



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



msc Jelena Spasojević

**KARAKTERIZACIJA BIOREMEDIJACIONIH
PROCESA U SEDIMENTIMA ZAGAĐENIM
POLICIKLIČNIM AROMATIČNIM
UGLJOVODONICIMA I PROCENA
BIODOSTUPNOSTI**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2015. godina

Istraživanja obuhvaćena doktorskom disertacijom rađena su na Katedri za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom “Unapređenje tehnologija remedijacije sedimenta u cilju zaštite voda”.

Zahvalnost pre svega želim da uputim mentoru prof. dr Srđanu Rončeviću na podršci i nesebičnoj pomoći tokom postavke eksperimenta, tumačenja rezultata i izrade ovog rada. Hvala na savetima i ukazanom poverenju.

Zahvaljujem se prof. dr Boži Dalmaciji koji mi je pružio odlične uslove za rad i napredovanje.

Posebnu zahvalnost dugujem doc. dr Snežani Maletić na strpljenu, podršci, savetima i pomoći koju mi je pružala u toku izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Jeleni Tričković na predlozima i savetima u toku pripreme eksperimenta i pomoći pri tumačenju rezultata.

Zahvaljujem se prof. dr Olgi Petrović, prof. dr Draganu Radnoviću i msc Dragani Čučak na interesovanju za ovaj rad i pomoći prilikom interpretacije mikrobioloških parametara.

Zahvalnost dugujem i doc. dr Jeleni Molnar Jazić i doc. dr Marijani Kragulj Isakovski na pomoći prilikom tumačenja rezultata.

Zahvaljujem se takođe i prof. dr Miletu Klašnji na interesovanju za ovaj rad.

Koleginicama i kolegama sa Katedre za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine dugujem veliku zahvalnost na pomoći i podršci tokom ovih godina.

Neizmerno sam zahvalna svojoj porodici, naročito majci Nadi, ocu Milomiru i bratu Strahinji na ljubavi, veri i podršci.

Hvala svim prijateljima koji su bili uz mene.

Novi Sad, 2015.

Jelena

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	OPŠTI DEO	4
2.1.	Policiklični aromatični ugljovodonici	4
2.1.1.	<i>Mehanizam formiranja policikličnih aromatičnih ugljovodonika</i>	6
2.1.2.	<i>Putevi dospevanja policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnu sredinu</i>	7
2.1.3.	<i>Fizičko-hemijske karakteristike policikličnih aromatičnih ugljovodonika</i>	10
2.1.4.	<i>Sudbina policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini</i>	13
2.1.5.	<i>Toksičnost policikličnih aromatičnih ugljovodonika</i>	17
2.1.5.1.	<i>Uticao na zdravlje ljudi i životinja</i>	19
2.1.5.1.1.	<i>Kancerogenost</i>	19
2.1.5.1.2.	<i>Teratogenost</i>	20
2.1.5.1.3.	<i>Genotoksičnost</i>	20
2.1.5.1.4.	<i>Imunotoksičnost</i>	20
2.2.	Sediment i njegov značaj	20
2.2.1.	<i>Zakonska regulativa u Srbiji</i>	22
2.2.2.	<i>Remedijacija sedimenta</i>	24
2.3.	<i>Mehanizam bakterijske razgradnje i transformacije odabranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika</i>	35
2.4.	Biodostupnost	43
2.4.1.	<i>Biodostupnost i procena rizika</i>	48
2.4.2.	<i>Sorpcioni procesi kao procesi biodostupnosti</i>	49
2.4.3.	<i>Hemijske metode za merenje biodostupnosti organskih jedinjenja</i>	50
2.4.3.1.	<i>Ekstrakcija</i>	51
2.4.3.1.1.	<i>Ekstrakcija u prisustvu ciklodekstrina</i>	53
2.4.3.1.2.	<i>Ekstrakcija u prisustvu čvrstog adsorbenta</i>	57
2.4.4.	<i>Modeli za opisivanje desorpcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa sedimenta</i>	58
2.5.	Spajkovanje sedimenta - izbor metode, način spajkovanja i smetnje	60
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	62
3.1.	Odabir policikličnih aromatičnih ugljovodonika	63
3.2.	Odabir sedimenata	64
3.3.	Odabir hemijskih agenasa za desorpciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa sedimenta	65
3.4.	Priprema sedimenata za eksperiment	66
3.5.	Postavke eksperimenata	66
3.6.	Metode ispitivanja sedimenata	72

4.	REZULTATI I DISKUSIJA	76
4.1.	Određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova	76
4.1.1.	<i>Određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije fluorantena, pirena i krizena</i>	76
4.1.1.1.	<i>Organski profil sedimenta</i>	77
4.1.1.2.	<i>Efikasnost uklanjanja ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika</i>	79
4.1.1.3.	<i>Mikrobiološka karakterizacija procesa bioremedijacije u sedimentima</i>	82
4.1.2.	Određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije fenantrena, pirena, krizena i benzo(a)pirena	83
4.1.2.1.	<i>Efikasnost uklanjanja ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika</i>	84
4.2.	Određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova	87
4.2.1.	<i>Efikasnost uklanjanja ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika</i>	88
4.2.2.	<i>Mikrobiološka karakterizacija procesa bioremedijacije u sedimentima</i>	91
4.3.	Testovi fitotoksičnosti (testovi klijavosti i usvajanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika)	92
4.4.	Ispitivanje mogućnosti procene potencijalno biodostupne frakcije primenom različitih hemijskih agenasa	93
4.4.1.	<i>XAD4, Tenax TA i HPCD</i>	93
4.4.2.	<i>XAD4 i MCD</i>	99
4.4.3.	<i>βCD</i>	103
4.5.	Koreliranje rezultata dobijenih testovima biodegradacije, testovima klijavosti, testovima fitotoksičnosti i rezultata dobijenih iz eksperimenta procene biodostupnosti hemijskim testovima	103
4.5.1.	<i>Korelacija rezultata degradacije PAH-ova sa istim brojem prstenova i eksperimenta biodostupnosti sa βCD..</i>	104
4.5.2.	<i>Korelacija rezultata degradacije PAH-ova sa istim brojem prstenova pri različitim uslovima i eksperimenta biodostupnosti sa βCD</i>	106
4.5.3.	<i>Korelacija rezultata degradacije PAH-ova sa različitim brojem prstenova i eksperimenta biodostupnosti sa XAD4 i MCD</i>	108
4.5.4.	<i>Korelacija rezultata testova klijavosti i fitotoksičnosti i eksperimenta biodostupnosti sa XAD4 i Tenaxom</i>	109

5.	ZAKLJUČAK	111
6.	LITERATURA	117
	PRILOG	132
	BIOGRAFIJA	
	KLJUČNA DOKUMENTACIJA	

1. UVOD

Ekspanzija i ubrzan razvoj industrije u XX veku, kao i povećana emisija polutanata u životnu sredinu uslovlili su degradaciju vodnih resursa, a samim tim i degradaciju kvaliteta sedimenta utičući na kvalitet celokupnog ekosistema. U isto vreme, nadležne državne institucije počele su da se bave problemom zagađenja i zaštite životne sredine, a industrijske kompanije kontrolisanjem izlivanja i ispuštanja otpadnih materija u životnu sredinu. Iz činjenice da sediment ima snažno izraženu tendenciju za vezivanje toksičnih jedinjenja i da on, na taj način predstavlja rezervoar toksičnih i perzistentnih jedinjenja dominantno antropogenog porekla, proistekla je potreba za istraživanjem sedimenta. Kontaminiran sediment može postati izvor sekundarnog zagađenja, kada usled promene uslova u vodenom sistemu (poplave, acidifikacija, itd.) sorbovani polutanti bivaju desorbovani i vraćeni u vodenu fazu gde ponovo predstavljaju opasnost (*Wise et al., 2000; Gleyzes et al., 2002*).

Među najznačajnijim polutantima, koji drastično narušavaju kvalitet životne sredine, nalaze se policiklični aromatični ugljovodonici (PAH). Prisutni su u svim segmentima životne sredine (u vodi, vazduhu, zemljištu, sedimentu), a nastaju kao produkti nepotpunog sagorevanja organske materije koja potiče delom od prirodnog sagorevanja kao što su šumski požari i vulkanske aktivnosti, ali najvećim delom nastaje kao produkt različitih ljudskih aktivnosti (*Johnsen et al., 2005*).

U zavisnosti od stepena zagađenja sediment je nekad neophodno podvrgnuti određenim tretmanima remedijacije. Iako su tehnike za remedijaciju zemljišta u velikoj meri razvijene, malo se zna o remedijaciji sedimenta. Osobine sedimenta se mogu u velikoj meri razlikovati od osobina zemljišta i tehnologije adekvatne za zemljište ne moraju odgovarati sedimentu (*Mulligan et al., 2001*). Često se kreće sa pretpostavkom da je sva sorbovana frakcija zapravo i biodostupna, što predstavlja konzervativan pristup proceni kvaliteta sedimenta. Ovo može dovesti do bespotrebnog trošenja finansijskih sredstava, kao i vremena, tokom procesa remedijacije. Sorpcija na organsku materiju, sekvestracija i degradacija, samo su neki od faktora koji mogu uticati na oslobađanje PAH-ova u pornu vodu, i samim tim na povećanje njihove biodostupnosti (*Bogan and Sallivan, 2003, Johnsen et al., 2005, Nam and Alexander, 1998, Ahn et al., 2008, Marini and Frapiccini, 2013*). Veoma je važno pri odabiru tehnike remedijacije napraviti balans između zaštite životne sredine i ekonomske efikasnosti (USEPA, 2005).

Biodegradacija je jedan od najznačajnijih procesa koji dovode do redukcije koncentracije PAH-ova u životnoj sredini. Primenom različitih agenasa (surfaktanata, nutrijenata, itd), ali i dodatkom različitih mikroorganizama može se poboljšati uklanjanje PAH-ova iz sedimenata (*Bernhardt et al., 2013, Ma et al., 2012, Rončević et al., 2005, Maletić et al., 2011, Ivančev-Tumbas et al., 2004, Amezcua-Allieri, 2012*).

Mikroorganizmi koji se obično koriste u ovakvim eksperimentima su obično roda *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Mycobacteria* ili *Ralstonia* (Juhasz and Naidu, 2000, Zhang, 2011, Kaczorek et al., 2013, Zhong et al., 2011 Song et al., 2011, Tøndervik et al., 2012). Biodegradacija zapravo predstavlja proces u kojem se koristi metabolitički potencijal mikroorganizama u cilju prečišćavanja područja koji su kontaminirana (Watanabe, 2001). U toku ovog procesa, mikroorganizmi posredstvom svojih enzima metabolišu organske kontaminante iz zemljišta, vode ili sedimenta i transformišu ih u krajnje netoksične proizvode, pre svega do ugljen-dioksida i vode. Stvaranjem optimalnih uslova za rast mikro-organizama i uvećavanje njihove brojnosti, potpomaže se detoksifikacija određenih količina kontaminanata.

Za uspješnije obavljanje procesa bioremedijacije, potrebno je poznavati karakteristike kontaminanta, lokaliteta i mikroorganizama (USEPA, 1996). Od ovih parametara zavisi i dužina trajanja bioremedijacije, koja često može da dostigne i više godina. Pojedini lako biodegradibilni kontaminanti mogu se razgraditi i za manje od godinu dana, dok se kontaminanti velikih molekulskih težina razgrađuju znatno duže. Najvažnije karakteristike kontaminanta koje je potrebno odrediti su mogućnost biodegradacije, rastvorljivost u vodi, koeficijent sorpcije zemljišta i hemijska reaktivnost. Pored karakteristika kontaminanata, potrebno je u obzir uzeti i karakteristike matriksa koji će biti podvrgnut tretmanu bioremedijacije (koncentraciju kontaminanta u matriksu, pH, sadržaj organske materije, mikro- i makro- elemenata, prisutvo ili odsustvo supstanci koje su toksične za mikroorganizme, prisustvo drugih akceptora elektrona, itd.). Kada su mikroorganizmi u pitanju, potrebno je, pre svega, da oni budu aktivni, tj. da imaju sposobnost biodegradacije određenog kontaminanta i da njihova populacija u lokalitetu bude dovoljno velika, kako bi se što efikasnije kontaminant razgradio.

Samo prisustvo kontaminanta u nekom medijumu, ne znači da je taj kontaminant dostupan za usvajanje od strane živog organizma. Ona količina koja je dostupna i usvojiva za živi svet, predstavlja biodostupnu frakciju. Evaluacija dostupne frakcije kontaminanata prisutnih u tom sedimentu je veoma važna jer se smatra da ova dostupna frakcija lako podleže procesima bioakumulacije, biosorpcije i transformacije u prisustvu različitih organizama. Procena dostupne frakcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika je bitna zbog njihovih kancerogenih i mutagenih osobina koje se ispoljavaju ako oni uđu u lanac ishrane (Rostami and Juhasz, 2013).

Hemijske ekstrakcione metode se često koriste u cilju predviđanja biodostupnosti polutanata u životnoj sredini. Ortega-Calvo et al. (2013) su pokazali da rezultati dobijeni na ovaj način mogu da se koreliraju sa rezultatima dobijenim u eksperimentima usvajanja ili biodegradacije sa specifičnim organizmima. Veliki broj istraživača se bavio biodostupnošću PAH-ova iz zemljišta i sedimenta koristeći različite organske rastvarače, Tenax, Triton X-100 i hidroksipropil-ciklodekstrin (Bernhardt et al., 2013, Kelsey et al., 1997, Cuypers et al., 2002, Liste and Alexander, 2002, Reid et al., 2000,

Cornelissen et al., 2001, Allan et al., 2006, Oleszczuk, 2009, Rhodes et al., 2010. Patterson et al. (2004) pokazao je da je ekstraktibilna frakcija naftalena iz eksperimenta sa hidroksipropil-ciklodekstrinom mogla da se korelira sa mineralizovanom frakcijom, dok je sa XAD4 dobijena loša korelacija. Ono što je problem sa hemijskim testovima, kao i eksperimentima biodegradacije jeste taj da postoji veliki broj faktora koji se menjaju od sedimenta do sedimenta, pa ne postoje ni neki standardizovani faktori kako bi se vršila korekcija. Svaki lokalitet, svaki sediment se mora posmatrati posebno i tretirati svaki za sebe. Dakle, potrebna su dalja istraživanja u cilju povezivanja bioloških i hemijskih testova.

Pregled literature je pokazao da se tokom poslednjih godina istraživači okreću brzim, hemijskim testovima koji će dati procenu potencijalne biodostupnosti za svega par sati i smanjiti potrebna finansijska sredstva za procenu kvaliteta sedimenta i izradu studija vezanih za remedijaciju.

Cilj istraživanja je bolje razumevanje ponašanja i sudbine policikličnih aromatičnih ugljovodonika u sedimentu, procena biodostupnosti i mogućnosti biodegradacije. Ispitivanja će se vršiti na više sedimenata, sa više odabranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa liste prioriternih supstanci.

Istraživanje je fokusirano na:

- Određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova,
- Određivanje uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova,
- Ispitivanje fitotoksičnosti (testovi klijavosti i usvajanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika)
- Ispitivanje mogućnosti procene potencijalno biodostupne frakcije primenom različitih hemijskih sorbenata (2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, β -ciklodekstrin, metil- β -ciklodekstrin, Tenax TA i XAD4 smola)
- Koreliranje rezultata dobijenih testovima biodegradacije, testovima klijavosti, testovima fitotoksičnosti i rezultata dobijenih iz eksperimenta procene biodostupnosti hemijskim testovima.

2. OPŠTI DEO

2.1. Policiklični aromatični ugljovodonici

Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) su sveprisutni u životnoj sredini. Sastoje se od spojenih aromatičnih prstenova. Njihova biohemijska postojanost čini ih otpornim na nukleofilne degradacije. Poseduju fizička svojstva, kao što su niska rastvorljivost u vodi i visok koeficijent raspodele sediment - voda, što rezultuje niskom biodostupnošću za mikroorganizame i visokom akumulacijom u čvrstim fazama terestrijalne okoline. Velika ekološka zabrinutost vezana za PAH-ove potiče od činjenice da su oni visoko toksični i da imaju mutagena i kancerogena svojstva (*Johnsen et al., 2005, Monna et al., 1993*).

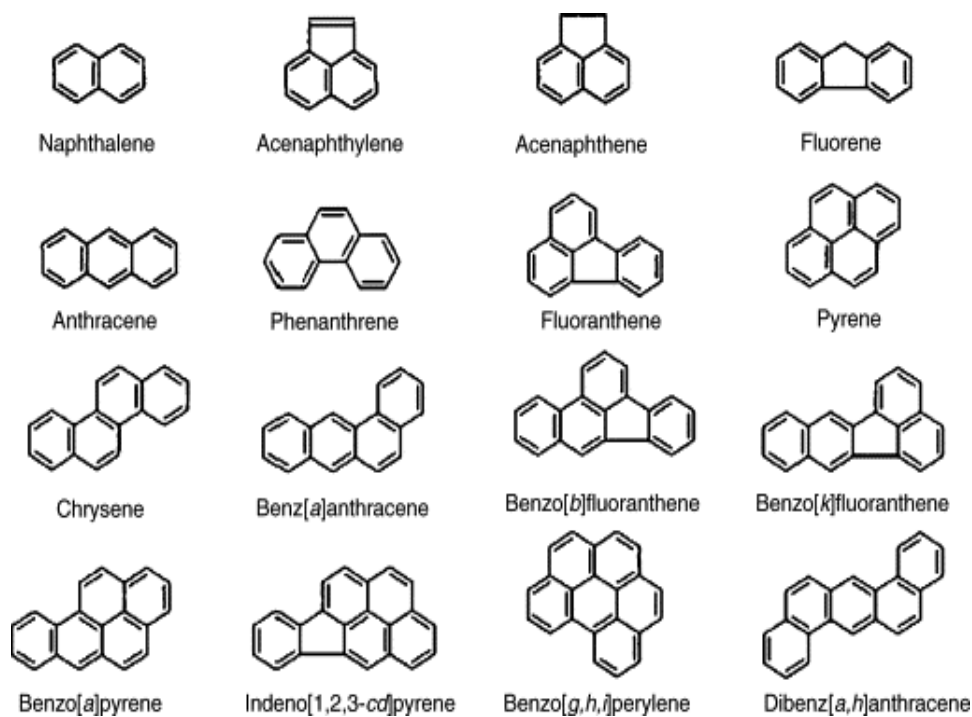
Konačna sudbina PAH-ova u sedimentu je pod kontrolom skoro isključivo stabilnom adsorpcijom na površinu mineralnih i organskih matrica. PAH-ovi sa tri ili više prstena imaju tendenciju da se jako adsorbuju na tlo matrica (*Knox et al., 1993*), po mogućnosti malih agregata (<50 µm), koji takođe sadrže najviše humifikovane organske supstance. Snažna adsorpcija u kombinaciji s vrlo niskom rastvorljivosti u vodi dovodi do toga da gubitak PAH-ova usled ispiranja bude zanemarljiv. Isparavanje se i ne smatra mehanizmom nestanka PAH-ova sa tri ili više prstenova zbog vrlo niskog napona pare i jakog zadržavanja u matrici zemljišta.

Američka agencija za zaštitu životne sredine (*US EPA*) i Evropska unija (*EU*) su odlučili da se 16 PAH-ova nađu na listi prioriternih polutanata, a to su: *naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, benzo(a)antracen, krizen, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren, dibenzo(a,h)antracen, benzo(g,h,i)-perilen i indeno(1,2,3-cd)piren* (*Slika 2.1, Tabela 2.1*) (*Kormüller i Viesmann, 1999*).

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

Štetno dejstvo PAH-ova se odvija putem dva mehanizma:

- asocijacijom ili reakcijom sa lipidima u ćelijskim membranama ili drugim ćelijskim konstituentima
- reakcijom sa makromolekulima kao što su nukleinske kiseline (DNK, RNK) i proteini (enzimi).



Slika 2.1. Strukture 16 USEPA PAH-ova koji se nalaze na listi prioriternih polutanata

Tabela 2.1. Osobine 16 USEPA PAH-ova (Bergknut, 2006):

PAH	Broj prstenova	Molekulska težina (g/mol)	Rastvorljivost u vodi (mg/l)	Napon pare (Pa)	Log K_{ow}
Naftalen	2	128	31	$1,0 \times 10^{-2}$	3,37
Acenaftilen	3	152	16	$9,0 \times 10^{-1}$	4,00
Acenaften	3	154	3,8	$3,0 \times 10^{-1}$	3,92
Fluoren	3	166	1,9	$9,0 \times 10^{-2}$	4,18
Fenantren	3	178	1,1	$2,0 \times 10^{-2}$	4,57
Antracen	3	178	0,045	$1,0 \times 10^{-3}$	4,54
Piren	4	202	0,13	$6,0 \times 10^{-4}$	5,18
Fluoranten	4	202	0,26	$1,2 \times 10^{-3}$	5,22
Benzo(a)antracen	4	228	0,011	$2,8 \times 10^{-5}$	5,91
Krizen	4	228	0,006	$5,7 \times 10^{-7}$	5,91
Benzo(b)fluoranten	5	252	0,0015	-	5,80
Benzo(k)fluoranten	5	252	0,0008	$5,2 \times 10^{-8}$	6,00
Benzo(a)piren	5	252	0,0038	$7,0 \times 10^{-7}$	5,91
Dibenzo(a,h)antracen	5	278	0,0006	$3,7 \times 10^{-10}$	6,75
Indeno(1,2,3-cd)piren	6	276	0,00019	-	6,50
Benzo(ghi)perilen	6	276	0,00026	$1,4 \times 10^{-8}$	6,50

Prvi tip reakcije je karakterističan za izvorno lipofilne supstance, s obzirom da su to kratkoživeći intermedijeri metabolizma koji reaguju sa proteinima ili formama DNK. Vezavanje za molekule DNK može uzrokovati mutacije i, ako su odbrambeni mehanizmi opterećeni, kancer.

Reakcijama sa ćelijskim membranama i ćelijskim organelama utiču nepovoljno na strukturu i funkciju membrane. Neke od posledica mogu biti promene u permeabilnosti membrane, kao i smetnje u transportu ćelije. Kako su mnogi enzimski sistemi povezani sa membranskim strukturama, drugi esencijalni procesi mogu biti oštećeni i normalan energetski balans može biti poremećen. Primeri ovih efekata su dobijeni posmatranjem i proučavanjem redukovano rastu mekušaca, smanjenjem masti u ostrigama i negativnim efektima na veličinu i reproduktivni potencijal kod morskih crva (*Widdows et al., 1985, Bender et al., 1988, Fries i Lee, 1984*).

Primer ovih reakcija je destabilizacija enzima membrana bogatih lizozomima. Ako je sistem lizozoma preopterećen toksičnim supstancama dolazi do autolize, odnosno do samodestrukcije ćelija i oštećenja tkiva. Destabilizacija lizozoma kod mekušaca se pojavljuje pri dozama PAH-ova koje su karakteristične za područja pod uticajem nafte kao što su terminali i luke (*Moore i Farrar, 1985*).

U studiji u kojoj su ribe bile izložene sedimentu koji je bio zagađen PAH-ovima *Payne et al. (1988)* su posmatrali promenu nekoliko biohemijskih i fizioloških pokazatelja, kao što je aktivnost enzimskog sistema citohrom P-450 (koji je odgovoran za sintezu hormona i metabolizam) čak i pri ublaženim i smanjenim kontaminacijama (< 1 mg PAH/kg suvog sedimenta).

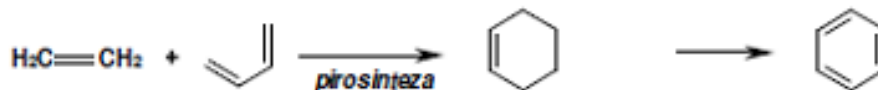
Generalno, uzimajući u obzir varijacije među vrstama, metabolički kapacitet jestivih akvatičnih vrsta je izgleda, najrazvijeniji kod riba a najmanje kod mekušaca (*James, 1989; Stegeman i Lech, 1991*). Ova pojava ima nekoliko posledica, najvažnija je transport PAH-ova kroz lanac ishrane.

Patologija. Do sada, najistraženiji patološki efekat PAH-ova je kancer. Druge bolesti koje se dovode u vezu sa zagađenjem od strane PAH-ova su razne lezije kože i jetre, i katarakta kod riba. Riblje vrste odlikuje osetljivosti prema kancerogenim agensima. Dva glavna faktora su najverovatnije razlike u putevima degradacije i kapacitet metaboličke detoksikacije. Kao rezultat toga dolazi do kovalentnog vezivanja reaktivnih metabolita za DNK. Drugi faktor može biti razlika u kapacitetu reparacije modifikovanog DNK (*Varanasi et al., 1987., Sikka et al., 1990*).

2.1.1. Mehanizam formiranja policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Iako sam mehanizam nastajanja PAH-ova nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavlja se da u osnovi leže reakcije pirolize i pirosinteze. Sam proces počinje pri visokim temperaturama kada dolazi do delimične razgradnje na manje stabilne fragmente, najčešće radikale, koji dalje, simultano, međusobno

reaguju stvarajući na taj način stabilna policiklična aromatična jedinjenja. Ovakvo dobijena jedinjenja su termostabilna. U najvećem broju slučajeva dolazi do pirosinteze produkata koji sadrže dve ili četiri ugljenične jedinice, kao to je slučaj sa etilenskim, odnosno butadienskim radikalima (slika 2.2.):



Slika 2.2. Pirosinteza policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Kako su dobijena policiklična jedinjenja termostabilna, a polazna jedinjenja nestabilna pri visokim temperaturama, to je udeo nastalih PAH-ova veći pri višim temperaturama, oko 500 °C. Pri nižim temperaturama 100-150 °C, uz duži period nastajanja, može nastati izvesna količina, najčešće supstituisanih PAH-ova (Dabestani i Ivanov, 1999).

2.1.2. Putevi dospevanja polickličnih aromatičnih ugljovodonika u životnu sredinu

Glavni izvor policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini jeste nepotpuno sagorevanje materije izgrađene od atoma ugljenika i vodonika. Proces sagorevanja je nepotpun kada je temperatura sagorevanja niska ili kada tokom procesa sagorevanja nema dovoljno kiseonika. Hemijska sinteza ugljovodonika u plamenu indukovana je od strane slobodnih radikala. Naime određene vrste slobodnih radikala mogu se međusobno spojiti na visokim temperaturama (500-800 °C), koje mogu biti postignute u gornjem delu plamena. Tako na primer utvrđeno je da prisustvo slobodnih radikala metana može dovesti do formiranja određenih PAH-ova, mada je to češće slučaj kada su prisutni neki drugi slobodni radikali većih molekulskih masa (Lewitas et al., 1997). Kao posledica urbanizacije i industrijalizacije u nekoliko poslednjih decenija, zastupljenost ovih jedinjenja u svim segmentima životne sredine u neprekidnom je porastu.

Kada govorimo o izvorima policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini, razlikujemo (Lenicek et al., 1997):

- prirodne izvore PAH-ova i
- antropogene izvore PAH-ova.

Prirodni izvori polickličnih aromatičnih ugljovodonika. U prirodi, PAH-ovi se mogu formirati na tri različita načina (Nikolaou et al., 2009):

- pirolizom organske materije na visokim temperaturama (prilikom sagorevanja dolazi do raspadanja kompleksnih organskih molekula do slobodnih radikla manje molekulske mase),

- dijagenezom sedimentne organske materije na niskim ili srednjim temperaturama, što vodi formiranju fosilnih goriva i
- direktnom biosintezom od strane mikroorganizama ili biljaka.

Šumski požari, spaljivanje poljoprivrednih otpadaka i generalno sve vrste požara, u najvećoj meri doprinose povećanju sadržaja PAH-ova, pre svega u atmosferi. Količina PAH-ova i čestičnih materija emitovana na ovaj način varira u zavisnosti od vrste organske materija koja sagoreva, kao i od vrste, prirode i inteziteta datog plamena. PAH-ovi koji vode poreklo od požara imaju tendenciju da se sorbuju na suspendovanu čestičnu materiju prisutnu u atmosferi, i na taj način da se postepeno sedimentuju u terestičnim i akvatičnim ekosistemima. U atmosferi, PAH-ovi mogu podleći fotolitičkim i hemijskim transformacijama. Ipak poznato je da se većina ovih jedinjenja, formiranih na ovaj način, sporo degradira u atmosferi, tako da se u njoj mogu zadržavati tokom dužeg vremenskog perioda u neizmenjenom obliku. Tokom boravka u atmosferi, PAH-ovi pod dejstvom vetra mogu biti transportovani na velike udaljenosti (*Xu et al., 2006*).

Drugi značajan prirodni izvor PAH-ova su fosilna goriva. Naime PAH-ovi su prirodno prisutni u bituminoznim fosilnim gorivima, kao što su na primer ugalj i sirova nafta. Proces koji vodi nastajanju PAH-ova sadržanih u ovim gorivima naziva se dijageneza. Dijageneza podrazumeva nisko-temperaturno (100-150 °C) sagorevanje organske materije tokom dužeg vremenskog perioda. Ovaj proces favorizuje formiranje alkilovanih PAH-ova, dok je nastajanje nesupstituisanih PAH-ova, kao rezultat ovog procesa, zanemarljivo. Poznato je da se oko 70-75% ugljenika sadržanog u uglju nalazi u aromatičnom obliku, pri čemu su šestočlani aromatični prstenovi dominantni, dok je zastupljenost petočlanih prstenova znatno manja. Prisustvo PAH-ova kao što su benzo(a)antracen, benzo(a)piren, benzo(e)piren, perilen, fenantren i dibenzo(c,d,m)-piren indentifikovano je u uzorcima uglja. U uzorcima otpadnih voda koji su uzeti iz jedanaest različitih postrojenja, koja se bave proizvodnjom uglja širom Kanade, naftalen i fenantren detektovani su u koncentracijama većim od 10 µg/l, dok su antracen, benzo(k)fluoranten i dibenzo(a,h)antracen detektovani u koncentracijama manjim od 10 µg/l. Što se tiče muljeva, naftalen, fenantren, antracen i fluoren obično se detektuju u koncentracijama reda veličine µg/g (*Prabhukumar i Pagilla, 2010*).

Pod prirodnim uslovima, fosilna goriva ne doprinose u značajnoj meri povećanju sadržaja PAH-ova u životnoj sredini. Ovo je posledica činjenice da se većina fosilnih goriva nalazi deponovana duboko ispod zemljine površine, tako da postoji mala verovatnoća da dođe do emisije PAH-ova iznad zemljine površine. Sa druge strane, postoje neke petroleumske frakcije koje se nalaze blizu zemljine površine, što znači da mogu imati doprinos u širenju PAH-ova u atmosferu i akvatične ekosisteme. Ipak, depoziti ovakvih materija prisutni su u malim količinama, tako da je njihov doprinos ukupnom sadržaju PAH-ova u životnoj sredini zanemarljiv.

Ostali prirodni izvori PAH-ova uključuju vulkansku aktivnost, kao i njihovu biosintezu od strane bakterija ili biljaka. Generalno govoreći, prirodni

izvori PAH-ova imaju minimalan doprinos u njihovom ukupnom sadržaju u životnoj sredini, u čemu posebno prednjače poslednje pomenuti prirodni izvori PAH-ova (*Prabhukumar i Pagilla, 2010*).

Antropogeni izvori policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Nepotpuno sagorevanje organske materije glavni je antropogeni izvor PAH-ova u životnoj sredini. Antropogene izvore policikličnih aromatičnih ugljovodonika možemo podeliti u dve velike grupe (*Kordybach, 1999*):

- sagorevanje različitih materijala u cilju produkcije energije i
- spaljivanje otpadnih materijala u cilju minimizacije količine nastalog otpada (insineracija otpada).

Prva grupa antropogenih izvora PAH-ova može se podeliti na:

- stacionarne izvore koji uključuju različite industrijske procese, proizvodnju energije, zagrevanje domaćinstava i
- mobilne izvore koji se uglavnom odnose na različite oblike saobraćaja (drumski, vodeni itd.).

Najznačajniji industrijski izvori PAH-ova pre svega uključuju proizvodnju koksa tj. koksovanje uglja, proizvodnju ugljovodoničnih goriva, kao i različite industrijske procese za proizvodnju aluminijuma, gvožđa i čelika. Komercijalna prerada uglja najpre vodi ka proizvodnji katrana, koji se dalje može prerađivati u asfalt ili različite vrste ulja. Proizvodnja koksa podrazumeva izlaganje antracita (vrsta uglja) visokim temperaturama (1400 °C) u redukcionoj atmosferi. Ovakvi uslovi idealni su za formiranje PAH-ova. Osim toga, proizvodnja katrana, koja takođe podrazumeva izlaganje uglja visokim temperaturama, poznata je kao značajan izvor mnoštva različitih PAH-ova. Ovi PAH-ovi vode poreklo ili od PAH-ova već prisutnih u uglju, ili nastaju usled sagorevanja ugljovodonika sadržanih u uglju. Eksploatacija uglja, osnovne sirovine koja učestvuje u ovim procesima, takođe predstavlja značajn vid emisije PAH-ova u atmosferu. Ugljena prašina posebno je bogata fenantrenom, pirenom, krizenom i perilenom, ali se na njoj povremeno mogu detektovati i drugi predstavnici ovih jedinjenja. Proizvodnja koksa i katrana donedavno predstavljala je jedan od najvećih antropogenih izvora PAH-ova u atmosferi. Poslednjih nekoliko decenija došlo je do unapređenja proizvodnih procesa koksa i katrana, kao i do zatvaranja starih pogona, tako da je značaj ovih izvora, u smislu emisije PAH-ova, u velikoj meri redukovan.

Katalitička razgradnja sirove nafte, u cilju proizvodnje ugljovodoničnih goriva i ostalih derivata nafte, rezultuju proizvodnjom značajne količine PAH-ova. Pri tome, mnogi od ovih PAH-ova zadržavaju se u frakcijama koje se odlikuju visokim tačkama ključanja, kao i u asfaltu. Osim toga, otpadni gasovi iz ovog procesa često su bogati različitim PAH-ovima (*Liu et al., 2008*).

Proizvodnja aluminijuma predstavlja problem iz razloga što su anode koje se koriste u tom procesu napravljene od određene vrste uglja, tako da i u ovom procesu postoji rizik od oslobađanja PAH-ova. Proces sinterovanja, koji

se primenjuje u metalurškoj industriji, može podrazumevati spaljivanje koksa, a samim tim i emisiju određenih PAH-ova u atmosferu.

Kada govorimo o zagrevanju domaćinstava, bilo da se radi o individualnom zagrevanju ili sistemu koji podrazumeva primenu centralnog grejanja, najveći problem predstavljaju emisija fenantrena, fluorantena, pirena, i krizena. Emisija ovih komponenti iz peći koje koriste drva za proizvodnju toplote, veća je za 25 do 1000 puta u odnosu na emisiju iz peći koje koriste ugalj. Pored toga značajno veće koncentracije ovih PAH-ova detektovane su u područjima u kojima postoji veliki broj domaćinstava koja se samostalno zagrevaju, i to naročito u zimskom periodu. Za zemlje u razvoju, u kojima se za proizvodnju toplote često koristi biomasa, koja se spaljuje u jednostavnim pećima, zagrevanje domaćinstava važan je izvor PAH-ova (*Bari et al., 2010*).

Koncentracije PAH-ova u dizel gorivu i benzinu, koja koriste motorna vozila, obično su reda veličine ppm-a. Skoro svi predstavnici ovih jedinjenja prisutni su u koncentracijama manjim od 1 mg/kg, izuzev antracena, fenantrena i fluorantena, koji se ponekad sreću u koncentracijama većim od 10 mg/kg. Kod motora koji koriste benzin najveći problem predstavlja emisija fluorantena i pirena, dok kod motora koji koriste dizel gorivo najveći problem predstavlja emisija naftalena i acenaftena. Osim toga, emisija ciklopenta(c,d)pirena značajna je samo u slučaju benzinskih motora, dok se u slučaju dizel motora nalazi odmah iznad granice detekcije. Emisioni nivoi pomeutih PAH-ova variraju od nekoliko nanograma po kilometru pređenog puta, do preko hiljadu miligrama po kilometru pređenog puta, što zavisi od vrste goriva, tipa vozila, stanja motora, itd. Pomenuti emisioni nivoi, mogu se značajno smanjiti postavljanjem katalizatora u sistemu izduvnih gasova (*Shen et al., 2011*).

Druga grupa antropogenih izvora PAH-ova podrazumeva incineraciju komunalnog i industrijskog otpada, u cilju smanjenja njegove količine. Količina PAH-ova koja se emituje na ovaj način, pre svega zavisi od vrste otpada koji se spaljuje.

Ostali antropogeni izvori PAH-ova, koje je teško svrstati u ove dve kategorije uključuju pečenje hrane, duvanski dim, deranje guma po asfaltu, kremiranje itd. Što se tiče antropogenih izvora PAH-ova, generalno možemo reći da oni uključuju sve procese koji podrazumevaju izlaganje organskog ugljenika visokim temperaturama (*Kordybach, 1999*).

2.1.3. Fizičko-hemijske karakteristike policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Fizičke karakteristike PAH-ova variraju u zavisnosti od njihove strukture i molekulske mase (*tabela 1*). Čisti PAH-ovi su obično obojene, čvrste nepolarne supstance koje na sobnoj temperaturi imaju izrazito visoke tačke ključanja i tačke topljenja (*Maagd et al., 1998*).

Izuzev naftalena, ostali predstavnici ove klase jedinjenja karakterišu se veoma niskom do niskom rastvorljivošću u vodi. Rastvorljivost policikličnih aromatičnih ugljovodonika u vodi naglo opada sa porastom njihove molekulske

mase, odnosno sa porastom broja kondenzovanih aromatičnih prstenova. Strukturno posmatrano linearni PAH-ovi odlikuju se većom rastvorljivošću od anguliranih PAH-ova. Kao primer ovoga može poslužiti antracen, koji je manje rastvoran od fenantrena. Takođe bitno je napomenuti da supstitucija atoma vodonika, u aromatičnim prstenovima, alkil grupama rezultuje smanjenjem rastvorljivosti PAH-ova u vodi. Kao i kod većine ostalih, i kod ovog pravila se javljaju izuzeci, a kao jedan od njih možemo uzeti rastvorljivost benzo(a)-antracena, koja je manja u poređenju sa rastvorljivošću metil- ili etil-benzo(a)antracena. Uticaj temperature na rastvorljivost PAH-ova u vodi je veoma značajan. Sa povećanjem temperature sa 5 na 30 °C, rastvorljivost PAH-ova u vodi može se povećati tri do četiri puta. Sa druge strane, ova jedinjenja, koja su veoma lipofilna, dobro se rastvaraju u nepolarnim organskim rastvaračima kao i u organskim kiselinama.

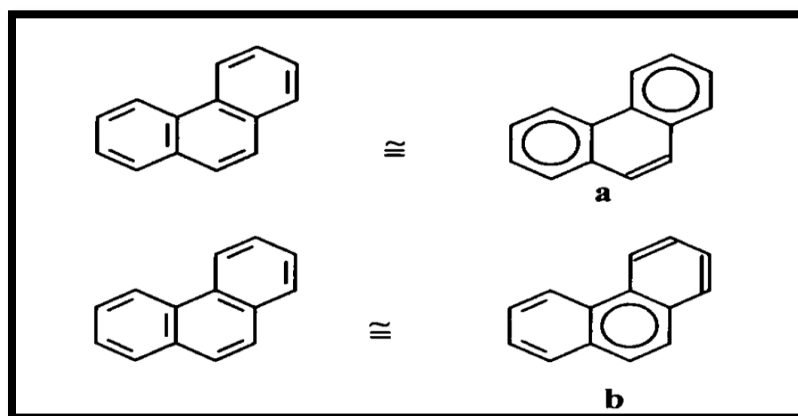
Slično kao i sa rastvorljivošću, napon pare PAH-ova opada sa porastom njihove molekulske mase, odnosno sa porastom broja kondenzovanih aromatičnih prstenova. Napon pare veoma utiče na perzistentnost PAH-ova, pre svega u akvatičnim ekosistemima. Policiklični aromatični ugljovodonici sa dva ili tri prstena odlikuju se srednjim naponom pare i relativno su volatilni, dok oni sa četiri ili više aromatičnih prstenova imaju veoma nizak napon pare, i samim tim slabo su isparljivi (*Skupinska et al., 2004*).

PAH-ovi se odlikuju relativno visokim koeficijentima raspodele oktanol-voda (K_{ow}), što ukazuje na njihov relativno visok potencijal adsorpcije na sedimentu i čvrstim suspendovanim česticama u vodi i vazduhu, kao i na mogućnost njihove biokoncentracije u živim organizmima (*Maagd et al., 1998*). Stepem adsorpcije PAH-ova na čestičnoj suspendovanoj materiji uslovljen je naponom pare konkretnog predstavnika ove klase jedinjenja, temperaturom, hemijskim karakteristikama i osobinama površine čestične materije, kao i njenom koncentracijom u datom medijumu. Adsorpcijom na čestičnoj materiji, poliareni postaju veoma termo- i foto- senzitivni. Zahvaljujući pomenutim svojstvima, PAH-ovi se ponekad mogu degradirati izlaganjem visokoj temperaturi (50 °C), ili pak izlaganjem zračenju talasnih dužina koje pripadaju UV ili VIS oblasti elektromagnetnog spektra (*Skupinska et al., 2004*).

Fotooksidacija predstavlja jedan od glavnih puteva degradacije PAH-ova prisutnih u atmosferi i akvatičnim ekosistemima. Foto-indukovana oksidacija PAH-ova najčešće se odvija u prisustvu molekula kiseonika u ekscitovanom obliku (1O_2) (*Nagpal, 1993*). Pored toga, ovaj proces može biti posredovan od strane ozona, hidroksil radikala ili nekih drugih oksidanasa. Senzitivnost PAH-ova prema fotooksidaciji varira. Neka ispitivanja pokazuju da su antracen, fenantren i benzo(a)antracen najosetljiviji prema fotooksidaciji, dok su krizen, fluoren, piren i benzo(a)piren relativno rezistentni na fotooksidaciju. PAH-ovi adsorbovani na čestičnu materiju podložniji su fotooksidaciji u odnose na PAH-ove koji se nalaze u rastvoru ili pak u gasovitoj fazi atmosfere, a i putevi njihove fotooksidacije se razlikuju (*Fasnacht i Blough, 2003*).

Hemijski posmatrano PAH-ovi su veoma stabilna jedinjenja. Njihova hemijska stabilnost može se najjednostavnije objasniti primenom tzv. Klarovog

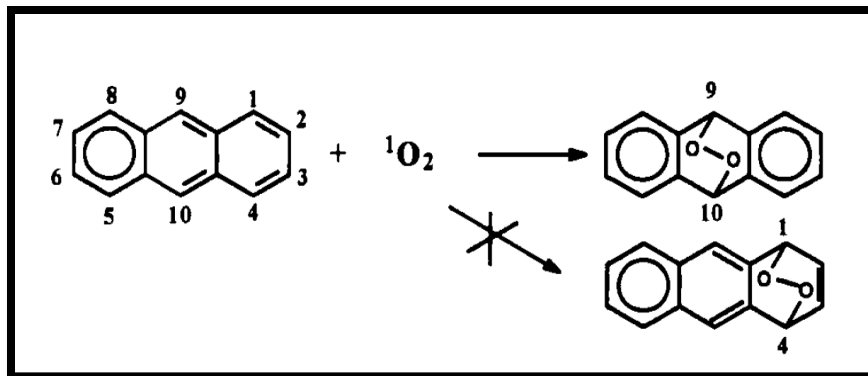
pravila. Prema ovom pravilu, π elektroni koji učestvuju u formiranju aromatičnih sekteta ($2p_z$ elektroni ugljenika) dodeljuju se pojedinačnim prstenovima tako da formiraju što više π elektron sekteta. Po Klaru izomerna struktura koja sadrži najviše ovakvih sekteta je ujedno i najstabilnija struktura. Ovo možemo objasniti na primeru fenantrena. Naime fenantren može biti predstavljen dvema različitim strukturama, *a* i *b*, pri čemu struktura *a* poseduje dva aromatična sekteta, dok struktura *b* poseduje svega jedan aromatični sektet. Prema ovom pravilu favorizovana struktura fenantrena je njegova struktura *a*, tj njegova stabilnija struktura (slika 2.3) (Dabestani i Ivanov, 1999).



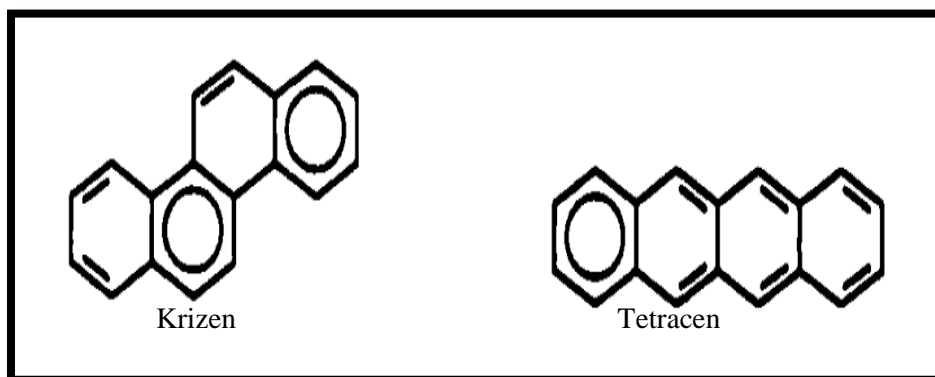
Slika 2.3. Izomerne strukture fenantrena sa dva (*a*), odnosno jednim (*b*) aromatičnim prstenom (Dabestani i Ivanov, 1999).

Ovaj model takođe može biti iskorišćen kako bi se predvideo put kojim će PAH-ovi reagovati sa određenim reaktantima. Ovo možemo objasniti na primeru adicije molekula kiseonika na antracen. Naime, adicija molekula kiseonika vršiće se na centralni prsten antracena, što rezultuje formiranjem 9,10-antracen endoperoksida koji poseduje dva aromatična sekteta, tj. jedan više od samog antracena. Reakcija na poziciji 1,4 ne dovodi do formiranja ni jednog aromatičnog sekteta. Prema ovom pravilu verovatnoća odvijanja reakcija koje ne vode do formiranja aromatičnih sekteta, ili reakcija koje dovode do gubitka aromatičnih sekteta je veoma mala. Samim tim lako je predvideti da će od ove dve reakcije favorizovana reakcija biti reakcija adicije molekula kiseonika na poziciju 9,10 (slika 2.4) (Dabestani i Ivanov, 1999).

Klarov model takođe može poslužiti za razumevanje smanjenja stabilnosti i aromatičnosti policikličnih aromatičnih ugljovodonika većih molekulskih masa. Veća reaktivnost PAH-ova većih molekulskih masa, koji se više ponašaju kao konjugovani alkeni, posledica je prisustva samo jednog aromatičnog prstena u njihovom molekulu (npr. tetracen ili pentacen). Anelacija može povećati aromatični karakter, a samim tim i stabilnost PAH-ova. Tako na primer, krizen koji je angularni analog tetracena, poseduje jedan aromatični prsten više od tetracena, i samim tim je stabilniji od njega (slika 2.5) (Dabestani i Ivanov, 1999).



Slika 2.4. Favorizovani put adicije molekula kiseonika na antracen (Dabestani i Ivanov, 1999).



Slika 2.5. Aromatičnost tetracena i njegovog angularnog analoga krizena (Dabestani i Ivanov, 1999)

2.1.4. Sudbina policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini

Sudbina policikličnih aromatičnih ugljovodonika, u svim medijumima životne sredine, uslovljena je kako njihovim fizičko-hemijskim karakteristikama, tako i karakteristikama čestične materije na kojoj su oni najčešće adsorbovani.

Atmosfera predstavlja primarni medijum, u kome se odigrava transport PAH-ova. U atmosferi, PAH-ovi mogu biti prisutni u gasovitoj fazi (PAH-ovi manje molekulske mase, npr. fenantren), ili pak mogu biti adsorbovani na površini čestične materije (PAH-ovi veće molekulske mase, npr. Benzo-(a)piren), sa kojom mogu biti transportovani na velike razdaljine (Jaarsveld *et al.*, 1997).

Reaktivnost PAH-ova u ovom medijumu određena je njihovom strukturom, fizičko-hemijskom prirodom čestične materije, koncentracijom i kompozicijom prisutnih gasova, kao i intezitetom apsorpcije radijacije.

Atmosferska reaktivnost PAH-ova, vezanih za čestičnu materiju, limitirana je dužinom životnog veka čestične materije u atmosferi. Glavni procesi koji dovode do smanjenja sadržaja čestične materije u atmosferi su difuzija, sedimentacija i njeno uklanjanje putem padavina. Osim toga, vreme zadržavanja samih PAH-ova u atmosferi, uslovljeno je i fotohemijskim i termohemijskim procesima koji dovode do transformacija PAH-ova, a u kojima učestvuju različite atmosferske vrste (*Wild i Jones, 1995*).

Ozon-indukovana oksidacija i hidroksilacija predstavljaju dva najvažnija transformaciona mehanizma PAH-ova u atmosferi. Oba pomenuta procesa aktiviraju se u prisustvu sunčeve svetlosti. Vreme poluraspada različitih PAH-ova pod dejstvom fotooksidacije kreće se između 0,4 i 0,68 sati, a pod dejstvom fotolize (odvija se kada nema dovoljno kiseonika za fotooksidaciju) između 0,37 i 25 sati, pri čemu izuzetak predstavlja naftalen čije se vreme poluraspada kreće između 1704 i 13200 sati. Odvijanje ovih fotohemijskih transformacija uslovljeno je mnogim faktorima, od kojih su najznačajniji: karakteristike čestične materije i količina PAH-ova adsorbovana na čestičnoj materiji (*Dabestani i Ivanov, 1999*).

Perzistentnost PAH-ova u atmosferi raste sa porastom sadržaja organskog ugljenika u čestičnoj materiji, kao i sa porastom količine PAH-ova koji su adsorbovani na ovoj materiji. Ostali transformacioni procesi PAH-ova, koji su zastupljeni u značajno manjoj meri, uključuju reakcije sa azotnim oksidima i sumpor dioksidom. Ove reakcije, obično se odvijaju prilikom same emisije, kada temperature variraju između 100 i 200°C (*Kordybach, 1999*).

Na površinu zemljišta, PAH-ovi dospevaju usled atmosferske depozicije, odlaganja industrijskog otpada ili usled akcidentnih slučajeva. Sudbina PAH-ova, što se tiče zemljišta, zavisi od klimatskih uslova, vrste zemljišta, prisustva biljnog pokrivača, sadržaja i prirode mineralne faze u zemljištu, kao i od osobina samih PAH-ova, među kojima prednjače molekulska struktura, rastvorljivost u vodi, hidrofobnost, lipofilnost i polarnost. Najznačajniji procesi kojima PAH-ovi podležu, kada dospeju na površinu zemljišta su bioakumulacija i biodegradacija, volatalizacija i sorpcija za organsku ili mineralnu fazu zemljišta (*Semple et al., 2003*).

