboratoriji. Biomasa velike gustine aktiviranih mikroorganizama je u količini od 10 L svake nedelje tokom prva tri meseca bioremedijacionog procesa i aplicirana na eksperimentalnu haldu.

#### **4.1.1.4. Karakterizacija huminskih kiselina**

##### **4.1.1.4.1. Određivanje količine huminskih kiselina i parametra E4/E6**

Ekstrakcija huminskih kiselina iz uzoraka HP1-HP6 je sprovedena prema opisanoj proceduri. Izolovane huminske kiselina tokom procesa bioremedijacije su podvrgnute daljim analizama. Jedna od prvih analiza koja je urađena je određivanje optičke gustine huminskih kiselina koju karakteriše odnos E4/E6. Karakter optičkih svojstava, a među njima i optičke gustine humusnih materija određuje njihova hemijska građa. Utvrđeno je da je optička gustina organskih materija koje sadrže dvogube veze upravo proporcionalna ovim poslednjim. Optička gustina alkalnih rastvora huminskih

kiselina, karakteriše se odnosom ugljenika aromatičnih jezgara prema ugljeniku bočnih radikala, i veća je ako su prisutni ciklični, a manja ako preovlađuju lančani spojevi.

**Tabela 4.5.** Sadržaj huminskih kiselina u uzorcima iz Rafinerije nafte Pančevo tokom procesa bioremedijacije i E4/E6 ispitivanih uzoraka

<b>Uzorak</b>	<b>% huminskih kiselina</b>	<b>E4/E6</b>
HP1-Hk	1,92	2,15
HP2-Hk	2,08	2,21
HP3-Hk	2,30	2,30
HP4-Hk	2,62	2,43
HP5-Hk	2,72	2,75
HP6-Hk	2,83	3,86

Porast huminskih kiselina tokom procesa bioremedijacije ukazuje na to, da se paralelno sa procesom biorazgradnje naftnih ugljovodonika dešava i humifikacija. To je verovatno posledica toga, što se organske komponente najrezistentnije na biorazgradnju, transformišu i inkorporišu u materijale analogne huminskim supstancama (Ressler i dr. 1999, Henner i dr. 1997, Loehner i dr., 2001; Brassington i dr., 2007; Stroud i dr., 2007).

#### 4.1.1.4.2. Nuklearna magnetna rezonanca (NMR) uzoraka huminskih kiselina

U Tabeli 4.6. su prikazani rezultati NMR uzoraka huminskih kiselina iz Rafinerije nafte Pančevo.

**Tabela 4.6.** NMR uzoraka huminskih kiselina iz Rafinerije nafte Pančevo

Uzorak	Alkil C 0-45 ppm (%)	O/N Alkil C 45-105 ppm (%)	Aromatični C 105-160 ppm (%)	Karbonilni C 160-220 ppm (%)	Stepen aromatičnosti*
HP1-Hk	42,90	26,73	23,15	7,22	24,9 %
HP2-Hk	42,53	26,99	23,56	6,92	25,3 %
HP3-Hk	40,75	26,17	24,18	8,90	26,6 %
HP4-Hk	42,55	26,45	25,16	5,84	26,7 %
HP5-Hk	41,22	26,71	25,50	6,57	27,3 %
HP6-Hk	37,72	26,56	26,10	9,62	28,9 %

\*Stepen aromatičnosti=aromatičniC(105-160)/((aromatičniC(105-160)+alifatičniC(0-105))

Posmatrajući <sup>13</sup>C NMR spektar huminskih kiselina može se uočiti da se procenat alifatičnih struktura (0-45ppm) smanjuje sa odmicanjem procesa bioremedijacije, dok se procenat aromatičnog ugljenika (105-160ppm) i karbonilnog ugljenika (160-220) povećava, kao i sam stepen aromatičnosti. Ovo je u skladu sa pretpostavkom da se procesi bioremedijacije i humifikacije simultano odvijaju, odnosno da tokom bioremedijacije nastaju huminske kiseline.

#### 4.1.1.4.3. EOMA huminskih kiselina i izračunati atomski odnosi H/C i O/C

U Tabeli 4.7. je prikazana elementarna organska mikroanaliza huminskih kiselina iz Rafinerije nafte Pančevo kao i izračunati atomski odnosi H/C i O/C.

**Tabela 4.7.** EOMA, H/C i O/C uzoraka huminskih kiselina iz Rafinerije nafte Pančevo

	<b>C (%)</b>	<b>H (%)</b>	<b>N(%)</b>	<b>S(%)</b>	<b>O*(%)</b>	<b>H/C atomski odnos</b>	<b>O/C atomski odnos</b>
HP1-Hk	63,87	9,43	3,34	1,56	21,80	1,78	0,25
HP2-Hk	61,46	8,96	3,35	1,76	24,47	1,75	0,30
HP3-Hk	60,80	8,89	3,49	1,55	25,27	1,75	0,31
HP4-Hk	60,21	8,62	3,26	1,53	26,38	1,72	0,33
HP5-Hk	59,65	8,20	3,42	1,45	27,28	1,65	0,34
HP6-Hk	59,03	7,70	3,40	1,46	28,41	1,56	0,36

\*Sadržaj kiseonika je izračunat iz razlike do 100

Porast aromatičnih struktura u molekulima huminskih kiselina tokom procesa bioremedijacije je potvrđen i na osnovu rezultata elementarne organske analize, tj. na osnovu opadanja H/C odnosa (Pajaczkowska et al. 2003). Procentni porast kiseonika i O/C vrednosti u huminskim kiselinama tokom procesa bioremedijacije, ukazuju na porast kiseonikovih funkcionalnih grupa (Campitelli and Ceppi, 2008; Chen et al. 1977; Jerzykiewicz et al., 1999; Polak et al. 2009; Pajaczkowska et al. 2003; Xiaowei et al. 2013).

Dobijeni rezultati pokazuju da se tokom bioremedijacije sadržaj ukupnih naftnih ugljovodonika smanjio za oko 93%, dok je zabeležen porast huminskih kiselina od 47%, što je veoma značajno sa aspekta izlečenja zemljišta.

Rezultati nakon prvog eksperimenta su bili ohrabrujući, ali se istovremeno i otvorilo pitanje: Da li je generisanje huminskih kiselina posledica dejstva izolovanog konzorcijuma mikroorganizama na naftno zagađenje, ili je posledica uticaja prisutnih zemljišnih mikroorganizama na stajnjak, koji je dodat kontaminiranom zemljištu kao izvor azota i fosfora?

Kako bi se razrešila dilema o načinu generisanja huminskih supstanci, osmišljena su dva nova eksperimenta. Naime, izvedene su dve bioremedijacije, sa složenim naftnim zagađivačem, u sloju veštačkog zemljišnog supstrata, sa rečnim peskom kao matičnom stenom. Detaljni opisi eksperimenata su dati u daljem tekstu.

## **4.1.2. Drugi eksperiment**

### **4.1.2.1. Opis pilot eksperimenta**

Pilot eksperiment bioremedijacije je realizovan u otvorenim sudovima od  $1\text{m}^3$  u količini od  $0.6\text{ m}^3$  ( $1 \times 1 \times 0,6\text{ m}$ ) u trajanju od 90 dana. Jedan sud je predstavljao kontrolu haldu i u njemu su bili umešani piljevina ( $0,045\text{ m}^3$ ), pesak ( $0,45\text{ m}^3$ ) i zagađivač ( $0,105\text{ m}^3$ ). Piljevina je dodata u cilju povećanja retencionog vodnog kapaciteta, aeracije, ali i kao alternativni izvor ugljenika. Drugi sud je predstavljao inokulisanu haldu, pripremljen je na isti način kao i kontrola, samo su još pored piljevine, peska i zagađivača dodati biostimulatori, izvori azota i fosfora (amonijum-nitrat i kalijum-difosfat) i biomasa. Količine azota, fosfora i kalijuma koje su dodate, u skladu su sa odnosom  $C_{\text{Org}}:N_{\text{Ukupni}}:P_{\text{Dostupni}}:K_{\text{Dostupni}} = 100:10:1:0,1$ . Vlažnost je održavana tehnološkom vodom, manualnim orošavanjem do 100 % retencionog vodnog kapaciteta. Aeracija sadržaja halde je obezbeđivana ručnim mešanjem celokupne količine jednom mesečno. Reinokulacija je rađena takođe jednom mesečno.

U ovom eksperimentu su paralelno sa sa karakterizacijom huminskih kiselina tokom procesa bioremedijacije, određivani i humifikacioni parametri. Naime, neki autori smatraju da su glavni indikatori humifikacije bazirani na kvantifikaciji i praćenju transformacije huminskih kiselina (Castaldi i dr. 2005; Xiaoli i dr. 2007), dok drugi smatraju da kvalitet humifikacije može biti procenjen na osnovu sledećih parametara:  $C_{\text{HA}}/C_{\text{FA}}$  (odnos huminskih prema fulvo kiselinama) (Domeizel i dr. 2004; Jiménez i Garcia, 1992; Lopez i dr. 2002; Sagahara i Inoko, 1981),  $C_{\text{HS}}/C$  (stepen ekstrakcije (TE)),  $C_{\text{FF}}/C_{\text{HS}}$  (indeks polimerizacije(IP)) (Domeizel i dr. 2004; Sugahara i Inoko, 1981).  $C_{\text{HA}}$ ,  $C_{\text{HS}}$ ,  $C_{\text{FF}}$ ,  $C_{\text{FA}}$  i  $C$  predstavljaju rastvoreni organski ugljenik redom u huminskim kiselinama, u huminskim supstancama, u fulvo frakciji, u fulvo kiselinama i ukupni organski ugljenik u čvrstom uzorku.

#### 4.1.2.2. Hemijski i mikrobiološki pokazatelji procesa bioremedijacije

Početna vrednost ukupnih naftnih ugljovodonika (TPH) u pilot postrojenju je iznosila 22,35 g/kg suve supstance. Na kraju eksperimenta, ukupni ugljovodonici su pali na 7,12 g/kg suve supstance u inokulisanoj haldi, dok je u kontrolnoj haldi ta vrednost iznosila 19,21 g/kg suve supstance. Što se tiče huminskih kiselina, u početnom uzorku ih je bilo 0,23%, na kraju eksperimenta u inokulisanom sudu sadržaj huminskih kiselina je porastao na 0,70%, dok je u kontrolnom sudu primećeno neznatno povećanje sa 0,23% na 0,27%.

U Tabeli 4.8. su prikazani hemijski pokazatelji procesa bioremedijacije

**Tabela 4.8.** Hemijski pokazatelji procesa bioremedijacije

Halda	Dan eksperimenta	Vlaga	Pepeo %		HES	TPH	% razlaganja TPH	Huminske kiseline	CaCO <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub>
		%	550 °C	800 °C	(g/kg s.s.)	(g/kg s.s.)		(%)	%	%
Kontrolna halda	0. dan	20,22	86,62	84,87	41,32	22,35		0,23	2,95	1,30
	90. dan	22,35	88,48	85,22	37,15	19,21	14,05	0,27	2,84	1,25
Inokulisana halda	0. dan	21,32	86,68	84,93	43,42	22,35		0,23	3,55	1,56
	90. dan	23,01	88,69	85,62	14,28	7,12	68,14	0,70	3,01	1,32

**Tabela 4.9.** Mikrobiološki pokazatelji

Broj halde	Dan eksperimenta	MIKROBIOLOGIJA			
		UBA	ANA	KIP	RUV
Kontrolna halda	0. dan	1 x10 <sup>3</sup>	4 x10 <sup>3</sup>	3 x10 <sup>3</sup>	3 x10 <sup>3</sup>
	90. dan	1 x10 <sup>4</sup>	7 x10 <sup>3</sup>	1,5 x10 <sup>3</sup>	8 x10 <sup>4</sup>
Inokulisana halda	0. dan	7 x10 <sup>6</sup>	1 x10 <sup>3</sup>	1 x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>6</sup>
	90. dan	5x10 <sup>8</sup>	3 x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>6</sup>	3 x10 <sup>8</sup>

Promene u sadržaju TPH kao i u sadržaju huminskih kiselina u kontrolnoj haldi tokom procesa bioremedijacije su posledica prisustva malog broja mikroorganizama u samoj zagađujućoj supstanci. S obzirom da su navedene izmene minorne, dalje analize su rađene samo na huminskim kiselinama izolovanim na početku i na kraju bioremedijacionog procesa u inokulisanoj haldi.

### 4.1.2.3. Karakterizacija huminskih kiselina

#### 4.1.2.3.1. Elementarna organska mikroanaliza i parameter E4/E6

Ispitivani parametri huminskih kiselina na početku i na kraju bioremedijacionog procesa su prikazani u Tabeli 4.10.