Mogućnost biodegradacije PAH-ova u zemljištu pre svega zavisi od plodnosti zemljišta, kao i od kataboličke aktivnosti zemljišnih mikroorganizama. Mnogi eukariotski i prokariotski mikroorganizmi imaju sposobnost da degradiraju PAH-ove. Kako bi se mogli degradirati od strane određene grupe mikroorganizama, PAH-ovi moraju biti biodostupni i biodegradabilni. Biodostupnost PAH-ova opada sa povećanjem kontaktnog vremena između zemljišta i PAH-ova. Ova činjenica posledica je tendencije PAH-ova da se jako vežu za organsku materiju zemljišta (*Reid et al., 2000*). Katabolička aktivnost mikroorganizama može biti unapređena na različite načine. Neki od tih načina podrazumevaju dodavanje specifičnih enzima, genetske modifikacije, primenu mikroorganizama prilagođenih na određenu vrstu kontaminanata, optimizaciju uslova u zemljištu i tako dalje (*Mcnelly et al., 1998*). Bioakumulacija PAH-ova, od strane organizama, predstavlja veliki problem, zbog mogućnosti njihovog

transporta kroz lanac ishrane, što opet može dovesti do njihove biokoncentracije u organizmima koji se nalaze na višoj lestvici lanca ishrane.

Volatalizacija, kao mehanizam uklanjanja PAH-ova sa površine zemljišta, značajna je samo za PAH-ove manje molekulske mase (*Kookana et al., 1998*). Kao i volatalizacija, spiranje PAH-ova sa površine zemljišta je zanemarljivo, što je posledica njihove slabe rastvorljivosti u vodi. Rastvorljivost organskih polutanata u vodi, pa samim tim i PAH-ova, može se povećati usled interakcije ovih polutanata sa huminskim materijama (*Lassen et al., 1997*).

Sorpcioni procesi i difuzija mogu biti obuhvaćeni zajedničkim pojmom sekvestracije. Za opisivanje sekvestracije PAH-ova u zemljištu koriste se sledeća dva koncepta:

- difuzija kroz organsku materiju i
- sorpciono-usporena difuzija u pore.

Za zemljišnu organsku materiju smatra se da sadrži staklastu i gumenu fazu. Pomenuta staklasta faza poseduje krupne otvore, u kojima kontaminanti mogu interreagovati sa organskom materijom, usled čega dolazi do njihove difuzije u organsku materiju.

Difuzija kontaminanata kroz poru vodu, u zemljištu, usporena je sorpciom kontaminanata na površini mikro i nano pora, koje sadrže male količine organske materije. Brzina difuzije kontaminanata zavisi od veličine čestica zemljišta, poroznosti, kao i od sternih smetnji unutar pora. Većina zemljišta sadrži mnoštvo pora, dijametra do 20 nm, koje su isuviše male da bi obezbedile bakterijama, protozoama ili vlaknima korenja da dopru do njih. Usled smeštanja kontaminanata u ovakve pore, oni postaju zaštićeni od biote, to jest postaju bionedostupni (*Kim i Osako, 2003*).

Slično kao i u atmosferi, PAH-ovi u vodenom stubu pretežno su asociрани sa čestičnom materijom. U vodenu sredinu, PAH-ovi najčešće dospevaju usled atmosferske depozicije, spiranja sa površine zemljišta i vegetacije, kao i usled akcidentnih situacija (npr. izlivanje ulja). Volatalizacija, fotoliza, hidroliza, biodegradacija i adsorpcija na čestičnu materiju praćena sedimentacijom, predstavljaju procese koji dominantno determinišu sudbinu PAH-ova u akvatičnim ekosistemima.

Stepen volatalizacije, određenih predstavnika ove klase jedinjenja, zavisi od vremenskih uslova, kretanja vode i molekulske mase datog jedinjenja. Za PAH-ove manjih molekulskih masa utvrđeno je da mogu volatalizacijom da napuštaju vodenu sredinu. Kao primer ovoga mogu poslužiti naftalen ili antracen koji pod dejstvom volatalizacije veoma brzo napuštaju vodenu sredinu (red veličine sati). Sa druge strane PAH-ovi većih molekulskih masa, kao što je na primer piren, veoma sporo volatilizuju iz vodene sredine (*Hattum et al., 1998*).

Fotodegradacija predstavlja značajan mehanizam degradacije PAH-ova, većih molekulskih masa, u akvatičnim ekosistemima. Prema nekim istraživanjima, utvrđeno je da su PAH-ovi adsorbovani na čestice suspendovane u vodi perzistentniji prema fotodegradaciji od PAH-ova koji se nalaze u rastvoru. Ovo pravilo nije u potpunosti potvrđeno, s obzirom da pojedini testovi ukazuju da su PAH-ovi koji se nalaze u rastvoru podložniji fotolizi, od PAH-ova

adsorbovanih za čestičnu materiju. Fotooksidacija može hemijski transformisati PAH-ove u jedinjenja koja su kancerogenija i toksičnija od polaznih jedinjenja.

PAH-ovi u akvatičnim ekosistemima, podložni su biodegradaciji od strane različitih mikroorganizama, među kojima preovlađuju bakterije, gljive i pojedine vrste algi, a koji se nalaze u okviru sedimentnog supstrata, ili pak čestica sedimenta suspendovanih u vodi (*Haritash i Kaushik, 2009*). Step biodegradacije PAH-ova, od strane akvatičnih mikroorganizama, zavisi od broja aromatičnih prstenova, kao i načina na koji su oni spojeni u molekulu. Tako na primer PAH-ovi sa dva ili tri prstena, kao što su naftalen, fenantren i antrecen veoma su podložni biodegradaciji od strane PAH-biodegradirajućih mikroorganizama, koji ih ponekad koriste kao primarni supstrat (*Haus et al., 2001*). Sa druge strane PAH-ovi većih molekulskih masa, kao što su na primer piren i benzo(a)piren, degradiraju se znatno sporije. PAH-ovi koji ne mogu biti direktno biodegradirani od strane određene vrste mikroorganizama, degradiraju se zahvaljujući postojanju procesa kometabolizma (simultana degradacija dva jedinjenja, u kojoj je degradacija drugog jedinjenja uslovljena prisustvom i degradacijom prvog jedinjenja). Intermedijerni produkti biodegradacije PAH-ova, u akvatičnim ekosistemima, mogu biti znatno toksičniji i kancerogeniji od polaznih jedinjenja. Pored mikroorganizama PAH-ovi mogu biti ingestirani od strane mnogih bezkičmenjaka i kičmenjaka. Bioakumulacija PAH-ova obično je inverzno povezana sa mogućnošću organizma da metaboliše PAH-ove. Tako na primer, organizmi sa dobro razvijenim sistemom mikrozomal oksigenaza, metabolišu PAH-ove i imaju mali stepen akumulacije ovih komponenti.

Stepen adsorpcije PAH-ova na čestice suspendovane u vodi raste sa porastom njihove molekulske mase, tj. sa porastom broja aromatičnih prstneova, odnosno opada sa porastom njihovog napona pare. Generalno za većinu PAH-ova, prisutnih u vodenom stubu određenog akvatičnog ekosistema, možemo reći da sedimentacija predstavlja glavni mehanizam njihovog uklanjanja (*Carlsen et al., 1997*).

Sudbina PAH-ova u sedimentu, kao krajnjem medijumu deponovanja ovih jedinjenja, zavisi od niza faktora. Danas je poznato da na interakciju između sedimenta i zagađujućih materija (PAH-ova) utiče organska materija iz sedimenta (njena količina (*Hatzinger i Alexander, 1995*) i njena priroda (*Piatt i Brusseau, 1998*)), neorganski konstituenti (*Mader et al., 1997*), zatim distribucija pora i struktura (*Nam i Alexander, 1998*), mikrobiološka aktivnost (*Guthrie i Pfaender, 1998*) i koncentracija zagađujuće supstance (*Divincenzo i Sparks, 1997*). Takođe je utvrđeno da se sa povećanjem sadržaja organske materije, kao i sa smanjenjem veličine čestica sedimenta, povećava stepen akumulacije PAH-ova u njemu, i obrnuto što je posledica činjenice da organska materija ima visok kapacitet adsorpcije prema PAH-ovima i da se sa smanjenjem veličine čestica sedimenta, povećava ukupna površina, dostupna za adsorpciju PAH-ova. Efikasnost biodegradacije PAH-ova u sedimentu opada sa porastom broja kondenzovanih prstenova u molekulu, tako da se petočlani i šestočlani PAH-ovi veoma teško razgrađuju (*Haus et al., 2001*).

Sve je zapaženija uloga mikroorganizama u konačnoj sudbini PAH-ova u sedimentu. Biodegradacija od strane mikroorganizama koji naseljavaju sediment je ključni mehanizam uklanjanja PAH-ova iz sedimenta. Da bi uklanjanje zagađenja bilo efikasno potrebno je obezbediti odgovarajuće mikroorganizme, u dovoljno velikom broju, kao i optimalne uslove za njihov rast i razvoj, kao što su dovoljne količine azota i fosfora. Najčešće se primenjuje autohtona mikroflora, koja se izoluje iz sedimenta i razmnožava u bioreaktorima. Pored kvasaca iz rodova *Candida* (*C. lipolytica*, *C. tropicalis*), *Hansenula*, *Torulopsis*, *Rhodotorula* i gljiva iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* i druge, osnovnu ulogu u biodegradaciji ugljovodonika imaju bakterije, među kojima dominiraju vrste iz rodova *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* i druge (*Committee on In Situ Bioremediation et al.*, 1993). Proces biodegradacije je spor, jer su PAH-ovi slabo biodostupni mikroorganizmima. Biodostupnost se može povećati sa oksidativnom predtretmanom ili sa povećavanjem temperature. Oksidativnim predtretmanom PAH-ovi se zbog dodatka hemikalija (peroksid, ozon) raspadaju na komponente i mikroorganizmi mogu lakše da ih koriste. Povećavanjem temperature rastvorljivost PAH-ova se povećava i mikroorganizmi ih lakše mogu razgraditi (*Feitkenhauer et al.*, 2003).

2.1.5. Toksičnost policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Prisustvo PAH-ova u životnoj sredini, između ostalog, problematično je i zbog njihove toksične, kancerogene i mutagene prirode. Toksičnost predstavnika ove klase jedinjenja ne može se generalizovati. Ona je uslovljena strukturom datog predstavnika, kao i prirodom grupa, koje mogu biti supstituisane u molekulu.

Mnogi nesupstituisani PAH-ovi, kao i PAH-ovi koji poseduju metil, nitro ili karboksilne grupe, poseduju kancerogene karakteristike. Američka agencija za zaštitu životne sredine (*USEPA*) i Evropska unija (*EU*) su odlučili da se 16 PAH-ova nađu na listi prioriternih polutanata, a to su (*slika 1*): *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*.

PAH-ovi prisutni u životnoj sredini su neaktivni, i sami po sebi ne mogu izazvati kancerogenezu. Tek nakon ulaska u organizam, PAH-ovi se metabolički transformišu u kancerogene forme. Mehanizam ove aktivacije dobro je poznat, i sličan je za sve kancerogene PAH-ove. Naime, apsorbirani PAH se metaboliše u cilju povećanja njegove rastvorljivosti, kao i olakšanja ekskrecije iz organizma. Metabolička transformacija PAH-ova sastoji se iz sledeće dve faze (*Surh et al.*, 1996):

- faza 1, koja podrazumeva odvijanje reakcija oksidacije PAH-ova koje su katalizovane enzimom koji se naziva citohrom P-450, kao i reakcija hidroksilacije koje su katalizovane epoksid hidrolazama i

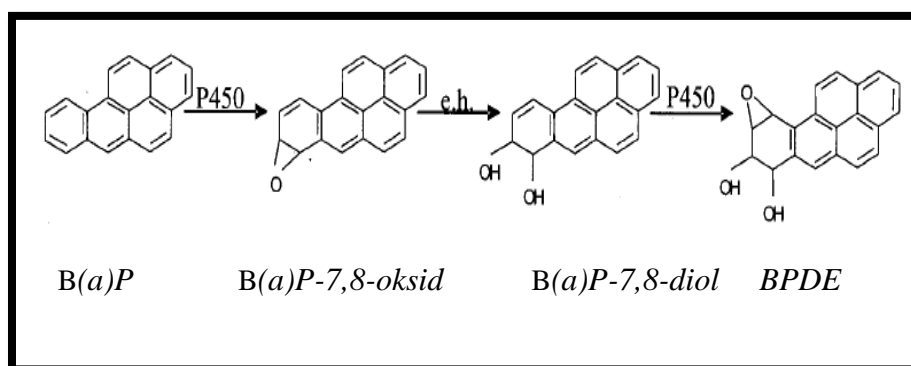
- o faza 2, koja podrazumeva odvijanje složenih reakcija konjugacije koje dodatno povećavaju rastvorljivost datog jedinjenja.

Elektrofilni produkti, epoksi dioli, koji nastaju tokom prve faze, su hidrofilni i samim tim poseduju veću rastvorljivost u vodi. Hidroksilacija PAH-ova dovodi do povećanja njihove aktivnosti prema molekulima proteina i molekulima DNK. Produkti hidroksilacije PAH-ova napadaju nukleofilne centre pomenutih makromolekula, što može dovesti do oštećenja proteina ili mutacije DNK, koja može prouzrokovati kancerogenezu.

Jedan od najčešćih produkata druge faze, konjugat glutationa i datog predstavnika PAH-ova, nastaje reakcijom konjugacije u kojoj učestvuje glutation, a koja je katalizovana glutation-S-transferazom. Konjugovani PAH-ovi nisu u mogućnosti da se vežu za proteine ili DNK. Shodno tome možemo reći da su dve primarne funkcije glutationa da ubrza ekskreciju datog PAH-a, kao i da zaštiti ćelije od mutacije (Astrup *et al.*, 1995).

Najtoksičniji PAH je *benzo(a)piren* (3,4-benzopiren). Metabolička transformacija benzo(a)pirena (B(a)P), posredovana citohromom P-450, veoma je kompleksna, jer on poseduje veliki broj reaktivnih mesta, na koje kiseonik može biti supstituisan, što dovodi do nastanka epoksida. Dalje, u reakcijama hidrolize ove komponente mogu biti transformisane u trans-diole, ili mogu biti konjugovane sa glutationom. Odvijanje ovih reakcija zavisi od stabilnosti epoksida, kao i od prisustva enzima na reakcionom mestu. Nastali produkti mogu se ponovo transformisati u epoksidge. Konkretno, aktivacijom benzo(a)pirena citohromom P-450 nastaje benzo(a)piren-7,8-oksidge, koji se dalje epoksid hidrolazama može transformisati u tri različita benzo(a)piren-transdiola.

Poslednja faza aktivacije podrazumeva formiranje (7R,8S)-dihidroksi-(9S,10R)-epoksi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo(a)pirena (BDPE), najkancerogenijeg, od moguća četiri izomera (slika 2.6). Period poluraspada BDPE iznosi osam minuta, što je dovoljno da se kovalentno veže za nukleofilne delove molekula proteina i DNK. BDPE se veže za atome kiseonika ili azota, koji ulaze u sastav purinskih (adenin i guanin) ili pirimidinskih (citozin i timin) baza.



Slika 2.6. Kancerogena aktivacija benzo(a)pirena (Skupinska *et al.*, 2004).

Tokom procesa popravke, PAH-DNK konjugat uklanja se iz DNK lanca i biva zamenjen komplementarnom bazom. Kada sistem koji vrši popravku pogreši, sekvenca nukleotida se može narušiti, tako da se na mestu oštećene DNK formira novi heliks sa rasporedom baza koji nije pravilan. Ovakva mutacija može biti uzrok kancerogeneze (*Decaprio, 1997*).

2.1.5.1. Uticaj na zdravlje ljudi i životinja

Efekti na ljudsko zdravlje zavise uglavnom od dužine i načina izlaganja, kao i koncentracije kojoj je organizam izložen. Pored ovih, bitan faktor jeste i zdravstveni status osobe i godine. Sposobnost PAHova da izazovu kratkoročne efekte na zdravlje ljudi još uvek nije do kraja razjašnjen. Profesionalna izloženost visokim koncentracijama policikličnih aromatičnih ugljovodonika može da izazove simptome kao što su: iritacija oka, nosa, mučnina, djareja i konfuzija. Smeša PAHova takođe može da izazove i osipe i iritaciju kože. Antracen, benzo(a)piren i naftalen direktno mogu da iritiraju kožu, dok antracen i benzo(a)piren izazivaju i alergije na koži životinja i ljudi.

Zdravstveni efekti od dugotrajnog izlaganja PAH-ovima može da uključi smanjenje imuniteta, kataraktu, oštećenje bubrega ili jetre, problem u disanju, astmu i probleme u funkciji pluća, kao i iritaciju kože i osip. Naftalen može da izazove raspad crvenih krvnih zrnaca ako se inhalira ili unese u organizam u većim količinama (*Lah, 2011*).

2.1.5.1.1. Kancerogenost

Iako nemetabolisani PAHO-ovi mogu imati toksične efekte, glavna zabrinutost potiče od sposobnosti reaktivnih metabolita, kao što su epoksidi i dihidrodoli, nekih PAH-ova da se vežu za ćelijske proteine i DNK, rezultujući biohemijske poremećaje i oštećenja ćelija koja mogu dovesti do mutacije, razvojnih anomalija, tumora i raka. Dokazi ukazuju da je mešavina PAH-ova kancerogena za ljude. Dokazi potiču pre svega iz studija sprovedenih na radnicima koji su izloženi PAH-ovima i smešama koje sadrže ove komponente. Ove dugoročne studije su pokazale povećan rizik pretežno od oboljenja kože i pluća, ali i raka mokraćne bešike i gastrointestinalnog raka. Međutim, nije do kraja razjašnjeno da li samo izliženost PAH-ovima utiče na zdravlje ili je glavni razlog pojave različitih simptoma zapravo izloženost nekim drugim kancerogenim agensima, kao što su npr. aromatični amini.

Životinje izložene PAH-ovima tokom dužeg perioda u laboratoriji obolele su od raka pluća i raka želuca usled inhalacije i ingestije PAH-ova, i raka kože usled kontakta PHA-ova sa kožom. izazivač kancera kod životinja i ljudi, a ovo jedinjenje je poznato po tome što je prva hemikalija koja je dokazano kancerogena. Na osnovu raspoloživih dokaza, Međunarodna agencija za istraživanje raka i USEPA klasifikuju brojne PAH-ove kao kancerogene za životinje i neke PAH-bogate smeše kao kancerogene za

ljude. EPA je klasifikovala sedam PAH jedinjenja kao verovatno kancerogena za ljude: benz(a)antracen, benzo(a)pirena, benzo(b)fluoranten, krizen, benzo(k)-fluoranten, dibenz(ah)antracen i indeno(1,2,3 - cd)piren (Lah, 2011).

2.1.5.1.2. Teratogenost

Embriotoksični efekti PAHova opisani su u eksperimentalnoj studiji sprovedenoj na životinjama izloženim PAH-ovima kao što su: benzo(a)antracen, benzo(a)piren i naftalen. Laboratorijske studije sprovedene na miševima pokazale su da ingestijom većih količina benzo(a)pirena tokom trudnoće dolazi do oštećenja ploda. Ovakvo dejstvo nije dokazano na ljudima. Međutim, Centar za Zaštitu Zdravlja Dece pokazao je u svojim studijama da je prilikom izlaganja trudnica policikličnim aromatičnim ugljovodonicima moguća pojava deformiteta kod deteta, kao i prerani porođaj. Visoka prenatalna ekspozicija PAHovim je u vezi i sa nižim IQ do treće godine, kao i poremećajima ponašanja koji se javljaju u periodu od šeste do osme godine i dečijom astmom. Pupčana vrpca dece izložene PAH-ovima pokazala je DNK oštećenje koje se dovodi u vezu sa pojavom kancera (Lah, 2011).

2.1.5.1.3. Genotoksičnost

Genotoksični efekti nekih PAH-ova ispoljili su se kako kod glodara, tako i kod in vitro testova na ćelijama sisara (uključujući i ljudske ćelije). Većina PAH-ova nije genotoksična sama po sebi. Međutim ukoliko u toku metabolizma dođe do nastanka diol epoksida koji reaguje sa DNK, onda dolazi i do genotoksičnog oštećenja. Genotoksičnost igra važnu ulogu u procesu kancerogeneze i ispoljavanja toksičnih efekata (Lah, 2011).

2.1.5.1.4. Imunotoksičnost

Dokazano je da PAH-ovi kod glodara izazivaju supresiju imunih reakcija. Precizni mehanizam PAH-indukovane imunotoksičnosti nisu još razjašnjeni, ali se pretpostavlja da imunosupresori imaju važnu ulogu u indukovanju kancera (Lah, 2011).

2.2. Sediment i njegov značaj

Sediment je integralna komponenta akvatičnih sistema. Geolozi definišu sediment kao čvrsti materijal koji nastaje delovanjem erozije, spiranjem obala i nanošenjem čvrstog materijala vazduhom (npr. peska), te sukcesivnim taloženjem suspendovanog materijala. Materijal koji formira sediment potiče i od organskih materija nastalih raspadanjem biljnih i životinjskih organizama, a nastaje i taloženjem suspendovanih materija iz nedovoljno prečišćenih otpadnih voda. USEPA je sediment definisala kao esencijalnu, dinamičku komponentu

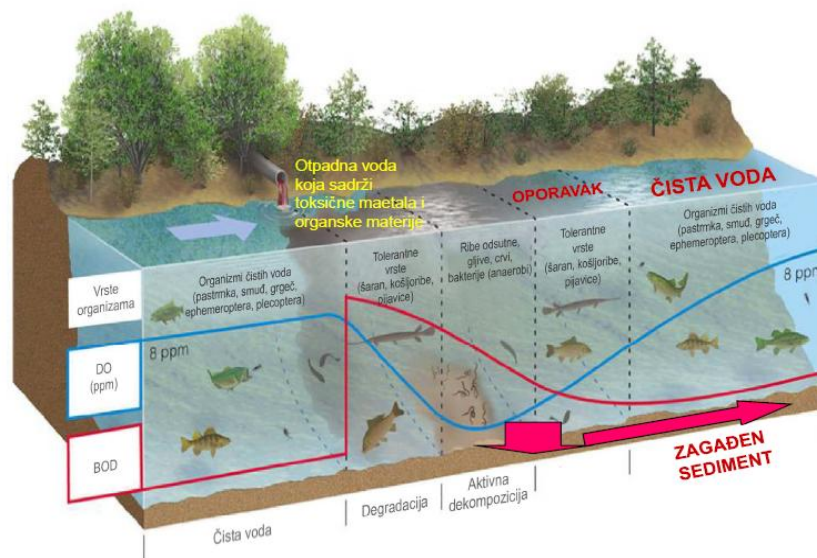
svih akvatičnih sistema koji zbog snažno izražene tendencije vezivanja predstavlja rezervoar akumuliranih, toksičnih i perzistentnih jedinjenja prirodnog i antropogenog porekla.

Akumulacija toksičnih supstanci u sedimentu može imati mnogo štetnih efekata na ekosistem, kako jasno vidljivih, tako i onih diskretnih i nevidljivih. U mnogim slučajevima, vidljivi i lako prepoznatljivi dokazi o štetnom dejstvu na rezidentnu biotu su podudarni sa određenim koncentracijama polutanata u sedimentu. Češći su, međutim, manje vidljivi efekti na biološke zajednice i ekosisteme koji su uslovljeni različitim koncentracijama zagađujućih materija u sedimentu, ali ih je i teže identifikovati. Brojne studije su dokazale da slične koncentracije zagađujućih materija mogu prouzrokovati različite ekotoksične efekte u različitim sedimentima jer je toksičnost uslovljena stepenom kojim konstituenti sedimenta vezuju zagađujuće materije. S obzirom da kapacitet sedimenata za vezivanje polutanata varira u zavisnosti od njihovih fizičko-hemijskih osobina, variraće i stepen toksičnog efekta za istu ukupnu koncentraciju zagađujućih materija. Dostupnost hidrofobnih organskih polutanata je važna i sa aspekta procene bioremedijacionog potencijala sedimenata zagađenih hidrofobnim organskim polutantima što je veoma značajno ako se uzme u obzir da je bioremedijacija perspektivna i jeftina remedijaciona tehnologija sa najmanje negativnih efekata na okolinu. Biodostupnost organskih jedinjenja uslovljena je vrstom i intenzitetom interakcija u sistemu sediment/voda, a kada su u pitanju hidrofobna organska jedinjenja, sorpcija na organskoj materiji sedimenata predstavlja najznačajniju interakciju. Organska materija igra presudnu ulogu u procesima koji utiču na ponašanje organskih polutanata u složenim sistemima akvatičnih sedimenata, što je u najvećoj meri uslovljeno njenom heterogenom hemijskom strukturom (*Delle Site, 2001*).

U vodotocima sediment nastaje od čestica tla koje nastaju spiranjem zemljišta, tj. procesom koji se naziva *erozija*, zatim od čestica eolskog nanosa koje pod dejstvom vetra dospevaju u vodu. Sediment može da nastane od čestica koje dospevaju zajedno sa otpadnim vodama iz naselja i industrije ili nastaju pri mikrobiološkoj razgradnji zagađenja u vodotocima, a prikaz takvog procesa je dat na *slici 2.7*. Truljenje akvatične i obalne vegetacije (većim delom od procesa eutrofizacije) i nagomilavanjem čvrstog otpada koji se neodgovorno ubacuje u vodotokove takođe može nastati sediment (*Dalmacija, 2012*).

Sediment ima i ekološku vrednost:

- stanište je brojnih organizama,
- važan izvor nutrijenata za organizme, što utiče na lanac ishrane,
- dinamika sedimenta (erozija, sedimentacija i gradijenti) stvara povoljne uslove za raznolikost sredine (biodiverzitet)
- vekovima je korišćen kao đubrivo i konstrukcioni materijal,
- izvor minerala.



Slika 2.7. Sediment zagađen otpadnom vodom (Dalmacija, 2012)

2.2.1. Zakonska regulativa u Srbiji

Sediment je integralna komponenta akvatičnih sistema i može predstavljati sekundarni izvor zagađenja. Prateći ekosistemski pristup sa akcentom na proceni rizika za vodene ekosisteme prati se i koncentracija polutanata u sedimentu. Okvirna Direktiva o vodama implicira da je potrebno vršiti i monitoring sedimenta i daje smernice za rešavanje problema sedimentata na samoj lokaciji gde je degradiran kvalitet sedimenta. Međutim, veliki problem predstavlja nedostatak podataka o koncentracijama jedinjenja i elemenata u sedimentu, kao i propisa i legislativa, ne samo u našoj zemlji, već i u okviru EU.

Vlada Republike Srbije je 2012. godine donela Uredbu o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentima i rokovima za njihovo dostizanje (*Službeni glasnik 50/2012*). Uredba definiše granične vrednosti za pojedine policiklične aromatične ugljovodonike u sedimentu, njihovu ciljnu, maksimalno dozvoljenu i remedijacionu vrednost (*tabela 2.2*).

Granične vrednosti se odnose na standardni sediment koji sadrži 10% organske materije i 25% gline. Prilikom ocene kvaliteta sedimenta, dobijene granične vrednosti se koriguju za dati sediment prema izmerenom sadržaju organske materije i sadržaju gline u datom sedimentu na sledeći način:

$$GV_K = GV_{ST} \cdot \frac{\%OM}{10}$$

Gde je:

GV_K – korigovana granična vrednost za određeni sediment kada se uzme u obzir samo sadržaj organske materije

GV_{ST} – granična vrednost za standardni sediment sa 25% gline i 10% organske materije

% OM – izmereni sadržaj organske materije u datom sediment izražen u procentima u odnosu na masu suvog sedimenta

Granične vrednosti zagađujućih menjaju se i/ili dopunjavaju sa novim zagađujućim materijama u skladu sa novim podacima o zagađujućim materijama, grupama zagađujućih materija ili indikatorima, u cilju zaštite zdravlja ljudi i životinja i životne sredine, a u skladu sa planom zaštite voda od zagađivanja. U slučaju izmuljivanja sedimenta koriste se kriterijumi dati u *tabeli 2.3*, dok su kriterijumi za dozvoljeni način postupanja sa izmuljenim sedimentom dati u *tabeli 2.4*.

Tabela 2.2. Granične vrednosti PAH-ova za ocenu statusa i trenda kvaliteta sedimenta

Parametar	Jedinica mere	Ciljna vrednost	Maksimalno dozvoljena koncentracija	Remedijaciona vrednost
Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) ¹	mg/kg	1	10	40
Naftalen	mg/kg	0,001	0,1	
Antracen	mg/kg	0,001	0,1	
Fenantren	mg/kg	0,005	0,5	
Fluoranten	mg/kg	0,03	3	
Benzo(a)antracen	mg/kg	0,003	0,4	
Krizen	mg/kg	0,1	11	
Benzo(k)fluoranten	mg/kg	0,02	2	
Benzo(a)piren	mg/kg	0,003	3	
Benzo(g,h,i)perilen	mg/kg	0,08	8	
Indeno(1,2,3-cd)piren	mg/kg	0,06	6	

¹ parametar se odnosi na sumu sledećih jedinjenja: naftalen, antracen, fenantren, fluoranten, benzo(a)antracen, krizen, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren, benzo(g,h,i)perilen, indeno(1,2,3-cd)piren

Tabela 2.3. Granične vrednosti PAH-ova za ocenu kvaliteta sedimenta pri izmuljivanju sedimenta iz vodotoka

Parametar	Jedinica mere	Ciljna vrednost	Vrednost limita	Verifikacioni nivo	Remedijaciona vrednost
Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) ¹	mg/kg	1	1	10	40

¹ parametar se odnosi na sumu sledećih jedinjenja: naftalen, antracen, fenantren, fluoranten, benzo(a)antracen, krizen, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren, benzo(g,h,i)perilen, indeno(1,2,3-cd)piren

Tabela 2.4. Kriterijumi za ocenu kvaliteta sedimenta i dozvoljeni načini postupanja sa izmuljenim sedimentom

Klasa	Kriterijum	Načini postupanja sa izmuljenim sedimentom
0	\leq ciljna vrednost	Koncentracije zagađujućih materija u sedimentu su na nivou prirodnog fona. Sedimenti mogu biti dislocirani bez posebnih mera zaštite
1	$>$ ciljna vrednost i \leq vrednost limita	Sediment je neznatno zagađen. Prilikom dislokacije dozvoljeno je odlaganje bez posebnih mera zaštite u pojasu širine do 20 m u okolini vodotoka.
2	$>$ vrednost limita i \leq verifikacioni limita	
3	$>$ verifikacioni nivo \leq remedijaciona vrednost	Sediment je zagađen. Nije dozvoljeno njegovo odlaganje bez posebnih mera zaštite. Neophodno je čuvanje u kontrolisanim uslovima uz posebne mere zaštite kako bi se sprečilo rasprostiranje zagađujućih materija u okolinu.
4	$>$ remedijaciona vrednost	Izuzetno zagađeni sedimenti. Obavezna je remedijacija ili čuvanje izmuljenog materijala u kontrolisanim uslovima uz posebne mere zaštite kako bi se sprečilo rasprostiranje zagađujućih materija u okolinu.

2.2.2. Remedijacija sedimenta

Ukoliko se, nakon urađene karakterizacije sedimenta, utvrdi da je sediment zagađen iznad dozvoljenog nivoa pristupa se remedijaciji. Remedijacija sedimenta podrazumeva upotrebu hemijskih, fizičkih ili bioloških tretmana kako bi se smanjila koncentracija polutanata u sedimentu. Ovi procesi podrazumevaju odvajanje, uklanjanje ili prevođenje u netokičan oblik svih polutanata prisutnih u sistemu. Ove tehnike mogu biti odabrane na osnovu (Reis et al., 2007):

- Karakteristika lokaliteta
- Specifičnosti projekta
- Specifičnosti sedimenta

Osnovna podela remedijacionih tehnologija jeste na (Reis et al., 2007):

1. *In-situ* tehnike: bez uklanjanja sedimenta (monitoring prirodnim uklanjanjem, *in situ* tretman sedimenta- tehnička bioremedijacija, izolacija zagađenog sedimenta prekrivanjem)
2. *Ex-situ* tehnike: podrazumevaju vađenje sedimenta, njegov transport, eventualnu obradu i odlaganje

Monitoring prirodnog uklanjanja zagađenja

Monitoring prirodnog uklanjanja (eng. *natural attenuation*) zagađenja podrazumeva uklanjanje zagađenja u toku vremena prirodnim procesima. Prirodno uklanjanje zagađenja može biti posledica destruktivnih (aerobna i anaerobna biodegradacija, abiotička oksidacija, hidroliza) i nedestruktivnih (sorpcija, razblaženje (disperzija i infiltracija), volatilizacija) procesa. Za uklanjanje zagađenja aerobnom i anaerobnom biodegradacijom koriste se i termini prirodna bioremedijacija, pasivna i "spontana" bioremedijacija. Prirodna bioremedijacija se oslanja na prirodne sposobnosti prisutnih mikrobioloških zajednica i primenjuje se kada je prirodni stepen biodegradacije zagađenja brži od stepena migracije zagađenja, odnosno, zagađenje ne sme da se raširi. Ovaj relativni odnos zavisi od tipa i koncentracije zagađenja, mikrobiološke zajednice i karakteristika sedimenta. Parametri na koje treba obratiti pažnju su: tip, količina i distribucija zagađenja, podložnost zagađenja biodegradaciji autohtonim mikroorganizmima, vremenski period migracije mrlje i potencijalni receptori zagađenja. Prednosti ove tehnike su da su aktivnosti svedene na monitoring i institucionalnu kontrolu, ne uništava se vodno telo i manji su troškovi. Nedostaci su da sediment ostaje u vodenom okruženju, proces se odvija sporo (vreme razgradnje težih frakcija je dugo), monitoring je dugotrajan i zahteva institucionalnu kontrolu, ne mogu se uklanjati visoke koncentracije zagađenja, uslovi na lokalitetu mogu biti nepovoljni (pod uticajem je povremenih poplava i slično), može doći do migracije zagađenja, ne može se uvek postići ciljna vrednost koncentracije zagađenja za razumno vreme (Dalmacija i Agbaba, 2008; Reis et al., 2007).

In situ tehnike

In situ tehnike podrazumevaju remedijaciju sedimenta na mestu nastanka zagađenja. Ove tehnike često podrazumevaju dodatak mikroorganizama i nutrijenata i njihovo mešanje sa zagađenim sedimentom. Primarna prednost takvog tretmana jeste da nije potrebno vađenje sedimenta i njegov transport na drugu lokaciju (tabela 2.5). Ove tehnike su takođe jednostavnije i zahtevaju manje finansijsko ulaganje u odnosu na ex situ tehnike, ali mogu biti limitirane faktorom dostupnosti kiseonika, tipom sedimenta, distribucijom kontaminanata i temperaturom (Reis et al., 2007). In situ tretman sedimenta najčešće podrazumeva tehničku bioremedijaciju, koja predstavlja primenu određenih tehničkih mera u cilju stimulacije mikrobiološke degradacije zagađenja. Tehnička bioremedijacija je brža od prirodne, jer se vrši stimulacija mikrobiološke degradacije zagađenja kontrolom koncentracije kiseonika, nutrijenata, pH, temperature i dr. Primenjuje se kada je bitno da se čišćenje izvrši za kratko vreme ili kada se zagađenje veoma brzo širi.

Tabela 2.5. Glavne prednosti i nedostaci *in situ* tretmana (Reis et al., 2007)

<i>Prednosti</i>	<i>Nedostaci</i>
Zahteva relativno niska finansijska ulaganja	Proces se teško kontroliše
Obično rezultuje smanjenom resuspenzijom kontaminiranog sedimenta nego <i>ex situ</i> tehnike	Loši uslovi životne sredine za tretman
Tretira, i ne sadrži kontaminante	Manja efikasnost procesa u odnosu na <i>ex situ</i> tehnike
Smanjuje kontakt i izlaganje kontaminiranom sedimentu	Limitirana iskustva sa <i>in situ</i> tretmanima

Većina bioremedijacionih tehnologija koje su vremenom usavršavane i bile zasnovane na *in situ* bioremedijaciji služile su za uklanjanje naftnih ugljovodonika. Primenjuje se nekoliko tehnika kao što su *in situ* biostimulacija autohtone mikroflore (najčešće se primenjuje; mikroflora može da se izoluje iz sedimenta, razmnožava u bioreaktorima i zasejava u zagađenoj zoni), bioaugmentacija (dodatak adaptirane mikroflore ili genetski modifikovanih mikroorganizama, GMO) i dr. Aeracija sedimenta podrazumeva dodatak oksidanata, nutrijenata i flokulanata da se poboljšaju biohemijsko-fizičke karakteristike sedimenta. To se postiže direktnom injekcijom vazduha ili vode u sediment serijom pumpi, creva i raspršivača. Prednost aerobnog procesa je obrazovanje jedinjenja sa manje mirisa i brži proces degradacije. U praksi se primenjuju plovila koja mogu da aerišu površinu od 1 ha na dan. Tretman je ograničen na dubinu vode od 2-22 m, dok dubina sedimenta koji može da se tretira zavisi od karakteristika sedimenta, dubine zagađenja, snage motora i dr. Mogu da se dodaju oksidanti, jedinjenja koja sporo oslobađaju kiseonik. Ta jedinjenja, u osnovi, predstavljaju zaštićeni oblik magnezijum-peroksida, a njihova primena predstavlja "tehniku postupnog oslobađanja elektron-akceptora". Magnezijum-peroksid je beli nerastvorni prah koji oslobađa kiseonik kada se meša sa vlažnim sedimentom. Može se primeniti i aeracija vodenog sloja, koja podrazumeva pumpanje vazduha ili kiseonika u vodu ili pumpanje vode sa obale kroz sistem za saturaciju vazduhom. Koriste se aeratori vetrenjače, koji unose vazduh kroz površinu vode i teraju ga kroz vodeni stub. U plitkom sistemu to dovodi do ekstremno lokalizovane aeracije sedimenta ispod aeratora sa ograničenim bočnim kretanjem kiseonika. Zato se postavlja veliki broj aeratora jedan blizu drugog (*Dalmacija i Agbaba, 2008 Reis et al., 2007*).

Da bi se procenilo da li je uspostavljena uspešna *in situ* bioremedijacija na lokalitetu potrebno je učiniti sledeće:

- putem rutinskog monitoringa dokazati smanjenje koncentracije zagađenja,
- treba sprovesti laboratorijska merenja koja će pokazati da mikroorganizmi na datom lokalitetu imaju potencijal da transformišu zagađenje pod očekivanim uslovima, i
- treba dokazati da je biodegradacioni potencijal stvarno uspostavljen na lokalitetu.

In situ prekrivanje (eng. in-situ capping)

U nekim oblastima gde je prisutna velika količina zagađenog sedimenta primenjuje se tehnika postavljanja sloja izolacionog materijala (peska) preko sedimenta sa ulogom da zadrži i stabilizuje zagađeni sediment. Uglavnom se za prekrivanje koristi granulirani materijal, kao što je čist sediment, pesak ili šljunak. Kompleksniji sistemi uključuju primenu geotekstila, prekrivača i drugih propusnih ili nepropusnih elemenata u višeslojnom prekrivaču koji mogu da uključe dodatne materijale da bi se smanjio fluks zagađenja. Zavisno od zagađenja i okruženja sedimenta, prekrivač se dizajnira tako da se smanji rizik kroz sledeće primarne funkcije:

- fizička izolacija zagađenog sedimenta dovoljna da smanji mogućnost izlaganja zagađenju direktnim kontaktom i iznošenje zagađenja na površinu od strane organizama koji kopaju po sedimentu;
- stabilizacija zagađenog sedimenta i zaštita od erozije sedimenta i prekrivača dovoljna da smanji resuspenziju i transport na druge lokalitete i/ili
- hemijska izolacija zagađenog sedimenta dovoljna da smanji mogućnost izlaganja rastvorenim i koloidno vezanim zagađenju transportovanim u vodu.

Varijacije tehnike in situ prekrivanja uključuju postavljanje prekrivača posle delimičnog uklanjanja zagađenog sedimenta i inovacione prekrivače, koji uključuju tretman sedimenta. Delimično uklanjanje sedimenta pre prekrivanja se primenjuje kada je potrebno da se očuva minimalna dubina vode neophodna za plovidbu, kontrolu poplava, gde je poželjno da se očuva obala ili stabilnost obale usled uklanjanja. Postavljanje tankog sloja čistog materijala može se koristiti kada brzina prirodne sedimentacije nije dovoljna prilikom ubrzavanja prirodne remedijacije prekopavanjem zagađenog sedimenta i mešanjem sa čistim sedimentom. Postavljanje tankog sloja čistog materijala ponekad se koristi da bi se ponovo napunile izmuljene zone, jer se on meša sa sedimentom zaostalim nakon izmuljivanja zbog smanjenja rizika od zaostalog zagađenja (*Dalmacija i Agbaba, 2008 Reis et al., 2007*).

Ex situ tehnike

Kod ex situ remedijacije ukoliko je zagađena velika količina sedimenta ili kad zagađenje dospe u dublje slojeve sedimenta, nemoguće je izvaditi sav zagađen sediment, tako da dolazi do ograničene primene ex situ tehnike. Ex situ tehnikom se sediment brže očisti, ali narušava pejzaž, zagađenje se iznosi na površinu i mora se izmestiti, što zahteva značajna materijalna sredstva. Ex situ tehnike podrazumevaju sledeće faze: izmuljivanje, obezbojavanje, tretman, transport materijala i odlaganje na deponiju, tako da razlikujemo izmuljivanje sa odlaganjem i izmuljivanje sa tretmanom i odlaganjem (*Dalmacija i Agbaba, 2008; Reis et al., 2007*).

Izmuljivanje i iskopavanje

Najčešće je prvi korak remedijacije toksičnog sedimenta njegovo uklanjanje, vađenje. Izmuljivanje i iskopavanje su dva najčešća načina uklanjanja zagađenog sedimenta. Izmuljivanje podrazumeva mehaničko mešanje sedimenta na dnu da bi nastala suspenzija sedimenta i vode uz istovremeno usisavanje suspenzije cevima u blizini površine sedimenta. Oprema za usisavanje zavisi od dubine vode i sedimenta, karakteristika sedimenta, količine izmuljenog materijala i mesta i metoda odlaganja. Suspenzija može da se transportuje do konačnog mesta odlaganja. Prednost ovog procesa je što dolazi do uklanjanja zagađene mase, tehnologija je proverena i jednostavna za primenu. Nedostaci su mogućnost resuspenzije tj. disperzije finih čestica sedimenta uz mogućnost oslobađanja vezanog zagađenja u okolinu jer se na finim česticama zadržavaju dioksini/furani, PCB, pesticidi, organo-živa i drugi poluisparljivi toksini i metali (prema sprovedenim istraživanjima resuspenzija iznosi < 1% uklonjene mase), zatim, rezidualni sediment (zaostaje količina od 10-25% zapremine izmuljenog sedimenta pri čemu povećanje broja prolaza mehanizacije nije efikasno), uklanjanje bentičkih organizama, moguće smanjenje koncentracije kiseonika u vodi zbog pomeranja anaerobnog sedimenta i nastajanje drugih toksičnih supstanci kao što su vodonik-sulfid i amonijak, troškovi odlaganja su veliki (*Dalmacija i Agbaba, 2008; Reis et al., 2007*). Izmuljivanje i iskopavanje često uključuju tretman vode iz obezvodnjenog sedimenta pre ispuštanja u odgovarajuće vodno telo. Resuspenzija sedimenta nije prisutna prilikom iskopavanja sedimenta, ali postoji opasnost transporta zagađena u atmosferu (*Dalmacija i Agbaba, 2008; Reis et al., 2007*).

Kada je izvodljivo, iskopavanje ima prednost u odnosu na izmuljivanje iz sledećih razloga (*Dalmacija i Agbaba, 2008; Reis et al., 2007*):

- Prilikom iskopavanja radnici mogu mnogo bolje da prate operaciju uklanjanja. Iako u nekim situacijama izmuljivanje može da vrši ronilac ili putem videomonitoringa, ipak se zbog mutnoće, bezbednosti i drugih tehnoloških mogućnosti izmuljivanje obično vrši bez vizuelne pomoći.
- Uklanjanje zagađenog sedimenta je skoro potpuno (zaostalo zagađenje je manje kada je sediment uklonjen posle obezvodnjavanja zone);
- Mnogo manje zagađenja se oslobađa kada se zona iskopavanja obezvodni; i
- Stanje dna (pukotine) i karakteristike sedimenta (veličina čestica i specifična gustina) uobičajeno zahtevaju mnogo manje pažnje .

- *Transport, naknadna manipulacija i obezvodnjavanje*

Nakon uklanjanja sediment se često transportuje do lokacije za obezvodnjavanje (ako je potrebno) i dalje procesuiranje, tretman ili konačno odlaganje. Postoji nekoliko načina transporta, pri čemu treba obavezno voditi računa o zdravlju i bezbednosti radnika na lokalitetu i šire zajednice (*Dalmacija i Agbaba, 2008; Reis et al., 2007*):

- Cevovodi,
- Barže,
- Trakasti transporteri,
- Železnica,
- Kamion/prikolica.

- *Tretman sedimenta*

Za tretman sedimenta se koriste različite tehnike u koje se ubrajaju: fizička separacija sedimenta, solidifikacija i stabilizacija, pranje sedimenta, termička remedijacija, elektrokinetika, bioremedijacija (*Dalmacija i Agbaba, 2008; Reis et al., 2007*).

- *Odlaganje sedimenta*

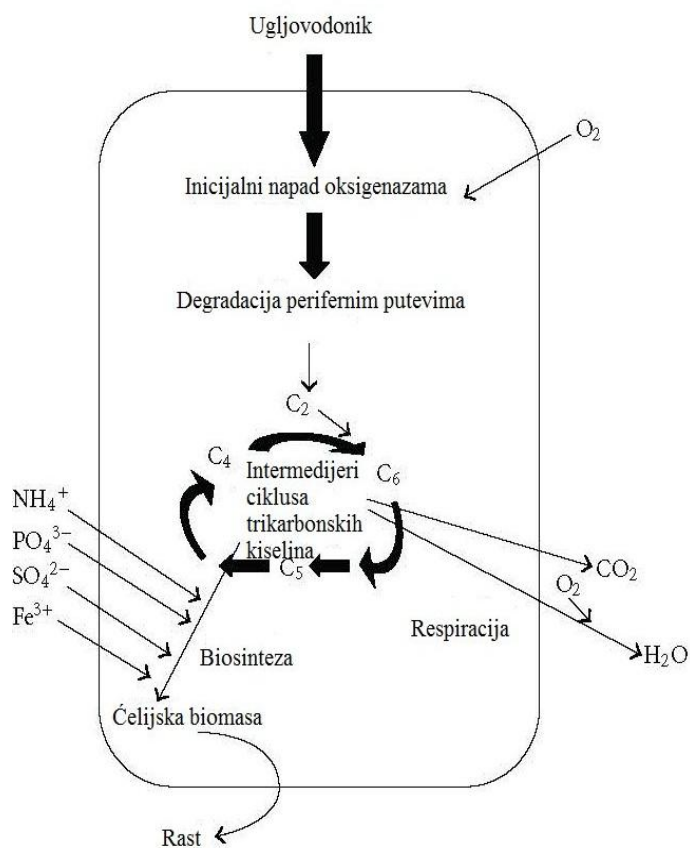
Odlaganje sedimenta podrazumeva smeštanje izmuljenog materijala na odabranu lokaciju uz dodatno obezbeđenje da se zagađenje ne raširi. To je najčešće zona u blizini obale koja može biti konačno mesto odlaganja ili privremena lokacija za čuvanje ili predtretman. Bira se neka depresija, iskopana rupa ili jama. Jedan od preduslova za odlaganje je "bez suvišne vode", odnosno, sediment se prvo mora obezvodniti. Mesto odlaganja ne mora biti konstruisano. Ipak, troškovi mogu biti veliki, pošto mesto odlaganja može biti kilometrima udaljeno od mesta izmuljivanja i cena prekrivanja odloženog materijala može biti velika. Najčešće se sediment transportuje kamionima od mesta predtretmana do mesta odlaganja. Koriste se zaštitne folije za sprečavanje isparavanja i oticanja toksičnih komponenti, očuvanje temperature biološke reakcije, sprečavanje UV degradacije do toksičnih komponenti. Folije mogu biti od različitih materijala – npr. od polietilena, polipropilena (*Dalmacija i Agbaba, 2008; Reis et al., 2007*).

Bioremedijacija

Bioremedijacija je skup postupaka za remedijaciju uz primenu bioloških agenasa. U užem smislu pod bioremedijacijom se smatra remedijacija uz pomoć mikroorganizama, a u širem smislu uz pomoć biljaka (fitoremedijacija) (*Ugrinov i Stojanov, 2010*). Da bi bioremedijacija bila uspešna neophodno je da mikroorganizmi razlagači ugljovodonika nafte budu prisutni na mestu kontaminacije i da enzimskim napadom konvertuju naftnu zagađujuću supstancu do bezopasnih jedinjenja. Ipak, samo prisustvo mikroorganizama nije dovoljno, s obzirom na to da je mikrobiološka razgradnja zavisna od brojnih faktora uključujući različite faktore životne sredine kao, na primer, dostupnost supstrata, nutrijente, elektron donore i akceptore, pH i temperaturu. Bioremedijacija često uključuje manipulaciju faktorima životne sredine, budući da je bioremedijacija uspešna samo kada faktori životne sredine omogućuju rast i aktivnost mikroorganizama. To rezultira rastom mikrobiološke populacije, što dovodi do efikasnije i brže degradacije naftnog zagađenja. Proces stimulisanja rasta mikrobiološke populacije radi degradacije zagađujuće supstance je poznat po imenu biostimulacija. Biostimulacija se može izvesti dodatkom nutrijenata

koji limitiraju rast mikroorganizama, elektron akceptora (pre svega kiseonika) ili čak dodatkom dodatnog izvora ugljenika (na primer melasa) (Vrvić, 2008, Ugrinov i Stojanov, 2010, Marković et al., 1996).

Najbrža i najkompletnija degradacija većine organskih zagađujuće supstance se obavlja pod aerobnim uslovima. Na slici 2.8. prikazan je glavni princip aerobne degradacije ugljovodonika, pri čemu se ugljovodonici koriste za dobijanje energije i za rast mikroorganizama. Nakon inicijalnog napada oksigenazama, organska zagađujuća supstanca se perifernim degradacionim putevima postepeno konvertuje do centralnim intermedijera, na primer, ciklusom trikarbonskih kiselina. Biosinteza ćelijske biomase započinje od centralnih prekursorskih metabolita, na primer acetil-Co-A, sukcinata i piruvata (Fritsche i Hofrichter, 2000).



Slika 2.8. Glavni princip aerobne degradacije ugljovodonika od strane mikroorganizama (Fritsche i Hofrichter, 2000)

Faktori koji utiču na bioremedijaciju. Za uspešnost bioremedijacionog procesa pored poznavanja karakteristika kontaminiranog sedimnta i mikroorganizma sposobnih da razgradi kontaminant kao izvor ugljenika moraju se uzeti u obzir i drugi faktori kao što su lako usvojivi izvor azota i fosfora (hranljive supstance), vlažnost, temperatura, kiseonik (aeracija) i eventualno prisustvo surfaktanata.

Osim toga, važne su i karakteristike sedimenta kao što je pH, mineraloški sastav i sadržaj organske supstance (Vrvić, 2008).

Hranljive supstance. Zagađujuća supstanca predstavlja izvor ugljenika za mikroorganizme, pa je kontaminirani sediment uglavnom siromašno u azotu i fosforu. Dodatak ovih sastojaka dovodi do povećanog rasta mikroorganizama i ubrzava proces degradacije kontaminanta (Khan et al., 2004; Boopathy, 2000; Aleksander, 1999). Dodatak hranljivih supstanci se označava kao biostimulacija, a može se koristiti mineralno đubrivo ili đubrivo organskog porekla (stajsko đubrivo, aktivni mulj) (Das i Chandran, 2011).