**Tabela 4.10.** Elementarna analiza i H/C, O/C i E4/E6 huminskih kiselina ekstrahovanih na početku i na kraju bioremedijacionog procesa u inokulisanjoj haldi

Dan	%C	%H	%N	%S	%O*	H/C atomski odnos	O/C atomski odnos	E4/E6
0	60,27	8,51	3,35	1,62	26,25	1,69	0,33	1,97
90	58,52	7,64	3,49	1,42	28,93	1,56	0,37	2,30

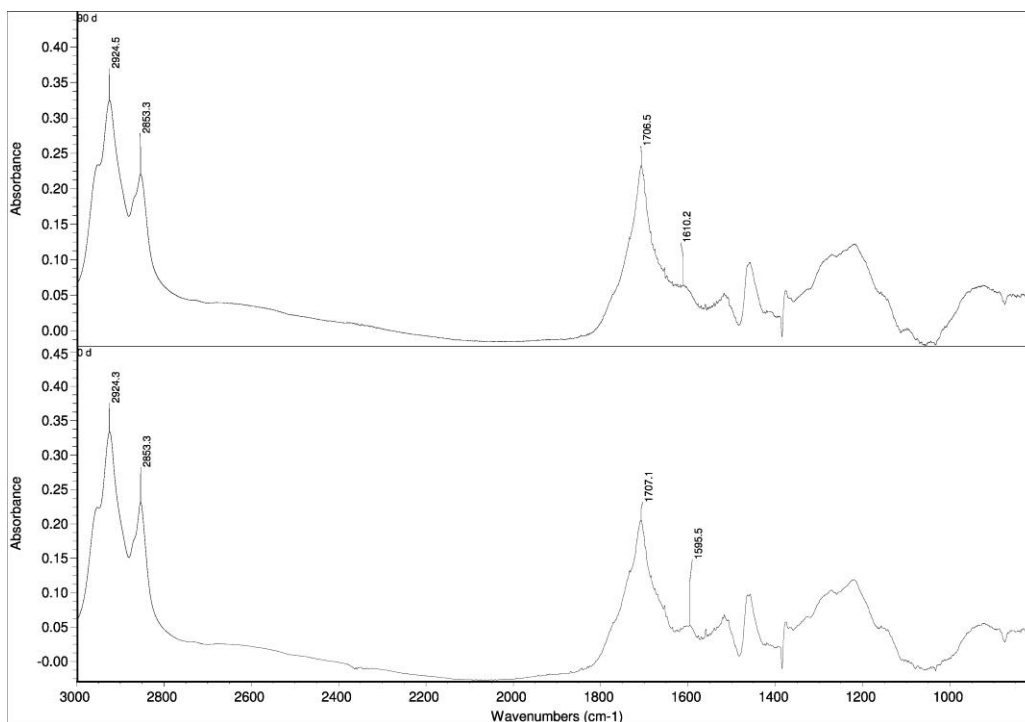
\*O%=100-(C+H+N+S)%

Rezultati pokazuju da je u huminskim kiselinama izolovanim na kraju procesa sadržaj ugljenika kao i izračunata H/C vrednost bila manja nego u huminskim kiselinama izolovanim na početku procesa. Ovo ukazuje da dolazi do porasta aromatičnosti tokom procesa bioremedijacije (Pajczkowska i dr. 2003). Parametar E4/E6, procenat kiseonika i O/C atomski odnos se povećavaju tokom procesa bioremedijacije, što ukazuje na povećanje broja kiseonikovih funkcionalnih grupa (Campitelli i Ceppi, 2008; Chen i dr. 1977; Jerzykiewicz i dr., 1999; Polak i dr. 2009; Pajczkowska i dr. 2003; Xiaowei i dr. 2013).



#### 4.1.2.3.2. FT-IR analiza

FT-IR analiza huminskih kiselina na početku i na kraju bioremedijacionog procesa je prikazana na Slici 4.7.



**Slika 4.7.** FT-IR huminskih kiselina ekstrahovanih 0. i 90. dana bioremedijacionog procesa

**Tabla 4.11.** Odnos pikova

Talasna dužina [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Dan	
	0	90
1600/2924 (aromatični C/alifatični C)	0,084	0,158
1600/2850 (aromatični C/alifatični C)	0,126	0,254
1600/1707 (aromatični C/alifatični C)	0,114	0,179

Na osnovu intenziteta pikova u FT-IR spektru (Slika 4.7. ), može se uočiti da se tokom bioremedijacionog procesa dešava transformacija huminskih kiselina.

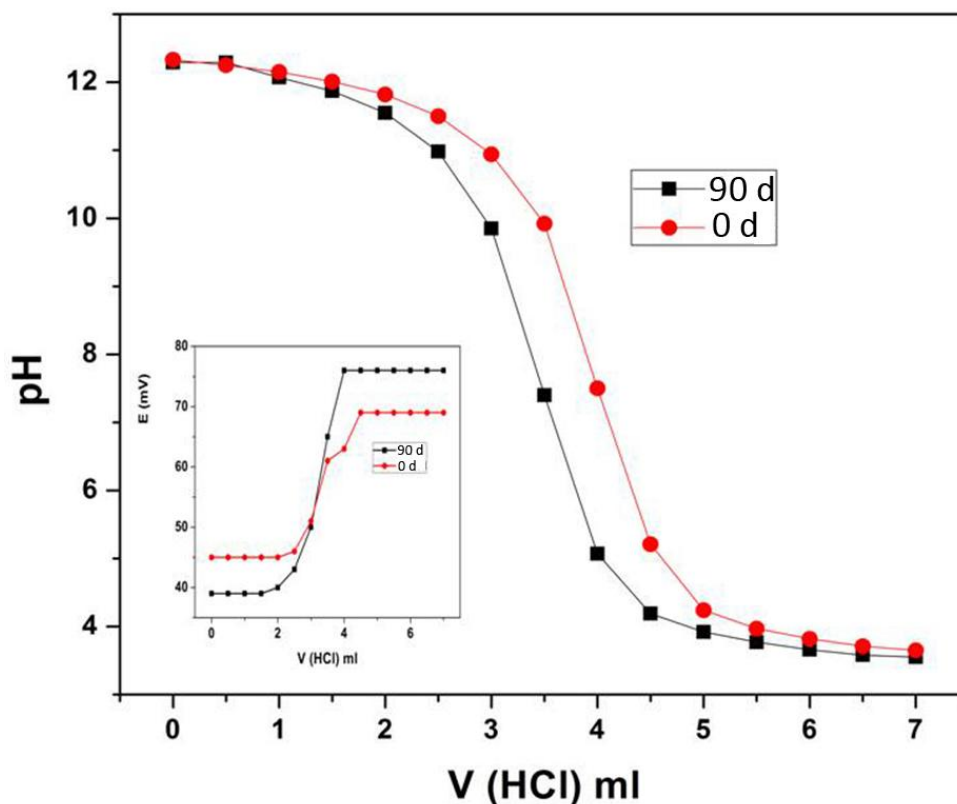
Izmene su praćene poređenjem intenziteta pikova i izračunavanjem odnosa pikova na 2924, 2850, 1707 i 1600  $\text{cm}^{-1}$  (Tabela 4.11.). Svi odnosi aromatičnog C

prema alifatičnom C su povećani na kraju procesa, što ukazuje da na kraju procesa bioremedijacije ima više aromatičnih struktura u molekulima huminskih kiselina, nego na početku. Ovo povećanje može biti prouzrokovano formiranjem huminskih polimera koje je posledica mikrobiološke aktivnosti (Castaldi i dr. 2005).

#### 4.1.2.3.3. Potencijometrijske titracije rastvora huminskih kiselina

Poznato je da huminske kiseline sadrže nekoliko različitih tipova funkcionalnih grupa. Iz merenja ukupne kiselosti (pH titracije) i merenja elektromotorne sile (EMS) tokom titracije sa standardnim rastvorom HCl, moguće je pratiti promene u sadržaju funkcionalnih grupa između huminskih kiselina iz različitih uzoraka ili tokom humifikacionih procesa (Klүpfel et al. 2014; Helburn i MacCarthy, 1994; Palladino i dr. 2007).

Na Slici 4.8. je prikazana titraciona kriva sa 0,1 M HCl, kao i merenje EMS u istim titracionim rastvorima.



**Slika 4.8.** Titraciona kriva sa 0,1 M HCl. Ubačeno: merenje EMS u istim titracionim rastvorima

Na Slici 4.8 se može uočiti da se tokom bioremedijacije povećava puferski kapacitet huminskih kiselina, što znači da je došlo do porasta u sadržaju funkcionalnih grupa koje su odgovorne za ukupnu kiselost, tj. hidroksilnih i karboksilnih grupa.

Iz rezultata merenja EMS (ubača slika u Sliku 4.8.), jasno je da se tokom procesa bioremedijacije redoks kapacitet huminskih kiselina povećava. EMS, nakon dodavanja iste količine titracionog agensa, postaje viša, što je u skladu sa povećanjem broja grupa odgovornih za redoks kapacitet huminskih kiselina. Ovo ukazuje da grupe odgovorne za ukupnu kiselost mogu biti i odgovorne za redoks kapacitet huminskih kiselina.

Dobijeni rezultati još jednom potvrđuju da se tokom bioremedijacionog procesa dešava transformacija huminskih kiselina.

#### **4.1.2.3.4. Humifikacioni parametri**

Humifikacija je praćena kvantifikacijom i monitoringom nastanka huminskih supstanci. Parametri koji mere razvoj huminskih supstanci su: stepen ekstrakcije ( $TE = C_{HS}/C$ ), odnos huminskih prema fulvo kiselinama ( $C_{HA}/C_{FA}$ ), indeks polimerizacije ( $IP = C_{FF}/C_{HS}$ ).  $C_{HA}$ ,  $C_{HS}$ ,  $C_{FF}$ ,  $C_{FA}$  i  $C$  predstavljaju rastvoreni organski ugljenik redom u huminskim kiselinama, u huminskim supstancama, u fulvo frakciji, u fulvo kiselinama i ukupni organski ugljenik u čvrstom uzorku.

U Tabeli 4.12. su prikazani parametri koji opisuju i kvantifikuju procese humifikacije, na početku eksperimenta i na kraju eksperimenta.

**Tabela 4.12.** Sadržaj ugljenika u čvrsoj frakciji, rastvorni ugljenik u huminskim frakcijama i parametri humifikacije

	<b>C</b>	<b>C<sub>HS</sub></b>	<b>C<sub>HA</sub></b>	<b>C<sub>FA</sub></b>	<b>C<sub>FF</sub></b>	<b>C<sub>HA</sub>/C<sub>FA</sub></b>	<b>IP</b>	<b>TE</b>
	<b>mg/g</b>	<b>mg/g</b>	<b>mg/g</b>	<b>mg/g</b>	<b>mg/g</b>			
Početni uzorak	49,5	6,05	3,40	2,04	3,2	1,67	0,52	0,12
Kontrolna halda (kraj eksperimenta)	48,8	6,28	3,61	1,91	3,1	1,89	0,49	0,13
Inokulisana halda (kraj eksperimenta)	42,2	7,91	4,82	1,16	2,5	4,15	0,31	0,19

IP:  $C_{FF}/C_{HS}$

TE:  $C_{HS}/C$

FF: fulvo frakcija (fulvo kiseline+nehuminske supstance)

Dobijeni rezultati pokazuju da je procenat huminskih kiselina tokom procesa bioremedijacije porastao više od tri puta, što je potvrđeno i povećanjem sadržaja C u huminskim kiselinama u odnosu na početni uzorak, dok je C koji pripada fulvo kiselinama opao za 44% . Navedeno smanjenje se može objasniti na sledeći način: (1) kao i sve organske supstance lako biodegradabilne, fulvo kiseline su meta mikroorganizama na početku, kasnije se njihova količina ustaljuje; (2) fulvo kiseline su prekursori huminskih kiselina (Fourti i dr. 2010).

### 4.1.3. Treći eksperiment

#### 4.1.3.1. Opis eksperimenta

Praćenje procesa bioremedijacije složenih kontaminanata (mešavina mazuta i katalizatora) iz naftne industrije izvedeno je takođe u sloju veštačkog zemljišnog supstrata, kao i drugi eksperiment, ali pri različitim uslovima, kako bi se utvrdilo koji od faktora najviše utiče na brzinu razgradnje i transformacije zagađivača. Eksperiment se sastojao iz pet haldi, pri čemu je masa svake halde iznosila oko 45 kg (pesak ~33,75 kg; piljevina ~3,75 kg; složeni kontaminant (katalizator+mazut) ~7,49 kg). Sve halde su sadržale navedene sastojke u istoj količini kao i slepa proba, samo su se razlikovale u uslovima pod kojima je izvedena biodegradacija. Eksperiment bioremedijacije je trajao 170 dana.