Vlažnost. Optimalna vlažnost sedimenta za proces bioremedijacije je 12-30%, ili 40-80% saturacionog kapaciteta. Nedovoljna vlažnost ograničava i smanjuje rast mikroorganizama, dok prevelika vlažnost smanjuje aeraciju (Rittman i McCarty, 2000).

Temperatura. Temperatura utiče na mikrobni rast, sastav mikrobnih zajednica i brzinu degradacije polutanata. Osim toga, od temperature zavisi i viskozitet, rastvorljivost, fizička priroda i hemijski sastav kontaminanata (Boopathy, 2000; Aleksander, 1999). Biodegradacija ugljovodonika se može odvijati u širokom opsegu temperatura. Izolovani su psihrofilni (Aislabie et al., 2006) mezofilni i termofilni (Obuekwe et al., 2001) mikroorganizmi koji koriste PAH-ove kao jedini izvor elektrona i ugljenika.

Aeracija. Degradacija PAH-ova se najbrže i najkompletnije ostvaruje pod aerobnim uslovima. Dostupnost kiseonika zavisi od intenziteta ukupne mikrobiološke potrošnje i tipa sedimenta. Za povišenje koncentracije kiseonika u kontaminiranoj sredini se koriste brojne metode poput prevrtanja, prinudne aeracije, mehaničkog mešanja, bioventilacije, uvođenja vazduha i dodatkom alternativnih izvora kiseonika poput vodonik-peroksida ili najčešće magnezijum-peroksida (Obuekwe et al., 2001).

pH. pH zemljišta određuje tip mikroorganizama koji je na raspolaganju za biodegradaciju. Većini bakterija odgovara neutralni pH, a gljivama slabo kisela sredina. Obično je optimalno pH za bioremedijaciju u granicama od 6 do 8 (Aleksander, 1999; Rittman i McCarty, 2000).

Surfaktanti. Surfaktanti su jedinjenja koja smanjuju površinski napon vode i povećavaju rastvorljivost hidrofobnih supstanci u vodi. Ugljovodonicima se vezuju za čestice sedimenta, pa surfaktanti u porama pomažu proces desorpcije nepolarnih jedinjenja sa čestica sedimenta, čime se povećava njihova biosvojivost. Mogu se koristiti surfaktanti hemijskog i biološkog porekla (Mulligan et al., 2001; Mulligan 2005). Hemijski surfaktanti koji se upotrebljavaju u bioremedijaciji treba da budu biodegradabilni i da ne inhibiraju rast mikroorganizama. Neki mikroorganizmi sintetišu biosurfaktante glikolipide kao što su ramnolipidi kod sojeva *Pseudomonas aeruginosa* ili trehalolipidi kod roda *Rhodococcus*, lipopeptide kao što je surfaktin kod sojeva *Bacillus subtilis*, polimere kao što je emulzan kod bakterije *Acinetobacter calcoaceticus* (Singh et al, 2007). Iako je potvrđeno da se biosurfaktanti grade i u zemljištu, uglavnom se smatra da se *in situ* pri bioremedijaciji ne postiže efektivna koncentracija surfaktanta. Kao alternativa postoji i proces gde se

ramnolipidi proizvode u odvojenom postupku, a onda dodaju na postrojenje za bioremedijaciju.

Ograničavajući faktori bioremedijacije. Postoji niz faktora koji ometaju uspešno uspostavljanje procesa bioremedijacije na zagađenom lokalitetu. Zagađenje može biti “nevidljivo” za mikroorganizme ako je suviše niska koncentracija zagađenja, ako je zagađenje u nevodenoj fazi (u rastvoru koji se ne meša lako sa vodom i zato putuje odvojeno od podzemne vode kroz zemlju), ako je adsorbovano za površinu sedimenta ili u porama tako malim da ih voda cirkulacijom teško ispira. U takvim slučajevima treba dodati hemijske agense koji će mobilisati zagađenje. Organsko zagađenje može biti pokrenuto dodavanjem surfaktanata. Male količine surfaktanata smanjuju površinski napon i zagađenje prelazi u vodenu fazu. Kada se primenjuju velike količine surfaktanata dolazi do spajanja molekula surfaktanata u koloide uz građenje micela. Organsko zagađenje rastvara se u micelama i transportuje se sa vodom u njima, tako da nema pravog povećanja koncentracije u vodenoj fazi i biodegradacija nije povećana. U nekim slučajevima bakterije proizvode sopstvene surfaktante. Zagađenje može biti toksično za mikroorganizme. Neka toksična jedinjenja mogu biti razgradiva u malim koncentracijama, ali u velikim koncentracijama u vodenoj fazi mogu da uništavaju mikroorganizme. Mikroorganizmi preferiraju lako razgradiva jedinjenja ili ona jedinjenja koja daju najviše energije. Prirodna jedinjenja mogu da ometaju proces biodegradacije zagađenja zbog selektivne razgradnje, a mogu i da pomažu ukoliko podstiču razvoj mikroorganizama pa time omogućuje razgradnju i onih jedinjenja koja su zbog niske koncentracije “nevidljiva” za mikroorganizme. Parcijalnom razgradnjom zagađenja mogu nastati nusproizvodi toksičniji od zagađenja. Može se desiti da je nemoguće ukloniti zagađenje do niskih koncentracija, iako su uslovi za biodegradaciju dobri, jer jednostavno može biti favorizovana neka druga reakcija. Usled mikrobiološkog rasta može doći do akumulacije mikroorganizama blizu bunara i može doći do začepjenja akvifera, što izaziva smanjenje efikasne cirkulacije rastvora nutrijenata. Protozoe mogu da uklone začepljenje jer se hrane mikro-organizmima. Primenjuju se dve tehnike da se spreči začepljenje: dodaju se nutrijenti i supstrat u porcijama tako da nema nagomilavanja blizu mesta injektiranja i dodaje se vodonik-peroksid kao izvor kiseonika i jak dezinficijens (razgrađuje se do kiseonika i vode) (Ugrinov i Stojanov, 2010).

Fitoremedijacija

Često je veoma teško stvoriti dovoljno mikrobne populacije u prirodnom zemljištu ili sedimentu koje bi imale značajni PAH-degradirajući kapacitet. Upotreba viših biljaka u procesima bioremedijacije mogla bi značajno da pomogne i donese prednosti koje se ogledaju u sledećem (Alagia et al., 2013a; Venkata Mohan et al., 2006; Cunningham i Ow, 1996; Schnoor et al., 1995):

- biljke poboljšavaju strukturu matriksa u kom su zasađene, a time i aeraciju i hidrološke aspekte koji mogu da budu ograničenje kod biodegradacije;
- pojedine biljke luče oksidativne enzime koji doprinose degradaciji PAH-ova,
- biljke fizički translociraju PAH-ove u svoje tkivo, a zatim ih mogu dalje biotransformisati,
- korenje biljaka obezbeđuje lako razgradiv ugljenik, energiju koja generalno povećava mikrobnu aktivnost, što može dovesti do poboljšane degradacije PAHs kroz direktni metabolizam, ili ko-metabolizam

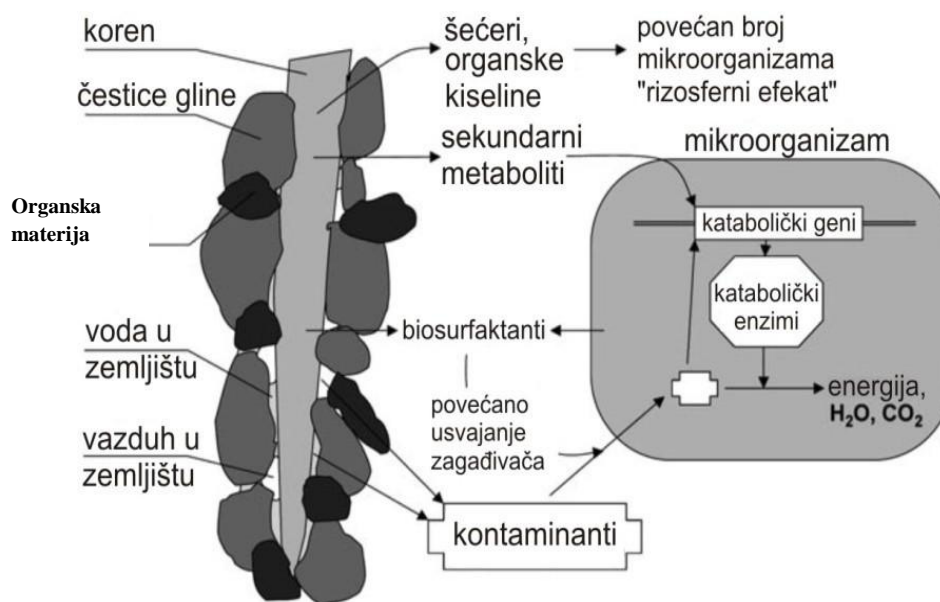
Praktično, može se reći da je u postupku fitoremedijacije PAHs, iskorišćena sposobnost biljaka da se adaptiraju na stresne uslove, tj. uslove visokih koncentracija PAHs u okruženju, koja im omogućava da žive i napreduju u takvim uslovima. Kao i u slučaju ostalih organskih polutanata, mehanizmi fitoremedijacije PAH-ova mogu obuhvatiti (*Alagia et al., 2013b; Schnoor et al., 1995, Reichenauer i Germida, 2008; Macek et al., 2000*):

- fitoekstrakciju/fitoakumulaciju (usvajanje polutanata biljnim korenjem i translokacija/akumulacija u nadzemnim izdancima i listovima),
- fitodegradaciju (biotransformacija polutanata unutar biljnih tkiva),
- fitovolatilizaciju (transport zagađujućih materija u vazduh preko toka transpiracije), fitostabilizaciju (proizvodnja hemijskih jedinjenja da bi se polutanati imobilisali na površini korena i zemljištu),
- poboljšanu rizosfernu biodegradaciju/rizoremedijaciju (degradacija neposredno oko korena biljke) i u manjoj meri
- hidrauličnu kontrolu (korišćenja drveća da prihvati i ispari velike količine podzemne, ili površinske vode radi kontrole zagađujućih materija)

Radovi brojnih istraživača ukazali su da korenje biljaka apsorbuje PAH-ove iz zemljišta ili sedimenta direktno, ali da su njihove koncentracije u biljkama mnogo manje nego one koje se nalaze u samom matriksu na kome biljke rastu, sa faktorima akumulacije manjim od jedinice. Biokoncentracioni faktori (BCFs) opisuju tendenciju bioakumulacije individualnih jedinjenja u pojedinim biljnim organima i ovi faktori se za PAH-ove obično kreću od 0,001 do 0,4, mada u slučajevima zasićenja, mogu dostići i veće vrednosti, čak do 2 (*Reichenauer i Germida, 2008; Kipopoulou, 1999; Sojinu, 2010; Tao, 2006*). Iako akumulacija ovih opasnih polutanata u biljnim tkivima nije značajna, potvrđeno je da PAH-ovi, kao i svi ostali POPs, podležu procesima detoksifikacije u biljnoj ćeliji i to u skladu sa konceptom "zelene jetre". Naime, metabolizam ksenobiotika u biljkama upoređuje se sa onim koji se odvija u jetri sisara kroz tri faze: transformacija (faza I), konjugacija (faza II) i ekskrecija (faza III), s tom razlikom da kod biljaka ne postoji mehanizam potpuno analogan fazi eliminacije kod sisara. Praktično, organski polutanti koji prodru u biljnu ćeliju, bivaju podvrgnuti transformacijama enzimatskog tipa, pri kojima

poprimaju forme koje su manje toksične (Alagia *et al.*, 2013a,b; Reichenauer i Germida, 2008; Campos, 2008; Singh, 2003).

Kako PAH jedinjenja imaju izrazito složenu molekulsku građu, njihova potpuna degradacija do CO₂ i H₂O u samoj biljci, nažalost nije moguća, što su dosadašnja istraživanja i potvrdila (Reichenauer i Germida, 2008). Ova činjenica, kao i nizak nivo akumulacije u biljnim tkivima, mogli bi da, na prvi pogled, učine biljke nedovoljno podesnim za fitoremedijaciju dizajniranu na klasičan način: apsorpcija korenom translokacija u nadzemne delove žetva odlaganje, spaljivanje. Međutim, eksperimenti brojnih istraživača su pokazali da mnoge biljne vrste, pre svega iz porodica trava (*Poaceae*) i leguminoza (*Fabaceae*), imaju sposobnost da uklone ove opasne kontaminante iz podloge u značajnom stepenu. Pokazalo se da glavnu ulogu u fitoremedijaciji PAH-ova igraju procesi rizoremedijacije, jer degradacija primarno postoji u oblasti rizosfere gde visoke koncentracije mikrobnih populacija koriste PAH-ove kao ugljenične supstrate za rast i razvoj, što sve rezultuje razaranjem i eventualno, potpunom mineralizacijom kontaminanata. Ovaj proces uobičajeno je poboljšan izlučivanjem ekskudata korenja (šećeri, alkoholi, kiseline, enzimi) i ugradnjom organskog ugljenika u podlogu (slika 2.9.) (Reichenauer i Germida, 2008, Alagia *et al.*, 2013; Campos, 2008; Singh, 2003; Gianfreda i Rao, 2004; Chekol, 2005). Rizodegradacijom se, dodatno, izbegavaju faze remedijacije kao što su žetva i odlaganje, ili uništavanje kontaminiranog biljnog materijala.

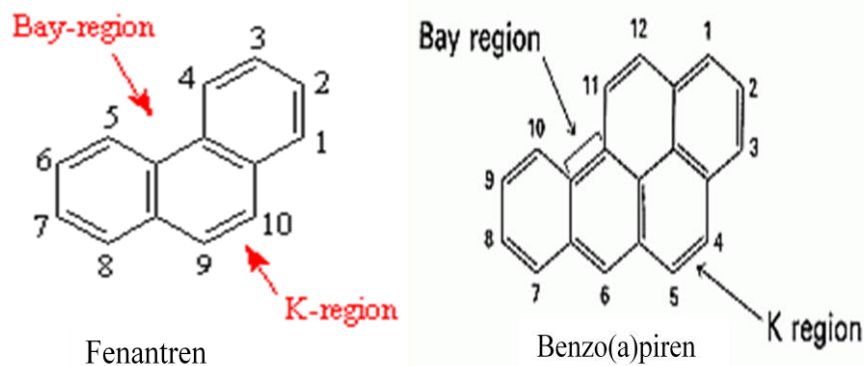


Slika 2.9. Sinergističko delovanje biljaka i mikroorganizama u zoni rizosfere (Reichenauer i Germida, 2008)

2.3. Mehanizam bakterijske razgradnje i transformacije odabranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika

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

Policiklični aromatični ugljovodonici su grupa jedinjenja koja sadrže ugljenik i vodonik, povezan u obliku dva ili više spojenih aromatičnih prstenova uređenih linearno ili pod uglom. Mnogi PAH sadrže “bay”-region i “K”-region. “Bay”-region i “K”-region epoksidi, koji se mogu formirati metabolički, su visoko reaktivni kako u hemijskom tako i u biološkom pogledu. Fenantren je najprostiji aromatični ugljovodonik koji sadrži ove regione. “Bay”-region fenantrena je sterno sakriveno područje između ugljenikovih atoma 4 i 5, a “K”-region se nalazi između 9 i 10 ugljenkovog atoma koji su povezani dvostrukom vezom, koja ima najizraženije aromatične oleinske osobine sa visokom gustinom elektrona (*slika 2.10.*). Prema Schmidt-Pullman elektronskoj teoriji, “K”-region epoksidi trebalo bi da budu više kancerogeni od njihovih prekursora. PAH male molekulske težine (sa dva ili tri prstena) su relativno volatilni, rastvorni i degradabilniji od PAH sa velikom molekulskom masom. Visokomolekularni PAH (četiri ili više prstenova) jako se sorbuju na zemljištu ili sedimentu i rezistentniji su na mikrobiološku degradaciju.

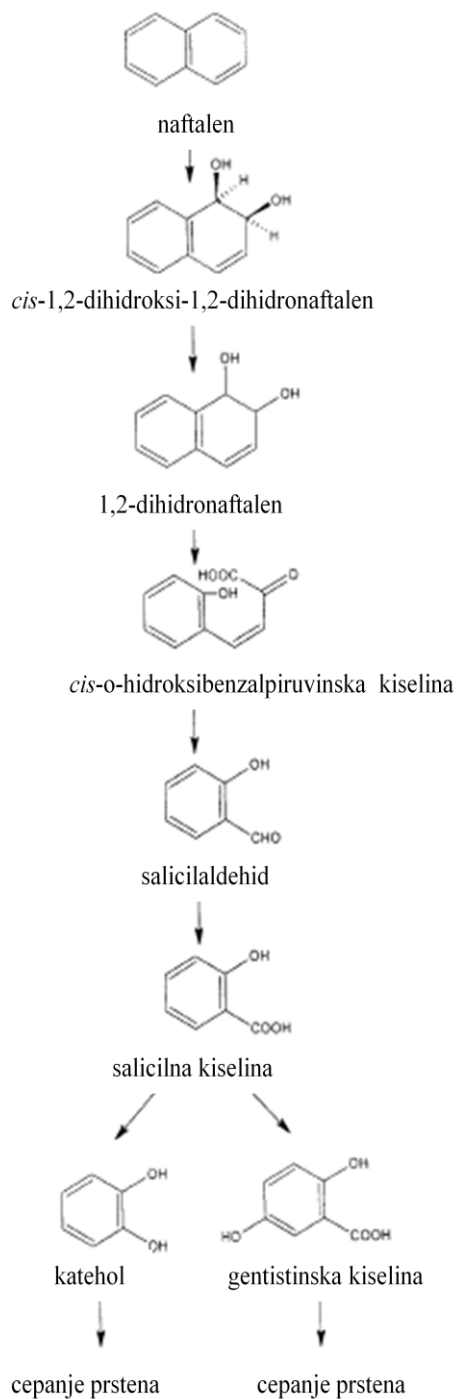


Slika 2.10. Bay i K region kod fenantrena i benzo(a)pirena

Naftalen. Biodegradacija naftalena je najtačnije utvrđena, sobzirom da je naftalen najjednostavniji i najrastvorljiviji policiklični aromatični ugljovodonik, i naftalen degradirajući mikroorganizmi su najlakši za izolovanje. Bakterijski sojevi sposobni da razgrade ugljovodonike su obično gram negativne bakterije, uglavnom roda *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Rhodococcus*, and *Bacillus* (Cerniglia, 1984;

Smith, 1994, Annweiler et al., 2000). Prve reakcije koje vode degradaciji naftalena opisane su od strane *Davies i Evans (1964)*. Kasnije studije su pokazale da bakterije inicijalno oksiduju naftalen do cis-1,2-dihidroksi-1,2-dihidronaftalena. Naftalen deoksigenaze iz *Pseudomonas sp. NCIB 9816* i *Pseudomonas putida ATCC 17 484* se ponašaju kao multikomponentni enzimski sistemi koji su odgovorni za naftalen cis-dihidroksidiol formiranje tj formiranje cis-1,2-dihidroksi-1,2-dihidronaftalena kao dominantne forme metabolita (*Cerniglia, 1984; Jeffrey et al., 1975*). Drugi korak je bakterijska oksidacija i konverzija cis-1,2-dihidroksi-1,2-dihidronaftalena do 1,2-dihidroksinaftalena. Reakcija je katalizovana naftalen(+)-cis-dihidroksidiol dehidrogenazama i potreban je NAD⁺ (oksidovana forma nikotinamid adenin dinukleotida) kao elektron akceptor. Upotrebom *Pseudomonas sp.* Sledeći korak vodi enzimskom cepanju 1,2-dihidroksinaftalena do cis-2-hidroksibenzalpiruvata, koji se zatim serijom dioksigenaza prevodi do salicilata i piruvata. Salicilat se oksiduje dalje do katehola, koji dalje podleže orto ili meta fiziji u zavisnosti od bakterijskog metabolizma (*Dagley i Gibson, 1965; Dagley, 1971*). Predložen put mikrobiološke degradacije upotrebom mikroorganizama iz roda *Pseudomonas* dat je na slici 11. Sličan put degradacije dobijen je i uporebom roda *Aeromonas sp* (*Kiyohara i Nagao, 1978*). Drugačiji metabolizam salicilata je primećen u studijama sa *Pseudomonas testosterone*. Ovi mikroorganizmi prevode salicilat u gentizinsku kiselinu (slika 2.11.).

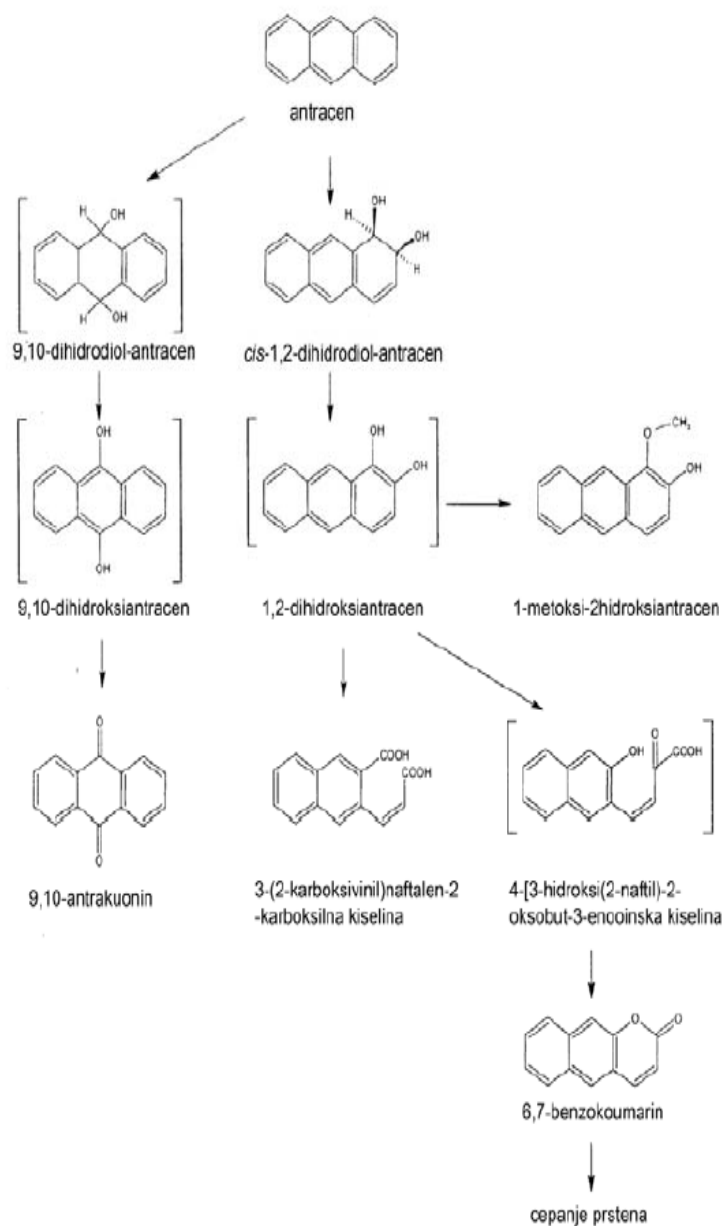
Fluoren. Studije novijeg datuma su pokazale da tokom transformacije ili biodegradacije fluorena, nastaje više različitih intermedijera. Degradacijom fluorena sa *Pseudomonas*-om nastaje šest glavnih metabolita, pet od njih je identifikovano: 9-fluorenol; 9-fluorenon; 1,1-dihidroksi-1-hidro-9-fluorenol;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



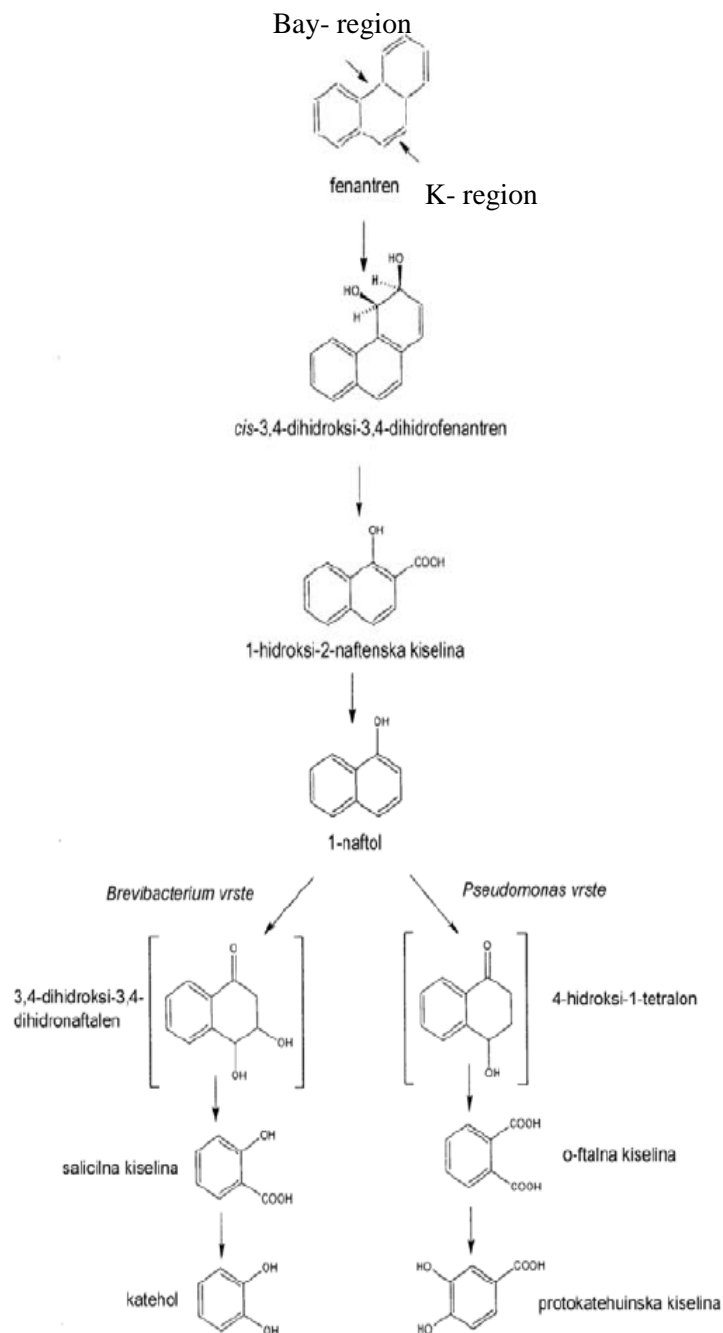
Slika 2.11. Predložen put za oksidaciju naftalena rodom *Pseudomonas* (Cerniglia, 1984; Gibson i Subramanian, 1984; Mrozik et al., 2000)

Antracen i fenantren. Ovi triciklični aromatični ugljovodonici su široko rasprostranjeni u životnoj sredini. Oni se koriste kao model supstrati za ispitivanje degradacije PAH u životnoj sredini, s obzirom da obe strukture i njihovi derivati (kao što su benzo[a]antracen i benzo[a]piren) spadaju u grupu kancerogenih jedinjenja. Antracen se može kompletno mineralizovati sa bakterijama *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Beijerinckia*, *Rhodococcus* i *Mycobacterium* pri čemu je inicijalni oksigenovani intermedijer dihidrol (Morzik et al., 2003). Većina ovih bakterija oksiduju antracen u 1,2 poziciji pri čemu se formira *cis*-1,2-dihidroksi-1,2-dihidroantracen, a zatim se NAD⁺-zavisnim dihidrodiol dehidrogenazama konvertuje u 1,2-dihidroksi-antracen. U sledećem koraku bakterije oksiduju 1,2-dihidroksiantracen pri čemu dolazi do cepanja prstena i nastanka *cis*-4-(2-hidroksi-3-naftil)-okso-butanonska kiselina, nakon čega dolazi do njene konverzije u 2-naftoinsku kiselinu. Produkti cepanja prstena se metabolišu do salicilata i katehola preko 2,3-dihidroksinaftalena. Katehol se degradira do jednostavnog alifatičnog jedinjenja na sličan način kao kod naftalena (Cerniglia, 1984; Morzik et al., 2003). Većina *Mycobacterium* vrsta metabolizuje antracen na različitim mestima u molekulu, najverovatnije putem „napada“ dioksisgenaze i monooksigenaze na aromatični nukleus. Rezultujući antracen *cis*-1,2-dihidrodiol se dehidrogenuje do 1,2-dihidroksiantracena. Akumulacija 1-metoksi-2-hidroksiantracena daje dodatni dokaz o deoksisgenaciji antracena. Predloženi put degradacije antracena sa *Mycobacterium* je prikazan na slici 2.12.

Bakterije roda *Pseudomonas* inicijalno oksiduju fenantren u 1,2 i 3,4 poziciji pri čemu se formira *cis*-1,2-dihidroksi-1,2-dihidrofenantren ili *cis*-3,4-dihidroksi-3,4-dihidrofenantren. Fenantren-*cis*-3,4-dihidrodiol je predominantni izomer koji se konvertuje do 3,4-dihidroksifenantrena. Produkti cepanja prstena se dalje metabolišu do 1-hidroksi-2-naftoinske kiseline, koja se zatim dekarboksiluje do 1,2-dihidroksinaftalena, a zatim sledi *meta* cepanje prstena i formiranje salicilne kiseline (Jerina et al., 1976, Morzik et al., 2003). Salicilna kiselina se dalje može degradirati pri čemu mogu nastati ili katehol ili gentistinska kiselina. I katehol i gentistinska kiselina podležu cepanju pri čemu se formiraju intermedijeri ciklusa trikarboksilnih kiseline (Houghton i Shanley, 1994). Novi intermedijer, 1-naftol je detektovan prilikom biodegradacije fenantrena bakterijama roda *Brevibacterium* koje degradiraju fenantren preko 1-hidroksi-2-naftoinske kiseline i salicilne kiseline, i *Pseudomonas* koji degradiraju fenantren formiranjem 1-hidroksi-2-naftoinske kiseline, 1-naftola i *o*-ftalne kiseline (slika 2.13).



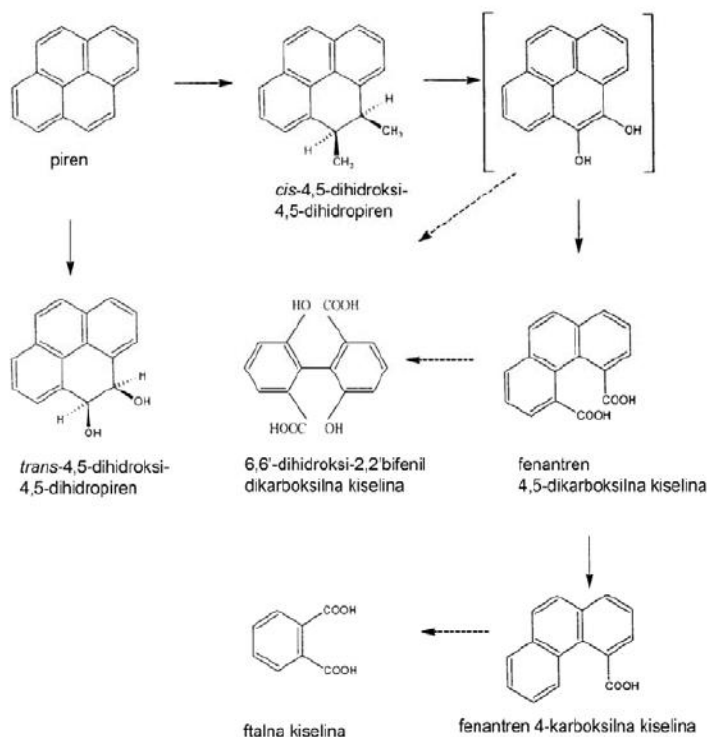
Slika 2.12. Predloženi put degradacije antracena sa *Mycobacterium* (Mrozik et al., 2000)



Slika 2.13. Predloženi put metabolizma fenantrena bakterijama roda *Brevibacterium* i *Pseudeomonas* (Mrozik et al., 2000)

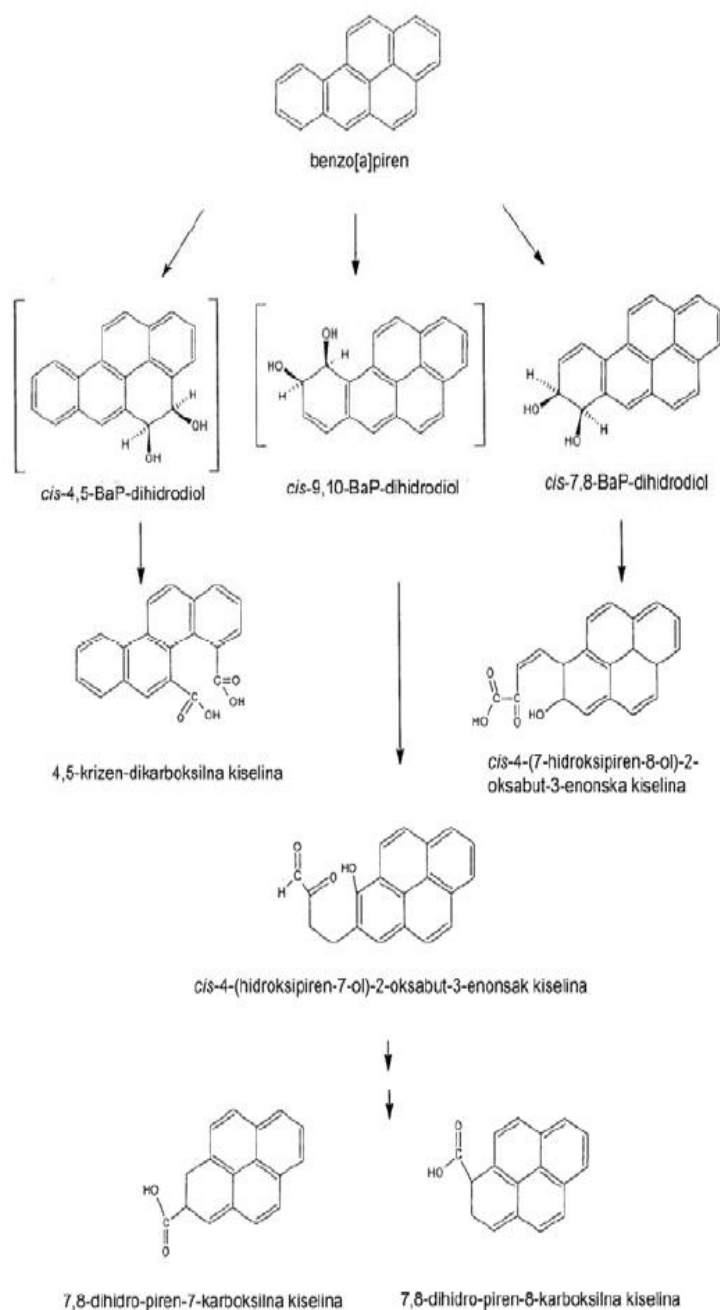
Piren i *benzo[a]piren*. *Mycobacterium* je bakterija za koju je pokazano da može da degradira piren i benzo[a]piren. Sedam metabolite metabolizma pirena je identifikovano (Morzik et al., 2003). Tri produkta oksidacije prstena, *cis*-4,5-pirendihidrodiol i *trans*-4,5-pirendihidrodiol i pirenol; kao i četiri produkta cepanja prstena 4-hidroksiperinafetenon; 4-fenantroinska kiselina;

ftalna kiselina i cinaminska kiselina. 4-fenantroinska kiselina je glavni produkt metabolizma pirena. Detekcija *cis* i *trans*-4,5-dihidrodiola ukazuje na različite inicijalne puteve oksidativnog “napada” na piren. *Mycobacterium* vrste su takođe sposobne da formiraju i neke nove metabolite kao što su 6,6-dihidroksi-2,2-bifenil dikarboksilna kiselina, što predstavlja novi put degradacije pirena koji uključuje cepanje oba centralna prstena (Vila *et al.*, 2001). Šematski prikaz puta predloženog za degradaciju pirena sa *Mycobacterium* je prikazan na slici 2.14.



Slika 2.14. Predloženi put metabolizma pirena (Mrozik *et al.*, 2000)

Mycobacterium ne mineralizuje samo piren već takođe može da mineralizuje i benzo[a]piren. Analiza degradacionih produkata pokazuje da se benzo[a]piren transformiše dioksidacijom na 4,5-, 7,8- i 9,10- poziciji. Predominantno se formira krizen-4,5-dikarboksilat cepanjem intradiola 4,5-dihidroksi[a]pirena, dok 7,8- i 9,10-dihidrodioli podležu ekstradiolnom cepanju do dihidropiren karboksilata (Mrozik *et al.*, 2003). Šematski prikaz puta predloženog za degradaciju benzo[a]pirena sa *Mycobacterium* je prikazan na slici 2.15.



Slika 2.15. Šematski prikaz puta predloženog za degradaciju benzo[a]pirena sa *Mycobacterium* (Mrozik et al., 2000)

Fluoranten. Fluoranten se uglavnom razgrađuje bakterijama roda *Mycobacterium* i *Alcaligenes*. Degradacija upotrebom *Mycobacterium* sp. (PYR-1) uključuje diokigenaciju na pozicijama 1,2- i 7,8-, nakon čega nastaje fluoren-9-on ili acenaften-7-on. Sojem *Alcaligenes denitrificatians* oksidacijom dobija se 3-hidroksimetil-3,4-dihidrobenzokumarin (Mrozik et al., 2000).

Drugim sojevima *Mycobacterium sp.*(KR20) najmanje sedam metabolita se proizvodi tokom metabolizma fluorantena, od kojih je 5 identifikovano upotrebom NMR ili MS spektroskopije (cis-2,3-fluoranten dihidrodiol, 9-karboksimetilen-fluoren-1-karboksilna kiselina, cis-1,9-dihidroksi-1-hidrofluoren-9-on-8-karboksilna kiselina, 4-hidroksibenzokromen-6-on-7-karboksilna kiselina i benzen-1,2,3-trikarboksilna kiselina (Mrozik *et al.*, 2000).

2.4. Biodostupnost

Biodostupnost se može definisati i kao efekat fizičko-hemijskih i mikrobioloških faktora na brzinu i opseg biodegradacije i smatra se jednim od najznačajnijih faktora bioremedijacije. Termin „biodostupnost“ odnosi se na frakciju hemikalija u zemljištu koja se može usvojiti ili transformisati živim organizmima. Dva važna faktora određuju količinu hemikalija koja je biodostupna:

1. brzina transfera posmatranog jedinjenja do žive ćelije (transfer mase) i
2. brzina usvajanja i metabolizam (intristička aktivnost ćelija).

Definicija biodostupnosti može se na više načina objasniti (*slika 2.16*):

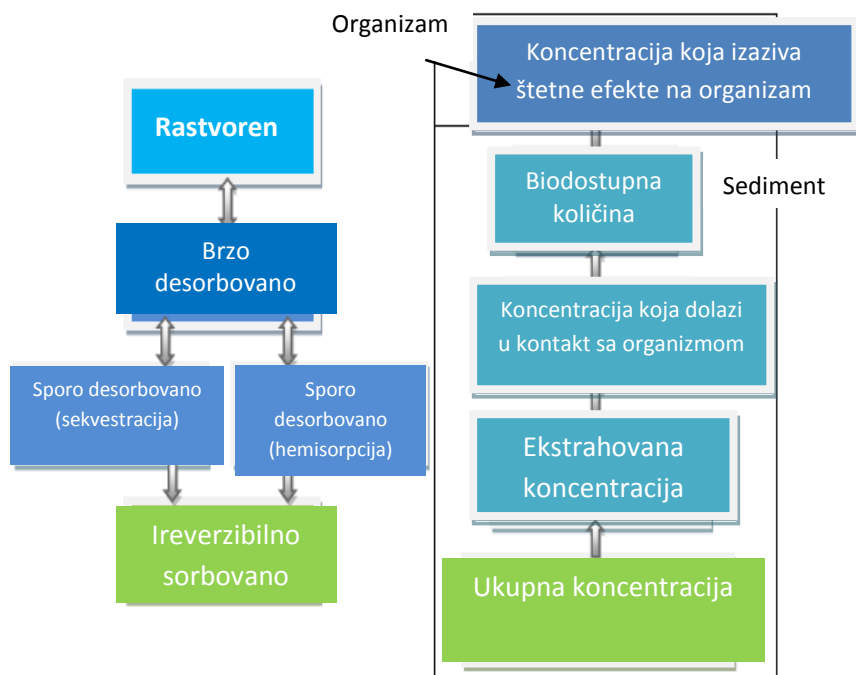
- Biodostupnost predstavlja dostupnost jedinjenja za asimilaciju i moguću toksičnost (Alexander, 2000).
- Termin biodostupnost označava dostupnost za prolaz kroz ćelijsku membranu i prodor u ćeliju (Alexander, 2000).
- Biodostupnost predstavlja složeni interaktivni efekat mnogobrojnih fizičko-hemijskih faktora na brzinu i domašaj bioremedijacije (Mueller *i sar.*, 1996).
- Biodostupna frakcija polutanta je frakcija koja se može desorbovati ili razgraditi za određeno vreme (Bonten *i sar.*, 1999).
- Biodostupnost opisuje fenomen zavisnosti bioremedijacije zemljišta zagađenih hidrofobnim jedinjenjima od brzine i stepena desorpcije sa čvrstog matriksa (Mihelčić *i sar.*, 1993).
- Biodostupnost jedinjenja je određena odnosom brzine prenosa mase i unutrašnje aktivnosti ćelija mikroorganizama. Smanjena biodostupnost polutanata u zemljištu prouzrokovana je sporim prenosom mase do mikroorganizama (Bosma *i sar.*, 1997).

Pojam biodostupnosti se, može definisati sa dva stanovišta:

1. kao stvarna biodostupnost, sa ekotoksikološkog stanovišta i
2. kao potencijalna biodostupnost, sa stanovišta bioremedijacije.

Biodostupnost (stvarna, ekotoksična) predstavlja dostupnost supstanci za ispoljavanje potencijalne toksičnosti. Biodostupna frakcija supstance je frakcija u zemljištu/sedimentu i vodi koja potencijalno može biti apsorbovana od strane organizma za vreme njegovog životnog ciklusa. Kontaminant ima

ograničenu biodostupnost kada je apsorpcija od strane organizma limitirana fizičko-hemijskom barijerom između polutanta i mikroorganizama. Procesi koji određuju biodostupnost se definišu kao pojedinačne fizičke, hemijske i biološke interakcije koje određuju stepen izloženosti biljnih i životinjskih organizama supstancama vezanim za čvrste čestice zemljišta/sedimenta.



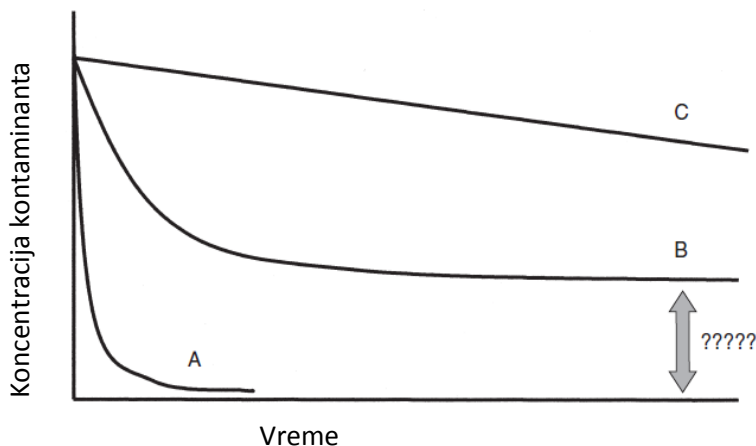
Slika 2.16. Ilustracija nekoliko sorpcionih procesa između hemijskih kontaminanata i sedimenta (leva slika) i relativne koncentracije kontaminanata u sedimentu (Bielská, 2013)

Biodostupnost (potencijalna, biodegradabilna) predstavlja interaktivni efekat brojnih fizičko-hemijskih faktora na brzinu i domašaj bioremedijacije. Biodostupnost opisuje pojavu zavisnosti bioremedijacije zemljišta/sedimenta zagađenog hidrofobnim organskim jedinjenjima od brzine njihove desorpcije sa čestica sedimenta.

Sudbina i ponašanje organskih kontaminanata u sediment kontrolisano je sa nekoliko faktora, uključujući tip sedimenta (sadržaj gline i organske materije) i fizičko-hemijskih karakteristika jedinjenja (rastvorljivosti u vodi, polarnosti, lipofilnosti, hidrofobnosti i molekulske strukture) (Reid *et al.*, 2000a, b).

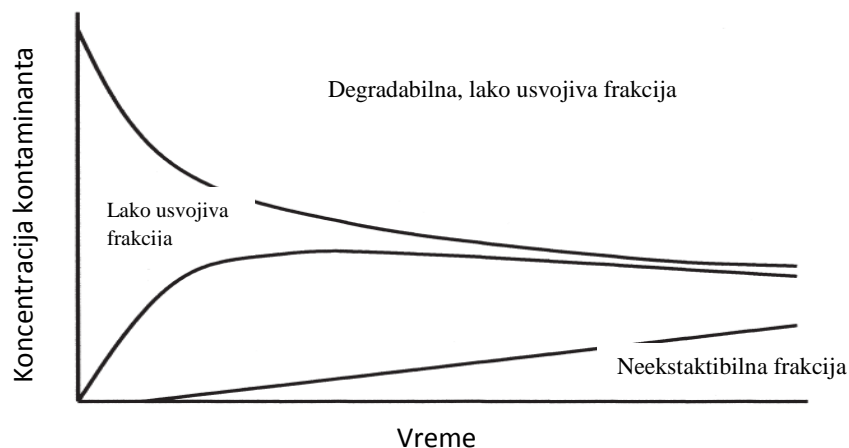
Kontaminanti se mogu iz sedimenta ukloniti različitom brzinom. Na slici 2.17. je dat prikaz teorijskih kriva za tri različite klase kontaminanata. Jedinjenja A reprezentuju kontaminante rastvorne u vodi, lako mobilne i biodegradabilne; B predstavlja kontaminante bifaznog ponašanja, gde jasno dolazi do gubitka, međutim kako kontaktno vreme raste između sedimenta i

kontaminantam, smanjuje se i gubitak komponente; i C predstavlja visoko rezistentne komponente. Strelica ispod krive B predstavlja potrebu za karakterizacijom procesa retardacije gubitka komponente iz sedimenta.



Slika 2.17. Teorijske krive gubitka tri klase kontaminanata (Semple et al., 2003)

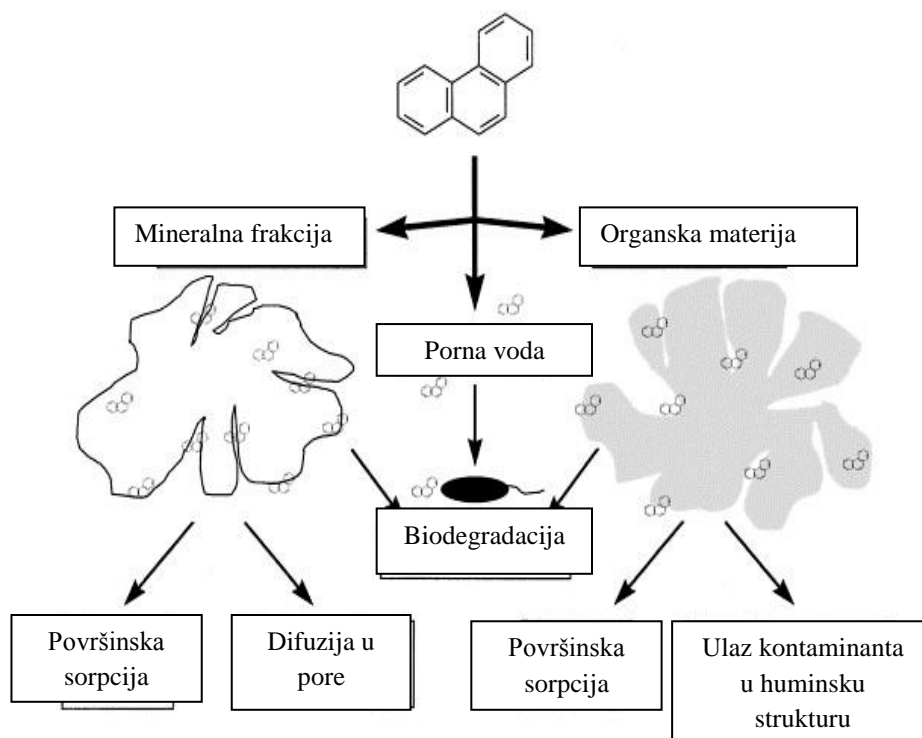
Fizičko-hemijski proces kontrolisan je potencijalom komponente da se sorbuje na čvrstu fazu. Glavni mehanizmi starenja su sorpcija i difuzija (sekvestracija), koje predstavljaju interakciju između kontaminanata i čvrste frakcije u sedimentu, uglavnom mineralne i organske frakcije. Slika 2.18. predstavlja prikaz uticaja kontaktnog vremena na ekstrakciju i biodostupnost ispitivanog kontaminanta. Studije su pokazale da je starenje uslovljeno prisustvom i prirodom organske materije sedimenta, neorganskim konstituentima, mikrobnom aktivnošću i koncentracijom kontaminanata (Hatzinger i Alexander, 1995; Piatt i Brusseau, 1998; Ball i Roberts, 1991a, b; Mader et al., 1997; Nam i Alexander, 1998; Guthrie i Pfaender, 1998; Divincenzo i Sparks, 1997). Organski kontaminanti generalno prolaze kroz dve kinetičke faze u sedimentu. Inicijalno, deo kontaminanta može biti sorbovan brzo (reda veličine minuta ili nekoliko sati), dok se preostala frakcija sorbuje znatno sporije tokom nedelja ili meseci (Xing i Pignatello, 1997). Inicijalna, brza sorpcija je generalno posledica vezivanja vodoničnim vezama i Van der Valsovim silama, mehanizmi koji se odvijaju momentalno nakon kontakta organskih kontaminanata sa površinom sedimenta. Organski kontaminanti se u sedimentu najčešće vezuju kovalentnim vezama, što rezultuje stvaranjem skoro ireverzibilne inkorporacije (Gevao et al., 2000). Međutim, s obzirom da je njihova sorpcija vođena raspodelom između rastvorne faze i faze organske materije, specifične interakcije između sorbata i sorbenta dovode do toga da je uticaj hemisorpcije na ove kontaminante minimalan (Brusseau et al., 1991).