- Prva halda (I) se sastojala iz peska, piljevine i zagađivača, nazvana je sirova halda, i predstavlja slepu probu.
- Druga halda (II) je predstavlja aerisanu haldu, sastojala se iz istih komponenata kao i prva, i mešana je jednom mesečno, kako bi se postigao efekat aeracije.
- Treća halda (III) je biostimulisana halda, jer je pored peska, piljevine i zagađivača sadržala i izvore azota, fosfora i kalijuma (amonijum-nitrat, kalijum-difosfat i kalijum-hlorid). Količine azota, fosfora i kalijuma koje su dodata u skladu su sa odnosom  $C_{Org}:N_{Ukupni}:P_{Dostupni}:K_{Dostupni} = 100:10:1:0,1$ .
- Četvrta halda (IV) predstavlja je biostimulisanu i aerisanu haldu. Sastojala se iz peska, piljevine, zagađivača, amonijum-nitrata, kalijum-difosfata i kalijum-hlorida, i mešana je jednom mesečno.
- Peta halda (V) je predstavlja inokulisanu haldu, u kojoj je bilo sve zastupljeno kao i u četvrtoj haldi, uz dodatak umnoženog konzorcijuma mikroorganizama, izolovanog iz složenog kontaminanta. Reinokulacija je rađena svakih trideset dana.

### 4.1.3.2. Mikrobiološki i hemijski pokazatelji procesa bioremedijacije

Sadržaj osnovnih klasa mikroorganizma prisutnih u uzorcima tokom procesa bioremedijacije i to: ukupnih hemoorganoheterotrofnih mezofilnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija (HA), anaerobnih bakterija (HAG), kvasaca i plesni (SL), i mikroorganizama koji kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2 (UG), prikazan je u Tabeli 4.13.

**Tabela 4.13.** Osnovni mikrobiološki pokazatelji procesa bioremedijacije

Broj halde	Dan eksperimenta	MIKROBIOLOGIJA			
		HA	HAG	SL	UG
<b>I</b>	0. dan	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
	60. dan	$1 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$7 \times 10^3$
	120. dan	$1,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$8,1 \times 10^3$
	170. dan	$9 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	$1 \times 10^4$
<b>II</b>	0. dan	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
	60. dan	$6 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$
	120. dan	$9 \times 10^5$	$4 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	$6 \times 10^5$
	170. dan	$9 \times 10^4$	$3 \times 10^3$	$6 \times 10^3$	$8 \times 10^5$
<b>III</b>	0. dan	$1 \times 10^4$	$9 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^3$
	60. dan	$9 \times 10^5$	$4 \times 10^4$	$7,4 \times 10^4$	$9 \times 10^4$
	120. dan	$4,9 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$
	170. dan	$8 \times 10^6$	$4 \times 10^4$	$8 \times 10^4$	$9 \times 10^5$
<b>IV</b>	0. dan	$1 \times 10^4$	$8,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$1 \times 10^3$
	60. dan	$4 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$
	120. dan	$2,4 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$
	170. dan	$4 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$
<b>V</b>	0. dan	$3 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$
	60. dan	$5,8 \times 10^6$	$3 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^7$
	120. dan	$9,5 \times 10^7$	$3,5 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$8,4 \times 10^7$
	170. dan	$8,1 \times 10^9$	$2,3 \times 10^5$	$7,6 \times 10^6$	$7 \times 10^8$

U haldi I, koji predstavlja slepu probu (halda koja nije aerisana, biostimulisana i bioaugmentovana), uočavamo veoma mali porast broja svih mikroba tokom perioda od 170 dana.

U haldi II, koji predstavlja aerisanu haldu uočavamo porast broja mikroorganizama koji kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2, što je verovatno posledica toga što se degradacija ugljovodonika nafte najefikasnije obavlja pod aerobnim uslovima, pa sama aeracija omogućava porast broja mikroba koji kao izvor ugljenika koriste dizel D2.

U haldi III, koji predstavlja biostimulisanu haldu, uočavamo porast broja ukupnih hemoorganoheterotrofnih mezofilnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija i mikroorganizama koji kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2.

U haldi IV, koji predstavlja aerisanu i biostimulisanu haldu, uočavamo porast svih mikroorganizama. Može se zaključiti da je kombinovanje aeracije i biostimulacije povoljno uticalo na rast svih mikroorganizama.

U haldi V, koji predstavlja aerisanu, biostimulisanu i bioaugmentovanu haldu dolazi do značajnog porasta broja svih mikroba.

U Tabeli 4.14. prikazane su vrednosti hemijskih pokazatelja bioremedijacije iz svih uzoraka 0., 60., 120. i 170. dana bioremedijacije.

**Tabela 4.14.** Hemijski pokazatelji procesa bioremedijacije

Halda	Dan eksperimenta	Vlaga %	Pepeo %		HES (g/kg s.s.)	TPH (g/kg s.s.)	% razlaganja TPH	Huminske kiseline (g/kg s.s.)	CaCO <sub>3</sub> %	CO <sub>2</sub> %
			550 °C	800 °C						
I	0. dan	9,80	87,64	84,99	48,42	21,72		<b>3,23</b>	4,12	1,81
	60. dan	8,37	88,45	85,85	48,10	21,05	<b>3,08</b>	<b>3,12</b>	2,84	1,25
	120. dan	12,67	88,40	85,76	47,86	20,39	<b>6,12</b>	<b>2,97</b>	2,90	1,28
	170. dan	14,51	88,92	85,85	47,15	19,88	<b>8,53</b>	<b>3,20</b>	3,10	1,36
II	0. dan	9,80	87,64	84,99	48,42	21,72		<b>3,23</b>	4,12	1,81
	60. dan	22,01	86,69	83,73	46,78	20,32	<b>6,45</b>	<b>3,14</b>	3,01	1,32
	120. dan	21,34	87,85	84,21	44,23	17,87	<b>17,73</b>	<b>2,78</b>	3,53	1,55
	170. dan	22,13	88,12	85,31	42,55	16,98	<b>21,82</b>	<b>3,05</b>	2,95	1,30
III	0. dan	14,03	86,69	83,95	49,87	20,71		<b>3,30</b>	2,75	1,21
	60. dan	9,70	86,40	83,87	47,76	19,18	<b>7,39</b>	<b>2,88</b>	2,48	1,09
	120. dan	12,56	87,21	83,92	45,24	17,95	<b>13,33</b>	<b>2,86</b>	3,32	1,46
	170. dan	12,78	87,54	84,05	43,87	16,80	<b>18,88</b>	<b>2,98</b>	3,55	1,56
IV	0. dan	14,03	86,69	83,95	49,87	20,71		<b>3,30</b>	2,75	1,21
	60. dan	20,25	90,56	88,44	46,13	17,64	<b>14,82</b>	<b>2,74</b>	2,30	1,01
	120. dan	22,74	87,46	85,28	43,50	15,27	<b>27,57</b>	<b>2,82</b>	2,30	1,01
	175. dan	23,10	88,18	85,75	38,82	13,74	<b>33,66</b>	<b>3,40</b>	2,25	0,99
V	0. dan	11,16	85,57	82,69	47,58	23,05		<b>3,22</b>	3,65	1,61
	60. dan	22,50	86,56	83,77	42,18	18,01	<b>21,87</b>	<b>2,75</b>	2,87	1,26
	120. dan	23,75	87,32	84,88	32,53	13,74	<b>40,39</b>	<b>3,35</b>	2,35	1,03
	170. dan	25,12	88,97	86,50	26,05	8,15	<b>64,64</b>	<b>3,90</b>	2,40	1,06

Dobijeni rezultati pokazuju da u svim eksperimentima dolazi do razgradnje ukupnih naftnih ugljovodonika, dok je najveći procenat razgradnje u haldi V, koja je bila aerisana, biostimulisana i inokulisana. Kada se uporedi broj mikroorganizama u svim haldama, primećuje se da peta halda odstupa od ostale četiri zbog značajno većeg broja mikroorganizama, što objašnjava drastičan pad vrednosti TPH.

Veoma je interesantan, kako porast broja mikroorganizama, tako i pad TPH u haldi IV. Ovo nas navodi na zaključak da biostimulacija i aeracija podstiču umnožavanje i potentnost mikroorganizama prisutnih u samom zagađenju.

Što se tiče huminskih kiselina, vrednosti variraju u uzorcima, verovatno kao posledica prirodne ravnoteže između njihove sinteze i degradacije. Treba napomenuti da je uočen značajan porast količine huminskih kiselina u haldi V nakon 170 dana.



Pošto je paralelno sa porastom količine huminskih kiselina u haldi V nakon 170 dana uočen i najznačajniji pad TPH, pristupili smo karakterizaciji uzoraka huminskih kiselina iz halde V, 0., 60., 120. i 170. dana, kako bismo utvrdili da li su procesi biodegradacije i humifikacije međusobno povezani.

### **4.1.3.3. Karakterizacija huminskih kiselina**

#### **4.1.3.3.1. Gel hromatografija uzoraka huminskih kiselina**

Nakon gel hromatografije uzoraka izolovanih huminskih kiselina iz halde V, i to 0. dana (uzorak I), 60. dana (uzorak II), 120. dana (uzorak III) i 170. dana (uzorak IV), konstruisani su hromatogrami i određena je približna molekulska masa frakcija. Molekulska masa je određena korišćenjem particione konstante ( $K_{av}$ ) frakcija preko jednačine:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_t}{V_t - V_o}$$

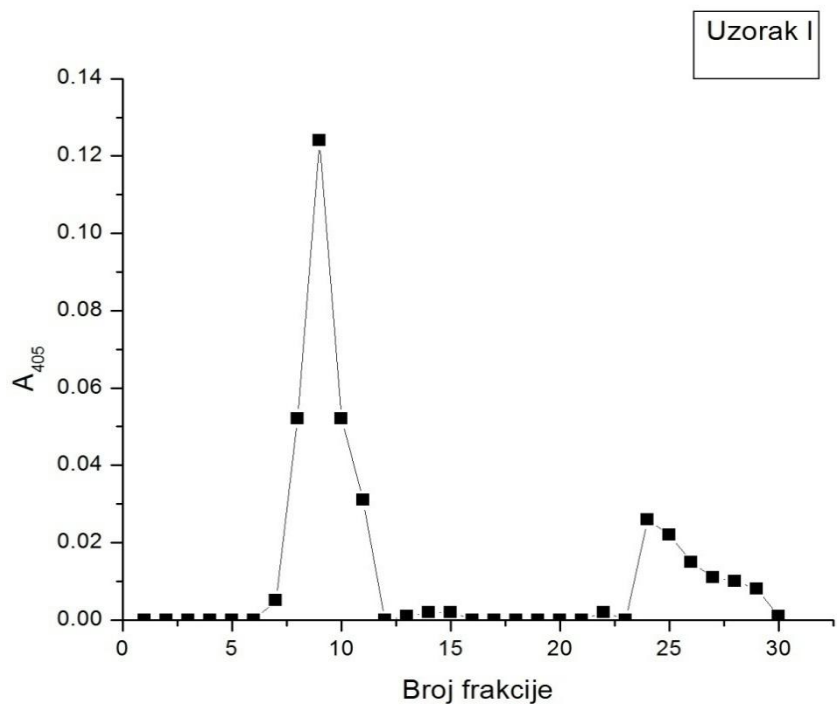
Gde je:

$V_t$  - fizička zapremina kolone

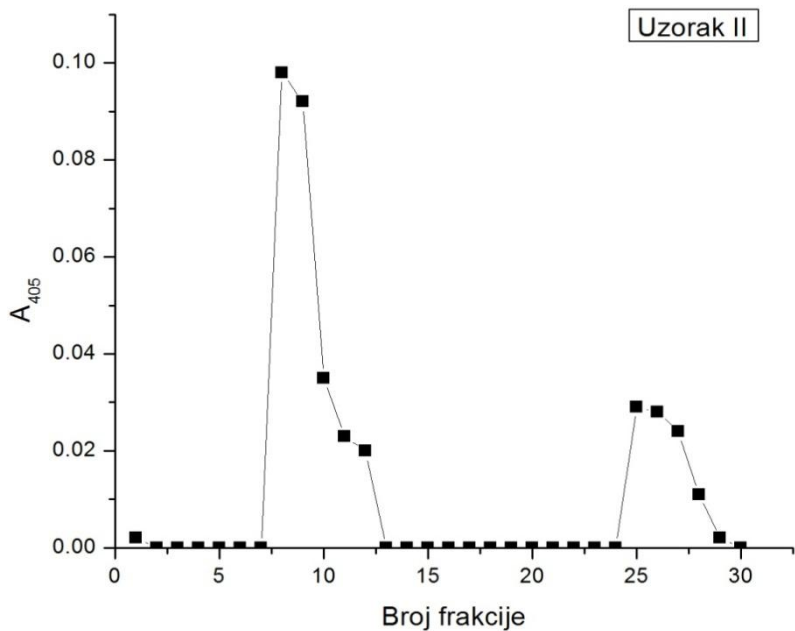
$V_o$  - ekskuziona zapremina maksimuma pika u kome silazi plavi dekstran

$V_e$  - maksimum pika frakcije uzorka

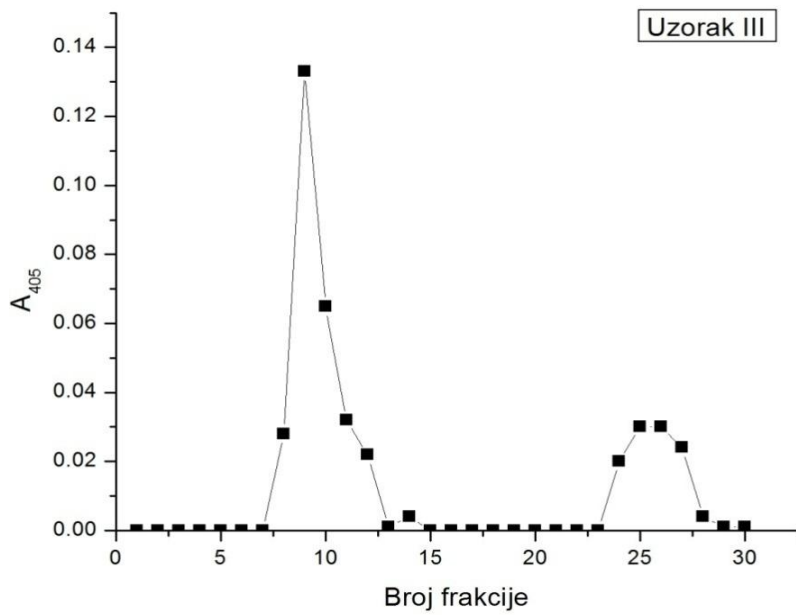
Hromatogrami ispitivanih uzoraka huminskih kiselina prikazani su na Slikama 4.9.-4.12.