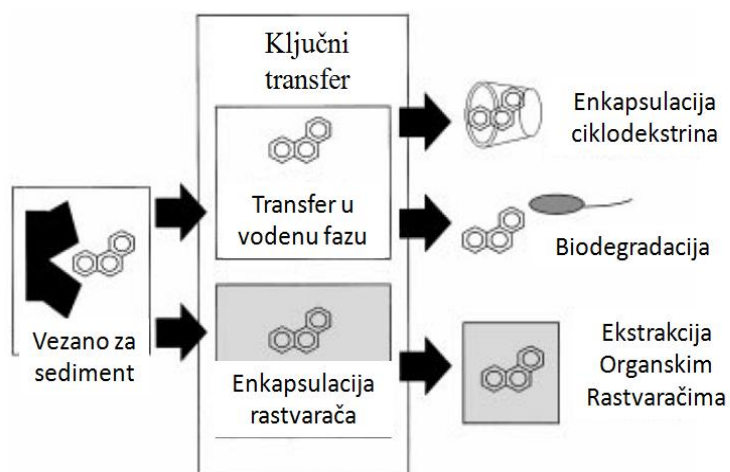
Slika 2.18. Uticaj kontaktnog vremena na ekstrakciju i biodostupnost kontaminanta

Ilustracija glavnih mehanizama koji se mogu odigrati tokom procesa starenja je prikazana na slici 2.19. Biodostupnost PAH-ova može biti procenjena upotrebom i hemijskih i bioloških metoda, mada je pitanje koji testovi su najreprezentativniji, jer oba pristupa imaju nedostatke. Maseni transfer kontaminanta određuje mikrobijalnu biodostupnost (Bosma *et al.*, 1997; Carmichael *et al.*, 1997) i posebno veličinu brzo i sporo desorbujuće frakcije (Cornelissen *et al.*, 1998). Usvajanje kontaminanta je brže iz fluida nego iz sorbovanog stanja, pa s obzirom da se većina ugljovodonika slabo rastvara u vodi i jako sorbuje na sedimentu samo će mala porcija posmatranog kontaminanta biti prisutna u vodi. Zbog toga je voda loš izbor rastvarača za procenu biodostupnosti, s obzirom da će velika labilna frakcija ugljovodonika ostati na čvrstoj fazi sedimenta (Reid *et al.*, 2000). Idealno ekstrakciono sredstvo bi prema tome bilo ono koje može da izekstrahuje celokupnu labilnu frakciju kontaminanta iz sedimenta, ponekad možda oponašajući interakcije između mikroba i kontaminanta.

Jedan od najznačajnijih napredaka je vezan za primenu čvrsto-tečne mikroekstrakcije (SPME), izbegavajući u potpunosti primenu rastvarača. Ako se čvrsta faza adsorbenta dovede u kontakt sa suspenzijom sedimenta i vode, ugljovodonici mogu difundovati sa sedimenta na adsorbent. Ovo može biti korišćeno kao brza i adekvatna alternativa konvencionalnim ekstrakcijama (Eriksson *et al.*, 1998) i može se koristiti za procenu biodostupnosti. Primena odgovarajućeg adsorbenta kao što je Tenax ili smola XAD4, će obezbediti da koncentracija ugljovodonika u tečnoj fazi u suspenziji sedimenta i vode bude efektivno nula (Yeom *et al.*, 1996). Načini određivanja biodostupnosti su prikazani na slici 2.20.



Slika 2.19. Proces starenja policikličnih aromatičnih ugljovodonika u sedimentu (Reid et al., 2000a)



Slika 2.20. Konceptualni prikaz biodostupnosti i ekstraktibilnosti hidrofobnih organskih komponenti upotrebom 1. Organskih rastvarača i 2. Vodenih rasvora ciklodekstrina

2.4.1. Biodostupnost i procena rizika

Prisustvo hazardnih organskih polutanata u sedimentu i rizik koji oni predstavljaju za ljudsko zdravlje i životnu sredinu su od velike važnosti (*Shi et al., 2013*). Komponente kao što su policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), polihlorovani bifenili (PCB) i organohlorni pesticidi (OCP) smatraju se štetnim kako za organizme prisutne i posmatranom matriksu, tako i za organizme na višem nivou u lancu ishrane usled njihove toksičnosti i izraženog potencijala bioakumulacije i biomagnifikacije (*Man et al., 2013*). Prilikom određivanja biodostupne frakcije u obzir treba uzeti procese starenja i sorpcije.

Procesi biodostupnosti imaju značajnu ulogu kako u proceni rizika po zdravlje, tako i u ekološkoj proceni rizika – jer pokrivaju ogroman broj puteva ekspozicije. Tipični putevi ekspozicije uključuju:

- oslobađanje kontaminanata iz sedimenta u vodu koja ga okružuje,
- ingestiju kontaminiranog sedimenta,
- direktan dermalni kontakt sa sedimentom,
- inhalaciju čestičnih materija ili para koje sadrže kontaminante,
- ingestiju hrane koja sadrži akumulirane kontaminante iz sedimenta.

U okviru ekološke procene rizika obuhvaćeni su mnogi faktori koji utiču na procenu stepena ekspozicije, a koji se posebno ne razmatraju u okviru procene rizika po zdravlje ljudi (npr. interakcije između kompetitivnih organizama, struktura ekosistema, interakcije između zajednica organizama i dr). Putevi ekspozicije za ekološku procenu rizika često uključuju modele lanca ishrane, posebno za bioakumulativne komponente kao što su PCB, dioksini, pesticidi i metil-živa.

Putevi ekspozicije za ekološku procenu rizika često uključuju modele lanca ishrane, posebno za bioakumulativne komponente kao što su PCB, dioksini, pesticidi i metil-živa. Teško je biti siguran da li su svi relevantni procesi uzeti u obzir i da li je odgovarajuća pretpostavka zasnovana na validnom konceptu i pouzdanim podacima. U cilju poboljšanja ovog aspekta procene rizika, neophodno je identifikovati relevantne procese biodostupnosti na transparentniji način, kako bi se bolje razumeo mehanizam tih procesa i ocenila mogućnost različitih alata da pruže informacije o procesima biodostupnosti. U cilju poboljšanja ovog aspekta procene rizika, neophodno je identifikovati relevantne procese biodostupnosti na transparentniji način, kako bi bolje razumeo mehanizam tih procesa i ocenila mogućnost različitih alata da pruže informacije o procesima biodostupnosti. Dugoročno gledano, ovakav pristup omogućava poboljšanje procene izloženosti toksikantima, rezultujući boljom konzistentnosti, pouzdanosti i odbranljivosti merenja, modeliranja i predviđanja.

Analiza zasnovana na proceni rizika preporučuje:

- Primena više linija dokaza za procenu kvaliteta sedimenta - najčešće se primenjuje karakterizacija trojnom metodologijom.
- Primena dostupnih tehničkih priručnika
- Donošenje konačnih zaključaka predstavlja kompleksan zadatak, ali ga je moguće uprostiti prikupljanjem pravih informacija: koncentracija hemijskih komponenti u sedimentu u tački kontakta sa individualnim organizmom; promenljive vezane za prirodu i stepen ekspozicije (npr. frekvencija ekspozicije, količina ingestiranog sedimenta, telesna masa) i toksičnost hemijske komponente.

Procesi biodostupnosti se mogu odraziti na sve tri grupe podataka.

2.4.2. Sorpcioni procesi kao procesi biodostupnosti

Površina sedimenta može dramatično da smanji aktivnost prirodnih mikroorganizama. Ta površina može da promeni dostupnost organskih jedinjenja, koncentraciju različitih organskih i neorganskih nutrijenata, pH, odnos kiseonika, zadrži inhibitore, mikroorganizme ili smanji aktivnost ekstracelularnih enzima. Aktivna površina mogu biti minerali gline, organske frakcije (ili huminske materije) sedimenta, druga kompleksna jedinjenja ugljenika ili nekad amorfni gvožđe- ili aluminijum-oksidi ili hidroksidi. Glavni procesi sorpcije odvijaju se na površini minerala gline i huminskih materija, jer oni mogu da imaju veliku površinu. Po jedinici mase, na primer, gram gline ima površinu od 20-80 m². Ipak, od svih sorbenata prisutnih u sedimentu, organska materija ima najvažniju ulogu u sorpciji većine organskih jedinjenja. Organske frakcije imaju veliku specifičnu površinu i katjonizmenjivački kapacitet, hidrofobne i organofilne karakteristike, što uslovljava sorpciju hidrofobnih organskih jedinjenja.

Najčešće proučavana klasa prirodnih organskih materija su huminske supstance (fulvokiseline, huminske kiseline, humini ili kerogen). Zavisno od jonske sile i pH vode, molekuli huminskih supstanci mogu da menjaju konformaciju gradeći »hidrofobne šupljine« u koje se mogu inkorporirati hidrofobna organska jedinjenja (*Dalmacija i Agbaba, 2008*). Mnogi faktori vrše uticaj na sorpciju organskih jedinjenja. To su vrsta i koncentracija rastvoraka u pornoj vodi, vrsta i količina minerala gline, količina organskih jedinjenja u sedimentu, uključujući i prisustvo specifičnih jedinjenja, pH, temperatura i sl. Mnogo pažnje je posvećeno sorpciji organskih jedinjenja i na glini i na organskoj materiji sedimenta i važno je razmotriti herniju sorpcije na tim glavnim konstituentima akvatičnog sedimenta. Mineral gline kaolinit ima manju površinu i manji kapacitet sorpcije nego montmorilonit, jer su slojevi blisko zajedno i molekuli su adsorbovani za spoljnu površinu gline. Kod montmorilonita struktura gline može da se raširi i takva struktura može da

adsorbuje molekule sa obe strane površine gline. Organski molekuli, neorganski nutrijenti i voda može da penetrira između slojeva kristala minerala. Adsorpcija može da uključi fizičke i Van der Valsove sile, vodonične veze, jonsku izmenu ili hemisorpciju. Veliki molekuli mogu da se vežu vodoničnim vezama, a mali molekuli jonskom izmenom. Minerali gline i koloidne organske materije su negativno naelektrisani. Glina može da ima jone vodonika, kalcijuma, kalijuma ili magnezijuma na površini, ali pozitivno naelektrisana organska materija može da zameni katjone već prisutne na površini gline i tako da se zadrži na površini minerala. Pozitivno naelektrisana jedinjenja mogu biti adsorbovana i na organskoj frakciji sedimenta jer su huminska jedinjenja negativno naelektrisana. Površina gline ili huminski koloidi mogu da zadržavaju organske katjone na taj način. Anjonski organski molekuli se uglavnom odbijaju zbog negativno naelektrisane površine (*Dalmacija i Agbaba, 2008*). Organska frakcija sedimenta je odgovorna za sorpciju mnogih jedinjenja, naročito hidrofobnih. Mnogi PAH-ovi su sorbovani uglavnom na prirodnim organskim materijama pre nego na glini. Stepem ovog zadržavanja je direktno u korelaciji sa koeficijentom raspodele oktanol-voda, K_{ow} i procentom organskog ugljenika u sedimentu. Postoje dva pristupa kako se hidrofobni molekuli zadržavaju na organskoj materiji. Jedan pristup je da je u pitanju proces fizičke sorpcije na organskoj materiji, gde se javlja fizičko vezivanje rastvorka na organskoj čvrstoj fazi, tj. na spoljnoj površini ili u porama (*Calvet, 1989*). Po drugom pristupu, hidrofobni molekuli difunduju u organsku materiju više kao prelaz hidrofobnog jedinjenja iz vodenog u organski rastvarač u kome je dobro rastvoran, tj. molekul je distribuisan u unutrašnju zapreminu organske materije (*Chiou, 1989*).

Biodostupnost opisuje pojavu zavisnosti bioremedijacije sedimenta koji je zagađen hidrofobnim organskim jedinjenjima od brzine njihove desorpcije sa česticom sedimenta. Na brzinu kojom PAH-ovi postaju dostupni utiče sposobnost mikroorganizama da redukuju koncentraciju u tečnoj fazi i tendencije organizama da vezuju sorbent. Na slici 6 je prikazan mogući mehanizam mikrobijalnog usvajanja kontaminanta, direktni kontakt ili u tečnoj fazi. Povećano kontaktno vreme smanjuje veličinu brzo desorbujuće faze i stepen biodegradacije. *Guerin i Boyd (1992)* i *Calvillo i Alexander (1996)* su pokazali da prisustvo degradirajućih mikroorganizama menja desorpcionu brzinu kontaminanta sa sorbovane površine. Promena se dešava zbog toga što mikroorganizmi usvajaju kontaminante koji su lako dostupni preko tečne faze što dovodi do desorpcije kontaminanta sa čvrste površine u tečnu fazu.

2.4.3. Hemijske metode za merenje biodostupnosti organskih jedinjenja

Biodostupnost organskih jedinjenja se povezuje sa sposobnošću hidrofobnih organskih jedinjenja da se desorbuju sa čvrste faze i pređu u rastvoran oblik pa praćenje kinetike desorpcije može dati značajne informacije

za procenu biodostupnosti organskih polutanata. Desorpcija organskih jedinjenja sa sedimenta je dvofazni proces: kratak period brze desorpcije je paćen mnogo dužim periodom spore desorpcije (*Tričković, 2009*).

U poslednjoj deceniji veliki broj istraživanja je posvećen razvoju metoda za merenje biodostupnosti PAH-ova. Ova istraživanja su podrazumevala laboratorijske testove zasnovane na mikrobiološkoj konverziji biodostupnih PAH-ova, ekstrakciji čvrste faze biodostupnih PAH-ova (*Cornelissen et al., 1998; MacRae and Hall, 1998*), i persulfatnoj oksidaciji biodostupnih PAH-ova. Pored toga, alternativni testovi su predloženi na osnovu uklanjanja lako biodostupnih PAH-ova tečnom ekstrakcijom (*Kelsey et al., 1997; Chung and Alekander, 1998; Nam et al., 1998; Chung and Alekander, 1999*) i superkritičnom CO₂ ekstrakcijom. Obzirom da se većina ugljovodonika slabo rastvara u vodi i jako sorbuje na sedimentu samo će mala porcija posmatranog kontaminanta biti prisutna u vodi koja je u kontaktu sa sedimentom. Zbog toga je voda loš izbor rastvarača za procenu biodostupnosti, s obzirom da će velika labilna frakcija ugljovodonika ostati na čvrstoj fazi sedimenta (*Reid et al., 2000a*).

Do sada je razvijeno nekoliko hemijskih metoda koje se sve zasnivaju na uklanjanju samo one frakcije hidrofobnih organskih jedinjenja koja se nalazi u brzo-desorbujućoj oblasti organske materije:

1. ekstrakcija u prisustvu ciklodekstrina,
2. ekstrakcija u prisustvu čvrstog adsorbenta,
3. blaga ekstrakcija organskim rastvaračima,
4. supekritična ekstrakcija ugljen-dioksidom,
5. oksidacija persulfatom, i
6. ekstrakcija (super) zagrejanom vodom

2.4.3.1. Ekstrakcija

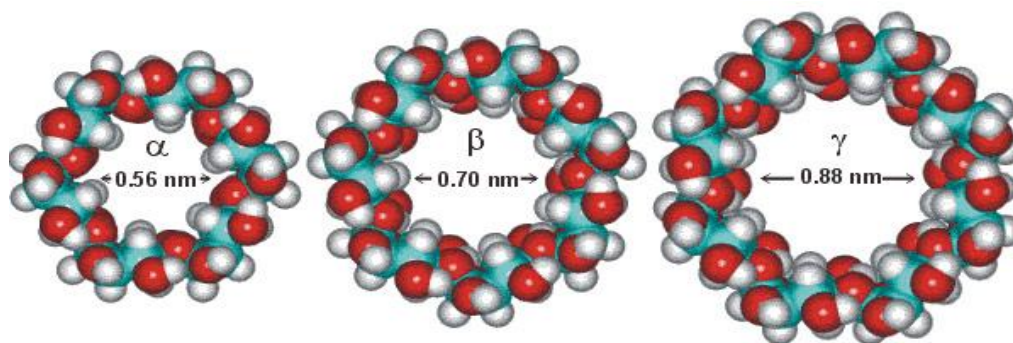
U cilju pripreme uzoraka zemljišta/sedimenta za analizu PAH-ova mogu se koristiti najrazličitije metode. Neke od najčešće primenjivanih metoda jesu metoda ultrazvučne ekstrakcije smešom rastvarača, ekstrakcija po Soxhlet-u, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija organskim rastvaračima na koloni, ekstrakcija superkritičnim fluidima, mikroekstrakcija čvrstom fazom. Prednosti i mane svake od metoda date su u *tabeli 2.6. (Joa et al., 2005)*.

Tabela 2.6. Prednosti i nedostaci različitih metoda ekstrakcije pri pripremi uzoraka za analizu PAH-ova

<i>Metoda ekstrakcije</i>	<i>Prednosti</i>	<i>Mane</i>
<i>Soxhlet</i>	Klasična i najčešće primenjivana metoda Dobre recovery vrednosti Male količine uzorka i kratko vreme potrebno za pripremu eksperimenta	Dugo vreme analize Skupa, zahteva veliku potrošnju rastvarača Relativno niske recovery vrednosti za određivanje PAH-ova u odnosu na ASE i SPE metode
<i>Ultrazvučna ekstrakcija</i>	Jeftina Brza Jednostavna za izvođenje Dostupna u većini laboratorija	Niska selektivnost Niže recovery vrednosti u odnosu na metodu po Soxhletu i ASE
<i>Mikrotalasna ekstrakcija</i>	Male količine rastvarača Jeftina Brza	Niska selektivnost Posedovanje specifične opreme za njeno izvođenje
<i>Ekstrakcija velikom brzinom kretanja rastvarača</i>	Dobre recovery vrednosti za analizu PAH-ova Brza Male količine rastvarača Moguće pakovanje kolone bez naknadnog prečišćavanja	Niska selektivnost
<i>Ekstrakcija superkritičnim fluidima</i>	Odlična selektivnost Brza	Niske recovery vrednosti za HMW PAH-ove Efikasnost odvajanja zavisi od matrice uzorka Posedovanje specifične opreme za njeno izvođenje
<i>Mikroekstrakcije čvrstom fazom</i>	Upotreba vrlo malih količina rastvarača, što je dobro sa aspekta očuvanja životne sredine Brza Jednostavna za izvođenje	Niska selektivnost Posedovanje specifične opreme za njeno izvođenje

2.4.3.1.1. Ekstrakcija u prisustvu ciklodekstrina

Ciklodekstrini su makrociklični oligosaharidi, koji se karakterišu prstenastom strukturom. U istraživanjima inkluzionih kompleksa najčešće su korišćeni α , β i γ ciklodekstrini koji se sastoje od 6, 7, i 8 glukopiranoznih jedinica respektivno. Kako raste broj glukopiranoznih jedinica, raste i dijametar prstena i šupljine unutar njega (slika 2.21.).



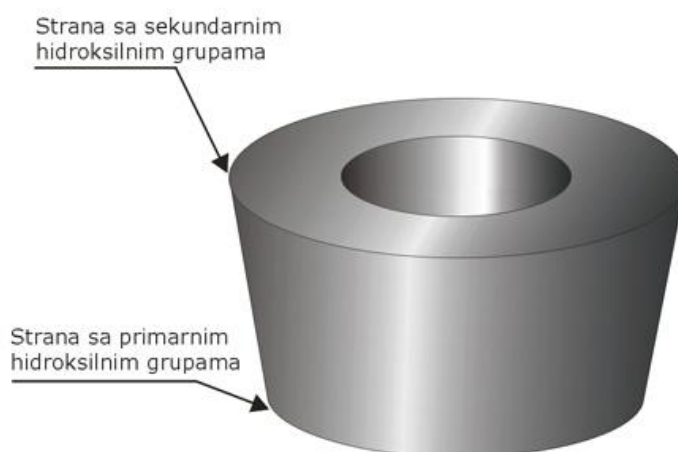
Slika 2.21. Tipovi ciklodekstrina

Ciklodekstrini nastaju razgradnjom skroba uz enzim ciklodekstrin-glukoziltransferazu (CGT), kojeg proizvodi *Bacillus macerans* i neke druge vrste, pri čemu dolazi do intramolekularne reakcije primarnog produkta razgradnje skroba bez prisustva vode, te nastaju α -1,4 vezani ciklični produkti, zvani ciklodekstrini. Razgradnjom skroba uz enzim nastaje smeša α -, β -, γ -ciklodekstrina, no može usmeriti sintezu prema željenom derivatu dodatkom određenih supstanci, te kontrolom pH i temperature reakcionog medijuma. Dodatkom toluena u reakcionu smešu uglavnom nastaje β -ciklodekstrin, koji s toluenom stvara nerastvorljivi kompleks i tako pomera ravnotežu reakcije u smeru nastajanja β -ciklodekstrina. Dodatkom dekana u reakcionu smešu nastaje α -ciklodekstrin, a dodatkom α -naftola i metiletilketona, nastaje γ -ciklodekstrin (Connors, 1997).

Ciklodekstrini sadrže hidroksilne grupe OH-2, OH-3 i OH-6. Sekundarne hidroksilne grupe (OH-2 i OH-3) su na široj, a primarne (OH-6) na užoj strani cilindričnog molekula (slika 2.22.). Jaka vodonična veza postoji između OH-2 i OH-3 grupe, pri čemu se OH-3 grupa ponaša kao donor protona. Odnos jačina vodoničnih veza kod ciklodekstrina je sledeći: α -CD < β -CD < γ -CD. OH-6 grupe takođe mogu da se povezuju vodoničnim vezama sa donje strane molekula, ali su ove veze destabilizovane dipolarnim efektima, lako se raspadaju u vodi i obično ih nema u kristalima ciklodekstrina (Connors, 1997).

U molekulima ciklodekstrina stvara se prsten vodoničnih veza između C_2 -OH i susedne C_3 -OH glukopiranozne jedinice. Tako se u molekulima β -ciklodekstrina stvara 7 vodoničnih veza koje uzrokuju rigidnost molekula i relativno nisku rastvorljivost β -ciklodekstrina u odnosu na ostale derivate ciklodekstrina. U molekulu α -ciklodekstrina zbog sternih smetnji nastaju samo 4 od 6 mogućih vodoničnih veza, pa je stoga α -ciklodekstrin rastvorljiviji od β -

ciklodekstrina. Najrastvorljiviji je γ -ciklodekstrin koji je neplanarne, fleksibilnije strukture (Connors, 1997).

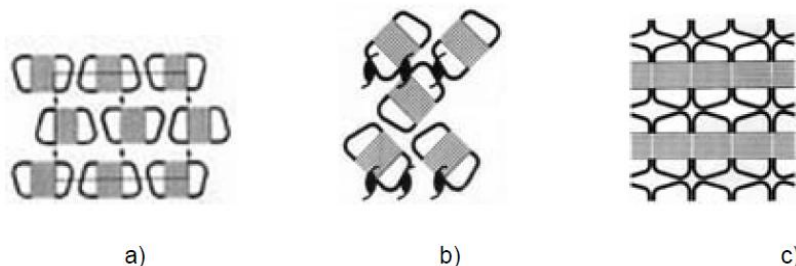


Slika 2.22. Izgled molekula ciklodekstrina

Dok su na spoljnim stranama šupljine OH grupe, u unutrašnjosti molekula su atomi vodonika. U vodenom rastvoru ove hidrofobne šupljine sadrže 3 (α -CD), 7 (β -CD) ili 9 (γ -CD) slabo vezanih molekula vode. Njihova gustina u šupljinama je mala, a one su dovoljno velike da prime još molekula. Znači da ciklodekstrini mogu da vežu nepolarne alifatične i aromatične molekule odgovarajućih dimenzija. Oni se vežu u odnosu 1:1, 2:1 i 1:2, što zavisi od gustujućeg molekula.

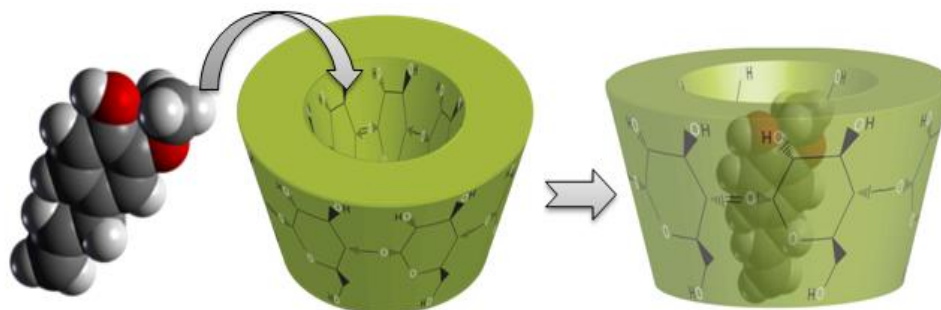
Proučavanje kristala β -ciklodekstrina (CD) je pokazalo da postoje tri načina pakovanja (slika 2.23.):

- zid od cigala (brick wall) (a)
- riblja kost (herring bone) (b)
- kanalna struktura (c).



Slika 2.23. Načini pakovanja ciklodekstrina

Inkluzioni kompleksi ciklodekstrina. Unutrašnja šupljina molekula CD sadrži glukozidne kiseonike i vodonikove atome. Zbog toga, unutrašnja šupljina ima delimično hidrofobni karakter i usled povećane elektronske gustine može se razmatrati kao slaba Luisova baza. Ova svojstva unutrašnje šupljine su preduslov za obrazovanje kompleksa sa raznim molekulima - "gostima". Molekuli domaćina formiraju mrežastu strukturu sa šupljinama koje su dovoljno velike da prime molekule gosta. Molekuli domaćina mogu biti makromolekuli kao što su ciklodekstrini malih molekula koji formiraju mrežu povezivanjem jonskom ili vodoničnom vezom. Inkluzioni kompleksi CD mogu da se formiraju u tečnoj, gasnoj i čvrstoj fazi. Većina istraživanja su vršena u vodenoj fazi zbog centralne uloge koju voda ima u procesu kompleksiranja. Prisustvo vode u nepolarnoj šupljini CD-a uzrokuje njegovu nestabilnost, čime se favorizuje njena zamena sa manje polarnim molekulima. Kao rezultat ovoga svaki molekul, koji je sa sternog aspekta, makar delimično, komplementaran sa CD šupljinom može stvarati inkluzione komplekse sa CD. Nastajanje inkluzionih kompleksa zavisi od veličine i oblika molekula gosta i od dimenzija šupljina koje formiraju molekuli domaćina. Komplementarnost molekula sa CD sa sternog aspekta je od ključne važnosti za afinitet šupljine CD prema molekulu „gostu“, ova komplementarnost takođe određuje i stehiometriju kompleksa. Inkluzioni kompleksi mogu biti stehiometrije 1/1, gde jedan molekul zauzima šupljinu (*slika 2.24*). Međutim, takođe je moguće nastajanje inkluzionih kompleksa 2/1 (dva molekula zauzimaju jednu šupljinu, ili 1/2 gde jedan molekul zauzima dva molekula CD (*slika 2.24*). Naravno moguće su i veće stehiometrije u zavisnosti od veličine molekula gosta i prečnika šupljine CD-a. Na primer, α -CD favorizuje inkluzione komplekse sa malim molekulima kao što su dihlormetan ili slično. Suprotno ovome kod γ -CD favorizovani su kompleksi sa velikim molekulima, na primer, kao što je benzo(a)piren. β -CD je dobar kompromis između prethodna dva ciklodekstrina, s obzirom da je veličina šupljine između ova dva krajnja slučaja, pa se primenom njega može tretirati široka paleta jedinjenja. Njegov veliki nedostatak je mala rastvorljivost, pa se često pristupa njegovoj modifikaciji kako bi se ovaj problem prevazišao (*Voncina i Vivod, 2013; Jeffrey, 1997*).

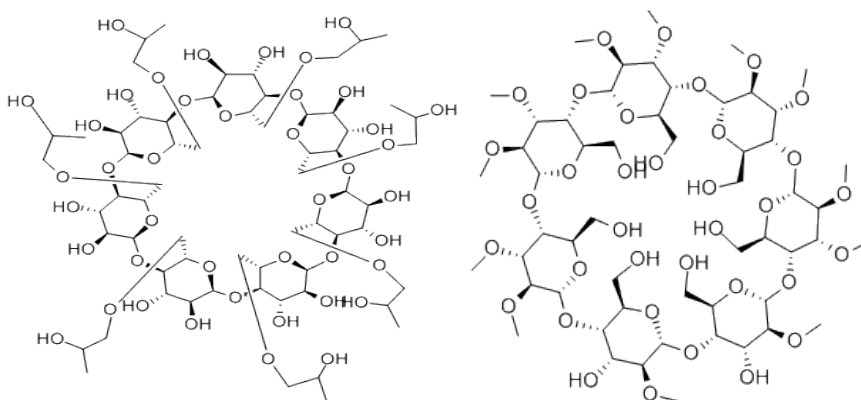


Slika 2.24. Formiranje inkluzionih kompleksa

Kada se nalaze u vodenoj suspenziji sedimenta i/ili zemljišta, ciklodekstrini snižavaju koncentraciju organskih molekula u vodenoj fazi što rezultuje formiranjem koncentracionog gradijenta između vodene faze i čvrstog matriksa i daljom desorpcijom biodostupne frakcije organskog jedinjenja. Da bi se obezbedila potpuna desorpcija biodostupne frakcije organskog jedinjenja, neophodno je redovno osvežavati sistem svežim rastvorom ciklodekstrina. Frakcija organskog jedinjenja koja zaostane u čvrstom matriksu nakon ekstrakcije smatra se da je slabo biodostupna ili nedostupna. Očigledno je da je ekstrakcija ciklodekstrinom veoma slična ekstrakciji čvrstim adsorbentom, s tom razlikom što se kod ove metode koriste rastvorni molekuli ciklodekstrina za ekstrakciju hidrofobnih organskih jedinjenja (*Del Valle, 2003*).

Modifikacija ciklodekstrina. Prisustvo reaktivnih hidroksilnih grupa u ciklodekstrinima omogućavaju razne modifikacije ovih jedinjenja. Na ovaj način moguće je modifikovati rastvorljivost CD-a, inkluzione osobine i slično. Međutim, njihova modifikacija iziskuje dodatne troškove, zbog čega se za primenu ovih jedinjenja u svrhe remedijacije uglavnom primenjuju nasumično modifikovani ciklodekstrini koji su dostupni kao industrijske ili tehničke hemikalije. Nasumična modifikacija postiže se direktnom esterifikacijom. Na primer metilovanjem, ili hidroksipropilovanjem, karboksimetilovanjem ili sulfobutilovanjem.

Zbog veličine centralne šupljine, jednostavnog načina dobijanja i ekonomskih razloga β -ciklodekstrin i njegovi derivati se najčešće upotrebljavaju. Najčešće primenjivani derivat β -ciklodekstrina za procenu ili povećanje biodostupnosti organskih jedinjenja je 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HPCD) (*slika 2.25*). Pored HPCD-a u iste svrhe često se primenjuje i metil- β -ciklodekstrin (*slika 2.25*).



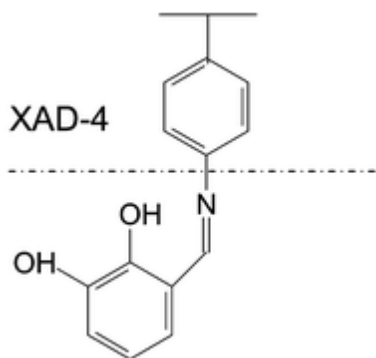
Slika 2.25. Hemijska struktura 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin-a (desno) i metil- β -ciklodekstrin-a (levo)

2.4.3.1.2. Ekstrakcija u prisustvu čvrstog adsorbenta

Najčešće primenjivani čvrst adsorbent je Tenax-TA (*ten Hulscher i sar., 2003; Cornelissen i sar., 2001; Cornelissen i sar., 1998*), Pored navedenog adsorbenta korišćeni su membranski diskovi (*Krauss i Wilcke, 2001*), vlakna prekrivena slojem adsorbenta (engleski Solid-Phase Microextraction, SPME) (*Styrishave i sar., 2008; van der Wal i sar., 2004; Leslie i sar., 2002*) ili uređaji sa semipermeabilnim membranama (SPMD) (*MacRae i Hall, 1998; Utvik i Johnson, 1999*). Sve primenjene metode su pokazale dobar potencijal za predviđanje biodostupnosti organskih jedinjenja kada su poređene sa bioakumulacionim testovima i testovima mikrobiološke razgradnje, ali se sa operativnog stanovišta jedino metoda desorpcije u prisustvu čvrstog adsorbenta Tenax TA može smatrati operativnom jer je proučena na najvećem broju uzoraka i organskih polutanata (*Tričković, 2009*).

Princip metode jeste da čvrsti hidrofobni adsorbent vezuje (adsorpcijom, raspodelom) hidrofobne organske molekule koji se nalaze rastvoreni u vodenoj fazi održavajući na taj način stalni koncentracioni gradijent, između čestica sedimenta/zemljišta i vodene faze, koji će prozrokovati dalju desorpciju organskog jedinjenja sa čvrstog matriksa. Frakcija hidrofobnog organskog jedinjenja koja ostane u uzorku sedimenta/zemljišta nakon ovakve ekstrakcije smatra se da je slabo biodostupna ili bionedostupna, a desorbovana frakcija je ona koja pri datim uslovima može biti potencijalno akumulirana u biološkom svetu. Tipično, uklanjanje biodostupne frakcije hidrofobnog organskog jedinjenja može trajati od nekoliko sati do nekoliko dana, što ovu metodu čini mnogo bržom od bioloških određivanja.

XAD4 smole se obično koriste za adsorpciju organskih jedinjenja relativno malih molekulskih masa iz polarnih rastvarača, kao što je voda. Struktura XAD4 smole je prikazana na slici 2.26. To je hidrofobni polimer čiji kapacitet za adsorpciju organskih jedinjenja potiče iz makroretikularne strukture i prisustva pora, te izuzetno velikog površinskog kapaciteta i aromatične prirode njegove površine. Adsorpcija hidrofobnih organskih jedinjenja na smoli se vrši zahvaljujući uspostavljanju van der Valsovih interakcija. Zahvaljujući prisustvu pora, voda ili neki drugi rastvarač može veoma brzo penetrirati unutar pora. Oni hidrofobni organski molekuli koji imaju manji afinitet prema vodi (ili nekom drugom polarnom rastvaraču), ostaće adsorbovani na hidrofobnoj površini adsorbenta, dok će hidrofilniji molekuli da se orijentišu ka vodenoj fazi koja ispunjava pore. Pravilnim izborom ekstrakcionog sredstva i tehnike, ekstrakcija sa smole se vrši veoma brzo, zahvaljujući brzom difuziji kroz pore.



Slika 2.26. Struktura XAD4 smole

2.4.4. Modeli za opisivanje desorpcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa sedimenta

Za opisivanje dvofaznog procesa desorpcije hidrofobnih organskih jedinjenja u literaturi se najčešće koristi dvočlani modeli (Cornelissen *et al.*, 1997a; Cornelissen *et al.*, 1997b; Cornelissen *et al.*, 1998; Cornelissen *et al.*, 1999). U novijim studijama, kao model se koristi i tročlani modeli (Kukkonen *i sar.*, 2003).

Dvočlani model se može predstaviti sledećom jednačinom, uz pretpostavku da se ne dešava ponovna sorpcija frakcije organskog jedinjenja koja je desorbovana sa sedimenta (Cornelissen *i sar.*, 1997a):

$$\frac{S_t}{S_0} = F_{brzi} \cdot e^{-k_{brzi} \cdot t} + F_{spori} \cdot e^{-k_{spori} \cdot t} \quad (\text{Eq. 1})$$

Gde su (Cornelissen *et al.*, 1997, Cornelissen *et al.*, 2001):

S_t i S_0 - količina organskog jedinjenja koja je sorbovana u vremenu t i početnom trenutku $t=0$

k_{brzi} i k_{spori} - konstante brzina prvog reda za brzu i sporu fazu desorpcije

F_{brzi} i F_{spori} predstavljaju brzo- i sporo- desorbujuće frakcije.

Postojanje brzo- i sporo-desorbujuće oblasti može se objasniti koristeći tri različita fenomena (Tričković, 2009):

- postojanjem mesta vezivanja različite dostupnosti što prouzrokuje postojanje otpora ka difuziji;
- postojanjem dva ili više različitih mesta vezivanja koja se razlikuju u mehanizmu sorpcije, od kojih je bar jedan limitirajući i određuje brzinu desorpcije; i
- postojanjem reakcionih mesta koja se razlikuju hemijski, odnosno na molekulskoj skali, i imaju različit afinitet prema organskom jedinjenju i/ili se razlikuju u brzini reakcije sorbat mesto vezivanja na sorbentu.

Ako se pretpostavi da je difuzija kroz organsku materiju odgovorna za dvofaznu desorpciju hidrofobnih organskih jedinjenja, onda je moguće da kombinacija sva tri gore pomenuta fenomena doprinosi takvom ponašanju. Očigledno, amorfne i kondenzovane oblasti veoma verovatno poseduju različit afinitet prema organskim jedinjenjima zbog razlika u gustini, strukturi i rigidnosti. Pored toga, uočeno je da se odigravaju različiti mehanizmi sorpcije u različitim oblastima: brza desorpcija je povezana sa mehanizmom raspodele čija pokretačka sila jeste porast entropije, dok je spora desorpcija povezana sa procesom čija pokretačka sila jesu i entropija i entalpija i uključuje uklanjanje visoko uređenog omotača molekula vode oko rastvorenog organskog molekula. Konačno, specifična sorpcija organskog jedinjenja može da se odigra u unutrašnjim šupljinama. Sorpcija u unutrašnjim šupljinama verovatno uključuje strukturalna preuređenja u blizini šupljine u zavisnosti od vrste hidrofobnog organskog jedinjenja, pa je vrlo verovatno da je ovakva sorpcija veoma specifična, pri čemu afinitet hidrofobnog organskog jedinjenja varira za različite tipove šupljina.

U novijoj literaturi se može sresti i tročlani model koji ima dodatni član koji se odnosi na veoma sporu desorpciju organskog jedinjenja sa sedimenta (*Kukkonen i sar., 2003*):

$$\frac{S_t}{S_0} = F_{brzi} \cdot e^{-k_{brzi} \cdot t} + F_{spori} \cdot e^{-k_{spori} \cdot t} + F_{veoma\ spori} \cdot e^{-k_{veoma\ spori} \cdot t} \quad (\text{Eq.2})$$

gde su:

$F_{veoma\ spori}$ – frakcija organskog jedinjenja u veoma sporodesorbujućoj oblasti organske materije u vremenu $t=0$ i

$k_{veoma\ spori}$ – konstanta brzine veoma spore desorpcije (h^{-1})

Pretpostavlja se da je treći član u ovom modelu povezan sa nelinearnim mehanizmom specifične sorpcije u unutrašnjim šupljinama, dok drugi član uključuje difuzijom kontrolisanu sorpciju u kondenzovanoj oblasti organske materije mehanizmom raspodele. I ovaj model važi pod pretpostavkom da nema značajne ponovne sorpcije organskog jedinjenja nakon desorpcije. Zapravo je nemoguće znati koliko oblasti, a time i članova u modelu, i konstanti brzina zapravo postoji za jedinjenja sorbovana na sedimentu. Odabir modela za opis desorpcije predstavlja ravnotežu između količine dostupnih podataka i uspešnosti odabranog modela da kvantitativno opiše desorpciju koja se meri statističkim veličinama (koeficijentom korelacije pre svega).

2.5. Spajkovanje sedimenta-izbor metode, način spajkovanja i smetnje

Ekperimentalne studije o sudbini perzistentnih organskih polutanata u životnoj sredini se najčešće sprovodi u laboratorijskim uslovima. Istraživači koriste kontrolisane uslove kako bi pratili specifične polutante (npr. vlažnost, svetlost, temperatura). Ovo se posebno odnosi na polutante gde se prati perzistentnost, biodostupnost, biodegradacija, toksičnost, sorpcija i desorpcija. Ovakvi eksperimenti često zahtevaju da se određena koncentracija kontaminanta „unese“ u ispitivani matriks, tj. da se izvrši njegovo spajkovanje (eng. *spiking*). Definicija spajkovanja koju je uvelo Američko društvo za testiranje i materijale (eng. *American Society for Testing and Materials*) (ASTM) glasi „eksperimentalno dodavanje testiranih materijala kao što su hemikalije ili mešavine hemikalija, otpadnih voda, ulja, čestičnih materija, ili visokokontaminiranog zemljišta/sedimenta u čistu kontrolu ili referentni materijal u cilju utvrđivanja toksičnosti dodatog materijala. Nakon dodavanja, sediment/zemljište se mora homogenizovati kako bi kontaminanti bili jednako raspoređeni u sedimentu/zemljištu“ (ASTM, 1998a; ASTM, 1998b).

Idealno, procedura spajkovanja organskih komponenti u sediment ili zemljište, ne trebala bi da dovede do promena hemijskih, bioloških i fizičkih karakteristika testiranog uzorka. Međutim, u praksi je ovo nemoguće postići, pa se smatra da je procedura spajkovanja kritičan korak u dizajnu eksperimenta. Sama procedura uklanjanja sedimenta ili zemljišta iz životne sredine i njegov transport u laboratoriju dovodi do promena karakteristika tog medijuma. Manipulacija uzorka, uključujući njegovo skladištenje, uzorkovanje, prosejavanje, sušenje i ponovno vlaženje, dovodi do promena u fizičkim, hemijskim i biološkim karakteristikama (Northcott i Jones, 2000).

Usvojena procedura spajkovanja, zavisiće od cilja studije, tipa sedimenta ili zemljišta i karakteristika komponente koja se spajkuje (Northcott i Jones, 2000). Organske komponente se često dodaju u sediment ili zemljište upotrebom acetona ili metanola. Upotrebu surfaktanata, koji mogu da rastvore velike količine organskih jedinjenja, treba izbegavati jer oni mogu uticati na biodostupnost i toksičnost testiranih komponenti i imati direktnu interakciju sa testiranim supstratom (Stelmack, 1999; DeWitt, 1992).

Izbor organskog rastvarača je definisan rastvorljivošću komponente u njemu, kompatibilnosti sa ciljem eksperimenta, njegovom toksičnošću i perzistentnošću u spajkovanom supstratu. Primarna zabrinutost kada se radi o izboru rastvarača jeste njegova sudbina i efekti rastvarača na spajkovani matriks, jer reziduali rastvarača mogu uticati na rezultate eksperimenta (Northcott i Jones, 2000).

- Metoda spajkovanja

Veliki broj metoda za spajkovanje organskih kontaminanata je razvijen. Može se spajkovati vlažan ili suv matriks upotrebom vode ili organskih rastvarača, koncentrovanih spajkovanih matriksa i mešanje različitim tehnikama. Uzorci sedimenta/zemljišta se uglavnom spajkuju vlažni, čime se

izbegava sušenje matriksa i modifikovanje njegovih osobina. Komponente u odgovarajućem rastvaraču se dodaju direktno u uzorak, a zatim se uzorak ostavi da rastvarač ispari (Muir *et al.*, 1983; Knaebel *et al.*, 1996). Upotrebom vlažnog sedimenta/zemljišta eliminiše se zabrinutost zbog upotrebe organskih rastvarača, međutim postavlja se pitanje homogenosti komponenti u uzorku i da li se komponenta potpuno rastvorila ili je ostala u obliku kristala u zemljištu/sedimentu.

- *Uticaj rastvarača*

Spajkovanje kontaminanata u sediment ili zemljište upotrebom organskih rastvarača ima potencijal da poveća sadržaj organskog ugljenika. Prevelika količina rastvarača može ekstrahovati labilne komponente i/ili izmeniti sastav prirodne organske materije. Dokazano je da rastvarač utiče na strukturu i funkciju mikrobiološke zajednice zemljišta/sedimenta (Fuller *et al.*, 1997), denitrifikacioni proces u zemljištu (Miller *et al.*, 1997), biomasu (Reid *et al.*, 1998), kao i nastajanje toksičnih i drugih efekata na floru i faunu. Zapreminu rastvarača korišćenu u eksperimentu treba svesti na minimum. Kada se spajkuje suv sediment, ključni parametar koji utiče na perzistentnost rastvarača je pritisak pare. Pentan i aceton imaju visok pritisak pare, pa se smatraju dobrim izborom za spajkovanje suvog sedimenta.

- *Mešanje i homogenizacija*

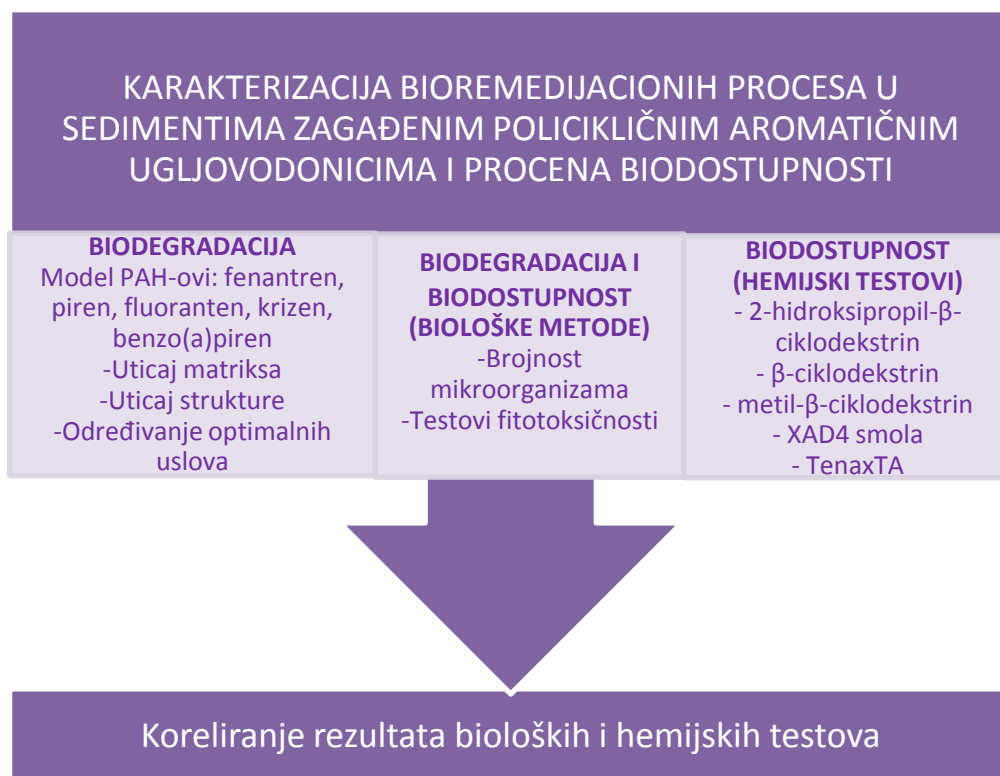
Mešanje uzorka se obično sprovodi nakon spajkovanja kako bi se obezbedila homogenizacija uzorka za eksperiment. Ispitivani materijali kao što su otpadne vode, ulja, toksični sedimenti i/ili zemljišta, ili hemijski rastvarači trebalo bi da se dobro izmešaju sa uzorkom nakon dodavanja. Mešanje se može izvesti ručno ili mehanički. Uslovi mešanja, kao što su, trajanje, temperatura i vreme starenja sedimenta, treba da se sprovode na način da se sa sigurnošću obezbedi homogenizacija spajka (Northcott i Jones, 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

U ovom delu dat je detaljan opis eksperimentalnih procedura korišćenih u cilju:

1. Određivanja optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije pol cikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova,
2. Određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova,
3. Ispitivanja fitotoksičnosti (testovi kljavosti i usvajanje policikličnih aroma-tičnih ugljovodonika)
4. Ispitivanja mogućnosti procene potencijalno biodostupne frakcije primenom različitih hemijskih agenasa (2-hidroksipropil- β -ciklo-dekstrin, β -ciklodekstrin i metil- β -ciklodekstrin, smola XAD4 i Tenax TA)
5. Koreliranja rezultata dobijenih testovima biodegradacije, testovima kljavosti, testovima fitotoksičnosti i rezultata dobijenih iz eksperimenta procene biodostupnosti hemijskim testovima.

Blok šema eksperimenta data je na slici 3.1.



Slika 3.1. Blok šema eksperimenta

3.1. Odabir policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Za svrhu ispitivanja gore navedenih ciljeva odabrano je pet policikličnih aromatičnih ugljovodonika: fenantren, piren, fluoranten, krizen i benzo(a)piren, kao predstavnici PAH-ova sa 3, 4 i 5 prstenova. U *tabeli 3.1* prikazane su neke fizičko-hemijske osobine PAH-ova odabranih za eksperiment.

Kriterijumi korišćeni za odabir ovih jedinjenja na kojima će se vršiti ispitivanje bili su:

1. **Fizičko-hemijske osobine** ovih jedinjenja u pogledu njihove sudbine i distribucije u akvatičnim ekosistemima. Primarni kriterijum za izbor jedinjenja koja se trebaju pratiti u sedimentu jesu njihova fizičko-hemijska svojstva, a pre svega hidrofobnost i rastvorljivost u vodi od kojih zavisi njihov afinitet ka sorpciji za sediment. Što je jedinjenje hidrofobnije, manje je rastvorljivo u vodi, pa će stoga imati veći afinitet da se vezuje za čvrstu fazu (sediment, suspendovane čestice). Dobro merilo hidrofobnosti predstavlja koeficijent raspodele K_{ow} , a prema njemu je postavljen kriterijum prema kome se određuje da li neko jedinjenje treba pratiti u sedimentu ili ne. Prema ovom kriterijumu, jedinjenja sa $\log K_{ow} > 5$ (*tabela 7*), bi trebala biti određivana u sedimentu, a ona sa $\log K_{ow} < 3$ bi prvenstveno trebala biti praćena u vodi. Jedinjenja sa $\log K_{ow}$ između 3 i 5, kao što je fenantren (*tabela 7*), se opciono određuju u sedimentu u zavisnosti od nivoa zagađenja.
2. **Značaj sa ekotoksikološkog stanovišta.** Sva izabrana jedinjenja se nalaze na EPA listi prioriternih supstanci za koje je zahtevano izvođenje kriterijuma kvaliteta za sediment.
3. **Značaj sa zakonodavnog stanovišta.** Svi odabrani PAH-ovi, izuzev pirena, se nalaze na listi graničnih vrednosti za ocenu statusa i trenda kvaliteta sedimenta Uredbe o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje (*Sl. Glasnik 50/2012*).
4. Izborom odabranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika kao polutanata **analitički razlozi su u potpunosti zadovoljeni** jer se radi o jedinjenjima za čije određivanje je korišćena gasna hromatografija sa masenom detekcijom. Ova metoda ima visok nivo selektivnosti i mogućnost potvrde identiteta jedinjenja primenom retencionog vremena i jedinstvenog izgleda hromatograma.

Tabela 3.1. Fizičko-hemijske osobine odabranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika (Bergknut, 2006)

PAH	Broj prstenova	M (g/mol)	S (mg/L)	p (Pa)	Log K_{ow}
Fenantren	3	178	1,1	$2,0 \times 10^{-2}$	4,57
Piren	4	202	0,13	$6,0 \times 10^{-4}$	5,18
Fluoranten	4	202	0,26	$1,2 \times 10^{-3}$	5,22
Krizen	4	228	0,006	$5,7 \times 10^{-7}$	5,91
Benzo[a]piren	5	252	0,0038	$7,0 \times 10^{-7}$	5,91

M – molarna masa,

S – rastvorljivost u vodi,

p – napon pare,

log K_{ow} -koeficijent raspodele oktanol-voda

3.2. Odabir sedimenata

Ispitivanja su rađena na više različitih sedimenata i podeljena su u četiri faze (tabela 3.2).

Tabela 3.2. Odabrani sedimenti korišćeni u eksperimentima

Cilj istraživanja	Odabrani sediment
- Određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova	- 5 sedimenta sa različitim sadržajem gline i organske materije
- Određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova	- Uzorak sedimenta sa niskim sadržajem gline - Uzorak sedimenta sa sadržajem gline od oko 25% i organskom materijom do 10%
- Ispitivanje mogućnosti procene potencijalno biodostupnosti frakcije primenom različitih hemijskih sorbenata	- Uzorak sedimenta sa sadržajem gline od oko 25% i organskom materijom do 10% - 5 sedimenta sa različitim sadržajem gline i organske materije - Uzorak sedimenta sa niskim sadržajem gline
- Koreliranje rezultata dobijenih testovima biodegradacije, testovima ključnosti i rezultata dobijenih iz eksperimenta procene biodostupnosti hemijskim testovima	- Uzorak sedimenta sa sadržajem gline od oko 25% i organskom materijom do 10% - 5 sedimenta sa različitim sadržajem gline i organske materije - Uzorak sedimenta sa niskim sadržajem gline

3.3. Odabir hemijskih agenasa za desorpciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa sedimenta

Za svrhu ovog eksperimenta odabrana su dva sorbenta (Tenax i XAD4) i tri ciklodekstrina (β CD, MCD i HPCD) (tabela 3.3.). U cilju procene biodostupne frakcije različitih organskih polutanata najčešće korišćen sorbent jeste Tenax (Bernhardt *et al.*, 2013; Cornelissen *et al.*, 2001; Ten Hulscher, 2003). Za XAD4 postoji relativno ograničen broj podataka za njegovu upotrebu kao sredstva za procenu biodostupnosti organskih polutanata u sedimentima i zemljištima (Tričković *et al.*, 2008, Patterson *et al.*, 2004). Sa ekonomskog aspekta i aspekta dostupnosti, značajno je ispitati primenu XAD4 za procenu biodostupnosti organskih jedinjenja. Primena ciklodekstrina je takođe dosta dobro ispitana i opisana u literaturi. Njihova prednost u odnosu na čvrste sorbente je jednostavnost i brzina metode, a takođe je pokazano da su CD u potpunosti netoksični za životnu sredinu (Irie and Uekama, 1997; Thompson, 1997; Totterman, 1997; Del Valle, 2003). Njihova efikasnost zavisi od građenja inkluzionih kompleksa. Ukoliko ciklodekstrin ne može da gradi inkluzioni kompleks sa ispitivanim organskim jedinjenjima, on neće biti ni efikasan za procenu njegove biodostupnosti. Najčešće primenjivan ciklodekstrin u studijama biodostupnosti jeste HPCD i za njega postoji niz literaturnih podataka pa je moguće poređenje podataka sa literaturom. Liu *et al.* (2013) su pokazali da je izbor ciklodekstrina značajan sa stanovišta procene efikasnosti procesa, te je stoga značajno ispitati više oblika ovog jedinjenja (β CD, MCD i HPCD). Ovo je naročito bitno s obzirom da je nemodifikovani β CD mnogo dostupniji, čak i kao tehnička hemikalija, u odnosu na dva modifikovana CD, što bi u slučaju da se pokaže da ima podjednako dobru efikasnost znatno olakšalo njegovu primenu u komercijalne svrhe.

Tabela 3.3. Fizičko hemijske osobine odabranih hemijskih agenasa

	Veličina čestica	Gustina (g/cm^3)	Zapremina pora (ml/g)	Veličina pore (Å)	Površina (m^2/g)
XAD4	20-60 mesh	1,02	0,98	100	750
Tenax	60-80 mesh	0,25	2,4	2000	35
	<i>n</i>	<i>R = H ili</i>	<i>Subst.</i> ^a	<i>MW</i> ^b (Da)	<i>Rastvorljivost u vodi</i> (mg/l)
βCD	1	-H	0	1135	18,5
MCD	1	-CH ₃	1,8	1312	> 500
HPCD	1	-CH ₂ CHOHCH ₃	0,65	1400	> 600

^a Prosečan broj supstituenata po jedinici ponavljanja glukoznih jedinica

^b MW molekulska težina

^c Rastvorljivost na 25°C.

3.4. Priprema sedimenta za eksperiment

Priprema sedimenta za određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova i određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova.

Pre početka rada vlažan sediment je homogenizovan, a zatim je spajkovan smešom krizena, pirena i fluorantena. Na 1 kg sedimenta aplikovana je smeša ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika rastvorena u acetonu, a koncentracije su određene naknadno, nakon starenja sedimenta i date su u delu Rezultati i diskusija. Nakon spajkovanja sediment je ostavljen u mraku, dok rastvarač ne ispari, uz povremeno mešanje. U cilju dobijanja što realnijih uslova u matriksu, sediment je ostavljen da stari 30 dana.

Priprema sedimenta za ispitivanje mogućnosti procene potencijalno biodostupnosti frakcije primenom različitih hemijskih agenasa (2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, β -ciklodekstrin i metil- β -ciklodekstrin, smola XAD-4 i TenaxTA).

Za svrhu ispitivanja biodostupnosti i biodegradacije odabranih PAH-ova, sediment je sušen na vazduhu, u mraku, a zatim je na 1 kg sedimenta aplikovana smeša benzo(a)pirena, pirena, fenantrena i krizena u acetonu. Koncentracije ispitivanih PAH-ova dobijene spajkovanjem date su u delu Rezultati i diskusija. Nakon spajkovanja sediment je ostavljen u mraku, dok rastvarač ne ispari, uz povremeno mešanje. U cilju dobijanja što realnijih uslova u matriksu, sediment je ostavljen da stari 30 dana.

3.5. Postavke eksperimenata

Postavka biometara za određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova.

Eksperimenti biodegradacije izvedeni su u 250 ml - modifikovanim Bartha biometrima opremljenim sa posudom sa KOH i hermetički zatvorenim sa gumenim čepovima, slika 3.2. Ispitivana je biodegradacija PAH-ova u uslovima dodatka mikroorganizama (bioaugmentacija), mineralnog medijuma (biostimulacija), surfaktanata (solubilizacija), kao i kombinacije ovih procesa. Za tu svrhu 50 g kontaminiranog sedimenta je odmereno u biometre, a karakteristike svake probe i aplikovane količine destilovane vode, rastvora živa(II)-hlorida (HgCl_2), inokuluma, mineralnog medijuma, i surfaktanata Brij 35, Tween 80 i SDS date su u tabeli 3.4. Istovremeno su rađene i probe sa dejonizovanom vodom i živa(II)-hloridom u cilju praćenja prirodne atenuacije i eventualnih abiotičkih gubitaka ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika u toku eksperimenta. Probe su bioaugmentirane tako da je krajnja koncentracija reprezentativnih grupa mikroorganizama bila oko 10^6 CFU/g sedimenta.



Slika 3.2. Ispitivanje biodegradacije – biometri

Rastvor nutrijenata koji je korišćen kao dodatak u pojedine probe sastojao se od NH_4Cl kao izvora N, a kao izvor P korišćen je $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ puferski rastvor. Rezultujući C:N:P odnos nakon dodatka inokuluma i nutrijenata je bio oko 100:5:0.5. Biometri su se aerisali 2 min svaki dan. Biometri su postavljeni u duplikatima i inkubirani na 30 °C. Eksperiment je trajao 42 dana.

Tabela 3.4. Sastav rastvora i količina rastvora koja se dodaje u sediment biometara

Oznake biometara	DI voda	HgCl_2	Inokulum	Mineralni medijum	Brij 35	Tween 80	SDS
<i>Abiotička kont. (AK)</i>	-	10 ml	-	-	-	-	-
<i>Prirodna atenuacija (PA)</i>	10 ml	-	-	-	-	-	-
<i>Bioaugmentacija (BA)</i>	7,5 ml	-	2,5 ml	-	-	-	-
<i>Biostimulacija (BS)</i>	7,5 ml	-	-	2,5 ml	-	-	-
<i>Bioaugmentacija + Biostimulacija (BB)</i>	5 ml	-	2,5 ml	2,5 ml	-	-	-
<i>Solubilizacija (S3)</i>	5 ml	-	-	-	5 ml	-	-
<i>Solubilizacija (S4)</i>	5 ml	-	-	-	-	5 ml	-
<i>Solubilizacija (S5)</i>	5 ml	-	-	-	-	-	5 ml
<i>Solubilizacija+ Bioaugmentacija+ Biostimulacija (SBB Brij 35)</i>	-	-	2,5 ml	2,5 ml	5 ml	-	-
<i>Solubilizacija+ Bioaugmentacija + Biostimulacija (SBB Tween 80)</i>	-	-	2,5 ml	2,5 ml	-	5 ml	-
<i>Solubilizacija+ Bioaugmentacija+ Biostimulacija (SBB SDS)</i>	-	-	2,5 ml	2,5 ml	-	-	5 ml

Postavka biometara za određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova.

Eksperimenti biodegradacije izvedeni su u 250 ml - modifikovanim Bartha biometrima, slika 3.2, kao i u prethodnom slučaju. Na osnovu dobijenih rezultata prilikom određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova, ponovljeni su određeni eksperimentalni uslovi u biometrima. Ispitivana je biodegradacija PAH-ova u uslovima dodatka mikroorganizama (bioaugmentacija), mineralnog medijuma (biostimulacija), kao i kombinacije ovih procesa. Istovremeno je postavljena i proba sa živa(II)-hloridom u cilju praćenja eventualnih abiotičkih gubitaka ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika u toku eksperimenta. Za tu svrhu 50 g kontaminiranog sedimenta je odmereno u biometre a karakteristike svake probe i aplikovane količine rastvora živa(II)-hlorida (HgCl_2), inokuluma i mineralnog medijuma date su u tabeli 3.5.

Probe su bioaugmentirane tako da je krajnja koncentracija reprezentativnih grupa mikroorganizama bila oko 10^8 CFU/g sedimenta. U probe su dodata dva soja fenantren degradirajućih bakterija (*Prilog 1*) koje su izolovane iz rečnog sedimenta korišćenog u toku eksperimenta. Rastvor nutrijenata koji je korišćen kao dodatak u pojedine probe sastojao se od NH_4Cl , $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 i FeCl_3 . Biometri su postavljeni u duplikatima i inkubirani na 30°C . Eksperiment je trajao 40 dana.

Tabela 3.5. Eksperimentalni uslovi u biometrima

	<i>Abiotička kontrola (AK)</i>	<i>Biostimulacija (BS)</i>	<i>Bioaugmentacija sa inokulumom 1 (BA1)</i>	<i>Bioaugmentacija sa inokulumom 2 (BA2)</i>	<i>Biostimulacija i Bioaugmentacija sa inokulumom 1 (BB1)</i>	<i>Biostimulacija i Bioaugmentacija sa inokulumom 2 (BB2)</i>
<i>Dejonizovana voda</i>	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
<i>Živa(II)-hlorid*</i>	2,5 ml	-	-	-	-	-
<i>Inokulum 1**</i>	-	-	2,5 ml	-	2,5 ml	-
<i>Inokulum 2***</i>	-	-	-	2,5 ml	-	2,5 ml
<i>Mineralni medijum****</i>	-	2,5 ml	-	-	2,5 ml	2,5 ml

* HgCl_2 – 200 mg rastvoreno u 1 l dejonizovane vode

**Inokulum 1– 10^8 CFU g^{-1}

***Inokulum 2– 10^8 CFU g^{-1}

****Mineralni medijum: 2,7 g/l NH_4Cl , 0,1 g/l, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 40 mg/l KH_2PO_4 , 160 mg/l K_2HPO_4 , 5 mg/l FeCl_3

Test fitotoksičnosti. Za ovaj deo eksperimenta, modifikovana metodologija je preuzeta od *Coulon et al. (2010)*, a ispitivana su semena 5 različitih vrsta biljaka (*Cucurbita pepo*, *Cucumis Sativus L.*, *Lactuca sativa L.*, *Zea mays*) često korišćenih u prethodnim studijama fitoremedijacije i testova klijavosti (*Molina-Barahona et al., 2005; Ghanem, 2010*). Svi uzorci su postavljeni u triplicatu. U svaki sud od 100 ml, dodato je 20 g suvog sedimenta i 5 semena ispitivane biljke. Probe su ostavljene na dnevnoj svetlosti na 25 °C da proključaju (10 dana). Sve probe su redovno zalivane. Istovremeno je postavljen i kontrolni sediment bez dodatka semena, kako bi se procenio eventualni abiotički gubitak ispitivanih PAH-ova. Broj proključalih semena je određen nakon 10 dana za svaku vrstu posebno. Rezidualna koncentracija u sedimentu, kao i usvojena količina PAH-ova u semenu biljke, određena je gasnom hromatografijom.

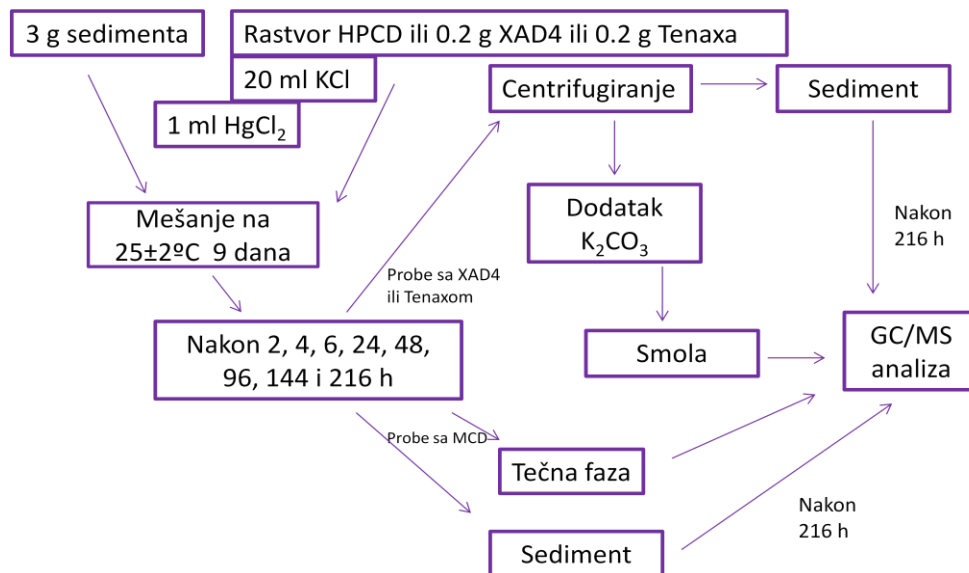
Eksperiment biodostupnosti sa hemijskim agensima - višestepena ekstrakcija (slika 3.3.). Biodostupnost je praćena u toku vremenskog intervala od 216 h primenom čvrstog sorbenta Tenax TA, XAD4 smole (pripremljene na odgovarajući način) i rastvora 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom.

Tenax. U vijale od 40 ml, odmereno je oko 1 g sedimenta, dodato 20 ml 5 mM kalcijum-hlorida pripremljenog sa dejonizovanom vodom, 1 ml 0,02% živa-hlorida i 0,2 g Tenax-TA. Probe su stavljene na mućkalicu na 150 obrtaja po minuti na 25 \pm 2 °C u toku 9 dana. Nakon isteka odgovarajućeg vremena (nakon 2, 4, 6, 24, 48, 96, 144 i 216 h) sorbent je odvajanjem centrifugiranjem celokupnog sadržaja erlenmajera, a u probu je dodata sveža količina sorbenta. Sadržaj PAH-ova je određivan u Tenaxu nakon svakog odvajanja, a nakon 216 sati, određena je i rezidualna koncentracija u sedimentu. Istovremeno je rađena i slepa proba, bez dodatka sorbenta.

XAD4. U vijale od 40 ml, odmereno je oko 1 g sedimenta, dodato 20 ml 5 mM kalcijum-hlorida pripremljenog sa dejonizovanom vodom, 1 ml 0,02% živa-hlorida i 0,2 g XAD4 smole. Probe su stavljene na mućkalicu na 150 obrtaja po minuti na 25 \pm 2 °C u toku 9 dana. Nakon isteka odgovarajućeg vremena (nakon 2, 4, 6, 24, 48, 96, 144 i 216 h) sorbent je odvajanjem centrifugiranjem celokupnog sadržaja erlenmajera, a u probu je dodata sveža količina sorbenta. Da bi se olakšalo odvajanje smole, u uzorke je pre centrifugiranja dodavano oko 1,5 g K₂CO₃ kako bi se povećala gustina vodene faze i smola isplivala na površinu. Smola je zatim izdvojena filtriranjem supernatanta preko filter hartije na Büchner-ovom levku i analizirana na sadržaj PAH-a. Istovremeno je rađena i slepa proba, bez dodatka sorbenta. Nakon 216 sati, određena je i rezidualna koncentracija PAH-ova u sedimentu.

HPCD. U vijale od 40 ml, odmereno je oko 1 g sedimenta, dodato 20 ml 5 mM kalcijum-hlorida pripremljenog sa dejonizovanom vodom, 1 ml 0,02% živa-hlorida i 25 ml 5 mM 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Probe su stavljene na mućkalicu na 150 obrtaja po minuti na 25 \pm 2 °C u toku 9 dana. Nakon isteka odgovarajućeg vremena (nakon 2, 4, 6, 24, 48, 96, 144 i 216 h) vodeni sloj HPCD-a je odvojen pomoću kapalice, a u probu je dodata sveža količina agensa. Sadržaj PAH-ova je određivan u vodenom sloju ekstrahovanom sa

heksanom, nakon svakog odvajanja, a nakon 216 sati, određena je i rezidualna koncentracija u sedimentu. Istovremeno je rađena i slepa proba, bez dodatka agensa.



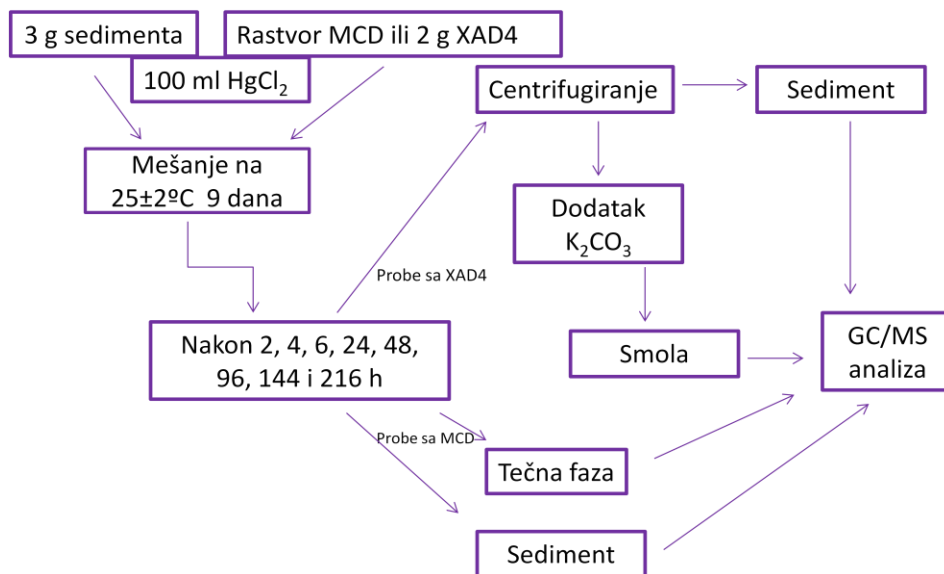
Slika 3.3. Šematski prikaz eksperimenta biodostupnosti sa hemijskim agensima - višestepena ekstrakcija sa HPCD, Tenaxom i XAD4 smolom

Eksperiment biodostupnosti sa hemijskim agensima - jednostepena ekstrakcija upotrebom XAD4 i MCD (slika 3.4.). Biodostupnost je praćena u toku vremenskog intervala od 144 h primenom čvrstog sorbenta XAD4 smole i rastvora metil-β-ciklodekstrina.

XAD4. U vijale od 40 ml, odmereno je oko 3 g sedimenta, dodato 100 ml živa-hlorida koncentracije 300 mg/l (da bi se sprečila mikrobiološka razgradnja organskih jedinjenja tokom eksperimenta) i 2 g XAD4 smole (pripremljene na odgovarajući način). Probe su stavljene na mućkalicu na 150 obrtaja po minuti na 25±2 °C u toku 9 dana. Nakon isteka odgovarajućeg vremena (nakon 2, 4, 6, 24, 48, 96 i 144 h) smola je odvajana centrifugiranjem celokupnog sadržaja erlenmajera. Da bi se olakšalo odvajanje smole, u uzorke je pre centrifugiranja dodavano oko 1,5 g K₂CO₃ kako bi se povećala gustina vodene faze i smola isplivala na površinu. Smola je zatim izdvojena filtriranjem supernatanta preko filter hartije na Büchner-ovom levku. Sediment je, nakon odvajanja smole, podvrgavan određivanju rezidualne koncentracije PAH-ova. Istovremeno je rađena i slepa proba, bez dodatka sorbenta.

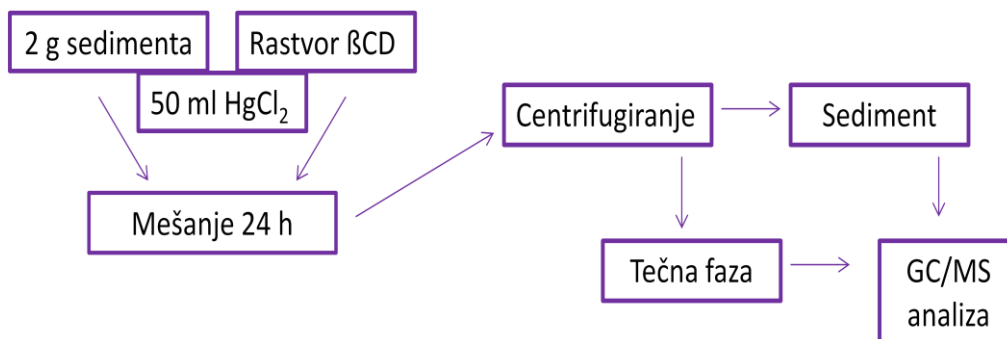
MCD. U vijale od 40 ml, odmereno je oko 3 g sedimenta, dodato 100 ml živa-hlorida koncentracije 300 mg/l (da bi se sprečila mikrobiološka razgradnja organskih jedinjenja tokom eksperimenta) i 25 ml metil-β-ciklodekstrina. Probe su stavljene na mućkalicu na 150 obrtaja po minuti na 25±2 °C u toku 9 dana. Nakon isteka odgovarajućeg vremena (nakon 2, 4, 6, 24, 48, 96 i 144 h) rastvor

ciklodekstina je oddekantovan. Sediment je, zatim, podvrgavan određivanju rezidualne koncentracije PAH-ova. Istovremeno je rađena i slepa proba, bez dodatka agensa.



Slika 3.4. Šematski prikaz eksperimenta upotrebom MCD i XAD4 smole

Eksperiment biodostupnosti sa hemijskim agensima - jednostepena ekstrakcija upotrebom rastvora β -ciklodekstrina (slika 3.5.). Biodostupnost je određena ekstrakcijom sa rastvorom ciklodekstrina. Odmereno je 2 g kontaminiranog sedimenta, 1,5 g ciklodekstrina rastvorenog u dejonizovanoj vodi (potrebno je da odnos ciklodekstrin / organska materija bude min 20) i 50 ml rastvora HgCl_2 (200 mg/l) (kako bi se sprečila mikrobiološka razgradnja organskih jedinjenja tokom eksperimenta) u erlenmajer od 100 ml i mućkano 24 h, nakon toga suspenzija je centrifugirana i određena je rezidualna koncentracija PAH u sedimentu. Frakcija koja je zaostala u čvrstoj fazi sedimenta nakon ekstrakcije ciklodekstrinom, smatra se slabo biodostupnom.



Slika 3.5. Šematski prikaz eksperimenta upotrebom β CD

3.6. Metode ispitivanja sedimenata

Granulometrijski sastav. Određivanje raspodele čestica prema veličini u sedimentu i zemljištu - granulometrijski sastav vrši se prema metodi ISO 11277:2009. Odmeriti oko 30 g sedimenta, prosejati kroz sito od 2 mm i izmeriti frakciju koja je prošla kroz sito. U visoku čašu u kojoj se nalazi frakcija sedimenta manja od 2 mm, dodati 30 ml dejonizovane vode i 30 ml vodonik-peroksida, kako bi se razgradila organska materija, polako mešati staklenim ili plastičnim štapićem, ukoliko uzorak peni dodati nekoliko ml metanola. Prekriti čašu i ostaviti da stoji preko noći, zatim blago zagrevati čašu na rešou, voditi računa da sadržaj ne upari do suva dodatkom vode ako je neophodno. Pustiti da blago ključa uzorak sve dok se izdvajaju mehurovi od dekompozicije vodonik peroksida. Ukoliko još postoji organske materije ohladiti uzorak i postupak ponoviti, za uzorke koji sadrže puno organske materije potrebno je i do 2-3 ovakva tretmana. Nakon destrukcije organske materije uzorak kvantitativno preneti u kivete za centrifugu i centrifugirati uzorak minimum 15 min na 3000 obrtaja/min kako bi se dobio bistar supernatant. Nakon centrifugiranja odekantovati supernatant kako bi se uklonile prisutne soli i gips iz uzorka, ostatku uzorka nakon centrifugiranja dodati dejonizovanu vodu i izmešati uzorak ponoviti centrifugiranje, u supernatantu izmeriti elektroprovodljivost da li je manja od 0,4 dS/m. Ukoliko je provodljivost veća ponavljati postupak ispiranja se dejonizovanom vodom dok se ne dobije provodljivost manja od 0,4 dS/m. Nakon uklanjanja soli i gipsa uzorak iz kiveta za centrifugu kvantitativno preneti u plastičnu bocu od oko 300 ml i dodati vode do 150-200 ml, zatim dodati 25 ml $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Uzorak staviti na mućkalicu i mešati 18 h. Uzorak koji se nalazi u cilindru za pipet metodu dopuniti vodom do 500 ml ili do 1000 ml u zavisnosti od zapremine cilindra. Izmeriti temperaturu prostorije gde se vrši određivanje. Izmešati uzorak mućkanjem cilindra. Postaviti cilindar uspravno i odmah uključiti štopericu. Oko 15 sekundi pre nego što treba da se otpipetira uzorak uroniti pipetu do određene dubine u uzorak pažljivo. Odpipetirati 25 ml uzorka o roku od oko 10 sekundi u određenom vremenskom intervalu u zavisnosti od određivane veličine čestica i temperature okoline prema tabeli 3.6. Odpipetirane uzorke staviti u izmereni lončić za žarenje, upariti do suva i sušiti u sušnici na 105-110 °C do konstantne mase.

Tabela 3.6. Vremena pipetiranja i veličine čestica (d_p) na dubini uzorkovanja od 10 cm

T (°C)	Vreme, nakon mešanja, za početak uzorkovanja								
	I uzoraka		II uzorak		III uzorak		IV uzorak		
	min	s	min	s	min	s	h	min	s
20	0	56	4	38	51	35	7	44	16
21	0	54	4	32	50	27	7	34	4
22	0	53	4	26	49	19	7	23	53
23	0	52	4	19	48	8	7	13	13
24	0	51	4	13	47	0	7	3	2
25	0	49	4	7	45	52	6	52	50
26	0	48	4	2	44	53	6	44	2
27	0	47	3	57	43	58	6	35	42
28	0	46	3	52	42	59	6	26	53
29	0	45	3	47	42	3	6	18	33
30	0	44	3	41	41	5	6	9	45
dp (mm)	0,063		0,020		0,006		0,002 GLINA		
a Dubina uzorkovanja 200 mm									

Sadržaj vlage je određivan metodom SRPS EN 12880:2007 odmeravanjem između 5-10 grama vlažnog homogenizovanog sedimenta u lončić za žarenje, koji je zatim sušen najmanje 2 h na 105 °C (tj. do konstantne mase). Razlika između prve i druge mase predstavlja sadržaj vlage.

Sadržaj organske materije je određivan metodom SRPS EN 12879:2007, tako što je prethodno osušen sediment (5-10 g) žaren 3 h na 550 °C (do konstantne mase), nakon čega je ohlađen u eksikatoru i izmerena mu je masa. Razlika između dobijene mase i mase nakon sušenja predstavlja sadržaj organske materije.

Priprema XAD4 smole za eksperiment. XAD4 smola je pripremljena za eksperiment desorpcije sukcesivnim šestočasovnim Soxhlet-ovim ekstrakcijama sa nekoliko rastvarača: vodom, metanolom, smešom heksan-aceton (1:1), metanolom i na kraju vodom. Prečišćavanje je rađeno kako bi se uklonili eventualno prisutni ostaci monomera koji mogu uticati na adsorpcione osobine smole.

GC-MS analiza sedimenta. PAH-ovi su ekstrahovani iz sedimenta metodom EPA3550b tehnikom ultrazvuka smešom aceton/heksan (1:1). Elementarni sumpor je uklonjen korišćenjem bakra prema proceduri EPA 3660b. Uzorci su frakcionisani preko silika gela po proceduri EPA3630c u staklenoj koloni. GC/MS analiza urađena je prema metodi EPA8270C, na aparatu Agilent 7890A gasnom hromatografu sa 5975C MSD masenim spektrometrom na HP-5MS koloni (J&W Scientific) sa fenantren d-10 kao internim standardom. Koncentracija PAHova je izračunata koristeći metodu internog standard. Uparene frakcije rekonstituišu se u 0,5 ml rasvora IS Fenantrena-d10 u smeši metilen-hlorid/heksan (1:1), nakon čega sledi njihova analiza na gasnom hromatografu sa masenim detektorom. Joni koji se prate, tzv. target joni navedeni su u tabeli 3.7. Takođe, u tabeli 10 navedene su i granice detekcije metode (MDL) i procenjeni limit kvantitacije (PQL) vrednosti za svaki PAH.

Tabela 3.7. Target joni, MDL i PQL za pojedinačne predstavnike PAH-ova

<i>PAH</i>	<i>Target joni</i>	<i>MDL</i>	<i>PQL</i>
<i>Naftalen</i>	128, 102, 64	2,58	6,46
<i>Acenaftilen</i>	153, 98, 76	2,67	6,69
<i>Acenaften</i>	153, 76, 63	1,55	3,88
<i>Fluoren</i>	166, 139, 82	4,26	10,6
<i>Fenantren</i>	178, 152, 89	3,70	9,26
<i>Antracen</i>	178, 152, 89	4,31	10,8
<i>Fluoranten</i>	202, 174, 101	3,92	9,80
<i>Piren</i>	202, 174, 101	3,97	9,92
<i>Krizen</i>	228, 114, 200	3,95	9,88
<i>Benzo(a)antracen</i>	228, 113, 200	4,43	11,1
<i>Benzo(b)fluoranten + Benzo(k)fluoranten</i>	252, 126, 113	3,69	9,23
<i>Benzo(a)piren</i>	252, 126, 113	4,45	11,1
<i>Benzo(a,h)antracen + Indeno(1,2,3-cd)piren</i>	276, 278, 138	4,21	10,5
<i>Benzo(g,h,i)perilen</i>	276, 277, 138	4,77	11,9

Brojnost bakterija u cilju određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova i određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova.

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

Izolacija i identifikacija PAH degradirajućih bakterija u cilju određivanja optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova.

PAH degradirajuće bakterije izolovane su iz rečnog sedimenta. Sediment (10 g) dodat je u 100 ml mineralnog medijuma uz dodatak 100 mg/l fenantrena i 1% Tween80, kao solubilizacionog agensa i inkubiran na orbitalnom šejkeru na 150 obrtaja u minutu i 30°C u mraku (Moscoso et al., 2012). U sastav mineralnog medijuma ulaze sledeće komponente: K₂HPO₄·3H₂O 4,25 g/l, NaH₂PO₄·3H₂O 1 g/l; NH₄Cl 2 g/l; MgSO₄·7H₂O 0,2 g/l; FeSO₄·7H₂O 0,012 g/l, MnSO₄·7H₂O 0,003 g/l; ZnSO₄·7H₂O 0,003 g/l;

$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g/l (Yuan *et al.*, 2001). Svake nedelje se 10 ml kulture prenese u 100 ml svežeg mineralnog medijuma istog sastava. Konstantni transfer se vrši 4 puta. Posle svake nedelje, kultura se inokuliše na Petri ploče agarizovanog mineralnog medijuma (15 g/l agara) sa fenantrenom i inkubira se 7-14 dana na 30 °C u mraku. Mineralni medijum sa fenantrenom se priprema razlivanjem 1 ml rasvora fenantrena u acetonu (10 µg/ml) po površini agara. Na ovaj način pripremljen medijum se ostavi preko noći da stoji kako bi aceton ispario, a zatim se dnevno prati da li postoje zone prosvetljenja oko kolonija. Kolonije sa prosvetljenim zonama se presejavaju na svež mineralni medijum sa fenantrenom sve dok se ne dobiju uniformne kolonije (Zhou *et al.*, 2008). Čiste fenantren degradirajuće kolonije presejane su na hranljivi agar (Torlak, Srbija) i sačuvane su na -70°C i -20 °C u hranljivom bujonu (Torlak, Srbija) sa 20% glicerola. Identifikacija je urađena na sistemu Vitek 2 (Biomérieux, France) po uputstvima proizvođača. Dva soja istog roda *Stenotrophomonas* sa različitim biohemijskim osobinama su identifikovana (Prilog 1). Biomasa za inokulaciju dobijena je suspendovanjem rasta bakterija sa hranljivog agara. Suspenzija je napravljena u 0,9% NaCl i podešena na gustinu od 0,5 McFarland jedinica. Za bioaugmentaciju, 2,5 ml ove suspenzije je dodato. Broj bakterija u inokulumu bio je $4,2 \times 10^9$ CFU/ml, dok je konačna koncentracija po gramu sedimenta iznosila $2,1 \times 10^8$ CFU/ml.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova

U prvoj fazi eksperimenta korišćen je sediment sa niskim sadržajem gline čije je karakterizacija data u *tabeli 4.1.*, sa dodatkom inokuluma, dok je za drugi deo eksperimenta korišćen sediment sa sadržajem gline od 24% i organskom materijom do 10% (*tabela 4.4.*), sa dodatkom inokuluma (dva soja mikroorganizama) izolovanog iz ispitivanog sedimenta, koji ciljano razgrađuje PAH-ove (fenantren degradirajuće bakterije).

U prvom delu izučavana je mikrobiološka degradacija tri policiklična aromatična ugljovodonika sa istim brojem prstenova (pirena, krizena i fluorantena) i ispitivani su faktori koji utiču na njihovu biodegradabilnost (prirodna atenuacija, bioaugmentacija, dodatak mineralnog medijuma, solubilizacija - dodatak surfaktanata), kao i procesi kojima podležu, njihova sudbina i ponašanje u sedimentu pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima. U drugom delu eksperimenta (u odnosu na dobijene rezultate u prvom delu eksperimenta) ispitivana je biodegradacija fenantrena, pirena, krizena i benzo(a)pirena odabranim mikroorganizmima i ispitivani su faktori koji utiču na njihovu biodegradabilnost (bioaugmentacija, biostimulacija i kombinacija ova dva procesa).

4.1.1. Određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije fluorantena, pirena i krizena

Eksperimenti biodegradacije izvedeni su u 250 ml - modifikovanim *Bartha* biometrima opremljenim sa posudom sa KOH i hermetički zatvorenim sa gumenim čepovima, *slika 3.2.* Ispitivana je biodegradacija PAH-ova u uslovima prirodne atenuacije, dodatka mikroorganizama (bioaugmentacija), mineralnog medijuma (biostimulacija), surfaktanata (solubilizacija), kao i kombinacije ovih procesa. Kombinacija i količina aplikovanih rastvora data je u *tabeli 3.4.*

Karakterizacija sedimenta na početku (originalni sediment) i na kraju eksperimenta u pogledu granulometrijskog sastava, sadržaja vlage i organske materije je prikazana u *tabeli 4.1.* Sadržaj organske materije u originalnom uzorku sedimenta je iznosio 2,9%, dok je sadržaj gline 0,22%. Ovi rezultati pokazuju da organske zagađujuće materije koje eventualno dospeju u ovakav sediment, neće imati dovoljno organske materije da se sa njom kompleksiraju i/ili gline da se na njoj sorbuju. Samim tim zagađujuće materije dospele u ovakvu sredinu su dostupne za usvajanje od strane biote i njihov dalji prenos putem lanca ishrane. S obzirom na toksičnost i kancerogenost PAH-ova, ovakvi sedimenti predstavljaju "najgoru moguću situaciju" i zbog toga se na njihovo uklanjanje iz ovakvih sistema mora obratiti posebna pažnja.

Tabela 4.1. Procentualni sadržaj vlage, gline i organske materije u originalnom i tretiranom sedimentu

Oznaka uzorka	Originalni sediment	AK	S3	S4	S5	BA	BS	BB	SBB Brij 35	SBB Tween 80	SBB SDS
Vlaga (%)	34	49	53	50	49	49	45	50	43	49	49
Organska materija (%)	2,9	2,5	2,5	2,5	2,5	3,4	2,8	2,5	3,0	3,1	2,7
Glina (%)	0,22										

4.1.1.1. Organski profil sedimenta

Jedinjenja detektovana GC-MS kvalitativnom analizom ekstrakta sedimenta uzetog pre procesa bioremedijacije (originalni sediment), i nakon procesa bioremedijacije su prikazana u *tabeli 4.2*. Primetno je da je najviše jedinjenja (48) detektovano u uzorku pre početka eksperimenta (uzorak sa oznakom M). Nakon eksperimenta biodegradacije se vidi smanjenje broja detektovanih jedinjenja što se objašnjava mikrobiološkom i hemijskom degradacijom istih. Najmanje smanjenje broja detektovanih jedinjenja dobijeno je u abiotičkoj kontroli (AK), što je posledica odsustva mikrobiološke degradacije ovih jedinjenja. Kod proba BA, BS, i BB se uočava odsustvo svih alkana, alkena i alkina koji su detektovani pre početka eksperimenta što se objašnjava njihovom mikrobiološkom degradacijom, dok je manji broj alkana, alkena i alkina degradiran u probama SBB Brij 35, SBB Tween 80 i SBB SDS. Na početku eksperimenta je detektovano šest jedinjenja iz grupe alkohola i etara. Takođe u probama BA, BS i BB nije detektovana većina jedinjenja, dok se u probama SBB Brij 35, SBB Tween 80 i SBB SDS, detektovalo nešto više jedinjenja u odnosu na probu bioaugmentacije, biostimulacije i kombinacije bioaugmentacije i biostimulacije. Jedinjenje koje se degradiralo u skoro svim probama (S3, S4, BA, BS, BB, SBB Brij 35, SBB Tween 80 i SBB SDS) je izopropil alkohol. Iz grupe aldehida i ketona je detektovano sedam jedinjenja. Povećan broj detektovanih jedinjenja iz ove grupe se objašnjava nastankom metaboličkih intermedijera kod metaboličkih procesa ili hemijskih degradacija. Broj detektovanih jedinjenja ftalata i toluena (derivat benzena) praktično ostaje isti i na početku i na kraju eksperimenta. Organske kiseline, estri i soli organskih kiselina su kao i alkoholi, ketoni i etri produkti metabolizma organske materije, i iz tog razloga se i detektuju u većini proba.

Policiklični aromatični ugljovodonici su konstantno detektovani u svim uzorcima tretiranog sedimenta što je posledica njihove male biodegradabilnosti. Zbog njihove slabe razgradnje detektovani su PAH-ovi sa približno istim brojem prstenova (4, 5 i 6) na početku i na kraju eksperimenta. Dodatno, u tretiranom sedimentu su detektovani spajkovani PAH-ovi, koji su teže usvojivi (piren, krizen i fluoranten), što je i očekivano obzirom da je ispitivan sediment

dotatno tretiran visokim koncentracijama ovih jedinjenja. U originalnom sedimentu je detektovano četiri predstavnika organoazotnih jedinjenja.

Tabela 4.2. Organski profil originalnog i tretiranog sedimenta

Oznaka uzorka	M	Uzorci sedimenta tretirani 42 dana									
		AK	S3	S4	S5	BA	BS	BB	SBB Brij 35	SBB Tween 80	SBB SDS
Alifatični i ciklični alkani, alkeni i alkini											
Cikloheksan	+		+		+						
1-Etilenoksi butan	+	+	+	+						+	+
Dekan	+	+		+							+
undekan	+	+	+	+	+					+	
4-Metil-dekan	+		+		+				+		+
Dodekan	+	+							+		
Tridekan	+	+								+	+
1-Tridekan	+			+	+					+	
Tetradekan	+	+	+	+	+					+	
Pentadekan	+	+	+	+	+				+	+	+
Heksadekan	+	+	+	+	+				+	+	+
1-Heksadekan	+		+	+	+				+	+	
Heptadekan	+		+	+	+				+		+
Eikosan	+	+	+	+	+				+	+	+
Alkoholi, etri											
2-Etil-1-heksanol	+	+	+	+							+
Izopropil alkohol	+	+		+							
1-Undekanol	+		+	+	+	+			+	+	+
1-Heksadekanol	+	+		+		+				+	
Benzil-alkohol	+	+			+	+	+		+	+	+
2-Butoksietanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aldehidi, ketoni											
Propanal	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
2-Heksanon	+	+	+	+	+	+		+	+		
2-Butanon	+		+		+		+		+	+	+
4-Metil-3-penten-2-on	+				+		+	+			
2-Heptanon	+	+					+	+	+	+	+
Benzofenon	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Cikloheksanon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ftalati											
Bis(2-etilheksil)-ftalat	+	+	+	+	+	+			+	+	+
Dibutil-ftalat	+	+	+	+	+	+				+	+
Supstituisani benzeni i derivati benzena											
Toluen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Organske kiseline, estri i soli organskih kiselina											
Tetradekanska kiselina	+		+	+	+						
n-Heksadekanska kiselina	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Metil estar heksadekanske kiseline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metil estar oktadekanske kiseline	+			+	+	+	+				+

Tabela 4.2. Organski profil originalnog i tretiranog sedimenta (nastavak)

Oznaka uzorka	M	Uzorcima sedimenta tretirani 42 dana									
		AK	S3	S4	S5	BA	BS	BB	SBB Brij 35	SBB Tween 80	SBB SDS
Butil estar sirćetne kiseline	+			+	+		+	+	+		+
2-Metilpropil estar sirćetne kiseline	+	+	+	+	+		+				+
Metil estar (z)-9-oktadekanske kiseline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH)											
Fluoranten	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenantren	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Metil-fenantren	+								+		+
9-Metil-fenantren	+			+	+						
Krizen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Piren	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Benzo(a)antracen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Organoazotna jedinjenja											
2-Metil-2-propanamin	+	+	+	+	+	+			+	+	
Trimetilamin	+		+	+	+						
Nitro-cikloheksan	+	+	+	+	+				+	+	+
Piperidin	+		+	+	+	+					
Ukupan broj detektovanih jedinjenja pre eksperimenta	48	35	33	39	39	22	19	17	30	31	34

4.1.1.2. Efikasnost uklanjanja ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika

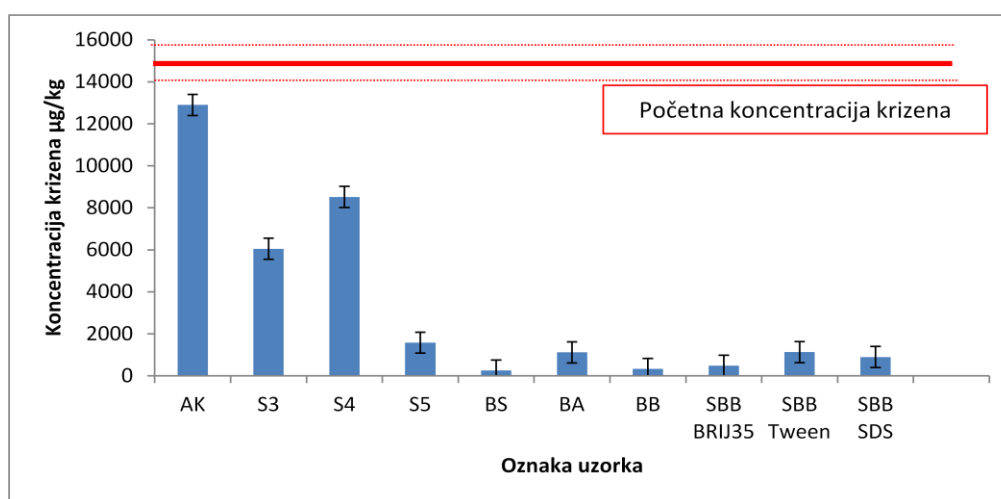
Tokom biodegradacionog respirometrijskog eksperimenta u trajanju od 42 dana procenat biorazgradnje krizena, pirena i fluorantena je bio u opsegu od 0 do 98,2% (tabela 4.3). Za biodegradaciju krizena dodatak samog surfaktanta se nije pokazao kao optimalno rešenje.

Tabela 4.3. Procenti razgradnje krizena, pirena i fluorantena nakon 42 dana respirometrijskih eksperimenata

% Biorazgradnje PAH-ova	Ispitivani tretmani sedimenta									
	AK	S3	S4	S5	BA	BS	BB	SBB Brij 35	SBB Tween 80	SBB SDS
Krizen	11,8	58,8	42,0	89,2	92,4	98,2	97,7	96,7	92,3	93,9
Piren	0	20,2	46,3	22,8	68,7	88,7	85,8	86,7	66,4	63,0
Fluoranten	24,1	78,1	69,5	77,5	90,7	97,6	96,7	97,0	90,7	90,2

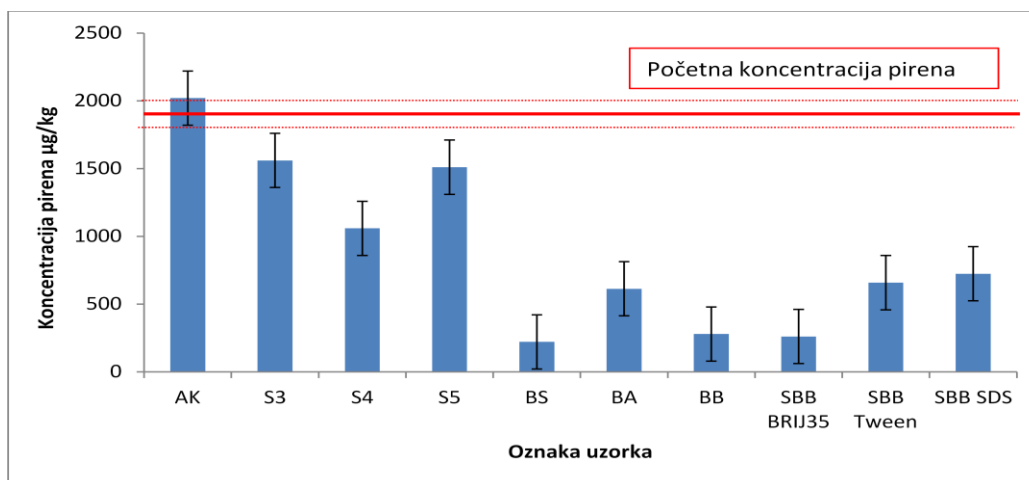
U probama u kojima su korišteni surfaktanti Brij 35 i Tween 80 (S3 i S4), procenat razgradnje je iznosio 58,8% i 42,0%. Sa druge strane razgradnja krizena u probi S5 gde se koristi surfaktant SDS je bila z 89,2%.

Procenat biorazgradnje se vidno poboljšava dodatkom inokuluma i mineralnog medijuma pored samih surfaktanata i tad procenat biorazgradnje raste do 96,7% u probi SBB BRIJ 35 što se i uočava na *slici 4.1*. Najveći procenat biorazgradnje krizena je bio u probi gde se vršila biostimulacija mikroorganizama mineralnim medijumom (BS) i u ovoj probi je procenat razgradnje iznosio 98,2%, što se objašnjava time da autohtona mikroflora poseduje degradacioni potencijal za krizen, ali ne i dovoljan sadržaj nutrijentnih materija za njegovu biodegradaciju.



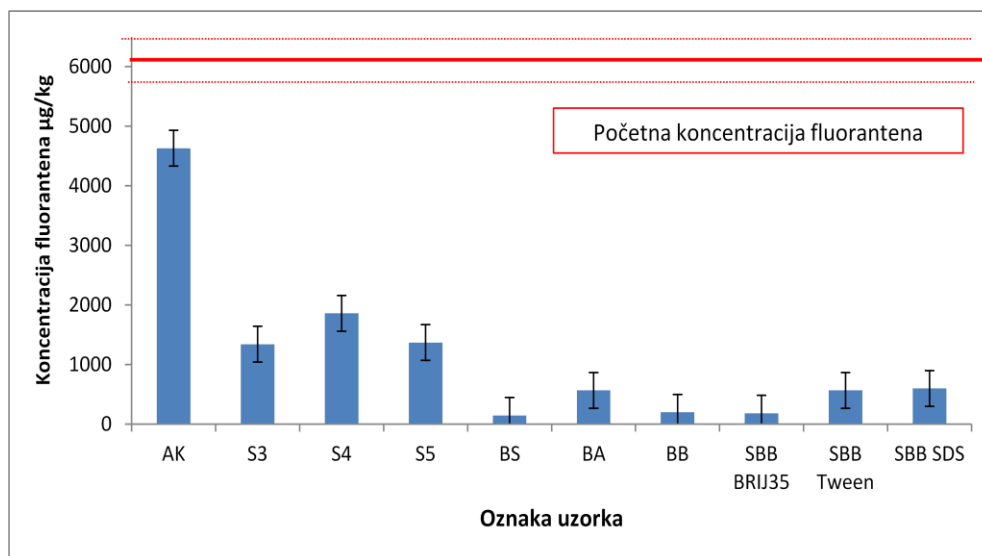
Slika 4.1. Koncentracije krizena pre i nakon eksperimenta biodegradacije

Uočava se da se piren (*slika 4.2*) najmanje degradirao u odnosu na krizen i fluoranten (*slika 4.3*). Međutim, primećuje se da dodatak mineralnog medijuma poboljšava biodegradaciju pirena, znatno bolje i od proba sa solubilizacijom, biostimulacijom i bioatenuacijom. Od surfaktanata koji su korišćeni najbolje rezultate daje surfaktant Brij 35 gde je procenat razgradnje 86,7% kad je u kombinaciji sa biostimulacijom i bioaugmentacijom, dok je procenat razgradnje kad se koristi sam surfaktant Brij 35 svega 20,2% (*slika 4.2*). Kao što je slučaj i kod krizena, najveći procenat biorazgradnje je detektovan kod probe BS 88,7%.



Slika 4.2. Koncentracije pirena pre i posle eksperimenta biodegradacije

Slična situacija kao kod krizena javlja se kod fluorantena (slika 4.3) gde su najveći procenti biorazgradnje uočeni u probama biostimulacije (97,6%) i kombinacije bioaugmentacije i biostimulacije (96,7%). Dodatak samog surfaktanta se takođe nije pokazao kao optimalno rešenje jer je u probama S3, S4 i S5 u kojima su korišćeni surfaktanti Brij 35, Tween 80 i SDS procenat razgradnje bio 78,1%, 69,5%, odnosno, 77,5%, što je manje u odnosu na 97,0%, 90,7% i 90,2% kad se pored surfaktanata aplikuje mineralni medijum i inokulum.