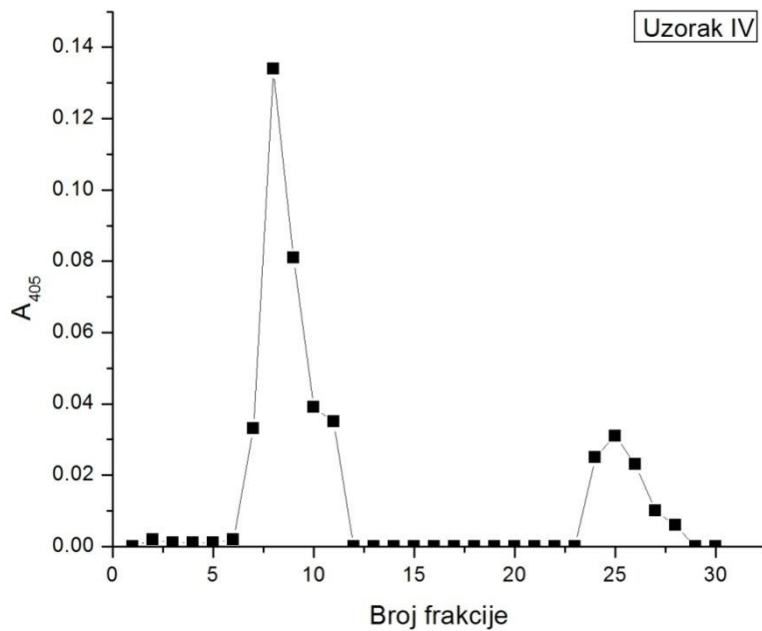
Slika 4.9. Hromatogram huminskih kiselina iz halde V, 0. dana.



Slika 4.10. Hromatogram huminskih kiselina iz halde V, 60. dana.



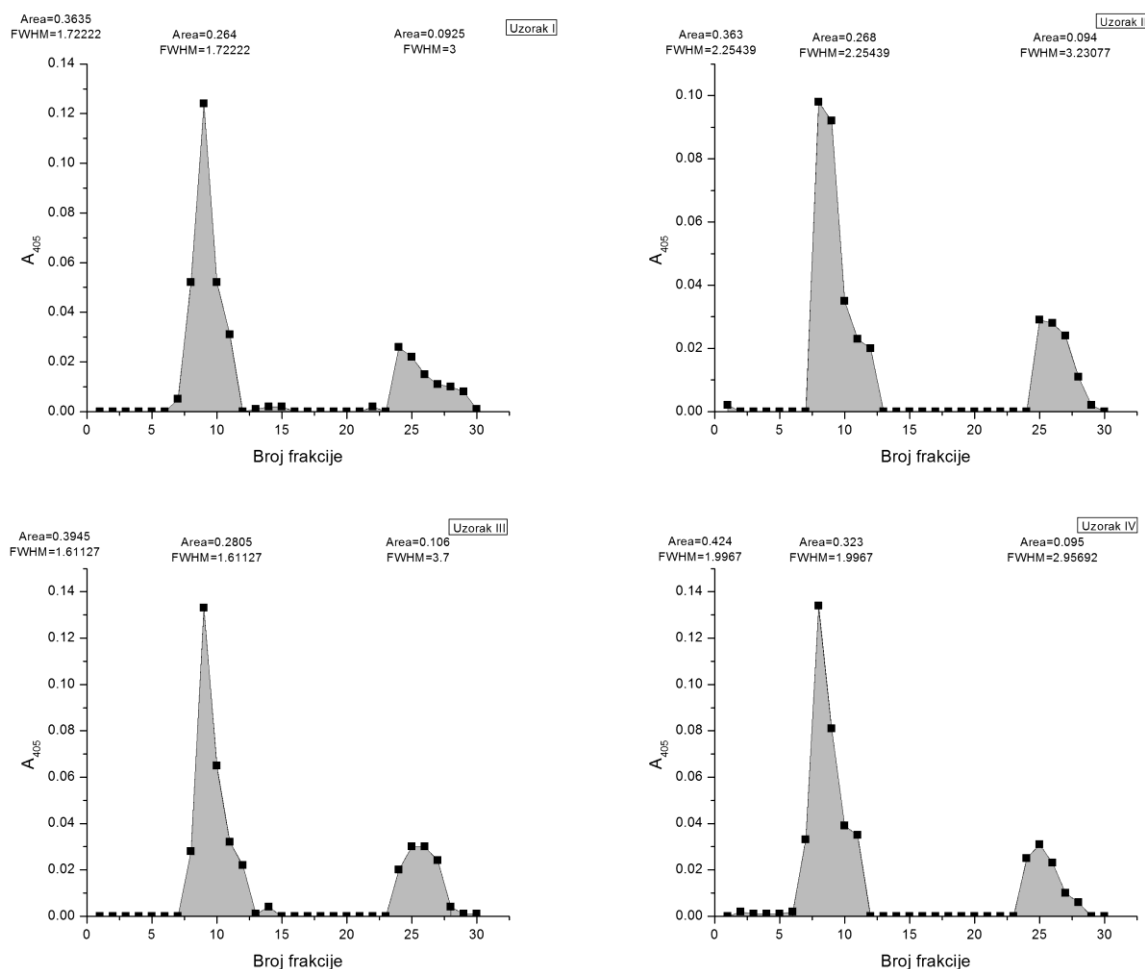
Slika 4.11. Hromatogram huminskih kiselina iz halde V, 120. dana.



Slika 4.12. Hromatogram uzorka huminskih kiselina iz halde V, 170 dana.

U svakom od hromatograma uočavaju se dve frakcije koje se razlikuju po molekularnoj masi. Prvi pik predstavlja frakciju veće molekulske mase, dok drugi pik odgovara frakciji manje molekulske mase. U svakom od uzoraka frakcija veće molekulske mase izlazi iz opsega razdvajanja matriksa Sephadex G-100, što implicira da ima molekularnu masu veću od 100.000 Da. Molekularna masa druge frakcije određena je iz kalibracione krive i ona iznosi u svakom uzorku približno 8000 Da.

Da bismo odredili udeo svake od frakcija u ukupnoj smeši huminskih kiselina određivali smo površine ispod svakog od pikova (Slika 4.13.).



**Slika 4.13.** Analiziranje udela površina ispod pikova.

Površine ispod pikova su direktni pokazatelj udela težih/lakših frakcija u ukupnom sastavu huminskih kiselina.

**Tabela 4.15.** Analiziranje udela površina ispod pikova

Broj uzorka (dani)	% frakcije mase >100 kDa	% frakcije mase ~ 8 kDa
Uzorak I ( 0 )	72,63	26,18
Uzorak II (60)	72,83	26,89
Uzorak III (120)	71,02	26,86
Uzorak IV (170)	76,17	22,40

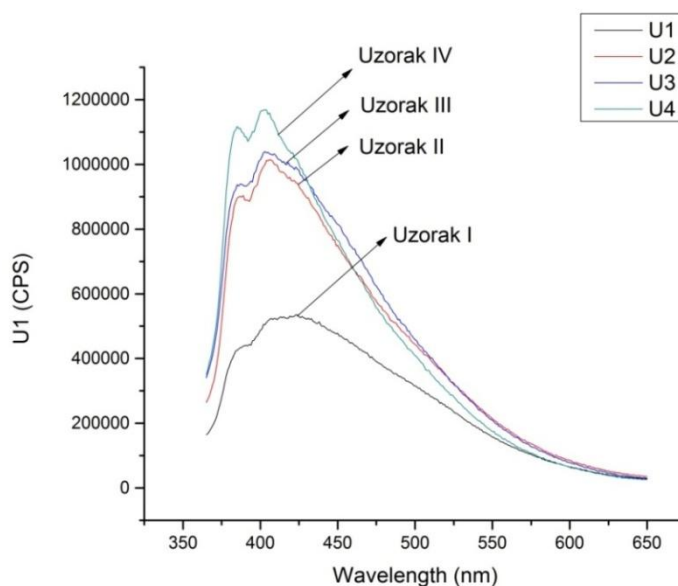
Dok je u prva tri uzorka prisutan sličan procenat frakcije veće molekulske mase, u četvrtom uzorku dolazi do značajnog porasta udela ove frakcije kao i do smanjenja udela frakcije manje molekulske mase. Pretostavka je da dolazi do polimerizacije huminskih kiselina, a samim tim i porasta frakcije veće molekulske mase uz istovremeni porast aromatičnosti.

Da bismo proverili postavljenu hipotezu, pristupili smo spektrofluorimetrijskoj analizi uzoraka huminskih kiselina.

#### 4.1.3.3.2. Spektrofluorimetrijska analiza

Snimani su uzorci huminskih kiselina izolovani iz halde V i to 0., 60., 120. i 170. dana procesa bioremedijacije. Uzorci su ekscitovani na 350nm, a praćen je emisijski spektar u opsegu 365-650nm.

Spektri uzoraka su prikazani na Slici 4.14.



**Slika 4.14.** Fluorescentni spektri uzorka huminskih kiselina iz halde V

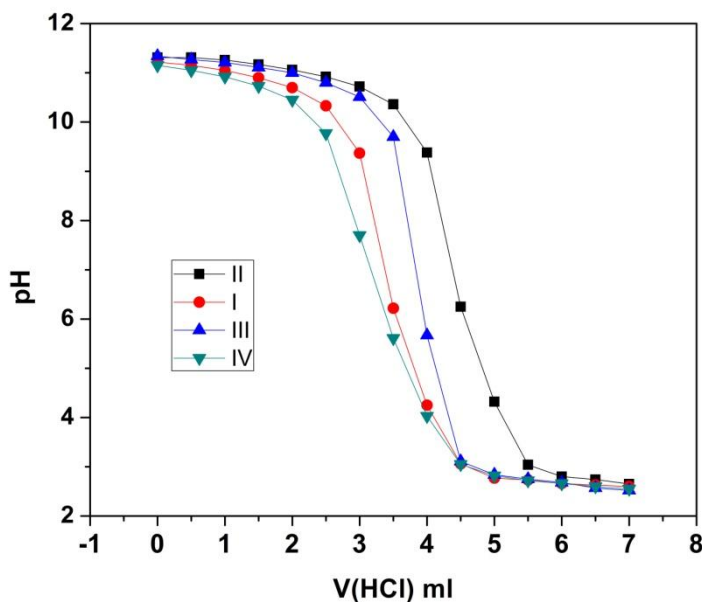
Spektri uzoraka humniskih kiselina pokazuju dve bitne razlike:

1. Porast intenziteta fluorescencije krećući se od početnog ka krajnjem uzorku.
2. Pomeranje maksimuma emisije sa 420nm na 410nm u četvrtom uzorku u odnosu na prethodna tri.

Prorast intenziteta fluorescencije može biti objašnjen porastom broja fluorofora u uzorku IV, dok pomeranje maksimuma emisije može biti dovedeno u vezu sa modifikacijom samih fluorofora u uzorku. Porast broja fluorofora ukazuje na porast broja aromatičnih struktura u uzorcima humniskih kiselina (Klavins i Ansone, 2010). Kada uporedimo rezultate gel hromatografije i spektrofluorimetrijske analize uzoraka humniskih kiselina, možemo zaključiti da je porast frakcije veće molekule mase u uzorku uzetom nakon 170 dana od početka procesa bioremedijacije, verovatno u korelaciji sa porastom broja fluorofora u tom uzorku.

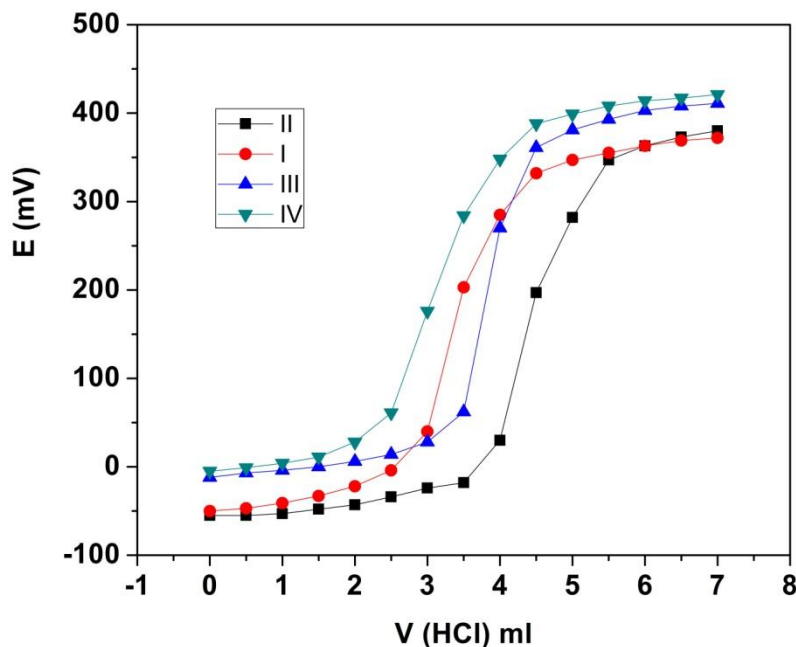
#### 4.1.3.3.3. Potencimetrijske titracije rastvora humniskih kiselina

Na Slici 4.15. je prikazana titraciona kriva sa 0,1 M HCl u rastvoru humniskih kiselina.



**Slika 4.15.** Titraciona kriva sa 0,1 M HCl u rastvoru humniskih kiselina.

Na Slici 4.16. su prikazani rezultati merenje EMS u titracionim rastvorima huminskih kiselina.



**Slika 4.16.** EMS u titracionim rastvorima huminskih kiselina.

Sa Slika 4.15. i 4.16. se može uočiti da se tokom bioremedijacije kao i u prethodnom eksperimentu povećavaju i puferski i redoks kapaciteti huminskih kiselina. Povećanje puferskog i redoks kapaciteta, sugerise da huminske kiseline iz procesa bioremedijacije mogu delovati kao terminalni akceptori elektrona u anaerobnim mikrobiološkim respiracijama, u privremeno bezkiseoničnim sistemima.

Rezultati ispitivanja pokazuju da se pored biodegradacije naftnog zagađenja dešava i transformacije najrezistentnijih komponenti u kompleksne polimerne strukture analogne huminskim supstancama. Rezidualni materijal nakon degradacije nafte i njenih proizvoda ne predstavlja opasnost po životnu sredinu, već naprotiv doprinosi poboljšanju životne sredine.

## 4.2. Mikrobiološka mobilizacija fosfora iz fosfatne rude

Fosfor je jedan od esencijalnih hranljivih sastojaka koji ima značajne uloge u metabolizmu, rastu i razvoju biljaka. Fosfor ima gradivnu ulogu u makromolekulima kao što su nukleinske kiseline. Takođe učestvuje i u transferu energije u metaboličkim putevima biosinteze i biodegradacije (Corbridge, 2013). Proučavanje rastvaranja fosfata iz matične rude pomoću acidofilnih i acidogenih autotrofnih i heterotrofnih mikroorganizama ima veliki značaj u oblasti poljoprivrede usled potencijalne primene ovako dobijenog fosfata kao biođubriva (Bhatti i Yawar, 2010). Veliki broj acidofilnih i acidogenih autotrofnih i heterotrofnih mikroorganizama je sposoban da u laboratorijskim uslovima rastvori nerastvorne fosfate svojim metabolitima - organskim i neorganskim kiselinama (Alam i dr., 2002; Bojinova i dr., 2008; Delvasto i dr., 2008). Mikroorganizmi koji mogu imati ovakvu primenu su bakterije, kvasci i gljive (Antoun i Babana, 2006; Hamdali i dr., 2008; Xiao i dr., 2009, Rodriguez i Fraga, 2009).

Hemolitaototrofne gvožđe i sumpor oksidujuće acidofilne bakterije se uobičajeno upotrebljavaju u procesima bakterijskog luženja i imaju značajnu ulogu u biohidrometalurgiji i dobijanju metala mikrobiološkim putem. Najznačajnije vrste su *Acidithiobacillus ferrooxidans* i *Acidithiobacillus thiooxidans*. Ove bakterijske vrste oksiduju elementarni sumpor, redukovana sumporna jedinjenja i sulfidne minerale i pri čemu nastaju sumporna kiselina i sulfati metala a *Acidithiobacillus ferrooxidans* oksiduje gvožđa(II)-jon do gvožđa(III)-jona koji je snažan oksidans u kiseloj sredini. Tokom uobičajenog procesa bakterijske oksidacije pirita nastala sumporna kiselina se tako može upotrebiti za rastvaranje fosfata iz fosfatne stene. Niska cena upotrebe ovih mikroorganizama, lakoća rada sa njima kao i kontrole njihovog uticaja na životnu sredinu otvara mogućnost i povećava interesovanje za njihovu primenu u procesima rastvaranja fosfata (Ehrlich, 2001). Nekoliko studija je realizovano uz upotrebu *Acidithiobacillus ferrooxidans* i *Acidithiobacillus thiooxidans* za rastvaranje fosfata (Chi i dr., 2006; Stamford i dr., 2007; Bhatti i Yawar, 2010; Xiao i dr., 2013). Eksperimenti su realizovani na laboratorijskom nivou i iako je rastvaranje fosfatne stene



bilo moguće pomoću ovih mikroorganizama, niska koncentracija rastvornog fosfata je bila najveći izazov.

### **4.2.1. Opis eksperimenta**

U cilju rada sa autohtonim mikroorganizmom koji je prirodno optimizovan na klimatske uslove i rast na piritu, izolovan je i okarakterisan hemolitoautotrofni mikroorganizam *Acidithiobacillus sp. B2* iz jezera Robule (Bor, Srbija). U testovima je upotrebljen koncentrat pirita sa lokacije Bor. Upotrebljena fosfatna ruda je sa ležišta Lisina, Bosilegrad, Srbija. Deo ležišta ispunjava potrebne zahteve za primenu kao prirodnog mineralnog đubriva, pre svega zbog visokog sadržaja  $P_2O_5$ , zatim zbog prisustva hranljivih mikroelemenata (Zn, Co, Cu, Se, Mn), i što je veoma značajno zbog niskog sadržaja toksičnih elemenata (Pb, Cd, Cr, Ni, U).

Praćenje postupka rastvaranja fosfata iz fosfatne rude dejstvom *Acidithiobacillus sp. B2* u prisustvu pirita trajalo je 28 dana. Svakih sedam dana je analiziran pH, stepen oksidacije pirita, broj mikroorganizama i koncentracija  $P_2O_5$ . Mešavina rude sa kojom je izveden eksperiment sastojala se iz 70% fosfatne rude i 30% koncentrata pirita. Mešavina rude je suspendovana u tečnoj mineralnoj podlozi sastava: 3,0 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,5 g/L  $K_2HPO_4$ , 0,5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 g/L KCl, 0,01 g/L  $Ca(NO_3) \cdot 4H_2O$ , 0,5 g/L  $H_2SO_4$ . Gustina pulpe je iznosila 10%, a početni broj kulture *Acidithiobacillus sp. B2*  $1,7 \times 10^6$  CFU/mL). Broj mikroorganizama je određen metodom najverovatnijeg broja (Collins, 2004). Kao kontrola upotrebljena je suspenzija istovetnog sastava u kojoj su mikroorganizmi inaktivirani sterilizacijom.

### **4.2.2. Izolovanje i karakterizacija mikroorganizma**

#### ***Acidithiobacillus sp. B2***

#### **4.2.2.1. Izolovanje mikroorganizma**

Hemolitoautotrofna gvoždje i sumpor oksidujuća acidofilna bakterija roda *Acidithiobacillus* je izolovana iz tečnog uzorka uzorkovanog iz jezera Robule (Bor,

Srbija) (44° 3.858' N; 22° 8.221'E). Tečni uzorci sakupljeni u sterilnim staklenim teglama su transportovani do laboratorije na 4°C. *Acidithiobacillus sp.* B2 je izolovan iz tečnog uzorka metodom serijskog razblaženja na tečnoj podlozi 9K (Silverman i Lundgren 1959).

#### **4.2.2.2. Analiza 16S rRNA genske sekvence**

Genomska DNA *Acidithiobacillus sp.* B2 je ekstrahovana upotrebom komercijalnog kita DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA). Gen 16S rRNA je amplifikovan PCR upotrebom prajmera 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; (Lane, 1991) i 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'; [Liu i dr., 2007]). Amplifikovani fragmenti su prečišćeni komercijalnim kitom QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) i sekvencirani u servisu MACROGEN (Holandija). Izolovana vrsta je identifikovana sekvencionom analizom na osnovu sekvence 16S rRNA gena upotrebom server EzTaxon-e [<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim et al., 2012). Molekulska karakterizacija ukazuje da izolovana vrsta pripada rodu *Acidithiobacillus* sa 99,28% sličnosti sa *Acidithiobacillus ferrivorans* NO-37(T) (AF376020, (Hallberg i dr., 2010), 98,54% with *Acidithiobacillus ferridurans* ATCC 33020(T) (AJ278719, (Hedrich i Johnson 2013) i 98,21% sličnosti sa *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270(T) (CP001219). *Acidithiobacillus ferrivorans* i *Acidithiobacillus ferridurans* su skoro okarakterisane kao nove vrste roda *Acidithiobacillus* (Hallberg i dr., 2010; Liljeqvist i dr., 2011; Hedrich i Johnson 2013). Sekvenca gena 16S rRNK uzorka *Acidithiobacillus sp.* B2 je deponovana u genskoj banci NCBI, GenBank, Holandija (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pod brojem KC691309.

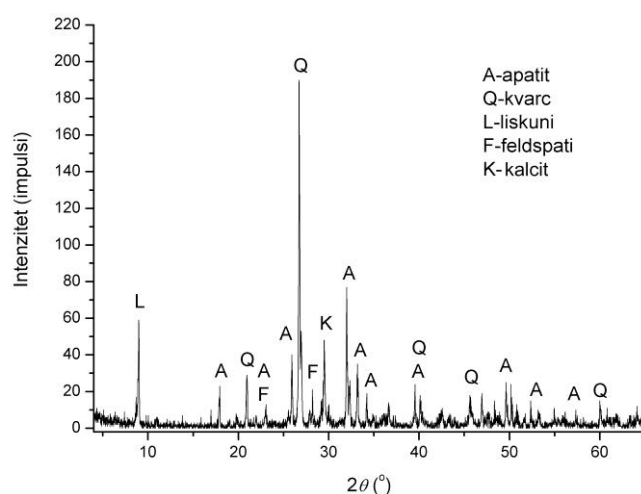
#### **4.2.2.3. Osnovne karakteristike izolovanog *Acidithiobacillus sp.* B2**

Hemolitaotrofna gvožđe i sumpor oksidujuća acidofilna bakterije *Acidithiobacillus sp.* B2 pokazuje sledeće karakteristike: pokretljivost, veličina ćelije 1,5 x 0,5µm, rast na elementarnom sumporu, tiosulfatu, gvožđe(II)-jonu i piritu kao izvoru elektrona.

### 4.2.3. Karakteristike fosfatne rude i pirita

#### 4.2.3.1. Fosfatna ruda

Na osnovu ispitivanja iz 2008. godine, procenjeno je da se na lokaciji Lisina (ležište Lisina, Bosilegrad) nalazi oko 95 miliona tona fosfatnih mineralnih ruda (Torbica i Lapčević 2012). Rendgensko-difrakciona analiza je pokazala da se ruda sastoji od apatita (A), kvarca (Q), liskuna (L), feldspata (F), i kalcita (K). Difraktogram praha uzorka rude je prikazan na Slici 4.17.



Slika 4.17. Rendgensko-difrakciona analiza fosfatne rude ležišta Lisina

Rezultati silikatne analize fosfatne rude sa ležišta Lisina dati su u Tabeli 4.16.