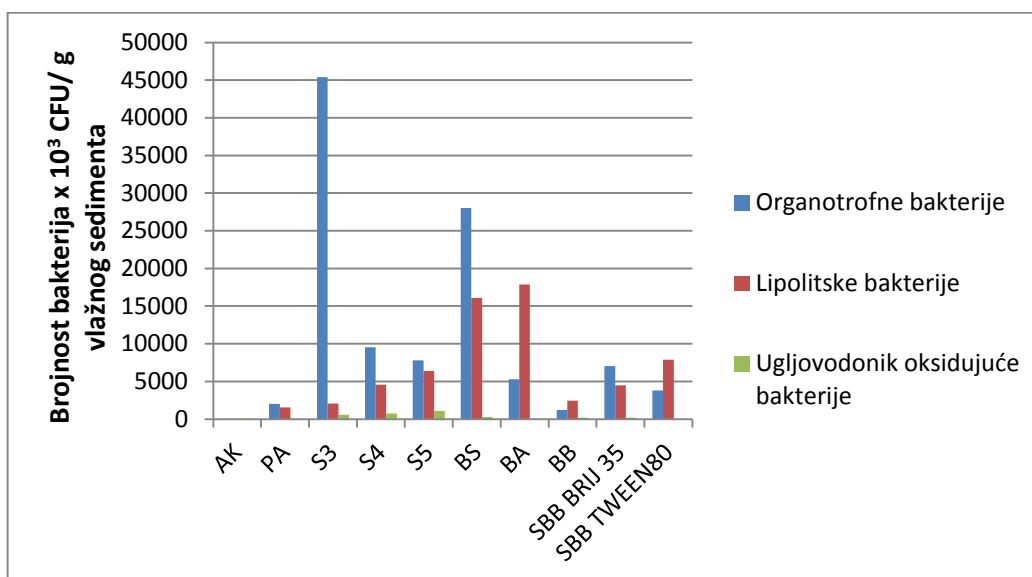
Slika 4.3. Koncentracija fluorantena pre i posle eksperimenta biodegradacije

Najmanji procenti biorazgradnje sva tri PAH-a su dobijeni kod proba gde su se koristili sami surfaktanti (S3, S4 i S5). Znatno rast biodegradacije se uočava kod proba sa biostimulacijom, bioaugmentacijom i njihovom kombinacijom (BS, BA i BB). Ovakvi rezultati govore u prilog tome da se bolji uslovi degradacije postižu dodatkom inokuluma i mineralnog medijuma, a ne

samo dodatkom solubilizanta. *Pantsyrnaya et al. (2011)* su pokazali da se sa povećanjem temperature na 60°C povećava i efikasnost biodegradacije, dok su *Hadibarata and Tachibana (2009)* pokazali da se u prisustvu izolovanih mikroorganizama i surfaktanata postiže bolja biodegradacija krizena. Generalno, najveći procenat biorazgradnje je pokazao fluoranten, što se može objasniti njegovim fizičko-hemijskim osobinama. Procenat biorazgradnje pirena je bio nešto manji u odnosu na krizen, ali dobijeni procenti se slažu sa ranijim studijama (*Nieman et al., 2001; Hadibarata and Tachibana, 2009*).

4.1.1.3. Mikrobiološka karakterizacija procesa bioremedijacije u sedimentima

Promena brojnosti ispitivanih grupa bakterija u sedimentima spajkovanim odabranim policikličnim aromatičnim ugljovodonicima u toku eksperimenta prikazana je na slici 4.4. Mikrobiološke analize potvrdile su da je bakterijska populacija u posmatranim sedimentima bila uključena u procese biodegradacije odabranih organskih jedinjenja, pošto je njihova brojnost čak i na kraju eksperimenta bila zadovoljavajuća (*USEPA, 1995*).



Slika 4.4. Brojnost mikroorganizama pri različitim eksperimentalnim uslovima

Na početku eksperimenta detektovana je brojnost reda veličine 10^6 CFU/g vlažnog sedimenta za sve tri grupe ispitivanih mikroorganizama u svim probama, dok je na kraju eksperimenta brojnost mikroorganizama bila je veličine 10^3 CFU/g vlažnog sedimenta.

Brojnost ispitivanih mikroorganizama na početku eksperimenta iznosila je 72×10^6 CFU/g vlažnog sedimenta za organotrofe, 25×10^6 CFU/g vlažnog sedimenta za lipolitske bakterije i 26×10^6 CFU/g vlažnog sedimenta za ugljovodnik oksidujuće mikroorganizme. Broj mikroorganizama na kraju

eksperimenta prikazan je na *slici 4.4*. Broj mikroorganizama u abiotičkoj kontroli je bio zanemarljiv usled dodatka živa(II)-hlorida koji je inhibirao njihov rast.

4.1.2. Određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije fenantrena, pirena, krizena i benzo(a)pirena

Eksperimenti biodegradacije izvedeni su u 250 ml - modifikovanim *Bartha* biometrima opremljenim sa posudom sa KOH i hermetički zatvorenim sa gumenim čepovima, *slika 3.2*. Ispitivana je biodegradacija PAH-ova u uslovima prirodne atenuacije, dodatka mikroorganizama (bioaugmentacija), mineralnog medijuma (biostimulacija), kao i kombinacije ovih procesa. Kombinacija i količina aplikovanih rastvora data je u *tabeli 3.5*. Za svrhe ovog ispitivanja vršena je izolacija PAH degradirajućih bakterija.

Karakterizacija sedimenta na početku eksperimenta u pogledu granulometrijskog sastava, sadržaja vlage i organske materije, kao i spajkovanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa različitim brojem prstenova je prikazana u *tabeli 4.4*. Sadržaj organske materije u uzorku sedimenta je iznosio 8,5 %, dok je sadržaj gline 24,7 %. Eksperiment biodegradacije sproveden je na sedimentu spajkovanom sa 4 policiklična aromatična ugljovodonika (fenantren, piren, krizen i benzo(a)piren), koji su odabrani kao predstavnici PAH-ova sa 3, 4 i 5 prstena. Biodegradacija pojedinih komponenti zavisi od prisustva mikroorganizama koji su sposobni da degradiraju ovakvu vrstu organskog zagađenja, ali i od prisustva drugih faktora koji mogu limitirati proces biodegradacije. Jedinjenja detektovana GC-MS kvalitativnom analizom ekstrakta sedimenta su prikazana u *tabeli 4.5*. U uzorku sedimenta detektovano je ukupno 41 jedinjenje. Detektovano je 16 ugljovodonika, 5 jedinjenja iz grupe alkohola i etara i 2 jedinjenja iz grupe organskih kiselina, estara i soli organskih kiselina. Takođe, detektovani su svi spajkovani policiklični aromatični ugljovodonici, šest jedinjenja iz grupe aldehida, ketona i fenola, kao i 1 organskoazotno jedinjenje i tri jedinjenja ftalata.

Tabela 4.4. Karakterizacija sedimenta

	Izmerena vrednost
Glina (%)	24,0
Vlaga (%)	70,0
Organska materija (%)	8,50
Fenantren (µg/kg)	2161
Piren (µg/kg)	3046
Krizen (µg/kg)	2394
Benzo(a)piren (µg/kg)	361,5

Tabela 4.5. Organski profil sedimenta nakon spajkovanja

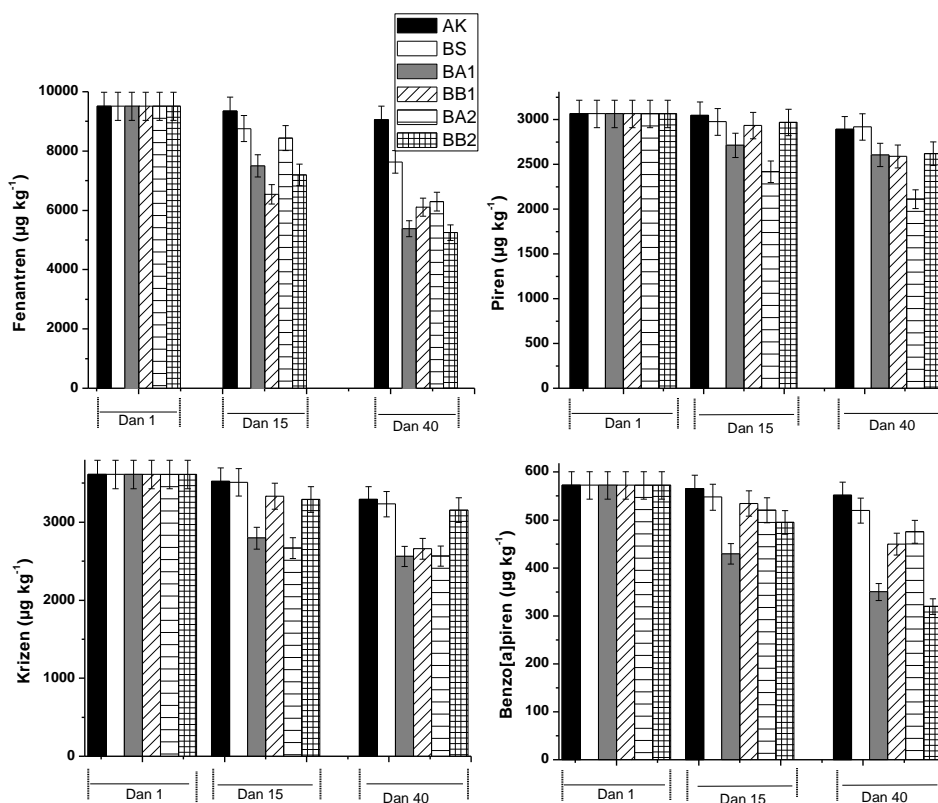
Ugljovodonici	Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH)
Dekan 2-Metil-dekan 4-Metil-dekan Dodekan Undekan Tridekan Tetradekan 2,6,10,14-Tetrametil-pentadekan Pentadekan Heksadekan Heptadekan Oktadekan Eikosan Heneikosan Tetrakosan Skvalen	Fenantren Naftalen Antracen Krizen Piren Benzo[a]piren Fluoranten Fluoren
	Aldehidi, ketoni, fenoli
	Benzaldehid Acetofenon Benzofenon Propanal Bis-2,4-(1,1-dimetiletil)-fenol m-terc-Butil-fenol
Alkoholi, etri	Ftalati
1-Heksadekanol 1-Undekanol 2-Butoksietanol Benzil alkohol 2-Etil-1-Heksanol	Bis(2-etilheksil)-ftalat Dietil-ftalat Dibutil-ftalat
Organske kiseline, estri i soli organskih kiselina	Organoazotna jedinjenja
Heksadekanska kiselina Bis (2-metilpropil) estar 1,2 Benzendikarboksilne kiseline	Benzotiazol

4.1.2.1. Efikasnost uklanjanja ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Tokom biodegradacionog eksperimenta u trajanju od 40 dana smanjenje koncentracije fenantrena, pirena, krizena i benzo(a)pirena dato je na *slici* 4.5. Smanjenje koncentracije ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika u abiotičkoj kontroli je zanemarljivo i kretalo se od 4-9%, dokazujući da u toku eksperimenta abiotički gubitak nije imao značajan uticaj na efikasnost uklanjanja ispitivanih PAH-ova. Dobijeni rezultati su pokazali da biostimulacija bez dodatka inokuluma uopšte nije dovela do značajnijeg smanjenja u pogledu koncentracije policikličnih aromatičnih ugljovodonika u sedimentu. Maksimalni biodegradacioni potencijal za fenantren postignut je u tretmanu biostimulacije (BS), oko 20%, dok su ostali tretmani pokazali međusobno sličnu efikasnost. Optimalni tretman za degradaciju pirena bio je tretman bioaugmentacije sa inokulumom 2 (BA2) (31%). Što se tiče krizena, slični rezultati dobijeni su za tretmane bioaugmentacije sa inokulumom 1 (BA1) (29%), inokulumom 2 (BA2) (29%) i tretmanom biostimulacije i bioaugmentacije sa inokulumom 1 (BB1) (26%). Biodegradacija benzo(a)pirena u tretmanima biostimulacije i bioaugmentacije sa inokulumom 2 (BB2) i bioaugmentacije sa inokulumom 1

(BA1) bili su 44% i 39%, respektivno. Kao što se uočava, maksimalni biodegradacioni potencijal posmatranih PAH-ova različitih osobina, postignut je u različitim tretmanima, ali se može generalizovati nekoliko zaključaka:

- u cilju biodegradacije ispitivanih PAH-ova u datom sedimentu neophodno je primeniti bioaugmentaciju,
- kao što sama biostimulacija nije dovela do uklanjanja PAH-ova, tako ni u kombinaciji sa bioaugmentacijom nije došlo do povećanja efikasnosti bioaugmentacije (čak je dolazilo i do negativnog efekta), osim u slučaju tretmana benzo(a)pirena sa inokulumom 2,
- ista ili bolja efikasnost uklanjanja fenantrena, krizena i benzo(a)pirena je postignuta bioaugmentacijom inokulumom 1, a pirena inokulumom 2.

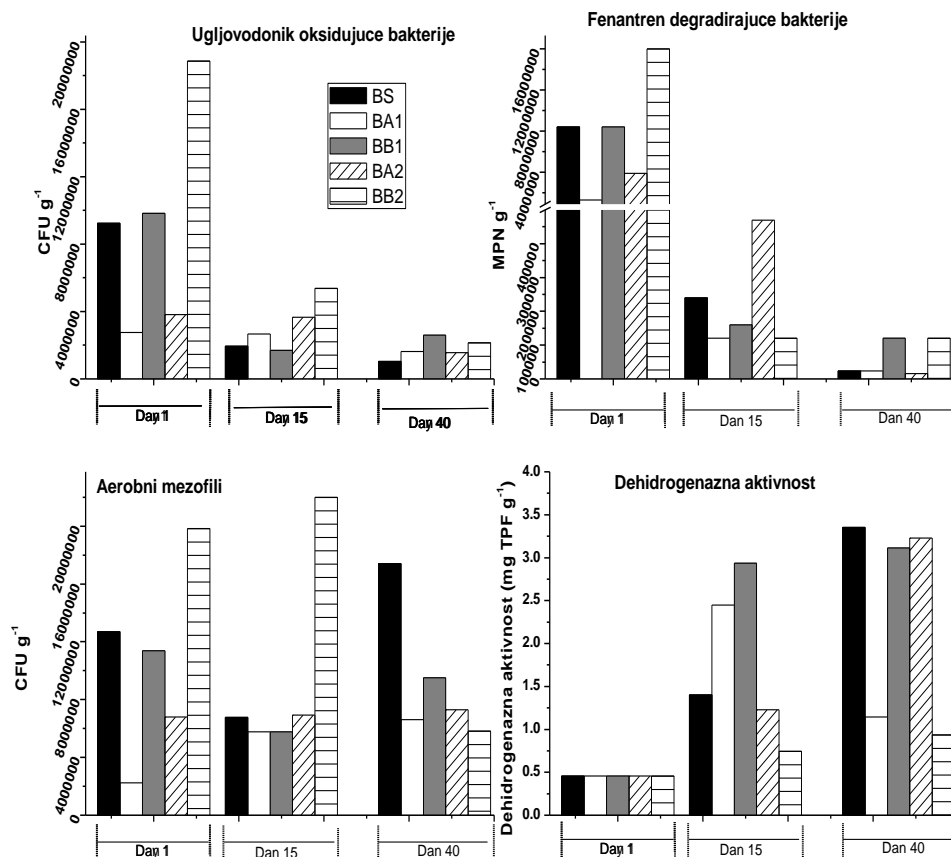


Slika 4.5. Efikasnost uklanjanja ispitivanih PAH-ova primenom različitih eksperimentalnih uslova

Međutim, posmatrajući sumu posmatranih PAH-ova, svi tretmani, izuzev biostimulacije (BS), dali su slične rezultate (30-35%). Slični rezultati dobijeni su i u nekim ranijim studijama, gde se dodatkom inokuluma uvećao i biodegradacioni potencijal (Rončević *et al.*, 2005; Maletić *et al.*, 2009; Maletić *et al.*, 2012). Međutim, veliki broj oprečnih rezultata je dobijen u eksperimentima sa dodatkom nutrijenata u cilju stimulacije biodegradacionog

procesa (Braddock *et al.*, 1997; Johnson and Scow, 1999; Atagana *et al.*, 2003). Usled kompleksnosti matriksa, različitih interakcija, kao i prisustva smeše policikličnih aromatičnih ugljovodonika i mikroorganizama, teško je predvideti ponašanje različitih polutanata.

U toku biodegradacionog eksperimenta praćene su tri grupe mikroorganizama: aerobni mezofili, ugljovodonik-oksidiujuće bakterije i fenantren degradirajuće bakterije, kao i dehidrogenazna aktivnost (slika 4.6).



Slika 4.6. Brojnost mikroorganizama pri različitim eksperimentalnim uslovima

Broj aerobnih mezofila i ugljovodonik-oksidiujućih mikroorganizama u svim tretmanima bio je reda veličine 10^6 do 10^7 CFU/g, dok je broj fenantren degradirajućih bakterija bio reda veličine 10^6 do 10^7 MPN/g. Na kraju eksperimenta, u gotovo svim tretmanima je došlo do smanjenja brojnosti mikroorganizama, što se može objasniti smanjenjem dostupnog supstrata za degradaciju, kao i mogućim povećanim toksičnim delovanjem supstrata na mikrofloru usled povećane biodostupnosti tj. desorpcije sa čvrste faze usled povećane vlažnosti. Bitno je reći da je broj individualnih vrsta mikroorganizama u svim tretmanima bio dovoljan i da njihova brojnost nije bila

limitirajući faktor za proces degradacije. Prema USEPA (1995), broj mikroorganizama potrebnih za bioremedijacioni proces je 1000 CFU/g suvog zemljišta. Broj aerobnih mezofila u tretmanu biostimulacije se povećao na kraju tretmana, što ukazuje na adaptiranost mikroflora na eksperimentalne uslove i koncentraciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika prisutnih u sedimentu. Eksperimentalni uslovi u tretmanu BB2 bili su optimalni za degradaciju fenantrena i benzo(a)pirena. Dehidrogenazna aktivnost je rasla tokom eksperimenta što ukazuje na adaptiranje i dobru aktivnost prisutnih mikroorganizama u procesima biodegradacije i biotransformacije sve do završetka eksperimenta.

4.2. Određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova

U ovom delu eksperimenta ispitivan je uticaj sadržaja gline i organske materije u odabranim sedimentima na efikasnost biodegradabilnosti policikličnih aromatičnih ugljovodonika (piren, krizen i fluoranten), kao i procesi koji se odvijaju prilikom bioremedijacije sedimenta zagađenog PAH-ovima u toku 42 dana eksperimenta u biometrima. U cilju ovog ispitivanja odabrano je 5 različitih uzorka sedimenta (sa različitim sadržajem gline i organske materije) (tabela 4.6).

Tabela 4.6. Sadržaj gline i organske materije u odabranim sedimentima

<i>Sediment</i>	<i>% organske materije</i>	<i>% gline</i>
<i>lOIC</i>	2,20	0,22
<i>lOmC</i>	2,38	14,8
<i>mOmC</i>	3,30	12,9
<i>mOhC(a)</i>	4,93	23,8
<i>mOhC(b)</i>	4,93	33,2

Za ispitivanje bioremedijacionih procesa sediment je spajkovan odabranim PAH-ovima sa istim brojem prstenova. Sadržaj detektovanih spajkovanih PAH-ova na početku i na kraju eksperimenta dat je u tabeli 4.7. Najveći zbirni sadržaj PAH-ova nakon spajkovanja detektovan je u uzorcima *lOIC* i *lOmC*. Najniža ukupna koncentracija detektovana je u uzorku *mOhC(a)*. Nakon 42 dana eksperimenta u svim posmatranim uzorcima je došlo do biodegradacije ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika i do smanjenja njihove koncentracije.

Tabela 4.7. Karakterizacija sedimenta pre i posle eksperimenta

Karakterizacija sedimenta pre eksperimenta (posle spajkovanja)					
	<i>IOIC</i>	<i>IOmC</i>	<i>mOmC</i>	<i>mOhC(a)</i>	<i>mOhC(b)</i>
Krizen ($\mu\text{g/kg}$)	14700	11000	3300	1880	8160
Piren ($\mu\text{g/kg}$)	1960	15400	5440	2850	7910
Fluoranten ($\mu\text{g/kg}$)	6100	14400	5760	2880	6500
Karakterizacija sedimenta posle eksperimenta					
Krizen ($\mu\text{g/kg}$)	5140	7600	1900	868	2100
Piren ($\mu\text{g/kg}$)	1320	7980	1120	1500	2770
Fluoranten ($\mu\text{g/kg}$)	1390	10100	1070	1370	2860

4.2.1. Efikasnost uklanjanja ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika

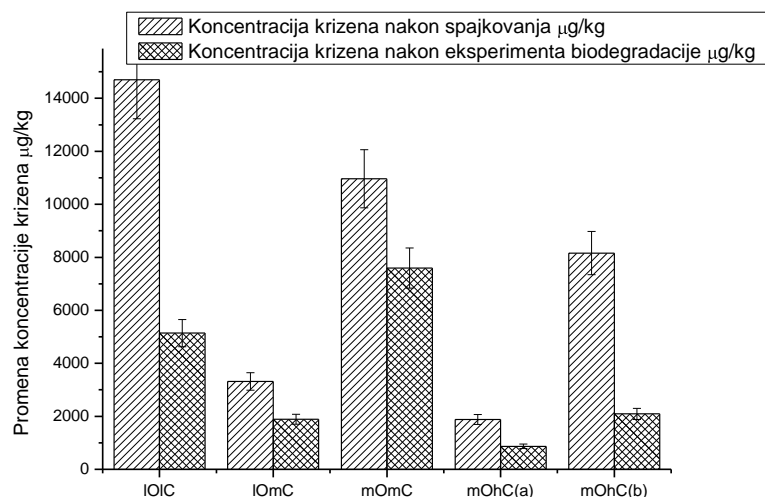
Nakon biodegradacionog eksperimenta procenat biorazgradnje krizena, pirena i fluorantena prisutnih u uzorcima dat je u tabeli 4.8. Procenat biorazgradnje svakog PAH-a pojedinačno se kretao od 30 do 80%. Primećuje se da su PAH-ovi prisutni u uzorku *IOmC* najmanje uklonjeni, kao posledica prisustva visokih koncentracija ispitivanih PAH-ova (2-5 puta veća koncentracija u odnosu na ostale uzorke), te je uklonjena apsolutna količina PAH-ova ipak samo 36% početne količine, a moguć je i negativan uticaj više koncentracije PAH-ova po mikrofloru, zbog, kako je to već napomenuto, njihovog toksičnog dejstva.

Tabela 4.8. Procenat biodegradacije PAH-ova

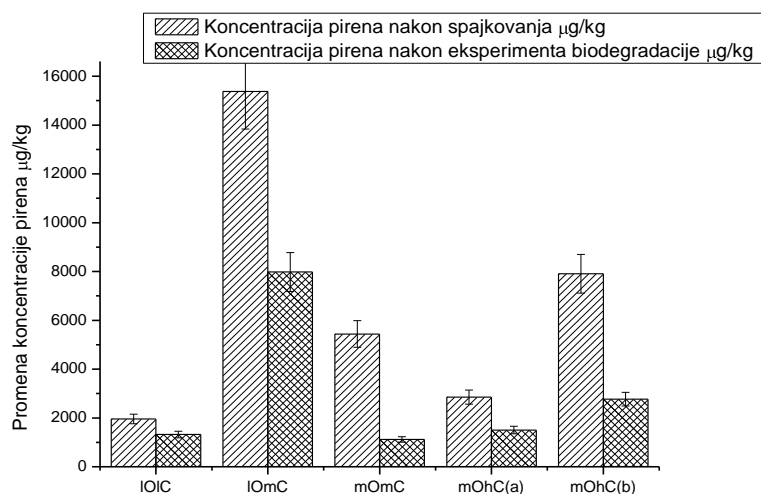
<i>PAH</i>	<i>IOIC</i>	<i>IOmC</i>	<i>mOmC</i>	<i>mOhC(a)</i>	<i>mOhC(b)</i>
	% biodegradacije				
Krizen	64,1	30,7	42,9	53,8	74,3
Piren	32,7	48,1	79,4	47,3	65,0
Fluoranten	77,2	29,7	81,3	52,3	56,0
Suma	65,5	36,2	68,0	51,1	65,1

Apsolutna promena sadržaja PAH-ova na početku i na kraju eksperimenta prikazana je na slikama 4.7, 4.8. i 4.9. Na osnovu apsolutne količine uklonjenog krizena (slika 4.7) vidi se da je najmanja količina uklonjena u uzorku *mOhC(a)* (oko 1000 $\mu\text{g/kg}$) i *mOmC* (oko 1400 $\mu\text{g/kg}$). Najveća količina pirena uklonjena je iz uzorka *IOIC* (8500 $\mu\text{g/kg}$), što je u skladu sa činjenicom da taj uzorak ima najniži sadržaj gline.

Apsolutne količine uklonjenog pirena su se kretale (*slika 4.8*) od oko 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*IOIC*) do 7500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*IOmC*). U slučaju pirena jasna veza između sadržaja gline i organske materije nije uočena. Ovo se može objasniti time da je uzorak *IOIC* (koji ima najniži sadržaj gline), imao i nizak sadržaj pirena. U uzorcima sa istim sadržajem organske materije, a različitim sadržajem gline, *mOhC(a)* i *mOhC(b)*, procenat uklanjanja pirena iznosio je 47%, odnosno 65%, respektivno.



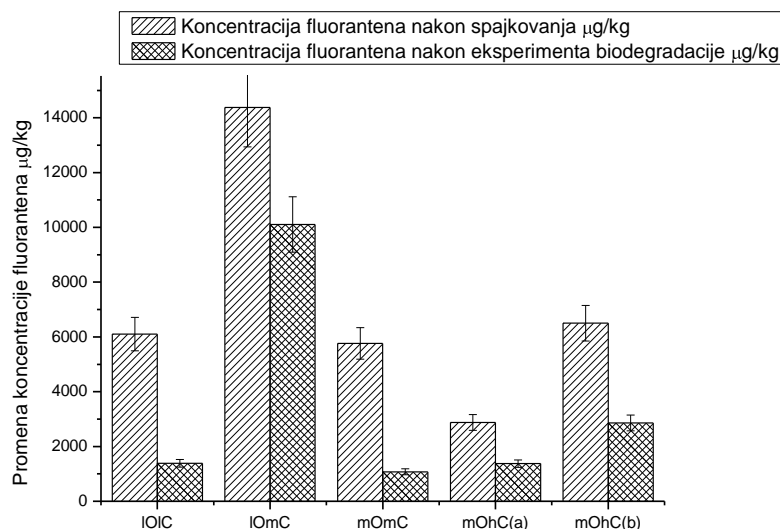
Slika 4.7. Koncentracija krizena pre i posle eksperimenta biodegradacije



Slika 4.8. Koncentracija pirena pre i posle eksperimenta biodegradacije

Na osnovu apsolutne količine uklonjenog flourantena (*slika 4.9.*) vidi se da je najmanja količina uklonjena u uzorku *mOhC(a)* (oko 1400 $\mu\text{g}/\text{kg}$), što je u skladu sa činjenicom da ovaj uzorak sadrži čak 24% gline. Najveći procenat

uklonjenog fluorantena je u sediment *mOmC* i iznosi 81%. U uzorku *lOmC* uklonjeno je oko 30% fluorantena. Ovako nizak procenat uklonjenog fluorantena može biti posledica toksičnog dejstva visokih koncentracija policikličnih aromatičnih ugljovodonika u posmatranom uzorku.

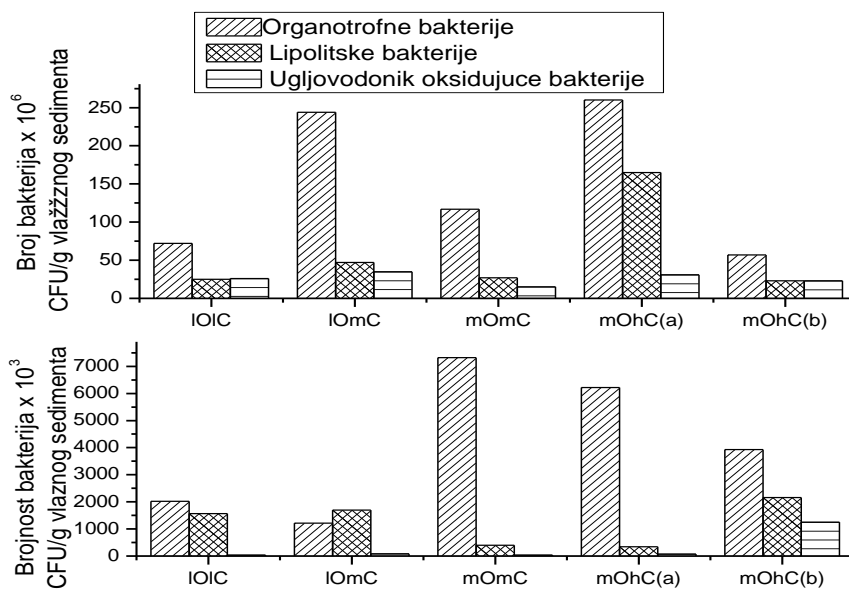


Slika 4.9. Koncentracija fluorantena pre i posle eksperimenta biodegradacije

Generalno, najveći stepen biorazgradnje ima fluoranten, što je u skladu sa njegovim fizičko-hemijskim osobinama. Uklanjanje krizena i pirena ne može jasno da se korelira sa sadržajem gline u uzorcima. Razlog ovakvog ponašanja ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika možda leži u niskom sadržaju organske materije. I ako se glina smatra dobrim sorbentom za nepolarna jedinjenja, doprinos organske materije u procesima sorpcije je mnogo veći (Lambert *et al.*, 1965; Lambert, 1967, Lambert, 1968). Snažna tendencija vezivanja hidrofobnih organskih polutanata za huminsku kiselinu, ispitivana je od strane Khan and Schnitzer (1972). Oni su zaključili da 100 g huminske kiseline može da sorbuje i do 2 g hidrofobnih organskih komponenti mehanizmima koji verovatno uključuju sorpciju na površini, kao i “ugrađivanje” u unutrašnje šupljine. Sorpciono ponašanje naftalena i lindana na nekoliko ispitivanih organskih i neorganskih materijala, kao i na prirodno zemljište, pokazali su da su organski konstituenti zemljišta uglavnom odgovorni za procese sorpcije (Rippen *et al.*, 1982; Delle Site, 2000). Mikrobiološka degradacija PAH-ova može biti ograničena količinom dostupnih PAH-ova, jer se neki PAH-ovi mogu sorbovati na sediment. Različite bakterijske vrste imaju različitu degradacionu sposobnost prema različitim PAH-ovima. Može doći i do konkurentne inhibicije degradacije jednog PAH-a drugim (Anders *et al.*, 2005). Ono što je bitno napomenuti jeste da brojnost mikroorganizama nije bila limitirajući faktor za proces biodegradacije, što je prikazano u narednom poglavlju.

4.2.2. Mikrobiološka karakterizacija procesa bioremedijacije u sedimentima

Promena brojnosti ispitivanih grupa bakterija u sedimentima spajkovanim odabranim policikličnim ugljovodonicima u toku eksperimenta prikazana je na slici 4.10. Na početku eksperimenta detektovana je brojnost reda veličine 10^6 CFU/g vlažnog sedimenta za sve tri grupe ispitivanih mikroorganizama u svih 5 ispitivanih sedimenta. Na kraju eksperimenta brojnost mikroorganizama bila je veličine 10^3 CFU/g vlažnog sedimenta. Najveći broj organotrofa i lipolitskih bakterija detektovan je na početku eksperimenta u uzorku *mOhC(a)*, dok je brojnost ugljovodonik-oksidiujućih bakterija bila najveća u uzorku *IOmC*. Na kraju eksperimenta, najmanja brojnost mikroorganizama je bila u uzorcima *IOIC* i *IOmC* usled visokih koncentracija ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika prisutnih u ovim uzorcima, koji su svojom toksičnošću negativno uticali na prisutnu mikrofloru. U svim uzorcima je došlo do smanjenja posmatranih bakterijskih kultura, što je u skladu sa dobijenim rezultatima u eksperimentima biodegradacije ispitivanih PAH-ova, tj. došlo je do smanjenja koncentracije supstrata. Bitno je napomenuti da je brojnost bakterijska populacija u posmatranim sedimentima bila zadovoljavajuća do kraja eksperimenta (USEPA, 1995).



Slika 4.10. Brojnost mikroorganizama u sedimentu na početku (slika gore) i na kraju eksperimenta (slika dole)

4.3. Testovi fitotoksičnosti (testovi klijavosti i usvajanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika)

U ovoj fazi eksperimenta odabrano je pet različitih semena biljaka često korišćenih u poljoprivredi:

1. Krastavac (*Cucumis sativus L.*)
2. Kukuruz (*Zea mays*)
3. Zelena salata (*Lactuca sativa L.*)
4. Pšenica (*Triticum spp.*)
5. Bundeve (*Cucurbita pepo*)

Semena su zasađena u sediment pod pretpostavkom da će se izmuljeni sediment koristiti u poljoprivredne svrhe, a u cilju ispitivanja njihove sposobnosti germinacije ukoliko je sediment kontaminiran odabranim policikličnim aromatičnim ugljovodonicima (fenantren, piren, krizen i benzo(a)piren). Početne koncentracije PAH-ova date su u *tabeli 4.4*. Eksperiment je trajao 10 dana, nakon čega je izvršeno brojanje iskljalog semena. Sva semena su proklijala, što govori u prilog tome da mešavina ovih kontaminanata pri ispitivanim koncentracijama nije inhibirala klijanje biljaka, te se stoga ove biljke mogu koristiti u fitoremedijaciji. Ovi rezultati se slažu sa nekim ranijim studijama (*Smith et al., 2006, Sverdrup et al., 2007, Ghanem et al., 2010, Gong et al., 1999; Henner et al., 1999*). Naravno, treba napomenuti, da odsustvo inhibirajućeg dejstva na samo seme biljke, ne znači nužno da se u kasnijem rastu i razvoju neće ispoljiti negativno dejstvo prisutnih PAH-ova. Smatra se da je faza klijanja najosetljivija faza u razvoju biljke, međutim, do ispoljavanje toksičnosti može doći i na listu ili stablu u kasnijim fazama rasta biljke (*Lah, 2011*).

Nakon prebrojavanja semena, urađena je analiza reziduala policikličnih aromatičnih ugljovodonika, kao i sadržaj PAH-ova u semenima koja su korišćena. Uporedo sa analizom rezidala u sedimentu, rađena je i analiza sedimenta u slepoj probi, kako bi se procenio eventualni abiotski gubitak posmatranih jedinjenja. Koncentracije detektovanih PAH-ova u sedimentu i semenu date su u *tabeli 4.9*. Ukoliko se posmatra ekstrahovana količina policikličnih aromatičnih ugljovodonika semenom u odnosu na rezidualnu koncentraciju u sedimentu, može se reći da su:

- seme pšenice i bundeve hiperakumulatori za fenantren, a
- seme bundeve hipeakumulator za piren.

Koncentracije krizena i benzo(a)pirena su u svim slučajevima bile više u sedimentu u odnosu na koncentraciju u semenu, pa se ispitivano seme ne smatra hiperakumulatorom ni za krizen, ni za benzo(a)piren.

Tabela 4.9. Koncentracije PAH-ova u semenu i rezidual u sedimentu

PAH	<i>Cucumis sativus L.</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Lactuca sativa L.</i>	<i>Triticum spp.</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Slepa proba</i>
<i>Rezidual u sedimentu µg/kg</i>						
Fenantren	704	982	1063	687	680	2147
Piren	1257	1668	1939	1531	1249	3864
Krizen	1231	1522	1757	1441	1159	2891
Benzo(a)piren	201	294	266	223	325	386
<i>Koncentracija PAH-ova ekstrahovana iz semena µg/kg</i>						
Fenantren	631	809	933	1087	1305	-
Piren	410	1310	589	984	1489	-
Krizen	624	655	435	818	1020	-
Benzo(a)piren	68	44	96	27	30	-

4.4. Ispitivanje mogućnosti procene potencijalno biodostupne frakcije primenom različitih hemijskih agenasa

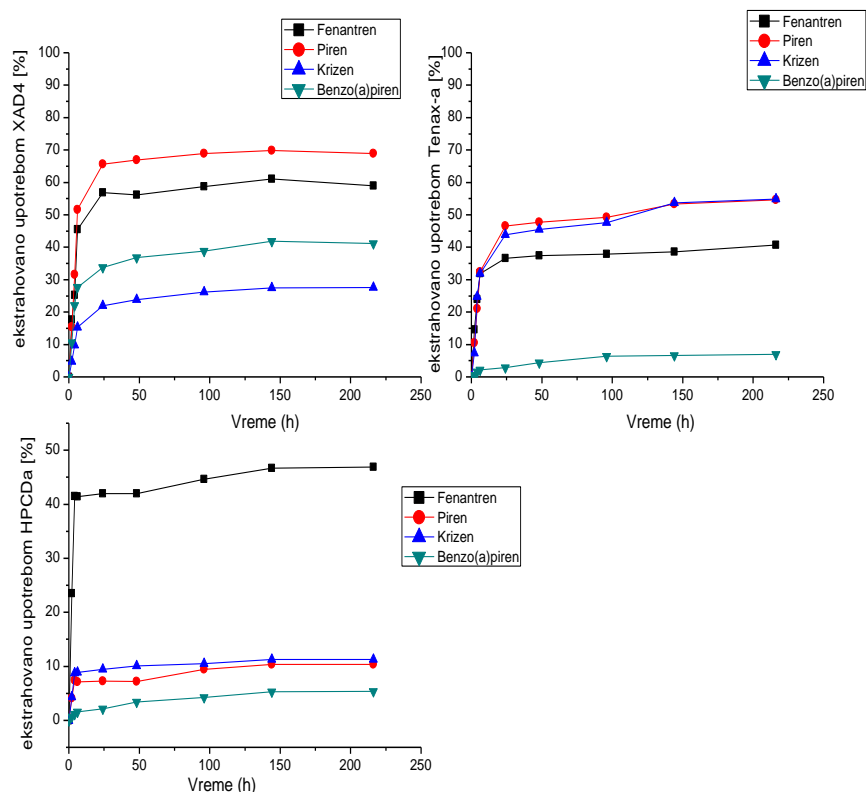
U ovom delu eksperimenta ispitivana je mogućnost procene potencijalno biodostupne frakcije odabranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika primenom različitih hemijskih agenasa:

- XAD4 i
- Tenax TA,
- 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin,
- metil- β -ciklodekstrin,
- β -ciklodekstrin.

Ispitivanja su rađena na sedimentu korišćenom za određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova, kao i na sedimentu korišćenom za određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova, tako da su karakteristike sedimenta ranije navedene u *tabelama 4.1, 4.2, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7.*

4.4.1. XAD4, Tenax TA i HPCD

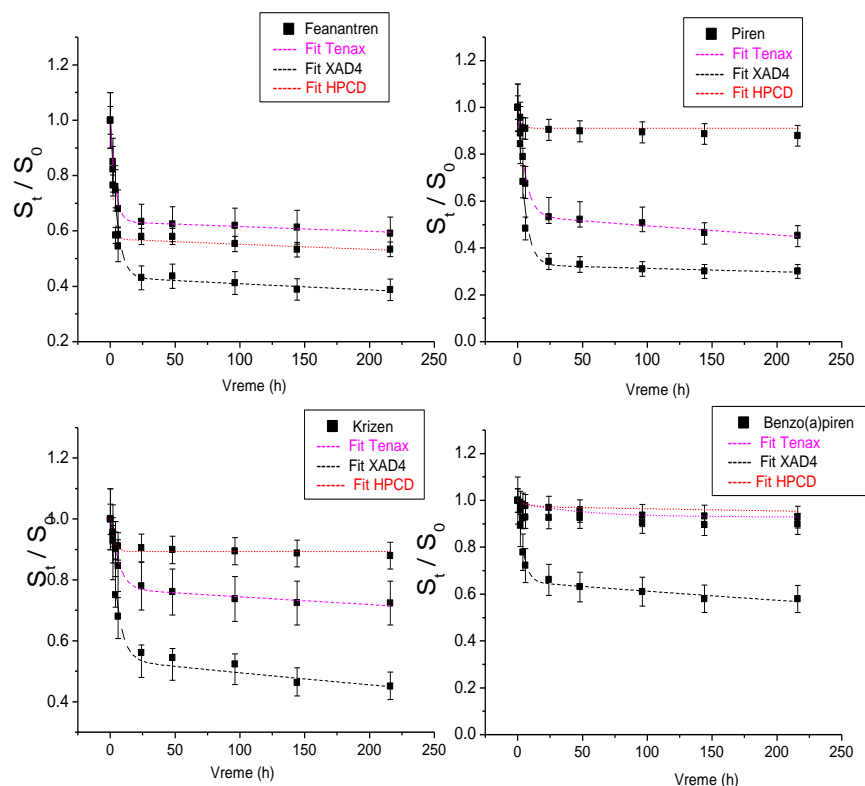
U cilju korišćenja hemijskih testova i ekstrakcija za procenu potencijalne biodostupnosti, potrebno je utvrditi vreme za koje se uspostavlja ravnoteža za sva 4 ispitivana PAH-a. U cilju utvrđivanja vremena uravnotežavanja, urađeni su testovi desorpcije u trajanju od 216 sati korišćenjem XAD4 smole, Tenaxa i HPCD-a višestepenom ekstrakcijom (*slika 4.11*) na sedimentu čija je karakterizacija data u *tabelama 4.4. i 4.5.* Rezultati su pokazali da se ravnoteža uspostavila nakon 24 sata za sva tri sorbenta.



Slika 4.11. Krive desorpcije ispitivanih PAH-ova za XAD4 smolu, Tenax i HPCD

Desorbovana količina odabranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika predstavlja oko 50-90 % ukupne desorbovane količine predstavnika PAH-ova sa 3, 4 i 5 prstenova. Ova brza faza desorpcije, praćena je sporijom fazom, koja ostaje konstantna do kraja eksperimenta. Dobijene vrednosti za brzinu brzo i sporo desorbujuće faze, kao i brzo i sporo desorbujuće frakcije organskih jedinjenja korišćenjem Tenaxa, XAD4 smole i HPCDa, date su u tabelama 4.10, 4.11 i 4.12.

Dobijene desorpcione krive su slične onim dobijenim u nekim ranijim studijama (Cornelissen *et al.*, 1998b; Cornelissen *et al.*, 2001, 1997; Greenberg *et al.*, 2005; Hawthorne *et al.*, 2002; Rhodes *et al.*, 2012; Swindell and Reid, 2006). Krive su modelovane korišćenjem dvočlanog modela (Eq. 1) (slika 4.12).



Slika 4.12. Modelovane krive posmatranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika

U prvih 24 sata, desorpcija je bila brza i desorbovana količina posmatranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika se kretala oko 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za feanantren, 1400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za piren i 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za krízen, upotrebom Tenaxa i 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za feanantren, 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za piren i 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za krízen, upotrebom XAD4 smole. Desorbovana količina benzo(a)pirena, u prvih 24 sata, iznosila je 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, upotrebom Tenaxa i XAD4 smole, respektivno.

Što se tiče 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, u prvih 24 h desorbovana je oko 40 % feanantrena i oko 4 puta manje krízena i pirena. Procenat desorpcije benzo(a)pirena bio je oko 2%, što se može smatrati zanemarljivim.

Uporedo sa probama u koje su dodati hemijski agensi, postavljena je i slepa proba, kako bi se pratio eventualni abiotički gubitak ispitivanih jedinjenja. Vrednosti rezidualnih koncentracija feanantrena, pirena, krízena i benzo(a)pirena iznosile su 2151 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3041 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2403 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 360 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respektivno.

Tabela 4.10. Kinetički parametri desorpcije PAH-ova dobijeni korišćenjem dvočlanog modela upotrebom Tenaxa

PAH	F_{brzi}	$k_{brzi} (h^{-1})$	F_{spori}	$k_{spori} (h^{-1})$	R^2
Fenantren	0,37	0,29	0,63	$2,84 \times 10^{-4}$	0,994
Piren	0,47	0,17	0,54	$8,31 \times 10^{-4}$	0,991
Krizen	0,45	0,20	0,57	$1,15 \times 10^{-3}$	0,973
Benzo(a)piren	0,06	0,02	0,93	$9,16 \times 10^{-6}$	0,957

Tabela 4.11. Kinetički parametri desorpcije PAH-ova dobijeni korišćenjem dvočlanog modela upotrebom XAD4 smole

PAH	F_{brzi}	$k_{brzi} (h^{-1})$	F_{spori}	$k_{spori} (h^{-1})$	R^2
Fenantren	0,58	0,20	0,43	$5,58 \times 10^{-4}$	0,971
Piren	0,70	0,19	0,33	$4,66 \times 10^{-4}$	0,978
Krizen	0,23	0,15	0,77	$3,44 \times 10^{-4}$	0,987
Benzo(a)piren	0,35	0,24	0,65	$6,52 \times 10^{-4}$	0,987

Tabela 4.12. Kinetički parametri desorpcije PAH-ova dobijeni korišćenjem dvočlanog modela upotrebom HPCD

PAH	F_{brzi}	$k_{brzi} (h^{-1})$	F_{spori}	$k_{spori} (h^{-1})$	R^2
Fenantren	0,50	0,43	0,57	$3,39 \times 10^{-4}$	0,967
Piren	0,35	0,09	0,91	$1,66 \times 10^{-18}$	0,809
Krizen	0,33	0,11	0,89	$3,96 \times 10^{-18}$	0,924
Benzo(a)piren	0,13	0,02	0,97	$9,64 \times 10^{-5}$	0,952

Konstante brzine brzodesorbujuće faze (k_{brzi}) kreću se od $0,02 h^{-1}$ (za benzo(a)piren) do $0,29 h^{-1}$ (za fenantren). Generalno posmatrano, konstanta brzine brzodesorbujuće faze raste sa opadanjem molekulske mase posmatranih komponenti. Vrednosti dobijene za piren i krizen su slične i iznose $0,17 h^{-1}$ i $0,20 h^{-1}$, respektivno. Konstante brzine sporodesorbujuće faze (k_{spori}) bile su oko 1000 puta manje od k_{brzi} (za PAHove sa 3 i 4 prstena). Za benzo(a)piren k_{spori} bio je 100000 puta manji od k_{brzi} . Slične rezultate dale su i prethodne studije (Barnier *et al.*, 2014). Vrednost brzodesorbujuće frakcije benzo(a)pirena dobijena upotrebom Tenaxa je 0,06, dok je za fenantren dobijena vrednost od 0,37. U ovom slučaju, molekuli sa istim brojem aromatičnih prstenova dali su slične vrednosti (0,47 i 0,45). Komponenta sa najvećom molekulskom masom, najmanjim naponom pare i najmanjom rastvorljivošću u vodi se najteže ekstrahuje iz sedimenta. Bitno je napomenuti da su vrednosti K_{ow} za krizen i benzo(a)piren iste, ali se dobijene vrednosti za F_{brzi} razlikuju. Takođe, uočeno je da su vrednosti brzodesorbujuće frakcije za krizen i piren koji imaju isti broj prstenova, a različitu K_{ow} vrednost, slični. Ovo se može objasniti strukturom i veličinom molekula.

U eksperimentu sa XAD4 smolom, konstante brzine brzodesorbujuće faze su se kretale od $0,15 \text{ h}^{-1}$ (za krizen) do $0,24 \text{ h}^{-1}$ (za benzo(a)piren). Za razliku od eksperimenta sa Tenaxom, nije uočena jasna veza između k_{brzi} i hemijskih osobina ispitivanih PAH-ova. Konstante brzine sporo-desorbujuće faze su manje oko 1000 puta u odnosu na konstante brzine brzodesorbujuće faze, i kreću se od $0,23 \text{ h}^{-1}$ (za krizen) do $0,70 \text{ h}^{-1}$ (za piren).

Upotrebom HPCD dobijene vrednosti za konstante brzine brzodesorbujuće faze su se kretale od $0,02 \text{ h}^{-1}$ (za benzo(a)piren) do $0,43 \text{ h}^{-1}$ (za fenantren). Kao i u slučaju Tenaxa, komponenta sa najmanjom molekulskom masom je imala najveću vrednost F_{brzi} . Konstante brzine sporodesorbujuće faze su manje više hiljada puta u odnosu na konstante brzine brzodesorbujuće faze. Nije uočena jasna veza između molekulske mase komponente i dobijenih vrednosti za k_{brzi} . Bitno je napomenuti da su u toku ovog eksperimenta dobijene slične vrednosti za piren i krizen za sve kinetičke parametre, što jasno ukazuje na povezanost strukture sa potencijalnom bioostupnošću ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika.

Poređenjem dobijenih vrednosti za F_{brzi} upotrebom Tenaxa, XAD4 smole i HPCD, može se zaključiti da u svim slučajevima, osim u slučaju pirena i krizena sa XAD4 smolom, sa porastom molekulske mase, smanjenjem rastvorljivosti i povećanjem vrednosti koeficijenta oktanol-voda, dolazi do smanjenja vrednosti brzodesorbujuće frakcije ispitivanih PAH-ova.

Veliki broj studija se bavio upotrebom Tenaxa i HPCD, kao hemijskih agenasa za procenu biodostupnosti (Bernhardt et al., 2013; Kelsey et al., 1997; Cuypers et al., 2002; Liste and Alexander, 2002; Reid et al., 2000; Cornelissen et al., 2001; Allan et al., 2006; Barnier et al., 2014; Oleszczuk, 2009; Rhodes et al., 2010). Rezultati dobijeni u ovoj studiji se slažu sa ranijim istraživanjima. Nasuprot HPCD i Tenaxu, XAD4 smola se koristila tek u nekoliko studija (Patterson et al., 2004; Spasojević et al., 2015, Tričković et al. 2008), pa je teško izvršiti poređenje dobijenih rezultata sa literaturom.

U tabeli 4.13 dat je odnos vrednosti brzo desorbujućih frakcija (F_{brzi}), koje su dobijene nelinearnim fitovanjem prema dvočlanom modelu i frakcije desorbovane nakon određenog vremena (2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 96 h, 144 h i 216 h). U tabeli su date srednje vrednosti odgovarajućih odnosa F_{brzi}/F_{Xh} (gde X predstavlja 2, 4, 6, 24, 48, 96, 144 i 216 h) za tri posmatrana sorbenta.