Tabela 4.16. Silikatna analiza fosfatne rude sa ležišta Lisina

Element ili jedinjenje	Sadržaj [%]
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	14,4
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4,0
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8,5
CaO	21,5
MgO	1,0
SiO <sub>2</sub>	44,9
K <sub>2</sub> O	2,9
Na <sub>2</sub> O	0,2
gubitak žarenja	2,6

Rezultati silikatne analize pokazuju da se ruda može koristiti kao prirodno fosfatno đubriva zbog visokog sadržaj  $P_2O_5$  (14,4%).

Dodatne hemijske analize fosfatne rude su potvrdile nizak sadržaj štetnih elemenata, što je pozitivno sa gledišta potencijalne upotrebe kao prirodnog đubriva Fosfatna ruda sadrži i hranljive elemente što joj dodatno daje na kvalitetu. Sadržaj toksičnih i hranljivih mikroelemenata je prikazan u Tabeli 4.17.

**Tabela 4.17.** Sadržaj toksičnih i biogenih elemenata u fosfatnoj rudi

<b>Toksični elementi [ppm]</b>		<b>Hranljivi elementi [ppm]</b>	
F	0. 266 - 0.282	Mo	20
Pb	< 20	Co	20
Cd	< 20	Cu	17 – 28
Sn	< 20	Zn	87 – 91
Ni	26 – 35	Mn	465–476
As	10	Se	2 – 3

#### 4.2.3.2. Koncentrat pirita

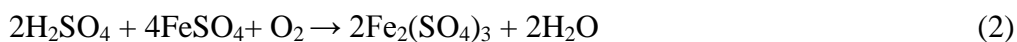
Pirit za eksperimente luženja pripreman je iz komercijalnog borskog koncentrata pirita, tretiranjem rastvorom sumporne kiseline (odnos čvrste i tečne faze 1:5 m/V), koncentracije 0,5 mol/L ( $pH \approx 0$ ), uz mešanje mehaničkom mešalicom na sobnoj temperaturi preko noći. Rastvor je zatim dekantovan, ispran demineralizovanom vodom i sušen na 80 °C, do konstantne mase. Obradeni koncentrat pirita je sadržao 41% gvožđa i 44,6% sulfidnog sumpora.

#### 4.2.4. Rezultati ispitivanja rastvaranja fosfora iz mešavine fosfatne rude i pirita pomoću bakterijske kulture

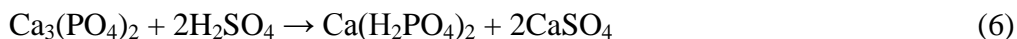
##### *Acidithiobacillus sp. B2*

Proces rastvaranja fosfora iz mešavine fosfatne rude i pirita dejstvom *Acidithiobacillus sp. B2* može se opisati na sledeći način. Bakterijska kultura *Acidithiobacillus sp. B2* u prisustvu vode i kiseonika oksiduje pirit, produkujući sumpornu kiselinu i gvožđe(II)-sulfat, koji se dalje mikrobiološki oksiduje do gvožđe(III)-sulfata (Rawlings, 2005). Gvožđe(III)-sulfat, izuzetno jak oksidans u kiseloj sredini, nastavlja oksidaciju pirita. Takođe, gvožđe(III)-joni mogu oksidovati pirit do sumpora, koji se dalje transformiše do sumporne kiseline, ključnog elementa u rastvaranju fosfata iz fosforne rude (Bhatti i Yawar, 2010; Xiao i dr., 2013).

Reakcije koje opisuju postupak rastvaranja fosfora su prikazane:



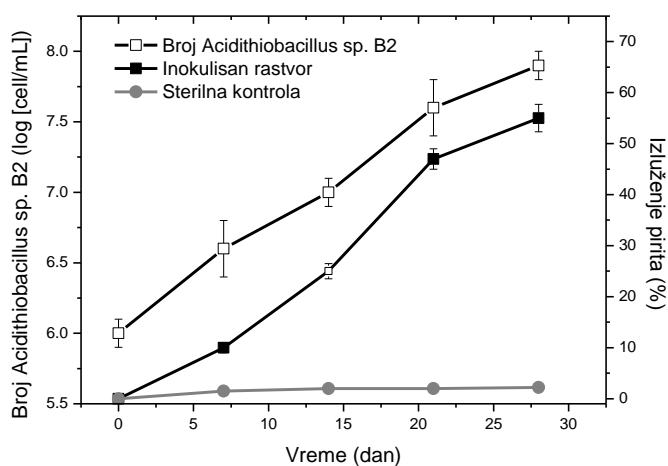
Rastvaranje fosfora u bakterijski generisanoj sumpornoj kiselinu je kompleksan ravnotežni proces koji se može prikazati sledećim jednačinama:



Kalcijum dihidrogen fosfat je najrastvorljiviji fosfat kalcijuma, tako da ima veoma bitnu ulogu u biodostupnosti fosfora za biljku. Međutim, generisanje fosforne kiseline je veoma važno za mobilizaciju drugih elemenata u zemljištu pre svega kalijuma, kao i za regulisanje pH vrednosti.

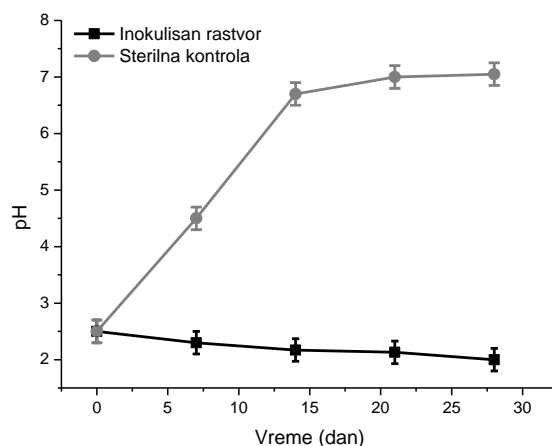
Tokom proces rastvaranja fosfora iz mešavine fosfatne rude i pirita dejstvom *Acidithiobacillus sp. B2* sa vremenom se broj mikroorganizama povećavao sa početnih  $1,7 \times 10^6$  CFU/mL tako da je sedmog dana iznosio  $4 \times 10^6$  CFU/mL, četrnaestog  $1 \times 10^7$  CFU/mL, dvadesetprvog  $4 \times 10^7$  CFU/mL, a dvadesetosmog  $1 \times 10^8$  CFU/mL, što potvrđuje na to da je ispitivana mešavina ruda pogodan supstrat za rast mikroorganizama.

Procenat luženja pirita, promena pH vrednosti i izluženja  $P_2O_5$  u suspenziji sa kulturom tionskih bakterija kao i u kontrolnoj suspenziji, određivana su na početku, nakon 7, 14, 21 i 28 dana eksperimenta. Svi testovi su rađeni u tri nezavisna ponavljanja. Dobijene vrednosti su prikazane na Slikama 4.18.- 4.20.



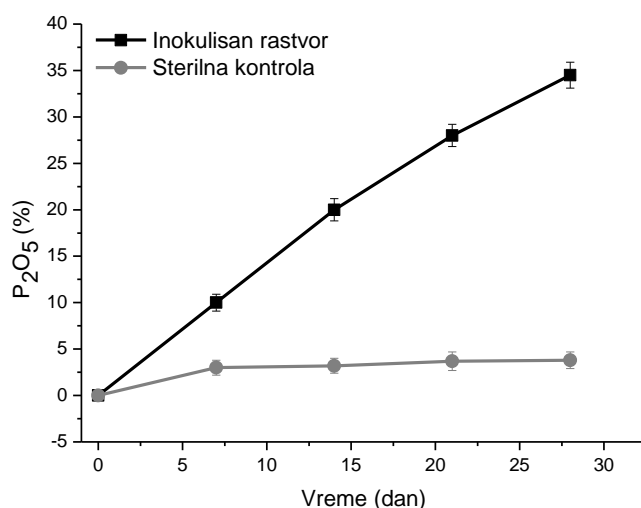
**Slika 4.18.** Broj *Acidithiobacillus sp. B2* i procenat izluženog pirita (sračunato na osnovu količine sulfidnog sumpora) u funkciji vremena

Tokom ispitivanja procesa, sadržaj sulfidnog sumpora u suspenziji sa gvožđe oksidujućim *Acidithiobacillus sp. B2* je smanjen sa 13,4% na 6,0%, dok je u kontrolnoj suspenziji sadržaj sulfidnog sumpora smanjen sa 13,4% na 13,1%. Nakon 28 dana, ukupno razlaganje pirita u testiranoj suspenziji sa *Acidithiobacillus sp. B2* je bilo u opsegu od 52,3-57,7% (Slika 4.18.).



**Slika 4.19.** Promena pH uzorka sa mikroorganizmima i kontrolnog uzorka tokom ispitivanog perioda

Usled generisanja sumporne kiseline pH vrednost inokulisanе suspenzije se smanjuje. Početna pH vrednost je opala sa pH 2,5 na pH 2 tokom perioda ispitivanja (28 dana). Abiotička oksidacija piritа je zanemarljiva u poređenju sa *Acidithiobacillus sp.* B2-inokulisanim sistemom, a kako ne dolazi do generisanja sumporne kiseline, primećen je porast pH vrednosti u kontrolnoj suspenziji (Slika 4.19.).



**Slika 4.20.** Procenat izluženja P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> tokom ispitivanog perioda

Ispitivanja pokazuju da je rastvaranje fosfora povezano sa smanjenjem pH vrednosti, tj. povećanjem koncentracije bakterijski generisane sumporne kiseline i gvožđe-(III)sulfat, što je posledica mikrobiološke oksidacije pirita u reakcionoj suspenziji. Dobijeni rezultati pokazuju da je u suspenziji sa gvožđe-oksidujućim *Acidithiobacillus* sp. B2 rastvoreno 34,5% neorganskog P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, dok je za isto vreme u kontrolnoj suspenziji procenat rastvaranja P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bio 3,8% (Slika 4.20.). Procenat izluženja P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> koji se može pripisati dejstvu *Acidithiobacillus* sp. B2 (tj. efektivno izluženje) se dobija oduzimanjem procenta izluženja P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> iz kontrolne suspenzije od procenta izluženja P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> iz inokulisane suspenzije i iznosi 30,7%. Dobijeni rezultati su uporedivi rezultatima dobijenim u prethodnim istraživanjima (Bhatti i Yawar, 2010; Chi i dr., 2006; Xiao i dr., 2013).

U Tabeli 4.18. je prikazana brzina razlaganja pirita, kao i brzina rastvaranja P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> iz fosfatne rude tokom ispitivanja.

**Tabela 4.18.** Brzina razlaganja pirita, kao i brzina rastvaranja P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> iz fosfatne rude tokom prve, druge, treće i četvrte nedelje ispitivanja

Period ispitivanja [d]	Brzina razlaganja pirita [mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	Brzina rastvaranja P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> [mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]
0-7	163	101
7-14	277	141
14-21	421	108
21-28	149	92
0-28	252	111

Najintenzivnije rastvaranje fosfora je primećeno u drugoj i trećoj nedelji, kada se najintenzivnije dešavalo i razlaganje pirita.

Gvožđe-oksidujuća *Acidithiobacillus* sp. B2 bakterija može oksidovati jone gvožđa, ali i elementarni sumpor ili sulfide do sumporne kiseline, pri čemu se kreira kiselo okruženje koje pomaže rastvaranje fosfora iz nerastvornih fosfatnih ruda. Zaključak je da tionske bakterije u suspenziji sa piritom imaju značajnu ulogu u rastvaranju fosfora iz prirodne fosfatne rude.



## 5. ZAKLJUČCI

## **Prvi proces: Sinteza i transformacija huminskih supstanci tokom bioremedijacije naftnih zagađivača**

### **Prvi eksperiment**

- Bioremedijacijom je nivo ukupnih naftnih ugljovodonika (TPH) smanjen sa 30 g/kg suve supstance na 2 g/kg suve supstance, što ukazuje na smanjenje od 93%. Uspešnosti bioremedijacije je doprineo pravilan izbor mikroorganizama upotrebljenih za reinokulaciju halde.
- Udeo mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2 u ukupnom broju mikroorganizama na početku bioremedijacije je bio manji od 20% a na kraju procesa preko 80%, što takođe ukazuje na uspešnost bioremedijacije.
- Tokom procesa bioremedijacije dolazi do porasta huminskih kiselina za 47%, što je veoma značajno sa aspekta izlečenja zemljišta.
- Strukturna analiza huminskih kiselina iz ispitivanih uzoraka pokazuje porast stepena aromatičnosti tokom bioremedijacije što ukazuje na simultani proces bioremedijacije i humifikacije.