Tabela 4.13. Odnos vrednosti brzo desorbujućih frakcija (F_{brzi}) i frakcije desorbovane nakon određenog vremena (2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 96 h, 144 h i 216 h) za ispitivane PAH-ove primenom XAD4, Tenax i HPCD

	Fenantren			Piren		
	XAD4	Tenax	HPCD	XAD4	Tenax	HPCD
F_{brzi}/F_{2h}	3,28	2,47	2,13	4,52	4,27	8,45
F_{brzi}/F_{4h}	2,30	1,54	1,20	2,21	2,23	4,71
F_{brzi}/F_{6h}	1,27	1,16	1,21	1,36	1,45	4,88
F_{brzi}/F_{24h}	1,02	1,01	1,19	1,06	1,01	4,78
F_{brzi}/F_{48h}	1,03	0,99	1,19	1,04	0,98	4,85
F_{brzi}/F_{96h}	0,99	0,97	1,12	1,02	0,95	3,69
F_{brzi}/F_{144h}	0,95	0,96	1,07	1,00	0,88	3,38
F_{brzi}/F_{216h}	0,95	0,91	1,07	1,00	0,86	3,37
	Krizen			Benzo(a)pirene		
	XAD4	Tenax	HPCD	XAD4	Tenax	HPCD
F_{brzi}/F_{2h}	4,77	6,43	7,65	3,29	6,00	18,33
F_{brzi}/F_{4h}	2,34	1,81	3,76	1,58	3,61	10,75
F_{brzi}/F_{6h}	1,50	1,41	3,69	1,26	2,65	8,15
F_{brzi}/F_{24h}	1,05	1,02	3,48	1,03	2,02	6,05
F_{brzi}/F_{48h}	0,96	0,99	3,27	0,95	1,33	3,77
F_{brzi}/F_{96h}	0,88	0,94	3,14	0,90	0,94	3,05
F_{brzi}/F_{144h}	0,83	0,84	2,93	0,83	0,90	2,42
F_{brzi}/F_{216h}	0,83	0,82	2,92	0,83	0,86	2,39

Rezultati za posmatrane čvrste sorbente (XAD4 i Tenax) pokazuju da

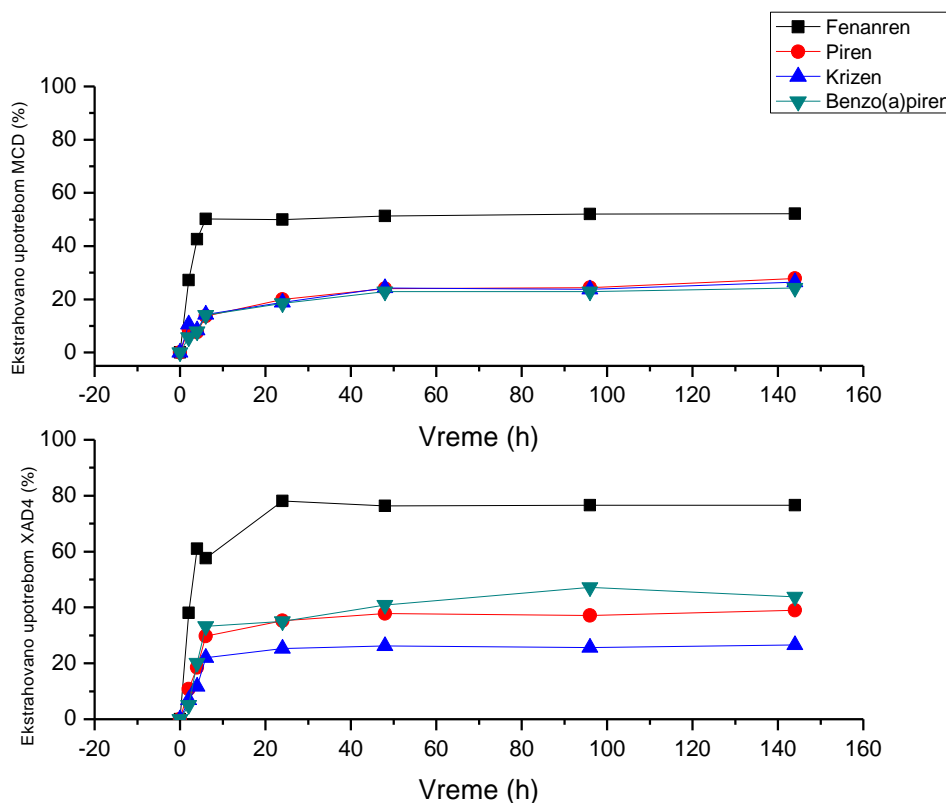
- vreme desorpcije od 2, 4 i 6 sati nije dovoljna da ukloni frakciju organskog jedinjenja u brzodesorbujućem domenu organske materije jer su F_{2h} , F_{4h} i F_{6h} mali u poređenju sa F_{brzi} pa su dobijeni odnosi značajno veći od 1;
- desorpcija posle 48, 96, 144 i 216 h uklanja ne samo frakciju organskog jedinjenja u brzo-desorbujućem domenu organske materije, već i deo frakcije koji se nalazi u sporo-desorbujućem domenu, jer su F_{48h} , F_{96h} , F_{144h} i F_{216h} veći u poređenju od F_{brzi} pa su dobijeni odnosi manji od 1 kod većine ispitivanih PAH-ova;
- desorpcija posle 24 h daje vrednosti za F_{brzi}/F_{24h} koje su najbliže vrednosti 1, što znači da se nakon 24 h desorpcije uklanja frakcija organskog jedinjenja koja se nalazi u brzo-desorbujućem domenu organske materije. Jedino u slučaju benzo(a)pirena upotrebom Tenaxa vrednost blizu 1 je dobijena nakon 48 h.

U slučaju pirena, krizena i benzo(a)pirena upotrebom HPCD dobijene vrednosti u toku eksperimenta ni nakon 216 sati ekstrakcija nisu dobijene vrednosti pri kojima bi mogli da tvrdimo da se uklonila frakcija organskog jedinjenja koja se nalazi u brzo-desorbujućem domenu organske materije. Samo u slučaju fenantrena, gde je vrednost F_{brzi}/F_{144h} bila približno 1, može se reći da je dobijena vrednost pri kojima bi mogli da tvrdimo da se uklonila frakcija organskog jedinjenja koja se nalazi u brzo-desorbujućem domenu organske materije.

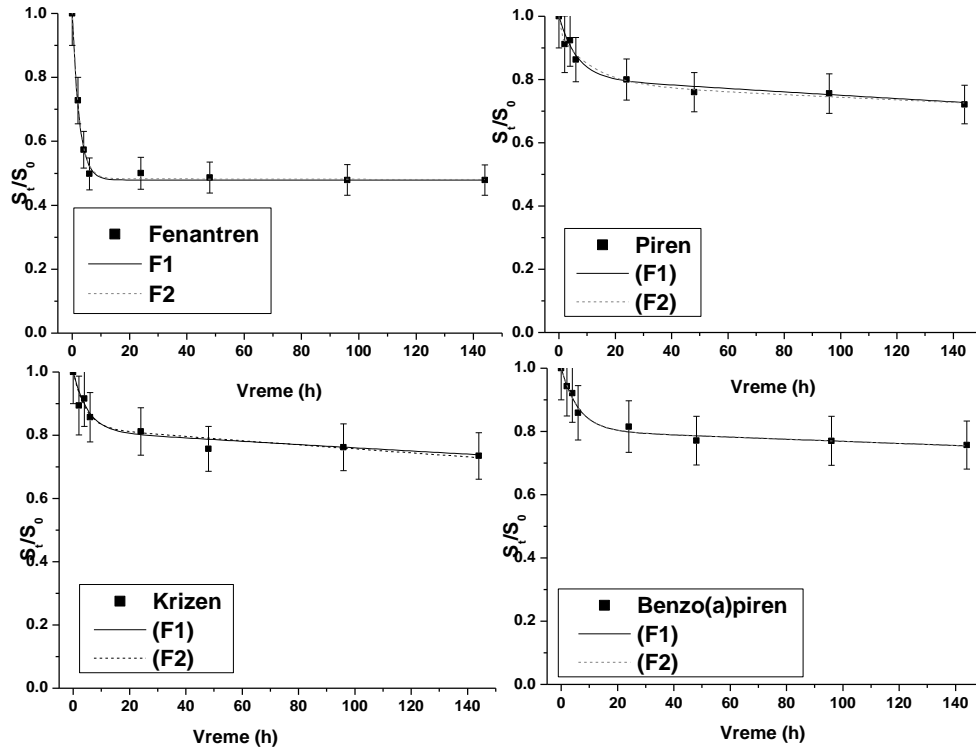
4.4.2. XAD4 i MCD

U cilju mogućnosti korišćenja hemijskih testova za procenu potencijalne biodostupnosti, pored višestepene ekstrakcije, može se raditi i jednostepena ekstrakcija. U ovom delu eksperimenta ispitivana je jednostepena ekstrakcija upotrebom XAD4 smole, koja se u prethodnom eksperimentu pokazala kao dobar sorbent za ispitivana jedinjenja i MCD, koji se u literaturi često koristi kao hemijski agens za ekstrakciju PAH-ova (*Viglianti et al, 2006; Cui et al., 2013; Del Valle, 2004*).

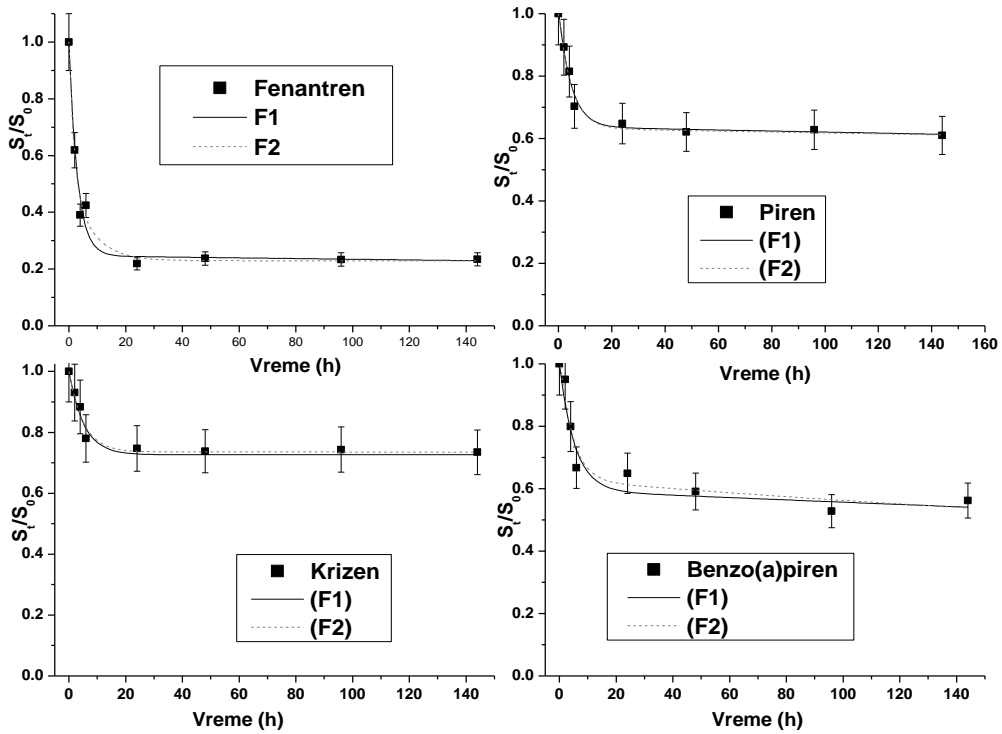
Eksperiment desorpcije sa XAD4 i MCD sa kontaminiranim sedimentom trajao je 144 sata, a kao model sediment se koristio sediment čije su karakteristike date u *tabeli 4.4 i 4.5*. Desorpciona kriva je pokazala tipičan oblik za desorpciju organskih komponenti iz sedimenta (*Ahn et al., 2008; Bonten et al., 1999; Barnier et al., 2014; Rhodes et al., 2010*). Rezultati su pokazali da se ravnoteža uspostavlja nakon jednog dana, kao i prethodnom eksperimentu (*slika 4.13*). Oblik desorpcionih kriva za XAD4 smolu bio je sličan kao i za MCD ekstrakciju (*slika 4.14 i 4.15*).



Slika 4.13. Krive desorpcije ispitivanih PAH-ova za XAD4 smolu i MCD



Slika 4.14. Desorpcione krive za ispitivane PAH-ove upotrebom MCD



Slika 4.15. Desorpcione krive za ispitivane PAH-ove upotrebom XAD4 smole

Fitovanjem dobijenih rezultata praćenja kinetike desorpcije u toku 144 sata, određene su vrednosti udela brzodesorbujuće i sporodesorbujuće faze. Krive su modelovane za svaki PAH pojedinačno, upotrebom dvočlanog modela (Eq. 1) (tabela 4.14).

Tabela 4.14. Kinetički parametri dobijeni korišćenjem dvočlanog modela upotrebom XAD4 smole i MCD

	F_{brzi}		$k_{brzi} (h^{-1})$		F_{spori}	
	XAD4	MCD	XAD4	MCD	XAD4	MCD
Fenantren	0,74	0,52	0,34	0,42	0,25	0,48
Piren	0,37	0,19	0,22	0,16	0,63	0,81
Krizen	0,27	0,19	0,19	0,19	0,73	0,81
Benzo(a)piren	0,40	0,20	0,19	0,16	0,59	0,80

	$k_{spori} (h^{-1})$		r^2	
	XAD4	MCD	XAD4	MCD
Fenantren	$5,14 \cdot 10^{-4}$	$2,73 \cdot 10^{-14}$	0,98	0,99
Piren	$2,67 \cdot 10^{-4}$	$7,05 \cdot 10^{-4}$	0,97	0,95
Krizen	$5,20 \cdot 10^{-26}$	$6,68 \cdot 10^{-4}$	0,94	0,89
Benzo(a)piren	$6,58 \cdot 10^{-4}$	$4,30 \cdot 10^{-4}$	0,88	0,97

Dvočlani model je pokazao da su vrednosti konstante brzine za brzodesorbujuću fazu slične za oba agensa i da se kreću od 0,19 do 0,34 za XAD4 i od 0,16 do 0,42 za MCD. Dobijeni rezultati su uporedivi sa rezultatima dobijenim u nekim ranijim studijama (Barnier et al., 2014; van Noort et al., 2003). Brzina desorpcije zavisi od karakteristika ispitivanog sedimenta (npr. sadržaja gline i organske materije), karakteristika polutanta (npr. rastvorljivost u vodi, napon pare, K_{ow}), kao i karakteristika korišćenog hemijskog sorbenta.

Udeo fenantrena u brzodesorbujućem domenu organske materije sedimenta je veći u odnosu na ostala tri PAH-a i za XAD4 smolu i za MCD, što se može objasniti njegovim fizičko-hemijskim karakteristikama (niska molekulska masa i visoka rastvorljivost u vodi). Vrednosti za udeo svakog PAH-a pojedinačno u brzodesorbujućem domenu organske materije se razlikuju upotrebom smole i ciklodekstrina. Veće vrednosti su za svaki PAH su dobijene u probama sa XAD4 smolom: F_{brzi} za XAD4 smolu kretale su se od 0,27 do 0,74, dok su se vrednosti dobijene u eksperimentu sa MCD kretale od 0,19 do 0,52. Značajne razlike u F_{brzi} vrednostima bi se mogle objasniti veličinom šupljina MCD, koje nisu dovoljno velike da zarobe PAH-ove većih dimenzija (Lemaire et al., 2013; Cornelissen et al., 2001).

Generalno, vrednosti F_{brzi} opadaju sa povećanjem molekulske mase ispitivanih PAH-ova, smanjenjem napona pare, povećanjem K_{ow} vrednosti i smanjenjem rastvorljivosti u vodi. Jedini izuzetak jeste benzo(a)piren, gde je vrednost F_{brzi} upotrebom XAD4 smole bila veća u odnosu na piren i krizen. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim višestepenom ekstrakcijom.

U cilju razvijanja brzih hemijskih testova za procenu potencijalne biodostupnosti potrebno je definisati ekstrakciono vreme u kom se uklanja

frakcija organskog jedinjenja koja se nalazi u brzodesorbujućem domenu organske materije. Poređenjem brzodesorbujuće frakcije organskih jedinjenja sa frakcijama organskih jedinjenja desorbovanih nakon određenog vremena može se izvršiti procena mogućnosti korišćenja jednostavne XAD4 i MCD desorpcije za procenu biodostupnosti organskih jedinjenja. U tabeli 4.15 su dati odnosi brzo desorbujuće frakcije organskih jedinjenja (F_{brzi}), koji su dobijeni nelinearnim fitovanjem kriva desorpcije prema nelinearnom dvočlanom modelu (Eq. 1), i frakcija organskih jedinjenja desorbovanih posle 2 h (F_{2h}), 4 h (F_{4h}), 6 h (F_{6h}), 24 h (F_{24h}), 48 h (F_{48h}), 96 h (F_{96h}) i 144 h (F_{144h}). U tabeli su date srednje vrednosti odgovarajućih odnosa F_{brzi}/F_{Xh} (gde X predstavlja 2, 4, 6, 24, 48, 96 ili 144 h).

Tabela 4.15 Odnos vrednosti brzo desorbujućih frakcija (F_{brzi}) i frakcije desorbovane nakon određenog vremena (2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 96 h i 144 h) za ispitivane PAH-ove primenom XAD4 i MCD

	Fenantren		Piren	
	XAD4	MCD	XAD4	MCD
F_{rap}/F_{2h}	1,97	1,91	3,45	2,15
F_{rap}/F_{4h}	1,23	1,22	2,00	2,50
F_{rap}/F_{6h}	1,3	1,06	1,25	1,39
F_{rap}/F_{24h}	0,96	1,04	1,05	0,95
F_{rap}/F_{48h}	0,98	1,01	0,98	0,79
F_{rap}/F_{96h}	0,98	1,00	1,00	0,78
F_{rap}/F_{144h}	0,98	0,99	1,00	0,78

	Krizen		Benzo(a)piren	
	XAD4	MCD	XAD4	MCD
F_{rap}/F_{2h}	3,90	1,79	7,95	3,52
F_{rap}/F_{4h}	2,31	2,27	1,99	2,52
F_{rap}/F_{6h}	1,23	1,33	1,20	1,42
F_{rap}/F_{24h}	1,07	1,01	1,14	1,08
F_{rap}/F_{48h}	1,03	0,78	0,98	0,87
F_{rap}/F_{96h}	1,05	0,80	0,85	0,87
F_{rap}/F_{144h}	1,04	0,80	0,86	0,87

Rezultati pokazuju da:

- desorpcija nakon 2, 4 i 6 sati nije dovoljna da ukloni frakciju organskog jedinjenja u brzo-desorbujućem domenu organske materije jer su F_{2h} , F_{4h} i F_{6h} mali u poređenju sa F_{brzi} pa su dobijeni odnosi značajno veći od 1;
- desorpcija posle 48 h, 96 h i 144 h uklanja ne samo frakciju organskog jedinjenja u brzo-desorbujućem domenu organske materije, već i deo frakcije koji se nalazi u sporo-desorbujućem domenu, jer su F_{48h} i F_{96h} veći u poređenju od F_{brzi} pa su dobijeni odnosi manji od 1 kod većine ispitivanih PAH-ova;
- desorpcija posle 24 h daje vrednosti za F_{brzi}/F_{24h} koje su najbliže vrednosti 1, što znači da se nakon 24 h desorpcije uklanja frakcija organskog jedinjenja koja se nalazi u brzo-desorbujućem domenu organske materije. Jedino u slučaju fenantrena i pirena (sa XAD4) i krizena (uporebom XAD4 i MCD) dalja desorpcija, posle 24 h, rezultuje daljim, ali veoma sporim, uklanjanjem frakcije organskog jedinjenja u brzo-desorbujućem domenu.

4.4.3. β CD

U cilju ispitivanja mogućnosti korišćenja β CD kao hemijskog agensa za procenu biodostupnosti pirena, krizena i fluorantena, korišćeni su sedimenti sa različitim sadržajem gline i organske materije dati u *tabeli 4.6*. Koncentracija ispitivanih PAH-ova određena je na početku i na kraju eksperimenta. Rezultati ekstrahovane količine PAH-ova iz sedimenata sa različitim sadržajem gline i organske materije dati su u *tabeli 4.16*. Kod sedimenta sa najmanjim sadržajem gline *IOIC* najveća količina fluorantena i krizena se smatra biodostupnom. Međutim, jasna korelacija između sadržaja gline i organske materije i procenta biodostupnosti nije uočena, što se objašnjava time da organska materija ima značajniji doprinos procesima sorpcije o čemu je bilo reči u prethodnim poglavljima. Takođe, ekstrahovana količina ispitivanih PAH-ova iz sedimenta sa oznakom *IOIC* se kasnije koristila za poređenje sa rezultatima dobijenim u eksperimentu određivanja optimalnih uslova za procese biodegradacije opisanim u *poglavlju 4.1.1*.

Tabela 4.16. Ekstrahovana količina PAH-ova upotrebom β CD iz sedimenata sa različitim sadržajem gline i organske materije

<i>PAH</i>	<i>IOIC</i>	<i>IOmC</i>	<i>mOmC</i>	<i>mOhC (a)</i>	<i>mOhC (b)</i>
	$\mu\text{g/kg}$				
Fluoranten	4290	2528	2021	1489	4479
Piren	489	11596	1778	2595	6851
Krizen	14100	6887	1985	10601	7669

4.5. Koreliranje rezultata dobijenih testovima biodegradacije, testovima klijavosti, testovima fitotoksičnosti i rezultata dobijenih iz eksperimenta procene biodostupnosti hemijskim testovima

U ovom delu istraživanja ispitivana je mogućnost poređenja rezultata dobijenih testovima biodegradacije, klijavosti i fitotoksičnosti i rezultata dobijenih iz eksperimenta procene biodostupnosti hemijskim testovima. Ispitivanja su rađena na sedimentima korišćenim za određivanje uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova, kao i na sedimentu korišćenom za određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova, tako da su karakteristike sedimenta ranije navedene u *tabelama 4.1, 4.2, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7*.

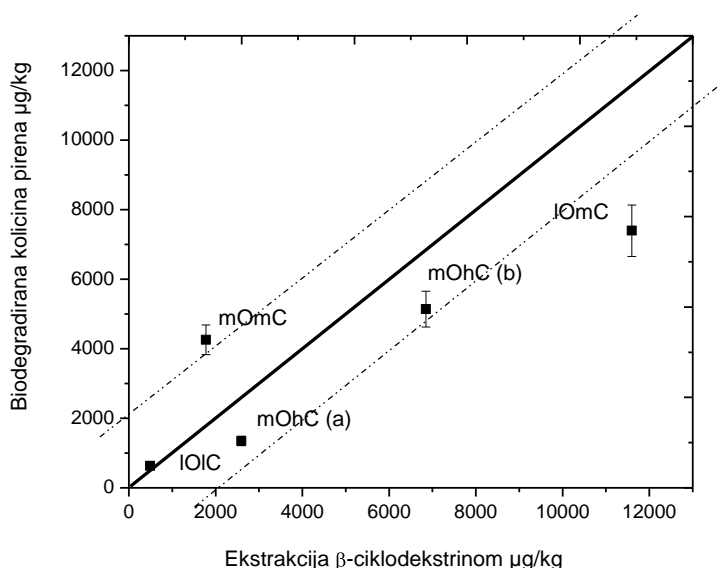
4.5.1. Korelacija rezultata degradacije PAH-ova sa istim brojem prstenova i eksperimenta biodostupnosti sa β CD

U cilju poređenja degradacije pirena, krizena i fluorantena u sedimentu čije su karakteristike date u *tabelama 4.1. i 4.2.* izvršena je korelacija između podataka dobijenih u eksperimentu određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova (4.2.) i rezultata dobijenih upotrebom β CD (4.4.3.). Na *slikama 4.16, 4.17 i 4.18.* dat je prikaz dobijenih korelacionih podataka.

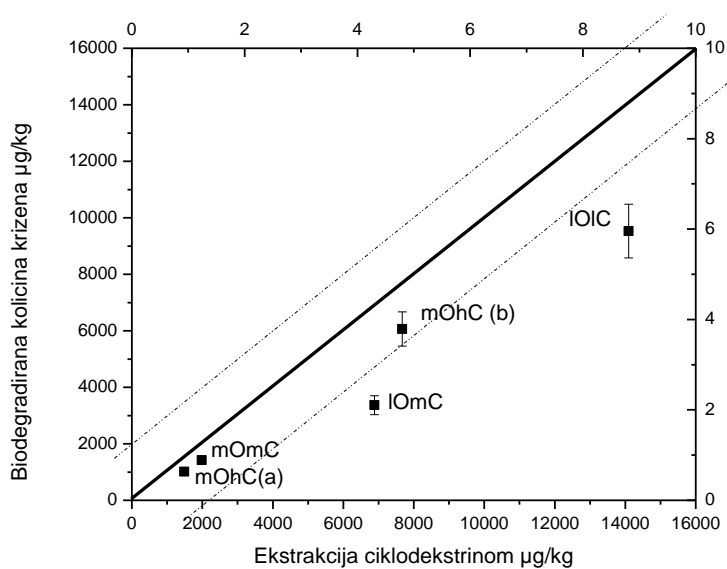
Dobijeni rezultati za piren pokazuju odličnu korelaciju za uzorak *IOIC*. Za ostale sedimente, izuzev *lOmC*, dobijene su dobre korelacije ($\pm 20\%$). Za uzorak *lOmC* veća vrednost je dobijena ekstrakcijom β CD, nego u eksperimentu biodegradacije.

Posmatrajući rezultate za krizen, uzorci *mOhC(a)*, *mOmC* i *mOhC(b)* su dali dobru korelaciju u dva odvojena eksperimenta. U slučaju *IOIC* i *lOmC* veća količina ispitivanih PAH-ova je ekstrahovana upotrebom hemijskog agensa u odnosu na degradiranu količinu.

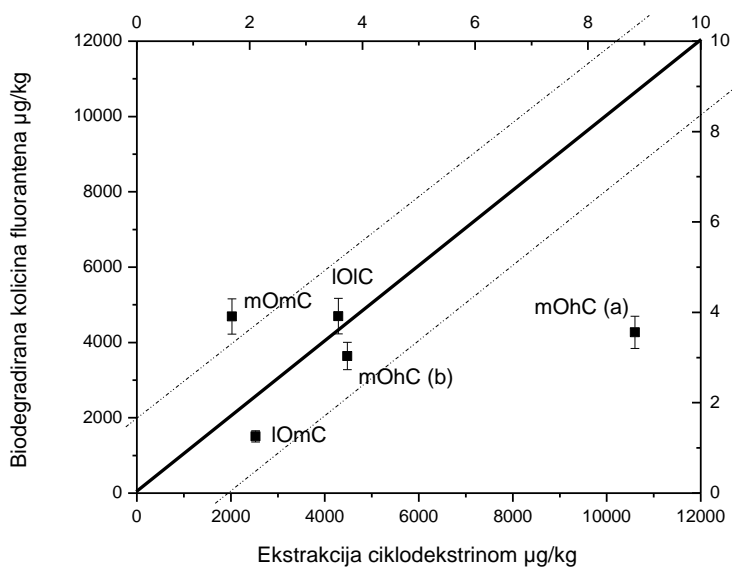
Sedimenti *IOIC* je pokazao odličnu korelaciju između degradirane i ekstrahovane količine fluorantena. Takođe, dobru korelaciju su pokazali i uzorci *mOmC*, *mOhC(b)* i *lOmC* ($\pm 20\%$). Kod uzorka *mOhC(a)* veća vrednost je dobijena ekstrakcijom, u odnosu na eksperiment biodegradacije.



Slika 4.16. Korelacija između degradirane količine pirena i koncentracije predviđene primenom hemijskog sorbenta β CD



Slika 4.17. Korelacija između degradirane količine krizena i koncentracije predviđene primenom hemijskog sorbenta β CD



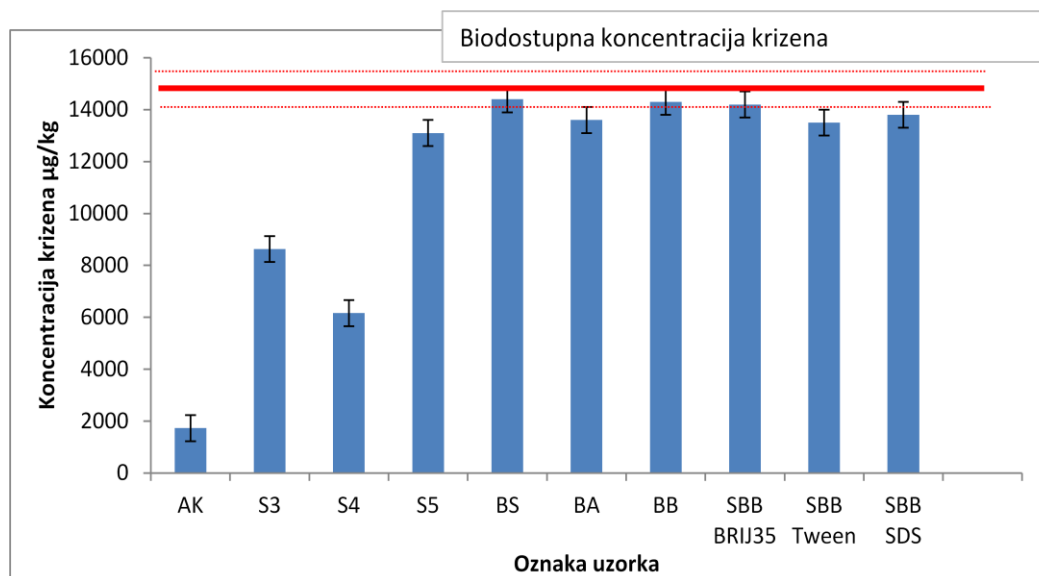
Slika 4.18. Korelacija između degradirane količine fluorantena i koncentracije predviđene primenom hemijskog sorbenta β CD

4.5.2. Korelacija rezultata degradacije PAH-ova sa istim brojem prstenova pri različitim uslovima i eksperimenta biodostupnosti sa β CD

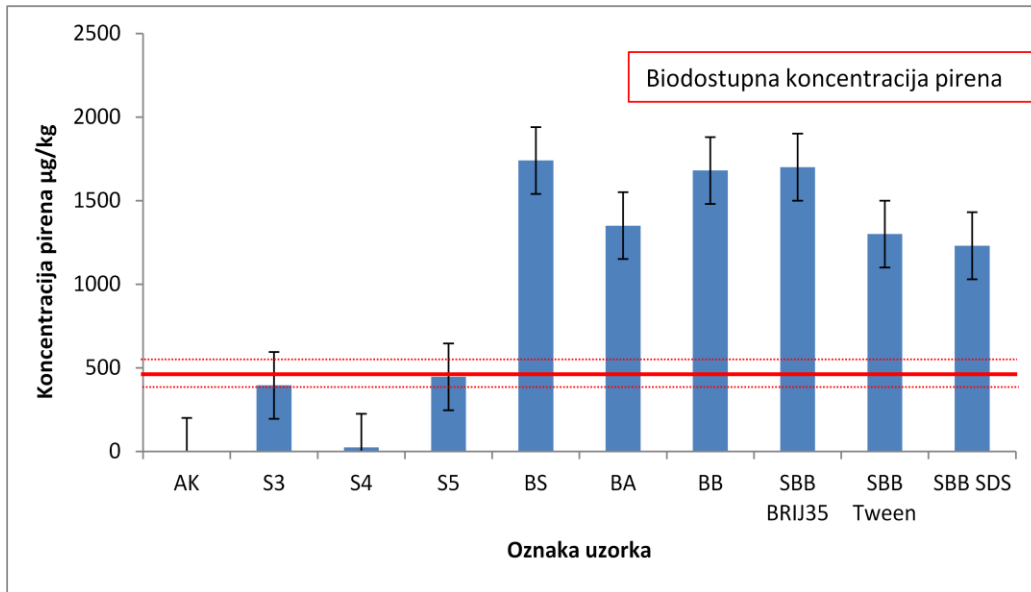
Rezultati dobijeni u eksperimentu određivanja optimalnih uslova za biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova (4.1.1.) korelirani su sa rezultatima dobijenim u eksperimentima biodostupnosti sa β -ciklodekstrinom (4.4.3). Na slikama 4.19, 4.20 i 4.21 prikazana je razlika između biodostupnosti koja je dobijena ekstrakcijom sa β CD i biodegradirane količine PAH-ova dobijene u eksperimentima biodegradacije.

Biodostupna koncentracija krizena iznosi 14100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (95,6% ukupne koncentracije krizena). Uočava se da je većina biodostupnog krizena i biodegradirana u probama BS, BB, SBB Brij 35, dok su probe sa dodatkom samih surfaktanata Brij35 i Tween nisu pokazale kao optimalni uslovi. U biometru sa dodatkom samog surfaktanta SDS biodegradiralo se oko 90% ukupne biodostupne količine krizena. Dobijeni rezultati za krizen se slažu sa rezultatima dobijenim u prethodnom eksperimentu, u smislu mogućnosti predviđanja potencijalno biodostupne frakcije.

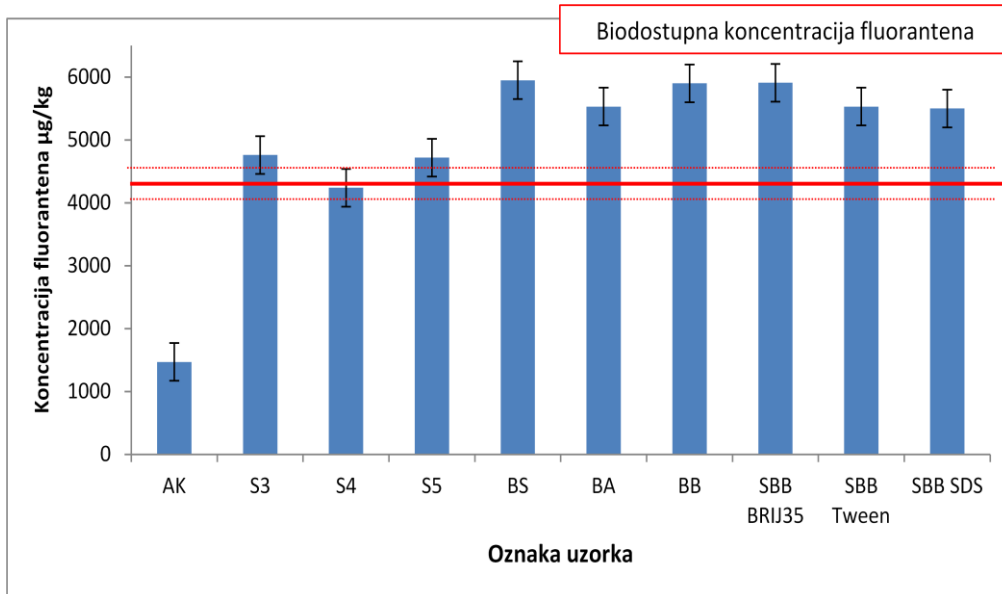
Kod pirena i fluorantena je veća količina biodegradiranih PAH-ova od količine koja je ekstrahovana β CD. Bitno je zapaziti da se probe sa dodatkom samog surfaktanta nisu pokazale kao optimalni uslovi za degradaciju PAH-ova, ali da uz dodatak mineralnog medijuma i/ili inokuluma procenat degradacije raste. Razlog leži u tome što u tom slučaju postoji i dovoljna količina i nutrijenata i mikroorganizama.



Slika 4.19. Razlika između biodostupnosti koja je procenjena β CD i realne biodostupnosti za krizen



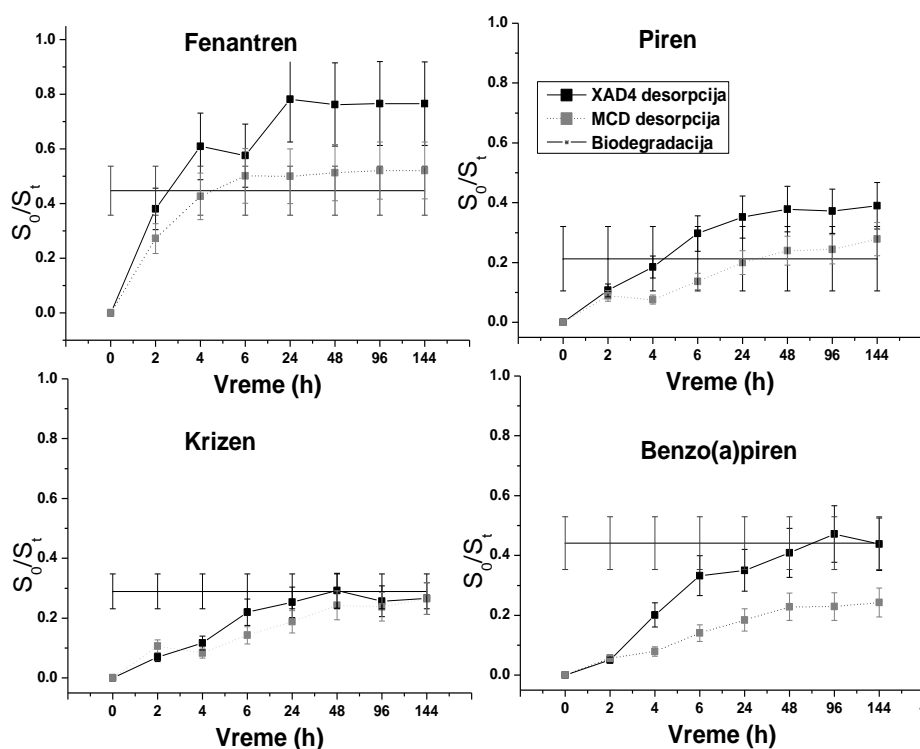
Slika 4.20. Razlika između biodostupnosti koja je procenjena β CD i realne biodostupnosti za piren



Slika 4.21. Razlika između biodostupnosti koja je procenjena β CD i realne biodostupnosti za fluoranten

4.5.3. Korelacija rezultata degradacije PAH-ova sa različitim brojem prstenova i eksperimenta biodostupnosti sa XAD4 i MCD

Rezultati dobijeni u eksperimentu određivanja degradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa različitim brojem prstenova (4.1.2.) korelirani su sa rezultatima dobijenim u eksperimentima ekstrakcije PAH-ova sa XAD4 i MCD (4.4.2). Za svrhu ovog eksperimenta korišćen je sediment čije su karakteristike date u tabelama 4.4 i 4.5. Da bi se uporedili rezultati dobijeni u eksperimentima biodegradacije i desorpcije rađene na sedimentu, maksimalna biodegradirana koncentracija svakog PAH-a je korelirana sa udelom u brzodesorbujućem domenu organske materije za svaki sorbent posebno (slika 4.22).

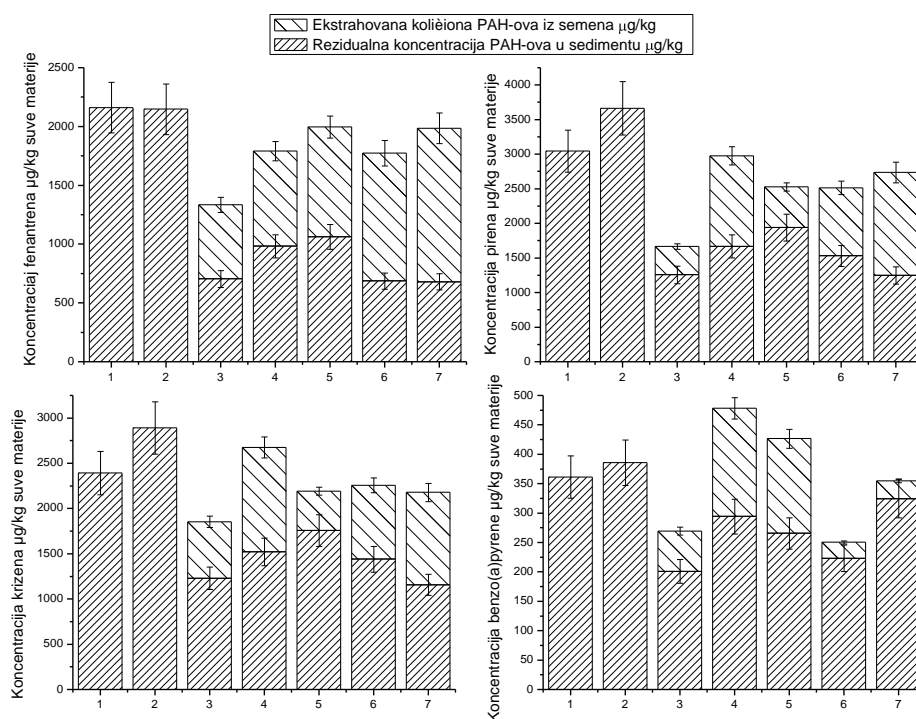


Slika 4.22. Poređenje biodegradirane frakcije PAH-ova sa udelom odgovarajućeg PAH-a u brzodesorbujućem domenu organske materije

Poređenje rezidualne koncentracije PAH-ova u sedimentu sa rezultatima dobijenim u eksperimentima desorpcije, pokazalo je da se rezultati međusobno dobro slažu. Za fenantren i piren, bolje slaganje sa rezultatima biodegradacije dobijeno je upotrebom MCD ekstrakcije, dok su bolja slaganja za benzo(a)piren dobijena upotrebom XAD4 smole. U slučaju krizena, dobro slaganje su dala oba hemijska agensa. Generalno, bolju korelaciju za niskomolekulske PAH-ove sa rezultatima biodegradacionog eksperimenta dobijena je upotrebom MCD, dok je XAD4 dao bolje rezultate za PAH-ove sa većom molekulskom masom.

4.5.4. Korelacija rezultata testova kljavosti i fitotoksičnosti i eksperimenta biodostupnosti sa XAD4 i Tenaxom

U cilju korelacije rezultata dobijenih u eksperimentu fitotoksičnosti (4.3) i rezultata dobijenih u eksperimentu ekstrakcije PAH-ova primenom XAD4 i Tenaxa (4.4.1) korišćen je sediment čije su karakteristike date u tabeliama 4.4. i 4.5. U tabeli 4.9 date su rezidualne koncentracije ispitivanih PAH-ova sa različitim brojem prstenova u sedimentu, kao i ekstrahovana količina PAH-ova iz semena. Na slici 4.23 dat je grafički prikaz koncentracija koje su ekstrahovane iz semena i rezidualnih koncentracija.

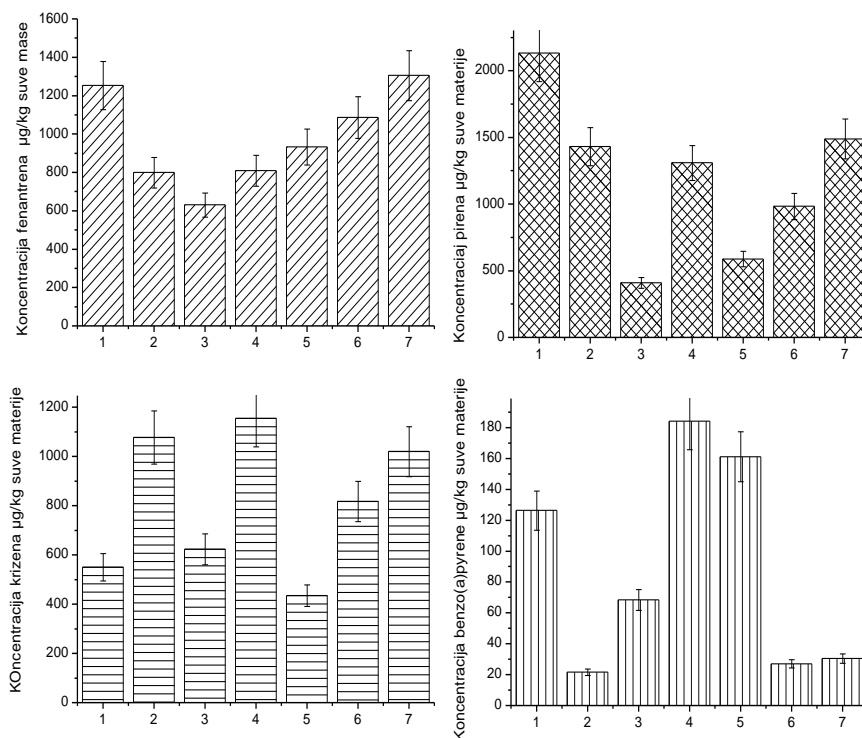


1. Pocetna koncentracija; 2. Slepa proba; 3. *Cucumis sativus* L.; 4. *Zea mays*;
5. *Lactuca sativa* L.; 6. *Triticum* spp.; 7. *Cucurbita pepo*

Slika 4.23. Grafički prikaz koncentracija koje su ekstrahovane iz semena i rezidualnih koncentracija ispitivanih PAH-ova u sedimentu

Na osnovu grafičkog prikaza može se zaključiti da je najmanji procenat usvojivosti semenom dobijen za benzo(a)piren, što se može objasniti njegovom kompleksnijom strukturom u odnosu na ostala tri ispitivana PAH-a. Seme pšenice i bundeve se mogu smatrati hiperakumulatorima za fenantren. Međutim, kao što je već ranije rečeno, bez obzira na usvojivost PAH-ova od strane izabranih semena, do ispoljavanja fitotoksičnosti nije došlo pri ispitivanim koncentracijama. Poređenje ovih rezultata sa udelom u brzodesorbujućem domenu prikazano je na slici 4.24. Dobro slaganje sa ekstrahovanom količinom PAH-ova primenom XAD4 smole pokazali su pšenica i bundeva za fenantren i krastavac i salata za krizen. Potencijalna

biodostupnost je precejnena u slučaju pirena, dok se dobro slaganje sa dobijenim rezultatima može uočiti i za benzo(a)piren kada se posmatra seme salate. Potencijalna biodostupnost primenom Tenaxa se dobro slaže sa kukuruzom, krastavcem i salatoma za fenantren i kukuruzom i bundevom za piren i krizen. U slučaju benzo(a)pirena rezultati koji se slažu sa ekstrakcijom sa Tenaxom dobijeni su primenom semena pšenice i bundeve.



1. XAD4; 2. Tenax; 3. *Cucumis sativus* L.; 4. *Zea mays*;
5. *Lactuca sativa* L.; 6. *Triticum* spp.; 7. *Cucurbita pepo*

Slika 4.24. Poređenje akumulirane količine PAH-ova u semenu i ekstrahovane frakcije upotrebom Tenaxa i XAD4 smole

5. ZAKLJUČAK

Jedan od najznačajnijih procesa koji dovode do redukcije koncentracije PAH-ova u životnoj sredini jeste proces biodegradacije. U toku ovog procesa, mikroorganizmi posredstvom svojih enzima metabolišu organske kontaminante iz zemljišta, voda ili sedimenta i transformišu ih u krajnje netoksične proizvode, pre svega do ugljen-dioksida i vode. Stvaranjem optimalnih uslova za rast mikroorganizama i uvećavanje njihove brojnosti, potpomaže se detoksifikacija određenih količina kontaminanata.

Prisustvo kontaminanta u nekom medijumu, ne znači nužno da je taj kontaminant dostupan za usvajanje od strane živog organizma. Ona količina koja je dostupna i usvojiva za živi svet, predstavlja biodostupnu frakciju. Evaluacija dostupne frakcije kontaminanata prisutnih u tom sedimentu je veoma važna jer se smatra da ova dostupna frakcija lako podleže procesima bioakumulacije, biosorpcije i transformacije u prisustvu različitih organizama. Procena dostupne frakcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika je bitna zbog njihovih kancerogenih i mutagenih osobina koje se ispoljavaju ako oni uđu u lanac ishrane.

Cilj ovog rada bio je bolje razumevanje ponašanja i sudbine policikličnih aromatičnih ugljovodonika u sedimentu, procena biodostupnosti i mogućnosti biodegradacije. Ispitivanja su rađena na više sedimenata, sa više odabranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa liste prioritetnih supstanci.

Rezultati istraživanja sprovedenih u ovom radu se mogu sumirati na sledeći način:

1. Određivanje optimalnih uslova za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova.
 - a) Od ispitivanih tretmana, najbolji uslovi degradacije pirena, krizena i fluorantena postižu se postizu se dodatkom ikuluma i mineralnog medijuma (BS i BA), dok su najlošiji rezultati dobijeni upotrebom samih surfaktanata. Najveći procenat biorazgradnje je pokazao fluoranten što je u skladu sa njegovim fizičko-hemijskim karakteristikama (najmanji, najrastvorljiviji, najmanja vrednost koeficijenta oktanol-voda). Procenat biorazgradnje pirena je bio nešto manji u odnosu na krizen.
 - b) U cilju biodegradacije ispitivanih PAH-ova sa različitim brojem prstenova (fenantrena, pirena, krizena i benzo(a)pirena) u datom sedimentu neophodno je primeniti bioaugmentaciju. Kao što sama biostimulacija nije dovela do uklanjanja PAH-ova, tako ni u kombinaciji sa bioaugmentacijom nije došlo do povećanja

efikasnosti bioaugmentacije (čak je dolazilo i do negativnog efekta), osim u slučaju tretmana benzo(a)pirena sa inokulumom 2. Ista ili bolja efikasnost uklanjanja fenantrena, krizena i benzo(a)pirena je postignuta bioaugmentacijom inokulumom 1, a pirena inokulumom 2.

2. Određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova:
 - a) Generalno, najveći stepen biorazgradnje ima fluoranten, što je u skladu sa njegovim fizičko-hemijskim osobinama. Uklanjanje krizena i pirena ne može jasno da se korelira sa sadržajem gline u uzorcima. Razlog ovakvog ponašanja ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika možda leži u niskom sadržaju organske materije. I ako se glina smatra dobrim sorbentom za nepolarna jedinjenja, doprinos organske materije u procesima sorpcije je mnogo veći. Mikrobiološka degradacija PAH-ova može biti ograničena količinom dostupnih PAH-ova, jer se neki PAH-ovi mogu sorbovati na sediment. Takođe, različite bakterijske vrste imaju različitu degradacionu sposobnost prema različitim PAH-ovima. Može doći i do konkurentne inhibicije degradacije jednog PAH-a drugim. Ono što je bitno napomenuti jeste da brojnost mikroorganizama nije bila limitirajući faktor za proces biodegradacije.
3. Ispitivanje fitotoksičnosti (testovi klijavosti i usvajanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika)
 - a) Sva semena su proklijala, što govori u prilog tome da mešavina ovih kontaminanata u koncentracijama od 361 µg/kg za benzo(a)piren, 2161 µg/kg za fenantren, 3046 µg/kg za piren i 2394 µg/kg za krizen, nije inhibirala klijanje biljaka, te se stoga ove biljke mogu koristiti u fitoremedijaciji. Naravno, odustvo inhibirajućeg dejstva na samo seme biljke, ne znači nužno da se u kasnijem rastu i razvoju neće ispoljiti negativno dejstvo prisutnih PAH-ova. Smatra se da je faza klijanja najosetljivija faza u razvoju biljke, međutim, do ispoljavanje toksičnosti može doći i na listu ili stablu u kasnijim fazama rasta biljke.
 - b) Najmanji procenat usvojivosti semenom dobijen je za benzo(a)piren, što se može objasniti njegovom kompleksnijom strukturom u odnosu na ostala tri ispitivana PAH-a. Seme pšenice i bundeve se mogu smatrati hiperakumulatorima za fenantren. Međutim, kao što je već ranije rečeno, bez obzira na usvojivost PAH-ova od strane izabranih semena, do ispoljavanja fitotoksičnosti nije došlo.

4. Ispitivanje mogućnosti procene potencijalno biodostupne frakcije primenom različitih hemijskih sorbenata

I. XAD4, Tenax i HPCD.

- *Tenax.* Konstante brzine brzodesorbujuće faze (k_{brzi}) kreću se od $0,02 \text{ h}^{-1}$ (za benzo(a)piren) do $0,29 \text{ h}^{-1}$ (za fenantren). Konstante brzine sporodesorbujuće faze (k_{spori}) bile su oko 1000 puta manje od k_{brzi} (za PAHove sa 3 i 4 prstena). a benzo(a)piren k_{spori} bio je 100000 puta manji od k_{brzi} .
- *XAD4.* Konstante brzine brzodesorbujuće faze su se kretale od $0,15 \text{ h}^{-1}$ (za krizen) do $0,24 \text{ h}^{-1}$ (za benzo(a)piren). Konstante brzine sporo-desorbujuće faze su manje oko 1000 puta u odnosu na konstante brzine brzodesorbujuće faze, i kreću se od $0,23 \text{ h}^{-1}$ (za krizen) do $0,70 \text{ h}^{-1}$ (za piren).
- *HPCD.* Konstante brzine brzodesorbujuće faze su se kretale od $0,02 \text{ h}^{-1}$ (za benzo(a)piren) do $0,43 \text{ h}^{-1}$ (za fenantren). Konstante brzine sporodesorbujuće faze su manje više hiljada puta u odnosu na konstante brzine brzodesorbujuće faze.
- Poređenjem dobijenih vrednosti za F_{brzi} upotrebom Tenaxa, XAD4 smole i HPCD, može se zaključiti da u svim slučajevima, osim u slučaju pirena i krizena sa XAD4 smolom, sa porastom molekulske mase, smanjenjem rastvorljivosti i povećanjem vrednosti koeficijenta oktanol-voda, dolazi do smanjenja vrednost brzodesorbujuće frakcije ispitivanih PAH-ova.
- Ekstrakciono vreme u kom se uklanja frakcija organskog jedinjenja koja se nalazi u brzodesorbujućem domenu organske materije iznosi 24 h, tada je odnos F_{brzi}/F_{24h} najbliži vrednosti 1. Jedino u slučaju benzo(a)pirena upotrebom Tenaxa vrednost blizu 1 je dobijena nakon 48 h. U slučaju HPCD samo u slučaju fenantrena, gde je vrednost F_{brzi}/F_{144h} bila približno 1, može se reći da je dobijena vredost pri kojima bi mogli da tvrdimo da se uklonila frakcija organskog jedinjenja koja se nalazi u brzodesorbujućem domenu organske materije.