### **Drugi eksperiment**

- Bioremedijacijom je nivo ukupnih naftnih ugljovodonika smanjen sa 22,35 g/kg suve supstance na 7,12 g/kg suve supstance, što ukazuje na smanjenje od 68%. Uspešnosti bioremedijacije je doprineo pravilan izbor mikroorganizama upotrebljenih za reinokulaciju halde.
- Porast sadržaja huminskih kiselina od 0,23% do 0,70% je primećen tokom bioremedijacionog procesa. Analiza FT-IR spektara i atomskog odnosa C/H ekstrahovanih huminskih kiselina na početku i na kraju bioremedijacionog procesa, ukazuju na povećanje aromatičnih struktura u molekulima huminskih kiselina. Povećanje odnosa E4/E6 ukazuje na obogaćivanje huminskih kiselina kiseonikovim funkcionalnim grupama. Rezultati potenciometrijskih analiza pokazuju da huminske kiseline na kraju procesa bioremedijacije imaju veći puferski kapacitet nego huminske kiseline, na početku, što znači da je došlo do povećanja broja funkcionalnih grupa koje

su odgovorne za ukupnu kiselost, tj. hidroksilnih i karboksilnih grupa u molekulima huminskih kiselina. Rezultati merenja EMS u titracionim rastvorima huminskih kiselina ukazuju da se redoks kapacitet huminskih kiselina povećava tokom procesa bioremedijacije. Dakle, grupe odgovorne za ukupnu kiselost mogu biti i odgovorne za redoks kapacitet huminskih kiselina.

- Rezultati parametara humifikacije pokazuju povećanje sadržaja ugljenika u huminskim kiselinama na kraju procesa, dok je ugljenik sadržan u fulvo kiselinama redukovan za 44%. Ovo je verovatno posledica transformacije fulvo u huminske kiseline. Parametri, stepen ekstrakcije i indeks polimerizacije, pokazuju da se humifikacija dešava tokom procesa bioremedijacije.

### **Treći eksperiment**

- Svi parametri bioremedijacije (aeracija, biostimulacija, aeracija+biostimulacija, aeracija+biostimulacija+inokulacija) doprinose razgradnji naftnih ugljovodonika, čak i u uzorcima koji nisu inokulisani, jer podstiču rast i potentnost mikroorganizama prisutnih u samom zagađenju. Posebno je uočljivo udruženo dejstvo aeracije i biostimulacije u haldi IV, koje dovodi do značajnog porasta mikroorganizama (sa  $1 \times 10^3$  do  $2,4 \times 10^6$ ) što rezultira stepenom razgradnje naftnih ugljovodonika od 33,66 % za period od 170 dana.
- Proces bioremedijacije najuspešnije je izveden u haldi V, koja predstavlja aerisanu, biostimulisanu i bioaugmentovanu haldu, pri čemu uočavamo pad TPH vrednosti od 64,64% u odnosu na početnu koncentraciju. Uspešnosti bioremedijacije je doprineo pravilan izbor mikroorganizama upotrebljenih za inokulaciju halde.
- Analize huminskih kiselina iz halde V pokazuju da dolazi do porasta koncentracije huminskih kiselina nakon 170 dana eksperimenta za 21% u odnosu na početak eksperimenta.
- U huminskim kiselinama izolovanim iz halde V nultog dana bioremedijacionog procesa, udeo frakcije velike molekulske mase (veće od 100 kDa) iznosio je 72,67% dok je nakon 170 dana od početka procesa udeo navedene frakcije iznosio 76,17% što je verovatno posledica toga, što se organske komponente najrezistentnije na biorazgradnju, transformišu i uključuju u složene polimerne strukture analogne huminskim supstancama.

- Spektrofluorimetrijske analize huminskih kiselina izolovanih iz halde V pokazuju porast fluorofora tokom bioremedijacionog procesa. Porast broja fluorofora ukazuje na porast aromatičnosti uzoraka huminskih kiselina.
- Potenciometrijske titracije rastvora huminskih kiselina pokazuju, da su one na kraju procesa bioremedijacije kvalitetnije, tj. da imaju bolji puferski i redoks kapacitet nego na početku. Povećanje puferskog i redoks kapaciteta, sugerise da huminske kiseline iz procesa bioremedijacije mogu delovati kao terminalni akceptori elektrona u anaerobnim mikrobiološkim respiracijama, u privremeno beskiseoničnim sistemima.

### **Drugi proces: Mikrobiološko rastvaranje fosfata iz fosfatne rude**

- Hemolitaototrofna gvoždje i sumpor oksidujuća acidofilna bakterija roda *Acidithiobacillus* je izolovana iz tečnog uzorka uzorkovanog iz jezera Robule (Bor, Srbija). Molekulska karakterizacija ukazuje da izolovana vrsta pripada rodu *Acidithiobacillus* sa 99,28% sličnosti sa *Acidithiobacillus ferrivorans*, 98,54% sa *Acidithiobacillus ferridurans* i 98,21% sličnosti sa *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Sekvenca gena 16S rRNK uzorka *Acidithiobacillus* sp. B2 je deponovana u genskoj banci NCBI, GenBank, Holandija, pod brojem KC691309.
- Tokom proces rastvaranja fosfora iz mešavine fosfatne rude i piritu dejstvom *Acidithiobacillus* sp. B2, vremenom se broj mikroorganizama povećavao sa početnih  $1,7 \times 10^6$  CFU/mL, tako da je sedmog dana iznosio  $4 \times 10^6$  CFU/mL, četrnaestog  $1 \times 10^7$  CFU/mL, dvadesetprvog  $4 \times 10^7$  CFU/mL, a dvadesetosmog  $1 \times 10^8$  CFU/mL, što potvrđuje da je ispitivana mešavina ruda pogodan supstrat za rast mikroorganizama.
- Ispitivanja pokazuju da je rastvaranje fosfora povezano sa smanjenjem pH vrednosti, tj. povećanjem koncentracije bakterijski generisane sumporne kiseline i  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , što je posledica mikrobiološke oksidacije piritu u reakcionoj suspenziji.
- Dobijeni rezultati pokazuju da je u suspenziji sa gvožđe-oksidujućim *Acidithiobacillus* sp. B2 rastvoreno 34,5% neorganskog  $\text{P}_2\text{O}_5$ , dok je za isto vreme u kontrolnoj suspenziji procenat rastvaranja  $\text{P}_2\text{O}_5$  bio 3,8%. Procenat izluženja  $\text{P}_2\text{O}_5$  koji se može pripisati dejstvu *Acidithiobacillus* sp. B2 (tj. efektivno izluženje) se dobija oduzimanjem procenta izluženja  $\text{P}_2\text{O}_5$  iz kontrolne suspenzije od procenta izluženja  $\text{P}_2\text{O}_5$  iz inokulisane suspenzije i iznosi 30,7%.

Rezultati ispitivanja bioremedijacije naftnog kontaminanta uz pomoć aktivnog konzorcijuma zimogenih mikroorganizama nedvosmisleno pokazuju, da paralelno sa biorazgradnjom naftnog zagađenja u ispitivanom uzorku dolazi ne samo do porasta sadržaja huminskih kiselina, već se dešava i promena u njihovoj strukturi. Porast aromatičnih struktura, kao i veći udeo frakcije sa većom molekulskom masom ukazuje na to da se tokom procesa bioremedijacije stvara kompleksna polimerna struktura, analogna huminskim supstancama. Rezultati potenciometrijske titracije rastvora huminskih kiselina pokazuju da su huminske kiseline na kraju procesa bioremedijacije kvalitetnije, tj. imaju veći puferski i redoks kapacitet, nego huminske na početku procesa bioremedijacije, što ukazuje da dolazi do obogaćenja kiselina u sadržaju hidroksilnih i karboksilnih grupa.

Rezultati ispitivanja drugog procesa, pokazuju da je *in situ* generisanje usvojivog fosfora iz fosfatne rude uz pirit kao pomoćni supstrat, i *Acidithiobacillus* sp. B2 kao katalizator solubilizacije, moguće izvesti, i to vrlo uspešno (34,5% fosfatne rude se rastvara za 4 nedelje), jer tionske bakterije oksidujući pirit kreiraju kiselo okruženje koje pomaže rastvaranje fosfora iz nerastvornih fosfatnih ruda.

## 6. LITERATURA

1. Alam S., Samina K., Najma A., Maliha R., 2002. In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PMS) from maize rhizosphere. *Int. J. Agric. and Biol.* **4**, 454–458.
2. Alexander, M., 1999. *Biodegradation and Bioremediation*, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press, San Diego.
3. Alisi C., Musella R., Tasso F., Ubaldi C., Manzo S., Cremisini C., Sprocati A.R., 2009. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Sci. Total. Environ.* **407**, 3024-3032.
4. Amro M.M., 2004. *Treatment Techniques of Oil-Contaminated soil and Water Aquifers*
5. Anonymus, 2010. *Suve podloge "Torlak" – Katalog*, Torlak – Institut za imunologiju i virusologiju, Beograd.
6. Antoun H, Babana A.H., 2006. Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. *Plant Soil* **287**, 51–58.
7. Atlas R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiol. Rev.* **45**, 180–209.
8. Atlas, R.M., 1984. *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York.
9. Atlas, R.M. 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* **31**, 178-182.
10. Babić S., 2009. Ispitivanje mikrobiološke degradacije vanbilasnog mazuta tokom ex situ bioremedijacije, Diplomski rad, Hemijski fakultet, Beograd.
11. Bamforth S.M., Singleton I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons : current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 723–736.
12. Beškoski V.P., 2011. Proučavanje aktivnosti konzorcijuma zimogenih mikroorganizama zemljišta zagađenog naftom i njenim derivatima i njihova primena za bioremedijaciju, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd.
13. Beškoski V.P., Gojgić-Cvijović G.Đ., Milić J.S., Ilić M.V., Miletić S.B., Jovančićević B.S., Vrvic M.M., 2012. Bioremedijacija zemljišta kontaminiranog naftom i naftnim derivatima: mikroorganizmi, putanje razgradnje, tehnologije. *Hem. Ind.* **66**, 275–289.

14. Bhatti, T.M., Yawar, W., 2010. Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy* **103**, 54-59.
15. Bojinova D., Velkova R., Ivanova R., 2008. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.* **99**, 7348-7353.
16. Boopathy R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technol.* **74**, 63-67.
17. 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*. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 199–232.
18. BS EN 14345, 2004, Characterization of waste — Determination of hydrocarbon content by gravimetry.
19. Campitelli P., Ceppi S., 2008. Effects of composting technologies on the chemical and physicochemical properties of humic acids. *Geoderma* **144**, 325–333.
20. Castaldi P., Alberti G., Merella R., Melis P., 2005. Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Manage.* **25**, 209-213.
21. Cerniglia C., Sutherland J.B., 2001. in: *Fungi in Bioremediation*, G.M. Gadd, Ed., British Mycological Society, Cambridge University Press, Cambridge.
22. Chen Y., Senesi N., Schnitzer M., 1977. Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **41**, 352-358.
23. Chi R., Xiao C., Gao H., 2006. Bioleaching of phosphorus from rock phosphate containing pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Miner. Eng.* **19**, 979-981.
24. Collins, C.H., Lyne, P.M., 2004. Estimating Microbial Numbers, in: Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M., (Eds.), *Microbiological Methods*, 8th ed. Falkinham III JO. Arnold, London.
25. Corbridge D.E.C., 2013. *Phosphorus: Chemistry, Biochemistry and Technology*, 6th ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
26. Das N., Chandran P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol. Res. Int.* **43**, 117-124.
27. Delvasto P., Valverde A., Ballester A., Moñoz J.A., Gonzáles F., Blázquez M.L., Igual J.M., Garcia-Balboa C., 2008. Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy* **92**, 124-129.



28. Domeizel M., Khalil A., Prudent P., 2004. UV spectroscopy: a tool for monitoring humification and for proposing an index of the maturity of compost. *Bioresource Technol.* **94**, 177-184.
29. Đurka Đ.J., 2010. Ekogeohemijska interpretacija organskih supstanci treseta Vlasinskog jezera, Magistarski rad, Hemijski fakultet, Beograd
30. Ehrlich H.L., 2001. Past, present and future of biometallurgy. *Hydrometallurgy* **59**, 127–134.
31. EzTaxon-e databases – Ez BioCloud, <http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/> (pristupljeno 05.10.13).
32. Gojgić-Cvijović G.D., Milić J.S., Šolević T.M., Beskoski V.P., Ilić M.V., Đokić L.S., Narančić T.M., Vrvić M.M., 2012. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation* **23**, 1-14
33. Gojgić-Cvijović G., Vrvić M. M., 2003. Praktikum za mikrobiološku hemiju, Centar za hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd
34. Guggenberger G., 2005. Humification and mineralization in soils. In: *Microorganisms in soils: roles in genesis and function*. F. Buscot, A.Varma, Eds. Berlin: Springer.
35. Hallberg K.B., González-Toril E., Johnson D.B., 2010. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* **14**, 9–19.
36. Hamdali H, Hafidi M, Virolle M.J, Ouhdouch Y., 2008. Rock phosphate solubilizing actinomycetes: Screening for plant growth promoting activities. *World J. Microb. Biot.* **24**, 2565–2575.
37. Harayama S., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design, *Curr. Opin. Biotech.* **8**, 268-273.
38. Haritash A.K., Kaushik C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH<sub>s</sub>): a review. *J.Hazard. Mater.* **169**, 1–15.
39. Hedrich S., Johnson D.B., 2013. *Acidithiobacillus ferridurans*, sp. nov.; an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic *Gammaproteobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **63**, 4018-4025.
40. Helburn R.S., MacCarthy P., 1994. Determination of some redox properties of humic acid by alkaline ferricyanide titration. *Anal. Chim. Acta* **295**, 263-272.

41. Henner P., Schiavon M., Morel J.L., Lichtfouse E., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Analisis* **25**, 9-10.
42. Horakova D.M.V., Nemec M., 2000. In: *Remediation Engineering of Contaminated Soil*, D.L. Wise, D.J. Trantolo, E.J. Eichon, H.I. Inyang, U. Stottmeister, Eds., Marcel dekker, New York.
43. Evans, G.M., Furlog, J.C., 2003. *Environmental Biotechnology: Theory and Application*. Wiley, Chichester.
44. Forsyth, J.V., Tsao, Y.M., Bleam, R.D., 1995. Bioremediation: When is bioaugmentation needed? In: Hinchee, R.E., Fredrickson, J., Alleman, B.C. (Eds.), *Bioaugmentation for Site Remediation*. Battelle Press, Columbus.
45. Ilić M., 2011. Transformacije zagađivača naftnog tipa u procesu simulacije biodegradacije u laboratorijskim aerobnim uslovima, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd.
46. <http://www.humicsustances.org> (07. 06. 2014.).
47. <http://www.hidmet.gov.rs/ciril/osmotreni/index.php> (10.08.2014.).
48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
49. ISO 5073, 1999. Brown coals and lignites — Determination of humic acids. Geneva
50. ISO 10693, 1995. Soil Quality – Determination of carbonate content – volumetric method. Geneve.
51. ISO 11274, 1998. Soil Quality – Determination of the water-retention characteristic – Laboratory methods. Geneve.
52. ISO 11465, 1993. Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method. Geneve.
53. ISO/DIS 10390, 2002. Soil Quality – Determination of pH. Geneve.
54. Jakovljević M., Pantović M., 1991. Hemija zemljišta i voda, Naučna knjiga, Beograd
55. Jekić, J.S., Beškoski, V.P., Gojgić-Cvijović, G., Grbavčić, M., Vrvić, M.M., 2007. Bacterially generated  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  from pyrite, as a leaching agent for heavy metals from lignite ash. *J. Serb. Chem. Soc.* **72**, 615-619.
56. Jerzykiewicz, M., Drozd, J., Jezierski A., 1999. Organic radicals and paramagnetic metal complexes in municipal solid waste composts. An EPR and chemical study. *Chemosphere* **39**, 253–268.

57. Jiménez E.I., García V.P., 1992. Determination of maturity indices for city refuse composts. *Agr. Ecosyst. Environ.* **38**, 331-343.
58. Kalvins M., Anson L., 2010. Study of interactions between humic acid and furfuren C60. *Ecological Chemistry and Engineering* **17**, 351-362.
59. Khan F.I., Husain T., Hejazi R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* **71**, 95-122.
60. Khomenkov V.G., Shevelev A.B., Zhukov V.G., Zagustina N.A., Bezborodov A.M., Popov V.A., 2008. Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic biodegradation in microorganisms: a review. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **44**, 133-152.
61. Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S., Chun J., 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J. Syst. Evol. Micr.* **62**, 716–721.
62. Klüpfel L., Piepenbrock A., Kappler A., Sander M., 2014. Humic substances as fully regenerable electron acceptors in recurrently anoxic environments. *Nat. Geosci.* **7**, 195-200.
63. Kostić A., 2007. Inženjering zaštite životne sredine, Osnovi inženjeringa uklanjanja postojećeg otpada. Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, Beograd.
64. Kuhad R.C., Gupta R., 2009. In: *Advances in Applied Bioremediation*, A. Singh, R.C. Kuhad, O.P. Ward, Eds., Springer-Verlag, Berlin.
65. Liljeqvist M., Valdes J. Holmes D.S., Dopson M., 2011. Draft Genome of the Psychrotolerant Acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3. *J. Bacteriol.* **193**, 4304–4305.
66. Liu J.S., Xie X.H., Xiao S.M., Wang X.M., Zhao W.J., Tian Z.L., 2007. Isolation of *Leptospirillum ferriphilum* by single-layered solid medium. *J Cent South Univ T* **4**, 467-473.
67. Loeher 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.
68. Lopez M.J., Elorrieta M.A., Vargas-Garcia M.C., Suarez-Estrella F., Moreno J., 2002. The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi. *Bioresource Technol.* **81**, 123-129.
69. Maier R., Pepper I., Gerba C., 2000. *Environmental Microbiology*, Academic Press, London.

70. Margensin, R., Schinner, F., 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 3127–3133.
71. Mayhew L., 2004. *Humic Substances in Biological Agriculture*, Acres U.S.A. Vol. 34
72. Mihelcic J.R., Pritschow A., Lueking D.R., 1995. Uptake of dissolved and oil phase organic chemicals by bacteria. *Ground. Water Monit. R.* **15**, 100–106.
73. Milić J., 2011. Biohemijska karakterizacija sojeva bakterija koje razgrađuju ugljovodonike izolovanih iz sredina sa naftnim zagađivačima, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd.
74. Miletić S., 2013. Ispitivanje zagađenih staništa kao izvora mikroorganizama za bioremedijaciju, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd.
75. Miličić-Terzić, J. Lopez -Vidal, Y., Vrvic, M.M., Saval, S., 2000. Biodegradation potential assessment of microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil. *Water Sci. Technol.* **42**, 403–406.
76. Miličić-Terzić, J. Lopez-Vidal, Y., Vrvic, M.M., Saval, S., 2001. Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil. *Bioresource Technol.* **78**, 47–54.
77. Mirsal I.A., 2008. *Soil Pollution – Origin, Monitoring & Remediation*, 2<sup>nd</sup> Ed., Springer.
78. Mishra S., Jyot J., Kuhad R.C., Lal B., 2001. In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. *Curr. Microbiol.* **43**, 328-335.
79. Pajczkowska J., Sulkowska A., Sulkowski W.W., 2003. Spectroscopic study of the humification process during sewage sludge treatment. *J. Mol. Struct.* 651-653, 141-149.
80. Palladino G., Ferri D., Manfredi C., Vasca E., 2007. Potentiometric determination of the total acidity of humic acids by constant-current coulometry. *Anal. Chim. Acta* **582**, 164-173
81. Paul E.A., 2007. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, Elsevier.
82. Philip J.C., Atlas R.M., 2005. In *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup*, R.M. Atlas, J.C. Philip, Eds., ASM Press, Washington DC.

83. Pena-Mendez E. M., Havel J., Patočka J., 2005. Humic substances compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment and biomedicine. *J. Appl. Biomed.* **3**, 13-24.
84. Peng R.H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 927–955.
85. Pettit R.E., 2006. Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid, and humin. *The Wonderful World of Humus and Carbon*.
86. Polak J., Bartoszek M., Sułkowski W., 2009. Comparison of humification processes occurring during sewage purification in treatment plants with different technological processes. *Water Res.* **43**, 4167–4176.
87. Powder Diffraction File, Card No. 9-0432 (apatite) and Card No. 42-1340 (pyrite). Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS), Swarthmore, PA.
88. Raičević V., Lalević B., Dabić D., Kiković K., Jovanović LJ., Nikšić M., 2007. Mikroorganizmi u bioremedijaciji zemljišta i voda. *Zaštita materijala* **48**, 49-52.
89. Rawlings D.E., 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell Fact* **4**, 1-15.
90. Rončević S., 2007. Karakterizacija bioremedijacionih procesa u zemljištu i podzemnim vodama zagađenim naftom i derivatima na lokalitetu Ratno ostrvo, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad.
91. Ressler B.P., Kneifel H., Winter J. 1999. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation. *Appl. Microbiol. Biot.* **53**, 85-91.
92. Rittmann, B.E., McCarty, P.L., 2001. *Environmental biotechnology: Principles and applications*. McGraw Hill, New York.
93. Rodríguez H, Fraga R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**, 319–359.
94. Savić J., Savić M., 1990. *Osnovi analitičke hemije: klasične metode*, Sarajevo.
95. Silverman, M.P., Lundgren, D.G., 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **77**, 642-647.
96. Singer M.E., Finnerty W.R., 1984. In: *Petroleum Microbiology R.M. Atlas, Ed.*, Macmillan Publishing Company, New York, 1–58.

97. Singh A., Ward O.P., 2004. Biodegradation and bioremediation, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
98. Stamford N.P., Santos P.R., Santos C.E.S., Freitas A.D.S., Dias S.H.L., Lira M.A.Jr., 2007. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* for yam bean grown on a Brazilian tableland acidic soil. *Bioresource Technology* **98**, 1311–1318.
99. Stevenson, F.J., 1994. Humus chemistry: genesis, composition, reactions, second ed. Wiley, New York.
100. 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.
101. Sugahara K., Inoko A., 1981. Composition analysis of humus and characterization of humic acid obtained from city refuse compost. *Soil Sci. Plant Nutr.* **27**, 213-224.
102. Ugrinov D., Stojanov A., 2010. Bioremedijacija u tretmanu zagađenog zemljišta. *Zaštita materijala* **51**, 237-244.
103. Van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B., 2003. Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. *Oil Gas Sci. Technol.* **58**, 427–440.
104. Van Hamme J.D., 2004. In: *Biodegradation and Bioremediation*, A. Singh, O.P. Ward, Eds., Springer-Verlag, Berlin, 37-56.
105. Veselinović D., Gržetić I., Đarmati Š., Marković D., 1995. Stanja i procesi u životnoj sredini, Fakultet za fizički hemiju Univerziteta u Beogradu.
106. Vidali M., 2001. Bioremediation. An overview, *Pure Appl. Chem.* **7**, 1163 – 1172.
107. Xiao C., Chi R., Fang Y., 2013. Effects of *Acidiphilium cryptum* on biosolubilization of rock phosphate in the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *T. Nonferrous Metal Soc.* **23**, 2153–2159.
108. Xiao C.Q., Chi R.A., He H., Qiu G.Z., Wang D.Z., Zhang X.W., 2009. Isolation of phosphate-solubilizing fungi from phosphate mines and their effect on wheat seedling growth. *App. Biochem. Biotech.* **159**, 330–342.
109. Xiaoli C., Shimaoka T., Xiaoyan C., Qiang G., Youcai Z., 2007. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere* **69**, 1446–1453.

110. Xiaowei L., Meiyang X., Jian Y., Limin Z., 2013. Organic matter humification in vermifiltration process for domestic sewage sludge treatment by excitation–emission matrix fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Hazard. Mater.* **261**, 491-499.

111. Živković M.D., Đodević A.R., 2003. Pedologija, geneza, sastav i osobine zemljišta. Poljoprivredni fakultet, Beograd.





## **BIOGRAFIJA AUTORA**



Jelena S. Avdalović (rođena Jekić), rođena je 03. 04. 1974. godine u Zenici, Republika Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Šapcu. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu završila je početkom 2000. godine sa prosečnom ocenom 8,21 i ocenom 10 na diplomskom radu. Magistarske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu završila je 2007. godine sa prosečnom ocenom 10.

Od 01. 02. 2002. do 30. 06.2013. bila je zaposlena u Institutu za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, a od 01. 07. 2013. do danas zaposlena je kao Istraživač saradnik u Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju.

Oblasti interesovanja i naučno-istraživačkog rada su biogeotehnologija-biohidrometalurgija i primena mikroorganizama za bioremedijaciju naftom zagađeneživotne sredine.

Autor i koautor je pet naučnih radova sa ISI liste objavljenih u uglednim domaćim i inostranim časopisima, četiri tehnička rešenja i više desetina saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu štampanih u celini i u izvodu.

Jelena S. Avdalović je udata, i majka je Natalije i Nevene.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена С. Авдаловић

број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

НАСТАНАК ЗЕМИЉИШТА У ПРОЦЕСИМА БИОРЕМЕДИЈАЦИЈЕ

---

---

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

Потпис докторанда

У Београду, 14.4.2015.



---

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена С. Авдаловић

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм Биохемија

Наслов рада НАСТАНАК ЗЕМЉИШТА У ПРОЦЕСИМА БИОРЕМЕДИЈАЦИЈЕ

Ментори др Мирослав М. Врвић и др Мила Илић

Потписана Јелена Авдаловић

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 14. 4. 2015.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

НАСТАНАК ЗЕМЉИШТА У ПРОЦЕСИМА БИОРЕМЕДИЈАЦИЈЕ

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 14.04.2015.



\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

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

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

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

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

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