II. XAD4 i MCD

- Dvočlani model je pokazao da su vrednosti konstante brzine za brzodesorbujuću fazu slične za oba agensa i da se kreću od 0,19 do 0,34 za XAD4 i od 0,16 do 0,42 za MCD. Udeo fenantrena u brzodesorbujućem domenu organske materije sedimenta je veći u odnosu na ostala tri PAH-a i za XAD4 smolu i za MCD, što se može objasniti njegovim fizičko-

hemijskim karakteristikama (niska molekulska masa i visoka rastvorljivost u vodi).

- Veće vrednosti su za svaki PAH su dobijene u probama sa XAD4 smolom: F_{brzi} za XAD4 smolu kretale su se od 0,27 do 0,74, dok su se vrednosti dobijene u eksperimentu sa MCD kretale od 0,19 do 0,52. Značajne razlike u F_{brzi} vrednostima bi se mogle objasniti veličinom šupljina MCD, koje nisu dovoljno velike da zarobe PAH-ove većih dimenzija.
- Desorpcija posle 24 h daje vrednosti za F_{brzi}/F_{24h} koje su najbliže vrednosti 1, što znači da se nakon 24 h desorpcije uklanja frakcija organskog jedinjenja koja se nalazi u brzo-desorbujućem domenu organske materije. Jedino u slučaju fenantrena i pirena (sa XAD4) i krizena (uporebom XAD4 i MCD) dalja desorpcija, posle 24 h, rezultuje daljim, ali veoma sporim, uklanjanjem frakcije organskog jedinjenja u brzo-desorbujućem domenu.

III. βCD

- U cilju ispitivanja mogućnosti korišćenja βCD kao hemijskog agensa za procenu biodostupnosti pirena, krizena i fluorantena, korišćeni su sedimenti sa različitim sadržajem gline i organske materije. Kod sedimenta sa najmanjim sadržajem gline najveća količina fluorantena i krizena se smatra biodostupnom. Međutim, jasna korelacija između sadržaja gline i organske materije i procenta biodostupnosti nije uočena, što se objašnjava time da organska materija ima značajniji doprinos procesima sorpcije.

5. Koreliranje rezultata dobijenih testovima biodegradacije, klijavosti, fitotoksičnosti i rezultata dobijenih iz eksperimenta procene biodostupnosti hemijskim testovima:

I. *Korelacija rezultata degradacije PAH-ova sa istim brojem prstenova i eksperimenta biodostupnosti sa βCD.*

- U cilju poređenja degradacije pirena, krizena i fluorantena u sedimentu izvršena je korelacija između podataka dobijenih u eksperimentu određivanja uticaja strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova i rezultata dobijenih upotrebom βCD. Dobijeni rezultati za piren i fluoranten pokazuju dobru korelaciju za uzorak IOIC. Posmatrajući rezultate za krizen, u

svim sedimentima je veća količina krizena ekstrahovana upotrebom hemijskog agensa.

II. *Korelacija rezultata degradacije PAH-ova sa istim brojem prstenova pri različitim uslovima i eksperimenta biodostupnosti sa β CD.*

- Rezultati dobijeni u eksperimentu određivanja optimalnih uslova za biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova korelirani su sa rezultatima dobijenim u eksperimentima biodostupnosti sa β CD. Uočava se da je većina biodostupnog krizena i biodegradirana u probama BS, BB, SBB Brij 35, dok su probe sa dodatkom samih surfaktanata Brij35 i Tween nisu pokazale kao optimalni uslovi. U biometru sa dodatkom samog surfaktanta SDS biodegradiralo se oko 90% ukupne biodostupne količine krizena. Dobijeni rezultati za krizen se slažu sa rezultatima dobijenim u prethodnom eksperimentu, u smislu mogućnosti predviđanja potencijalno biodostupne frakcije. Kod pirena i fluorantena je veća količina biodegradiranih PAH-ova od količine koja je ekstrahovana β CD. Bitno je zapaziti da se probe sa dodatkom samog surfaktanta nisu pokazale kao optimalni uslovi za degradaciju PAH-ova, ali da uz dodatak mineralnog medijuma i/ili inokuluma procenat degradacije raste. Razlog leži u tome što u tom slučaju postoji i dovoljna količina i nutrijenata i mikroorganizama.

III. *Korelacija rezultata degradacije PAH-ova sa različitim brojem prstenova i eksperimenta biodostupnosti sa XAD4 i MCD.*

- Poređenje rezidualne koncentracije PAH-ova u sedimentu sa rezultatima dobijenim u eksperimentima desorpcije, pokazalo je da se rezultati međusobno dobro slažu. Za fenantren i piren, bolje slaganje sa rezultatima biodegradacije dobijeno je upotrebom MCD ekstrakcije, dok su bolja slaganja za benzo(a)piren dobijena upotrebom XAD4 smole. U slučaju krizena, dobro slaganje su dala oba hemijska agensa. Generalno, bolju korelaciju za niskomolekulske PAH-ove sa rezultatima biodegradacionog eksperimenta dobijena je upotrebom MCD, dok je XAD4 dao bolje rezultate za PAH-ove sa većom molekulskom masom.

IV. *Korelacija rezultata testova klijavosti i fitotoksičnosti i eksperimenta biodostupnosti sa XAD4 i Tenax-om.*

- Dobro slaganje sa ekstrahovanom količinom PAH-ova primenom XAD4 smole pokazali su pšenica i bundeva za fenantren i krastavac i salata za krizen. Potencijalna biodostupnost je precejnena u slučaju pirena, dok se dobro slaganje sa dobijenim rezultatima može uočiti i za benzo(a)-piren kada se posmatra seme salate. Potencijalna biodostupnost primenom Tenaxa se dobro slaže sa kukuruzom, krastavcem i salatam za fenantren i kukuruzom i bundevom za piren i krizen. U slučaju benzo(a)pirena rezultati koji se slažu sa ekstrakcijom sa Tenaxom dobijeni su primenom semena pšenice i bundeve.

Rezultati dobijeni u ovom radu doprineli su boljem razumevanju sorpcionih procesa policikličnih aromatičnih ugljovodonika u sedimentu. Zaključeno je da organska materija i glina imaju veliku ulogu u sorpciji organskih jedinjenja, kao i da stepen biodegradiranih PAH-ova zavisi od dodatka različitih mineralnih medijuma, inokuluma ili surfaktanata. Pored uslova sredine, sadržaja organske materije i gline, bitan faktor za procese biodostupnosti i biodegradacije jeste i struktura ispitivanih molekula, kao i interakcija između molekula i sedimenta. Dodatno, uočeno je da prisustvo ispitivanih PAH-ova u sedimentu u ispitivanim koncentracijama ne utiče na ispoljavanje fitotoksičnosti u toku germinacije semena. Rezultati prezentovani u ovom radu, pokazuju da se desorpcija u prisustvu MCD, XAD4 smole i Tenaxa može koristiti kao jednostavna metoda za procenu potencijalne biodostupne frakcije organskih jedinjenja u sistemima sediment - voda.

6. LITERATURA

1. Ahn, S., Werner, D., Luthy, R.G. (2008) Modeling PAH mass transfer in a slurry of contaminated soil or sediment amended with organic sorbents, *Water Res.* 42, 2931–2942
2. Aislabie J., Saul D.J., Foght J.M., Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soil, *Extremophiles*. 2006, 10, 171-179.
3. Alagia E.S., Dimitrijević D.M., Kukia S. (2013b) Termalno pospešivanje ekstrakcije policikličkih aromatičnih ugljovodonika iz zemljišta/Thermally enhanced extraction of PAHs from soil. *Tehnika*, 64(3), 433-438
4. Alagia E.S., Maluckov S.B., Riznić T.D.(2013a) Phytoremediation as an environmental friendly method for POPs removal from contaminated soils/Fitoremedijacija kao ekološki prihvatljiva metoda za uklanjanje POPs iz kontaminiranih zemljišta. *Ecologica*, 20(70), 275-279
5. Aleksander M., (1999) Biodegradation and Bioremediation. 2nd ed., Academic Press, San Diego.
6. Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology* 34, 4259-4265.
7. Allan, I.J., Semple, K.T., Hare, R., Reid, B.J. (2006) Prediction of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in spiked soils using cyclodextrin extraction, *Environ. Pollut.* 144, 562–571
8. Allan, I.J., Semple, K.T., Hare, R., Reid, B.J. (2006) Prediction of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in spiked soils using cyclodextrin extraction, *Environ. Pollut.* 144, 562–571
9. American Society for Testing and Materials (1998a) Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. E 1367-92. In *Annual Book of ASTM Standards*, Vol 11.05. Philadelphia, PA, 732–757.
10. American Society for Testing and Materials (1998b) Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida*. E 1676-97. In *Annual Book of ASTM Standards*, Vol 11.05. Philadelphia, PA, 1056–1074
11. Amezcua-Allieri, M.A., Ávila-Chávez, M.A., Trejo, A., Meléndez-Estrada, J. (2012) Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil: a comparison between bioremoval and supercritical fluids extraction, *Chemosphere* 86, 985–993
12. Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W., Michaelis, W. (2000) Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophilic *Bacillus thermoleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 518
13. Autrup, H., Vestergaard, A. B., Okkles, H., (1995), *Carcinogenesis* 16, 1305

14. Ball, W.P., Roberts, P.V. (1991a) Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 1. Equilibrium. *Environmental Science and Technology* 25, 1223–1237
15. Ball, W.P., Roberts, P.V. (1991b) Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 2. Interparticle diffusion. *Environmental Science and Technology* 25, 1237–1249
16. Bari, Md. A., Baumbach, G., Kuch, B., Scheffknecht, G., (2010), Air Pollution in Residential Areas from Wood-fired Heating, *Aerosol and Air Quality Research* 11, (6), 749-757
17. Barnier, C., Ouvrard, S., Robin, C., Morel, J.L. (2014) Desorption kinetics of PAHs from aged industrial soils for availability assessment, *Sci. Total Environ.* 470–471, 639–645
18. Bartha, R., Pramer, D. (1965) Features of a flask and method for measuring the persistence of and biological effects of pesticides measuring the persistence of and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci.* 100, 86–170.
19. Bender M.E., Hargis W.J., Huggett J.R., Roberts M.H. (1988) Effects of polynuclear aromatic hydrocarbons on fishes and shellfish: an overview of research in Virginia. *Mar. Environ. Res.*, 24, 237-241
20. Bergknut, M., (2006) Characterization of PAH-contaminated soils focusing on availability, chemical composition and biological effects, 5-8
21. Bernhardt, C., Derz, K., Kordel, W., Terytze, K. (2013) Applicability of non-exhaustive extraction procedures with Tenax and HPCD, *J. Hazard. Mater.* 261, 711–717
22. Bielská, L. (2013) Chemical methods for prediction of bioavailability of persistent organic pollutants in solid environmental matrices. *Research Centre for Toxic Compounds in the Environment*
23. Bogan, B.W., Sullivan, W.R. (2003) Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil, *Chemosphere* 52, 1717–1726
24. Bonten, L.T.C., Grotenhuis, T.C., Rulkens, W.H. (1999) Enhancement of PAH biodegradation in soil by physicochemical pretreatment. *Chemosphere* 38, 3627-3636
25. Boopathy R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies, *Bioresour. Technol.* 74, 63-67
26. Bosma, T.N.P., Middeldorp, P.J.M., Schraa, G., Zehnder, A.J.B. (1997) Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environmental Science and Technology* 31, 248-252
27. Brusseau, M.L., Jessup, R.E., Rao, S.C. (1991) Nonequilibrium sorption of organic chemicals: elucidation of rate-limiting processes. *Environmental Science and Technology* 25, 134–142
28. Calvet, R. (1989) *Environ. Health Perspect.* 83, 145-177
29. Calvillo, Y.M., Alexander, M., 1996. Mechanism of microbial utilization of biphenyl sorbed to polyacrylic beads. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 383–390.

30. Campos V.M., Merino I., Casado R., Pacios L.F., Gomez L. (2008) Review. Phytoremediation of organic pollutants. *Spanish J Agric Res*, 6, 38-47
31. Carlsen, L., Lassen, P., Pritzl, G., Poulsen, M. E., Willumsen, P. A., Karlson, U. (1997), Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment 190, 9-11
32. Carmichael, L.M., Christman, R.F., Pfaender, F.K. (1997) Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. *Environmental Science and Technology* 31, 126–132
33. Cerniglia, C.E. (1984) Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* 30, 31–37
34. Chekol, T. (2005) Remediation of Persistent Organic Pollutants (POPs) in Two Different Soils. *Remediation*, DOI: 10.1002/rem.20074, 117-139
35. Chiou, C.T. (1989) in *Reactions and Movement of Organic Chemicals in soils* (B.I Sawhney, K. Brown, eds), Soil Science Society of America, Madison, WI, 1-29
36. Chung, N., Alexander, M. (1998) Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. *Environ. Sci. Technol.* 32, 855–860
37. Committee on In Situ Bioremediation, Water Science and Technology Board, Commission on Engineering and Technical Systems, and National Research Council (1993) *In Situ Bioremediation: When Does It Work?* National Academy Press: Washington, D.C.
38. Connors, A. K. (1997) The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution, *Chem. Rev.* 97, 1325–1357
39. Cornelissen, G., Rigtering, H., Ferdinandy, M.M.A., Noort, P.C.M. (1998) Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environmental Science and Technology* 32, 966-970
40. Cornelissen, G., Rigterink, H., ten Hulscher, D.E.M., Vrind, B.A., van Noort, P.C.M. (2001) A simple Tenax extraction method to determine the availability of sediment-sorbed organic compounds, *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 706–711
41. Cornelissen, G., van Noort, P.C.M., Govers, H.A.J. (1998) Mechanism of slow desorption of organic compounds from sediments: a study using model sorbents. *Environmental Science and Technology* 32, 3124–3131.
42. Coulon, F., Al Awadi, M., Cowie, W., Mardlin, D., Pollard, S., Cunningham, C., Risdon, G., Arthur, P., Semple, K.T., Paton, G.I. (2010) When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial, *Environ. Pollut.* 158, 3032–3040
43. Cui, X., Mayer., P., Gan., J. (2013) Review: Methods to assess bioavailability of hydrophobic organic contaminants: Principles, operations and limitations, *Environmental Pollution* 172, 223-234

44. Cunningham S.D. Ow D.W. (1996) Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol*, 110, 715-719
45. Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., Rulkens, W. (2002) The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques, *Chemosphere* 46, 1235–1245
46. Dabestani, R., Ivanov, L. N., (1999) A Compilation of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Photochemistry and Photobiology* 70(1) pp.10-34
47. Dagley, S. (1971) Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 6, 1
48. Dagley, S., Gibson, D. T. (1965) The bacterial degradation of catechol. *J. Biochem.* 95, 466
49. Dalmacija, B. (2012) Parametri kvaliteta vode i sedimenta i tumačenje standard (imisioni standardi), Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine
50. Dalmacija, B., Agbaba, J. (2008) Zagađujuće materije u vodenom ekosistemu i remedijacioni procesi, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine
51. Das, N., Chandran, P. (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, *Biotechnol. Res. Int.*
52. Davies, J.I, Evans, W.C. (1964) Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring fission mechanism. *Biochem. J.* 91, 251
53. Decaprio, A. P., (1997), *Envir. Sci. Tech.* 31, 1837.
54. Delle Site, A. (2001) Factors affecting sorption of organic compound in natural sorbent/water system and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 30, 187-439
55. DeWitt, T.H, Jones, J.K.P, Ozretich, R.J., Swartz, R.C., Lamberson, J.O, Shults, D.W., Ditsworth, D.W., Smith, L.M., Hoselton, L. (1992) The influence of organic matter quality on the toxicity and partitioning of sediment-associated fluoranthene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 (2) 197-208
56. Divincenzo, J.P., Sparks, D.L. (1997) Slow sorption kinetics of pentachlorophenol on soil: concentration effects. *Environmental Science and Technology* 31, 977–983
57. Eriksson, M., Swartling, A., Dalhammar, G. (1998) Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solidphase micro-extraction and GCMS. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 129–134
58. Fasnacht, P. M., Blough, N. V. (2003) Mechanisms of the Aqueous Photodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Environ. Sci. Technol.* 37, (24), 5767-5772

59. Feitkenhauera, H., Schnickeb, S., Müllerc, R., Märkl, H. (2003) Kinetic parameters of continuous cultures of *Bacillus thermoleovorans* sp. A2 degrading phenol at 65 °C, *Journal of Biotechnology*, 103 (2) 129-135
60. Fries C.R., Lee R.F. (1984) Pollutant effects on the mixed function oxygenase (MFO) and reproductive systems of the marine polychaete *Nereis*, *Mar. Biol.*, 79, 187-193
61. Fritsche, W., Hofrichter, M. (2000) Aerobic degradation by microorganisms, in: *Biotechnology 11b* (J. Klein, ed.), John Wiley & Sons, New York, 146-164
62. Gevaio, B., Semple, K.T., Jones, K.C., 2000. Bound pesticide residues in soils – a review. *Environmental Pollution* 108, 3–14.
63. Ghanem, A., D’Orazio, V., Senesi, N. (2010) Phytotoxicity assay of selected plants to Pyrene contaminated soil, 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, 1-6 August 2010, Brisbane, Australia
64. Gianfreda L. and Rao M. A.: Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review, *Enzyme Microb Technol*, 35, 339–354 (2004).
65. Gibson, D.T, Subramanian, V. (1984) Microbial degradation of aromatic hydrocarbons (in) *Microbial degradation of organic compounds* (ed. D. T. Gibson) Marcel Dekker, Inc., New York, pp 181-252
66. Gleyzes, C., Tellier, S., Astruc, M. (2002) Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures *Trend Anal Chem.* 21, 451-467
67. Grifoll, M., Selifonov, S.A., Chapman, P.J. (1994) Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain '274. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2438
68. Guerin, W.F., Boyd, S.A. (1992) Differential bioavailability of soil sorbed naphthalene to two bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1142–1152
69. Guthrie, E.A., Pfaender, F.K. (1998) Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environmental Science and Technology* 32, 501–508
70. Hadibarata, T., Tachibana, S. (2009) Enhanced Chrysene Biodegradation in Presence of a Synthetic Surfactant *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Environmental Research in Asia*, (Eds., Y. Obayashi, T. Isobe, A. Subramanian, S. Suzuki and S. Tanabe), 301–308
71. Haritash, A. K., Kaushik, C. P., (2009), Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review, *Journal of Hazardous Materials* 169, (1-3), 1-15
72. Hattum, B., Curto, M. P. J., Cid, M. J. F., (1998), Polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater isopods and field-partitioning between abiotic phases, *Environ. Sci. Technol.* 34, 4064-4070

73. Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1995. Effect of ageing of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology* 29, 537–545.
74. Haus F., German J., Junter G.A. Primary biodegradability of mineral base oils in relation to their chemical and physical characteristics. *Chemosphere*. 2001, 45, 983-990.
75. Houghton, J.E., Shanley, M.S. (1994) Catabolic potential of pseudomonads: a regulatory perspective. (in) *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*. (ed. G. Rasul Chaudhry) Chapman & Hall, London, 11-32
76. Irie, T., Uekama, K. (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci*. 86, 147–62
77. Ivančev-Tumbas, I., Tričković, J., Karlović, E., Tamaš, Z., Rončević, S., Dalmacija, B., Petrović, O., Klačnja, M. (2004) GC/MS-SCAN to follow the fate of crude oil components in bioreactors set to remediate contaminated soil, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54 (4) 311–318
78. Jaarsveld, J. A., Pul, W. A. J., Leeue, F. A. (1997), Modelling transport and deposition of persistent organic pollutants in the European region, *Atm. Environm.* 31, 1011
79. James M.O. (1989) Biotransformation and disposition of PAH in aquatic invertebrates in: U. Varanasi (Ed.), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, 69-92
80. Jeffrey, A.G. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*, University of Pittsburgh, Oxford University Press
81. Jeffrey, A.M., Yeh, H.J.C., Jerina, D.M., Patel, T.R., Davey, J.F., Gobson, D.T. (1975) Initial reactions oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 14, 575
82. Jerina, D.M., Selander, H., Yagi, H., Wells, M.C., Davey, J.F., Mahadevan, V., Gibson, D.T. (1976) Dihydrodiols from anthracene and phenanthrene. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 5988
83. Joa K., Panova E., Irha N., Teinmaa E., Lintelmann J., Kirso U. (2009), Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oil shale processing wastes: current practice and new trends, *Oil Shale* 26 (1) 59–72
84. Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H. (2005) Principles of microbial PAH degradation in soil, *Environ. Pollut.* 133, 71–84
85. Juhasz, A.L., Naidu, R. (2000) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 45, 57–88
86. Kaczorek, E., Sałek, K., Guzik, U., Jesionowski, T., Cybulski, Z. (2013) Biodegradation of alkyl derivatives of aromatic hydrocarbons and cell surface properties of strains of *Pseudomonas stutzeri*, *Chemosphere* 90, 471–478

87. Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M. (1997) Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals, *Environ. Sci. Technol.* 31, 214–217
88. Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R. (2004) An overview and analysis of site remediation technologies, *J. Environ. Manage.* 2004, 71, 95-122
89. Khan, S.U., Schnitzer, M. (1972) *Geochim. Cosmochim Acta* 36, 745
90. Kim, Y. J., Osako, M., (2003) Leaching characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from spiked sandy soil, *Chemosphere* 51, 387-395
91. Kioharah, H., Nagao, K. (1978) The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 109, 69
92. Kipopoulou A.M., Manoli E., Samara C. (1999) Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environ Pollut*, 106, 369-380.
93. Knaebel DB, Federle TW, McAvoy DC, Vestel JR. 1996. Microbial mineralization of organic compounds in an acidic agricultural soil: Effects of preadsorption to various soil constituents.
94. Knox R.C., Sabatini D.A., Canter L.W. (1993) *Subsurface Transport and Fate Processes*. Lewis Publ., Boca Raton, FL, USA.
95. Kookana, R. S., Baskaran, S., Naidu, R. (1998) Pesticide fate and behaviour in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: A Review, *Aust. J. Soil Res* 36, 715-764
96. Kordybach, B., M. (1999) Sources, Concentrations, Fate and Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Environment. Part A: PAHs in Air, Institute of Soil Science and Plant Cultivation ul. Czartoryskich 9, 24-100 Pulawy, Poland, 8, (3), 131-136
97. Kormüller A., Wiesmann U. (1999) Continuous ozonation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil/water-emulsions and biodegradation of oxidation product. *Wat. Sci. Tech.*, 40, 107-114
98. Krauss, M., Wilcke, W. (2001) Biomimetic extractions of PAHs and PCBs from soil with octadecyl-modified silica disks to predict their availability to earthworms. *Environmental Science and Technology* 35, 3931–3935.
99. Lah, K. (2011) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Dostupno na: <http://toxipedia.org/display/toxipedia/Polycyclic+Aromatic+Hydrocarbons>
100. Lambert, S.M. (1967) *J. Agric. Food Chem.* 15, 572
101. Lambert, S.M. (1968) *J. Agric. Food Chem.* 16, 340
102. Lambert, S.M., Porter, P.E., Schieferstein, H. (1965) *Weeds* 13, 185
103. Lassen, P., Poulsen, M. E., Stuer-Lauridsen, F., Carlsen, L. (1997) Leaching of selected PAHs and hetero analogues from an organic matrix into synthetic ground water. Influence of dissolved humic material, *Chemosphere* 34, 335-344.
104. Lenicek, J., Sekyra, M., Pandey, P., Citkova, M., Benes, I., Novotna, J., Kocianova, S.,

105. Helaskova, J., Simonova, A. (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbons at "Program Teplice" sites in the Czech Republic, *Toxicol. Environm. Chem.* 58, 25
106. Leslie, H. A., Ter Laak, T. L., Busser, F. J. M., Kraak, M. H. S., Hermens, J. L. M. (2002) Bioconcentration of organic chemicals: is a solid-phase microextraction fiber a good surrogate for biota? *Environmental Science and Technology* 36, 5399-5404
107. Lewitas, J., Walsh, D., Williams, R., Dobias, L. (1997) *Mut. Res.* 378, 51.
108. Liste, H.H., Alexander, M. (2002) Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil, *Chemosphere* 46, 1011–1017
109. Liste, H.H., Alexander, M. (2002) Butanol extraction to predict bioavailability of PAHsin soil, *Chemosphere* 46, 1011–1017.
110. Liu, G., Niu, Z., Niekerk, D., Xue, J., Zheng, L. (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from coal combustion: emissions, analysis, and toxicology, *Rev Environ Contam Toxicol.* 1921, 1-28.
111. Liu, H., Cai, X., Chen, J. (2013) Mathematical Model for Cyclodextrin Alteration of Bioavailability of Organic Pollutants *Environ. Sci. Technol.* 47, 5835–5842, dx.doi.org/10.1021/es303724b
112. Ma, J., Xu, L., Jia, L. (2012) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. JM2 isolated from active sewage sludge of chemical plant, *J. Environ. Sci.* 24 (12) 2141-2148
113. Maagd, P.G., Hulscher, D.E.M., Heuvel, H., Opperhuizen, A., Sijm, D.T.H.M. (1998) Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: Aqueous solubilities, n octanol/water partition coefficients, and Henry's law constants, *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (2) 251-257.
114. Macek, T., Mackova, M., Kas, J. (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol Adv*, 18, 23-34.
115. MacRae, J.D., Hall, K.J. (1998) Comparison of methods used to determine the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment. *Environmental Science and Technology* 32, 3809-3815
116. Mader, B.T., Uwe-Goss, K., Eisenreich, S.J. (1997) Sorption of nonionic, hydrophobic organic chemicals to mineral surfaces. *Environmental Science and Technology* 31, 1079–1086
117. Maletić, S., Dalmacija, B., Rončević, S., Agbaba, J., Ugarčina-Perović, S. (2011) Impact of hydrocarbon type, concentration and weathering on its biodegradability in soil, *J. Environ. Sci. Health, Part A* 46 (10), 1042–1049
118. Mann, M.J. (1999) Full-scale and pilot-scale soil washing. *Journal of Hazardous Materials* 66, 119–136
119. Marini, M., Frapiccini, E. (2013) Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments in the deeper area of the Northern Adriatic Sea (Mediterranean Sea), *Chemosphere* 90, 1839- 1846

120. Marković D. A., Đarmati Š.A., Gržetić I.A., Veselinović D.S. (1996) Fizičko-hemijski osnovi zaštite životne sredine, Izvori zagađivanja, posledice i zaštita. Univerzitet u Beogradu: Beograd.
121. McNally, D. L., Mihelcic, J. R., Lueking, D. R. (1998) Biodegradation of three and four ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions, *Environ.Sci. Technol.* 32, 2633-2639
122. Mihelčić, J.R., Lueking, D.R., Mitzell, R.J., Stapleton, J.M. (1993) Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. *Biodegradation* 4, 141-153.
123. Miller, J.L., Wollum, A.G., Weber, J.B. (1997) Degradation of carbon-14-atrazine and carbon-14-metolachlor in soil from four depths. *J Environ Qual* 26:633–638.
124. Molina-Barahona, L., Vega-Logo, L., Guerrero, M., Rameriez, S., Romero, I., Vega-Jarquín, C., Ibores, A. (2005) Ecotoxicological evaluation of diesel contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environmental Toxicology* 20, 100-109.
125. Monna L., Omori T., Kodama T. (1993) Microbial degradation of dibenzofuran, fluorine, and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 285-289
126. Moore, M.N., Farrar, S.V. (1985) Effects of polynuclear aromatic hydrocarbons in lysosomal membranes in molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 17, 222-225
127. Mroziak, A., Piotrowska-Seget, Z., Labuzek, S. (2003) Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies* 12, 15–25.
128. Mueller, J.G., Cerniglia, C.E., Pritchard, P.H. (1996) In: *Bioremediation Principles and Applications; Biotechnology Research Series, Vol. 6; Cambridge University Press, Cambridge, UK*, 125-194.
129. Muir DC, Townsend BE, Lockhart WL. 1983. Bioavailability of six organic chemicals to *Chironomus tentans* larvae in sediment and water. *Environ Toxicol Chem* 2:269–281.
130. Mulligan C.N., Environmental applications for biosurfactants, *Environ. Pollut.* 2005, 133, 183-198.
131. Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F., Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Eng. Geol.* 2001, 60, 371-380.
132. Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F. (2001) An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments, *J. Hazard. Mater.* 85, 145–163
133. Nagpal, N. K., (1993), *Ambient Water Quality Criteria For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*, Ministry of Environment, Lands and Parks Province of British Columbia.
134. Nam, K., Alexander, M. (1998) Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: tests with model solids, *Environ. Sci. Technol.* 32, 71–74

135. Nam, K., Chung, N., Alexander, M. (1998) Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3785–3788
136. Nieman, J.K., Sims, R.C., McLean, J.E., Sims, J.L., Sorensen, D.L. (2001) Fate of pyrene in contaminated soils amended with alternate electron acceptors, *Chemosphere* 44, 1265-1271
137. Nikolaou, A., Kostopoulou, M., Lofrano, G., Meric, S. (2009), Determination of PAHs in marine sediments: Analytical methods and environmental concerns, *Global NEST Journal* 11 (4) 391- 405
138. Northcott, G.L., Jones, K.C. (2000) Spiking hydrophobic organic compounds into soil and sediment: a review and critique of adopted procedures, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (10) 2418–2430
139. Obuekwe C.O., Hourani G., Radwan S.S. (2001) High-temperature hydrocarbon degradation activities in Kuwaiti desert soil samples, *Folia Microbiol.*, 46, 535-539.
140. of phenanthrene in aqueous media, *Chemosphere* 83, 29–33
141. Oleszczuk, P. (2009) Application of three methods used for the evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bioaccessibility for sewage sludge composting, *Bioresour. Technol.* 100, 413–420
142. Ortega-Calvo, J.J., Tejeda-Agredano, M.C., Jimenez-Sanchez, C., Congiua, E., Sunghonga, R., Niqui-Arroyob, J.L., Cantosa, M. (2013) Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation? *J. Hazard. Mater.* 261, 733–745
143. Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J.L., Guédon, E., Guseva, E., Boudrant, J. (2011) Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation
144. Patterson, C.J., Semple, K.T., Paton, G.I. (2004) Non-exhaustive extraction techniques (NEETs) for the prediction of naphthalene mineralisation in soil, *FEMS Micro-biol. Lett.* 241, 215–220
145. Payne J.F., Kiceniuk J., Fancey L.L., Williams U., Fletcher G.L., Rahimtula A., Fowler B. (1988) What is a safe level of polycyclic aromatic hydrocarbons for fish: subchronic toxicity study on winter flounder(*Pseudopleuronectes americanus*), *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 1983- 1993.
146. Piatt, J.J., Brusseau, M.L. (1998) Rate-limited sorption of hydrophobic organic compounds by soils with well characterized organic matter. *Environmental Science and Technology* 32, 1604–1608
147. Prabhukumar, G., Pagilla, K. (2010) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Runoff Sources, Sinks and Treatment: A Review, Department of Civil, Architectural & Environmental Engineering Illinois Institute of Technology, Chicago, IL, 1-15
148. Reichenauer T.G , Germida J.J. (2008) Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil and Groundwater. *ChemSusChem*, 1, 708–717

149. Reid, B. J., Jones, K. C., Semple, K. T. (2000a) Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments—a perspective on mechanisms, consequences and assessment, *Environ. Poll.* 108, 103–112
150. Reid, B.J., Northcott, G.L., Jones, K.C., Semple, K.T. (1998) Evaluation of spiking procedures for the introduction of poorly water soluble contaminants into soil. *Environ Sci Technol* 32, 3224–3227
151. Reid, B.J., Stokes, J.D., Jones, K.C., Semple, K.T. (2000) Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability, *Environ. Sci. Technol.* 34, 3174–3179.
152. Reis, E., Lodolo, A., Miertus, S. (2007) Survey of sediment remediation technologies International Centre for Science and High Technology
153. Rhodes, A.H., McAllister, L.E., Semple, K.T. (2010) Linking desorption kinetics to phenanthrene biodegradation in soil, *Environ. Pollut.* 158, 1348–1353
154. Rippen, G., Ilgenstein, M., Klopffer, W., Poremski, H.J. (1982) *Ecotoxicol. Environ. Safety* 6, 236
155. Rittman, B., McCarty, P. (2000) *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, McGraw Hill, New York,
156. Rončević, S., Dalmacija, B., Ivančev-Tumbas, I., Tričković, J., Petrović, O., Klačnja, M., Agbaba, J. (2005) Kinetics of degradation of hydrocarbons in the contaminated soil layer, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 27–36
157. Rostami, I., Juhasz, A.L. (2013) Bioaccessibility-based predictions for estimating PAH biodegradation efficacy—comparison of model predictions and measured end-points, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85, 323–330
158. Schnoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L., Carreira L.H. (1995) Phytoremediation of Organic and Nutrient Contaminants. *Environ Sci Technol*, 29(7) 318A–323A
159. Semple, K. T., Morriss, A. W. J., Paton, G. I., (2003), Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis, *Euro. J. Soil Sci.* 54, 809–818.
160. Shen, H., Tao, S., Wang, R., Wang, B., Shen, G., Li, W., Su, S., Huang, Y., Wang, X., Liu, W., Li, B., Sun, K. (2011) Global time trends in PAH emissions from motor vehicles, *Atmospheric Environment* 45 (12) 2067–2073
161. Shi, C., Jimenez, A.F. (2006) Stabilization/solidification of hazardous and radioactive wastes with alkali-activated cements. *Journal of Hazardous Materials B137*, 1656–1663.
162. Sikka H.C., Rutkowski J.P., Kandaswami C. (1990) Comparative metabolism of benzo(a)pyrene by liver microsomes from brown bullhead and carp. *Aquat. Toxicol.* 16, 101–112

163. Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P. (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects, *J. Biotechnol. Adv.* 25, 99-121
164. Singh, O.V., Jain, R.K. (2003) Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 128–135
165. Skupinska, K., Misiewicz, I., Kasprzycka-Guttman, T., (2004), Polycyclic aromatic hydrocarbons: Physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* 61, (3), 233-240.
166. Službeni glasnik RS br. 50/2012 (2012) Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje
167. Smith, J. (1978) Environmental Pathways of Selected Chemicals in Freshwater Systems. U.S.E.P.A (Office of Research and Development), Athens, GA. EPA-600/7-78-074
168. Sojину, O.S., Sonibare, O.O., Ekundayo, O., Zeng, E.Y. (2010) Biomonitoring potentials of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by higher plants from an oil exploration site, Nigeria. *J Hazard Mater* 184, 759–764
169. Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., Hu, Z. (2011) Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons, *Marine Pollut. Bull.* 62, 2122–2128
170. Spasojević, J., Maletić, S., Rončević, S., Radnović, D., Čučak, D., Dalmacija, B. (2015) Using chemical desorption of PAHs from sediment to model biodegradation during bioavailability assessment, *Journal of Hazardous Materials* 283, 60–69
171. Stegeman, J.J., Lech, J.J. (1990) Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogens metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ Health Perspect.* 90, 101-109
172. Stelmack, P.L., Gray, M.R., Pickard, M.A. (1999) Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl Environ Microbiol* 65, 163–168.
173. Styrišave, B., Mortensen, M., Henning-Krogh, P., Andersen, O., Jensen, J. (2008) Solid-phase microextraction (SPME) as a tool to predict the bioavailability and toxicity of pyrene to the springtail, *Folsomia candida*, under various soil conditions. *Environmental Science and Technology* 42, 1332-1336
174. Surh, Y. J., Shlyankevich, M., Lee, J. W., Yoo, J. K. (1996) *Mut. Res.* 367 (219) 233-240.
175. Tao, S., Jiao, X.C., Chen, S.H., Liu, W.H., Coveney, Jr R.M., Zhu, L.Z., Luo, Y.M.(2006) Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza sativa*). *Environ Pollut*, 140, 406-415

176. Ten Hulscher, T.E.M., Postma, J., den Besten, P.J., Stroomberg, G.J., Belfroid, A., Wegener, J.W., Faber, J.H., van der Pol, J.J.C., Hendriks, A. J., van Noort, P.C.M. (2003) Tenax extraction mimics benthic and terrestrial bioavailability of organic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2258-2265
177. Thompson, D.O. (1997) Cyclodextrins-enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 14, 1–104
178. Tøndervik, A., Bruheim, P., Berg, L., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.K., Valla, S., Throne-Holst, M. (2012) *Ralstonia* sp. U2 naphthalene dioxygenase and *Comamonas* sp. JS765 nitrobenzene dioxygenase show differences in activity towards methylated naphthalenes, *J. Biosci. Bioeng.* 113 (2) 173–178
179. Totterman, A.M., Schipper, N.G., Thompson, D.O., Mannermaa, J.P. (1997) Intestinal safety of water-soluble β -cyclodextrins in paediatric oral solutions of spironolactone: effects on human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol.* 49, 43–8.
180. Trenz, S.P., Engesser, K.H., Fisher, P.,Knackmuss, H.J. (1994) Degradation of fluorene by *Brevibacterium* sp. strain DPO13611: a novel C-C bond cleavage mechanism via 1,10-dihydro 11,10-dihydroxyfluorene-9-one. *J. Bacteriol.* 176, 789
181. Tričković, J. (2009) Primena sorpcionih parametara odabranih hidrofobnih organskih polutanata na organskoj materiji sedimenta za procenu njihove dostupnosti u sistemima sediment-voda , Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine
182. Tričković, J., Ivančev-Tumbas, I., Dalmacija, B., Rončević, S., Maletić, S. (2008) XAD-4 mediated desorption of pentachlorobenzene from laboratoryspiked sediment. 5th International SedNet Conference, 27-29 May 2008, Oslo, Norway
183. Ugrinov D., Stojanov A. (2010) Bioremedijacija u tretmanu zagađenog zemljišta. *Zaštita materijala* 6, 237-244
184. USEPA (1996) US Solid waste and EPA 542-F-96-007: 1-4
185. USEPA Contaminated Sediment Remediation Guidance for Hazardous Waste Sites (2005) EPA540-R-05-012 Office of Solid Waste and Emergency Response OSWER 9355.0-85, December 2005
186. Utvik, T.I.R., Johnson, S. (1999) Bioavailability of Polycyclic Aromatic hydrocarbons in the north sea. *Environmental Science and Technology* 33, 1963-1969
187. Van der Wal, L., Jager, T., Fleuren, R.H.L.J., Barendregt, A., Sinnige, T.L., van Gestel, C.A.M., Hermens, J.L.M. (2004) Solid-Phase microextraction to predict bioavailability and accumulation of organic micropollutants in terrestrial organisms after exposure to a field-contaminated soil. *Environmental Science and Technology* 38, 4842-4848

188. Varanasi U., Stein J.E., Nishimoto M., Meichert W.I., Collier T.K. (1987) Chemical carcinogenesis in feral fish: uptake activation and detoxification of organic xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* 71, 155-170
189. Venkata Mohan, S., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, A.R., Shimizu, Y. (2006) Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev Environ Sci Biotechnol* 5, 347–374
190. Viglianti, C., Hanna, K., de Brauer, C., Germain, P. (2006) Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged-contaminated soil using cyclodextrins: Experimental study, *Environmental Pollution* 140, 427-435
191. Vila, J., Lopez, Z., Sabate, J., Minguillon, C., Solanas, A.M., Grifoll, M. (2001) Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5497
192. Voncina, B., Vivod, V. (2013) Cyclodextrins in Textile Finishing <http://dx.doi.org/10.5772/53777>
193. Vrvic, M. (2008) Remedijacija: stanje-očekivanja-izazovi, Zbornik radova II Međunarodna naučna konferencija “Remedijacija, stanje i perspektive u zaštiti životne sredine”. Privredna komora Srbije - Odbor za zaštitu životne sredine i održivi razvoj: Beograd.
194. Watanabe, K. (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12, 237–241
195. Widdows, J., Donkin, P., Evans, S.V. (1985) Recoverz of *Mytilus edulis* L. from chronic oil exposure, *Mar. Environ. Res.*, 17, 250-253
196. Wild, S. R., Jones, K. C., (1995) Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget, *Environm. Poll.* 88, 91.
197. Wise, D.L., Trantolo, D.J., Cichon, E.J., Inyang, H.I., Stottmeister, U. (Eds.) (2000), *Remediation Engineering of Contaminated Soils*, Marcel Decker, NY, USA.
198. Xing, B., Pignatello, J.J. (1997) Dual-model sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. *Environmental Science and Technology* 31, 792–799
199. Xu, S. S., Liu, W. X., Tao, S. (2006), Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons in China, *Environmental Science and Technology* 40, 702-708
200. Yeom, I.T., Ghosh, M.M., Cox, C.D., Ahn, K.H. (1996) Dissolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from weathered contaminated soil. *Water Science and Technology* 34, 335–342
201. Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., Xu, P. (2011) Degradation of n-alkanes and poly-cyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8, *Bioresour. Technol.* 102, 4111–4116

202. Zhong, Y., Luan, T., Lin, L., Liu, H., Tamb, N.F.Y. (2011) Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp, *Bioresour. Technol.* 102, 2965–2972

Prilog 1.*Biohemijske karakteristike dva soja Stenotrophomonas maltophilia*

Šupljina	Test	Skraćenica	Veličina/ šupljina	MO1	MO2
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0,0384 mg	+	+
3	ADONITOL	ADO	0,1875 mg	-	-
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0,018 mg	-	-
5	L-ARABITOL	IARL	0,3 mg	-	-
7	D-CELLOBIOSE	dCEL	0,3 mg	-	-
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0,036 mg	-	+
10	H ₂ S PRODUCTION	H ₂ S	0,0024 mg	-	-
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0,0408 mg	+	+
12	Glutamyl Arylamidase pNA	AGLip	0,0324 mg	-	-
13	D-GLUCOSE	dGLU	0,3 mg	-	-
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	GGT	0,0228 mg	+	(-)
15	FERMENTION/ GLUCOSE	OFF	0,45 mg	-	-
17	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0,036 mg	+	+
18	D-MALTOSE	dMAL	0,3 mg	-	-
19	D-MANNITOL	dMAN	0,1875 mg	-	-
20	D-MANNOSE	dMNE	0,3 mg	-	-
21	BETA-XYLOSIDASE	BXYL	0,0324 mg	-	-
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	BAlap	0,0174 mg	-	-
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0,0234 mg	+	+
26	LIPASE	LIP	0,0192 mg	+	+
27	PALATINOSE	PLE	0,3 mg	-	-
29	Tyrosine ARYIAMIDASE	TyrA	0,0276 mg	-	-
31	UREASE	URE	0,15 mg	-	-
32	D-SORBITOL	dSOR	0,1875 mg	-	-
33	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0,3 mg	-	-
34	D-TAGATOSE	dTAG	0,3 mg	-	-
35	D-TREHALOSE	dTRE	0,3 mg	-	-
36	CITRATE (SODIUM)	CIT	0,054 mg	+	-
37	MALONATE	MNT	0,15 mg	-	-
39	5-KETO-D-GLUCONATE	5KG	0,3 mg	-	-
40	L-LACTATE alkalisation	ILAM	0,15 mg	+	+
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,036 mg	+	+
42	SUCCINATE alkalisation	SUCT	0,15 mg	+	+
43	Beta-N-ACETYL- GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0,0306 mg	-	-

Biohemijske karakteristike dva soja Stenotrophomonas maltophilia (nastavak)

44	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0,036 mg	-	+
45	PHOSPHATASE	PHOS	0,0504 mg	+	+
46	Glycine ARYLAMIDASE	GlyA	0,012 mg	-	(-)
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	ODC	0,3 mg	-	-
48	LYSINE DECARBOXYLASE	LDC	0,15 mg	-	-
53	l-HISTIDINE assimilation	IHISa	0,087 mg	-	-
56	COURMARATE	CMT	0,126 mg	-	-
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0,0379 mg	-	-
58	0/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	0129R	0,0105 mg	-	-
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	GGAA	0,0576 mg	-	+
61	L-MALATE assimilation	IMLTa	0,042 mg	-	-
62	ELLMAN	ELLM	0,03 mg	-	-
64	L-LACTATE assimilation	ILATa	0,186 mg	-	-

* Brojevi između 1 i 64 koji nisu navedeni su prazni

Card:	GN	GN
Lot No:	241270040	241270040
Vreme analize (h):	3,5	10,25
Verovatnoća (%):	99	85
Bio-broj	1022103001740000	1420103000760020
Slaganje:	Jako dobro	Prihvatljivo

BIOGRAFIJA



Ime i prezime: Jelena Spasojević

Datum rođenja: 06.01.1987.

Mesto rođenja: Novi Sad, Republika Srbija.

Obrazovanje:

2011 – Stekla zvanje master hemičar-kontrole kvaliteta i upravljanja životnom sredinom na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine sa prosečnom ocenom 9,64.

2011 – Upisala doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, gde je položila sve ispite sa prosečnom ocenom 10,00.

Zaposlenje:

2012 – Istraživač-pripravnik na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu

2014 – Istraživač-saradnik na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu

2015 – Asistent na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu

Publikacije:

Autor i koautor 20 saopštenja sa domaćih naučnih skupova (M63), 8 radova sa međunarodnih skupova (M33), 1 saopštenja sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34), 1 saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64) i koautor na 2 rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), koautor po jednog poglavlja u dve knjige (M45) i koautor jednog tehničkog rešenja (M83) sa ukupnim indeksom kompetentnosti 40,7.

Članstvo u naučnim i drugim asocijacijama:

Aktivan je član Marketing tima PMF-a. Član je Srpskog hemijskog društva - Hemijskog društva Vojvodine.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije: monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa: tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada: doktorska disertacija

VR

Autor: msc Jelena Spasojević

AU

Mentor: dr Srđan Rončević, vanredni profesor PMF-a u Novom Sadu

MN

Naslov rada:

Karakterizacija bioremedijacionih procesa u sedimentima zagađenim policikličnim aromatičnim ugljovodonicima i procena biodostupnosti

NR

Jezik publikacije: srpski (latinica)

JP

Jezik izvoda: srpski/engleski

JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina

ZGP

Godina: 2015.

GO

Izdavač: Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

MA

Fizički opis rada: (6/133/202/29/55/-/1)

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

FO

Naučna oblast: hemija

NO

Naučna disciplina: Zaštita životne sredine

ND

Predmetna odrednica/Ključne reči: sediment, sorpcija, desorpcija, policiklični aromatični ugljovodonici, biodostupnost

PO

UDK:

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

ČU

Važna napomena:

VN

Izvod: U okviru ovog istraživanja ispitani su: 1. Optimalni uslovi za eksperimente biodegradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim i različitim brojem prstenova; 2. Uticaj strukture i matriksa na biodegradaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika sa istim brojem prstenova; 3. Fitotoksičnost biljaka (testovi klijavosti i usvajanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika); 4. Procena potencijalne biodostupne frakcije primenom različitih hemijskih sorbenata (HPCD, β CD i MCD, XAD4 i TenaxTA) i 5. Korelacija dobijenih rezultata testovima biodegradacije, testovima klijavosti, testovima fitotoksičnosti i rezultata dobijenih iz eksperimenta procene biodostupnosti hemijskim testovima. Rezultati su pokazali da se optimalni uslovi za biodegradaciju postižu dodatkom mineralnih medijuma, inokuluma i surfaktanata. Posmatrajući uticaj sadržaja gline i organske materije i strukture molekula, najveći stepen biorazgradnje ima fluoranten, što je u skladu sa njegovim fizičko-hemijskim osobinama, dok se sadržaj pirena i krizena nije mogao jasno korelirati sa sadržajem organske materije i gline. Što se tiče testova fitotoksičnosti, sva semena su proključala, što govori u prilog tome da mešavina ovih kontaminanata pri ispitivanim koncentracijama nije inhibirala

klijanje biljaka. Testovi usvojivosti ispitivanih PAH-ova su pokazali da je najmanji procenat usvojivosti semenom dobijen za benzo(a)piren, što se može objasniti njegovom kompleksnijom strukturom. Hemijskim testovima za procenu biodostupnosti je sa druge strane pokazano da se desorpcija u prisustvu MCD, XAD4 smole i Tenaxa može koristiti kao jednostavna metoda za procenu potencijalne biodostupne frakcije organskih jedinjenja u sistemima sediment - voda.

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN Veća: 2015.

DP

Datum odbrane: 2015.

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik: dr Božo Dalmacija, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, *predsednik*

Član: dr Srđan Rončević, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, *mentor*

Član: dr Dragan Radnović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, *član*

Član: dr Snežana Maletić, docent Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, *član*

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

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: monographic publication
DT

Type of record: textual material, printed
TR

Contents code: theses
CC

Author: Jelena Spasojević, MSc.
AU

Mentor: dr Srđan Rončević, Associate Professor
MN

Title: Characterisation of bioremediation processes in sediment contaminated
with polycyclic aromatic hydrocarbons and bioavailability assessment
TI

Language of text: Serbian
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: AP Vojvodina
LP

Publication year: 2015
PY

Publisher: Authors reprint

PU

Publ.place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

PP

Physical description: (6/133/202/29/55/-/1)

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

PD

Scientific field: Chemistry

SF

Scientific discipline: Environmental protection

SD

Subject/Key Words: sediment, sorption, desorption, polycyclic aromatic hydrocarbons, bioavailability

SKW

UC:

Holding data: Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection (library), 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

HD

Note:

N

Abstract: The aim of this study was to investigate: 1. The optimal conditions for the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with the same and different numbers of rings; 2. The impact of structure and matrix biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with the same number of rings; 3. Phytotoxicity (germination tests and polycyclic aromatic hydrocarbon uptake); 4. The means for assessing the bioavailable fractions using various chemical sorbents (HPCD, β CD, MCD, XAD4 and TenaxTA) and 5. The correlation between the results of the biodegradation tests, germination tests, phytotoxicity tests and the results obtained from the experiments in the assessment of bioavailability and chemical tests. The results showed that the optimal conditions for biodegradation are achieved by the addition of mineral media, inoculum and surfactants. When considering the effect of the contents of clay and organic matter and the structure of the molecules, the highest degree of biodegradation was observed with fluoranthene, which is in line with its physico-chemical properties. The concentrations of pyrene and chrysene were not clearly correlated with the organic matter and clay contents. During the phytotoxicity tests, all seeds sprouted, which speaks in favor of a mixture of these contaminants not inhibiting the germination of the plants. Tests for the uptake of the investigated PAHs showed that the lowest percentage seed uptake

was for benzo(a)pyrene, which is explained by its more complex structure. Chemical tests for evaluating bioavailability have shown that desorption in the presence of MCD, XAD4 and Tenax resins can be used as a simple method for the evaluation of a potential bioavailable fraction of organic compounds in water-sediment systems.

A

Accepted by the Scientific Board on: 2015.

ASB

Defended: 2015.

DE

Thesis defends board:

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

President: Dr. Božo Dalmacija, Full Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Member: Dr. Srđan Rončević, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Member: Dr. Dragan Radnović, Full Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Member: Dr. Snežana Maletić, Assistant Professor, Faculty of Science, Novi Sad

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